

**Regulation und Funktion des Enzyms  
11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 im  
Skelettmuskelmetabolismus**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

( Dr. rer. nat. )

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Master of Science Ökotrophologin Katrin Biedasek

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Stefan Hecht PhD

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Joachim Spranger  
2. Prof. Dr. Gudrun Brockmann  
3. Prof. Dr. Werner Kloas

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2012

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Formelverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Kurzfassung.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>X</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XII</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Skelettmuskelgewebe .....	1
1.1.1 Anatomie des Skelettmuskels .....	1
1.1.2 Myosin-Heavy Chain Isoformen und Muskelfasertypen.....	3
1.1.3 Skelettmuskelentwicklung und -differenzierung .....	4
1.1.3.1 Die Muskel-Differenzierungsmarker .....	4
1.1.3.2 Differenzierung von Muskelzellen <i>in-vitro</i> .....	7
1.2 Proteolyse .....	9
1.2.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) .....	10
1.2.2 Die Ubiquitin-Ligasen MuRF-1 und Atrogin-1 .....	11
1.3 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenasen (11beta-HSD) .....	12
1.3.1 Cortisol-Metabolismus.....	12
1.3.2 Funktion der 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (11beta-HSD) im Cortisol-Metabolismus.....	13
1.3.3 11beta-HSD1 und das metabolische Syndrom .....	14
1.3.3.1 Das metabolische Syndrom – Definition und Prävalenzen.....	14
1.3.3.2 Bedeutung der 11beta-HSD1 im metabolischen Syndrom .....	15
1.3.4 11beta-HSD1 im Skelettmuskelgewebe.....	16
1.4 Zielstellung der Arbeit.....	18
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1 Zellkultur .....	19
2.1.1 Skelettmuskelzellen.....	19

2.1.2	Stimulationen.....	19
2.1.2.1	Chronische Stimulation .....	20
2.1.2.2	Akute Stimulation .....	20
2.1.3	Transfektionen.....	20
2.1.3.1	Transfektion der 11beta-HSD1 Promotorfragmente .....	21
2.1.3.2	RNA interference.....	21
2.1.3.3	Doppel-Transfektion von Myogenin siRNA und 11beta-HSD1 Promotorkonstrukten .....	22
2.1.3.4	Doppel-Transfektion von 11beta-HSD1 siRNA und GRalpha siRNA .....	23
2.1.4	Immunhistochemische Färbung .....	23
2.2	Molekularbiologische und biochemische Methoden .....	24
2.2.1	RNA-Analytik .....	24
2.2.1.1	RNA-Isolation und cDNA Synthese.....	24
2.2.1.2	Semi-quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	24
2.2.2	Protein-Analytik .....	26
2.2.2.1	Protein-Isolation und Bestimmung der Proteinkonzentration.....	26
2.2.2.2	SDS Page und Western Blot.....	27
2.2.2.3	Immunodetektion.....	27
2.2.3	11beta-HSD1 Promotoranalyse .....	28
2.2.3.1	<i>In-silico</i> Analyse .....	29
2.2.3.2	Mutagenese der 11beta-HSD1 Promotorfragmente .....	29
2.2.3.3	Dual-Luciferase-Assay .....	30
2.2.4	11beta-HSD1 Enzymaktivität .....	30
2.2.5	Proteolyse-Assay .....	31
2.2.6	Glukoseaufnahme-Assay .....	32
2.3	Statistische Auswertung.....	33
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
3.1	Analyse der 11beta-HSD1 in der Skelettmuskeldifferenzierung .....	34
3.1.1	Expressionsverlauf der Muskel-Differenzierungsmarker während der Skelettmuskelzellendifferenzierung.....	34

3.1.2	Die 11beta-HSD1 Transkription und Reduktase-Enzymaktivität in Skelettmuskelzellen.....	37
3.1.3	Stimulationsversuche mit Glucocorticoiden und dem 11beta-HSD1-Hemmer Carbenoxolon in Muskelzellen .....	38
3.1.3.1	Effekte einer chronischen Stimulation.....	38
3.1.3.2	Effekte einer akuten Stimulation .....	48
3.1.3.3	Effekte auf die Glukoseaufnahme .....	53
3.1.4	11beta-HSD1 Promotoranalyse in der Muskeldifferenzierung.....	54
3.1.4.1	Basale 11beta-HSD1-Promotoraktivität in C2C12 .....	54
3.1.4.2	Veränderung der 11beta-HSD1 Promotoraktivität unter Zusatz von Cortison während der Differenzierung .....	56
3.1.4.3	Analyse potenzieller Bindungsstellen von Myogenin und MEF2 im 11beta-HSD1 Promotor .....	57
3.1.5	Auswirkungen eines Myogenin Knock-downs via siRNA auf 11beta-HSD1 und die Muskeldifferenzierung .....	58
3.1.5.1	11beta-HSD1 und GRalpha .....	58
3.1.5.2	Muskel-Differenzierungsmarker .....	60
3.1.6	Auswirkungen eines MEF2c knock-downs via siRNA auf 11beta-HSD1 und die Muskeldifferenzierung .....	61
3.1.6.1	11beta-HSD1 und GRalpha .....	61
3.1.6.2	Muskel-Differenzierungsmarker .....	62
3.2	11beta-HSD1 in der Muskel-Proteolyse.....	64
3.2.1	11beta-HSD1-abhängige Proteolyse .....	64
3.2.2	11beta-HSD1-abhängige Transkription der Proteolyse-Marker Atrogin-1 und MuRF-1 .....	65
3.3	Veränderungen der MyHC-Isoformen.....	67
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>69</b>
4.1	Die 11beta-HSD1 in Skelettmuskelzellen und deren Regulation während der Differenzierung.....	69
4.2	Intrazellulärer Feed-Forward-Mechanismus der Glucocorticoide und gleichzeitige Gegenregulation des GRalpha in Skelettmuskelzellen.....	72
4.3	11beta-HSD1-abhängige Wirkungen von Glucocorticoiden auf die Skelettmuskeldifferenzierung und Muskelfasertypen.....	75

4.4	11beta-HSD1-abhängige Wirkungen von Glucocorticoiden auf die Proteolyse in Skelettmuskelzellen.....	77
4.5	11beta-HSD1-abhängige Wirkungen von Glucocorticoiden auf die Insulinsensitivität in Skelettmuskelzellen.....	79
4.6	Zusammenfassung.....	81
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>97</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt durch einen Skelettmuskel .....	1
Abbildung 2: Die Feinstruktur des Skelettmuskels.....	2
Abbildung 3: Struktureller Vergleich der Myogenetischen Regulationsfaktoren .....	5
Abbildung 4: Modell der MEF-2c Regulation während der Skelettmuskelentwicklung.....	7
Abbildung 5: Prozentuale Fusion der Myoblasten in C2C12 Zellen während der Myogenese in Abhängigkeit des Differenzierungsstadiums .....	8
Abbildung 6: Verlauf der Proteinexpression der Myogenetischen Regulationsfaktoren .....	9
Abbildung 7: Das Ubiquitin-Proteasom-System.....	11
Abbildung 8: Umwandlung von Cortisol und Cortison durch die Enzyme 11beta-HSD1 und 11beta-HSD2 .....	14
Abbildung 9: Transfektionseffizienz von pMaxGFP .....	21
Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung von MyHC in differenzierten primären humanen Myotuben .....	34
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung von MyHC in differenzierten C2C12 Myotuben .....	35
Abbildung 12: mRNA Expression der Muskeldifferenzierungsmarker im Differenzierungsverlauf.....	35
Abbildung 13: Proteinexpression von MyHC und Myogenin im Differenzierungsverlauf.....	36
Abbildung 14: Proteinexpression von CREB und pCREB im Differenzierungsverlauf.....	36
Abbildung 15: Proteinexpression von Atrogin-1 und MuRF-1 im Differenzierungsverlauf.....	37
Abbildung 16: Anstieg der 11beta-HSD1 während der Differenzierung.....	38
Abbildung 17: 11beta-HSD1 bei chronischer Stimulation.....	39
Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung von 11beta-HSD1 bei chronischer Stimulation in differenzierten C2C12 Myotuben .....	39
Abbildung 19: GRalpha bei chronischer Stimulation.....	40
Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung von GRalpha bei chronischer Stimulation in differenzierten C2C12 Myotuben .....	41
Abbildung 21: Myf5 und MyoD bei chronischer Stimulation.....	42
Abbildung 22: MRF4 und MEF2c bei chronischer Stimulation.....	43
Abbildung 23: Myogenin bei chronischer Stimulation.....	44
Abbildung 24: MyHC-1 bei chronischer Stimulation.....	45
Abbildung 25: pAkt/Akt bei chronischer Stimulation.....	46
Abbildung 26: pCREB/CREB bei chronischer Stimulation.....	47
Abbildung 27: Immunhistochemische Färbung von CREB bei chronischer Stimulation in differenzierten C2C12 Myotuben .....	47
Abbildung 28: 11beta-HSD1 bei akuter Stimulation.....	49
Abbildung 29: GRalpha und MR bei akuter Stimulation.....	50

Abbildung 30: MyoD und Myf5 bei akuter Stimulation. ....	51
Abbildung 31: Myogenin, MRF4 und MyHC-1 (mRNA) bei akuter Stimulation.....	51
Abbildung 32: Myogenin und MyHC (Proteinexpression) bei akuter Stimulation. ....	52
Abbildung 33: Glut4 und Glut1 bei akuter Stimulation. ....	52
Abbildung 34: pAkt/Akt bei akuter Stimulation. ....	53
Abbildung 35: Glucoseaufnahme bei akuter Stimulation. ....	54
Abbildung 36: 11beta-HSD1 Promotoraktivität in Abhängigkeit der Differenzierung.....	55
Abbildung 37: 11beta-HSD1 Promotoraktivität bei Cortison-Stimulation.....	56
Abbildung 38: 11beta-HSD1 Promotoraktivität der mutierten Fragmente.....	57
Abbildung 39: Knock-down von Myogenin mittels siRNA .....	58
Abbildung 40: Auswirkungen des Myogenin siRNA-Knock-downs auf 11beta-HSD1 und GRalpha (mRNA).....	59
Abbildung 41: Auswirkungen des Myogenin siRNA-Knock-downs auf die 11beta-HSD1 Promotoraktivität.....	59
Abbildung 42: Auswirkungen des Myogenin siRNA Knock-downs auf MRF4, MyHC-1 und MEF2c.....	60
Abbildung 43: Knock-down von MEF2c mittels siRNA .....	61
Abbildung 44: Auswirkungen des MEF2c siRNA-Knock-downs auf die 11beta-HSD1 mRNA Expression. ....	62
Abbildung 45: Auswirkungen des MEF2c siRNA-Knock-downs auf die 11beta-HSD1 Promotoraktivität.....	62
Abbildung 46: Auswirkungen des MEF2c siRNA-Knock-downs auf Myf5, MyoD, MyHC-1 und Myogenin an D3.....	63
Abbildung 47: Auswirkungen des MEF2c siRNA Knock-downs auf Myf5 und Myogenin an D6. ....	64
Abbildung 48: Prozentuale Proteindegradation bei akuter Stimulation.....	65
Abbildung 49: Atrogin-1 und MuRF-1 bei akuter Stimulation.....	66
Abbildung 50: Myosin Heavy Chain Isoformen (mRNA) bei akuter Stimulation. ....	68
Abbildung 51: MyHCslow und MyHCfast Proteinexpression bei chronischer Stimulation.....	68
Abbildung 52: 11beta-HSD1 und GRalpha Expression im Verlauf der Differenzierung von Skelettmuskelzellen .....	70

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: MyHC-Isoformen und Muskelfasertypen .....	4
Tabelle 2: Stimulationssubstanzen.....	20
Tabelle 3: Pipettierschema für RNAi in verschiedenen Well-Formaten .....	22
Tabelle 4: Primäre und sekundäre Antikörper für die Immunohistochemie .....	24
Tabelle 5: Primer für die qRT-PCR .....	26
Tabelle 6: Primäre und sekundäre Antikörper für die Immunodetektion.....	28
Tabelle 7: 11beta-HSD1 Promotorfragmente.....	28
Tabelle 8: Darstellung der Bindungsmatrizen der Transkriptionsfaktoren Myogenin und MEF2.....	29
Tabelle 9: Mutagenese der 11beta-HSD1 Promotorfragmente F4 und F5.....	30
Tabelle 10: Knock-down von 11beta-HSD1 und GRalpha mittels Einzel- und Doppel-siRNA- Behandlung .....	67

## Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der relativen Veränderung der mRNA-Level .....	25
Formel 2: Berechnung der 11beta-HSD1-Reduktase-Aktivität .....	31
Formel 3: Berechnung der Proteolyserate in Prozent.....	32
Formel 4: Berechnung der Glukoseaufnahme .....	32



## Kurzfassung

Das Enzym 11beta-HSD1 stellt im intrazellulären Glucocorticoidstoffwechsel eine wichtige Präzeptorkontrolle dar. Es reguliert die intrazelluläre Cortisolkonzentration durch die enzymatische Umwandlung des aus dem Blutkreislauf aufgenommenen und hormonell inaktiven Cortisons zum aktiven Cortisol. Die 11beta-HSD1 wird ubiquitär exprimiert, mit den höchsten Expressionen in Leber und Fettgewebe, aber auch im Muskelgewebe. Die Bedeutung einer erhöhten 11beta-HSD1 Expression und Aktivität bei der Entstehung von Übergewicht und Insulinresistenz wurde bisher vorwiegend in der Leber und im Fettgewebe untersucht und nachgewiesen. Wenig erforscht sind allerdings die Funktionen der 11beta-HSD1 im Muskelgewebe. Bisher war die klinische Bedeutung der chronischen Glucocorticoidbehandlung auf den Skelettmuskel bekannt, welche u.a. zur Muskelatrophie führen kann. Die Datenlage über eine veränderte 11beta-HSD1 Expression und Enzymaktivität im Skelettmuskel von Diabetikern und Übergewichtigen ist divergent, eine Hemmung der 11beta-HSD1 wirkte sich allerdings günstig auf den Insulinsignalweg und die Glucoseaufnahmefähigkeit in die Skelettmuskelzellen aus. Welche Bedeutung der 11beta-HSD1 sowohl bei Regulation der Muskeldifferenzierung, als auch -proteolyse zukommt, wurde bisher noch wenig untersucht.

Zur Untersuchung der Funktion und Regulation der 11beta-HSD1 im Skelettmuskel wurden die murine Skelettmuskelzelllinie C2C12 und primäre humane Myoblasten von gesunden Probanden verwendet. Die Enzymaktivität, Expression und basale Promotoraktivität der 11beta-HSD1 wurden in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades analysiert. Anhand akuter und chronischer Stimulationen mit Cortison und dem 11beta-HSD Hemmer Carbenoxolon wurden die Auswirkungen einer Erhöhung bzw. Erniedrigung der 11beta-HSD1-Aktivität auf die Differenzierung, Proteolyse, Muskelfasertypen und Glucoseaufnahmekapazität untersucht. Um die Regulationsmechanismen näher zu analysieren, wurden anhand einer *in-silico* Analyse des distalen Promotorbereiches der 11beta-HSD1 potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert, welche an der Regulation der Differenzierung beteiligt sein könnten. Mittels siRNA Technologie und zielgerichteter Mutationen von 11beta-HSD1 Promotorfragmenten wurden die Auswirkungen auf die Promotoraktivität und Expression der 11beta-HSD1, aber auch anderer wichtiger Faktoren im Kontext mit dem Verlust der Bindungsstelle bzw. des Transkriptionsfaktors näher untersucht.

Es konnte demonstriert werden, dass die 11beta-HSD1 in humanen und murinen Skelettmuskelzellen in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades exprimiert wird und als Oxo-Reduktase aktiv ist, sowie selbst einen Regulator der Differenzierung darstellt. Anhand der Stimulationsversuche zeigte sich ein Feed-Forward-Mechanismus des Cortisons, das die 11beta-HSD1 in den Skelettmuskelzellen akut und chronisch induzierte. Gleichzeitig veränderten sich die GRalpha- und MRalpha-Expressionen gegenregulatorisch zur 11beta-HSD1. Es zeigte sich, dass die Daten aus der Mauszelllinie zum größten Teil in humanen primären Myoblasten bestätigt

werden konnten. Zudem konnten mehrere Transkriptionsfaktoren wie CREB, Myogenin und MEF-2c identifiziert werden, die in den verschiedenen Phasen der Differenzierung unterschiedliche Relevanz für die Regulation der 11beta-HSD1 Promotoraktivität hatten. Des Weiteren wurden die Proteolyserate und die Expressionen der zwei E3-Ubiquitin-Ligasen Atrogin-1 und MuRF-1 11beta-HSD1-abhängig durch Cortison induziert. Trotz alledem führte eine Langzeit-Stimulation mit Cortison zu einer 11beta-HSD1-abhängigen Induktion der Differenzierung mit einer Veränderung der Muskelfasertypen in Richtung langsam-zuckender Muskelfasern.

Die Funktion und Regulation der 11beta-HSD1 in Skelettmuskelzellen konnten anhand dieser Ergebnisse näher charakterisiert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der 11beta-HSD1 einerseits eine wichtige Rolle in der Differenzierung der Skelettmuskelzellen zukommt, andererseits aber auch in der Skelettmuskelproteolyse. Zudem zeigte sich, dass die Muskelfasertypen 11beta-HSD1-abhängig reguliert werden, was eine Bedeutung für das klinische Bild der glucocorticoid-induzierten Muskelatrophie haben kann. Des Weiteren konnte ein Teil des Regulationsmechanismus der 11beta-HSD1 aufgeklärt werden.

## Abstract

The enzyme 11 $\beta$ -HSD1 functions as an important pre-receptor control of intracellular glucocorticoid action regulating the intracellular cortisol concentration by enzymatic conversion of the hormonal inactive cortisone up-taken from blood circulation to the active cortisol. 11 $\beta$ -HSD1 is ubiquitously expressed with the highest expression measured in liver and adipose tissue but also in muscle tissue. A pivotal role of an increased 11 $\beta$ -HSD1 expression and activity for the development of overweight and insulin resistance has been analyzed and demonstrated particularly in liver and adipose tissue. However, the functions of 11 $\beta$ -HSD1 in skeletal muscle tissue are rarely investigated. Hitherto clinical effects of chronic glucocorticoid treatments causing amongst others muscle atrophy were known. Published data concerning alterations of 11 $\beta$ -HSD1 expression and enzyme activity in skeletal muscle of diabetic or overweight individuals are divergent but an 11 $\beta$ -HSD1 inhibition improved insulin signaling pathway and glucose uptake in skeletal muscle cells. However, the role of 11 $\beta$ -HSD1 in the regulation of skeletal muscle differentiation as well as proteolysis is still rarely analysed.

For analysis of the 11 $\beta$ -HSD1 in skeletal muscle the murine skeletal muscle cell line C2C12 as well as primary human myoblasts from healthy volunteers were used. 11 $\beta$ -HSD1 enzyme activity, expression and promoter activity were determined in dependence on the differentiation state. In acute and chronic stimulation experiments using cortisone and the 11 $\beta$ -HSD1 inhibitor carbenoxolone the effects of an increased and reduced 11 $\beta$ -HSD1 activity on differentiation, proteolysis, muscle fiber type conversion and glucose uptake were investigated. To further characterise the regulation mechanisms an *in-silico* analysis of the distal promoter region of 11 $\beta$ -HSD1 was conducted to identify potential transcription factor binding sites involved in the regulation of differentiation. Via siRNA technology and site-directed mutations within 11 $\beta$ -HSD1 promoter fragments the consequences of the missing binding site or transcription factor respectively on the promoter activity and expression of 11 $\beta$ -HSD1 and other relevant factors were analysed.

11 $\beta$ -HSD1 was shown to be expressed and functionally active as oxo-reductase in human and murine skeletal muscle cells dependent on the differentiation but as well to function as a regulator of differentiation itself. The stimulation experiments revealed a feed-forward-mechanism of cortisone that induced 11 $\beta$ -HSD1 acutely and chronically. Concurrently, GR $\alpha$  and MR $\alpha$  were expressed contra-regulatory to 11 $\beta$ -HSD1. For the most part these data were confirmed in human primary myoblasts. Several transcription factors as CREB, Myogenin and MEF-2c were identified having different relevance for regulation of 11 $\beta$ -HSD1 promoter activity during the different phases of differentiation. Furthermore, treatment with cortisone increased protein degradation and expression of the two E3-ubiquitin-ligases Atrogin-1 and MuRF-1 in an 11 $\beta$ -HSD1-dependent way. Nonetheless, a long-term stimulation by cortisone revealed an 11 $\beta$ -

HSD1-dependent induction of differentiation accompanied by modification of muscle fiber type composition towards slow-twitch muscle fibers.

In this work the function and regulation of 11beta-HSD1 in skeletal muscle cells were further characterised. This work demonstrated that 11beta-HSD1 on the one hand promoted the differentiation of skeletal muscle cells but on the other hand regulated skeletal muscle proteolysis. Furthermore, muscle fiber type composition was shown to be modified in an 11beta-HSD1-dependent way. Additionally, the regulation mechanisms behind were further clarified.

## Abkürzungsverzeichnis

11beta-HSD1	11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1
ADP	Adenosin-Diphosphat
ALS	Amyotrophische Lateralsklerose
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
bHLH	basische Helix-Loop-Helix
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
cAMP	cyclische Adenosin-3',5'-monophosphat
CBG	Cortisol-Binding-Globulin/Transcortin
Cbx	Carbenoxolon
Ci	Curie
CREB	cAMP response element-binding protein
D0	Tag 0: Beginn der Differenzierung
D12	Tag 12 der Differenzierung
D16	Tag 16 der Differenzierung
D6	Tag 6 der Differenzierung
Dexa	Dexamethason
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	disintegrations per minute (Zerfälle pro Minute)
DTT	Dithiothreitol
E	Cortison
EDL	Musculus extensor digitorum longus
F	Cortisol
FFA	freie Fettsäuren
FKS	Fetales Kälberserum
GR	Glucocorticoidrezeptor
H6PD	Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HBSS	Hanks gepufferte Salzmischung
HDL	High-density lipoprotein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HRE	Hormon-Response-Element
HRP	Horseradish-Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSD11B1	11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1
HSP	Hitzeschockprotein
Id	Inhibitor of DNA binding factor
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
M	Molar (mol/L)
MAFbx	Muscle Atrophy F-box
MEF	Myocyte Enhancer Factor
MR	Mineralocorticoidrezeptor
MRF	myogenetische Regulationsfaktoren
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MuRF	Muscle RING Finger
MW	Mittelwert
MyHC	Myosin Heavy Chain

n	Anzahl der Versuche
NAD/H	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP/H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NK	Negativkontrolle
Pax	Paired-homeodomain-transcription factor
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
qRT-PCR	semi-quantitative Real-Time-PCR
RNAi	RNA interference
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
siRNA	small interfering RNA
SOL	Musculus soleus
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS/T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
vs.	versus

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Skelettmuskelgewebe

### 1.1.1 Anatomie des Skelettmuskels

Die Skelettmuskulatur wird auch als quergestreifte Muskulatur bezeichnet und stellt ein Organ bestehend aus einem System kontraktile Zellen mit der Fähigkeit zur Kontraktion (Anspannung) und Relaxation (Entspannung) dar.

Der Skelettmuskel (Abbildung 2A) ist von einer Bindegewebsschicht, dem Epimysium, umhüllt, welches an den Enden über Sehnen am Knochen verankert ist und aus langen Faserbündeln (Abbildung 2B) besteht, die meistens die Gesamtlänge des Muskels durchlaufen. Die einzelnen Faserbündel werden von einer Basalmembran, dem Perimysium umgeben und setzen sich aus parallel verlaufenden Muskelfasern (Abbildung 2C) zusammen. Jede Muskelfaser stellt eine Zelle mit mehreren Zellkernen dar, da sie durch Fusion einzelner embryonaler Myoblasten entstanden ist. Die Muskelfaser ist ebenfalls von einer Basalmembran, dem Endomysium, umgeben, in welchem die Nervenfasern und Blutkapillaren verlaufen (Abbildung 1).

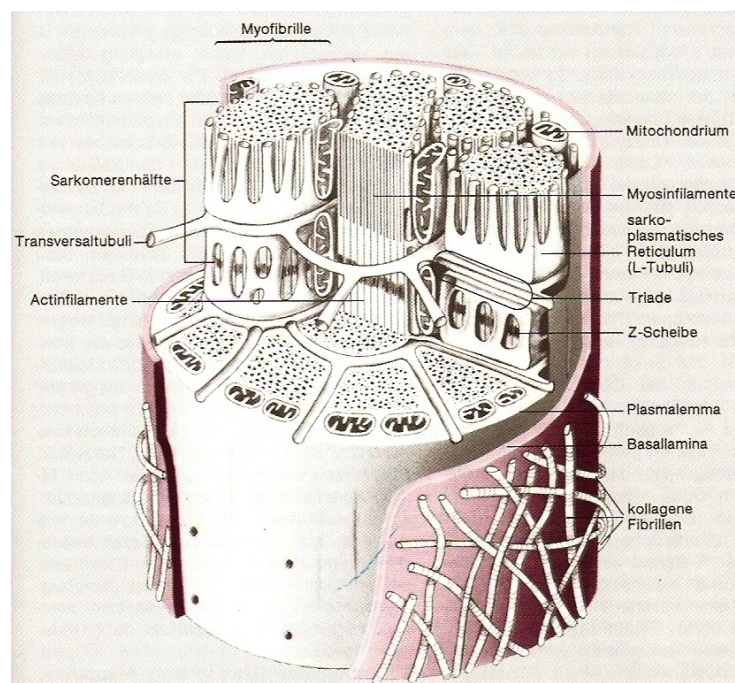


Abbildung 1: Querschnitt durch einen Skelettmuskel (modifiziert nach Herder-Lexikon der Biologie 1994 (1)).

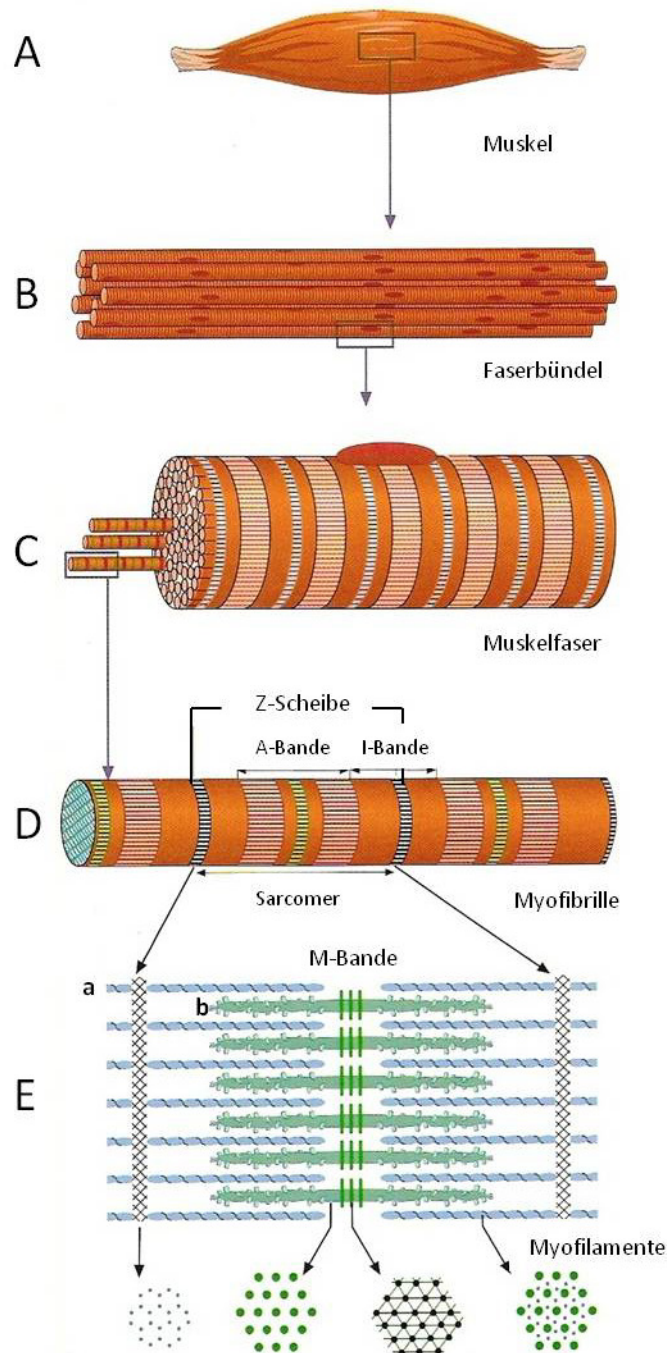


Abbildung 2: Die Feinstruktur des Skelettmuskels(modifiziert nach Löffler und Petrides 2007 (2)).

Die Muskelfasern enthalten in Längsrichtung angeordnete faserförmige Myofibrillen (Abbildung 2D), die sich aus zwei verschiedenen Myofilamenten (Abbildung 2E) zusammensetzen. Die dünnen Filamente bestehen aus zwei Strängen des Proteins Aktin sowie einem Strang Tropomyosin und Troponin. Die dicken Filamente sind aus dem Protein Myosin aufgebaut, wobei sich das Myosinmolekül aus sechs Untereinheiten, zwei schweren Ketten (Myosin Heavy Chain) und vier leichten Ketten (Myosin Light Chain) zusammensetzt. Die Anordnung der Filamente ist für die im Lichtmikroskop sichtbare Querstreifung der Muskelfaser verantwortlich und bildet die kleinste funktionelle Einheit des Skelettmuskels, die Sarcomere. Die Längenänderungen der



Einzel-sarcomere sind für die Verkürzung oder Verlängerung eines Muskels verantwortlich. Das Sarcomer setzt sich aus verschiedenen Banden zusammen: Die dünnen Aktinfilamente (Abbildung 2a) sind der I-Bande zugeordnet und in der Z-Scheibe miteinander verbunden. Die A-Bande entspricht der Länge der dicken Myosinfilamente (Abbildung 2b), die in der M-Bande verankert sind (Abbildung 2D und E). Beide Myofilamente, Aktin und Myosin, sind über Myosin-Querbrücken miteinander verbunden, die bei Kontraktion des Muskels unter Spaltung von ATP zu ADP und Phosphat durch die ATPase-Aktivität des Myosin Heavy Chains gelöst werden und die Filamente ineinander hinein gleiten können.

Die Kontrolle der Muskelkontraktion erfolgt über die Erregung von einer Nervenfasern, die auf die Muskelfaser übertragen wird. Hierbei sind Einstülpungen des Sarkolemms in die Muskelfaser als Transversaltubuli (T-Tubuli) und das sarkoplasmatische (=endoplasmatische) Retikulum (L-Tubuli) beteiligt (1–4).

### 1.1.2 Myosin-Heavy Chain Isoformen und Muskelfasertypen

Die Skelettmuskulatur setzt sich aus heterogen spezialisierten Muskelfasern zusammen, wobei die Kontraktionsgeschwindigkeit vor allem von den verschiedenen Myosin Heavy Chain (MyHC)-Isoformen abhängt, die unterschiedliche ATPase-Aktivitäten besitzen. In den adulten, humanen Muskeln der Extremitäten befinden sich drei verschiedene MyHC-Isoformen: MyHC-I (Myh-7), MyHC-IIa (Myh-2), MyHC-IIc/x (Myh-1) und in kleinen Säugetieren kommt noch eine vierte Isoform hinzu - MyHC-IIb (Myh-4) (5). MyHC-I und -IIa sind charakterisiert durch einen oxidativen Metabolismus und MyHC-IIc/x und -IIb durch einen glykolytischen Metabolismus (6) (Tabelle 1).

Des Weiteren wird zwischen langsam-zuckenden (slow-twitch) und schnell-zuckenden (fast-twitch) Typen unterschieden. Es gibt Muskelfasern, die nur aus einer MyHC-Isoform bestehen. Hierbei unterscheidet man Slow-Typ-1-Muskelfasern, die nur MyHC-I- $\beta$ -Moleküle exprimieren und drei Fast-Typen, Typ 2A mit MyHC-IIa, Typ 2D/X mit MyHC-IIc/x und Typ 2B mit MyHC-IIb (Tabelle 1). Die Co-Expression der MyHC-Isoformen bewirkt die Bildung von Hybridfasern. Die Slow-twitch-Muskelfasern sind sehr mitochondrienreich und besser mit Blutgefäßkapillaren versorgt. Diese Muskelfasern dienen der Aufrechterhaltung der Körperhaltung, kontrahieren nur langsam und ermüden dementsprechend langsam. Die Fast-twitch-Muskelfasern kontrahieren sehr schnell und ermüden kurzfristig, da sie für kräftige und schnelle Bewegungen benötigt werden. Muskelfasern können ihren Phänotyp unter bestimmten Bedingungen durch Änderung des MyHC-Isoformen-Musters ändern, z.B. durch Veränderungen der neuromuskulären Aktivität, der mechanischen Belastung, von Hormonprofilen oder im Alter (zusammengefasst von Bassel-Duby und Olson 2006 (7) und Pette und Staron 2000 (6)).

Tabelle 1: MyHC-Isoformen und Muskelfasertypen

<b>MyHC-Isoform</b>	<b>Synonym</b>	<b>Stoffwechsel</b>
MyHC-I	Myh-7	oxidativ
MyHC-IIa	Myh-2	oxidativ
MyHC-IIc/x	Myh-1	glykolytisch
MyHC-IIb	Myh-4	glykolytisch

<b>Muskelfasertyp</b>	<b>Art</b>
Typ 1	Slow
Typ 2A	Fast
Typ 2D/X	Fast
Typ 2B	Fast

### 1.1.3 Skelettmuskelentwicklung und -differenzierung

Die Entstehung von Muskelgewebe von der embryonalen Skelettmuskelzellentwicklung bis zu differenzierten Muskelfaserbündeln wird Myogenese genannt. In der frühen embryonalen Entwicklung proliferieren die Muskel-Vorläuferzellen, die sogenannten Myoblasten und richten sich anschließend aneinander aus. Ein wichtiger Schritt in der Differenzierung der Skelettmuskelzellen stellt der Austritt der proliferierenden Myoblasten aus dem Zellzyklus dar, woraufhin die Myoblasten sich nicht mehr teilen. Es folgt die Fusion der einkernigen Myoblasten, die anschließend zu langgezogenen vielkernigen Myotuben verschmelzen. Die Myotuben organisieren sich daraufhin zu Muskelfasern, die spontan kontrahieren können (8–10).

#### 1.1.3.1 Die Muskel-Differenzierungsmarker

Die Skelettmuskelzellentwicklung und -differenzierung wird über die Myogenetischen Regulationsfaktoren (MRFs) reguliert, welche zu der Familie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren gehören und strukturell und funktionell sehr ähnlich sind. Zu den MRF zählen MyoD (11), Myf5 (12), Myogenin (13) und MRF4 (14), die spezifisch in Skelettmuskelzellen exprimiert werden und Schlüsselfaktoren in deren Differenzierung einnehmen, da ohne sie keine Differenzierung möglich ist (15). Gemeinsam ist diesen Faktoren eine konservierte basische DNA-Bindungsdomäne und ein Helix-Loop-Helix-Motiv (H-L-H) (Abbildung 3), das wichtig für die Dimerisierung ist. Es konnte *in-vitro* und *in-vivo* gezeigt werden, dass die MRF Homodimere oder mit E-Proteinen Heterodimere bilden, die sequenzspezifisch an ein DNA-

Motiv, die E-Box (CANNTG), binden. Diese ist in den Promotoren vieler skelettmuskel-spezifischer Gene nachgewiesen ((16); zusammengefasst durch Sabourin und Rudnicki 2000 (17)).

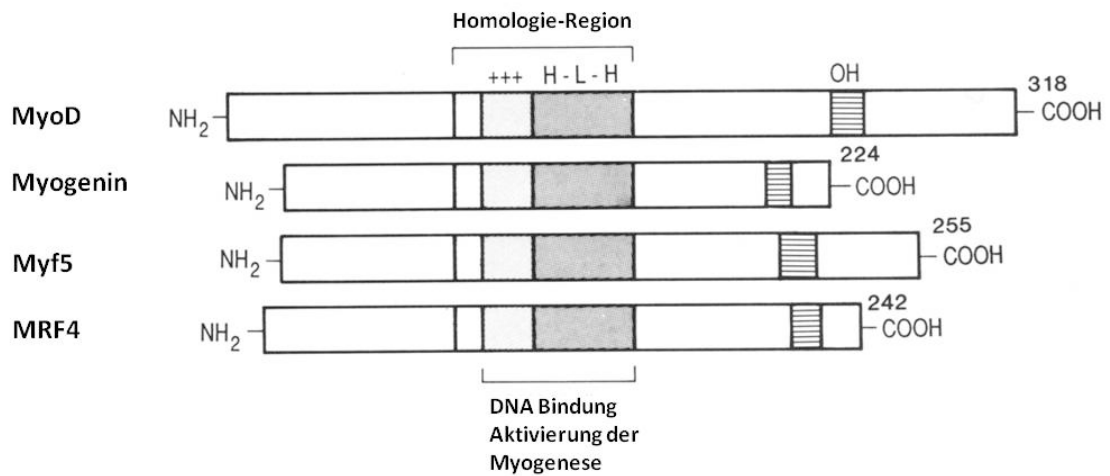


Abbildung 3: Struktureller Vergleich der Myogenetischen Regulationsfaktoren (MRF). Dargestellt sind die Homologie-Region, die die basische (+++) und die HLH-Domäne (grau) enthält, sowie die serin- und threoninreiche Region (OH; gestreift). Die jeweilige Zahl gibt die Anzahl der Aminosäuren der einzelnen Polypeptide an (modifiziert nach Olson et al. 1990 (18)).

Die Faktoren Pax3 und Pax7 (Paired-homeodomain transcription factor) spielen in der Initiation der Myoblasten-Entwicklung und Regulation der MRF ebenfalls eine Rolle (19). Zu Beginn der Myogenese wird die Expression von Pax3 herunterreguliert und die der MRF Transkriptionsfaktoren induziert, was die Zellen als Myoblasten spezifiziert (20,21). Die primären MRF Myf5 und MyoD werden als erstes in den Myoblasten exprimiert und scheinen eine Schlüsselfunktion in der Myoblasten-Determination einzunehmen. MyoD-Knockout Mäuse zeigten relativ normale Muskel-Phänotypen, ohne sichtbare Einschränkungen in der Physiologie oder Morphologie des Skelettmuskels. Das Fehlen von MyoD führte zu einer erhöhten Myf5 Expression (22). Die Skelettmuskulatur von Myf5-Knockout Mäusen erschien morphologisch ebenfalls normal entwickelt und es traten keine Veränderungen in der Expression der anderen MRF MyoD, Myogenin oder MRF4 auf. Allerdings führte das Fehlen von Myf5 dazu, dass diese Mäuse um den Zeitpunkt der Geburt herum starben, aufgrund des Fehlens distaler Rippenteile und der Unfähigkeit zu atmen (23). Der Doppel-Knockout von MyoD und Myf5 führte zu einem kompletten Fehlen von Skelettmuskelfasern und Myoblasten, was zeigt, dass MyoD und Myf5 sich offenbar bis zu einem gewissen Grad wechselseitig ersetzen können (24).

Myogenin und MRF4 zählen zu den sekundären MRF. Es wird angenommen, dass Myogenin und MRF4 direkt durch Myf5 und MyoD reguliert werden. In Myogenin-Knockout Mäusen entwickelten sich die Myoblasten normal, aber eine terminale Differenzierung zu Myotuben fehlte, so dass die Mäuse unmittelbar nach der Geburt sterben. Die essenzielle Funktion von Myogenin für die Differenzierung konnte nicht durch andere Transkriptionsfaktoren ausgeglichen werden (25–27). In drei verschiedenen Studien wurden MRF4-Knockout-Mäuse entwickelt, die verschiedene Phänotypen zeigten, von Mäusen mit anscheinend normalen Skelettmuskeln, allerdings mit einer

4-fach erhöhten Myogenin Expression (28,29), bis zu nicht lebensfähigen Mäusen mit einigen Muskelfehlbildungen (30,31). Es wurden schließlich Mäuse mit einem Doppel-Knockout von MyoD/Myf5 konstruiert, die aber MRF4 überexprimierten. In diesen Mäusen reichte MRF4 zur Differenzierung der Skelettmuskulatur aus. Daher nimmt man an, dass MRF4 sowohl Funktionen in der frühen Myoblastenentwicklung, als auch in der terminalen Differenzierung hat (32,33). Der Phänotyp eines Doppel-Knockouts von MyoD und MRF4 war fast identisch mit dem von Myogenin-Knockout-Mäusen, so dass MyoD inzwischen auch eine Funktion in der terminalen Differenzierung von Myoblasten zugeschrieben wird (34,35).

Da die MRF in differenzierten adulten Muskelfasern weiterhin exprimiert werden, wird ihnen außerdem eine Rolle außerhalb der Muskelentwicklung zugeschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass in adulten Skelettmuskeln die Expression der einzelnen MRF fasertypabhängig ist, so wird MyoD vermehrt in Fast-Twitch-Muskelfasern und Myogenin in Slow-Twitch-Muskelfasern exprimiert (36,37). Transgene Mäuse, die Myogenin spezifisch in differenzierten Muskelfasern überexprimieren, haben eine hohe neonatale Sterblichkeitsrate. Erst eine doppelte Überexpression von Myogenin und Id1 (Inhibitor of DNA binding factor 1) (Myogenin+Id1), welches ein negativer Regulator der MRF ist, führte in transgenen Mäusen zu normalen Überlebensraten. Bei Kreuzung der Myogenin+Id1-Mäuse mit Wildtypmäusen waren alle Nachkommen lebensfähig, auch die Mäuse, die ausschließlich Myogenin überexprimierten (MMg-Mäuse) (38). In MMg-Mäusen fand eine Veränderung des Muskel-Phänotyps hin zu typischen Merkmalen von Slow-Twitch-Muskelfasern statt. Die Aktivität der glykolytischen Enzyme sank und die der oxidativen Enzyme stieg an, auch in Muskeln, in denen normalerweise der glykolytische Stoffwechsel überwiegt. Des Weiteren verkleinerten sich die Muskelfasern zu einer Größe, die für oxidative Muskelfasern typisch sind (39). In Mäusen, denen MyoD fehlte, wurden ebenfalls Veränderungen in den Muskelfasertypen festgestellt (40).

Weitere wichtige Faktoren in der Regulation muskel-spezifischer Gene stellen die MEF-2 (Myocyte Enhancer Factor 2) Transkriptionsfaktoren dar, die vier Isoformen umfassen, MEF-2a, MEF-2b, MEF-2c und MEF-2d (41). Insbesondere MEF-2c wird spezifisch im Muskelgewebe exprimiert und bindet in der Nähe der E-Box an die DNA (42). MEF-2c-Knockout Mäuse sterben bereits während der Embryonalentwicklung (43). Bei einem spezifischen Knockout von MEF-2c im Skelettmuskel, bilden sich normale differenzierte Muskelfasern aus, nach der Geburt allerdings verschlechtert sich ihr Zustand, denn die Mäuse zeigten fehlerhafte Sarcomere, denen die M-Linie fehlte (44). MEF2 wird durch die MRF Transkriptionsfaktoren aktiviert, woraufhin es die myogene Differenzierung verstärkt (45). Dementsprechend reguliert MEF2 muskel-spezifische Gene (u.a. auch Myogenin und MRF4) in einer positiven Feed-Forward Schleife. Dies konnte sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* in Mäusen gezeigt werden (44,46–53) (Abbildung 4).

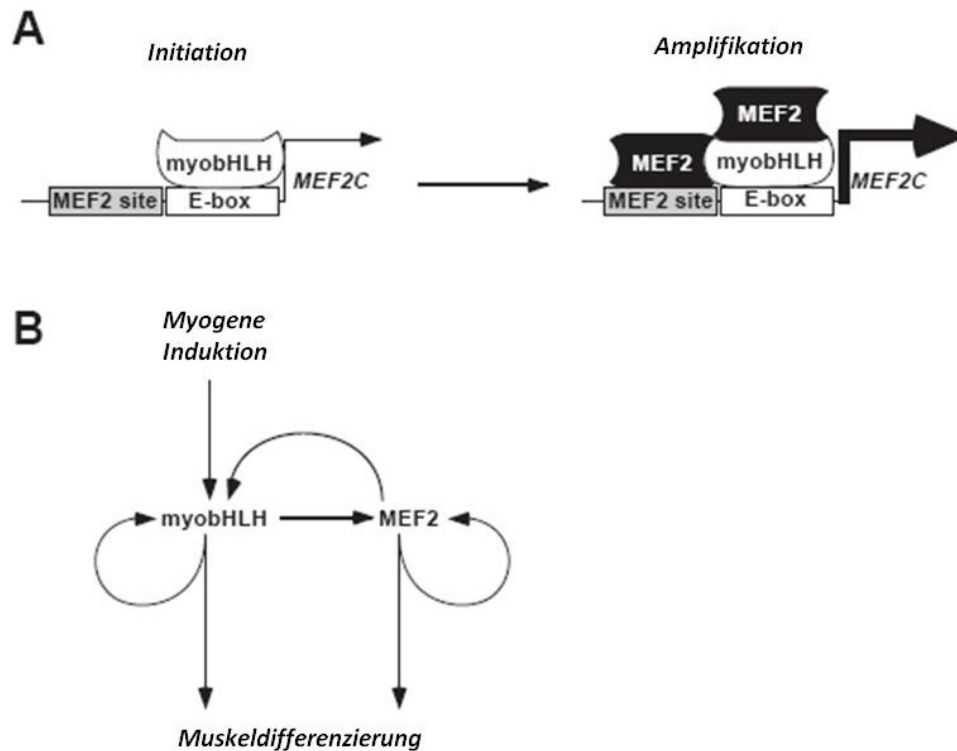


Abbildung 4: Modell der MEF-2c Regulation während der Skelettmuskelentwicklung. [A] Regulation während der Myogenese. Der MEF-2c Promotor enthält Bindungsstellen für die MRF (myobHLH) und MEF2 Proteine. Die E-Box wird für die Initiation und Amplifikation der MEF-2c Transkription benötigt, die MEF2 Bindungsstelle nur für die Amplifikation. [B] Modell des positiven Feedback-Loops von MRF und MEF2 Faktoren. (modifiziert nach Wang *et al.* 2001 (48)).

### 1.1.3.2 Differenzierung von Muskelzellen *in-vitro*

In der Zellkultur gehaltene Myoblasten proliferieren, migrieren und richten sich zum fusionieren zu Myotuben mit anderen Myoblasten aus. Die Differenzierung der Myoblasten zu adulten Myotuben wird durch Deprivation von Serum (Differenzierungsmedium) initiiert, woraufhin die Myoblasten ihre Proliferationsaktivität einschränken. Die murine C2C12 Myoblasten-Zelllinie ist gut etabliert, um die Differenzierung von Myoblasten zu untersuchen. Die C2C12 Myoblasten wurden ursprünglich von Yaffe und Saxel (1977) durch selektives seriell Passagieren aus dem Oberschenkelmuskel des C3H-Mausstamms isoliert und immortalisiert (54). Die Myoblasten differenzieren schnell zu kontraktile Myotuben. Dedieu *et al.* (2002) untersuchten die Stadien der Differenzierung in der murinen Skelettmuskelzelllinie C2C12. Nach 2 Tagen in Differenzierungsmedium begannen die Myoblasten zu fusionieren, mit einer maximalen Fusionsrate am 4.Tag. An Tag 8 war das Maximum der Differenzierung erreicht und 60% der Kerne in vielkernige Myotuben übergegangen (Abbildung 5) (55).

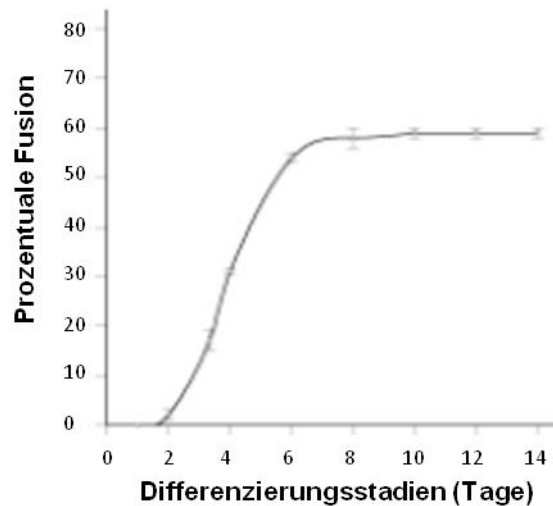


Abbildung 5: Prozentuale Fusion der Myoblasten in C2C12 Zellen während der Myogenese in Abhängigkeit des Differenzierungsstadiums in Tagen (modifiziert nach Dedieu *et al.* (2002) (55)).

In Kultur werden MyoD und Myf5 in undifferenzierten C2C12 Myoblasten stark exprimiert (55,56). Während der Differenzierung bleibt die Expression von MyoD weitestgehend auf einem konstanten Niveau, wohingegen die Myf5 Expression in der mittleren bis späten Phase der Differenzierung absinkt (56,57). Es wird angenommen, dass eine Myf5 Expression in der späten Differenzierung von verbleibenden undifferenzierten Myoblasten, sogenannten Reserve- oder Satellitenzellen, stammt (58,59). Nach Initiation der Differenzierung kommt es zu einem Anstieg der Myogenin mRNA- und Proteinexpression während der Myoblastenfusion (56,57), wohingegen die Myogenin Proteinexpression nach der mittleren Differenzierung wieder abfällt, die mRNA-Expression hingegen nicht (56). Die MRF4 Expression steigt ab der mittleren bis späten Differenzierung nach der Myoblastenfusion an und hemmt die Myogenin Expression (29,56) (Abbildung 6).

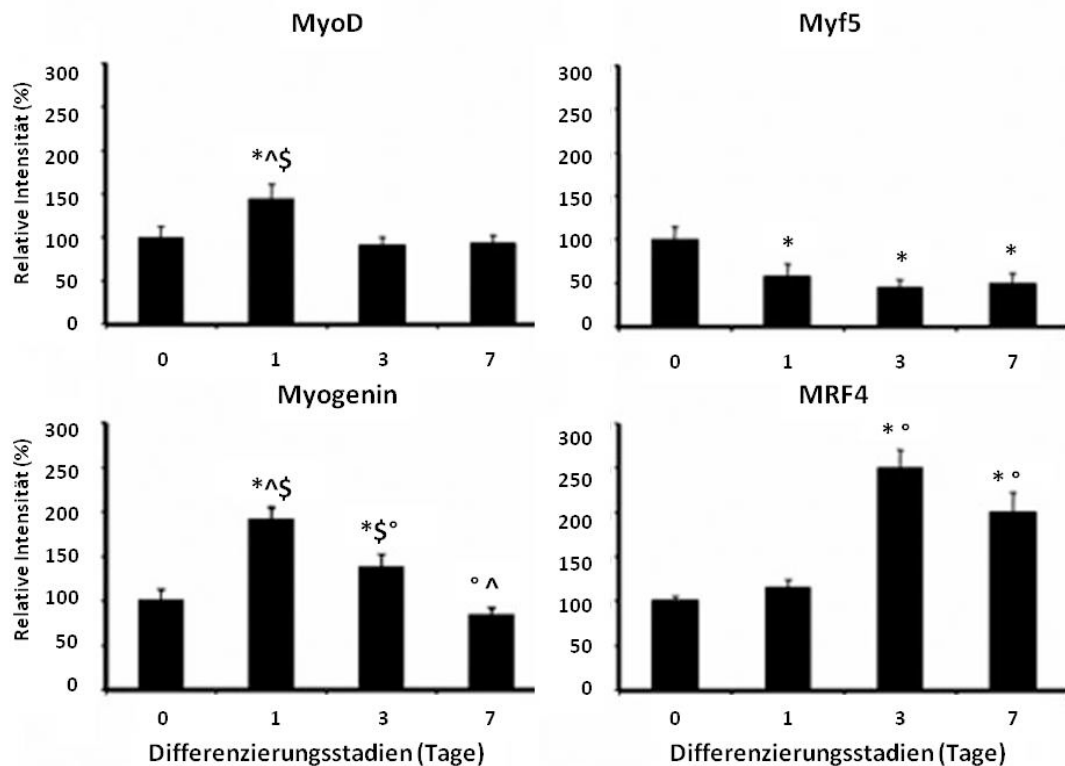


Abbildung 6: Verlauf der Proteinexpression der Myogenetischen Regulationsfaktoren (MyoD, Myf5, Myogenin, MRF4) während der Differenzierung in C2C12 Zellen (modifiziert nach Ferri *et al.* 2009 (56)).

## 1.2 Proteolyse

Der Umsatz von körpereigenem Protein (Turnover) hängt von der Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese und des Proteinabbaus (Proteolyse) ab und beträgt bei normaler Stoffwechselsituation beim Menschen 300 g pro Tag. Der Abbau kann bei veränderter Stoffwechsellage, wie z.B. einer negativen Stickstoffbilanz im Hungerstoffwechsel, pathologischen Bedingungen einer Muskeldystrophie, sowie bei Verletzungen, Bettlägerigkeit, Sepsis, Behandlung mit Glucocorticoiden, Diabetes, Krebserkrankungen und im Alter erheblich höher sein und somit zu einer Muskelatrophie führen (60). Die Lebensdauer einzelner Proteine kann von wenigen Minuten bis mehreren Wochen variieren und wird durch die proteinspezifische Halbwertszeit beschrieben. Der Abbau erfolgt durch enzymatische Spaltung durch Proteasen, welche die Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren hydrolytisch spalten. Man unterscheidet Endoproteinasen, die Peptidbindungen innerhalb der Proteinkette spalten und meistens den Abbau initiieren und Exoproteinasen, die die entstandenen Fragmente durch Spaltung an der endständigen Amino- oder Carboxygruppe weiter abbauen. Des Weiteren werden Proteasen nach Katalysemechanismus (Serin-, Cystein-, Aspartat-, Metallo- und Threoninproteasen) und Wirkungsort (intrazellulär und extrazellulär) unterschieden. Der Abbau der meisten Proteine findet im Cytosol statt, nur ein kleiner Anteil wird extrazellulär und in den Lysosomen abgebaut. Den wichtigsten intrazellulären Abbaumechanismus stellt die Ubiquitin-abhängige Proteolyse dar (61).

### 1.2.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Durch das in Kern und Cytosol lokalisierte Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) können Polypeptide zielgerichtet abgebaut werden. Es werden u.a. Proteine abgebaut, die nach der Biosynthese ungefaltet, fehlgefaltet oder denaturiert vorliegen, sowie gealterte Proteine und Fremdproteine, z.B. viralen Ursprungs.

Das UPS besteht aus einer großen Anzahl spezialisierter Proteine, die für die Identifizierung, Zielrichtung und Abbau verantwortlich sind. Zur Markierung der zum Abbau bestimmten Proteine dient das aus 76 Aminosäuren bestehende Ubiquitin, welches ubiquitär in den Geweben vorkommt und bei der Proteolyse nicht abgebaut wird. Die Ubiquitylierung besteht aus einer enzymatischen Kaskade der Enzyme E1, E2 und E3. Durch das für jedes Protein spezifische Enzym E1 wird das Ubiquitin ATP-abhängig durch eine Thioesterbindung zwischen dem C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins und dem Cystein des E1-Enzyms aktiviert und auf eine Thiolgruppe eines zweiten Enzyms (E2; Ubiquitin-Konjugase) übertragen. Die Ubiquitin-Ligasen (E3) transferieren das aktivierte Ubiquitin unter Ausbildung einer Isopeptidbindung von E2 an die  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinresten des abzubauenden Proteins. An ein Protein werden mehrere Ubiquitine zu langen Ubiquitin-Derivaten gebunden. Die Position des Lysinrests im Ubiquitinmolekül determiniert hierbei den weiteren Verbleib des Proteins. Bei Verknüpfung mit dem Lysinrest-48 des Ubiquitins wird das Zielprotein von dem 19S-Proteasom erkannt. Das Proteasom in Eukaryoten stellt einen 26S-Proteinkomplex dar, bestehend aus einer 20S- und zwei 19S-Untereinheiten. In den 19S-Proteasomen werden die abzubauenden Proteine ATP-abhängig entfaltet und im 20S-Proteasom endoproteolytisch zu Fragmenten aus etwa 10 Aminosäuren gespalten (61–63) (Abbildung 7).



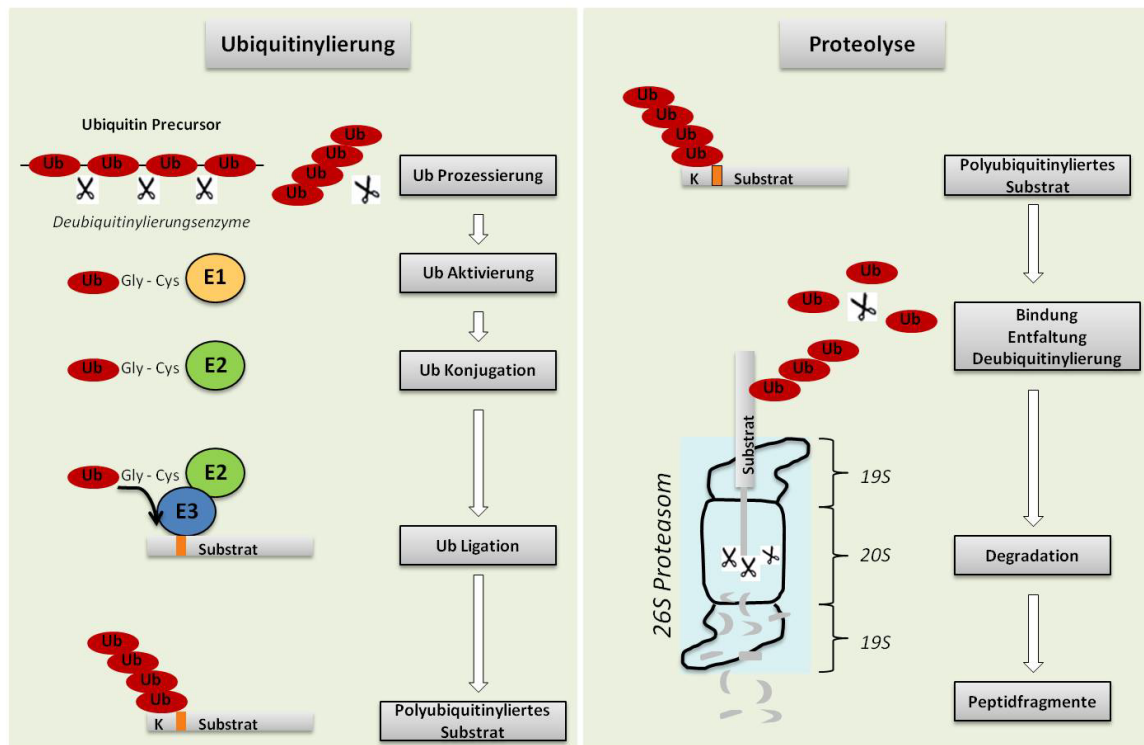


Abbildung 7: Das Ubiquitin-Proteasom-System. Freies Ubiquitin wird in einer enzymatischen Kaskade mittels der Enzyme E1, E2 und E3 in einer Ubiquitinkette an das abzubauenende Zielprotein konjugiert. Das ubiquitylierte Substrat wird vom Proteasom erkannt, woraufhin es entfaltet, deubiquityliert und in kleine Peptidfragmente zerlegt wird (modifiziert nach Dantuma und Lindsten 2010 (62)).

### 1.2.2 Die Ubiquitin-Ligasen MuRF-1 und Atrogin-1

Es gibt mehr als 1000 E3-Ubiquitin-Ligasen, die letztendlich bestimmen, welche Proteine abgebaut werden (63). Von besonderer Bedeutung war die Entdeckung der zwei E3-Ligasen MuRF-1 (Muscle RING Finger 1) und Atrogin-1/MAFbx (Muscle Atrophy F-box) in den vergangenen Jahren, die vor allem in quergestreifter Muskulatur exprimiert werden. Da deren Expressionen in verschiedenen Modellen der Muskelatrophie besonders stark erhöht waren im Vergleich zu anderen Genen, konnten MuRF-1 und Atrogin-1 als Marker für den Muskelabbau identifiziert werden (64–66). So zeigten Bodine *et al.* (2001), dass bei Ratten sowohl durch Denervierung, Immobilisation und Entlastung im Musculus gastrocnemius medialis ausgelöster Muskelatrophie, aber auch bei Behandlungen mit Interleukin-1 oder dem Glucocorticoid Dexamethason ein deutlicher Anstieg von MuRF-1 und Atrogin-1 gemessen wurde (64). Durch cDNA-Mikroarray-Analyse aus dem Musculus gastrocnemius konnten Gomes *et al.* (2001) im Rattenmodell ebenfalls zeigen, dass die Atrogin-1 Expression bei Muskelatrophie ausgelöst durch u.a. Hungern, streptozotocin-induzierter Diabetes oder Urämie mindestens um das 10-fache anstieg (66). Entsprechende Analysen von Lecker *et al.* (2004) konnten dies ebenfalls für MuRF-1 bestätigen (65).

In der Literatur sind viele weitere Zellkultur- und Tiermodelle vorhanden, die eine erhöhte Expression von MuRF-1 und Atrogin-1 in einer Muskelatrophie-erzeugenden Stoffwechselsituation bestätigen, aus der wiederum eine gesteigerte Proteolyse über das UPS resultiert. Zusammenfassend konnte dies für chronische Erkrankungen gezeigt werden, die u.a. durch Muskelatrophie charakterisiert sind, wie Krebserkrankungen (67–71), rheumatoider Kachexie (72–74), Sepsis (75,76), HIV/AIDS (77,78), Niereninsuffizienz (65) und Diabetes (65,66,79–81). Sowohl MuRF-1-, als auch Atrogin-1-Knockout-Mäuse waren lebensfähig, fertil und zeigten normales Muskelwachstum und -morphologie. Das Fehlen von MuRF-1 und Atrogin-1 verhinderte die Ausbildung einer Atrophie trotz Muskel-Denervierung (64). Transgene Mäuse, die MuRF-1 überexprimierten bildeten ebenfalls keine Muskelatrophie aus, sondern waren gekennzeichnet durch eine Hyperinsulinämie und geringe basale Glycogenspeicher in der Leber (82).

Bisher wurde der Zusammenhang einer MuRF-1 bzw. Atrogin-1 Induktion und einer gesteigerten Skelettmuskelatrophie in nur wenigen Humanstudien untersucht. Die Muskelatrophie wurde hierbei u.a. durch Immobilisation ausgelöst (83) oder in Patienten untersucht, bei denen durch künstliche Beatmung der Zwerchfellmuskeln inaktiv war und somit atrophierte (84). Léger et al. (2006) zeigten in Patienten mit amyotrophischer Lateralsklerose (ALS), die mit einer Muskelatrophie einhergeht, ebenfalls erhöhte Expressionen von Atrogin-1, aber nicht von MuRF-1 (85).

### **1.3 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenasen (11beta-HSD)**

#### **1.3.1 Cortisol-Metabolismus**

Das Glucocorticoid Cortisol gehört zu der Gruppe der Steroidhormone und wird in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde unter dem Einfluss des hypothalamisch-hypophysären-Systems gebildet und sezerniert. Aus dem aus Cholesterinestern freigesetzten Cholesterin wird als Vorstufe aller Steroidhormone Pregnenolon gebildet und über weitere enzymatische Schritte zu Cortisol umgewandelt. Die tägliche Cortisolproduktion beträgt etwa 5-30 mg (14-84 µmol) und unterliegt einem circadianen Rhythmus. Die Syntheserate wird stressinduziert deutlich erhöht. Im Ruhezustand und unter normalen Bedingungen steigt die Cortisol-Plasmakonzentration am Morgen auf 50-250 µg/L (140-690 nmol/L) und fällt dann durch einen negativen Feedback-Loop der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) wieder ab. Im Blutplasma wird Cortisol an Transcortin (Cortisol-Binding-Globulin, CBG) und Albumin gebunden transportiert, so dass ungefähr 6% des Plasma-Cortisols ungebunden als freies Cortisol vorliegt, welches ins Gewebe aufgenommen werden kann (86,87). Die Plasma-Konzentration von Cortison, der biologisch inaktiven Form des Cortisols, beträgt ungefähr ein Fünftel der des Cortisols (ca. 60 nmol/L). Durch die geringere Bindungsaffinität des Transcortins zu Cortison, liegt freies Cortison in

einer ähnlich hohen Plasma-Konzentration wie freies Cortisol vor (88). In Nagern entspricht das Corticosteron dem Cortisol und 11-Dehydro-Corticosteron dem Cortison.

Cortisol gehört zu den Stresshormonen und aktiviert katabole Stoffwechselfvorgänge zur Bereitstellung von Energie in Stresssituationen. Da Cortisolrezeptoren ubiquitär im Körper vorhanden sind, hat Cortisol vielfache verschiedene Wirkungen auf den gesamten Organismus. Als Gegenspieler von Insulin führt es zu einer Erhöhung des Blutglukosespiegels. In der Leber stimuliert Cortisol die Glukoneogenese und Glykogensynthese bei gleichzeitiger Hemmung der Glukoseaufnahme in periphere Gewebe. Im Muskelgewebe hemmt es die Proteinsynthese und stimuliert die Proteolyse und im Fettgewebe wird die Lipolyse induziert. Die hier freigesetzten Aminosäuren, Fettsäuren und Glycerin dienen in der Leber als Substrat der Glukoneogenese. Zudem unterstützt Cortisol die Adipogenese von Präadipozyten. Eine weitere bedeutende Funktion des Cortisols ist die Unterdrückung körpereigener Abwehrreaktionen und somit die Verhinderung einer Überreaktion des Immunsystems. Daher werden synthetische Cortisolderivate therapeutisch als Entzündungshemmer eingesetzt (86).

### 1.3.2 Funktion der 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (11beta-HSD) im Cortisol-Metabolismus

Nach der Entdeckung von Cortison, der hormonell inaktiven Form von Cortisol, zeigten Amelung *et al.* (1953), dass die 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (11beta-HSD; EC 1.1.1.146) in den Zielzellen für die enzymatische Umwandlung dieser beiden Formen verantwortlich sind (89). Man unterscheidet zwei Isoenzyme, die 11beta-HSD1 und die 11beta-HSD2. Für die biologische Aktivität ist die Hydroxyl-Gruppe am C11-Atom der Steroidstruktur entscheidend (Cortisol) und die Oxidation an dieser Position zu einer Oxo-Gruppe inaktiviert das Cortisol zu Cortison. Die 11beta-HSD weisen die gleichen Affinitäten zu den entsprechenden in Nagern vorkommenden Corticosteron und 11-Dehydro-Corticosteron auf wie zu Cortisol und Cortison.

Die 11beta-HSD1 katalysiert diese Reaktion bidirektional und weist somit sowohl 11-Oxoreduktase-, als auch Dehydrogenase-Aktivität auf. Die Richtung dieser Reaktion ist abhängig von dem Co-Faktor NADP(H), welcher durch das mit der 11beta-HSD1 im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums co-lokalisierte Enzym Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase (H6PD) zu NADPH reduziert wird (90) (Abbildung 8). Es konnte einerseits gezeigt werden, dass die 11beta-HSD1 in intakten Zellen als Reduktase wirkt und somit Cortisol aus Cortison aktiviert, andererseits kann die 11beta-HSD1 auch die Oxidation katalysieren, wenn diese *ex-vivo* ohne intaktes Zellsystem (lumenale Anordnung von 11beta-HSD1 und H6PD) analysiert wird. Die 11beta-HSD1 wird ubiquitär exprimiert, wobei die höchsten Expressionen in Leber, Fettgewebe, Lunge, Gonaden, Gehirn und Muskelgewebe zu finden sind. Das durch die 11beta-HSD1 aktivierte Cortisol bzw. aus dem Blut aufgenommenes Cortisol bindet an den im Cytosol lokalisierten Glucocorticoidrezeptor (GR) oder auch den Mineralocorticoidrezeptor (MR) und verursacht so eine Konformationsänderung des Rezeptors, durch die die vorher gebundenen Hitzeschutzproteine

(HSP) dissoziieren. Daraufhin transloziert der Rezeptorkomplex in den Kern und interagiert dort als Homodimer oder Monomer mit spezifischen Hormon-Response-Elementen (HRE), was zur Aktivierung oder Repression der Transkription bestimmter Gene führt (86,91). Weiterhin kann der aktivierte GR $\alpha$  auch über Protein-Protein-Interaktion die Expression anderen Genen beeinflussen (92).

Die 11 $\beta$ -HSD2 wird vor allem in Mineralocorticoid-Zielgeweben, wie Niere und Colon, exprimiert. Es handelt sich hierbei um ein unidirektionales Enzym, welches als NAD<sup>+</sup>-abhängige Dehydrogenase ausschließlich die Inaktivierung von Cortisol zu Cortison katalysiert (Abbildung 8). Da der MR neben Aldosteron, welches an der Blutdruckregulation beteiligt ist, ebenfalls eine höhere Bindungsaffinität für Cortisol besitzt (93), stellt die 11 $\beta$ -HSD2 einen Schutz des MR vor der Bindung durch Cortisol dar. Bei Störungen der 11 $\beta$ -HSD2 fehlt diese Prä-Rezeptorkontrolle und Cortisol kann ungehindert an den MR binden, was Bluthochdruck und Hyperkaliämie verursacht (zusammengefasst durch Tomlinson 2007 (94); (95)).

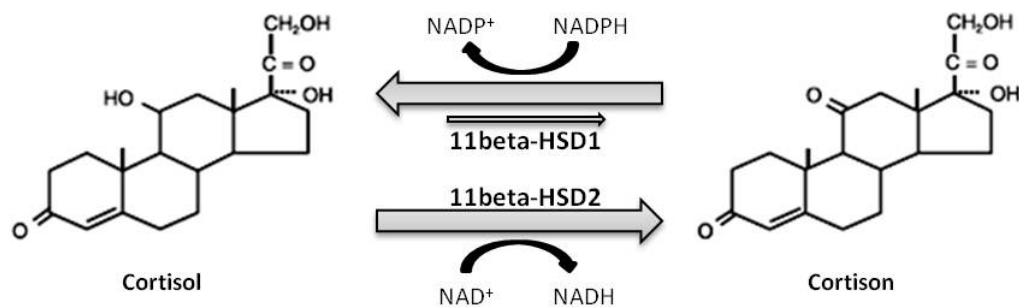


Abbildung 8: Umwandlung von Cortisol und Cortison durch die Enzyme 11 $\beta$ -HSD1 und 11 $\beta$ -HSD2 (modifiziert nach Walker 2006 (96)).

### 1.3.3 11 $\beta$ -HSD1 und das metabolische Syndrom

#### 1.3.3.1 Das metabolische Syndrom – Definition und Prävalenzen

Das metabolische Syndrom stellt einen Überbegriff für das gleichzeitige Auftreten mehrerer Erkrankungen dar, die gemeinsam als entscheidende Risikofaktoren für Herz-Kreislauferkrankungen gelten. Hierzu gehören neben Übergewicht/Adipositas und gestörter Glucosetoleranz bzw. Diabetes Typ 2 auch Dyslipidämie und Hypertonie. Die Prävalenzen von Adipositas und metabolischem Syndrom nehmen gegenwärtig epidemische Ausmaße an. Laut WHO galten im Jahr 2008 1,5 Milliarden Menschen als übergewichtig mit einem Body Mass Index ( $\text{BMI} = \frac{\text{Gewicht [kg]}}{(\text{Körpergröße [m]})^2}$ ) über 25 und an die 500 Millionen als fettleibig ( $\text{BMI} > 30$ ). Eine Zunahme der Kalorienzufuhr kombiniert mit verminderter körperlicher Bewegung stellt die Hauptursache für einen erhöhten BMI und daraus resultierender stoffwechselbedingter

Fehlstörungen des metabolischen Syndroms dar. Übergewicht gilt als fünfthäufigster Risikofaktor für Todesfälle weltweit (97).

### 1.3.3.2 Bedeutung der 11beta-HSD1 im metabolischen Syndrom

Chronisch und übermäßig erhöhte Cortisol-Plasmalevel werden als Hypercortisolismus bezeichnet und sind das Hauptsymptom des sogenannten Cushing-Syndroms. Ursachen hierfür können Störungen durch Tumore beispielsweise im hypothalamisch-hypophysären-System oder der Nebennierenrinde sein (86,98). Hypercortisolismus führt zu Symptomen, die dem metabolischen Syndrom sehr ähnlich sind, wie u.a. viszeraler Adipositas, Bluthochdruck und gestörter Glukosetoleranz bis hin zum Typ-2 Diabetes, aber auch Muskelschwäche, Osteoporose, Vollmondgesicht, Hirsutismus und einem Büffelnacken (98,99). Im Gegensatz zum Cushing-Syndrom sind die Cortisol-Plasmaspiegel bei Patienten des metabolischen Syndroms hingegen normal. Jedoch ist mehrfach gezeigt worden, dass die intrazelluläre Cortisol-Wirkung durch eine erhöhte Expression und Oxoreduktase-Aktivität der 11beta-HSD1 im Fettgewebe verstärkt war (100–102). Die meisten Studien beziehen sich dabei auf das subkutane Fettgewebe. So konnte für männliche und weibliche Probanden mit abdomineller Adipositas gezeigt werden, dass die 11beta-HSD1 Aktivität und mRNA Expression im subkutanen Fettgewebe erhöht war (101,103–107). Einige wenige Studien zeigen ebenfalls eine erhöhte 11beta-HSD1 Expression und Aktivität im viszeralen Fettgewebe von übergewichtigen Ratten (108) und Menschen (100,109,110).

Masuzaki *et al.* (2001) konnten zeigen, dass eine spezifische Überexpression der 11beta-HSD1 im Fettgewebe in Mäusen mit der gemessenen 11beta-HSD1 Expression und Aktivität von übergewichtigen Menschen gemessenen 11beta-HSD1 Aktivität im Fettgewebe vergleichbar war (105,111). Die transgenen Mäuse nahmen unter einer High-Fat-Diät im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrollmäusen sehr stark an Gewicht zu, vor allem im viszeralen Fettgewebe. Darüber hinaus konnten bei den transgenen Mäusen weitere Entgleisungen im Fett- und Glucose-Metabolismus beobachtet werden. Sie litten unter Hyperglykämie und Hyperinsulinämie, entwickelten eine Insulinresistenz in peripheren Geweben und zeigten erhöhte Spiegel freier Fettsäuren (FFA) im Blut (111). Demzufolge wird eine erhöhte 11beta-HSD1 Expression und Aktivität im Fettgewebe mit dem Auftreten von Adipositas und dem metabolischen Syndrom assoziiert.

Es existiert ein weiteres transgenes Mausmodell, das die 11beta-HSD1 spezifisch in der Leber überexprimiert. Diese transgenen Mäuse entwickelten eine Fettleber und erhöhte freie Fettsäure- und Insulin-Blutspiegel, sowie Hypertonie und Dyslipidämie. Sie hatten aber normale Corticosteron-Blutspiegel und entwickelten weder eine Glucoseintoleranz noch eine Gewichtszunahme (112).

11beta-HSD1-Knock-out-Mäuse zeigten keine Veränderungen in der Entwicklung und Fertilität. Allerdings wurde eine Vergrößerung der Nebennieren festgestellt und aufgrund verringerter

negativer Feedback-Wirkung der Glucocorticoide auf die HPA-Achse waren die Plasma-Corticosteron-Spiegel erhöht (113,114). Der Mangel an 11beta-HSD1 bewirkte, dass diese Mäuse ein verbessertes Lipidprofil im Blut (niedrigere Triglycerid-Spiegel und höhere HDL-Spiegel) und eine verbesserte Glucosetoleranz entwickelten (115). Fasten führte allerdings zu verstärkten Fettansammlungen in der Leber, die nach erneuter Fütterung aber wieder abgebaut wurden. Trotz einer High-Fat-Diät nahmen die Mäuse nicht an Gewicht zu, die viszeralen Fettdepots verringerten sich sogar und die Insulin-Sensitivität in Fettgewebe und Leber wurde verbessert (115,116).

Auch in zahlreichen aktuellen *in-vitro* und *in-vivo* Studien wurden positive Auswirkungen einer 11beta-HSD1 Hemmung auf den Lipid- und Glucose-Stoffwechsel nachgewiesen. In adipösen und diabetischen Mausmodellen konnten durch 11beta-HSD1 Inhibitoren die Insulin- und Glucose-Spiegel im Blut gesenkt werden, sowie eine verbesserte Glucosetoleranz gemessen werden. Auch eine Reduktion von Gesamtcholesterol, Triglyzeriden und freien Fettsäuren wurde erzielt. In der Leber wurde eine Abschwächung der Gluconeogenese durch Hemmung der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase und Glucose-6-Phosphatase Expression gemessen (117–123). Klinische Studien mit dem unspezifischen 11beta-HSD1 Inhibitor Carbenoxolon zeigen ebenfalls positive metabolische Effekte (124–126). Dementsprechend stellt die 11beta-HSD1 momentan ein vielversprechendes Target für die Typ 2-Diabetes bzw. Adipositas Therapie dar. In mehreren pharmazeutischen Unternehmen befinden sich 11beta-HSD1 Inhibitoren derzeit in den klinischen Entwicklungsphasen 1 und 2.

### 1.3.4 11beta-HSD1 im Skelettmuskelgewebe

Wenig erforscht sind allerdings die Auswirkungen einer 11beta-HSD1 Hemmung auf den Metabolismus des Skelettmuskels. Mehrere Studien zeigen, dass die 11beta-HSD1 im Skelettmuskel exprimiert wird und biologisch aktiv als Oxoreduktase wirkt (127,128). Die 11beta-HSD1 Expression ist hierbei nicht vom Muskelfasertyp abhängig und tritt gleichermaßen in Slow-Twitch- und Fast-Twitch-Fasern auf (127). Im Vergleich zur Leber ist die Expression im Skelettmuskel ca. 100-fach geringer (127,129). Die H6PD Expression und somit die Bereitstellung des Co-Faktors NADPH für die 11beta-HSD1 Oxoreduktase-Aktivität konnte ebenfalls nachgewiesen werden (127).

Die Datenlage über eine veränderte 11beta-HSD1 Expression und Enzymaktivität im Skelettmuskel von Diabetikern und/oder Übergewichtigen ist divergent. Einerseits gibt es Studien, die eine Feed-Forward-Induktion der Glucocorticoid-Wirkung durch eine erhöhte 11beta-HSD1 Expression/Aktivität unterstützen. So wiesen Abdallah *et al.* (2005) eine erhöhte 11beta-HSD1 mRNA-Expression in primären humanen Myotuben von männlichen übergewichtigen Typ-2-Diabetikern im Vergleich mit gesunden Übergewichtigen nach (130). In einer weiteren Studie von Zhang *et al.* (2009) wurde in männlichen Wistar-Ratten durch Fütterung einer High-Fat-Diät kombiniert mit einer Streptozotocin-Injektion Typ-2-Diabetes ausgelöst, was zu einer Erhöhung der 11beta-HSD1 Expression im Musculus gastrocnemius führte (131). Whorwood *et al.* (2002) zeigten

in einer *ex-vivo* Studie mit männlichen Probanden positive Assoziationen der 11beta-HSD1 Expression im Musculus vastus lateralis mit Insulinresistenz, BMI und Blutdruck bei vorheriger Stimulation der Zellen mit Cortisol. Unter basalen Bedingungen war allerdings keine signifikante Assoziation zu erkennen (128). Ebenfalls keine Assoziation der 11beta-HSD1 Aktivität im Musculus vastus lateralis mit BMI, Insulinresistenz oder dem Taille/Hüfte-Ratio unter basalen Bedingungen konnten Inder *et al.* (2011) feststellen (132). Auf der anderen Seite demonstrierten Jang *et al.* (2007) in einer Humanstudie mit Typ-2-Diabetikern eine niedrigere 11beta-HSD1 Aktivität im Musculus vastus lateralis im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Hierbei war kein Unterschied in der mRNA-Expression zu sehen. Nach einer Intervention mit Dexamethason wurde in beiden Gruppen eine Erhöhung der 11beta-HSD1 mRNA Expression gemessen, ein Anstieg der 11beta-HSD1 Aktivität fand ausschließlich in der Diabetiker-Gruppe statt (133).

Mehrfach dargestellt wurde, dass Glucocorticoide im Skelettmuskel die 11beta-HSD1 induzieren und so in einer Feed-Forward-Schleife ihrer eigene Aktivierung stimulieren (128,133–135). Es konnte ebenfalls in C2C12 Myotuben und in Mausversuchen gezeigt werden, dass sich eine Hemmung der 11beta-HSD1 günstig auf den Insulinsignalweg und die Glucoseaufnahmefähigkeit in die Skelettmuskelzelle auswirkt (130,134,136).

Des Weiteren beeinflussen Glucocorticoide die Differenzierung von Myoblasten zu adulten mehrkernigen Myotuben. Auch hier wurden gegensätzliche Ergebnisse in verschiedenen Studien erzielt, die offen lassen, ob Glucocorticoide die Differenzierung unterstützen oder beeinträchtigen (137–141). Eine Funktion der 11beta-HSD1 im Differenzierungsprozess wurde bisher noch nicht untersucht. Es konnte aber gezeigt werden, dass die 11beta-HSD1 Expression während des Differenzierungsprozesses von Skelettmuskelzellen ansteigt (142,143).

Gut etabliert ist, dass Glucocorticoide die Proteolyse im Skelettmuskel induzieren (144,145) und dies vor allem über Stimulation des UPS und der Expression der Ubiquitin-Ligasen Atrogin-1 und MuRF-1 (146–149).

## 1.4 Zielstellung der Arbeit

Anhand der positiven Effekte einer 11beta-HSD1 Inhibition auf die Insulinsensitivität und Übergewicht, die vor allem im Fettgewebe und der Leber analysiert wurden, soll untersucht werden, welche Bedeutung der 11beta-HSD1 im Skelettmuskel zukommt und wie sich eine Hemmung der 11beta-HSD1 dort auswirkt. Für diese Untersuchungen werden die murine C2C12 Skelettmuskelzelllinie und primäre humane Myoblasten von gesunden Probanden verwendet. Es sollen die 11beta-HSD1-Expression, -Aktivität und -Promotoraktivität in den Myoblasten und Myotuben bestimmt werden. Nach der Analyse der 11beta-HSD1 -Expression und -Aktivität in Zusammenhang des Differenzierungsprozesses werden verschiedene Stimulationsexperimente durchgeführt, um die Auswirkungen einer erhöhten oder erniedrigten Aktivität der 11beta-HSD1 auf den Differenzierungsprozess und auf den Stoffwechsel von Myotuben zu untersuchen. Dabei wird die 11beta-HSD1 durch Glucocorticoide stimuliert und durch den Inhibitor Carbenoxolon gehemmt. Es werden die molekularen Differenzierungsprozesse, die Glucoseaufnahmekapazität, die Proteolyserate und die Entwicklung der Muskelfasertypen untersucht. Darüber hinaus wird auch der Einfluss der Stimulationslänge – akut und chronisch – analysiert.

Des Weiteren sollen anhand einer *in-silico* Analyse des distalen Promotorbereiches der 11beta-HSD1 potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, welche an der Regulation der Differenzierung beteiligt sein könnten. Nachfolgend sollen u.a. die siRNA Technologie sowie zielgerichtete Mutationen von 11beta-HSD1 Fragmenten angewendet werden, um die Promotoraktivität und die Expression der 11beta-HSD1, aber auch anderer wichtiger Faktoren im Kontext mit dem Verlust der Bindungsstelle bzw. des Transkriptionsfaktors näher zu untersuchen.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Skelettmuskelzellen

Für alle zellulären Versuche wurden die murine Muskelkarzinom-Zelllinie C2C12 und primäre humane Myoblasten verwendet. Das Wachstumsmedium für die C2C12-Zellen setzte sich aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/L Glucose und stabilem Glutamin und 10% fetalem Kälberserum (FKS, Charge 1072L; Biochrom AG, Berlin, Deutschland) zusammen. Die primären humanen Myoblasten wurden durch Protease Verdau aus frischen Muskelbiopsien (Collagenase II, Dispase1, Trypsin/EDTA) gesunder Probanden isoliert und in Skeletal-muscle-growth-medium und einem Supplement Mix der Firma PromoCell (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit 10% FKS, Glutamin (3 mM) und Gentamycin (40 mg/ml) kultiviert. Alle Kulturen wurden durch immuno-magnetische Zellsortierung anhand von anti-CD56/NCAM Antikörper behafteten magnetischen Beads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) selektiert, um eine Anreicherung von Myoblasten zu erhalten. Die Reinheit der Myoblasten Gewinnung wurde durch Anfärben mit einem anti-Desmin Antikörper geprüft, so dass sicher gestellt wurde, dass mehr als 95% der Zellen Desmin-positiv waren. Alle Experimente wurden zwischen Passage 5 und 15 nach der Isolation durchgeführt, um eine frühzeitige replikative Seneszenz zu vermeiden.

Die Zellen wurden bei ca. 70-80%iger Konfluenz durch Trypsinierung mit TrypLE Express (GibcoBRL, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) passagiert.

Die Differenzierung der Myoblasten zu Myotuben wurde bei ca. 90%iger Konfluenz der Zellen durch Ersetzen des Mediums durch Differenzierungsmedium initiiert. Das Differenzierungsmedium für die C2C12 sowie für die primären humanen Myoblasten bestand aus DMEM supplementiert mit 2% Pferdeserum (Charge 0096T; Biochrom AG, Berlin, Deutschland). Der Beginn der Differenzierung wird im Folgenden als D0 bezeichnet.

#### 2.1.2 Stimulationen

Für die Stimulationsversuche wurden die in Tabelle 2 angegebenen Substanzen verwendet. Alle Substanzen wurden in Ethanol (1/10vol) aufgelöst und anschließend mit steriltriertem dH<sub>2</sub>O auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt. So enthielten alle Stocklösungen 10% Ethanol. Die jeweiligen Stocklösungen wurden in den Experimenten 1:500 eingesetzt, so dass die finale Ethanolkonzentration unter 0,02% lag. Dies wurde bei den Kontrollexperimenten entsprechend berücksichtigt. Alle Substanzen wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2: Stimulationssubstanzen

<b>Substanz</b>	<b>eingesetzte Konzentration</b>	<b>Stocklösung</b>
<b>Carbenoxolon</b>	10 $\mu$ M	5 mM
<b>Cortison</b>	1 $\mu$ M	500 $\mu$ M
<b>Dexamethason</b>	1 $\mu$ M	500 $\mu$ M

### 2.1.2.1 Chronische Stimulation

Die chronische Stimulation wurde während der Differenzierung der Muskelzellen ab Beginn des Wechsels auf Differenzierungsmedium an D0 über 6 bzw. 12 Tage durchgeführt. Die Zellen wurden mit Carbenoxolon 30-60 min prä-inkubiert, danach folgte die Stimulation mit Cortison.

### 2.1.2.2 Akute Stimulation

Für die akute Stimulation wurden die Muskelzellen an Tag 5 der Differenzierung auf serumfreies DMEM mit 4,5 g/L Glucose und stabilem Glutamin gesetzt. An Tag 6 der Differenzierung wurden die Zellen 30-60 min mit Carbenoxolon prä-inkubiert und dann für 16h mit Cortison und Dexamethason stimuliert.

### 2.1.3 Transfektionen

Es wurden verschiedene Transfektionsbedingungen und -reagenzien getestet, um die Transfektionseffizienz der Myotuben zu optimieren. Dazu wurden die Zellen mit einem Vektor mit einem grün-fluoreszenzierenden Protein (pMaxGFP, Amaxa biosystems, Köln, Deutschland) nach den entsprechenden Protokollen transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde visuell mittels eines Fluoreszenzmikroskops (AxioStar plus, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) bestimmt. Das beste Ergebnis wurde mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine-2000 (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) im Verhältnis 1:5 zur Vektor-Menge erzielt. In Abbildung 9 ist die Transfektionseffizienz mit Lipofectamine-2000 im Vergleich zu Nanofectin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) dargestellt.

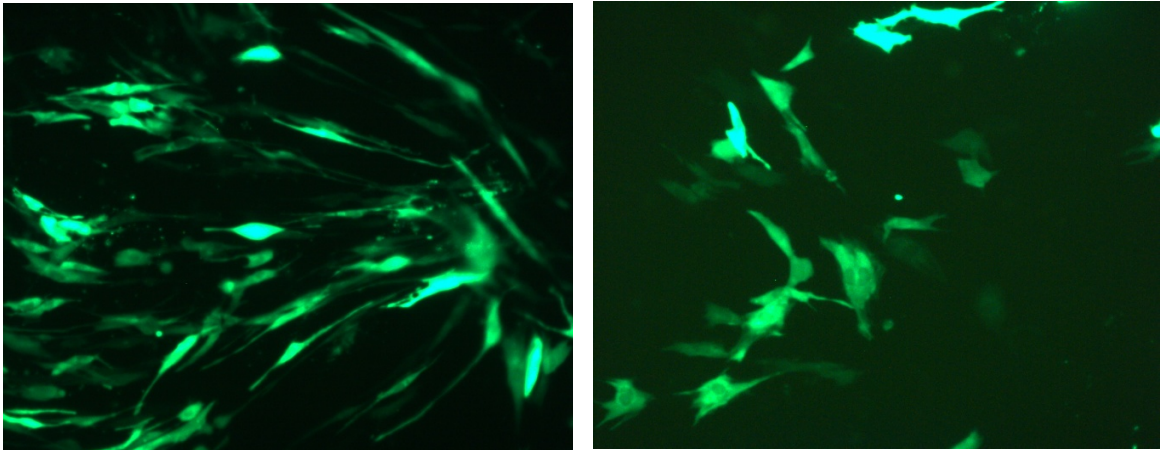


Abbildung 9: Transfektionseffizienz von pMaxGFP mit Lipofectamine 2000 (links) und Nanofectin (rechts) von C2C12 Myotuben. Fluoreszenzmikroskopaufnahme mit Anregung bei 488 nm und 20x Vergrößerung.

### 2.1.3.1 Transfektion der 11beta-HSD1 Promotorfragmente

Die Transfektion der 11beta-HSD1 Promotorfragmente (Tabelle 7) wurde im 96-Well-Format durchgeführt. Die C2C12 Myoblasten wurden mit 500-1.000 Zellen pro Well ausplattiert und bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 90%, die nach drei bis vier Tagen erreicht wurde, transfiziert. Der leere pGL3 Vektor (200 ng/well) und die acht 11beta-HSD1 Promotorfragmente (210-330 ng/well, äquimolar) wurden zusammen mit dem pRL-SV40 (20 ng/well) (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA), welcher der Normalisierung diente, transfiziert. Als Transfektionsreagenz diente Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA), das 1:5 zur Promotorkonstrukt-Menge eingesetzt wurde. In zwei Ansätzen wurden einmal die DNA-Vektoren mit Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) und Lipofectamine 2000 mit Opti-MEM getrennt für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze vermischt und für weitere 20 Minuten inkubiert und als Transfektionslösungen auf die Zellen pipettiert. Nach mindestens 6 h wurde das Medium durch Differenzierungsmedium (D0) ersetzt und die Zellen über drei oder sechs Tage mit 1  $\mu$ M Cortison stimuliert. Daraufhin folgte die Lysis der Zellen mit HEPES-Puffer (20 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT) und Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Die Promotor-Aktivität wurde mit dem Dual-Luciferase-Assay bestimmt (siehe 2.2.3.3).

### 2.1.3.2 RNA interference

Die RNA interference Technologie wurde angewendet, um ein gezieltes transientes Abschalten der Myogenin und MEF-2c mRNA zu erreichen. Die small interfering RNAs (siRNA) und das Transfektionsreagenz DharmaFECT1 siRNA Transfection Reagent wurden von der Firma Dharmacon (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, USA) bezogen. Bei der Myogenin siRNA

(MYOG ON-TARGETplus SMARTpool #L-044133-01) und MEF-2c siRNA (MEF2C ON-TARGETplus SMARTpool #L-009455-00) handelte es sich um eine Mischung vier verschiedener siRNAs gegen unterschiedliche Regionen der murinen Myogenin bzw. MEF-2c mRNA. Als Negativkontrollen wurden eine scrambled siRNA Kontrolle (ON-TARGETplus Non-targeting siRNA #2, #D-001810-02) verwendet, die keine Homologie im murinen Genom besitzt, sowie eine Mock-Kontrolle, bei der die Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz ohne siRNA behandelt wurden.

Die C2C12 Myoblasten wurden in 24-Well- oder 12-Well-Multiwellplatten ausplattiert, gemäß der in Tabelle 3 angegebenen Zellzahlen. Nach drei Tagen wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 70% transfiziert. Hierzu wurden pro Well zunächst in zwei verschiedenen Ansätzen siRNA eines 5 µM Stocks mit serumfreiem DMEM (finale Endkonzentration: 50 nM/well), sowie DharmaFECT 1 mit serumfreiem DMEM für fünf Minuten inkubiert. Danach wurden beide Ansätze vermischt (Transfektionslösung) und für 20 Minuten inkubiert. Die Zellen erhielten einen Mediumwechsel auf frisches Wachstumsmedium zusammen mit der Transfektionslösung. Nach 24 h Inkubation wurde die Differenzierung durch Wechsel des Mediums mit Differenzierungsmedium initiiert. Nach drei und sechs Tagen wurde RNA isoliert und die Myogenin bzw. MEF-2c mRNA Expression im Vergleich zur scrambled Kontroll-siRNA anhand der qRT-PCR quantifiziert. Durchschnittlich wurde ein Knock-down von Myogenin bzw. MEF-2c von 50-60% erreicht.

Tabelle 3: Pipettierschema für RNAi in verschiedenen Well-Formaten

Format	Zellzahl bei Aussaat	Ansatz 1		Ansatz 2		Wachstums- medium	Trans- fektions- lösung
		siRNA (5 µM)	serum- freies DMEM	Dharma- FECT1	serum- freies DMEM		
<b>12 well</b>	5.000- 10.000	10 µl	90 µl	10 µl	90 µl	800 µl	200 µl
<b>24 well</b>	2.500- 5.000	5 µl	45 µl	5 µl	45 µl	400 µl	100 µl
<b>96 well</b>	500- 1.000	1,25 µl	11,25 µl	1,25 µl	11,25 µl	100 µl	25 µl

### 2.1.3.3 Doppel-Transfektion von Myogenin siRNA und 11beta-HSD1 Promotorkonstrukten

Die siRNA Transfektion der C2C12 Myoblasten wurde im 96-well-Format durchgeführt (gemäß Tabelle 3), dem Protokoll entsprechend wie unter 2.1.3.2 beschrieben. Nach 24 h Inkubation der siRNA-Transfektionslösung wurden die Zellen mit den 11beta-HSD1 Promotorfragmenten (Tabelle 7) transfiziert, entsprechend wie in 2.1.3.1 aufgeführt. Nach mindestens 6 h erfolgte der Wechsel des Mediums auf Differenzierungsmedium. Nach drei Tagen wurde zur Kontrolle des siRNA-silencing-Effekts RNA isoliert und die Myogenin bzw. MEF-2c Transkription im Vergleich zur

scrambled Kontroll-siRNA mit der qRT-PCR quantifiziert. Die restlichen Zellen wurden mit HEPES-Puffer und Complete Protease Inhibitor Cocktail (siehe 2.1.3.1) lysiert und die 11beta-HSD1 Promotor-Aktivität mit dem Dual-Luciferase-Assay bestimmt (siehe 2.2.3.3).

### 2.1.3.4 Doppel-Transfektion von 11beta-HSD1 siRNA und GRalpha siRNA

Für die Doppel-siRNA-Transfektion wurden die 11beta-HSD1 siRNA (HSD11B1 ON-TARGETplus SMARTpool #L-046349-01-0005; Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, USA) und GRalpha siRNA (NR3C1 ON-TARGETplus SMARTpool #L-045970-01-0005; Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet. Die C2C12 Myblasten wurden in 12-Well-Multiwellplatten ausplattiert und für fünf Tage ausdifferenziert. Die Transfektion wurde dann gemäß Tabelle 8 für die 11beta-HSD1 siRNA und GRalpha siRNA gleichzeitig durchgeführt. Das Vorgehen war entsprechend dem der Myogenin siRNA-Transfektion (siehe 2.1.3.2). Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel mit Differenzierungsmedium und Stimulation mit Cortison über 48 h.

### 2.1.4 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Färbung wurden die C2C12 und die primären humanen Myoblasten in 96-Well-Multiwellplatten ausplattiert und ausdifferenziert. Nach Abschluss der Stimulationsexperimente wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Um eine bessere Permeabilität der Zellmembran zu erreichen, wurden die Zellen für 5-10 min mit eiskaltem Methanol (-20°C) behandelt und dreimal mit PBS gewaschen. Die freien Bindungsstellen wurden mit 5%igem Ziegen Serum mit 0,1% Triton X-100 in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Die primären Antikörper (Tabelle 4) wurden über Nacht 1:100 in 1% BSA in PBS bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Als sekundäre Antikörper wurden DyLight Fluor 488 goat anti-rabbit (Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland), DyLight Fluor 488 goat anti-mouse (Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) und DyLight Fluor 549 goat anti-rabbit (Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) 1:2000 in 1%BSA in PBS eingesetzt und die Zellen danach ebenfalls dreimal mit PBS gewaschen. Für die Kernfärbung wurde DAPI-Lösung (10 mg/ml) (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) 1:1000 in PBS verwendet. Die immunhistochemische Protein-Färbung wurde mittels Fluoreszenzmikroskop (BD Pathway 435 System and BD AttoVision V1.6 Software, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) mit folgenden Anregungs- und Emissionsfiltern/Filterbreiten visualisiert: DAPI 347/40 nm und 435LP; AK-488 482/35 nm und 536/40 nm; AK-549 543/22 nm und 593/40 nm.

Bei den dargestellten immunhistochemischen Abbildungen handelt es sich zum einen um Falschfarbenbilder, sowie um sogenannte Merge-Bilder, eine Überlagerung von mindestens zwei Bildern, wobei es bei Signalen an gleicher Stelle zur Mischung der Farben kommt.

Anmerkung: Der 11beta-HSD1-Antikörper ist laut Herstellerangabe für Western Blot und Immunofluoreszenz geeignet. Zwar zeigte sich im Western Blot, dass der verwendete primäre Antikörper gegen das 11beta-HSD1 Protein die richtige Größe ohne Nebenbanden detektiert, jedoch für die Quantifizierung qualitativ aufgrund sehr schwacher Signale nicht geeignet war.

Tabelle 4: Primäre und sekundäre Antikörper für die Immunohistochemie

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikelnummer</b>
<b>Myosin Heavy Chain</b>	Maus	Antikörper-online	ABIN152624
<b>GRalpha</b>	Kaninchen	Santa-Cruz Biotechnology	sc8992
<b>CREB</b>	Kaninchen	Cell signaling	9197
<b>11beta-HSD1</b>	Kaninchen	Novus Biotechnology	NBP1-32027
<b>Dylight 488</b>	Kaninchen	Biomol	611-141-002
<b>Dylight 488</b>	Maus	Biomol	610-741-002
<b>Dylight 549</b>	Kaninchen	Biomol	611-142-122

## 2.2 Molekularbiologische und biochemische Methoden

### 2.2.1 RNA-Analytik

#### 2.2.1.1 RNA-Isolation und cDNA Synthese

Für die RNA-Isolation aus C2C12 Zellen und primären humanen Myoblasten wurden die Zellen in Multiwellplatten (24-Well-, 12-Well- oder 6-Well-Format) ausgesät. Undifferenzierte Myoblasten wurden bei ca. 90%iger Konfluenz isoliert. Die Isolation aus den Zellen erfolgte nach Anleitung mit RNazol®RT (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, USA). Bis zur cDNA Synthese wurden die RNA Proben bei -80°C gelagert.

Die isolierte RNA wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) in cDNA umgeschrieben.

#### 2.2.1.2 Semi-quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die Quantifizierung der Expressionslevel der verschiedenen Targets erfolgte mittels qRT-PCR. In Tabelle 5 sind die dazu verwendeten Primer aufgeführt, die Buchstaben M, R, W und Y stehen hierbei für degenerierte Basen nach IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Die cDNA und die entsprechenden Primer wurden mit Power-SYBR RT-PCR MasterMix (Applied

Biosystems, Foster City, USA) nach Anleitung vermischt und im ABI PRISM 7300 System (Applied Biosystems, Foster City, USA) analysiert. Die verwendete Annealtemperatur betrug für alle Primer 56°C. Die Auswertung erfolgte mit der 7300 System SDS Software Version 1.4 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Die relativen Veränderungen der jeweiligen Behandlung wurden anhand der ddCt-Methode berechnet (Formel 1). Als interner Standard wurde das mitochondriale Riboprotein 16s verwendet.

$$\text{Relative Veränderung} = 2^{(-ddCt)}$$

$$ddCt = dCt(\text{Stimulation}) - dCt(\text{Kontrollbehandlung})$$

$$dCt = Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\text{interner Standard})$$

Formel 1: Berechnung der relativen Veränderung der mRNA-Level des Zielgens anhand der ddCt-Methode

Tabelle 5: Primer für die qRT-PCR

<b>Gen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Sense Primer</b>	<b>Antisense Primer</b>
<b>16S</b>	murin, human	TGCAGGTCTTCGGACGCA	ACTGYAGCGYCGCGGCT
<b>11beta-HSD1</b>	murin, human	TTGCCCATGCTGAAGCA	AGAACCCATCCARAGCAAAC
<b>11beta-HSD1</b>	murin, human	WGGGGCCAGCAAAGGGA	TGCTCCRAGYTCMAGGCA
<b>GRalpha</b>	murin, human	AYTGGCAGCGTTTTATC	CTCRGGAATTCAATACTC
<b>MyoD</b>	murin	CTTCTACGCACCTGGACCG	TCGTAGCCATTCTGCCGC
<b>MyoD</b>	human	AGCACTACAGCGGCGACTC	CAGGCAGTCTAGGCTCGACAC
<b>Myf5</b>	murin	CTACATTGAGAGCCTCCAGG	GCTGTTCTTTCGGGACCA
<b>Myf5</b>	human	CCCACCTCCAAGTCTCT	GGTATCCGGTCCACTATGTT
<b>Myh1</b>	murin	GCGGAGGCCAAAAGAAAA	GCATCGCTCCTCTGCATC
<b>Myh1</b>	human	GATGACCAACTTGAGGAGCAC	CTTCCAGCACACCGTTACAC
<b>Myh2</b>	murin	GAAGAGCGAGATGAAGATGGA	GTCCTCTCTGGGTTGTCAGG
<b>Myh4</b>	murin	ATGAACAGAAGCGCAACATC	GCCTCCTCAGCCTGTCTCT
<b>Myh7</b>	murin	CAACTGGAGGAGGAGGTCAA	GAATTGGCCTTGACAGGA
<b>MRF4</b>	murin	CTACAAACCCAAGCAAGAAA	GAAGAAAGGCCTGAAGA
<b>MRF4</b>	human	GCTGGATCAGCAGGAGAAGA	CCTGGAATGATCGGAAACAC
<b>Myogenin</b>	murin	GTGAATGCAACTCCACA	GCAACAGACATATCCTCCAC
<b>MuRF-1</b>	murin	CCTGCTGGTGAAAAACATCAT	GAGCAAGTAGGCACCTCACAC
<b>MuRF-1</b>	human	GCTCCATGTGCAAGGTGTT	GCTGAGTGATGATGGTCTGC
<b>Atrogin-1</b>	murin	GTCGCAGCCAAGAAGAGAAAAGAA	CGAGAAGTCCAGTCTGTTGAAAGC
<b>Atrogin-1</b>	human	GTGGGTGTATCGGATGGAGA	CAAAGGCAGGTCAAGTGAAGGT

## 2.2.2 Protein-Analytik

### 2.2.2.1 Protein-Isolation und Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Protein-Isolation aus C2C12 Zellen und primären humanen Myoblasten wurden die Zellen in 6-Well-Multiwellplatten ausgesät. Undifferenzierte Myoblasten wurden bei ca. 90%iger Konfluenz isoliert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) wurden die Zellen in Laemmli-Puffer (7% v/v Glycerin, 3% (w/v) SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% (v/v) beta-Mercaptoethanol, Bromphenolblau) lysiert, für 5 min auf 95°C erhitzt und die DNA und andere visköse Bestandteile mit einem Ultraschallstab zerstört. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Lösung 3:2 mit 60 % (w/v) Trichloressigsäure versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden anhand der Extinktion bei einer Wellenlänge von 590 nm im Multiwellreader Mithras LB 940 (Berthold Technologies GmbH & Co.KG, Bad Wildbad, Deutschland) und einer BSA-Standardreihe (in Laemmli-Puffer) quantifiziert.



### 2.2.2.2 SDS Page und Western Blot

Zur Auftrennung der Proteinfractionen wurde ein 10%iges Fertig-Polyacrylamidgel (ClearPage, C.B.S scientific company, Inc, San Diego, USA) mit 20-50 µg Gesamtprotein beladen und bei 100 V in einer Gelelektrophoresekammer (C.B.S. scientific, Kalifornien, USA) in Laufpuffer (ClearPage, C.B.S scientific company, Inc, San Diego, USA) aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mittels Tank-Blot-Verfahren (Transferpuffer: 0,23 M Glycin, 25 mM Tris (Base), 0,69 mM SDS, 20% (v/v) Methanol) bei 180 V auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

### 2.2.2.3 Immunodetektion

Die freien Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran wurden 1 h bei Raumtemperatur mit 1%iger Blocking Lösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) in TBS blockiert. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Die primären Antikörper wurden 1:1000 in 0,5%iger Blocking Lösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) in TBS (10 mM Tris (Base), 0,15 M NaCl, pH=8) eingesetzt, die sekundären Antikörper 1:2000. Zum Entfernen unspezifisch gebundener Antikörper von der Membran wurde diese zwischen den Antikörperbehandlungen jeweils dreimal mit TBS/T gewaschen. Die Detektion der Chemilumineszenz über das gekoppelte Enzym horseradish-peroxidase (HRP) erfolgte mit dem ChemiDocXRS+ Geldokumentationssystem (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Als Substrat wurde LumiLight Plus (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit der Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland).

Tabelle 6: Primäre und sekundäre Antikörper für die Immunodetektion

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikelnummer</b>
<b>Alpha-Tubulin</b>	Kaninchen	Cell signaling	2144
<b>Myosin Heavy Chain</b>	Maus	Antikörper-online	ABIN152624
<b>Myosin Heavy Chain slow</b>	Maus	Sigma Aldrich	M8421
<b>Myosin Heavy Chain fast</b>	Maus	Sigma Aldrich	M4276
<b>Myogenin</b>	Maus	Genetex	gtx11986
<b>GRalpha</b>	Kaninchen	Santa-Cruz Biotechnology	sc8992
<b>p-Akt (Ser473)</b>	Kaninchen	Cell signaling	9271
<b>Akt</b>	Kaninchen	Cell signaling	9272
<b>p-CREB (Ser133)</b>	Kaninchen	Cell signaling	9191
<b>CREB</b>	Kaninchen	Cell signaling	9197
<b>p-Foxo1 (Ser256)</b>	Kaninchen	Cell signaling	9461
<b>Foxo1</b>	Kaninchen	Cell signaling	2880
<b>Anti-rabbit, IgG, HRP-linked</b>	Ziege	Cell signaling	7074S
<b>Anti-mouse, IgG, HRP-linked</b>	Pferd	Cell-signaling	7076

### 2.2.3 11beta-HSD1 Promotoranalyse

Für die Analyse des 11beta-HSD1-Promotors wurden die durch Andres *et al.* (2007) (150) in den Leervektor pGL3 (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA) klonierten Promotorfragmente verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 7: 11beta-HSD1 Promotorfragmente

<b>11beta-HSD1 Promotorfragment</b>	<b>Promotorbereich</b>
<b>F1a</b>	-85/+188
<b>F1</b>	-172/+188
<b>F2</b>	-321/+188
<b>F3</b>	-823/+188
<b>F4</b>	-1505/+188
<b>F5</b>	-2235/+188
<b>F6</b>	-2841/+188
<b>F7</b>	-3034/+188

2.2.3.1 *In-silico* Analyse

Die Promotorregion des 11beta-HSD1 Gens wurde mit MatInspector (151), JasparDatabase (152) sowie Algen Promo (153) zur Bestimmung von potentiellen Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren analysiert. Hierdurch wurden auffällig viele Übereinstimmungen für die Bindungsmatrizen der Transkriptionsfaktoren Myogenin und MEF2 gefunden (Tabelle 8). Die Bindungsmatrizen beruhen auf der Computer-gestützten Auswertung bekannter Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen unter Verwendung verschiedener Algorithmen. Hieraus ergibt sich für jeden Transkriptionsfaktor ein spezifisches Nukleotidverteilungsmuster.

Tabelle 8: Darstellung der Bindungsmatrizen der Transkriptionsfaktoren Myogenin und MEF2 und der jeweiligen Bindungs-Position im 11beta-HSD1 Promotor.

Transkriptionsfaktor	Bindungsmatrix	Position																																																												
Myogenin	<table border="1"> <tr><td>A</td><td>0</td><td>11</td><td>0</td><td>0</td><td>5</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>C</td><td>11</td><td>0</td><td>0</td><td>11</td><td>0</td><td>3</td><td>5</td></tr> <tr><td>G</td><td>0</td><td>0</td><td>11</td><td>0</td><td>1</td><td>7</td><td>4</td></tr> <tr><td>T</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>5</td><td>0</td><td>1</td></tr> </table> <p>C A G C A G C</p>	A	0	11	0	0	5	0	0	C	11	0	0	11	0	3	5	G	0	0	11	0	1	7	4	T	0	0	0	0	5	0	1	-1293/-1289 -1789/-1785																												
A	0	11	0	0	5	0	0																																																							
C	11	0	0	11	0	3	5																																																							
G	0	0	11	0	1	7	4																																																							
T	0	0	0	0	5	0	1																																																							
MEF2	<table border="1"> <tr><td>A</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td><td>0</td><td>3</td><td>1</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td></tr> <tr><td>C</td><td>1</td><td>3</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>G</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td></tr> <tr><td>T</td><td>1</td><td>0</td><td>3</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>3</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> </table> <p>C C T A A A A A T A A C A C</p>	A	0	0	0	2	3	3	3	3	0	3	1	0	1	0	C	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	T	1	0	3	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	-1724/-1721
A	0	0	0	2	3	3	3	3	0	3	1	0	1	0																																																
C	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1																																																
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1																																																
T	1	0	3	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0																																																

2.2.3.2 Mutagenese der 11beta-HSD1 Promotorfragmente

Die Mutagenese der 11beta-HSD1 Promotorfragmente F4 und F5 (siehe Tabelle 7) wurde mit dem QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA) nach Anleitung durchgeführt. Die mittels *in-silico* Analyse gefundenen potentiellen Bindungsstellen für Myogenin und MEF2 wurden durch PCR-Amplifikation der Fragmente F4 bzw. F5 und anhand der in Tabelle 9 aufgeführten Mutationsprimer mutiert. Es folgte ein Verdau mit der Endonuklease Dpn I, welche spezifisch das methylierte Parental-Plasmid abbaut. Die Transformation erfolgte in den E.coli Sicherheitsstamm XL-Gold. Die mutierten Fragmente wurden durch Sequenzierung überprüft (Sequenzierungsprimer: Forward TAATCTGTTTGTGTCTTTGGGT; Reverse AGTATCAGTGCTTTGGAGGA).

Tabelle 9: Mutagenese der 11beta-HSD1 Promotorfragmente F4 und F5. In Großbuchstaben sind die neuen mutierten Sequenzen dargestellt.

Promotor-fragment	Nr.	Mutations-stelle	Transkriptions-faktor	Mutationsprimer
<b>F4</b>	1	-1293/-1289	Myogenin	aagtgaccctcTCAAGCACggccttggacaa
<b>F5</b>	1	-1293/-1289	Myogenin	aagtgaccctcTCAAGCACggccttggacaa
<b>F5</b>	2	-1724/-1721	MEF2	tgcaattatcttactcattgttattCtActtctttaaatt
<b>F5</b>	3	-1789/-1785	Myogenin	ttaattggagccaacaatGTAGCTAAGttaatgcatttgccttg

### 2.2.3.3 Dual-Luciferase-Assay

Die 11beta-HSD1 Promotoraktivität wurde anhand eines durch Andres *et al.* (2007) etablierten Dual-Luciferase-Assays nach Dyer *et al.* (2000) bestimmt. Die Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivität wurden mit einem Multiwell-Reader mit zwei Injektoren (Mithras LB 940, Berthold Technologies GmbH Co.KG, Bad Wildbad, Deutschland) unter Verwendung folgender Puffer quantifiziert:

Firefly-Luciferase-Puffer (25 mM Glycylglycin, 15 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mM EGTA, 15 mM MgSO<sub>4</sub> und frisch zugesetztem 0,1 mM CoA, 10 mM ATP, 150 µM Beetle Luciferin (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA)),

Renilla-Puffer (1,1 M NaCl, 2,2 mM EDTA, 0,22 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,44 mg/ml BSA, 1,3 mM NaN<sub>3</sub> und frisch zugesetztem 1,43 mM nativen Coelenterazine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)).

Zunächst wurden über einen Injektor 40 µl des Luciferase-Puffers injiziert und für zwei Sekunden die Biolumineszenz gemessen. Danach wurden über den zweiten Injektor 40 µl des Renilla-Puffers injiziert und ebenfalls für zwei Sekunden die Biolumineszenz gemessen. Jede Stimulation pro Experiment wurde als 5-fach-Replikat durchgeführt. Zur Normalisierung wurde der Quotient aus dem Luciferase- und Renilla-Messwert gebildet. Dem Signalquotienten des Leervektors pGL3 wurde der Wert 1 zugeordnet.

### 2.2.4 11beta-HSD1 Enzymaktivität

Für die Quantifizierung der 11beta-HSD1-Enzymaktivität in C2C12 Zellen und in primären humanen Myoblasten wurde die Reduktase-Aktivität bestimmt. Die Zellen wurden in 6-Well-Multiwellplatten ausplattiert. Die Enzymbestimmung erfolgte in serumfreiem Medium. Die Zellen wurden für 2,5-4h (C2C12) oder 24h (primäre humane Myoblasten) mit 100 nM unmarkiertem Cortison und radioaktiv markiertem 1,2-<sup>3</sup>H-Cortison (American Radiolabeled Chemicals, Inc., St.

Louis, USA) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Mediumüberstand über den Zellen abgenommen. Der Zell-Monolayer wurde mit 50 mM NaOH-Lösung lysiert und ein Teil hiervon für die DNA-Bestimmung abgenommen. Das restliche Lysat wurde zu dem Mediumüberstand gegeben und mit zwei Volumenteilen Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Zentrifugation wurde die obere organische Phase abgenommen, unter Luft verdampft, in 50 µl Dichlormethan aufgenommen und auf eine Dünnschichtplatte (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), aufgetragen. Die Trennung der beiden Steroide Cortison und Cortisol erfolgte in einer mit Dichlormethan:Methanol (75:8) gesättigten Kammer. Die unter UV-Licht markierten Spots wurden daraufhin ausgeschnitten, mit Scintillationsflüssigkeit (Instant SCINT-Gel PLUS, Perkin Elmer, Massachusetts, USA) vermischt und die Beta-Strahlung der jeweiligen Fraktionen in einem Beta-Counter quantifiziert. Anhand von Formel 2 wurde die 11beta-HSD1-Reduktase-Aktivität berechnet.

$$pmol/50\mu g DNA/h = \frac{dpm}{2,22 \times 10^6 \left[ \frac{\mu Ci}{dpm} \right] \times \text{spezifische Aktivität} \left[ \frac{pmol}{\mu Ci} \right] \times \text{Zeit [h]} \times \frac{50 [\mu g]}{DNA - \text{Gehalt} [\mu g]}}$$

Formel 2: Berechnung der 11beta-HSD1-Reduktase-Aktivität durch den Substratumsatz von [<sup>3</sup>H]-markiertem Cortison zu Cortisol

### 2.2.5 Proteolyse-Assay

Der Proteinabbau in den Muskelzellen wurde über die Quantifizierung des Abbaus von [<sup>3</sup>H]-markiertem Tyrosin bestimmt. Hierzu wurden die Muskelzellen in 12-Well-Multiwellplatten ausplattiert und am Tag 5 der Differenzierung für 48 h mit 0,5 µCi/ml L-[Ring 3,5-<sup>3</sup>H]-Tyrosin (spezifische Aktivität: 50 Ci/mmol) (ARC – American Radiolabeled Chemicals, Vertrieb über Biotrend) in 1 ml Differenzierungsmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, um das inkorporierte Tyrosin zu markieren. Daraufhin wurden die Zellen mit Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) gewaschen. Um die Proteolyse kurzlebiger Proteine von der Messung auszuschließen, wurden die Zellen für 2 h mit 500 µl serumfreien Medium mit 200 µM Tyrosin behandelt und erneut zweimal mit HBSS gewaschen. Danach wurden die Zellen erneut in 500 µl serumfreien Medium mit 200 µM Tyrosin inkubiert, mit 10 µM Carbenoxolon vorstimuliert und nach 30 min folgte die Stimulation mit 1 µM Cortison sowie 1 µM Dexamethason als Positivkontrolle. Nach 16 h wurde der Mediumüberstand abgenommen, mit 100 µl BSA (10 mg/ml) sowie 1:1 mit 20%iger TCA vermischt und die Proteine bei 4°C für mindestens 1 h präzipitiert. Durch Zentrifugation wurden die TCA-unlöslichen Proteine pelletiert (Fraktion B), welche in 1 ml Lysispuffer (0,5 M NaOH und 0,1% Triton X-100) aufgenommen wurden. Der Überstand enthielt die TCA-löslichen Proteine (Fraktion A). Die Zell-Monolayer wurde zweimal mit PBS gewaschen und ebenfalls in 1 ml Lysispuffer aufgenommen (Fraktion C). Fraktion A wurde mit insgesamt 10 ml und Fraktion B und C jeweils mit 5 ml Scintillationsflüssigkeit (Instant SCINT-Gel PLUS, Perkin Elmer, Massachusetts,

USA) vermischt und die Beta-Strahlung des [<sup>3</sup>H]-markierten Tyrosins in den einzelnen Fraktionen im Beta-Counter quantifiziert. Die prozentuale Proteolyse wurde anhand von Formel 3 berechnet.

$$\text{Proteolyse (\%)} = \frac{\text{dpm (Fraktion A)}}{\text{dpm (Fraktion A)} + \text{dpm (Fraktion B)} + \text{dpm (Fraktion C)}} \times 100$$

Formel 3: Berechnung der Proteolyserate in Prozent.

### 2.2.6 Glukoseaufnahme-Assay

Die Glukoseaufnahme wurde im 12-Well-Format gemessen. Die Muskelzellen wurden ausdifferenziert und am fünften Tag der Differenzierung wurde das Differenzierungsmedium gegen serumfreies DMEM ausgetauscht. An Tag 6 der Differenzierung wurden die Zellen 30-60 min mit Carboxolon prä-inkubiert und dann für 16 h mit Cortison und Dexamethason stimuliert. Eine Stunde vor Initiation der Messung wurde das Medium durch glukosefreies DMEM ersetzt und 15 min vor Initiation der Messung wurden ein Teil der Zellen mit 100 nM Insulin vorstimuliert. Die Zellen wurden für 120 min mit 200 µM Deoxy-Glukose und radioaktiv markierter Deoxy-D-Glukose, 2-[1-2-<sup>3</sup>H(N)] (Perkin Elmer LAS, MA, USA) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Daraufhin wurde der Mediumüberstand abgenommen und verworfen und die Zell-Monolayer zweimal mit PBS gewaschen. Der Zell-Monolayer wurde mit 50 mM NaOH-Lösung lysiert und ein Teil hiervon für die DNA-Bestimmung abgenommen. Der Rest wurde mit Scintillationsflüssigkeit (Instant SCINT-Gel PLUS, Perkin Elmer, Massachusetts, USA) vermischt und die Beta-Strahlung der einzelnen Ansätze im Beta-Counter quantifiziert. Anhand von Formel 4 wurde die Glukoseaufnahme pro Stunde berechnet.

$$\text{pmol}/50\mu\text{g DNA}/\text{h} = \frac{\text{dpm}}{2,22 \times 10^6 \left[ \frac{\mu\text{Ci}}{\text{dpm}} \right] \times \text{spezifische Aktivität} \left[ \frac{\text{pmol}}{\mu\text{Ci}} \right] \times \text{Zeit [h]} \times \frac{50 [\mu\text{g}]}{\text{DNA - Gehalt} [\mu\text{g}]}}$$

Formel 4: Berechnung der Glukoseaufnahme durch Messung der Aufnahme <sup>3</sup>H-markierter-Deoxy-Glukose in die Zelle.

### **2.3 Statistische Auswertung**

Die aus den Experimenten hervorgehenden Daten wurden mithilfe des Programms GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., Kalifornien, USA) als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) berechnet und grafisch dargestellt. Bei einem Vergleich von zwei Gruppen wurde die Signifikanz mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test überprüft, da dieser Test für kleine Stichproben geeignet ist und eine Normalverteilung nicht vorausgesetzt wird. Bei einem Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der ebenfalls nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test und daran anschließend als Posthoc-Test der Dunn's-Test for multiple comparison angewendet. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $P < 0,05$ ) festgelegt. Für alle Experimente wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche (n) durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Analyse der 11beta-HSD1 in der Skelettmuskeldifferenzierung

Als *in vitro*-Modellsystem zur Untersuchung der Myoblastendifferenzierung wurde die murine Skelettmuskelzelllinie C2C12 verwendet, eine gut etablierte Zelllinie in der Forschung für Muskelzellentwicklung und –differenzierung. Des Weiteren wurden die relevanten Ergebnisse in primären humanen Myoblasten verifiziert.

##### 3.1.1 Expressionsverlauf der Muskel-Differenzierungsmarker während der Skelettmuskelzelldifferenzierung

Die Muskelzelldifferenzierung der C2C12 und der primären humanen Myoblasten zu adulten Myotuben wurde sowohl visuell mittels Mikroskop kontrolliert, als auch durch Bestimmung der Expression von muskelspezifischen Differenzierungsmarkern. Die immunhistochemischen Färbungen von Myosin Heavy Chain (MyHC), als Marker für die terminale Differenzierung, sind in Abbildung 10 und Abbildung 11 dargestellt. Die Differenzierungsrate der C2C12 Zellen war in den für die Immunhistochemie verwendeten schwarzen 96-Well-Platten allerdings geringer als in den transparenten Multiwellplatten, die für alle anderen Versuche eingesetzt wurden.

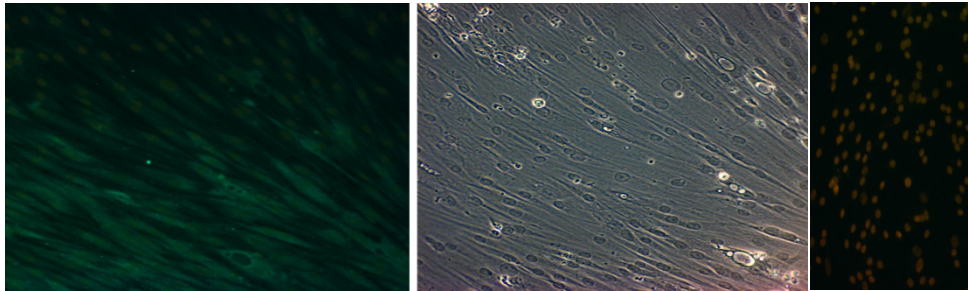


Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung von MyHC in differenzierten primären humanen Myotuben (20x Vergrößerung). Links: Fluoreszenzmikroskopaufnahme (MyHC: grün). Der Kernfarbstoff Sytox orange wird hier mit angeregt (orange). Mitte: Phasenkontrastaufnahme. Rechts: Fluoreszenzmikroskopaufnahme der Färbekontrolle (nur Kernfärbung; orange).



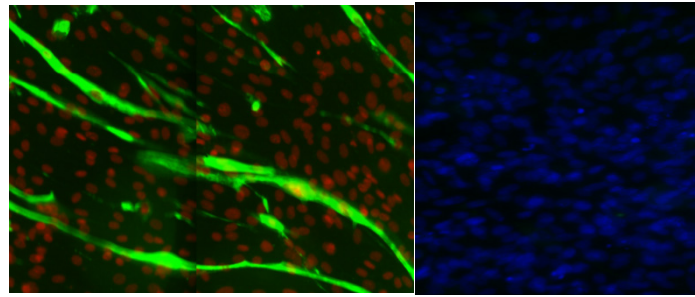


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung von MyHC in differenzierten C2C12 Myotuben (20x Vergrößerung). Links: Merge-Bild der Fluoreszenzmikroskopaufnahme von MyHC (grün) und DAPI-Kernfärbung (rot). Rechts: Fluoreszenzmikroskopaufnahme der Färbekontrolle (nur DAPI-Kernfärbung; blau). Dargestellt sind Falschfarbenbilder.

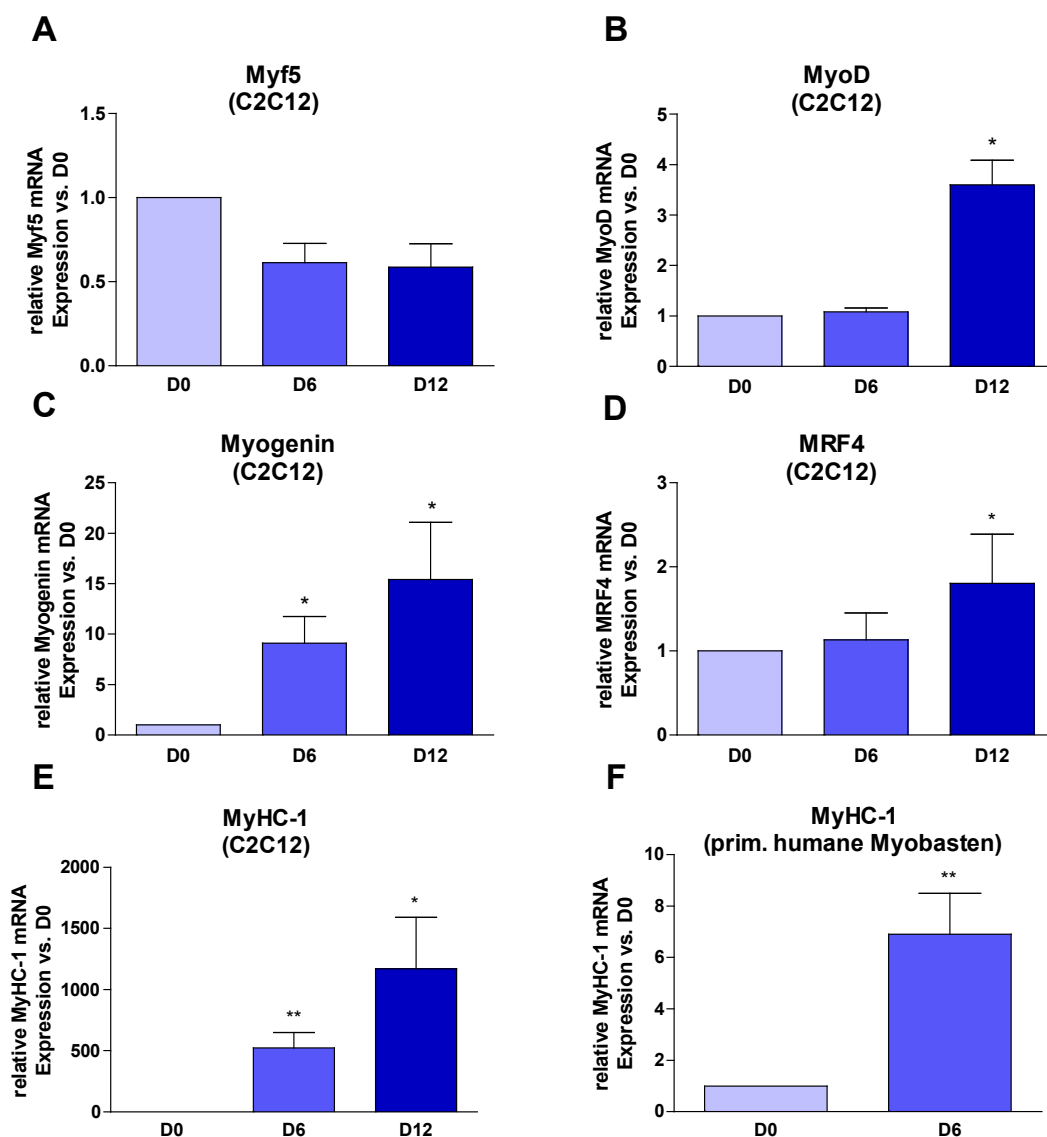


Abbildung 12: mRNA Expression der Muskeldifferenzierungsmarker im Differenzierungsverlauf in C2C12 [A-E] und primären humanen Myoblasten [F] (normalisiert auf das mitochondriale Riboprotein 16s): Myf5 (n=6) [A], MyoD (n=4) [B], Myogenin (n=4) [C], MRF4 (n=5) [D], MyHC-1 (jeweils n=5) [E und F]. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen mRNA Expressionen. D0: Beginn Differenzierung, D6: 6 Tage differenzierte Zellen, D12: 12 Tage differenzierte Zellen. \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$

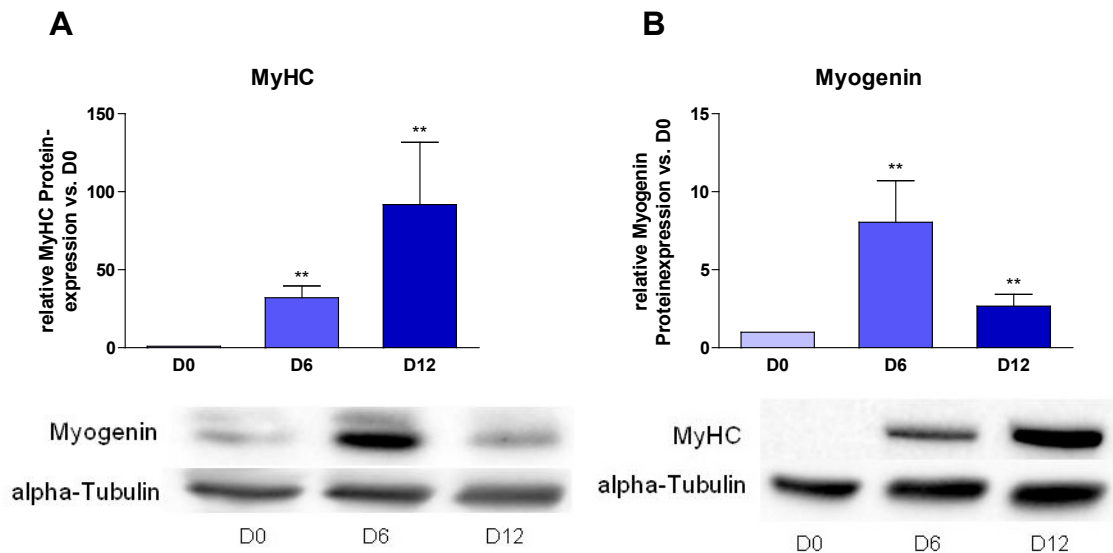


Abbildung 13: Proteinexpression von MyHC und Myogenin im Differenzierungsverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen Proteinexpressionen von MyHC [A] und Myogenin [B] in C2C12 (jeweils  $n=6$ ), normalisiert auf alpha-Tubulin, und jeweils ein repräsentativer Western Blot. D0: Beginn Differenzierung, D6: 6 Tage differenzierte Zellen, D12: 12 Tage differenzierte Zellen. \*\* $P \leq 0,01$

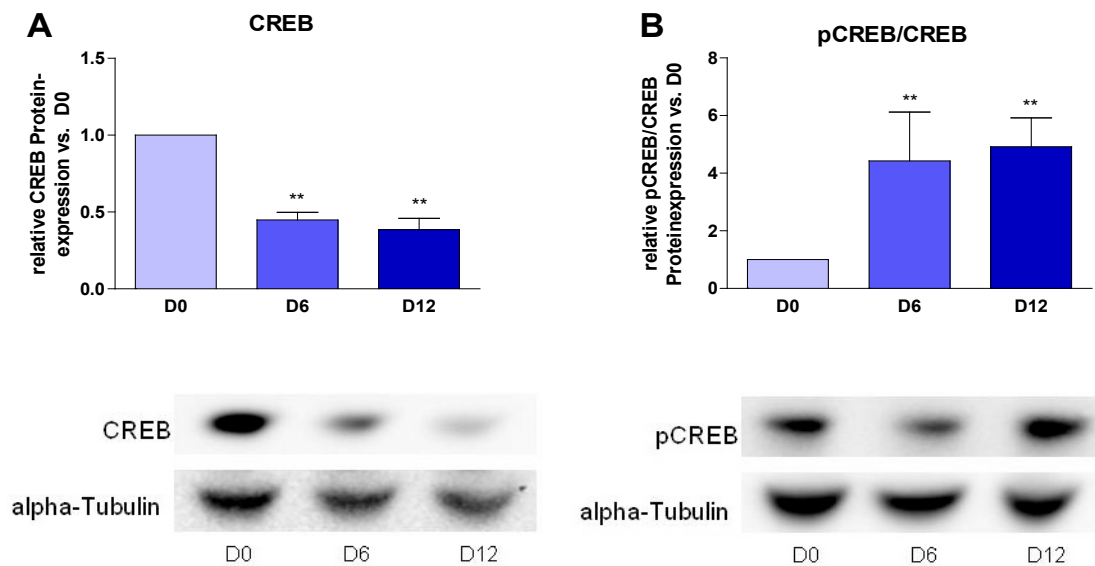


Abbildung 14: Proteinexpression von CREB und pCREB im Differenzierungsverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen Proteinexpressionen von CREB ( $n=6$ ) [A] und pCREB(Ser133)/CREB ( $n=5$ ) [B] in C2C12, normalisiert auf alpha-Tubulin, und jeweils ein repräsentativer Western Blot. D0: Beginn Differenzierung, D6: 6 Tage differenzierte Zellen, D12: 12 Tage differenzierte Zellen. \*\* $P \leq 0,01$

In C2C12 Zellen war die Transkription der sogenannten frühen Differenzierungsmarker Myf5 und MyoD in sechs Tagen differenzierten Zellen (D6) tendenziell geringer oder gleich, verglichen mit D0 (Myoblasten zu Beginn der Differenzierung). Die MyoD Transkription stieg in zwölf Tagen ausdifferenzierten C2C12 Myotuben signifikant ( $P < 0,05$ ) an. Die Transkriptionen der mittleren bis späten Marker Myogenin, MRF-4 und MyHC-1 vergrößerten sich mit der Differenzierung (D0-D12),

wohingegen die Myogenin Proteinexpression zunächst anstieg und an D12 wieder ein niedriges Niveau erreichte (Abbildung 12 und Abbildung 13).

Die MyHC-1 mRNA-Expression wurde in den C2C12 Zellen durch die Differenzierung deutlich induziert, in primären humanen Myoblasten fiel der Anstieg geringer aus (Abbildung 12). In C2C12 Zellen wurde ebenfalls eine starke Steigerung der MyHC-1 Proteinexpression detektiert (Abbildung 13).

Die CREB Proteinexpression nahm im Verlauf der Differenzierung an D6 gegenüber D0 in C2C12 Zellen ab, die Phosphorylierung von CREB am Serin-133 und somit die Aktivierung von CREB hingegen stieg durch die Differenzierung an D6 gegenüber D0 an. An D12 wurden keine weiteren Veränderungen von CREB und pCREB gemessen (Abbildung 14).

Des Weiteren waren die mRNA Expressionen der E3-Ubiquitin-Ligasen Atrogin-1 und MuRF-1 ebenfalls von der Differenzierung abhängig und stiegen während der Differenzierung signifikant an (D6 und D12) (Abbildung 15).

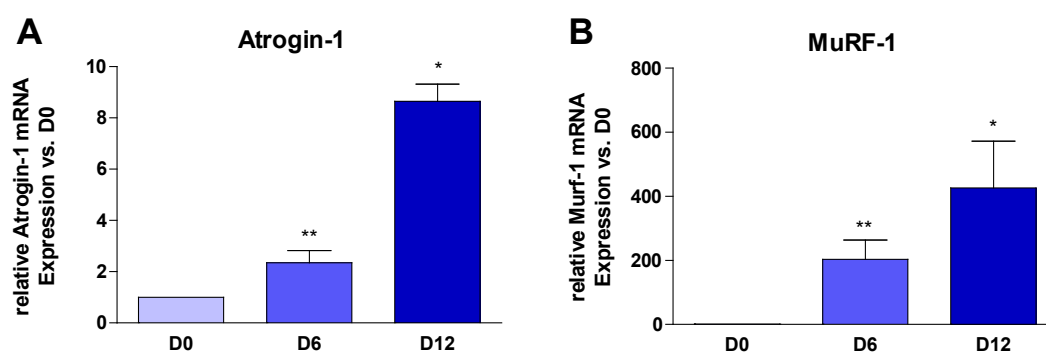


Abbildung 15: Proteinexpression von Atrogin-1 und MuRF-1 im Differenzierungsverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen mRNA Expressionen von Atrogin-1 [A] und MuRF-1 [B] in C2C12 während der Differenzierung (normalisiert auf das mitochondriale Riboprotein 16s) (jeweils n=4). D0: Beginn Differenzierung, D6: 6 Tage differenzierte Zellen, D12: 12 Tage differenzierte Zellen. \*P $\leq$ 0,05

### 3.1.2 Die 11beta-HSD1 Transkription und Reduktase-Enzymaktivität in Skelettmuskelzellen

Die 11beta-HSD1 Expression konnte in C2C12 Myotuben und in primären humanen Myotuben nachgewiesen werden. In undifferenzierten Myoblasten (D0) waren die 11beta-HSD1 Transkription und Reduktase-Aktivität sehr gering und stiegen während der Differenzierung zu adulten Myotuben (D6 und D12) an (Abbildung 16). Aufgrund des Fehlens eines zur Quantifizierung geeigneten kommerziellen Antikörpers gegen das 11beta-HSD1 Protein konnte in dieser Arbeit ausschließlich

die 11beta-HSD1 Transkription und Enzymaktivität untersucht werden. Die Expression der 11beta-HSD2 konnte nicht nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

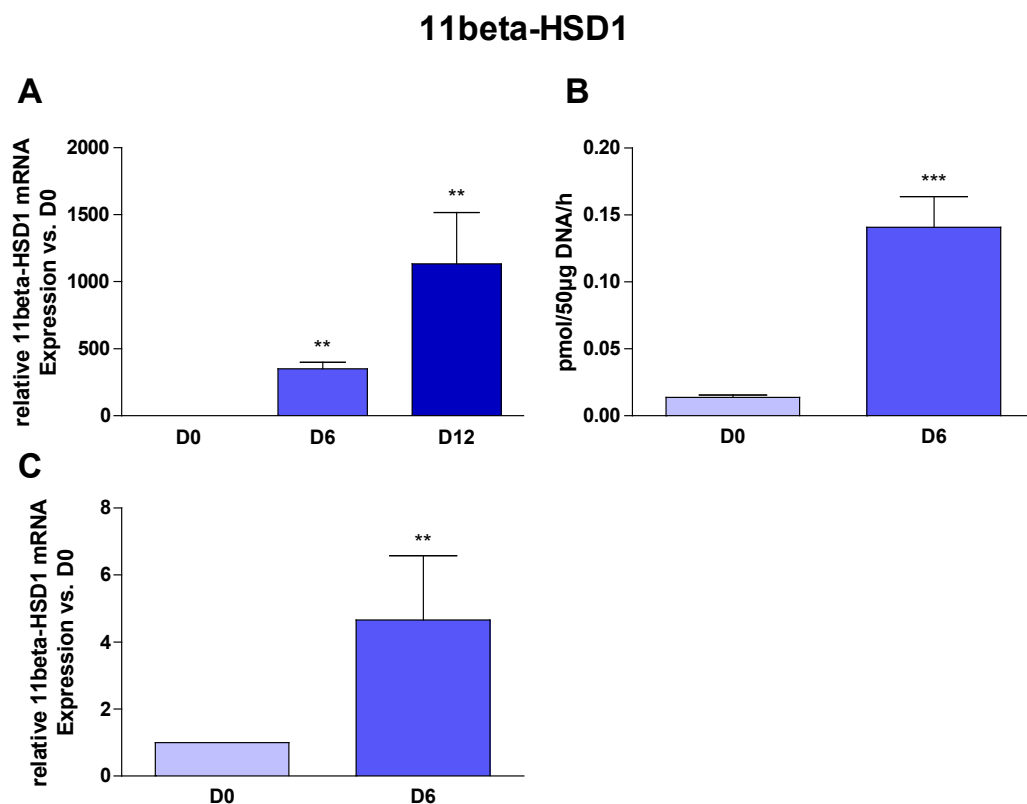


Abbildung 16: Anstieg der 11beta-HSD1 während der Differenzierung. Dargestellt sind die 11beta-HSD1 mRNA Expression (normalisiert auf das mitochondriale Riboprotein 16s) (jeweils n=5) [A und C] und Reduktase-Enzymaktivität (n=11) [B] während der Differenzierung in C2C12 [A und B] und in primären humanen Myoblasten [C]. D0: Beginn Differenzierung, D6: 6 Tage differenzierte Zellen, D12: 12 Tage differenzierte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$

### 3.1.3 Stimulationsversuche mit Glucocorticoiden und dem 11beta-HSD1-Hemmer Carbenoxolon in Muskelzellen

#### 3.1.3.1 Effekte einer chronischen Stimulation

Bei der chronischen Stimulation wurden die C2C12 Zellen von der Initiation der Differenzierung (D0) über sechs Tage (D6) bzw. zwölf Tage (D12) und sechzehn Tage (D16) mit dem hormonell inaktiven Cortison (E) stimuliert, welches durch 11beta-HSD1 zu seiner aktiven Form, dem Cortisol, umgewandelt wird. Die Zellen wurden zusätzlich jeweils für 30-60 min mit dem 11beta-HSD1 Inhibitor Carbenoxolon (Cbx) prä-inkubiert.

Durch Cortison wurde die 11beta-HSD1 Transkription während der Differenzierung (D6-D16) erhöht und war an D6 um den Faktor  $3,9 \pm 0,5$  ( $p < 0,01$ ) höher als in der unbehandelten

Negativkontrolle (NK). Cortison induzierte somit über die 11beta-HSD1 seine eigene Transkription. Die Prä-Inkubation mit Carbenoxolon verringerte die 11beta-HSD1 mRNA Expression (nicht signifikant) und verhinderte einen Anstieg durch Cortison (E:  $3,9 \pm 0,5$  vs. NK; E+Cbx:  $1,1 \pm 0,4$  vs. NK;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 17). Immunhistochemische Färbungen der 11beta-HSD1 an D6 in chronisch stimulierten C2C12 Myotuben sind in Abbildung 18 dargestellt. Die 11beta-HSD1 ist im endoplasmatischen Retikulum um den Kern herum lokalisiert. Der Antikörper zeigte jedoch auch einige unspezifische Färbungen im Cytoplasma.

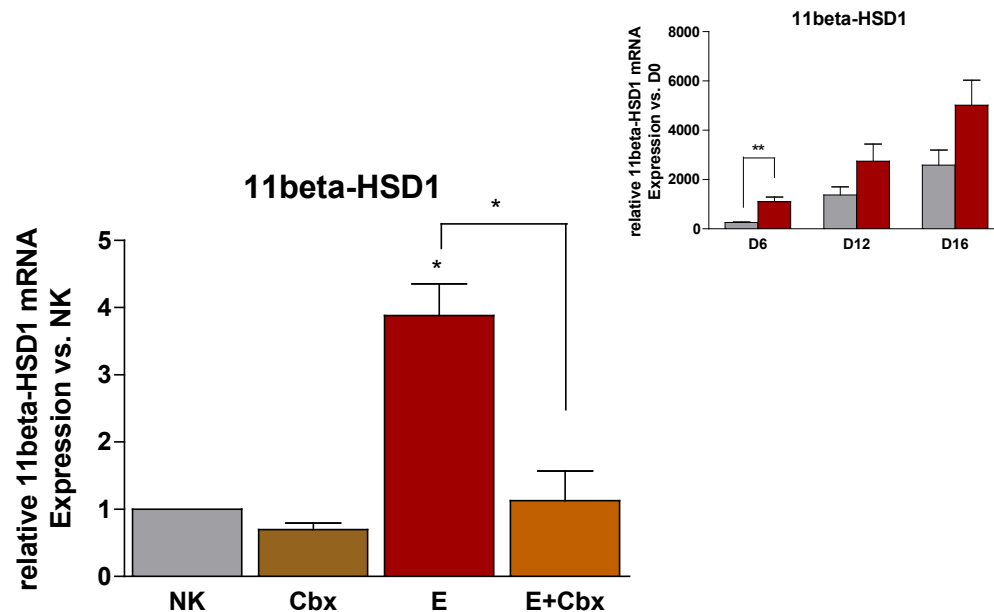


Abbildung 17: 11beta-HSD1 bei chronischer Stimulation. Relative Veränderung der 11beta-HSD1 mRNA Expression durch chronische Stimulation mit  $10 \mu\text{M}$  Carbenoxolon (Cbx) und  $1 \mu\text{M}$  Cortison (E) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) in C2C12 Zellen während der Differenzierung über sechs Tage (D6) (normalisiert auf das mitochondriale Riboprotein 16s). Verlauf der 11beta-HSD1 mRNA Expression an D6, D12 und D16 unter chronischer Cortison-Stimulation im Vergleich zur NK [kleine Abbildung]. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n=7$  (große Abbildung) bzw.  $n=5$  Experimenten (kleine Abbildung). \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$

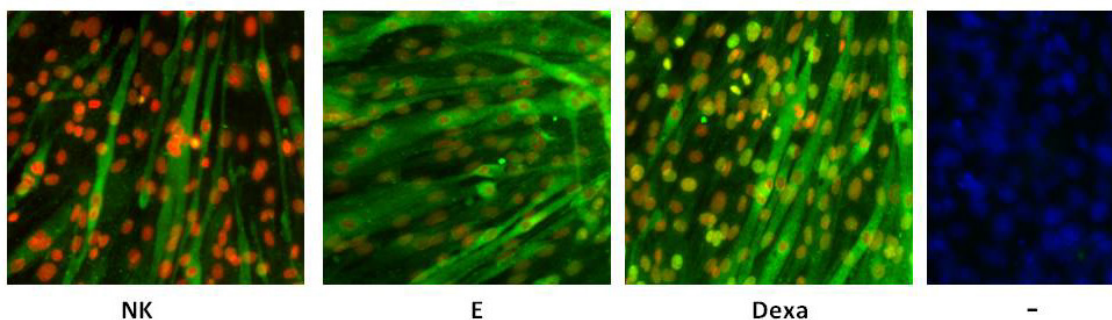


Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung von 11beta-HSD1 bei chronischer Stimulation in differenzierten C2C12 Myotuben (6 Tage). Dargestellt sind Merge-Fluoreszenzmikroskopaufnahmen bei 20x Vergrößerung (11beta-HSD1: grün) und DAPI-Kernfärbung (rot) NK: Negativkontrolle; E: Cortison ( $100 \text{ nM}$ ); Dexa: Dexamethason ( $1 \mu\text{M}$ ); -: nur DAPI-Kernfärbung (blau). Dargestellt sind Falschfarbenbilder.

Gleichzeitig zu der 11beta-HSD1 Induktion durch Cortison bzw. Reduktion durch Carbenoxolon wurde ein gegenläufiger Expressionsverlauf von GRalpha gemessen. Durch Stimulation mit

Cortison wurden die GRalpha Transkription und Proteinexpression herunterreguliert (D6, D12 und D16) und waren an D6 auf  $0,51 \pm 0,09$  ( $p < 0,01$ ) (mRNA) bzw.  $0,58 \pm 0,08$  ( $p < 0,01$ ) (Protein) im Vergleich zur Negativkontrolle reduziert. Dementsprechend bewirkte die initiale 11beta-HSD1 Hemmung durch Carbenoxolon einen gegenregulatorischen Anstieg der GRalpha Expression (mRNA Expression an D6:  $1,13 \pm 0,19$  vs. E  $0,51 \pm 0,09$ ;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 19).

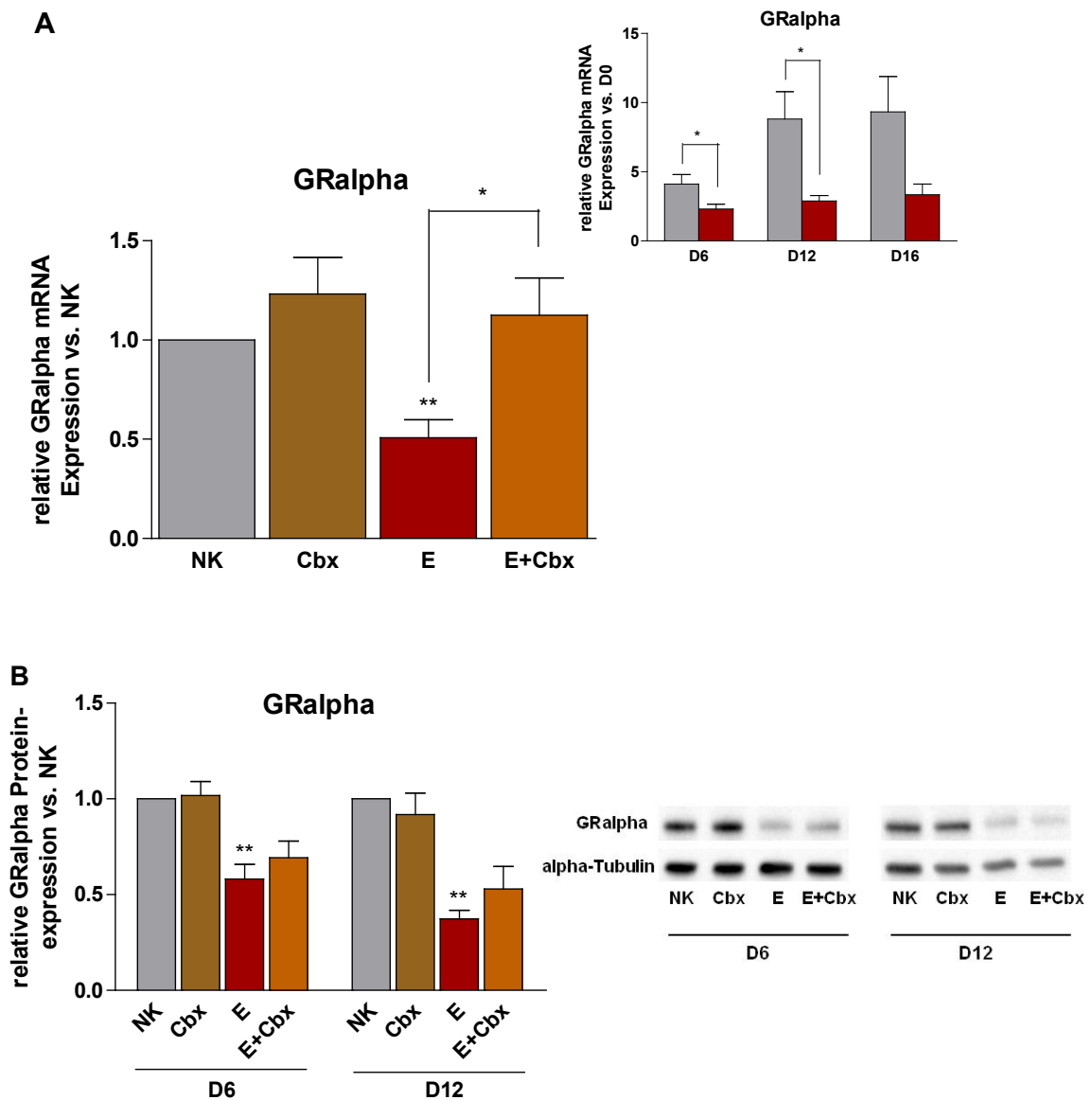


Abbildung 19: GRalpha bei chronischer Stimulation. Relative Veränderung der GRalpha mRNA Expression (normalisiert auf das mitochondriale Riboprotein 16s) ( $n=9$ ) [A] und Proteinexpression (normalisiert auf die alpha-Tubulin Expression; dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot) ( $n=6$ ) [B] durch chronische Stimulation mit  $10 \mu\text{M}$  Carbenoxolon (Cbx) und  $1 \mu\text{M}$  Cortison (E) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) in C2C12 Zellen während der Differenzierung über sechs Tage (D6) und zwölf Tage (D12). Verlauf der GRalpha mRNA Expression an D6, D12 und D16 unter chronischer Cortison-Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle [A, kleine Abbildung]. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$

In Abbildung 20 sind entsprechende immunhistochemische Färbungen von GRalpha in chronisch stimulierten C2C12 Myotuben abgebildet. Im Vergleich zu unstimulierten Zellen (NK) ist in den mit Cortison und Dexamethason stimulierten Myotuben eine vermehrte Translokation des GRalpha in den Kern zu erkennen.

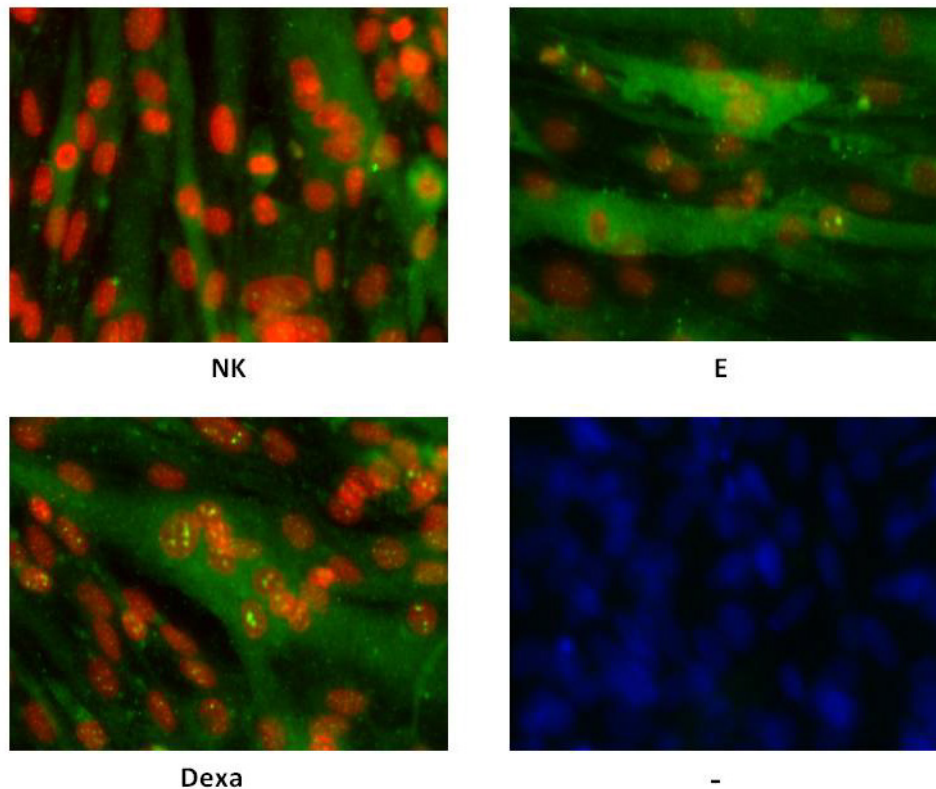


Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung von GRalpha bei chronischer Stimulation in differenzierten C2C12 Myotuben (6 Tage). Dargestellt sind Merge-Fluoreszenzmikroskopaufnahmen bei 20x Vergrößerung (GRalpha: grün) und DAPI-Kernfärbung (rot). NK: Negativkontrolle; E: Cortison (100 nM); Dexa: Dexamethason (1 µM); -: nur DAPI-Kernfärbung (blau). Dargestellt sind Falschfarbenbilder.

Durch die chronische Stimulation der 11beta-HSD1 in C2C12 Zellen wurden Veränderungen in den Expressionen von Muskel-Differenzierungsmarkern gemessen. So wurden durch chronische Cortison-Behandlung über sechs, zwölf und sechzehn Tage (D6, D12 und D16) die Transkriptionen aller gemessenen Differenzierungsmarker Myf5, MyoD, MRF4, MEF2c, Myogenin und MyHC-1, d.h. sowohl früher als auch später Marker, 11beta-HSD1-abhängig induziert (Abbildung 21 bis Abbildung 24). Mittels Western Blot wurden zusätzlich die Proteinexpressionen von Myogenin und MyHC-1 unter chronischer Stimulation bestimmt, welche ebenfalls durch Cortison-Behandlung anstiegen (Abbildung 23B und Abbildung 24B). Es konnte zusätzlich eine tenzielle 11beta-HSD1-abhängige Hemmung des Cortison-Effekts durch Carbenoxolon an D6 gemessen werden (Abbildung 21 bis Abbildung 24).

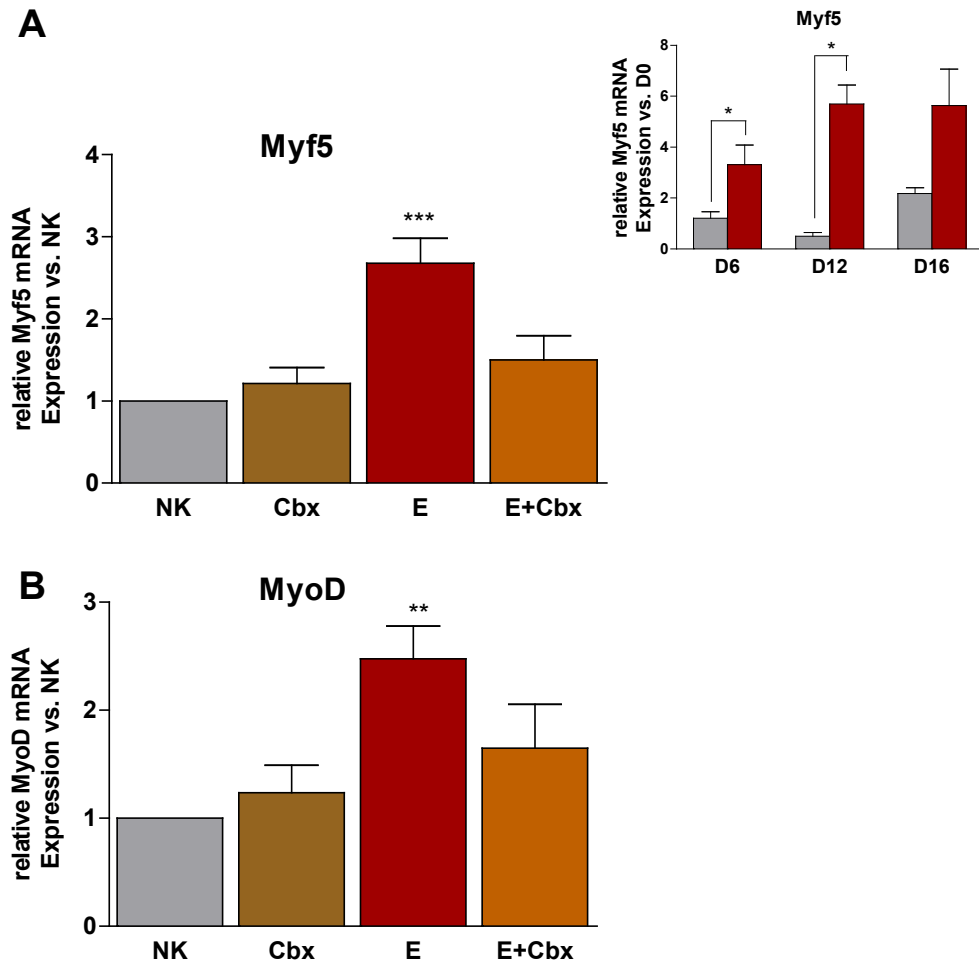


Abbildung 21: Myf5 und MyoD bei chronischer Stimulation. Relative Veränderungen der Myf5 (n=9) [A] und MyoD (n=5) [B] mRNA Expression durch chronische Stimulation mit 10  $\mu$ M Carbenoxolon (Cbx) und 1  $\mu$ M Cortison (E) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) in C2C12 Zellen während der Differenzierung über sechs Tage (D6). Verlauf der Myf5 mRNA Expression an D6 (n=10), D12 (n=5) und D16 (n=3) unter chronischer Cortison-Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle [A, kleine Abbildung]. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Als interner Standard wurde das mitochondriale Riboprotein 16s verwendet. \*\*\*P $\leq$ 0,001; \*\*P $\leq$ 0,01, \*P $\leq$ 0,05



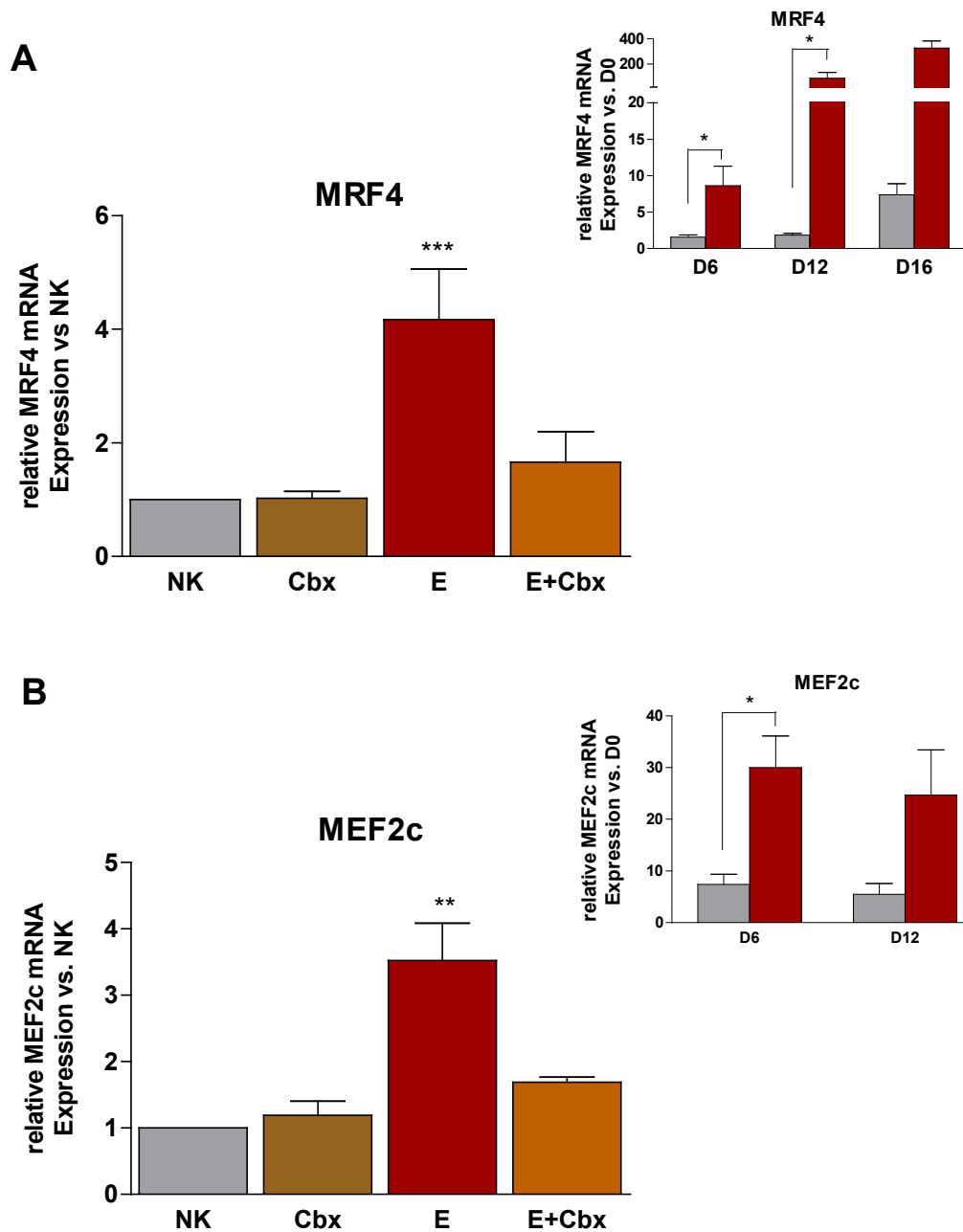


Abbildung 22: MRF4 und MEF2c bei chronischer Stimulation. Relative Veränderungen der MRF4 (n=7) [A] und MEF2c [B] mRNA Expression durch chronische Stimulation mit 10  $\mu$ M Carbenoxolon (Cbx) und 1  $\mu$ M Cortison (E) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) in C2C12 Zellen während der Differenzierung über sechs Tage (D6). Verlauf der MRF4 (D6: n=5; D12: n=12) und MEF2c (D6 und D12: n=4) mRNA Expressionen an D6, D12 und D16 unter chronischer Cortison-Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle [kleine Abbildungen]. Als interner Standard wurde das mitochondriale Riboprotein 16s verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\*\* $P \leq 0,001$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ; \* $P \leq 0,05$

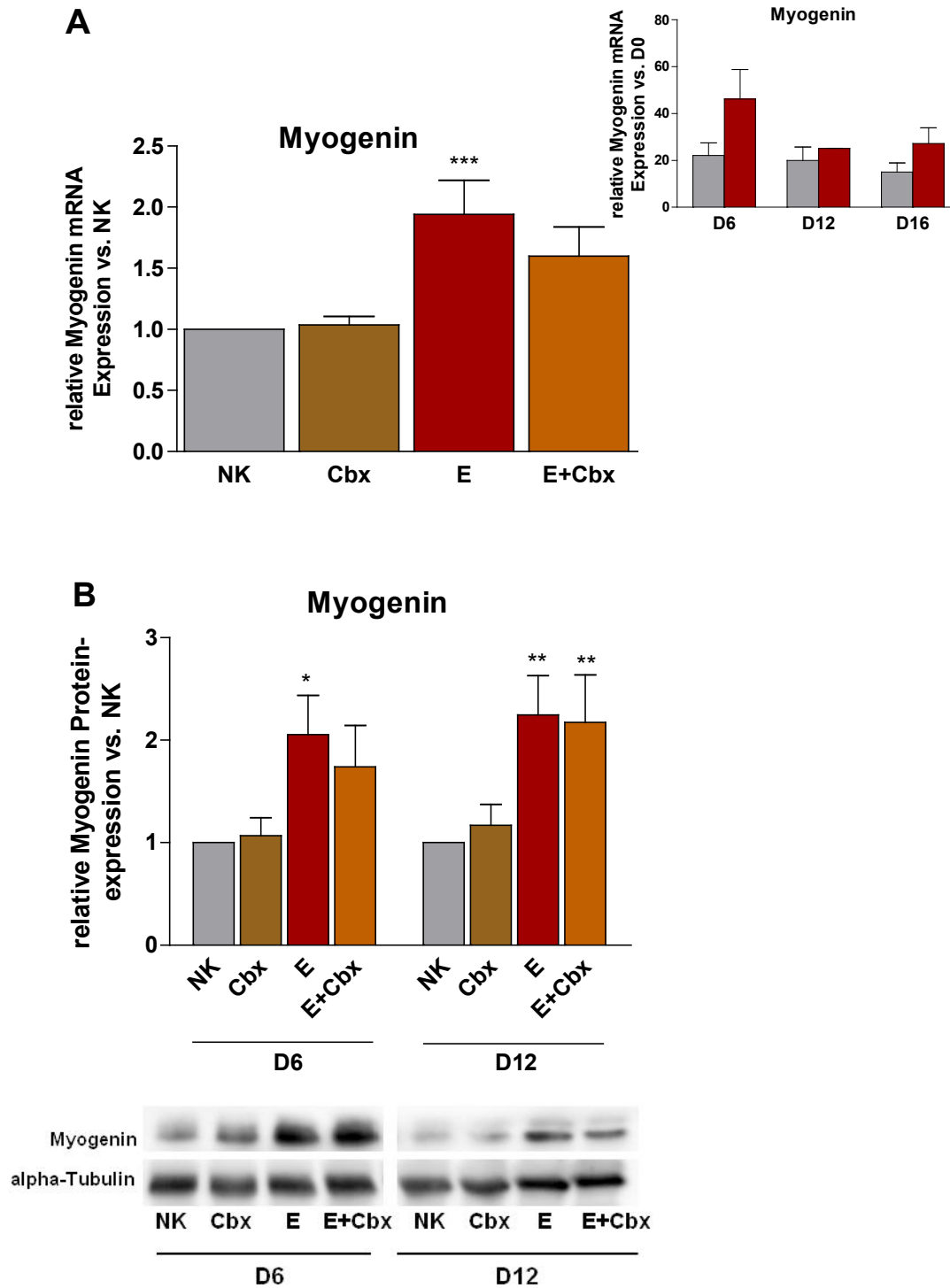


Abbildung 23: Myogenin bei chronischer Stimulation. Relative Veränderungen der Myogenin mRNA Expression (normalisiert auf das mitochondriale Riboprotein 16s) (n=7) [A] und Proteinexpression (normalisiert auf die alpha-Tubulin Expression; dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot) (jeweils n=7) [B] durch chronische Stimulation mit 10  $\mu$ M Carbenoxolon (Cbx) und 1  $\mu$ M Cortison (E) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) in C2C12 Zellen während der Differenzierung über sechs Tage (D6). Verlauf der Myogenin mRNA Expression an D6 (n=4), D12 (n=2) und D16 (n=2) unter chronischer Cortison-Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle [A, kleine Abbildung]. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\*\*P $\leq$ 0,001; \*\*P $\leq$ 0,01; \*P $\leq$ 0,05

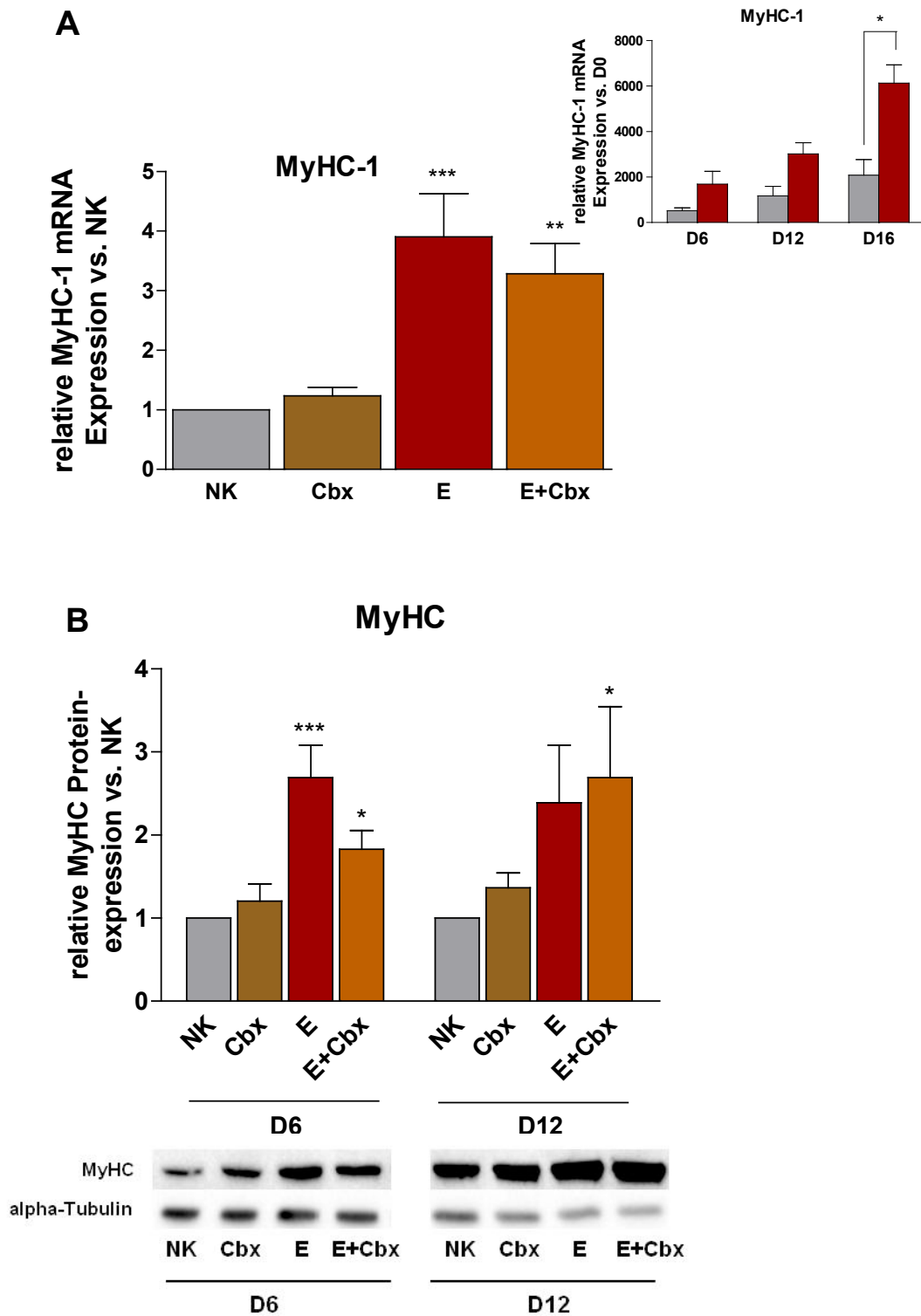


Abbildung 24: MyHC-1 bei chronischer Stimulation. Relative Veränderungen der MyHC-1 mRNA Expression (normalisiert auf das mitochondriale Riboprotein 16s) (n=8) [A] und MyHC Proteinoxpression (normalisiert auf die alpha-Tubulin Expression; dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot) (jeweils n=6) [B] durch chronische Stimulation mit 10  $\mu$ M Carbenoxolon (Cbx) und 1  $\mu$ M Cortison (E) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) in C2C12 Zellen während der Differenzierung über sechs Tage (D6). Verlauf der MyHC-1 mRNA Expression an D6 (n=5), D12 (n=4) und D16 (n=5) unter chronischer Cortison-Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle [A, kleine Abbildung]. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\*\*P $\leq$ 0,001; \*\*P $\leq$ 0,01, \*P $\leq$ 0,05

Um eventuelle Zusammenhänge zwischen den verschiedenen 11beta-HSD1-abhängigen Effekten der Glucocorticoide auf Proteinexpressionen und deren physiologischen Auswirkungen auf u.a. Proteolyse und Glucoseaufnahme herstellen zu können, wurde die Signalkaskade der Glucocorticoide näher analysiert. Hierzu wurden die Phosphorylierungen und Proteinexpressionen von Akt und CREB im Western Blot bestimmt. Durch die chronische Stimulation mit Cortison war CREB durch die Phosphorylierung am Serin-133 an D6 und D12 gegenüber der nicht-behandelten Kontrolle vermehrt aktiviert, dieser Effekt war allerdings aufgrund einer zu geringen Versuchsanzahl nicht signifikant (

Abbildung 26). Die immunhistologische Färbung in Abbildung 27 zeigt CREB in chronisch stimulierten und differenzierten C2C12 Myotuben.

Die Phosphorylierung am Serin-473 von Akt war nach sechs Tagen chronischer Stimulation unverändert, nahm aber ebenfalls nach zwölf Tagen 11beta-HSD1-abhängig durch Cortison-Behandlung zu (pAkt/Akt  $P < 0,01$  vs. NK). Eine Hemmung dieses Effekts durch Carbenoxolon war an D12 für pAkt/Akt sowie pCREB/CREB nur tendenziell messbar (Abbildung 25).

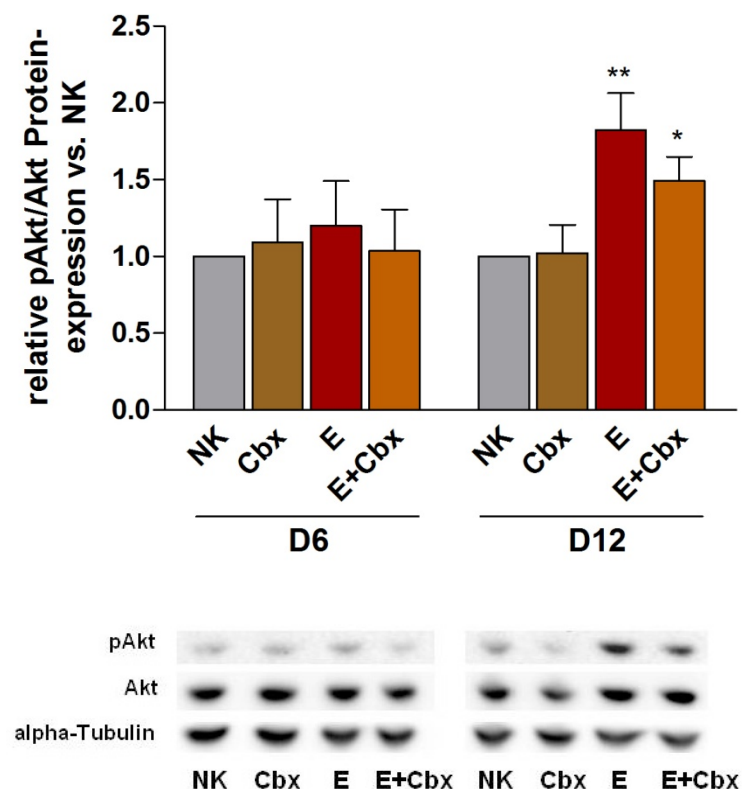


Abbildung 25: pAkt/Akt bei chronischer Stimulation. Relative Veränderungen der pAkt(Ser473)/Akt Proteinexpression (normalisiert auf die alpha-Tubulin Expression) durch chronische Stimulation mit 10  $\mu$ M Carbenoxolon (Cbx) und 1  $\mu$ M Cortison (E) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) in C2C12 Zellen während der Differenzierung über sechs Tage (D6) (n=5) und zwölf Tage (D12) (n=4). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM und jeweils ein repräsentativer Western Blot. \*\* $P \leq 0,01$ ; \* $P \leq 0,05$

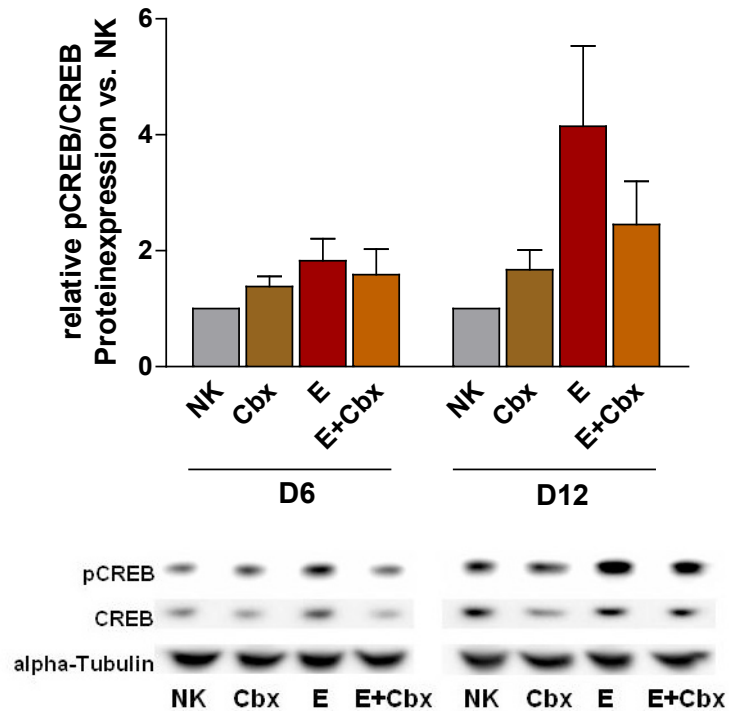


Abbildung 26: pCREB/CREB bei chronischer Stimulation. Relative Veränderungen der pCREB(Ser133)/CREB Proteinexpression (normalisiert auf die alpha-Tubulin Expression) durch chronische Stimulation mit 10  $\mu$ M Carbenoxolon (Cbx) und 1  $\mu$ M Cortison (E) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) in C2C12 Zellen während der Differenzierung über sechs Tage (D6) (n=5) und zwölf Tage (D12) (n=4). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM und jeweils ein repräsentativer Western Blot.

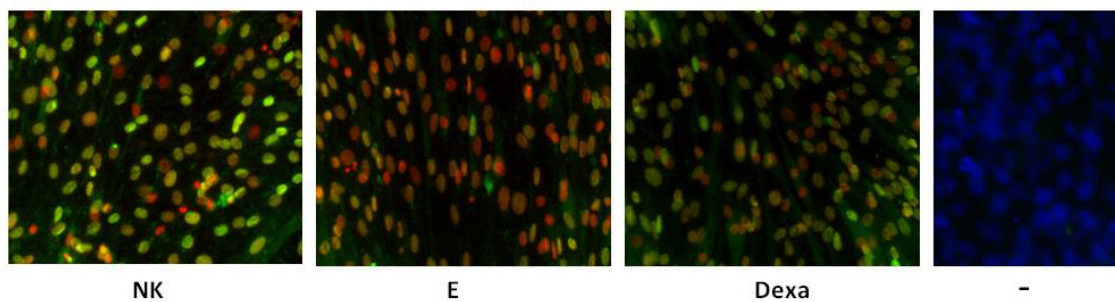


Abbildung 27: Immunhistochemische Färbung von CREB bei chronischer Stimulation in differenzierten C2C12 Myotuben (6 Tage). Dargestellt sind Merge-Fluoreszenzmikroskopaufnahmen bei 20x Vergrößerung (CREB: grün) und DAPI-Kernfärbung (rot). NK: Negativkontrolle; E: Cortison (100 nM); Dexa: Dexamethason (1  $\mu$ M); -: nur DAPI-Kernfärbung (blau). Dargestellt sind Falschfarbenbilder.

#### 3.1.3.2 Effekte einer akuten Stimulation

Für die akute Stimulation wurden unbehandelte differenzierte Muskelzellen (C2C12 und primäre humane Myotuben) mit dem 11beta-HSD1 Hemmer Carbenoxolon für 30-60 min prä-inkubiert und für 16 h mit den Glucocorticoiden Cortison und Dexamethason stimuliert. Vor Beginn der Akutstimulation wurden die Zellen über 24 h in serum-freiem Medium inkubiert.

Entsprechend der chronischen Stimulation wurde in C2C12 und primären humanen Myotuben durch akute Cortison-Stimulation die 11beta-HSD1 Transkription und Enzymaktivität aktiviert, die durch Carbenoxolon gehemmt wurde (Abbildung 28).

Die GRalpha Gegenregulation zur 11beta-HSD1 war bei Akutstimulation auf mRNA Ebene weniger deutlich ausgeprägt, als bei chronischer Langzeitstimulation von Muskelzellen (Abbildung 29A und B). Auf Proteinebene war eine deutliche Absenkung der GRalpha Expression durch die Glucocorticoide sowie eine gegenregulatorische Erhöhung bei 11beta-HSD1 Hemmung durch Carbenoxolon zu sehen (Abbildung 29C). Der Mineralocorticoidrezeptor (MR) konnte ebenfalls in C2C12 Zellen nachgewiesen werden und zeigte auf mRNA Ebene eine entsprechende Gegenregulation zur 11beta-HSD1 (Abbildung 29D).

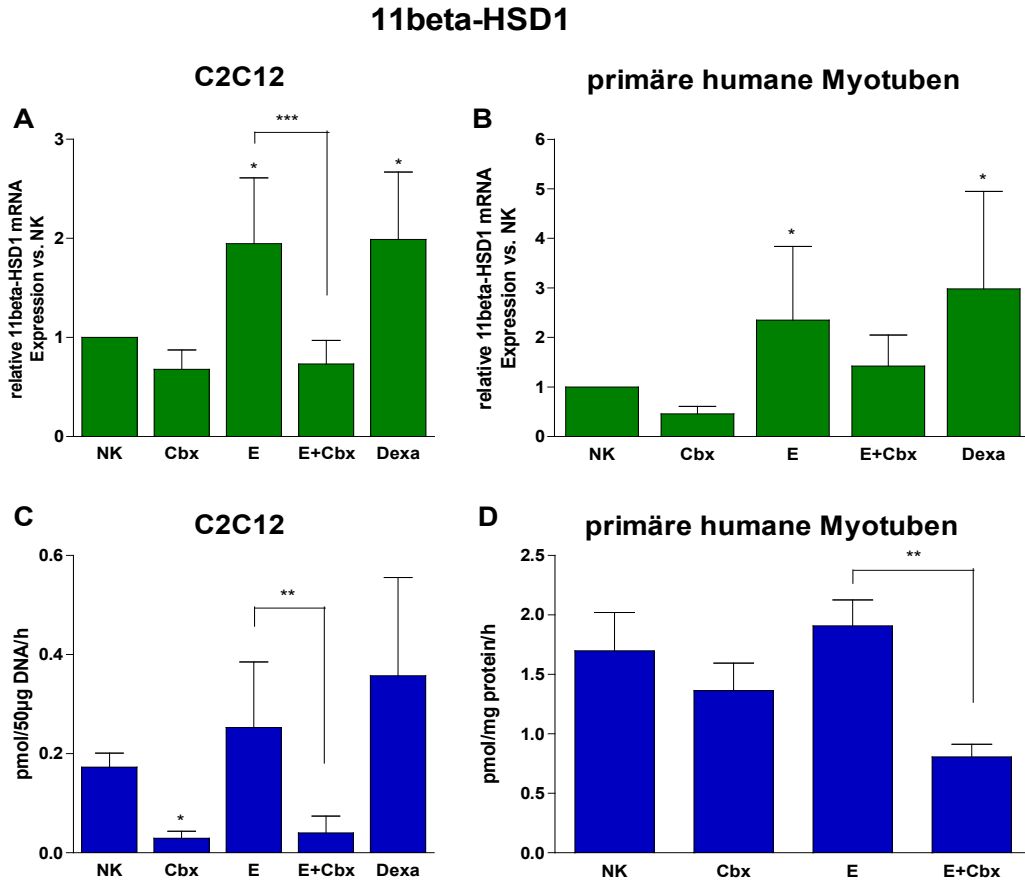


Abbildung 28: 11beta-HSD1 bei akuter Stimulation. Relative 11beta-HSD1 mRNA Expression (normalisiert auf das mitochondriale Riboprotein 16s) (n=8 und n=5) [A und B] und Reduktase-Enzymaktivität (n=9 und n=5) [C und D] in akut stimulierten C2C12 [A und C] und primären humanen Myotuben [B und D] mit 10 µM Carboxolol (Cbx) und 1 µM Cortison (E) und 1 µM Dexamethason (Dexa) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. \*\*\*P≤0,001; \*\*P≤0,01, \*P≤0,05

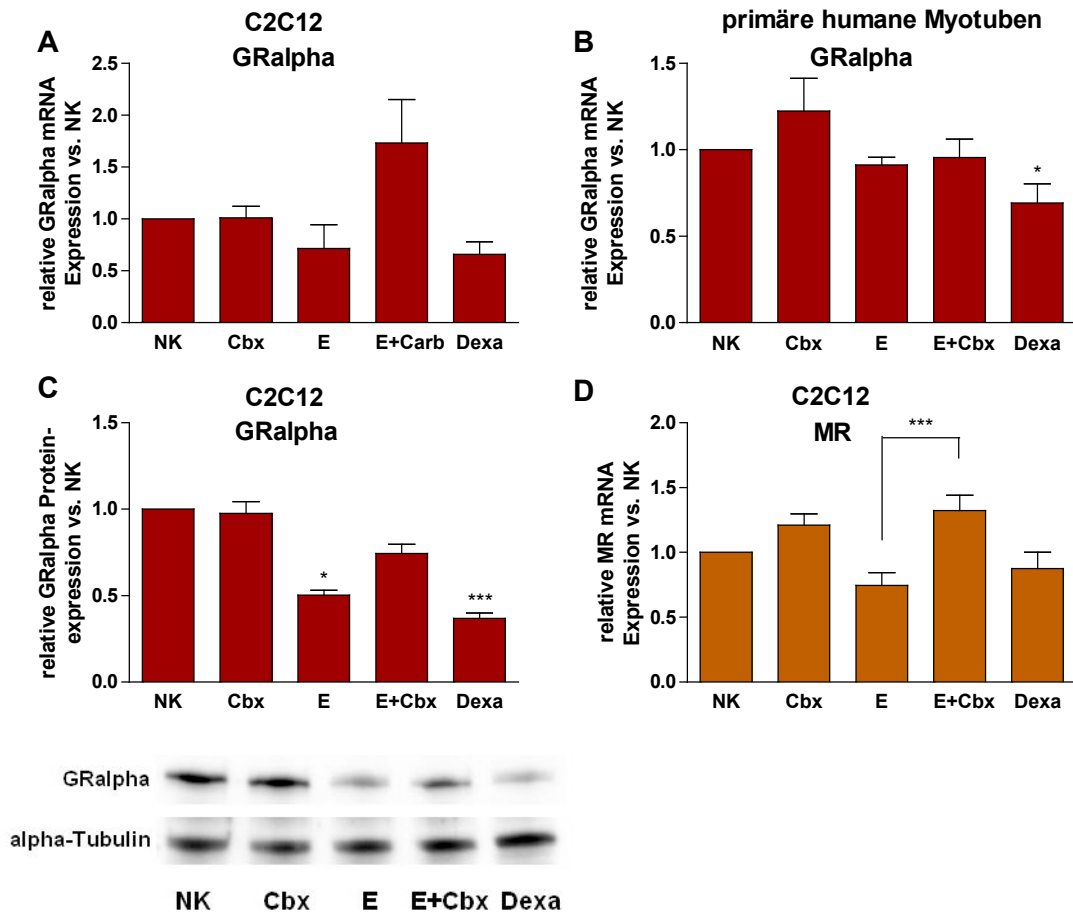


Abbildung 29: GRalpha und MR bei akuter Stimulation. Relative GRalpha mRNA (jeweils n=5) [A und B] und MR mRNA (n=6) [D] Expression (normalisiert auf das mitochondriale Riboprotein 16s) und GRalpha Proteinexpression (normalisiert auf die alpha-Tubulin Expression; dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot) (n=6) [C] in akut stimulierten C2C12 [A, C und D] und primären humanen Myotuben [B] mit 10 µM Carbenoxolon (Cbx) und 1 µM Cortison (E) und 1 µM Dexamethason (Dexa) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. \*\*\*P≤0,001; \*\*P≤0,01; \*P≤0,05

In C2C12 Myotuben konnten durch akute Stimulation mit Cortison und Carbenoxolon Veränderungen in allen gemessenen Muskel-Differenzierungsmarkern festgestellt werden. Cortison und Dexamethason induzierten die Transkription von Myf5, MyoD, Myogenin, MRF4 und MyHC-1 (Abbildung 30 und Abbildung 31), sowie ebenfalls die Proteinexpression von Myogenin und MyHC tendenziell (Abbildung 32). Die Carbenoxolon-Hemmung der 11beta-HSD1 blockierte den Effekt von Cortison signifikant auf die Myf5 und Myogenin mRNA-Expression. Für die anderen Marker war dieser Effekt tendenziell, allerdings nicht statistisch signifikant, messbar. In den primären humanen Myotuben konnten diese Ergebnisse nur teilweise bestätigt werden. Für die MyoD und tendenziell Myf5 mRNA Expression wurden entsprechende Effekte gemessen. Auf die Myogenin, MRF4 und MyHC-1 mRNA Expression zeigte Carbenoxolon keinen Effekt (Abbildung 30 und Abbildung 31).



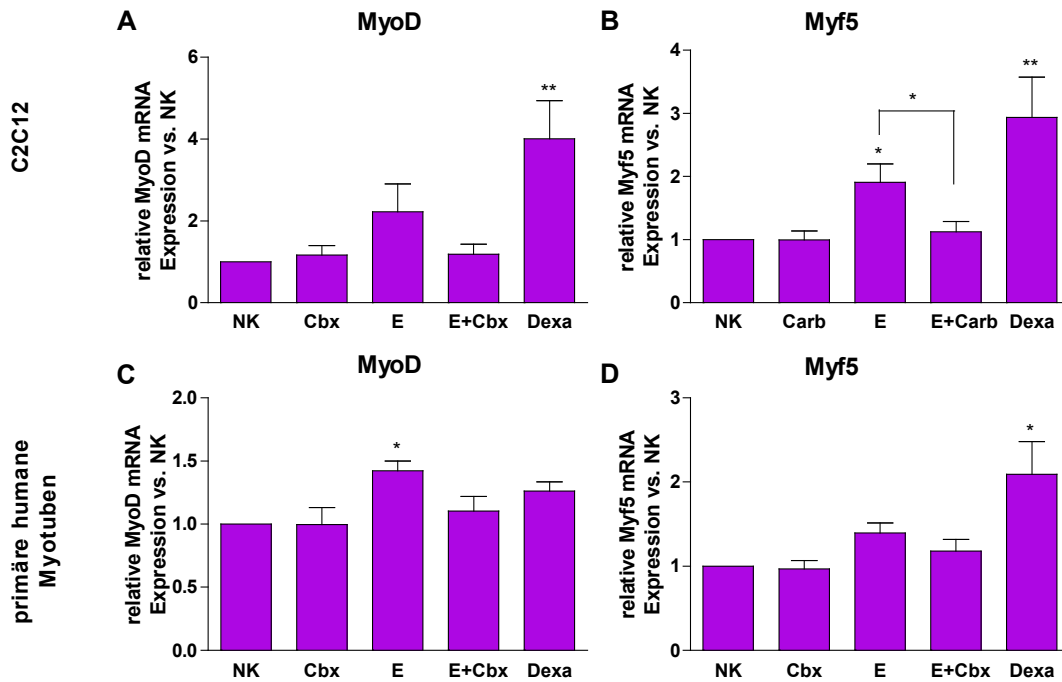


Abbildung 30: MyoD und Myf5 bei akuter Stimulation. Relative mRNA Expression der frühen Muskel-Differenzierungsmarker MyoD (jeweils n=5) [A und C] und Myf5 (n=8 und n=4) [B und D] (normalisiert auf das mitochondriale Riboprotein 16s) in akut stimulierten und differenzierten C2C12 [A und B] und primären humanen Myotuben [C und D] mit 10  $\mu$ M Carbenoxolon (Cbx) und 1  $\mu$ M Cortison (E) und 1  $\mu$ M Dexamethason (Dexa) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$

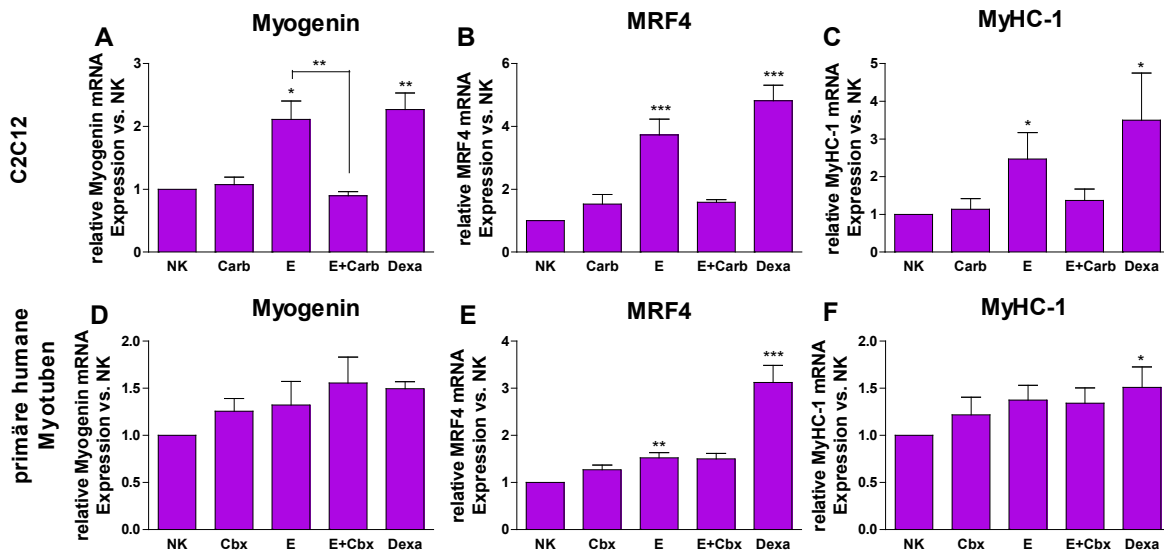


Abbildung 31: Myogenin, MRF4 und MyHC-1 (mRNA) bei akuter Stimulation. Relative mRNA Expression der mittleren und späten Muskel-Differenzierungsmarker Myogenin (jeweils n=5) [A und D], MRF4 (n=6 und n=5) [B und E] und MyHC-1 (n=7 und n=6) [C und F] (normalisiert auf das mitochondriale Riboprotein 16s) in akut stimulierten und differenzierten C2C12 [A-C] und primären humanen Myotuben [D-F] mit 10  $\mu$ M Carbenoxolon (Cbx) und 1  $\mu$ M Cortison (E) und 1  $\mu$ M Dexamethason (Dexa) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\*\* $P \leq 0,001$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ; \* $P \leq 0,05$

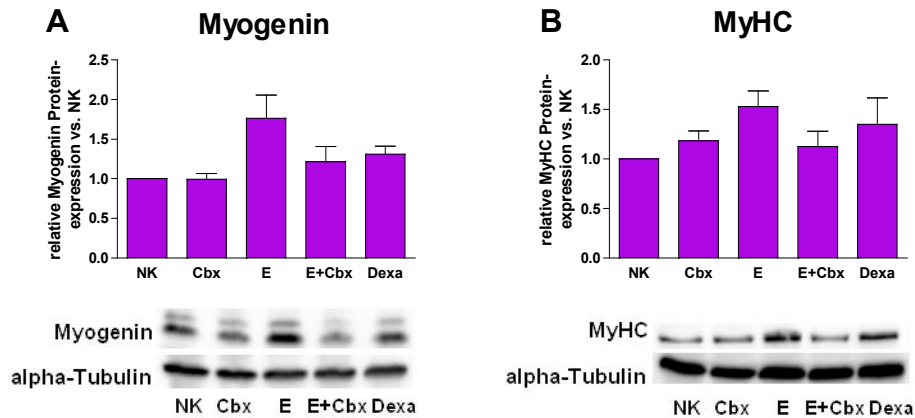


Abbildung 32: Myogenin und MyHC (Proteinexpression) bei akuter Stimulation. Relative Proteinexpression von Myogenin (n=4) [A] und MyHC (n=6) [B] in akut stimulierten und differenzierten C2C12 mit 10  $\mu$ M Carbenoxolon (Cbx) und 1  $\mu$ M Cortison (E) und 1  $\mu$ M Dexamethason (Dexta) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) (normalisiert auf die alpha-Tubulin Proteinexpression). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM und jeweils ein repräsentativer Western Blot.

Die mRNA Expression der Glucosetransporter Glut4 und Glut1 wurde durch die Glucocorticoid-Stimulation mit Cortison und Dexamethason signifikant bzw. tendenziell induziert. Durch 11beta-HSD1 Hemmung mit Carbenoxolon wurde dieser Effekt verhindert, dies konnte für Glut4 tendenziell, für Glut1 signifikant gezeigt werden (Abbildung 33). Des Weiteren bewirkten Cortison und Dexamethason eine vermehrte Phosphorylierung von Akt am Serin-473 ohne Insulinstimulus. Hier war kein signifikanter Effekt durch Carbenoxolon messbar, allerdings war tendenziell eine Reduktion des Cortison-Effekts durch Carbenoxolon zu sehen (Abbildung 34).

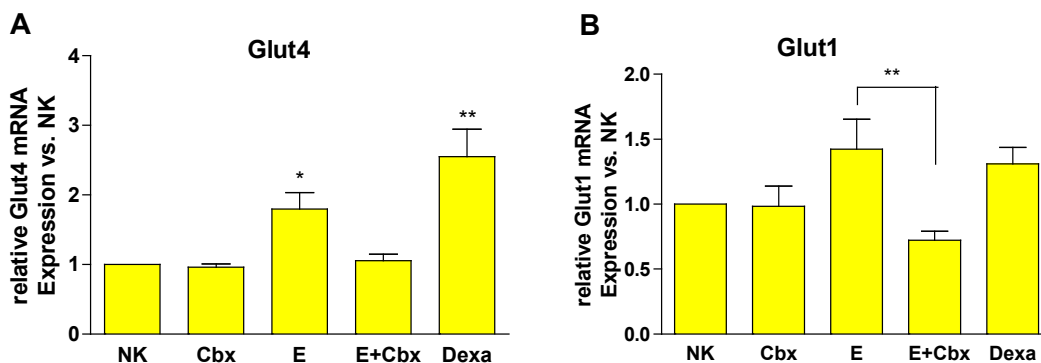


Abbildung 33: Glut4 und Glut1 bei akuter Stimulation. Relative mRNA Expression von Glut4 (n=5) [A] und Glut1 (n=4) [B] (normalisiert auf das mitochondriale Riboprotein 16s) in akut stimulierten und differenzierten C2C12 mit 10  $\mu$ M Carbenoxolon (Cbx) und 1  $\mu$ M Cortison (E) und 1  $\mu$ M Dexamethason (Dexta) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$

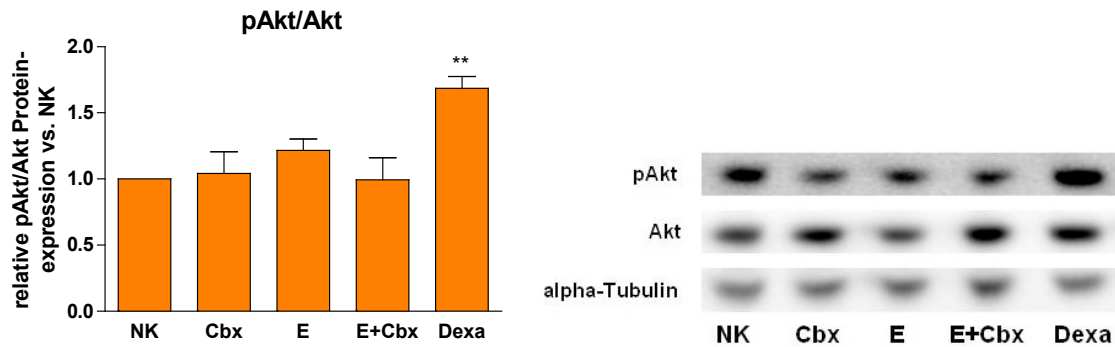


Abbildung 34: pAkt/Akt bei akuter Stimulation. Relative Proteinexpression von pAkt(Ser473)/Akt in akut stimulierten und differenzierten C2C12 mit 10  $\mu$ M Carbenoxolon (Cbx) und 1  $\mu$ M Cortison (E) und 1  $\mu$ M Dexamethason (Dexa) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK), normalisiert auf die alpha-Tubulin Proteinexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=5) und ein repräsentativer Western Blot. \*\*P $\leq$ 0,01

### 3.1.3.3 Effekte auf die Glukoseaufnahme

Die Glukoseaufnahme wurde anhand der Aufnahme [ $^3$ H]-markierter Deoxy-D-Glukose aus dem Mediumüberstand in die C2C12 Myotuben quantifiziert. Unter akuter Induktion der 11beta-HSD1 durch die Glucocorticoide Cortison und Dexamethason in differenzierten C2C12 Myotuben wurde unter basalen Bedingungen eine signifikant verringerte Glukoseaufnahme in die Zellen gemessen (E: 67,1%  $\pm$  8,7% vs. NK, P<0,01; Dexa: 74,0%  $\pm$  7,5% vs. NK, P<0,05). Durch Hemmung der 11beta-HSD1 mit Carbenoxolon konnte der Cortison-Effekt aufgehoben werden (E+Cbx: 107,1%  $\pm$  5,4% vs. E: 67,1%  $\pm$  8,7%, P<0,001). Die Insulin-abhängige Glukoseaufnahme wurde ebenfalls, aber nicht signifikant durch Cortison beeinträchtigt (E: 119,7%  $\pm$  2,2% vs. NK: 145,2%  $\pm$  9,5%, nicht signifikant), es wurde kein Effekt durch Carbenoxolon gemessen (Abbildung 35).

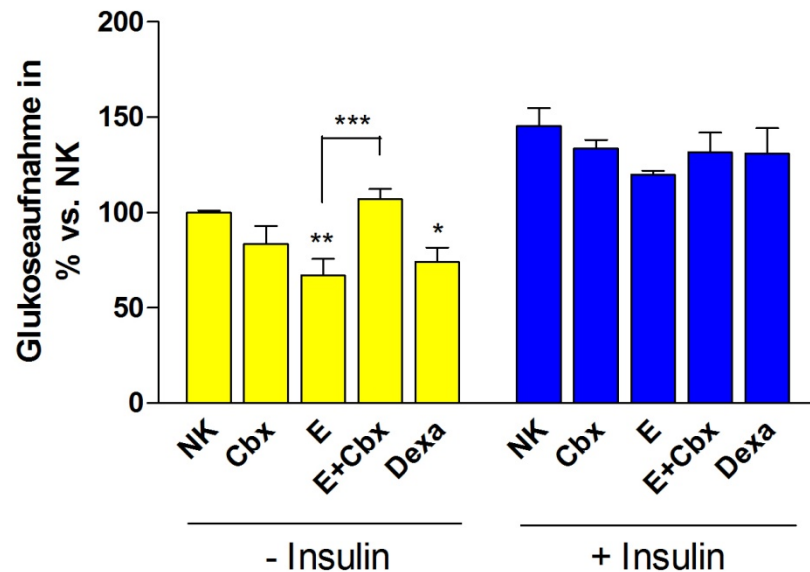


Abbildung 35: Glucoseaufnahme bei akuter Stimulation. Prozentuale basale und Insulin-abhängige Glucoseaufnahme quantifiziert anhand der Aufnahme  $^3\text{H}$ -markierter Deoxy-D-Glukose in C2C12 Myotuben in Abhängigkeit der 11beta-HSD1. Die C2C12 Zellen wurden akut stimuliert mit 10  $\mu\text{M}$  Carbenoxolon (Cbx), 1  $\mu\text{M}$  Cortison (E) und 1  $\mu\text{M}$  Dexamethason (Dexa), mit und ohne Insulinstimulation. Dargestellt sind die Veränderungen im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8). \*\*\* $P \leq 0,001$ ; \*\* $P \leq 0,01$

### 3.1.4 11beta-HSD1 Promotoranalyse in der Muskeldifferenzierung

#### 3.1.4.1 Basale 11beta-HSD1-Promotoraktivität in C2C12

In drei Tage differenzierenden C2C12 Zellen (D3) wurde eine Steigerung der 11beta-HSD1 Promotoraktivität bereits im Fragment F1a im Bereich von -85 bp und +188 bp ( $3,92 \pm 0,6$  vs. pGL3;  $P < 0,05$ ) gemessen, d.h. in der frühen Differenzierung der C2C12 fand eine Induktion der 11beta-HSD1 Transkription im proximalen Promotorbereich statt. Für alle 11beta-HSD1-Promotorfragmente wurde eine ähnlich hohe Luciferaseaktivität gemessen (Abbildung 36A). Nach sechs Tagen der Differenzierung (D6) war die Aktivität des proximalen Promotorbereichs der 11beta-HSD1 im Vergleich zu der Aktivität an D3 geringer, so sank die Luciferaseaktivität im Fragment F1a auf  $1,63 \pm 0,15$ . Jedoch zeigte sich im distalen Bereich ab dem Fragment F4 im Bereich von -1505 bp bis -823 bp ein deutlicher Anstieg der Promotoraktivität, welche ein Maximum in Fragment F6 (-2841/+188) mit einer relativen Luciferaseaktivität von  $7,40 \pm 1,24$  (vs. pGL3;  $P < 0,001$ ) erreichte. Demzufolge verschob sich die Induktion des 11beta-HSD1 Promotors in der späteren Differenzierung in distale Bereiche und lag relativ gesehen höher als am D3 (Abbildung 36B).

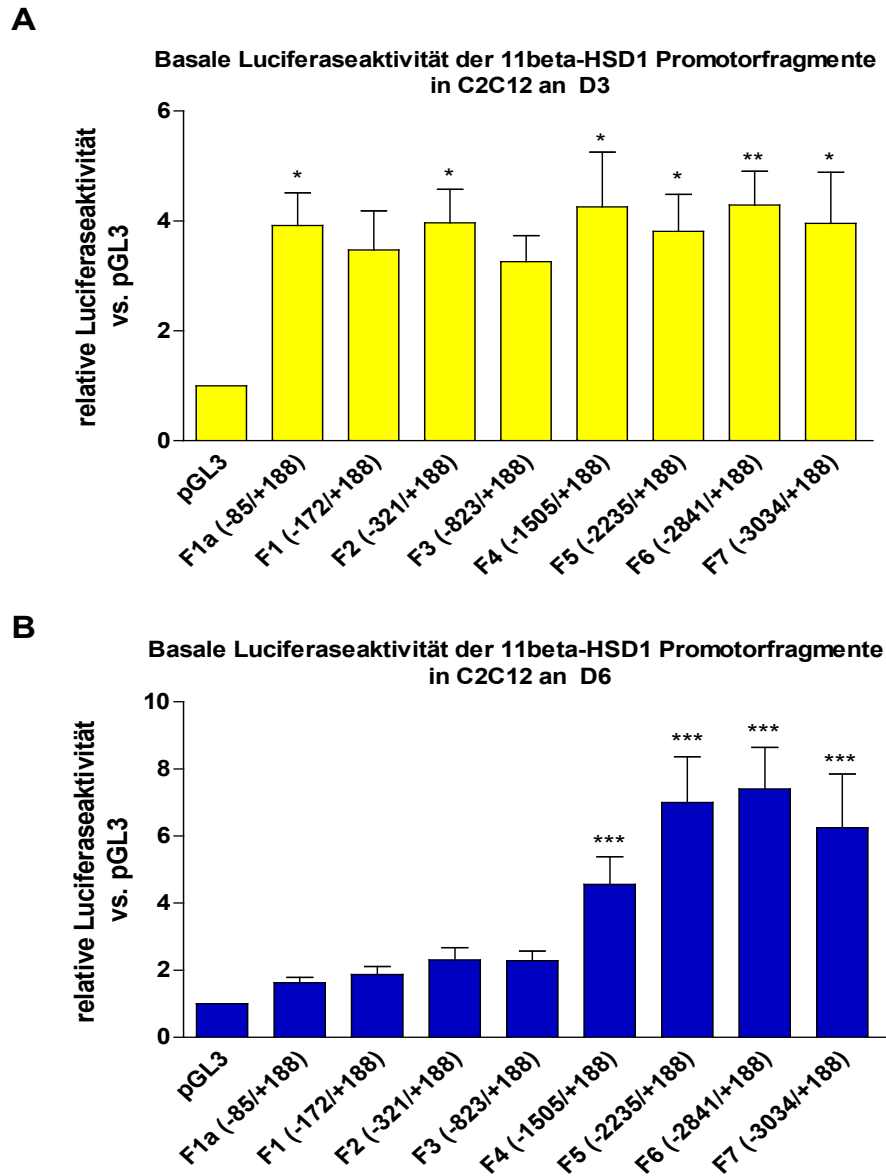


Abbildung 36: 11beta-HSD1 Promotoraktivität in Abhängigkeit der Differenzierung. Basale Luciferaseaktivität des 11beta-HSD1 Promotors in drei Tage differenzierten C2C12 (D3) (n=6) [A] und in sechs Tage differenzierten C2C12 (D6) (n=8) [B] ohne Stimulation. Der Leervektor pGL3 wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\*\* $P \leq 0,001$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ; \* $P \leq 0,05$

## 3.1.4.2 Veränderung der 11beta-HSD1 Promotoraktivität unter Zusatz von Cortison während der Differenzierung

Die Stimulation mit Cortison induzierte einen Anstieg der Luciferaseaktivität an D6 (nicht signifikant) (Abbildung 37B), dieser wurde tendenziell bereits an D3 (Abbildung 37A) gemessen. An D6 zeigte sich der Anstieg insbesondere in den distalen Promotorfragmenten. Eine Hemmung der 11beta-HSD1 mit Carbenoxolon verminderte den Anstieg durch Cortison an D6, dieser Effekt war allerdings ebenfalls nicht signifikant (Abbildung 37B, klein).

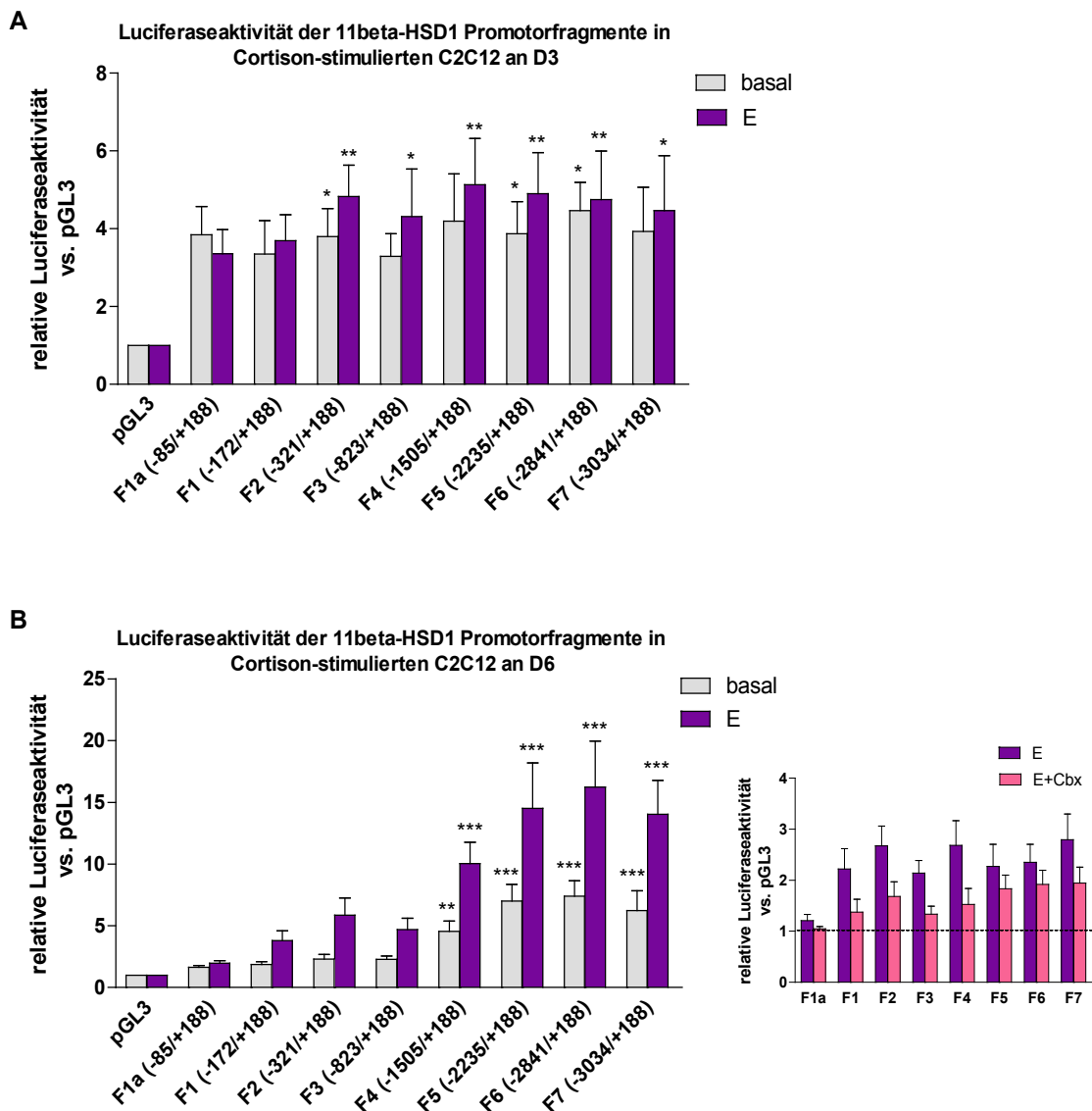


Abbildung 37: 11beta-HSD1 Promotoraktivität bei Cortison-Stimulation. Relativer Stimulationseffekt von 1  $\mu$ M Cortison (E) und 10  $\mu$ M Carbenoxolon (Cbx) auf die 11beta-HSD1 Promotoraktivität an D3 (n=5) [A] und an D6 (links:n=8; rechts: n=5) [B] in C2C12. Der Leervektor pGL3 wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## 3.1.4.3 Analyse potenzieller Bindungsstellen von Myogenin und MEF2 im 11beta-HSD1 Promotor

Die *in-silico*-Analyse des 11beta-HSD1 Promotors ergab viele Übereinstimmungen für die Bindungsmatrizen der Transkriptionsfaktoren Myogenin (CAGCAGC) und MEF2 (CCTAAAAATAACAC). Aufgrund des starken Anstiegs der basalen 11beta-HSD1 Promotoraktivität in den Fragmenten F4 und F5 während der Differenzierung wurden für die weitere Analyse hiervon eine Position für MEF2 im Bereich von -1724 bis -1721 im Fragment F5 und zwei Positionen für Myogenin in den Bereichen -1293 bis -1289 im Fragment F4 und -1789 bis -1785 im Fragment F5 ausgewählt und durch Mutation funktionell blockiert. Die mutierte potenzielle Bindungsstelle für MEF2 (F5\_M2) verringerte die 11beta-HSD1 Promotoraktivität in Fragment F5 von  $6,85 \pm 0,69$  auf  $4,49 \pm 0,28$  (vs. pGL3) ( $P < 0,05$ ). Der Anstieg durch Cortison wurde ebenfalls durch die Mutation F5\_M2 abgeschwächt ( $7,01 \pm 0,72$  vs.  $12,01 \pm 1,86$ ; nicht signifikant), so dass davon auszugehen ist, dass an dieser Stelle MEF2 als Transkriptionsfaktor an den 11beta-HSD1 bindet. Die Mutationen der potenziellen Bindungsstellen für Myogenin (F5\_M1, F4\_M1 und F5\_M3) hatten keinen Effekt auf die 11beta-HSD1 Promotoraktivität. Somit ist eine beeinflussende Bindung eines Transkriptionsfaktors an diese Position eher unwahrscheinlich (Abbildung 38).

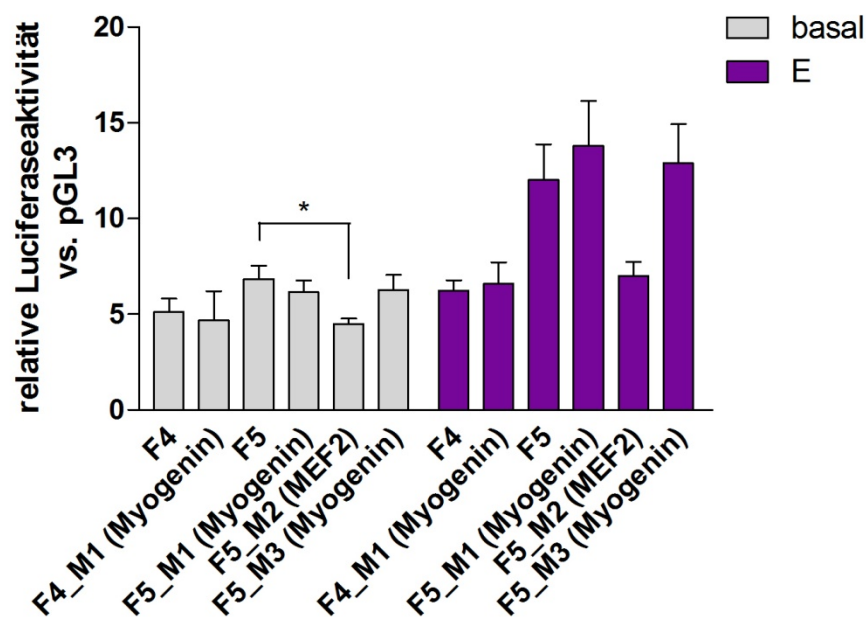


Abbildung 38: 11beta-HSD1 Promotoraktivität der mutierten Fragmente. Relative Luciferaseaktivität der Fragmente F4 und F5 sowie der mutierten Fragmente F4\_M1 (Myogenin), F5\_M1(Myogenin), F5\_M2 (MEF2) und F5\_M3 (Myogenin) des 11beta-HSD1 Promotors in sechs Tage differenzierten C2C12 unter basalen Bedingungen (n=8) und bei Stimulation mit 1  $\mu$ M Cortison (E) (n=8). Der Leervektor pGL3 wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $P \leq 0,05$

### 3.1.5 Auswirkungen eines Myogenin Knock-downs via siRNA auf 11beta-HSD1 und die Muskeldifferenzierung

In C2C12 Myoblasten wurde die Myogenin Expression mittels RNAi Technologie herunterreguliert und die Zellen dann über drei Tage differenziert. Es wurde ein mittlerer Knock-down auf  $44,1\% \pm 1,6\%$  ( $P < 0,01$ ) der Myogenin mRNA Expression erzielt. Durch den Myogenin siRNA-Knock-down wurde eine Cortison-induzierte Erhöhung der Myogenin Transkription unterdrückt (Myogenin siRNA:  $0,60 \pm 0,03$  vs. Scrambled siRNA:  $1,25 \pm 0,08$ ;  $P < 0,01$ ) (Abbildung 39).

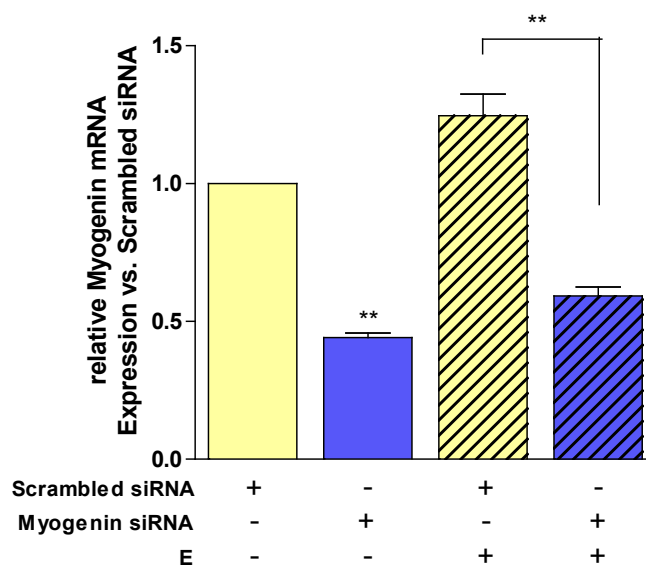


Abbildung 39: Knock-down von Myogenin mittels siRNA in C2C12. Die C2C12 Myoblasten wurden mit siRNA transfiziert und über drei Tage differenziert. Dargestellt ist die relative Myogenin mRNA Expression unter siRNA Behandlung mit und ohne  $1 \mu\text{M}$  Cortison (E)-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=8$ ).  $**P \leq 0,01$

#### 3.1.5.1 11beta-HSD1 und GRalpha

Das Myogenin-Silencing hatte nur kleine, statistisch nicht signifikante Auswirkungen auf die Genexpression von 11beta-HSD1, die mRNA Expression sank auf  $78\% \pm 8\%$  (vs. Scrambled siRNA; nicht signifikant) ab (Abbildung 40A). Es wurde ebenfalls eine durch Myogenin siRNA reduzierte 11beta-HSD1 Promotoraktivität v.a. in den distalen Bereichen gemessen, die aufgrund zu geringer Versuchszahlen allerdings nicht signifikant war (Abbildung 41).

Die gegenregulatorische Erhöhung der GRalpha mRNA deutete sich hier ebenfalls an, war aber ebenfalls nicht signifikant (Abbildung 40B).



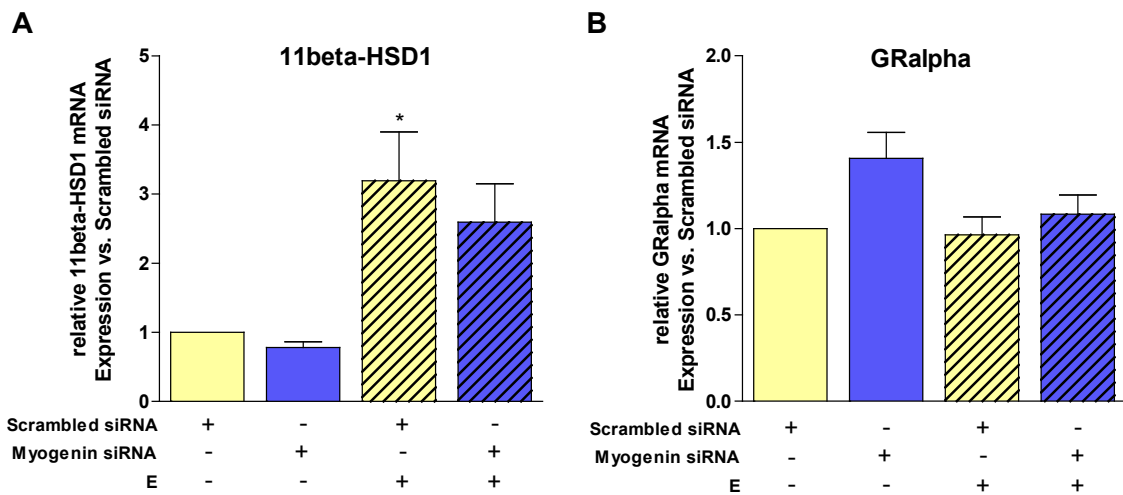


Abbildung 40: Auswirkungen des Myogenin siRNA-Knock-downs auf 11beta-HSD1 und GRalpha (mRNA) Expression. Dargestellt sind die 11beta-HSD1 (n=7) [A] und GRalpha (n=8) [B] mRNA Expressionen in C2C12. Die C2C12 Myoblasten wurden mit siRNA transfiziert und über drei Tage mit und ohne Cortison (E)-Stimulation (1  $\mu$ M) differenziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*P $\leq$ 0,05

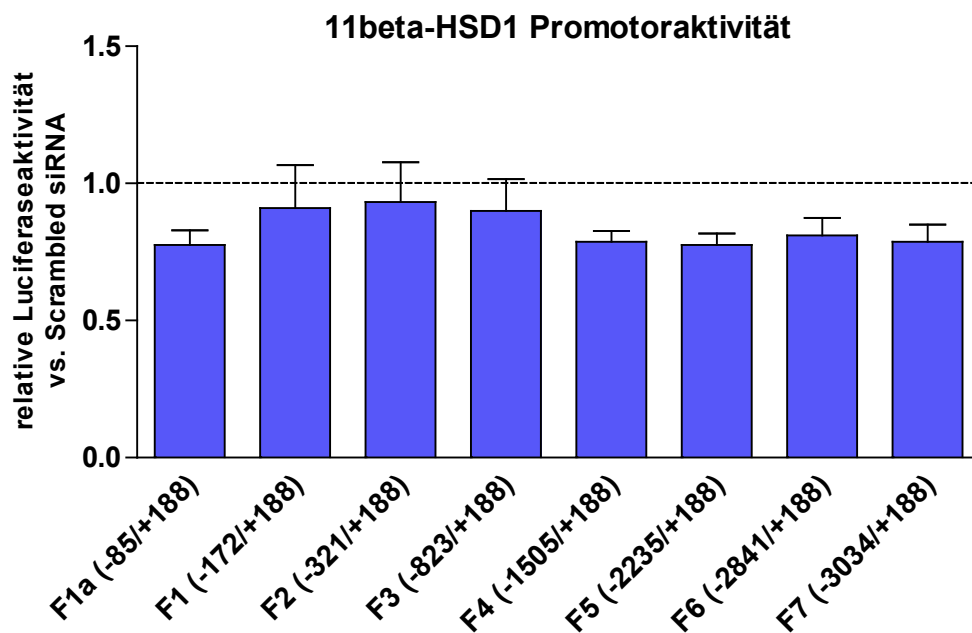


Abbildung 41: Auswirkungen des Myogenin siRNA-Knock-downs auf die 11beta-HSD1 Promotoraktivität in C2C12. Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität der mit Myogenin siRNA transfizierten C2C12 vs. der Scrambled siRNA behandelten Kontrolle. Die C2C12 Myoblasten wurden mit siRNA transfiziert. Einen Tag später erfolgte die Transfektion der 11beta-HSD1 Promotorkonstrukte. Anschließend wurden die Zellen über drei Tage differenziert. Der Leervektor pGL3 wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=4).

## 3.1.5.2 Muskel-Differenzierungsmarker

Des Weiteren wurden Veränderungen in der terminalen Differenzierung der C2C12 Myoblasten durch Messung von Muskel-Differenzierungsmarkern festgestellt. So hatte der Myogenin Knock-down keinen Effekt auf die frühen Marker wie MyoD und Myf5 (ohne Abbildung), hingegen waren die MRF4 Transkription signifikant ( $-39\% \pm 4\%$ ;  $P < 0,01$ ) und die MyHC-1 ( $-30\% \pm 8,3\%$ ; nicht signifikant) und MEF2c ( $-16\% \pm 4\%$ ; nicht signifikant) Transkriptionen tendenziell herunterreguliert. Der Effekt von Cortison wurde verringert: MRF4 ( $0,75 \pm 0,06$  vs. Scrambled siRNA  $1,33 \pm 0,09$ ;  $P < 0,01$ ), MyHC-1 ( $0,91 \pm 0,12$  vs. Scrambled siRNA  $1,52 \pm 0,2$ ;  $P < 0,05$ ), MEF2c ( $1,33 \pm 0,09$  vs. Scrambled siRNA  $1,80 \pm 0,13$ ; nicht signifikant) (Abbildung 42).

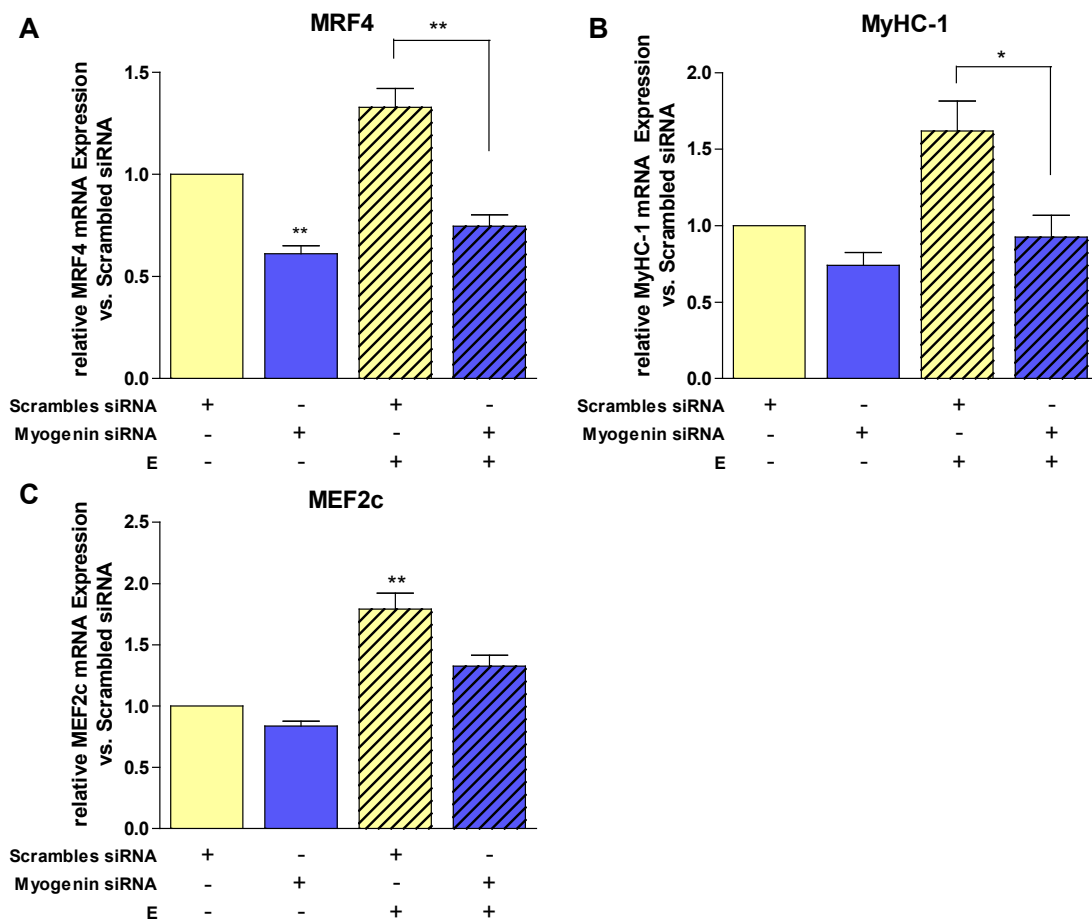


Abbildung 42: Auswirkungen des Myogenin siRNA Knock-downs auf MRF4, MyHC-1 und MEF2c. Dargestellt sind die MRF4 (n=8) [A], MyHC-1 (n=7) [B] und MEF2c (n=7) [C] mRNA Expressionen. Die C2C12 Myoblasten wurden mit siRNA transfiziert und über drei Tage mit und ohne Cortison (E)-Stimulation ( $1 \mu\text{M}$ ) differenziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\* $P \leq 0,01$ ; \* $P \leq 0,05$

### 3.1.6 Auswirkungen eines MEF2c knock-downs via siRNA auf 11beta-HSD1 und die Muskeldifferenzierung

In C2C12 Myoblasten wurde die MEF2c Expression mittels RNAi Technologie herunterreguliert und die Zellen dann über drei bzw. sechs Tage differenziert. Es wurde ein mittlerer Knock-down auf  $43\% \pm 10,5\%$  ( $P < 0,01$ ) an D3 und auf  $36\% \pm 10\%$  (nicht signifikant) an D6 der MEF2c mRNA Expression erzielt. Durch den MEF2c siRNA Knock-down wurde eine Cortison-induzierte Erhöhung der MEF2c Transkription an D3 unterdrückt (D3: MEF2c siRNA:  $0,81 \pm 0,11$  vs. Scrambled siRNA:  $1,92 \pm 0,24$ ;  $P < 0,01$ ). An D6 war dies tendenziell, aber aufgrund zu geringer Versuchszahlen nicht signifikant zu sehen (Abbildung 43).

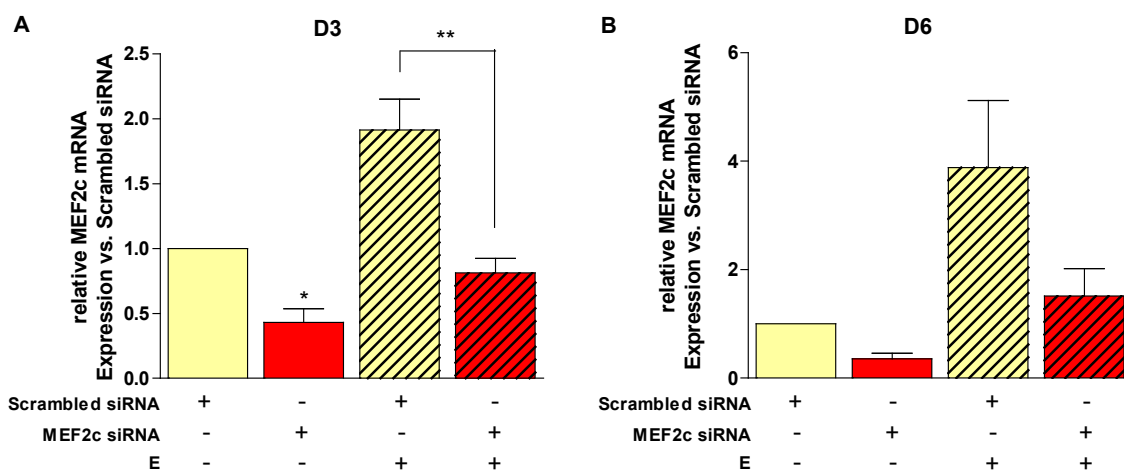


Abbildung 43: Knock-down von MEF2c mittels siRNA in C2C12. Die C2C12 Myoblasten wurden mit siRNA transfiziert und über drei (n=6) [A] bzw. sechs (n=4) [B] Tage mit und ohne Cortison (E)-Stimulation (100 nM) differenziert. Für die Inkubation über sechs Tage wurden die Zellen an D3 erneut mit siRNA transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\* $P \leq 0,01$ ; \* $P \leq 0,05$

#### 3.1.6.1 11beta-HSD1 und GRalpha

Das MEF2c-Silencing hatte eine tendenzielle Erhöhung der 11beta-HSD1 mRNA Expression zur Folge (D3:  $1,32 \pm 0,07$  vs. NK, nicht signifikant; D6:  $2,34 \pm 0,67$  vs. NK; nicht signifikant) (Abbildung 44). In sechs Tagen mit MEF2c-siRNA behandelten C2C12 Myotuben wurde ebenfalls eine durch MEF2c siRNA erhöhte 11beta-HSD1 Promotoraktivität gemessen, die für die Fragmente F1, F5, F6 und F7 (alle  $P < 0,05$ ; vs. Scrambled siRNA) signifikant war. Die Stimulation mit Cortison verursachte ebenfalls einen Anstieg der Luciferaseaktivität in der Scrambled siRNA Kontrolle, der allerdings aufgrund zu geringer Versuchszahlen hier nicht signifikant war. In MEF2c transfizierten Zellen bewirkte Cortison eine weitere, allerdings aufgrund der zu geringen Versuchszahl ebenfalls nicht signifikante Steigerung der Promotoraktivität (Abbildung 45). Es wurden weder an D3 noch an D6 Veränderungen der GRalpha mRNA gemessen (ohne Abbildung).

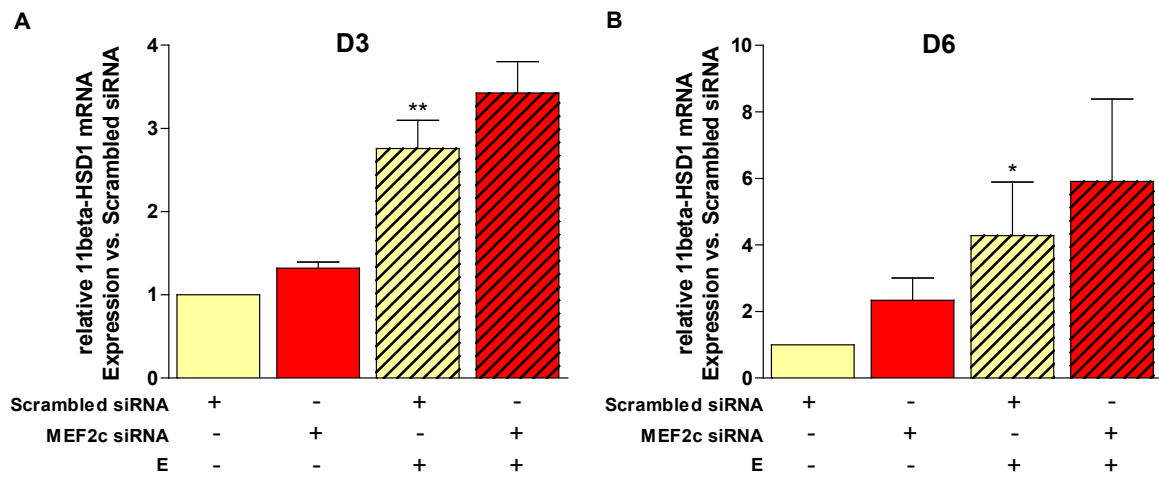


Abbildung 44: Auswirkungen des MEF2c siRNA-Knock-downs auf die 11beta-HSD1 mRNA Expression. Dargestellt ist die 11beta-HSD1 mRNA Expression an D3 (n=6) [A] und D6 (n=4) [B]. Die C2C12 Myoblasten wurden mit siRNA transfiziert und über drei bzw. sechs Tage mit und ohne Cortison (E)-Stimulation (100 nM) differenziert. Für die Inkubation über sechs Tage wurden die Zellen an D3 erneut mit siRNA transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\*P $\leq$ 0,01; \*P $\leq$ 0,05

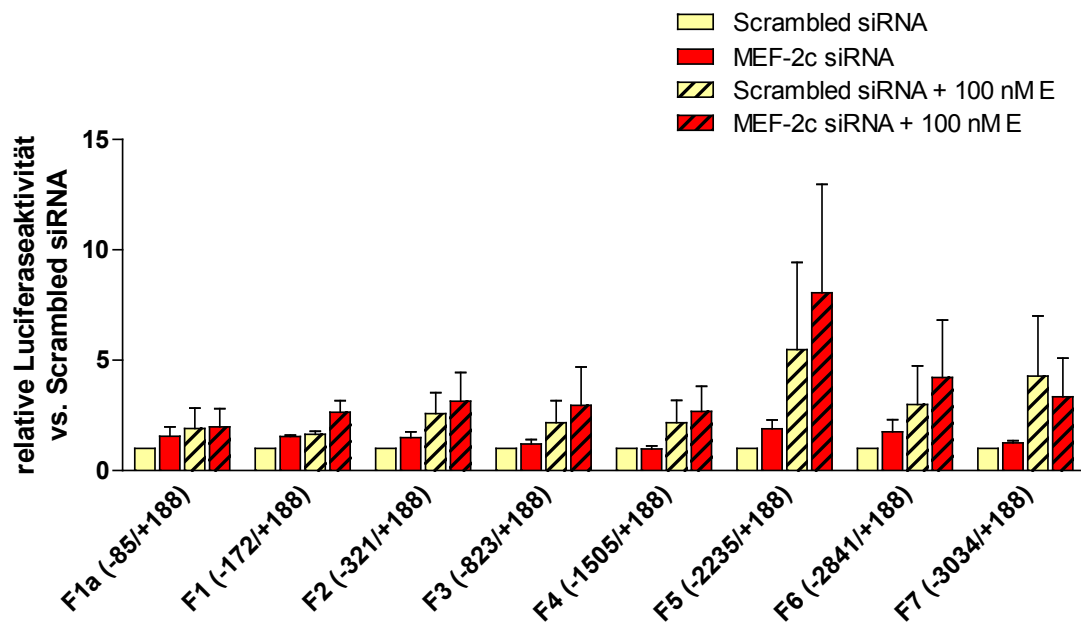


Abbildung 45: Auswirkungen des MEF2c siRNA-Knock-downs auf die 11beta-HSD1 Promotoraktivität. Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität der MEF2c siRNA transfizierten C2C12 vs. der Scrambled siRNA behandelten Kontrolle (n=4). Die C2C12 Myoblasten wurden an D0 mit siRNA transfiziert. Einen Tag später erfolgte die Transfektion der 11beta-HSD1 Promotorkonstrukte. Anschließend wurden die Zellen über sechs Tage mit und ohne Cortison (E)-Stimulation (100 nM) differenziert. An D3 wurden die Zellen erneut mit siRNA transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*P $\leq$ 0,05

### 3.1.6.2 Muskel-Differenzierungsmarker

Durch den MEF2c Knock-down wurden außerdem tendenzielle Erhöhungen einiger Muskel-Differenzierungsmarker festgestellt. Nach drei Tagen waren die Myf5 ( $1,30 \pm 0,1$  vs. NK, nicht

signifikant) und die MyHC-1 ( $1,52 \pm 0,14$  vs. NK, nicht signifikant) Transkriptionen deutlich, allerdings nicht signifikant, hochreguliert, die von MyoD und Myogenin tendenziell ebenfalls (Abbildung 46). Nach sechs Tagen waren die Myf5 ( $1,95 \pm 0,36$  vs. NK; nicht signifikant) und die Myogenin ( $1,51 \pm 0,18$  vs. NK; nicht signifikant) mRNA Expressionen ebenfalls erhöht, allerdings nicht signifikant (Abbildung 47). Auf den Cortison-Effekt hatte der MEF2c Knock-down keinen Einfluss (Abbildung 46 und Abbildung 47). Der MEF2c Knock-down hatte ebenfalls keinen Effekt auf MRF4 sowie auf MyoD und MyHC-1 an D6 (ohne Abbildung).

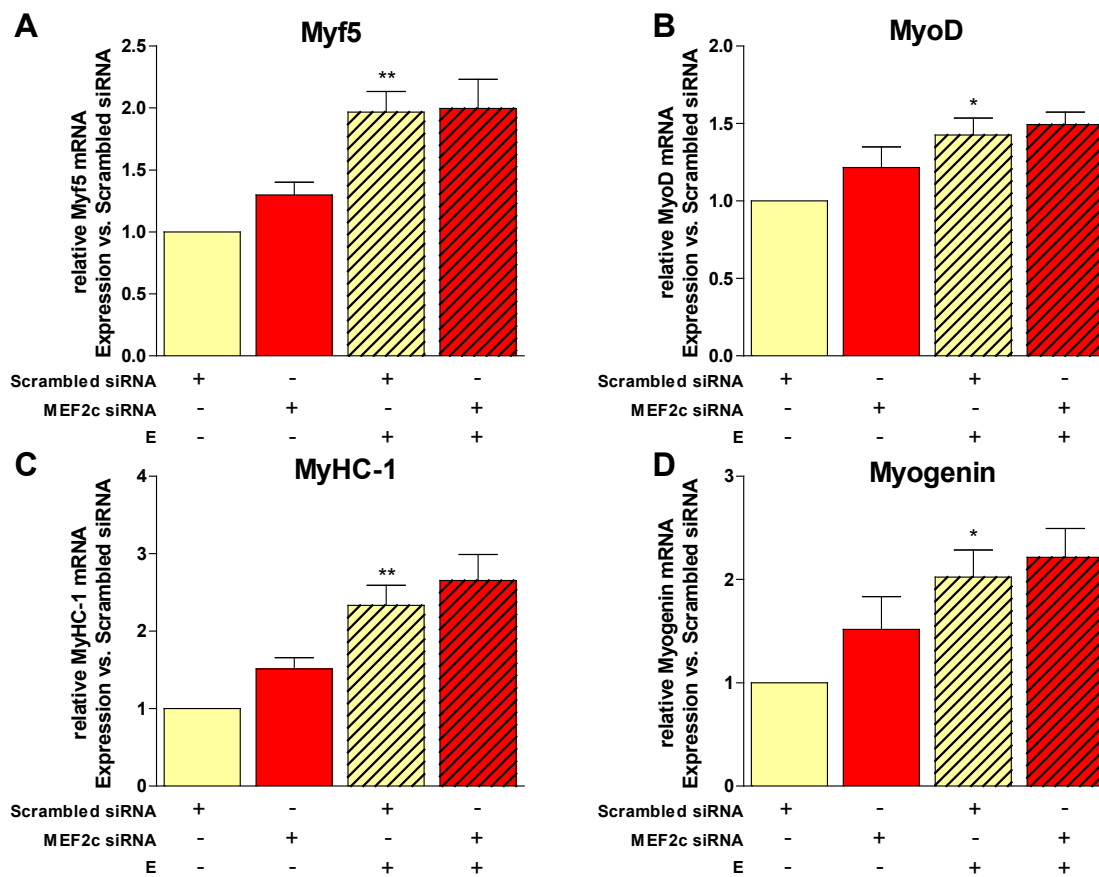


Abbildung 46: Auswirkungen des MEF2c siRNA-Knock-downs auf Myf5, MyoD, MyHC-1 und Myogenin an D3. Dargestellt sind die Myf5 (n=6) [A], MyoD (n=6) [B], MyHC-1 (n=6) [C] und Myogenin (n=6) [D] mRNA Expressionen. Die C2C12 Myoblasten wurden mit siRNA transfiziert und über drei Tage mit und ohne Cortison (E)-Stimulation (100 nM) differenziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\* $P \leq 0,01$ ; \* $P \leq 0,05$

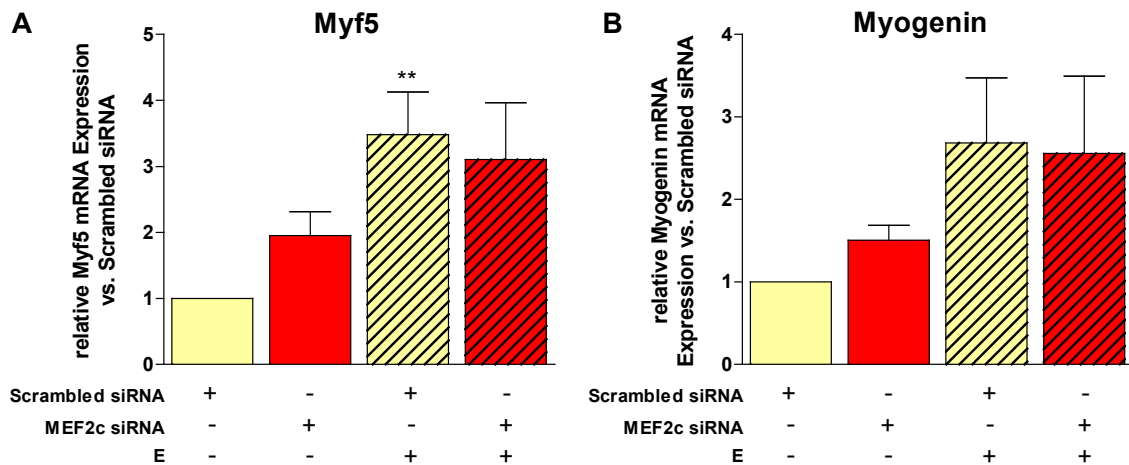


Abbildung 47: Auswirkungen des MEF2c siRNA Knock-downs auf Myf5 und Myogenin an D6. Dargestellt sind die Myf5 (n=4) [A] und Myogenin (n=4) [B] mRNA Expressionen. Die C2C12 Myoblasten wurden mit siRNA transfiziert und über sechs Tage mit und ohne Cortison (E)-Stimulation (1  $\mu$ M) differenziert. An D3 wurden die Zellen erneut mit siRNA transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\*P $\leq$ 0,01

## 3.2 11beta-HSD1 in der Muskel-Proteolyse

### 3.2.1 11beta-HSD1-abhängige Proteolyse

Der Proteinabbau (Proteolyse) wurde anhand des Abbaus [ $^3$ H]-markierten Tyrosins in C2C12 Myotuben quantifiziert. Unter akuter Hemmung der 11beta-HSD1 durch Carbenoxolon und Induktion durch die Glucocorticoide Cortison und Dexamethason in differenzierten C2C12 Myotuben ergab sich eine Abhängigkeit des Proteinabbaus von der 11beta-HSD1. Cortison und Dexamethason erhöhten die Proteolyse auf 120,33%  $\pm$  1,70% (P<0,05) und 123,05%  $\pm$  1,80% (P<0,01), wohingegen Carbenoxolon den Cortison-Effekt vollständig blockierte (96,47%  $\pm$  1,32% vs. E: 120,33%  $\pm$  1,70%; P<0,001) (Abbildung 48). Aufgrund des Versuchsaufbaus konnten keine Auswirkungen chronischer Stimulationen untersucht werden.

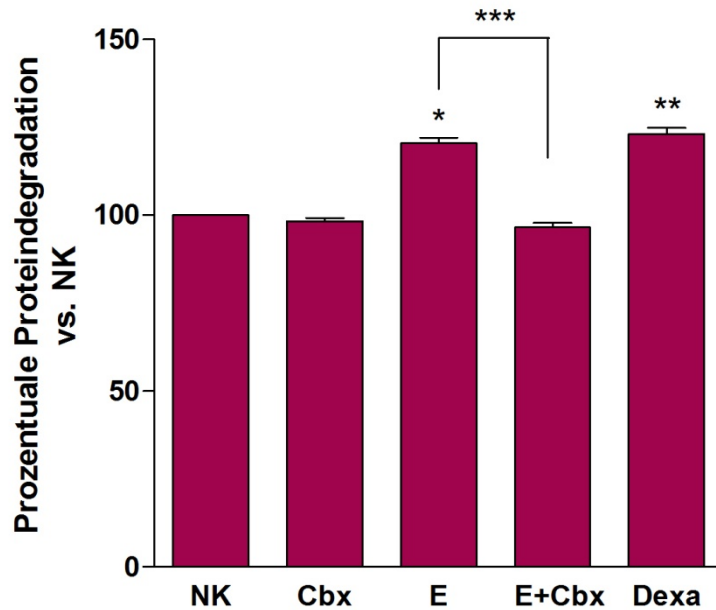


Abbildung 48: Prozentuale Proteindegradation bei akuter Stimulation, quantifiziert anhand des Abbaus [<sup>3</sup>H]-markierten Tyrosins in C2C12 Myotuben in Abhängigkeit der 11beta-HSD1. Die C2C12 Zellen wurden akut stimuliert mit 10 µM Carbenoxolon (Cbx), 1 µM Cortison (E) und 1 µM Dexamethason (Dexa). Dargestellt sind die Veränderungen im Vergleich zur Negativkontrolle (NK). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n=8). \*\*\*P≤0,001; \*\*P≤0,01; \*P≤0,001

### 3.2.2 11beta-HSD1-abhängige Transkription der Proteolyse-Marker Atrogin-1 und MuRF-1

Neben der Proteolyse zeigten die Ubiquitin-Ligasen Atrogin-1 und MuRF-1 des Ubiquitin-Proteasom-Systems ebenfalls eine Abhängigkeit von der 11beta-HSD1. Die Transkriptionen dieser zwei, auch als Proteolyse-Marker etablierten Ligasen wurden entsprechend unter Akutstimulation mit Carbenoxolon, Cortison und Dexamethason gemessen. In C2C12 wurden die Atrogin-1 ( $2,83 \pm 0,42$  vs. NK;  $P < 0,01$ ) und MuRF-1 ( $1,91 \pm 0,36$  vs. NK;  $P < 0,05$ ) mRNA Expressionen, sowie die Murf-1 ( $1,69 \pm 0,14$ ;  $P < 0,01$ ) mRNA Expression in primären humanen Myotuben durch Cortison und Dexamethason signifikant erhöht. Prä-Inkubation mit Carbenoxolon blockierte den Cortison-Effekt in C2C12 vollständig (C2C12: Atrogin-1  $P < 0,01$  und MuRF-1  $P < 0,05$ ) und in primären humanen Myotuben, allerdings nicht signifikant (Abbildung 49).

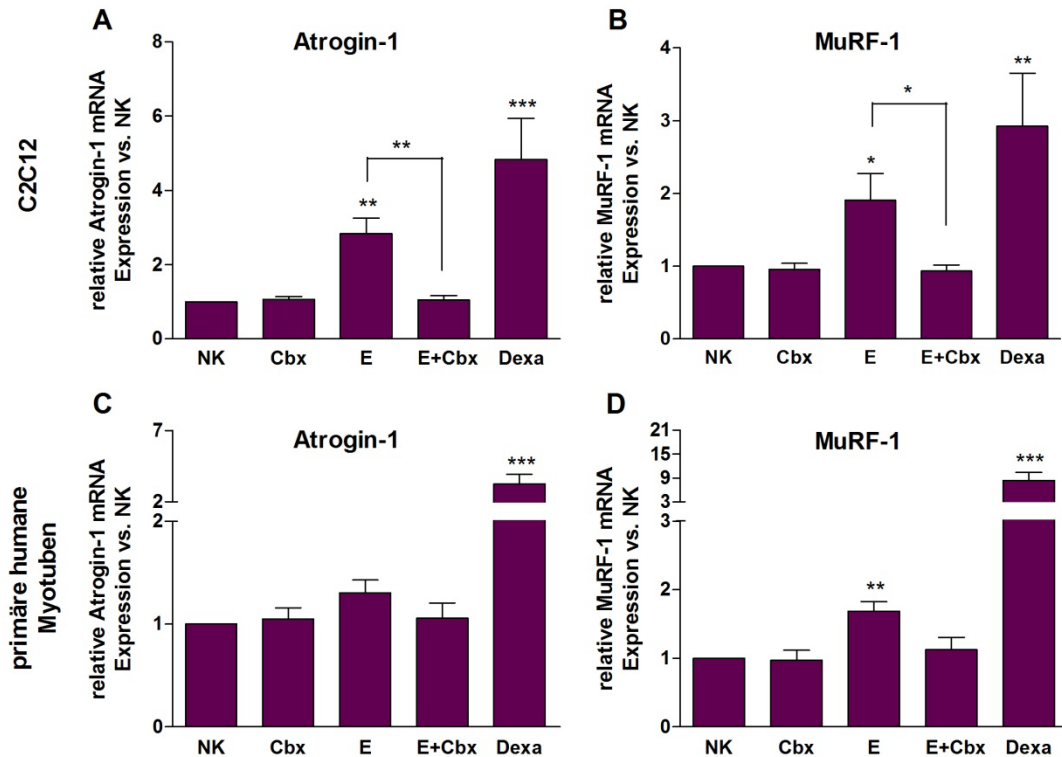


Abbildung 49: Atrogin-1 und MuRF-1 bei akuter Stimulation. Dargestellt sind die Veränderungen der mRNA Transkriptionen der Proteolyse-Marker Atrogin-1 [A und C] und MuRF-1 [B und D] in C2C12 (n=6) [A und B] und in primären humanen Myotuben (n=8) [C und D] in Abhängigkeit der 11beta-HSD1. Die Myotuben wurden akut stimuliert mit 10  $\mu$ M Carbenoxolon (Cbx), 1  $\mu$ M Cortison (E) und 1  $\mu$ M Dexamethason (Dexa). Dargestellt sind die Veränderungen im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) als Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\*\* $P \leq 0,001$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ; \* $P \leq 0,05$

Durch Doppel-Transfektion der C2C12 Zellen mit siRNA gegen sowohl 11beta-HSD1, als auch GRalpha gleichzeitig, wurden ebenfalls eine signifikant verringerte Atrogin-1 ( $P < 0,05$ ) und MuRF-1 ( $P < 0,05$ ) mRNA Expression gemessen, obwohl die kombinierte siRNA-Transfektion jeweils zu relativ geringen Knock-downs von 11beta-HSD1 und GRalpha mRNA von  $< 30\%$  bzw.  $< 50\%$  gegenüber der Scrambled siRNA Kontrolle führte. Durch separate siRNA Transfektion von 11beta-HSD1 und GRalpha in C2C12 Myotuben konnte eine tendenzielle Reduktion der Atrogin-1 und MuRF-1 mRNA Expression gemessen werden, dies waren allerdings keine signifikanten Effekte (Tabelle 10).



Tabelle 10: Knock-down von 11beta-HSD1 und GRalpha mittels Einzel- und Doppel-siRNA-Behandlung

	mRNA Expression			
	GRalpha	11beta-HSD1	Atrogin-1	MuRF-1
<b>11beta-HSD1 siRNA</b>	1,36 ± 0,29	0,46 ± 0,06 (***)	0,89 ± 0,05	0,79 ± 0,05
<b>GRalpha siRNA</b>	0,68 ± 0,11	1,18 ± 0,26	0,90 ± 0,09	0,78 ± 0,12
<b>11beta-HSD1 und GRalpha siRNA</b>	0,59 ± 0,09 (*)	0,72 ± 0,08	0,78 ± 0,07 (*)	0,78 ± 0,09 (*)

\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 vs. Scrambled siRNA Kontrolle

### 3.3 Veränderungen der MyHC-Isoformen

Um die Hypothese zu klären, ob eine Induktion der Muskel-Differenzierungsmarker sowie der Proteolyse und Proteolyse-Marker durch Glucocorticoide mit einer Veränderung der Muskelfaserzusammensetzung einhergeht, wurde die Expression verschiedener MyHC-Isoformen bestimmt. Die Zusammensetzung des von der Muskelfaser exprimierten MyHC-Musters gibt Aufschluss über deren Muskelfasertyp-Zugehörigkeit.

Bei akuter Stimulation der C2C12 Myotuben mit Cortison wurden keine unterschiedlichen Effekte auf die Expressionen der MyHC-Isoformen gemessen. Die mRNA Expressionen der Isoformen MyHC-2, MyHC-4 und MyHC-7 (Abbildung 50) wurden entsprechend MyHC-1 (Abbildung 30) durch Cortison erhöht, während die Carbenoxolon-Behandlung diesen Anstieg verhinderte. Ebenfalls auf Protein-Ebene wurden MyHCslow und MyHCfast gleichermaßen durch Akutstimulation reguliert (Effekte hier nicht signifikant) (Abbildung 50).

Eine chronische Stimulation über sechs Tage (D6) der Differenzierung bewirkte ebenfalls eine entsprechende Regulation des MyHCslow und MyHCfast Proteins. Nach längerer chronischer Stimulation über zwölf Tage (D12) wurden allerdings ausschließlich Stimulationseffekte auf MyHCslow gemessen, die MyHCfast Expression wurde durch die Langzeitstimulation nicht verändert (Abbildung 51). Nach zwölf-tägiger Stimulation war die durch Cortison-verursachte Zunahme der Proteinexpression von MyHCslow im Vergleich zu der von MyHCfast signifikant höher (P<0.01). Dementsprechend ist davon auszugehen, dass durch chronische Langzeitstimulation mit Cortison eine Umverteilung zugunsten der Typ-1-Fasern bzw. langsam-zuckenden oxidativen Fasern stattfindet.

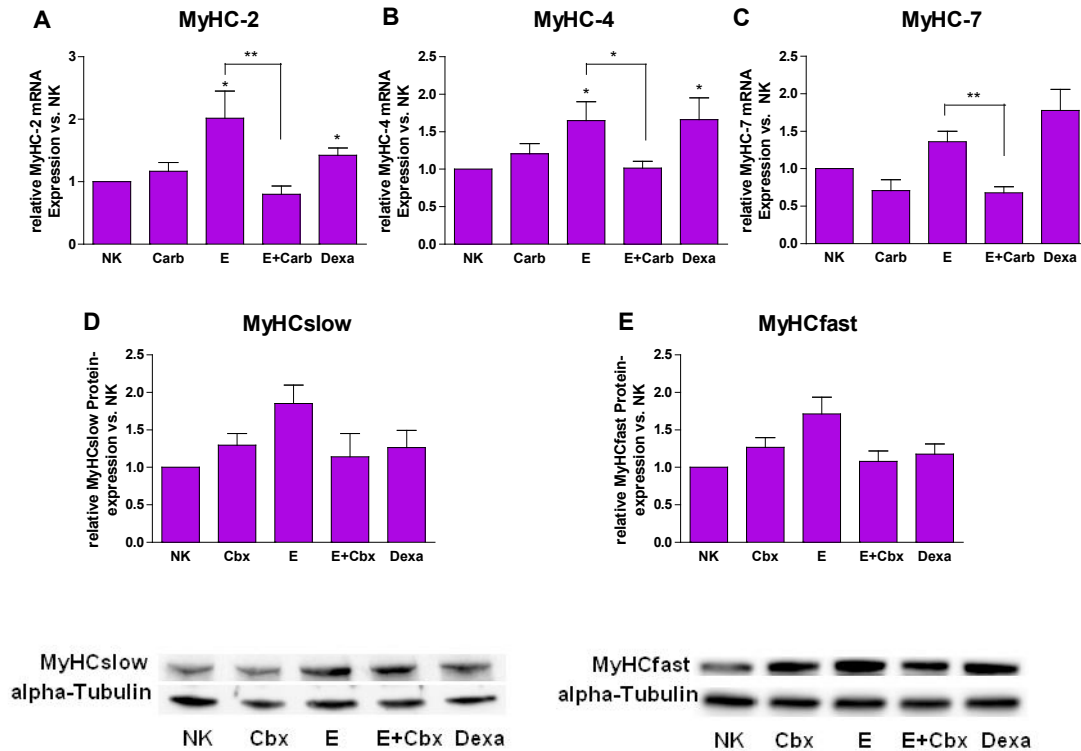


Abbildung 50: Myosin Heavy Chain Isoformen (mRNA) bei akuter Stimulation. Dargestellt sind die relative Transkription und Proteinexpression der Myosin Heavy Chain Isoformen in C2C12 nach Akutstimulation mit Carbenoxolon (Cbx), Cortison (E) und Dexamethason (Dexa) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK). Dargestellt sind die mRNA Expressionen von MyHC-2 [A], MyHC-4 [B], MyHC-7 [C] (normalisiert auf das mitochondriale Riboprotein 16s) und Proteinexpressionen mit repräsentativen Western Blots von MyHCslow [D] und MyHCfast [E] (normalisiert auf alpha-Tubulin). Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6). \*\*P $\leq$ 0,01, \*P $\leq$ 0,05

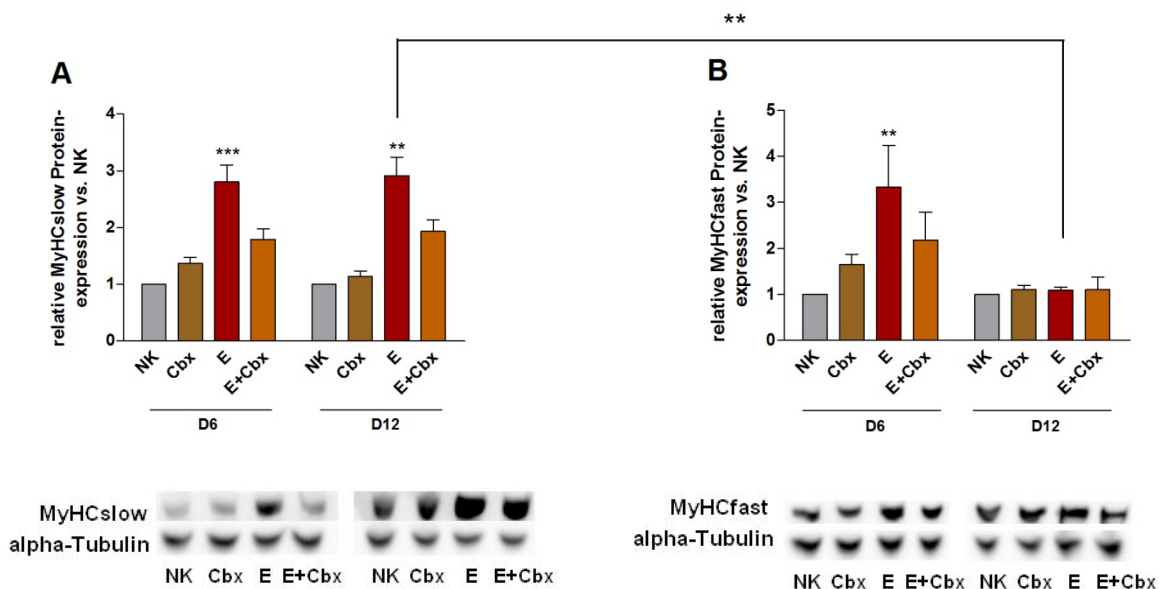


Abbildung 51: MyHCslow und MyHCfast Proteinexpression bei chronischer Stimulation. Dargestellt sind die relativen Proteinexpressionen der MyHC-Isoformen in C2C12 nach chronischer Stimulation mit 10  $\mu$ M Carbenoxolon (Cbx) und 1 $\mu$ M Cortison (E) im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) während der Differenzierung über sechs Tage (D6) und zwölf Tage (D12). Dargestellt sind die Proteinexpressionen mit repräsentativen Western Blots von MyHCslow [A] und MyHCfast [B] (normalisiert auf alpha-Tubulin). Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6). \*\*\*P $\leq$ 0,001, \*\*P $\leq$ 0,01

## 4. Diskussion

### 4.1 Die 11beta-HSD1 in Skelettmuskelzellen und deren Regulation während der Differenzierung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Enzym 11beta-HSD1 in Skelettmuskelzellen in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades exprimiert wird und als Oxo-Reduktase aktiv ist. Insbesondere konnte dies in primären humanen Myoblasten gesunder Probanden gezeigt werden, mit denen die Ergebnisse aus der etablierten murinen Myoblasten-Zelllinie C2C12 bestätigt wurden. Es gibt nur einige Studien, die bisher die 11beta-HSD1 in humanen Proben aus dem Skelettmuskel analysiert haben (127,128,130,132,134,136,154). Im Vergleich zur Leber, in der die höchste 11beta-HSD1 Expression und Oxo-Reduktase-Aktivität nachgewiesen wurde, konnte im humanen Skelettmuskel eine etwa 100-mal geringere Expression der 11beta-HSD1 gemessen werden (127). Die Bedeutung der muskulären 11beta-HSD1 im Rahmen von Erkrankungen wie Diabetes, Fettleibigkeit, aber auch Muskelerkrankungen ist nur unzureichend bekannt und untersucht.

Zwei andere Studien zeigten in der jüngeren Vergangenheit, dass die 11beta-HSD1 Expression und Enzymaktivität mit dem Differenzierungsgrad von Myoblasten zusammenhängt (142,143). Durch die hier vorgelegte Arbeit konnte zusätzlich ein Teil des molekularen Regulationsmechanismus aufgeklärt werden. Die Expression in undifferenzierten Myoblasten war sehr gering und steigerte sich mit zunehmender Differenzierung zu adulten Myotuben. So erhöhte sich die 11beta-HSD1 Expression um den Faktor 350 und die Enzymaktivität um den Faktor 10 in C2C12 Zellen. In primären humanen Myotuben stieg die Expression während des sechs-tägigen Differenzierungsprozesses um das ca. fünffache. Zur genauen Untersuchung der grundlegenden Expressionsregulation wurde ein Luciferase-Reportergen-Assay mit dem humanen 11beta-HSD1 Promotor durchgeführt. Hier zeigte sich eine zeit- bzw. differenzierungsspezifische Induktion unterschiedlicher Promotorregionen. So wurden in der frühen Phase der Differenzierung alle analysierten Promotorkonstrukte (+188 bp – -3034 bp) im gleichen Maße induziert, was bedeutet, dass entsprechende regulatorische Transkriptionsfaktoren an den proximalen Promotor-Bereich binden. Durch eine *in-silico*-Analyse konnten mögliche Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, wie z.B. CREB oder auch Transkriptionsfaktoren der CCAAT/Enhancer-Binding-Protein (C/EBP) Familie, die auch in Fettzellen eine wesentliche Rolle im proximalen 11beta-HSD1 Promotor spielen, wie unsere Arbeitsgruppe zeigen konnte (155). Entsprechend den putativen Bindungsstellen wurde in dieser Arbeit als nächstes die CREB-Proteinexpression und -Aktivierung durch Phosphorylierung untersucht. Wir konnten in der Tat nachweisen, dass die Aktivierung von CREB zu pCREB (Ser-133) in den Muskelzellen der Differenzierung unterlag. Damit könnte die differenzielle Aktivierung von CREB an der differenzierungsabhängigen Regulation des proximalen 11beta-HSD1 Promotors beteiligt sein. In früheren Studien wurde CREB bereits als Regulator während der Skelettmuskelentwicklung und -differenzierung diskutiert. Es konnte gezeigt werden,

dass eine Aktivierung von pCREB zu einer vermehrten Fusionsrate und Differenzierung von primären Myoblasten und C2C12 Zellen führte (156,157). Außerdem erhöhte pCREB sowohl *in-vitro* in primären Myoblasten, als auch *in-vivo* in Mäusen ebenfalls die Proliferation der Myoblasten und induzierte vor allem die erste Phase der Differenzierung (158). Des Weiteren war die Aktivierung von pCREB für die Induktion der Transkription der frühen Differenzierungsmarker MyoD und Myf5 notwendig und spielt somit in der Tat in der ersten Phase der Skelettmuskelentwicklung eine kritische Rolle (159). So ist es durchaus wahrscheinlich, dass pCREB den proximalen Promotor der 11beta-HSD1 in der frühen Phase der Differenzierung aktiviert und u.a. mitverantwortlich für die Expressionssteigerung der 11beta-HSD1 ist.

Während der Differenzierung änderte sich zusätzlich die Expression verschiedenster muskelspezifischer Faktoren, wie der myogenen Regulationsfaktoren (MRF) MyoD, Myf5, Myogenin, MRF4 sowie MEF-2c, die sich gegenseitig sowie differenzierungsabhängige Gene regulieren. Die MRF zeigten einen der Literatur entsprechenden und etablierten Expressionsverlauf von differenzierenden Myoblasten: Die Expression von Myf5 und MyoD verringerte sich in den differenzierten Myotuben bzw. blieb gleich und die der späten MRF Myogenin und MRF4 sowie des Differenzierungsmarkers MyHC stiegen parallel zur 11beta-HSD1 Expression an (an D6). Im weiteren Verlauf der Differenzierung veränderte sich auch das Aktivierungsmuster am Promotor der 11beta-HSD1. Am sechsten Tag der Differenzierung (D6) zeigte sich, dass die Aktivität des distalen Promotorbereichs ab -1505 bp verstärkt wird.

Von der Differenzierung unabhängig und somit nicht für die Regulation der 11beta-HSD1 im Verlauf der Differenzierung verantwortlich sind der Glucocorticoid Rezeptor GRalpha sowie der 11beta-HSD1 Co-Faktor-Lieferant (NADPH) H6PD, die jeweils in Myoblasten und Myotuben gleichermaßen exprimiert wurden (143,160,161). In Abbildung 52 sind die 11beta-HSD1 und GRalpha Expressionen im Verlauf der Differenzierung von Skelettmuskelzellen dargestellt.

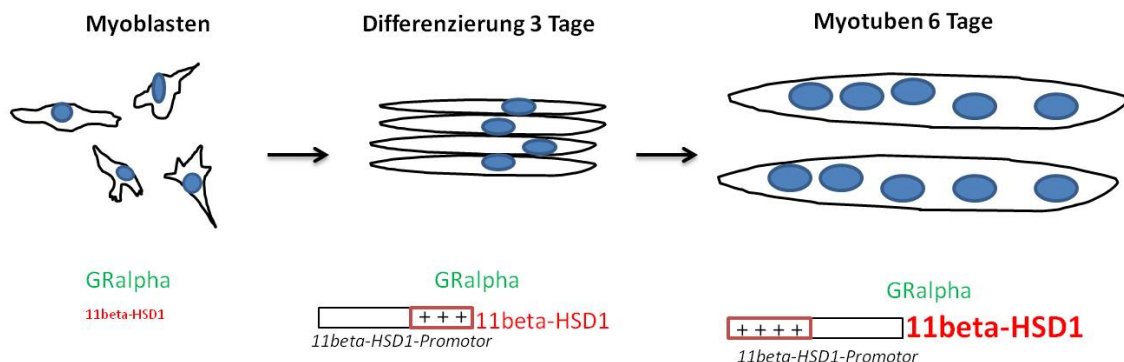


Abbildung 52: 11beta-HSD1 und GRalpha Expression im Verlauf der Differenzierung von Skelettmuskelzellen; die Schriftgröße steht symbolisch für die relative Expression des GRalpha und der 11beta-HSD1 und die blauen Kreise stellen die Zellkerne dar.

*In-silico*-Analysen zeigten in der Tat eine Häufung von potenziellen Myogenin- und MEF2-Bindungsstellen im Bereich ab -1505 bp. Da auch die Expression von Myogenin mit der Differenzierung stark ansteigt und die höchste Proteinexpression an D6 gemessen wurde, lag die Vermutung nahe, dass Myogenin in diesem Promotorbereich die Expression der 11beta-HSD1 im späteren Verlauf der Differenzierung reguliert. Daher wurde mittels siRNA-Technik die Expression von Myogenin reduziert und die Expression der 11beta-HSD1 und der anderen wichtigen Muskelfaktoren näher analysiert. Es zeigte sich, dass ein Knockdown von Myogenin mittels siRNA in C2C12 Zellen nur eine minimale, nicht-signifikante Reduktion der 11beta-HSD1 Transkription und Promotoraktivität bewirkte. Diese Reduktion der 11beta-HSD1 Expression war deutlich kleiner als der Knock-down-Effekt auf Myogenin, so dass anzunehmen ist, dass noch andere Faktoren die Expression der 11beta-HSD1 regulieren und eine verminderte Myogenin-Expression kompensieren können. Des Weiteren beeinflusste die Herunterregulation von Myogenin die Expression anderer regulatorischer Muskelfaktoren, wie MRF4 und MEF-2c, sowie gemessen an der Veränderung der Expression des terminalen Differenzierungsmarkers MyHC ebenfalls die Differenzierung selbst. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass Myogenin an der Regulation der 11beta-HSD1 beteiligt ist, und die 11beta-HSD1 Transkription entweder direkt oder indirekt und differenzierungsabhängig induziert. Andere Studien haben gezeigt, dass die Myogenin Proteinexpression eng mit dem Prozess der Myoblastenfusion zu adulten Myotuben zusammenhängt und nach der Fusion wieder abfällt (13,55,57). Bei Fehlen von Myogenin in Myogenin-Knockout-Mäusen fand dementsprechend keine Fusion der Myoblasten und somit keine weitere Differenzierung statt (26,27,162,163). In C2C12 Zellen wurde dieser Peak der Myogenin Proteinexpression und somit die maximale Myoblastenfusion an D6 erreicht, parallel zur Induktion des distalen 11beta-HSD1 Promotorbereichs ab -1505 bp. Nach D6 erhöhte sich die 11beta-HSD1 Expression und Aktivität allerdings weiterhin bis einschließlich D12 und verlief entgegengesetzt der Myogenin Proteinexpression. Demzufolge ist anzunehmen, dass die 11beta-HSD1 während der verschiedenen Phasen der Differenzierung von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren reguliert wird bzw. selbst eine regulierende Funktion in der Skelettmuskeldifferenzierung einnimmt. Mögliche 11beta-HSD1 regulierende Faktoren in der terminalen Phase der Differenzierung stellen MEF-2c und MRF4 dar, da die Expressionen beider Transkriptionsfaktoren auch nach der Myoblastenfusion weiter ansteigen (48).

Um die anhand der *in-silico*-Analyse bestimmten Kandidatenbindungsstellen für Myogenin und MEF-2c zu überprüfen, wurden diese mutiert. Im Reporteragen-Assay mit den mutierten potenziellen Myogenin-Bindungsstellen führte, entgegen den Erwartungen, die Mutation der entsprechenden Stellen zu keiner Veränderung der 11beta-HSD1 Promotoraktivität, die Mutation der potenziellen MEF-2c-Bindungsstelle hingegen zu einer Reduktion der Aktivität. In der Literatur ist beschrieben, dass Myogenin und MEF-2c in einem kausalen Zusammenhang stehen. So sind die MRF für die Initiation der MEF-2c Expression in Skelettmuskelzellen verantwortlich und die MEF-2 Faktoren können alleine keine Myogenese auslösen, in Kombination mit den MRF die Differenzierung aber steuern und verstärken (45,48). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich Myogenin und MEF-2c sowohl gegenseitig in einer positiven Feed-Forward Schleife regulieren

(44,46–53), als auch selbstregulierend ihre eigenen Promotoren induzieren (46,48) und synergistisch den MRF4 Promotor aktivieren (50). Es ist daher anzunehmen, dass MEF-2c durch Myogenin aktiviert wird und durch Bindung an den 11beta-HSD1 Promotor diesen induziert. Auf der anderen Seite führte das Fehlen von MEF-2c durch einen RNAi-Knockdown nicht zu einer erwarteten Verminderung der 11beta-HSD1 Transkription und Promotoraktivität, sondern im Gegenteil jeweils eher zu einer Erhöhung, was im scheinbaren Widerspruch zu den vorherigen Ergebnissen steht. Daneben kam es ebenfalls zu einem tendenziellen Anstieg der Transkription sowohl früher, als auch später Muskel-Differenzierungsmarker Myf5, MyoD, Myogenin und MyHC. Hier zeigte sich wiederum eine Kopplung der 11beta-HSD1 mRNA Expression und der Promotoraktivität an die Expression der MRF Transkriptionsfaktoren. Es liegt daher nahe, dass sich ein Knockdown von MEF-2c auf weitere kompensatorische Mechanismen und Transkriptionsfaktoren auswirken muss, die ebenfalls die 11beta-HSD1 und die Differenzierung steuern und welche an dieser Stelle weiterer Analysen bedürfen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse sind Einschränkungen in der Methodik des Luciferase-Assays zu berücksichtigen. Zum einen handelt es sich um Promotorfragmente des humanen 11beta-HSD1 Gens, die in Mauszellen (C2C12) transfiziert und hier analysiert wurden, so dass Diskrepanzen in der Regulation der 11beta-HSD1 zwischen den Spezies nicht ausgeschlossen werden können. Insbesondere kann nicht ausgeschlossen werden, dass die murinen Transkriptionsfaktoren den humanen Promotor möglicherweise anders beeinflussen als die humanen Transkriptionsfaktoren. Des Weiteren wurde im Gegensatz zur Analyse der mRNA- und Proteinexpressionsänderung im Luciferase-Assay nur ein Teilausschnitt des Promotors untersucht. Zum anderen wird der Promotor für die transiente Transfektion in ein Plasmid kloniert und kann somit nicht mehr über eine kondensierte Chromatinstruktur (3D-Struktur) verfügen. Die dichte Packung der Nucleosomen kann den Zugang für Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren verhindern bzw. so regulieren, dass nur bestimmte DNA-Abschnitte transkriptionell aktiv sind (164). An den klonierten Promotor im Plasmid hingegen können die Transkriptionsfaktoren ungehindert binden und die Transkription anders als in der komplexen Chromatinstruktur regulieren (165). Daher kann es zu unterschiedlichen Ergebnissen zwischen den Luciferase-Assays und den mRNA-Daten kommen.

## **4.2 Intrazellulärer Feed-Forward-Mechanismus der Glucocorticoide und gleichzeitige Gegenregulation des GRalpha in Skelettmuskelzellen**

Des Weiteren wurde die Regulation durch Glucocorticoide im 11beta-HSD1 Skelettmuskel-Metabolismus untersucht. Es ist aus anderen Zellmodellen bekannt, dass Glucocorticoide die Transkription der 11beta-HSD1 und des Glucocorticoidrezeptors GRalpha selbst regulieren (135,166–171). In dieser Arbeit konnte dies ebenfalls in Skelettmuskelzellen nachgewiesen werden. Die 11beta-HSD1 Expression wurde durch Stimulation mit den Glucocorticoiden Cortison und Dexamethason in murinen C2C12 Myotuben sowie in primären humanen Myoblasten induziert

und dies war sowohl in akut stimulierten differenzierten Myotuben (2-3-fach) der Fall, als auch unter chronischen Bedingungen (4-fach) in differenzierenden Myoblasten. In C2C12 Zellen konnte ebenfalls eine durch Cortison verursachte Steigerung der 11beta-HSD1 Enzymaktivität (1,5-2-fach) und Promotoraktivität (1,2-2,8-fach) demonstriert werden. Bei Cortison handelt es sich um die hormonell inaktive Form des Cortisols, welches erst nach der Reduktion durch die 11beta-HSD1 zu Cortisol an den GRalpha, aber auch an den MRalpha binden kann. Das synthetische Glucocorticoid Dexamethason verfügt bereits über eine aktive 11beta-Hydroxygruppe und bindet direkt ohne Prä-Rezeptorkontrolle durch die 11beta-HSD1 an den GRalpha, weshalb Dexamethason hier als Positivkontrolle der Glucocorticoid-Wirkung verwendet wurde. Es konnte somit gezeigt werden, dass Cortison in Skelettmuskelzellen seine eigene Aktivierung zum hormonell wirksamen Cortisol in einem sogenannten Feed-Forward-Mechanismus abhängig von der 11beta-HSD1 induziert. Diese Ergebnisse bestätigen Studien anderer Autoren, die ebenfalls eine positive Feedbackverstärkung durch Glucocorticoide in Skelettmuskelzellen nachweisen konnten (128,134,143,154). Die 11beta-HSD1 stellt folglich in Skelettmuskelzellen einen Regulator dar, der die intrazelluläre Wirksamkeit der Glucocorticoide selektiv, d.h. zellspezifisch, kontrollieren kann, ohne dabei den zentralen negativen Feedback-Loop über die HPA-Achse auf die Cortisolsynthese zu beeinflussen (172). Weiterhin weisen die Ergebnisse darauf hin, dass unter bestimmten Umständen die intrazelluläre Glucocorticoid-Sensitivität nennenswert moduliert werden kann.

Einen weiteren Regulator der intrazellulären Glucocorticoid-Wirkung stellt der GRalpha dar, der durch Bindung des aktiven Cortisols und darauf folgender Translokation in den Kern dessen genregulatorische Effekte vermittelt. Einige Studien zeigen, dass Glucocorticoide ihre Effekte nicht nur durch Bindung an den GRalpha vermitteln, sondern auch über Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren (173,174). Allerdings konnte in der Literatur durch den Einsatz eines GRalpha-Antagonisten bzw. eines GRalpha siRNA-Knockdowns in Muskelzellen trotz Stimulation mit Glucocorticoiden das Herunterregulieren des GRalpha, sowie das Hochregulieren der 11beta-HSD1 verhindert werden. Diese Daten zeigen, dass die Regulation der GRalpha und 11beta-HSD1 Expression über die Rezeptorbindung von Cortisol an den GRalpha vermittelt wird (154,169). Des Weiteren konnte in dieser Arbeit eine Gegenregulation der GRalpha und 11beta-HSD1 Expressionen beobachtet werden, wobei die Cortison-Behandlung parallel zur Stimulation der 11beta-HSD1 eine deutliche Reduktion der GRalpha Expression auf ca. die Hälfte der Expression in Kontrollzellen bewirkte und das sowohl in akut, als auch in chronisch stimulierten C2C12 Zellen. Die Anpassung des GRalpha könnte einen intrazellulären Mechanismus darstellen, um die erhöhte Glucocorticoid-Konzentration auszugleichen und die Zelle zu desensibilisieren.

Um den Mechanismus der positiven Feedbackverstärkung und der Gegenregulation zu untersuchen, wurde die 11beta-HSD1 gehemmt. Der zur Hemmung der 11beta-HSD1 eingesetzte Inhibitor Carbenoxolon senkte die 11beta-HSD1 mRNA Expression und Enzymaktivität sehr effektiv und deutlich stärker in C2C12 Zellen als in primären humanen Myoblasten. Durch Prä-Inkubation der Muskelzellen mit Carbenoxolon konnte der durch Cortison ausgelöste stimulierende

Effekt auf die 11beta-HSD1 Expression, Enzymaktivität und Promotoraktivität verhindert bzw. vermindert werden und das sowohl bei akuter, als auch bei chronischer Stimulation. Im Gegensatz dazu ging die durch die Prä-Inkubation mit Carbenoxolon verringerte 11beta-HSD1 Aktivität mit einem der Gegenregulation entsprechenden Anstieg der GRalpha Expression einher. Bei Carbenoxolon handelt es sich um einen Succinylester der Glycyrrhetinsäure, der sowohl einen Hemmer der 11beta-HSD1, als auch der 11beta-HSD2 darstellt (175,176). Eine Expression der 11beta-HSD2 im Skelettmuskel konnte in dieser Arbeit und von anderen Autoren nicht nachgewiesen werden (130,154), so dass davon ausgegangen werden kann, dass alle durch Carbenoxolon im Skelettmuskel verursachten Effekte ausschließlich durch eine Hemmung der 11beta-HSD1 ausgelöst wurden. Der Mineralocorticoidrezeptor MRalpha, an den Cortisol ebenfalls mit einer hohen Affinität binden kann, wurde allerdings in den Skelettmuskelzellen exprimiert und deren Expression unterlag entsprechend dem GRalpha der Gegenregulation zur 11beta-HSD1. Es kann somit sein, dass ein Teil der Glucocorticoid-Effekte auch über Bindung an den MRalpha vermittelt wird, was sogar sehr wahrscheinlich ist, da die Bindungsaffinität des MRalpha zu Cortisol sogar die des GRalpha überwiegt. So aktivieren geringe Cortisol-Konzentrationen bereits den MRalpha, während der GRalpha erst durch hohe Cortisol-Level aktiviert wird (177).

Der genaue Mechanismus der Regulation von GRalpha, MRalpha und 11beta-HSD1 ist bisher weitgehend ungeklärt, da sich putative Bindungsstellen nur im Bereich um -2830 bp (F6) bzw. -1365 bp (F4) des 11beta-HSD1 Promotors befinden. Jedoch sind Cortison-abhängige Effekte bereits im Fragment F1 zu beobachten. Mögliche Kandidaten für diese Regulation wären hierbei wiederum C/EBP und CREB. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass C/EBPbeta und C/EBPdelta für die durch Glucocorticoide verursachte Induktion der 11beta-HSD1 in glatten Muskelzellen notwendig waren. Diese erhöhte 11beta-HSD1 Expression regulierte die GR Expression in einem CREB-abhängigen Mechanismus, wobei Dexamethason einen negativen Regulator der Phosphorylierung von CREB darstellte (169). Dagegen hatte in dieser Arbeit in Skelettmuskelzellen eine akute Glucocorticoid-Stimulation keine Auswirkungen auf CREB, jedoch auf die GRalpha und 11beta-HSD1 Expression. Bei chronischer Stimulation mit Cortison konnte ein tendenzieller 11beta-HSD1-abhängiger Anstieg der CREB Phosphorylierung und somit Aktivierung gemessen werden, was zunächst im Widerspruch zur Literatur steht. Zum einen handelt es sich allerdings um verschiedene Zelltypen, so dass im Skelettmuskel andere Regulationsmechanismen vorhanden sein können als in glatten Muskelzellen. Zum anderen spielt CREB ebenfalls eine Rolle in der Skelettmuskeldifferenzierung und -regeneration (siehe 4.1), was mit diesen Ergebnissen der CREB-Regulation übereinstimmend ist.



### 4.3 11beta-HSD1-abhängige Wirkungen von Glucocorticoiden auf die Skelettmuskeldifferenzierung und Muskelfasertypen

Da wie oben beschrieben die 11beta-HSD1 in Skelettmuskelzellen von dem Grad der Differenzierung abhängig ist, wurde analysiert, inwiefern die Differenzierung durch die 11beta-HSD1 selbst beeinflusst wird. Hier konnte in C2C12 Zellen gezeigt werden, dass Glucocorticoide die Expression von Skelettmuskel-Differenzierungsmarkern, sowohl die der primären MRF MyoD und Myf5, als auch die der sekundären MRF Myogenin und MRF4, sowie MEF-2c, erhöhte. Demzufolge konnte eine Steigerung der Differenzierungsrate festgestellt werden, gemessen an der Expression von MyHC, welches eine Familie von Strukturproteinen im Skelettmuskel umfasst und einen Marker der terminalen Differenzierung darstellt, als auch anhand visueller Beobachtungen via Mikroskop. Dies war sowohl bei akuter, als auch chronischer Behandlung der Skelettmuskelzellen mit Cortison und Dexamethason der Fall. Da die gemessenen Cortison-Effekte eine Umwandlung zu Cortisol mittels 11beta-HSD1 voraussetzen, konnte somit in dieser Arbeit aufgeklärt werden, dass es sich hier um einen 11beta-HSD1-abhängigen Prozess handelt, der bei akuter und chronischer Stimulation durch eine Hemmung der 11beta-HSD1 mit Carbenoxolon inhibierbar war, allerdings nicht signifikant. In primären humanen Myoblasten konnte ebenfalls eine 11beta-HSD1-abhängige Erhöhung der MyoD und MRF4 Expressionen gemessen werden, für Myf5, MRF4 und Myogenin war dieser Effekt allerdings nicht signifikant. Außerdem war ausschließlich die Cortison-induzierte Steigerung der frühen Differenzierungsmarker MyoD und Myf5 tendenziell mit Carbenoxolon inhibierbar. Dies war bei den anderen Markern nicht erkennbar. Bei diesen Ergebnissen ist allerdings zu berücksichtigen, dass die 11beta-HSD1 in C2C12 Zellen mit Carbenoxolon deutlich stärker gehemmt wurde als in den primären humanen Myoblasten. So ist anzunehmen, dass ein in humanen Zellen stärker wirkender 11beta-HSD1 Hemmer größere Effekte bewirken könnte.

Die bisher in der Literatur beschriebene Wirkung von Glucocorticoiden auf die Skelettmuskeldifferenzierung ist divergent und somit ist auch die genaue Funktion der 11beta-HSD1 hier noch unklar. Es wird einerseits beschrieben, dass die Behandlung mit Glucocorticoiden in C2C12 Zellen die Differenzierungsmarker herunterreguliert, andererseits aber stimuliert (137–139,178,179). Ungewiss ist hier bisher, inwiefern eine veränderte Expression der Differenzierungsmarker zu den verschiedenen Stadien im Differenzierungsprozess zu bewerten ist. Eine erhöhte Expression könnte einerseits eine gesteigerte und somit eventuell verbesserte Skelettmuskelentwicklung und Hypertrophie widerspiegeln, andererseits aber auch morphologische Fehlbildungen und einen erhöhten Turnover charakterisieren, bei dem sowohl die Proteinsynthese bzw. Muskelregeneration, als auch der Proteinabbau erhöht sind. Hier gehen die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse ebenfalls auseinander. Einerseits beschreiben Te Pas *et al.* (2000) eine Verschlechterung der morphologischen Differenzierung als Folge einer chronischen Glucocorticoid-Stimulation in C2C12 Zellen, obwohl die Expressionslevel von MyoD, Myf5 und MRF4 anstiegen und lediglich die Myogenin Expression reduziert war (138). Andererseits führte in einer anderen

Publikation eine chronische Behandlung mit Dexamethason in C2C12 Zellen zu einer Erhöhung der Myoblastenfusion zu mehrkernigen Myotuben und dies bei gleichzeitigem Anstieg der MyoD, Myogenin und MyHC Expressionen (137). Des Weiteren gibt es in der Literatur Belege dafür, dass Muskelzellen auch de-differenzieren können, was bedeutet, dass in ausdifferenzierten Myotuben eine Rückbildung zu proliferierenden einkernigen Myoblasten stattfinden kann. Diese De-Differenzierung scheint allerdings mit einer Reduktion von Muskel-Differenzierungsmarkern einherzugehen (180–182). In dieser Arbeit war allerdings eine Erhöhung der Differenzierungsmarker ausgelöst durch Glucocorticoide zu beobachten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich hier eher um eine Hypertrophie bzw. einen erhöhten Turnover handelt. Auch hier ist wieder eine Kopplung der Differenzierungsmarker an die 11beta-HSD1 Expression/Aktivität gegeben.

Weiterhin kann eine Veränderung der Differenzierungsmarker in adulten ausdifferenzierten Myotuben mit Veränderungen der Muskelfasertypen einhergehen (36–40). Daher wurde im Folgenden analysiert, ob Glucocorticoide in den Skelettmuskelzellen eine Veränderung der Muskelfasertypen bzw. der MyHC-Isoformen bewirken. In dieser Arbeit führte eine akute und über sechs Tage verlaufende chronische Stimulation mit Cortison in C2C12 Zellen zu einem Anstieg aller MyHC-Isoformen, sowohl vom langsam-zuckenden-Typ (Slow-Typ), als auch vom schnell-zuckenden-Typ (Fast-Typ) gleichermaßen. Auf Proteinebene war ebenfalls kein Unterschied in den Muskelfasertypen messbar und die Hemmung der 11beta-HSD1 durch Carbenoxolon verhinderte diesen Anstieg der MyHC-Isoformen beider Muskelfasertypen tendenziell. Allerdings waren nach zwölf Tagen Stimulation nur die Muskelfasern vom Slow-Typ 11beta-HSD1-abhängig erhöht, in den Muskelfasern vom Fast-Typ konnte hingegen kein Effekt durch Cortison oder Carbenoxolon gemessen werden. So könnte ein Langzeiteffekt der Glucocorticoide eine 11beta-HSD1-abhängige Veränderung der Muskelfasertypen in Richtung Slow-Typs bedeuten.

Diese Hypothese wird in der Literatur weiter gestützt. So konnte gezeigt werden, dass Glucocorticoide in Ratten und Mäusen eine Veränderung der Muskelfasertypen in Richtung des Slow-Typs verursachten (183,184) und vor allem atrophierend in Muskelfasern vom glykolytisch aktiven Fast-Typ wirkten, hingegen nicht oder nur wenig in Muskelfasern vom oxidativen Slow-Typ (185–190). Des Weiteren behandelten Kelly *et al.* (1986) Ratten über zehn Tage mit unterschiedlichen Glucocorticoiden und stellten Veränderungen in der Skelettmuskelmorphologie fest. Durch die Glucocorticoid-Behandlung nahm die Anzahl der Mitochondrien in den Muskelfasern vom Fast-Typ so zu, dass sie die Anzahl in den Muskelfasern vom Slow-Typ überstieg (191). Eine Ursache hierfür könnte in der höheren GR Expression in schnell-zuckenden als in langsam-zuckenden Muskelfasern liegen (192). Die Expression der 11beta-HSD1 ist allerdings nicht vom Muskelfasertyp anhängig, sondern wird in schnell-zuckenden und langsam-zuckenden Muskelfasern gleichermaßen exprimiert (127). Sato *et al.* (2011) zeigten hingegen, dass eine chronische Dexamethason-Behandlung in Ratten zu einer deutlichen Herunterregulation der GR mRNA führt und zwar gleichermaßen sowohl im Musculus extensor digitorum longus (EDL), welcher vorwiegend aus schnell-zuckenden Muskelfasern besteht, als auch im Musculus

soleus (SOL), der reich an langsam-zuckenden Muskelfasern ist. Hier wurde zusätzlich die Expression von CREB gemessen, die ausschließlich im SOL reduziert war, im EDL tendenziell sogar eher erhöht. pCREB wurde in dieser Studie nicht analysiert (192). Dies lässt aber vermuten, dass der Mechanismus, der die Veränderungen in den Muskelfasertypen bewirkt, ebenfalls über CREB reguliert werden könnte. Zusammenfassend geht aus den Ergebnissen hervor, dass eine chronische Glucocorticoidstimulation zu einem vermehrten Abbau schnell-zuckender Muskelfasertypen zugunsten einer Modifikation zu langsam-zuckenden Muskelfasern führt und dieser Mechanismus sehr wahrscheinlich über die 11beta-HSD1 und CREB reguliert wird.

#### **4.4 11beta-HSD1-abhängige Wirkungen von Glucocorticoiden auf die Proteolyse in Skelettmuskelzellen**

Parallel zur Funktion der 11beta-HSD1 in der Differenzierung wurde diese in der Skelettmuskelproteolyse untersucht, da gut etabliert ist, dass Glucocorticoide einen Abbau von Muskelproteinen verursachen (189,193). Die Glucocorticoid-abhängige Proteolyse stellt vor allem eine Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) dar (146–149). Auf der einen Seite erhöhen Glucocorticoide direkt den Proteinabbau über Aktivierung des proteinspaltenden Proteasoms selbst (194). Auf der anderen Seite bewirken sie durch einen Anstieg der E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF-1 und Atrogin-1 Expression eine vermehrte Kennzeichnung zum Abbau bestimmter Proteine durch Konjugation von Ubiquitin, wodurch das Proteasom diese gekennzeichneten Proteine erkennt und abbaut. In verschiedenen Modellen der Muskelatrophie waren die MuRF-1 und Atrogin-1 Expressionen im Vergleich zu anderen Genen besonders stark erhöht und konnten als zuverlässige Marker für den Muskelabbau über das UPS identifiziert werden, denen eine Schlüsselstellung im Muskelabbauprozess zukommt (60,64,146–149).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch Glucocorticoide ausgelöste Proteolyse über das UPS in Skelettmuskelzellen von der 11beta-HSD1 abhängig ist. Die Stimulation mit Cortison und Dexamethason führte zu einer Steigerung der Proteolyserate sowie der MuRF-1 und Atrogin-1 Expressionen. Durch eine Hemmung der 11beta-HSD1 mit Carbenoxolon wurde die Glucocorticoid-induzierte Proteolyse sowie die Induktion der E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF-1 und Atrogin-1 mRNA Expression vollständig verhindert. Demzufolge ist anzunehmen, dass der 11beta-HSD1 in der Regulierung der durch Glucocorticoide verursachten Proteolyse über das UPS eine Schlüsselfunktion zukommt. Bisher gibt es keine weiteren Studien, die sich mit der 11beta-HSD1 im intrazellulären Glucocorticoid-Metabolismus hinsichtlich des Proteinabbaus beschäftigen. Ein nächster Schritt wäre eine Überprüfung dieser *in-vitro*-Ergebnisse z.B. in einem Mausmodell, dem die 11beta-HSD1 Expression durch einen Knockout spezifisch in Myozyten fehlt bzw. spezifisch dort überexprimiert wird. Denkbar wäre ebenfalls eine *in-vivo* Behandlung mit einem 11beta-HSD1 Inhibitor mit nachfolgender Analyse der Auswirkungen auf den Skelettmuskelabbau und die Expressionen von MuRF-1 und Atrogin-1. In dieser Arbeit konnte der 11beta-HSD1-abhängige

Effekt sowohl in C2C12 Myotuben, als auch zum Teil in primären humanen Myotuben gezeigt werden und bestätigt daher eine physiologische Relevanz auch für den Menschen. Ein ausschließlicher siRNA-Knockdown von 11beta-HSD1 bzw. ein ausschließlicher siRNA-Knockdown von GRalpha hatten keinen Effekt auf die Transkription der E3-Ligasen. Dies ist aber wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in bereits differenzierten C2C12 Myotuben die Zelldichte sehr groß war und die Transfizierbarkeit der Zellen in diesem Stadium daher gering war. So wurde in den C2C12 Myotuben lediglich ein Silencing von 30-50% erreicht. Die gleichzeitige Herunterregulation von 11beta-HSD1 und GRalpha mittels siRNA führte allerdings zu einer signifikanten Reduktion der MuRF-1 und Atrogin-1 Transkription und bestätigt die Schlüsselfunktion von 11beta-HSD1 und GRalpha im durch Glucocorticoide verursachten Proteinabbau über das UPS.

Die genauen molekularen Mechanismen und Signalwege, die den Proteinabbau bzw. die Expressionen von MuRF-1 und Atrogin-1 regulieren, sind noch weitgehend unbekannt. Ein möglicher Regulator wäre hierbei ebenfalls Myogenin, dem wie oben beschrieben eine Rolle in der Skelettmuskeldifferenzierung und 11beta-HSD1 Regulation zukommt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MuRF-1 und Atrogin-1 Expressionen während der Differenzierung ansteigen und parallel zu Myogenin ebenfalls 11beta-HSD1 abhängig durch Glucocorticoide induziert werden. Hierzu passend demonstrierten Moresi *et al.* (2010), dass Myogenin an Promotorregionen beider E3-Ubiquitin Ligasen MuRF-1 und Atrogin-1 bindet und deren Transkription aktiviert. Dies konnten sie sowohl in C2C12 Zellen *in-vitro*, als auch in Mäusen *in-vivo* nachweisen (195). Gegen Ende der Muskelzellendifferenzierung kommt es zu einer Herunterregulation der Myogenin Expression. Bei der Geburt sind die Skelettmuskeln vollständig ausdifferenziert, so dass die Myogenin Expression hier bereits abgesunken ist. Im Mausversuch konnte die Myogenin Expression bei einer durch Denervation eines Muskels ausgelösten Atrophie wieder re-induziert werden (196,197). Ein Myogenin-Knockdown (Myogenin<sup>-/-</sup>) in adulten Mäusen verhinderte die Ausbildung einer Muskelatrophie durch Denervation und den Anstieg der Expressionen von MuRF-1 und Atrogin-1. Dadurch, dass der Knockdown von Myogenin hier in ausgewachsenen Mäusen stattfand, erschienen Muskelwachstum und -entwicklung dieser Mäuse normal zu sein (195). Myogenin scheint daher wichtige Funktionen, sowohl während der Differenzierung an der Fusion der Myoblasten zu Myotuben, als auch beim Proteinabbau in adulten Skelettmuskelzellen, einzunehmen. Dies würde die Hypothese eines durch Glucocorticoide verursachten generell erhöhten Turnovers in den Muskelzellen weiter stützen, bei dem es zu einer Hypertrophie mit gleichzeitig erhöhter Proteolyserate der Muskelproteine kommt. Des Weiteren ist anzunehmen, dass außerdem Mechanismen zur Erhöhung der Skelettmuskelregeneration induziert werden müssten.

Die Skelettmuskelregeneration beinhaltet Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Satellitenzellen, welche Reservezellen in Form von einzelligen nicht proliferierenden Myoblasten darstellen und z.B. im Falle von Verletzungen der Muskelfasern aktiviert werden können. An der Skelettmuskelregeneration scheint wiederum CREB beteiligt zu sein. Stewart *et al.* (2011) zeigten

an Mäusen, dass im Skelettmuskelgewebe drei Tage nach einer Verletzung pCREB deutlich anstieg und dies vor allem in den Satellitenzellen im regenerierenden Muskelgewebe. Weiterhin untersuchten sie primäre Myoblasten, die in Kultur mit Extrakten aus zerstörtem Muskelgewebe aus dem Musculus gastrocnemius inkubiert wurden. Diese Zellen zeigten danach einen raschen Anstieg von pCREB. Es wird daher vermutet, dass ein noch unbekannter Faktor von verletzten Skelettmuskelzellen abgegeben wird, der über pCREB die Muskelzellregeneration veranlasst. In den Zellkernen von regenerierenden Muskelfasern konnte außerdem durch immunhistochemische Färbung ein starkes Vorkommen von pCREB nachgewiesen werden (158). In dieser Arbeit führte die chronische Stimulation über sechs und zwölf Tage mit Cortison in C2C12 Zellen parallel zum Anstieg terminaler Differenzierungsmarker und 11beta-HSD1 zu einer zunehmenden Phosphorylierung von CREB (nicht signifikant) und war damit ebenfalls tendenziell 11beta-HSD1 abhängig. Dieser Effekt wurde tendenziell, aber aufgrund zu geringer Versuchszahlen nicht signifikant, durch Hemmung der 11beta-HSD1 mit Carbenoxolon vermindert. Die Gesamtproteinexpression von CREB wurde durch eine zwölf-tägige chronische Stimulation mit Carbenoxolon reduziert. Die akute Cortison- und Carbenoxolon-Stimulation hatte noch keinen Einfluss auf die Proteinexpression von CREB bzw. dessen Phosphorylierung. Es ist daher zu vermuten, dass aufgrund des vermehrten Abbaus von Muskelmasse durch Glucocorticoide, unter chronischen Bedingungen und ebenfalls 11beta-HSD1-abhängig über Aktivierung von pCREB die Skelettmuskelregeneration initiiert wird.

#### **4.5 11beta-HSD1-abhängige Wirkungen von Glucocorticoiden auf die Insulinsensitivität in Skelettmuskelzellen**

Die 11beta-HSD1 wird zur Zeit als vielversprechendes Target u.a. in der Typ 2-Diabetes Therapie diskutiert, da in vielen Studien durch eine Hemmung der 11beta-HSD1 eine Erhöhung der Ganzkörper-Insulinsensitivität nachgewiesen werden konnte (117–119,121–125). 11beta-HSD1-Knockout-Mäuse zeigten ebenfalls eine verbesserte Glucosetoleranz (115). Konsequenzen für die Insulinsensitivität im Skelettmuskelgewebe wurden bisher nur in sehr wenigen Studien analysiert. Der Skelettmuskel stellt allerdings ein sehr wichtiges Zielgewebe für die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme dar (198) und es ist daher zu vermuten, dass der Skelettmuskel an der Verbesserung der Ganzkörper-Insulinsensitivität beteiligt ist. In dieser Arbeit wurde die Insulinsensitivität anhand der Glucoseaufnahmerate in die Muskelzellen analysiert. Hierzu wurde der Effekt von Glucocorticoiden auf die basale und Insulin-induzierte Glucoseaufnahme in die C2C12 Myotuben 11beta-HSD1-abhängig untersucht. Die Akutstimulation der Myotuben sowohl mit Cortison, als auch mit Dexamethason reduzierte die basale Glucoseaufnahme und die Prä-Inkubation mit Carbenoxolon konnte die durch Cortison verursachte Beeinträchtigung der Glucoseaufnahme komplett verhindern. Hier zeigte sich somit ein positiver Effekt durch die 11beta-HSD1 Hemmung auf die Insulin-unabhängige Aufnahme von Glucose in die Myotuben. Des

Weiteren wurde die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme zwar tendenziell durch Cortison verringert, hier zeigte sich aber nur ein geringer reversibler Effekt durch die 11beta-HSD1 Hemmung. Dies bestätigt die Ergebnisse von Salehzadeh *et al.* (2009), die ebenfalls durch eine 11beta-HSD1 Inhibition eine Verbesserung der basalen und nicht der Insulin-abhängigen Glucoseaufnahme in chronisch (4 Tage) mit Cortison stimulierten primären humanen Myoblasten gesehen haben (134). Die basale und die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme unterliegen zwei verschiedenen Mechanismen und werden über unterschiedliche Glucosetransporter vermittelt. Unter basalen Bedingungen erfolgt die Aufnahme über den Glucosetransporter Glut1, der die Glucoseversorgung unabhängig von Insulin ermöglicht. Die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme wird hingegen über den Glucosetransporter Glut4 vermittelt, der nicht permanent, sondern erst nach Insulinstimulation an die Zellmembran transloziert wird (199,200). Die RT-PCR Messung dieser beiden Glucosetransporter ergab eine signifikante Erhöhung der Glut4 mRNA Expression und ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung der Glut1 mRNA Expression in den Myotuben, die mit Glucocorticoiden stimuliert wurden. Der Anstieg des Glut1 wurde durch eine 11beta-HSD1 Inhibition mit Carbenoxolon signifikant, der Anstieg des Glut4 tendenziell verhindert. In der Literatur konnte in Skelettmuskelzellen ebenfalls gezeigt werden, dass Dexamethason zu einer Erhöhung der Glut1 und Glut4 Expression führte, allerdings gleichzeitig eine Herabregulation der Insulinsignalkaskade bewirkte (136,201). Es wird daher vermutet, dass eine Beeinträchtigung im Insulinsignalweg zu einer kompensatorischen Hochregulation der Glucosetransporter Glut1 und Glut4 Expressionen führt (201). Weitere Studien konnten bestätigen, dass sich eine Hemmung der 11beta-HSD1 günstig auf den Insulinsignalweg und die Glucoseaufnahmefähigkeit in die Skelettmuskelzelle auswirkt (130,136). So konnte durch eine 11beta-HSD1 Inhibition u.a. verhindert werden, dass Cortison durch Verringerung der Phosphorylierung von Akt (pAkt-Th308) die Insulinkaskade beeinträchtigte (136). Im Gegensatz dazu führte Cortison in dieser Arbeit 11beta-HSD1-abhängig zu keiner Veränderung bzw. eher einer Erhöhung von pAkt (Ser473) und somit zu einer eher Induktion des Insulinsignalwegs. Unterstützt werden diese Daten anhand von Ergebnissen aus unserer Arbeitsgruppe, die eine Erhöhung von pAkt (Ser473) durch Cortison in differenzierten murinen 3T3-L1 Adipozyten zeigen (unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Effekte auf Akt sind am ehesten indirekt durch die Glucocorticoid-induzierte Differenzierung der Sklettmuskelzellen zu erklären, wobei dies noch im Detail untersucht werden muss. In der Literatur konnte allerdings auch gezeigt werden, dass die durch Glucocorticoide herbeigeführte Insulinresistenz vor allem durch Störung der Translokation von Glut4 an die Zellmembran zustande kommt, unabhängig vom Insulinsignalweg über Akt (202,203).

## 4.6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass das Enzym 11beta-HSD1 in humanen und murinen Skelettmuskelzellen in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades exprimiert wird und als Oxo-Reduktase aktiv ist. Zusätzlich konnte ein Teil des molekularen Regulationsmechanismus der 11beta-HSD1 aufgeklärt werden. Die 11beta-HSD1 Promotoraktivität der unterschiedlichen Promotorregionen wurde hierbei zeit- und differenzierungsspezifisch reguliert. So wurde der Promotor in der frühen Phase der Differenzierung über den proximalen Promotorbereich induziert und im späteren Verlauf der Differenzierung wurde verstärkt der distale Promotorbereich (ab -1505 bp) aktiviert. So kann geschlussfolgert werden, dass der Promotor der 11beta-HSD1 während den verschiedenen Phasen der Differenzierung von unterschiedlichen regulatorischen Transkriptionsfaktoren gesteuert wird. Insbesondere das cAMP-response element binding protein (CREB) stellt in der frühen Phase der Differenzierung einen sehr wahrscheinlichen Regulator der 11beta-HSD1 dar, wobei dies noch in weiteren Studien bestätigt werden muss. Aber auch die Familie der myogenetischen Regulationsfaktoren (MRF) MyoD, Myf5, Myogenin und MRF4 sowie MEF-2c sind höchstwahrscheinlich für den Anstieg der 11beta-HSD1 während des Differenzierungsverlaufs mitverantwortlich. Eine *in-silico*-Analyse des 11beta-HSD1 Promotors ergab Übereinstimmungen für die Bindungsmatrizen der Transkriptionsfaktoren Myogenin und MEF-2c. Anhand der hier gezeigten Daten wird vermutet, dass Myogenin an der Erhöhung der 11beta-HSD1 Expression bis zum Zeitpunkt der Myoblastenfusion beteiligt ist, eine direkte Bindung von Myogenin an den 11beta-HSD1 Promotor konnte aber nicht nachgewiesen werden. Daneben beeinflusste Myogenin die Differenzierung selbst und wirkt so vermutlich indirekt auf die 11beta-HSD1 Expression. Eine Bindungsstelle für MEF-2c konnte hier direkt nachgewiesen werden. Es müssen allerdings weitere Transkriptionsfaktoren an der 11beta-HSD1 Regulation während der späteren Differenzierung beteiligt sein, da die Bindung von MEF-2c eine eher Erhöhung der 11beta-HSD1 in den hier durchgeführten Versuchen nicht erklären konnte.

Durch Stimulationsversuche mit den Glucocorticoiden Cortison und Dexamethason sowie dem 11beta-HSD1 Hemmer Carbenoxolon konnte gezeigt werden, dass die Expression und Enzymaktivität der 11beta-HSD1 in Skelettmuskelzellen akut und chronisch durch Glucocorticoide in einem Feed-Forward-Mechanismus induziert wird und die GRalpha und MRalpha Expressionen gegenregulatorisch zur 11beta-HSD1 exprimiert werden. Hierbei ist aber noch offen, ob die Rezeptoren trotz der verringerten Expression vermehrt in den Kern transloziert sind. Somit stellen die 11beta-HSD1, aber auch die Cortisol-bindenden Rezeptoren GRalpha und MRalpha wichtige Regulatoren der intrazellulären Glucocorticoid-Sensitivität dar, welche sich bei hohen Glucocorticoid-Konzentrationen nennenswert erhöhen kann. Zudem konnte aufgeklärt werden, dass die 11beta-HSD1 eine Schlüsselstellung in der Glucocorticoid-induzierten Regulation der Skelettmuskeldifferenzierung, -proteolyse und Modifizierung der Muskelfasertypen einnimmt. So induzierten Glucocorticoide 11beta-HSD1-abhängig die Expressionen von Skelettmuskeldifferenzierungsmarkern und somit die Differenzierung von Myoblasten zu adulten Myotuben. Parallel dazu erhöhten Glucocorticoide in 11beta-HSD1-abhängiger Weise die

Proteolyserate und die Expressionen der E3-Ubiquitin-Ligasen Atrogin-1 und MuRF-1. Eine Langzeit-Stimulation mit Glucocorticoiden führte ebenfalls 11beta-HSD1-abhängig zu einer Veränderung der Muskelfasertypen in Richtung langsam-zuckender Muskelfasern.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression und Aktivität der 11beta-HSD1 von der Skelettmuskeldifferenzierung abhängt und gleichzeitig die Glucocorticoid-stimulierte Differenzierung selbst reguliert. Es konnte dargestellt werden, dass mehrere und in den verschiedenen Phasen der Differenzierung unterschiedliche Transkriptionsfaktoren wie CREB, Myogenin und MEF-2c für die Regulation der 11beta-HSD1 Promotoraktivität relevant sind. Es zeigte sich ferner eine 11beta-HSD1-Abhängigkeit weiterer Glucocorticoid-induzierter Stoffwechselprozesse, wie der Skelettmuskelproteolyse und der Modifizierung von Muskelfasertypen. Es wird daher angenommen, dass Glucocorticoide einen erhöhten Turnover des Skelettmuskelmetabolismus verursachen, der eine beschleunigte Differenzierung sowie einen erhöhten Abbau von Muskelproteinen und eine vermehrte Skelettmuskelregeneration umfasst. Diese Prozesse sind dabei z.T. abhängig von der 11beta-HSD1, die die intrazelluläre Cortisolkonzentration reguliert.



## Literaturverzeichnis

1. Becker U, Ganter S, Just C, Sauermost R. Muskulatur. Herder - Lexikon der Biologie. 1. Aufl. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag; 1994. S. 70–2.
2. Löffler G, Petrides PE. Kapitel 33: Muskelgewebe. Biochemie und Pathobiochemie. 7. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2003. S. 1032–51.
3. Dr. Könniker C. Muskel. Kompaktlexikon der Biologie [Internet]. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011 [zitiert 15. August 2011]. Verfügbar unter: <http://www.wissenschaft-online.de/abo/lexikon/biok/7861>
4. Schubel B, Linss W. Kapitel 2: Die Strukturelemente - Muskelgewebe. Grundriß der Anatomie. 6. Aufl. Berlin: Verlag Gesundheit GmbH; 1990. S. 28–30.
5. Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. Human skeletal muscle fiber type classifications. Phys Ther. November 2001;81(11):1810–6.
6. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. Microsc. Res. Tech. 15. September 2000;50(6):500–9.
7. Bassel-Duby R, Olson EN. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. Annu. Rev. Biochem. 2006;75:19–37.
8. Mintz B, Baker WW. Normal mammalian muscle differentiation and gene control of isocitrate dehydrogenase synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. August 1967;58(2):592–8.
9. Konigsberg IR. Clonal analysis of myogenesis. Science. 21. Juni 1963;140(3573):1273–84.
10. Gilbert SF. Chapter 11: Myotube Formation: How we learned that skeletal muscle is made by cell fusion. Developmental Biology [Internet]. 9. Aufl. Sinauer Associates; 2010. Verfügbar unter: <http://9e.devbio.com/>
11. Pinney DF, Pearson-White SH, Konieczny SF, Latham KE, Emerson CP Jr. Myogenic lineage determination and differentiation: evidence for a regulatory gene pathway. Cell. 3. Juni 1988;53(5):781–93.
12. Braun T, Buschhausen-Denker G, Bober E, Tannich E, Arnold HH. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. EMBO J. März 1989;8(3):701–9.
13. Wright WE, Sassoon DA, Lin VK. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. Cell. 24. Februar 1989;56(4):607–17.
14. Braun T, Bober E, Winter B, Rosenthal N, Arnold HH. Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. EMBO J. März 1990;9(3):821–31.
15. Mok GF, Sweetman D. Many routes to the same destination: lessons from skeletal muscle development. Reproduction. März 2011;141(3):301–12.
16. Olson EN, Klein WH. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. Genes Dev. Januar 1994;8(1):1–8.
17. Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis. Clin. Genet. Januar 2000;57(1):16–25.

18. Olson EN. MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev.* September 1990;4(9):1454–61.
19. Otto A, Schmidt C, Patel K. Pax3 and Pax7 expression and regulation in the avian embryo. *Anat. Embryol.* August 2006;211(4):293–310.
20. Yusuf F, Brand-Saberi B. The eventful somite: patterning, fate determination and cell division in the somite. *Anat. Embryol.* Dezember 2006;211 Suppl 1:21–30.
21. Yokoyama S, Asahara H. The myogenic transcriptional network. *Cell. Mol. Life Sci.* Juni 2011;68(11):1843–9.
22. Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell.* 30. Oktober 1992;71(3):383–90.
23. Braun T, Rudnicki MA, Arnold HH, Jaenisch R. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell.* 30. Oktober 1992;71(3):369–82.
24. Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell.* 31. Dezember 1993;75(7):1351–9.
25. Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I, u. a. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature.* 5. August 1993;364(6437):532–5.
26. Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, u. a. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature.* 5. August 1993;364(6437):501–6.
27. Venuti JM, Morris JH, Vivian JL, Olson EN, Klein WH. Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J. Cell Biol.* Februar 1995;128(4):563–76.
28. Patapoutian A, Yoon JK, Miner JH, Wang S, Stark K, Wold B. Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. *Development.* Oktober 1995;121(10):3347–58.
29. Zhang W, Behringer RR, Olson EN. Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev.* 1. Juni 1995;9(11):1388–99.
30. Braun T, Arnold HH. Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *EMBO J.* 15. März 1995;14(6):1176–86.
31. Olson EN, Arnold HH, Rigby PW, Wold BJ. Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell.* 5. April 1996;85(1):1–4.
32. Kassam-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomès D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, u. a. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:MyoD double-mutant mice. *Nature.* 23. September 2004;431(7007):466–71.
33. Zhu Z, Miller JB. MRF4 can substitute for myogenin during early stages of myogenesis. *Dev. Dyn.* Juni 1997;209(2):233–41.
34. Rawls A, Valdez MR, Zhang W, Richardson J, Klein WH, Olson EN. Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice. *Development.* Juli 1998;125(13):2349–58.

35. Francetic T, Li Q. Skeletal myogenesis and Myf5 activation. *Transcription*. 2011;2(3):109–14.
36. Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development*. August 1993;118(4):1137–47.
37. Voytik SL, Przyborski M, Badylak SF, Konieczny SF. Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles. *Dev. Dyn*. November 1993;198(3):214–24.
38. Gundersen K, Rabben I, Klocke BJ, Merlie JP. Overexpression of myogenin in muscles of transgenic mice: interaction with Id-1, negative crossregulation of myogenic factors, and induction of extrasynaptic acetylcholine receptor expression. *Mol. Cell. Biol*. Dezember 1995;15(12):7127–34.
39. Hughes SM, Chi MM, Lowry OH, Gundersen K. Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice. *J. Cell Biol*. 3. Mai 1999;145(3):633–42.
40. Hughes SM, Koishi K, Rudnicki M, Maggs AM. MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. *Mech. Dev*. Januar 1997;61(1-2):151–63.
41. Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 1998;14:167–96.
42. Puri PL, Sartorelli V. Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. *J. Cell. Physiol*. November 2000;185(2):155–73.
43. Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science*. 30. Mai 1997;276(5317):1404–7.
44. Potthoff MJ, Olson EN. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development*. Dezember 2007;134(23):4131–40.
45. Molkenkin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell*. 29. Dezember 1995;83(7):1125–36.
46. Edmondson DG, Cheng TC, Cserjesi P, Chakraborty T, Olson EN. Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle-specific enhancer factor MEF-2. *Mol. Cell. Biol*. September 1992;12(9):3665–77.
47. Molkenkin JD, Olson EN. Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 3. September 1996;93(18):9366–73.
48. Wang DZ, Valdez MR, McAnally J, Richardson J, Olson EN. The Mef2c gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development. *Development*. November 2001;128(22):4623–33.
49. Black BL, Martin JF, Olson EN. The mouse MRF4 promoter is trans-activated directly and indirectly by muscle-specific transcription factors. *J. Biol. Chem*. 17. Februar 1995;270(7):2889–92.

50. Naidu PS, Ludolph DC, To RQ, Hinterberger TJ, Konieczny SF. Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* Mai 1995;15(5):2707–18.
51. Cheng TC, Hanley TA, Mudd J, Merlie JP, Olson EN. Mapping of myogenin transcription during embryogenesis using transgenes linked to the myogenin control region. *J. Cell Biol.* Dezember 1992;119(6):1649–56.
52. Yee SP, Rigby PW. The regulation of myogenin gene expression during the embryonic development of the mouse. *Genes Dev.* Juli 1993;7(7A):1277–89.
53. Dodou E, Xu S-M, Black BL. mef2c is activated directly by myogenic basic helix-loop-helix proteins during skeletal muscle development in vivo. *Mech. Dev.* September 2003;120(9):1021–32.
54. Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 22. Dezember 1977;270(5639):725–7.
55. Dedieu S, Mazères G, Cottin P, Brustis J-J. Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12. *Int. J. Dev. Biol.* März 2002;46(2):235–41.
56. Ferri P, Barbieri E, Burattini S, Guescini M, D'Emilio A, Biagiotti L, u. a. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. *J. Cell Biochem.* [Internet]. 14. Oktober 2009;(1097-4644 (Electronic)). Verfügbar unter: PM:19830700
57. Shimokawa T, Kato M, Ezaki O, Hashimoto S. Transcriptional regulation of muscle-specific genes during myoblast differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 8. Mai 1998;246(1):287–92.
58. Yoshida N, Yoshida S, Koishi K, Masuda K, Nabeshima Y. Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates „reserve cells“. *J. Cell. Sci.* März 1998;111 ( Pt 6):769–79.
59. Lindon C, Montarras D, Pinset C. Cell cycle-regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts. *J. Cell Biol.* 12. Januar 1998;140(1):111–8.
60. Jagoe RT, Goldberg AL. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* Mai 2001;4(3):183–90.
61. Löffler G, Petrides PE. Kapitel 9: Biosynthese von Proteinen. *Biochemie und Pathobiochemie.* 7. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2003. S. 268–300.
62. Dantuma NP, Lindsten K. Stressing the ubiquitin-proteasome system. *Cardiovasc. Res.* 15. Januar 2010;85(2):263–71.
63. Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Am. Soc. Nephrol.* Juli 2006;17(7):1807–19.
64. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, u. a. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 23. November 2001;294(5547):1704–8.
65. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, u. a. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* Januar 2004;18(1):39–51.

66. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 4. Dezember 2001;98(25):14440–5.
67. Asp ML, Tian M, Wendel AA, Belury MA. Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. *Int. J. Cancer.* 1. Februar 2010;126(3):756–63.
68. Bonetto A, Penna F, Minero VG, Reffo P, Bonelli G, Baccino FM, u. a. Deacetylase inhibitors modulate the myostatin/follistatin axis without improving cachexia in tumor-bearing mice. *Curr Cancer Drug Targets.* August 2009;9(5):608–16.
69. Costelli P, Muscaritoli M, Bossola M, Penna F, Reffo P, Bonetto A, u. a. IGF-1 is downregulated in experimental cancer cachexia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* September 2006;291(3):R674–683.
70. Penna F, Costamagna D, Fanzani A, Bonelli G, Baccino FM, Costelli P. Muscle wasting and impaired myogenesis in tumor bearing mice are prevented by ERK inhibition. *PLoS ONE.* 2010;5(10):e13604.
71. Siddiqui RA, Hassan S, Harvey KA, Rasool T, Das T, Mukerji P, u. a. Attenuation of proteolysis and muscle wasting by curcumin c3 complex in MAC16 colon tumour-bearing mice. *Br. J. Nutr.* Oktober 2009;102(7):967–75.
72. Granado M, Martín AI, Priego T, López-Calderón A, Villanúa MA. Tumour necrosis factor blockade did not prevent the increase of muscular muscle RING finger-1 and muscle atrophy F-box in arthritic rats. *J. Endocrinol.* Oktober 2006;191(1):319–26.
73. Granado M, Martín AI, Villanúa MA, López-Calderón A. Experimental arthritis inhibits the insulin-like growth factor-I axis and induces muscle wasting through cyclooxygenase-2 activation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* Juni 2007;292(6):E1656–1665.
74. Granado M, Priego T, Martín AI, Villanúa MA, López-Calderón A. Ghrelin receptor agonist GHRP-2 prevents arthritis-induced increase in E3 ubiquitin-ligating enzymes MuRF1 and MAFbx gene expression in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* Dezember 2005;289(6):E1007–1014.
75. Frost RA, Nystrom GJ, Jefferson LS, Lang CH. Hormone, cytokine, and nutritional regulation of sepsis-induced increases in atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* Februar 2007;292(2):E501–512.
76. Wray CJ, Mammen JMV, Hershko DD, Hasselgren P-O. Sepsis upregulates the gene expression of multiple ubiquitin ligases in skeletal muscle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* Mai 2003;35(5):698–705.
77. Otis JS, Ashikhmin YI, Brown LAS, Guidot DM. Effect of HIV-1-related protein expression on cardiac and skeletal muscles from transgenic rats. *AIDS Res Ther.* 2008;5:8.
78. Pruznak AM, Hong-Brown L, Lantry R, She P, Frost RA, Vary TC, u. a. Skeletal and cardiac myopathy in HIV-1 transgenic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* Oktober 2008;295(4):E964–973.
79. Wang H, Kubica N, Ellisen LW, Jefferson LS, Kimball SR. Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. *J.Biol.Chem.* 22. Dezember 2006;281(51):39128–34.
80. Dehoux M, Van Beneden R, Pasko N, Lause P, Verniers J, Underwood L, u. a. Role of the insulin-like growth factor I decline in the induction of atrogin-1/MAFbx during fasting and diabetes. *Endocrinology.* November 2004;145(11):4806–12.

81. Chen Y, Cao L, Ye J, Zhu D. Upregulation of myostatin gene expression in streptozotocin-induced type 1 diabetes mice is attenuated by insulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9. Oktober 2009;388(1):112–6.
82. Hirner S, Krohne C, Schuster A, Hoffmann S, Witt S, Erber R, u. a. MuRF1-dependent regulation of systemic carbohydrate metabolism as revealed from transgenic mouse studies. *J. Mol. Biol.* 13. Juni 2008;379(4):666–77.
83. Gustafsson T, Osterlund T, Flanagan JN, von Waldén F, Trappe TA, Linnehan RM, u. a. Effects of 3 days unloading on molecular regulators of muscle size in humans. *J. Appl. Physiol.* September 2010;109(3):721–7.
84. Levine S, Biswas C, Dierov J, Barsotti R, Shrager JB, Nguyen T, u. a. Increased proteolysis, myosin depletion, and atrophic AKT-FOXO signaling in human diaphragm disuse. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 15. Februar 2011;183(4):483–90.
85. Léger B, Vergani L, Sorarù G, Hespel P, Derave W, Gobelet C, u. a. Human skeletal muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis reveals a reduction in Akt and an increase in atrogin-1. *FASEB J.* März 2006;20(3):583–5.
86. Löffler G, Petrides PE. Kapitel 30: Hypothalamisch-hypophysäre Beziehungen. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2003. S. 867–908.
87. Rehner G, Daniel H. Teil I: Grundlagen der Stoffwechselregulation auf zellulärer Ebene. *Biochemie der Ernährung*. 2. Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2002. S. 1–172.
88. Meulenber PM, Hofman JA. Differences between concentrations of salivary cortisol and cortisone and of free cortisol and cortisone in plasma during pregnancy and postpartum. *Clin. Chem.* Januar 1990;36(1):70–5.
89. Amelung D, Hubener HJ, Roka L, Meyerheim G. Conversion of cortisone to compound F. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* September 1953;13(9):1125–6.
90. Draper N, Walker EA, Bujalska IJ, Tomlinson JW, Chalder SM, Arlt W, u. a. Mutations in the genes encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. *Nat. Genet.* August 2003;34(4):434–9.
91. Beato M, Chalepakis G, Schauer M, Slater EP. DNA regulatory elements for steroid hormones. *J. Steroid Biochem.* Mai 1989;32(5):737–47.
92. Imai E, Miner JN, Mitchell JA, Yamamoto KR, Granner DK. Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 15. März 1993;268(8):5353–6.
93. Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, u. a. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*. 17. Juli 1987;237(4812):268–75.
94. Tomlinson JW, Stewart PM. Modulation of glucocorticoid action and the treatment of type-2 diabetes. *Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab.* Dezember 2007;21(4):607–19.
95. Draper N, Stewart PM. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J. Endocrinol.* August 2005;186(2):251–71.
96. Walker BR. Cortisol--cause and cure for metabolic syndrome? *Diabet. Med.* Dezember 2006;23(12):1281–8.

97. World Health Organization. Obesity and overweight. Fact Sheet N°311 [Internet]. Geneva; 2012 Mai. Verfügbar unter: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>
98. Sharma ST, Nieman LK. Cushing's syndrome: all variants, detection, and treatment. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* Juni 2011;40(2):379–391, viii–ix.
99. Pschyrembel W. *Klinisches Wörterbuch*. 259. Aufl. Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG; 2002.
100. Mariniello B, Ronconi V, Rilli S, Bernante P, Boscaro M, Mantero F, u. a. Adipose tissue 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in obesity and Cushing's syndrome. *Eur.J.Endocrinol.* 2006;155(3):435–41.
101. Rask E, Walker BR, Soderberg S, Livingstone DE, Eliasson M, Johnson O, u. a. Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* Juli 2002;87(7):3330–6.
102. Fraser R, Ingram MC, Anderson NH, Morrison C, Davies E, Connell JM. Cortisol effects on body mass, blood pressure, and cholesterol in the general population. *Hypertension.* Juni 1999;33(6):1364–8.
103. Lindsay RS, Wake DJ, Nair S, Bunt J, Livingstone DE, Permana PA, u. a. Subcutaneous adipose 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity and messenger ribonucleic acid levels are associated with adiposity and insulinemia in Pima Indians and Caucasians. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* Juni 2003;88(6):2738–44.
104. Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Heintze U, Janke J, u. a. Regulation of 11beta-HSD genes in human adipose tissue: influence of central obesity and weight loss. *Obes.Res.* Januar 2004;12(1):9–17.
105. Rask E, Olsson T, Soderberg S, Andrew R, Livingstone DE, Johnson O, u. a. Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* März 2001;86(3):1418–21.
106. Koska J, de Court, Wake DJ, Nair S, Walker BR, Bunt JC, u. a. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue and prospective changes in body weight and insulin resistance. *Obesity.(Silver.Spring).* 2006;14(9):1515–22.
107. Katz JR, Mohamed-Ali V, Wood PJ, Yudkin JS, Coppack SW. An in vivo study of the cortisol-cortisone shuttle in subcutaneous abdominal adipose tissue. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* Januar 1999;50(1):63–8.
108. Livingstone DE, Jones GC, Smith K, Jamieson PM, Andrew R, Kenyon CJ, u. a. Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. *Endocrinology.* Februar 2000;141(2):560–3.
109. Desbriere R, Vuaroqueaux V, Achard V, Boullu-Ciocca S, Labuhn M, Dutour A, u. a. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA is increased in both visceral and subcutaneous adipose tissue of obese patients. *Obesity (Silver Spring).* Mai 2006;14(5):794–8.
110. Veilleux A, Rheaume C, Daris M, Luu-The V, Tchernof A. Omental adipose tissue 11{beta}-HSD1 oxoreductase activity, body fat distribution and metabolic alterations in women. *J.Clin.Endocrinol.Metab* [Internet]. 30. Juni 2009;(1945-7197 (Electronic)). Verfügbar unter: PM:19567539

111. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, u. a. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*. 7. Dezember 2001;294(5549):2166–70.
112. Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, u. a. Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 4. Mai 2004;101(18):7088–93.
113. Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmolli D, Jamieson P, u. a. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 23. Dezember 1997;94(26):14924–9.
114. Harris HJ, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR, Holmes MC. Intracellular regeneration of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-HSD)-1 plays a key role in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: analysis of 11beta-HSD-1-deficient mice. *Endocrinology*. Januar 2001;142(1):114–20.
115. Morton NM, Holmes MC, Fiévet C, Staels B, Tailleux A, Mullins JJ, u. a. Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. *J. Biol. Chem.* 2. November 2001;276(44):41293–300.
116. Morton NM, Paterson JM, Masuzaki H, Holmes MC, Staels B, Fievet C, u. a. Novel adipose tissue-mediated resistance to diet-induced visceral obesity in 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice. *Diabetes*. April 2004;53(4):931–8.
117. Feng Y, Huang SL, Dou W, Zhang S, Chen JH, Shen Y, u. a. Emodin, a natural product, selectively inhibits 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and ameliorates metabolic disorder in diet-induced obese mice. *Br. J. Pharmacol.* 2010;161(1):113–26.
118. Sundbom M, Kaiser C, Björkstrand E, Castro VM, Larsson C, Selén G, u. a. Inhibition of 11betaHSD1 with the S-phenylethylaminothiazolone BVT116429 increases adiponectin concentrations and improves glucose homeostasis in diabetic KKAy mice. *BMC Pharmacol.* 2008;8:3.
119. Lloyd DJ, Helmering J, Cordover D, Bowsman M, Chen M, Hale C, u. a. Antidiabetic effects of 11beta-HSD1 inhibition in a mouse model of combined diabetes, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Diabetes Obes. Metab.* Juli 2009;11(7):688–99.
120. Berthiaume M, Laplante M, Festuccia WT, Berger JP, Thieringer R, Deshaies Y. Preliminary report: pharmacologic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition increases hepatic fat oxidation in vivo and expression of related genes in rats fed an obesogenic diet. *Metabolism [Internet]*. 2009;(1532-8600 (Electronic)). Verfügbar unter: PM:19766266
121. Wan ZK, Chenail E, Xiang J, Li HQ, Ipek M, Bard J, u. a. Efficacious 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I inhibitors in the diet-induced obesity mouse model. *J. Med. Chem.* 2009;52(17):5449–61.
122. Alberts P, Engblom L, Edling N, Forsgren M, Klingstrom G, Larsson C, u. a. Selective inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 decreases blood glucose concentrations in hyperglycaemic mice. *Diabetologia*. November 2002;45(11):1528–32.
123. Bhat BG, Younis H, Herrera J, Palacio K, Pascual B, Hur G, u. a. Antisense inhibition of 11betahydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves diabetes in a novel cortisone-induced diabetic KK mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25. Januar 2008;365(4):740–5.
124. Walker BR, Connacher AA, Lindsay RM, Webb DJ, Edwards CR. Carbenoxolone increases hepatic insulin sensitivity in man: a novel role for 11-oxosteroid reductase in enhancing



- glucocorticoid receptor activation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* November 1995;80(11):3155–9.
125. Andrews RC, Rooyackers O, Walker BR. Effects of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone on insulin sensitivity in men with type 2 diabetes. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* Januar 2003;88(1):285–91.
  126. Sandeep TC, Andrew R, Homer NZM, Andrews RC, Smith K, Walker BR. Increased in vivo regeneration of cortisol in adipose tissue in human obesity and effects of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor carbenoxolone. *Diabetes.* März 2005;54(3):872–9.
  127. Jang C, Obeyesekere VR, Dilley RJ, Alford FP, Inder WJ. 11Beta hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is expressed and is biologically active in human skeletal muscle. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* Dezember 2006;65(6):800–5.
  128. Whorwood CB, Donovan SJ, Flanagan D, Phillips DIW, Byrne CD. Increased glucocorticoid receptor expression in human skeletal muscle cells may contribute to the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Diabetes.* April 2002;51(4):1066–75.
  129. Itoh E, Iida K, Kim DS, del Rincon JP, Coschigano KT, Kopchick JJ, u. a. Lack of contribution of 11betaHSD1 and glucocorticoid action to reduced muscle mass associated with reduced growth hormone action. *Growth Horm.IGF.Res.* Dezember 2004;14(6):462–6.
  130. Abdallah BM, Beck-Nielsen H, Gaster M. Increased expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in type 2 diabetic myotubes. *Eur.J.Clin.Invest.* Oktober 2005;35(10):627–34.
  131. Zhang M, Lv XY, Li J, Xu ZG, Chen L. Alteration of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in skeletal muscle in a rat model of type 2 diabetes. *Mol.Cell Biochem.* April 2009;324(1-2):147–55.
  132. Inder WJ, Obeyesekere VR, Alford FP, Jang C. Skeletal Muscle 11betaHSD1 Activity of Nondiabetic Subjects is Unaltered in Central Obesity-associated Insulin Resistance. *Horm.Metab Res.* [Internet]. 19. Januar 2011;(0018-5043 (Linking)). Verfügbar unter: PM:21249616
  133. Jang C, Obeyesekere VR, Dilley RJ, Krozowski Z, Inder WJ, Alford FP. Altered activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in skeletal muscle confers metabolic protection in subjects with type 2 diabetes. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 2007;92(8):3314–20.
  134. Salehzadeh F, Al-Khalili L, Kulkarni SS, Wang M, Lonnqvist F, Krook A. Glucocorticoid-mediated effects on metabolism are reversed by targeting 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human skeletal muscle. *Diabetes Metab Res.Rev.* März 2009;25(3):250–8.
  135. Yang Z, Guo C, Zhu P, Li W, Myatt L, Sun K. Role of glucocorticoid receptor and CCAAT/enhancer-binding protein alpha in the feed-forward induction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by cortisol in human amnion fibroblasts. *J.Endocrinol.* November 2007;195(2):241–53.
  136. Morgan SA, Sherlock M, Gathercole LL, Lavery GG, Lenaghan C, Bujalska IJ, u. a. 11{beta}-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 regulates glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes* [Internet]. 2009;(1939-327X (Electronic)). Verfügbar unter: PM:19675138
  137. Belanto JJ, Diaz-Perez SV, Magyar CE, Maxwell MM, Yilmaz Y, Topp K, u. a. Dexamethasone induces dysferlin in myoblasts and enhances their myogenic differentiation. *Neuromuscul.Disord.* Februar 2010;20(2):111–21.

138. Te Pas MF, de Jong PR, Verburg FJ. Glucocorticoid inhibition of C2C12 proliferation rate and differentiation capacity in relation to mRNA levels of the MRF gene family. *Mol.Biol.Rep.* Juni 2000;27(2):87–98.
139. Montano MM, Lim RW. Glucocorticoid effects on the skeletal muscle differentiation program: analysis of clonal proliferation, morphological differentiation and the expression of muscle-specific and regulatory genes. *Endocr. Res.* Mai 1997;23(1-2):37–57.
140. Tsai CC, Saffitz JE, Billadello JJ. Expression of the Gs protein alpha-subunit disrupts the normal program of differentiation in cultured murine myogenic cells. *J. Clin. Invest.* 1. Januar 1997;99(1):67–76.
141. Auradé F, Pfarr CM, Lindon C, Garcia A, Primig M, Montarras D, u. a. The glucocorticoid receptor and AP-1 are involved in a positive regulation of the muscle regulatory gene myf5 in cultured myoblasts. *J. Cell. Sci.* November 1997;110 ( Pt 22):2771–9.
142. Aubry EM, Odermatt A. Retinoic acid reduces glucocorticoid sensitivity in C2C12 myotubes by decreasing 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and glucocorticoid receptor activities. *Endocrinology.* Juni 2009;150(6):2700–8.
143. Cho YS, Kim CH, Cheon HG. Cell-based assay for screening 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 inhibitors. *Anal.Biochem.* [Internet]. 2. Juni 2009;(1096-0309 (Electronic)). Verfügbar unter: PM:19497289
144. Lofberg E, Gutierrez A, Wernerman J, Anderstam B, Mitch WE, Price SR, u. a. Effects of high doses of glucocorticoids on free amino acids, ribosomes and protein turnover in human muscle. *Eur.J.Clin.Invest.* Mai 2002;32(5):345–53.
145. 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. *Biochem.J.* 15. Januar 1979;178(1):139–46.
146. Menconi M, Gonnella P, Petkova V, Lecker S, Hasselgren PO. Dexamethasone and corticosterone induce similar, but not identical, muscle wasting responses in cultured L6 and C2C12 myotubes. *J.Cell Biochem.* 1. Oktober 2008;105(2):353–64.
147. 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. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* Februar 2006;290(2):C650–C659.
148. 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. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* Oktober 2004;287(4):E591–E601.
149. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, u. a. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol.Cell.* 7. Mai 2004;14(3):395–403.
150. Andres J, Mai K, Mohlig M, Weickert MO, Bumke-Vogt C, Diederich S, u. a. Cell-type specific regulation of the human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promoter. *Arch.Physiol Biochem.* Juni 2007;113(3):110–5.
151. MatInspector [Internet]. Verfügbar unter: <http://www.genomatix.de>
152. Jaspar Database [Internet]. Verfügbar unter: <http://jaspar.cgb.ki.se>
153. Alggen Promo [Internet]. Verfügbar unter: <http://alggen.lsi.upc.es/>

154. Whorwood CB, Donovan SJ, Wood PJ, Phillips DI. Regulation of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms and type I 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human skeletal muscle cells: a key role in the pathogenesis of insulin resistance? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Mai 2001;86(5):2296–308.
155. Gögebakan Ö, Andres J, Biedasek K, Mai K, Kühnen P, Krude H, u. a. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide reduces fat-specific expression and activity of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and inhibits release of free fatty acids. *Diabetes.* Februar 2012;61(2):292–300.
156. Mukai A, Hashimoto N. Localized cyclic AMP-dependent protein kinase activity is required for myogenic cell fusion. *Exp. Cell Res.* 15. Januar 2008;314(2):387–97.
157. Berdeaux R, Goebel N, Banaszynski L, Takemori H, Wandless T, Shelton GD, u. a. SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. *Nat. Med.* Mai 2007;13(5):597–603.
158. Stewart R, Flechner L, Montminy M, Berdeaux R. CREB is activated by muscle injury and promotes muscle regeneration. *PLoS ONE.* 2011;6(9):e24714.
159. Chen AE, Ginty DD, Fan C-M. Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature.* 20. Januar 2005;433(7023):317–22.
160. Filipović D, Pirkmajer S, Mis K, Mars T, Grubic Z. Expression of glucocorticoid receptors in the regenerating human skeletal muscle. *Physiol Res.* 2011;60 Suppl 1:S147–154.
161. Sun L, Trausch-Azar JS, Muglia LJ, Schwartz AL. Glucocorticoids differentially regulate degradation of MyoD and Id1 by N-terminal ubiquitination to promote muscle protein catabolism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 4. März 2008;105(9):3339–44.
162. Rawls A, Morris JH, Rudnicki M, Braun T, Arnold HH, Klein WH, u. a. Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf-5 during mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* November 1995;172(1):37–50.
163. Hirayama E, Isobe A, Okamoto H, Nishioka M, Kim J. Myogenin expression is necessary for commitment to differentiation and is closely related to src tyrosine kinase activity in quail myoblasts transformed with Rous sarcoma virus. *Eur. J. Cell Biol.* Februar 1997;72(2):133–41.
164. Löffler G, Petrides PE. Kapitel 5: Nucleoside und Nucleotide. *Biochemie und Pathobiochemie.* 7. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2003. S. 142–68.
165. Smith CL, Hager GL. Transcriptional regulation of mammalian genes in vivo. A tale of two templates. *J. Biol. Chem.* 31. Oktober 1997;272(44):27493–6.
166. Hammami MM, Siiteri PK. Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human skin fibroblasts: enzymatic modulation of glucocorticoid action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* August 1991;73(2):326–34.
167. Sun K, Myatt L. Enhancement of glucocorticoid-induced 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by proinflammatory cytokines in cultured human amnion fibroblasts. *Endocrinology.* Dezember 2003;144(12):5568–77.
168. Rajan V, Edwards CR, Seckl JR. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in cultured hippocampal cells reactivates inert 11-dehydrocorticosterone, potentiating neurotoxicity. *J. Neurosci.* Januar 1996;16(1):65–70.

169. Michas G, Liberman M, Becker KC, Handy DE, Loscalzo J, Leopold JA. Reciprocal regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and glucocorticoid receptor expression by dexamethasone inhibits human coronary artery smooth muscle cell proliferation in vitro. *Mol.Cell Biochem.* Januar 2011;346(1-2):69–79.
170. Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM. Does central obesity reflect „Cushing’s disease of the omentum“? *Lancet.* 26. April 1997;349(9060):1210–3.
171. Li B, Bai X, Wanh H. Effect of dexamethasone on expression of glucocorticoid receptor in human monocyte cell line THP-1. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 2006;26(1):25–7.
172. Walker BR, Andrew R. Tissue production of cortisol by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and metabolic disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* November 2006;1083:165–84.
173. Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM. Effects of glucocorticoids on gene transcription. *Eur. J. Pharmacol.* 1. Oktober 2004;500(1-3):51–62.
174. Smoak KA, Cidlowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech. Ageing Dev.* November 2004;125(10-11):697–706.
175. Stewart PM, Wallace AM, Atherden SM, Shearing CH, Edwards CR. Mineralocorticoid activity of carbenoxolone: contrasting effects of carbenoxolone and liquorice on 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in man. *Clin. Sci.* Januar 1990;78(1):49–54.
176. Monder C, Stewart PM, Lakshmi V, Valentino R, Burt D, Edwards CR. Licorice inhibits corticosteroid 11 beta-dehydrogenase of rat kidney and liver: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology.* August 1989;125(2):1046–53.
177. Yau JLW, Noble J, Seckl JR. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 deficiency prevents memory deficits with aging by switching from glucocorticoid receptor to mineralocorticoid receptor-mediated cognitive control. *J. Neurosci.* 16. März 2011;31(11):4188–93.
178. Hasselgren PO, Alamdari N, Aversa Z, Gonnella P, Smith IJ, Tizio S. Corticosteroids and muscle wasting: role of transcription factors, nuclear cofactors, and hyperacetylation. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care.* Juli 2010;13(4):423–8.
179. Nishimura M, Mikura M, Hirasaka K, Okumura Y, Nikawa T, Kawano Y, u. a. Effects of dimethyl sulphoxide and dexamethasone on mRNA expression of myogenesis- and muscle proteolytic system-related genes in mouse myoblastic C2C12 cells. *J.Biochem.* Dezember 2008;144(6):717–24.
180. Mastroiannopoulos NP, Nicolaou P, Anayasa M, Uney JB, Phylactou LA. Down-regulation of myogenin can reverse terminal muscle cell differentiation. *PLoS ONE.* 2012;7(1):e29896.
181. Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1. *Cell.* 22. Dezember 2000;103(7):1099–109.
182. McGann CJ, Odelberg SJ, Keating MT. Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 20. November 2001;98(24):13699–704.
183. Pellegrino MA, D’Antona G, Bortolotto S, Boschi F, Pastoris O, Bottinelli R, u. a. Clenbuterol antagonizes glucocorticoid-induced atrophy and fibre type transformation in mice. *Exp. Physiol.* Januar 2004;89(1):89–100.

184. Polla B, Bottinelli R, Sandoli D, Sardi C, Reggiani C. Cortisone-induced changes in myosin heavy chain distribution in respiratory and hindlimb muscles. *Acta Physiol. Scand.* Juli 1994;151(3):353–61.
185. Dekhuijzen PN, Gayan-Ramirez G, Bisschop A, De Bock V, Dom R, Decramer M. Corticosteroid treatment and nutritional deprivation cause a different pattern of atrophy in rat diaphragm. *J. Appl. Physiol.* Februar 1995;78(2):629–37.
186. 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. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* Juli 2003;285(1):R34–43.
187. Kawano F, Tanihata J, Sato S, Nomura S, Shiraishi A, Tachiyashiki K, u. a. Effects of dexamethasone on the expression of beta(1)-, beta (2)- and beta (3)-adrenoceptor mRNAs in skeletal and left ventricle muscles in rats. *J Physiol Sci.* September 2009;59(5):383–90.
188. Livingstone I, Johnson MA, Mastaglia FL. Effects of dexamethasone on fibre subtypes in rat muscle. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* Oktober 1981;7(5):381–98.
189. Schakman O, Gilson H, Thissen JP. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J. Endocrinol.* April 2008;197(1):1–10.
190. Prezant DJ, Karwa ML, Richner B, Maggiore D, Gentry EI, Chung V, u. a. Short-term vs long-term dexamethasone treatment: effects on rat diaphragm structure and function. *Lung.* 1998;176(4):267–80.
191. Kelly FJ, McGrath JA, Goldspink DF, Cullen MJ. A morphological/biochemical study on the actions of corticosteroids on rat skeletal muscle. *Muscle Nerve.* Januar 1986;9(1):1–10.
192. Sato S, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Synthesized glucocorticoid, dexamethasone regulates the expressions of  $\beta_2$ -adrenoceptor and glucocorticoid receptor mRNAs but not proteins in slow-twitch soleus muscle of rats. *J Toxicol Sci.* August 2011;36(4):479–86.
193. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Nutr.* Januar 1999;129(1S Suppl):227S–237S.
194. Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N. Engl. J. Med.* 19. Dezember 1996;335(25):1897–905.
195. Moresi V, Williams AH, Meadows E, Flynn JM, Potthoff MJ, McAnally J, u. a. Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell.* 1. Oktober 2010;143(1):35–45.
196. Merlie JP, Mudd J, Cheng TC, Olson EN. Myogenin and acetylcholine receptor alpha gene promoters mediate transcriptional regulation in response to motor innervation. *J. Biol. Chem.* 28. Januar 1994;269(4):2461–7.
197. Tang H, Macpherson P, Marvin M, Meadows E, Klein WH, Yang X-J, u. a. A histone deacetylase 4/myogenin positive feedback loop coordinates denervation-dependent gene induction and suppression. *Mol. Biol. Cell.* Februar 2009;20(4):1120–31.
198. Bak JF, Møller N, Schmitz O, Saaek A, Pedersen O. In vivo insulin action and muscle glycogen synthase activity in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: effects of diet treatment. *Diabetologia.* August 1992;35(8):777–84.
199. Leney SE, Tavaré JM. The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling, trafficking and potential drug targets. *J. Endocrinol.* Oktober 2009;203(1):1–18.

200. Watson RT, Pessin JE. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog. Horm. Res.* 2001;56:175–93.
201. Ewart HS, Somwar R, Klip A. Dexamethasone stimulates the expression of GLUT1 and GLUT4 proteins via different signalling pathways in L6 skeletal muscle cells. *FEBS Lett.* 20. März 1998;425(1):179–83.
202. Sakoda H, Ogihara T, Anai M, Funaki M, Inukai K, Katagiri H, u. a. Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes.* Oktober 2000;49(10):1700–8.
203. Weinstein SP, Wilson CM, Pritsker A, Cushman SW. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. *Metab. Clin. Exp.* Januar 1998;47(1):3–6.

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion aktiv und passiv unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Joachim Spranger für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und Ermöglichung diese in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Des Weiteren danke ich ihm für seine Unterstützung und Betreuung. Seine Anregungen, Ideen und kritischen Kommentare haben zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Janin Andres für ihre engagierte Betreuung während meiner gesamten Promotionszeit. Sie war für mich ein täglicher Ansprechpartner und hat mir mit Rat und Tat bei inhaltlichen sowie methodischen Fragen zur Seite gestanden. Die Zusammenarbeit hat mir immer sehr viel Spaß bereitet. Ich hätte mir keine bessere Betreuerin wünschen können.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Prof. Dr. Gudrun Brockmann für die Bereitschaft, diese Arbeit offiziell zu betreuen.

Des Weiteren danke ich der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Spranger für die schöne Zusammenarbeit und die vielen netten Stunden, die wir zusammen im Labor verbracht haben.

Herrn Prof. Dr. Josef Köhrle und dem DFG-Graduiertenkolleg 1208 möchte ich danken, welches diese Arbeit finanziell ermöglichte und mir über meine Arbeit hinaus ein endokrinologisches Grundwissen vermittelte.

Herrn Dr. Jens Fielitz möchte ich für die Bereitstellung der C2C12 Zelllinie danken, sowie für die von seiner Arbeitsgruppe teilweise durchgeführten Proteolyse-Messungen sowie Frau Prof. Dr. Simone Spuler für die stetige Versorgung mit primären humanen Myoblasten. Der Arbeitsgruppe Klinische Ernährung des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung danke ich außerdem für die Möglichkeit ein Teil meiner Messungen an ihren Geräten durchführen zu dürfen. Darüber hinaus bedanke ich mich auch bei unserer Nachbararbeitsgruppe (Nephrologie) für die Nutzung ihres Fluoreszenzmikroskops.

Ein großer Dank von ganzem Herzen gilt meiner Familie für die unentwegte, gleichermaßen moralische und finanzielle Unterstützung sowohl während meines Studiums, als auch während meiner Promotionszeit, ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit sicherlich nie zustande gekommen.

Nicht zuletzt danke ich meinem Lebensgefährten Björn, der mich oft genug erfolgreich wieder aufgebaut hat und mit mir zusammen die doch sehr aufregende Zeit der Promotion in seinen Höhen und Tiefen durchlebt hat.