

Aus dem Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin
Abteilung für Molekulare und Zelluläre Sportmedizin
Deutsche Sporthochschule Köln
Leiter: Prof. Dr. W. Bloch

Molekulare Mechanismen der Skelettmuskeladaptation

von der Deutschen Sporthochschule Köln
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Sportwissenschaften
genehmigte Dissertation
vorgelegt von

Angelika Friedel

Köln 2006

Erster Referent:
Zweiter Referent:
Vorsitzende des Promotionsausschusses:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. H.-J. Appell
Priv. Doz. Dr. P. Diel
Univ.-Prof Dr. I. Hartmann-
Tews
31.10.2006

Eidesstattliche Versicherung:

Hierdurch versichere ich an Eides Statt: Ich habe diese Dissertationsarbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen angefertigt; sie hat noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegen. Wörtlich übernommene Textstellen, auch Einzelsätze oder Teile davon, sind als Zitate kenntlich gemacht worden.

Angelika Friedel

*Für meine Mutter,
meine Familie und
meine Freunde*

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde in den Jahren 2003 (Institut für Morphologie und Tumorforschung) bis 2006 (Umbenennung in Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin) in der Abteilung der molekularen und zellulären Sportmedizin an der Deutschen Sporthochschule Köln angefertigt.

Ohne die Hilfe und Unterstützung vieler, netter Menschen wäre diese Arbeit bestimmt nicht das geworden, was sie nun ist.

Ich möchte mich ganz herzlich bedanken:

Als erstes bei dem Betreuer meiner Arbeit Herrn Dr. Patrick Diel, der mit seinen ständigen Bemühungen mir praktisch und theoretisch zur Seite stand. Für sein großes Vertrauen in meine wissenschaftliche Arbeit, sowie in die Aufgabe der Betreuung der vielen Diplomanden im Labor. Und es freut mich, dass ich ihn immer wieder davon überzeugen konnte, dass ich lernfähig bin.

Bei Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Appell für die Aufmerksamkeit und die gute Beratung über die Jahre hinweg. Er hat mir gezeigt, dass es auch noch andere interessante Arbeitsgebiete zu entdecken gibt.

Bei Herrn Prof. Dr. Wilhelm Bloch, dem Leiter des Instituts für Kreislaufforschung und Sportmedizin, der jederzeit offen für Fragen jeglicher Art war, was ich sehr schätze, und sich immer die Zeit nahm mir Antworten zu geben.

Bei allen Mitarbeitern des gesamten Instituts. Ohne ein funktionierendes Team ist es nicht möglich eine Arbeit in dieser Art und Weise durchzuführen. Ich danke allen für die gute Atmosphäre bei der Durchführung der praktischen Arbeiten.

Bei Dr. Antonios Matsakas für seine Unterstützung und Hilfe in Theorie und Praxis. Auch für die vielen netten Gespräche auf der Arbeit und auf Kongressen; nicht zu vergessen die griechischen Abendessen im Labor.

Auch bei meinen beiden Mitdoktoranden Torsten Hertrampf und vor allem bei Jan Seibel (ohne den meine Zeit im Labor und in den USA , sowie mein Leben um sehr viel ärmer gewesen wäre). Für die gute Zusammenarbeit und die täglichen Mittagessen in der Mensa mit anschließendem Kickerspiel.

Bei den technischen Assistentinnen Anika Voss und Ute Laudenschowsky, die im Labor und im Tierstall mir ständig zur Seite standen.

Bei allen Diplomanden, die in der Zeit im Institut ihre Diplomarbeit angefertigt haben (v. a. bei Klaudia Erdmann, Jennifer Kluge, Jean-Pierre Schwarz, Gunnar Diehl, Florian Belz, Kristin Schlüpmann, Alexander Pollmeier, Isabelle Mader, Tobias Rosing, Sebastian Frese, Gregor Stumpf und Damian Badners). Insbesondere auch bei Kerstin Wolken, die jederzeit für mich da war. Für die netten Stunden zu jeder Tag- und Nachtzeit innerhalb und außerhalb des Labors. Sie alle haben mich immer wieder dazu ermuntert, meine Arbeit zu schätzen und nicht aufzugeben. Vor allem sei denjenigen Diplomanden gedankt, mit denen ich mir die Nächte und die Wochenenden im Labor um die Ohren geschlagen habe (wenigstens gibt es einen Pizza-Dienst).

Weiterhin bei zwei weiteren Doktoranden aus anderen Instituten; bei Stephan Geisler für die netten Kaffeepausen, sowie bei Kirsten Legerlotz, die mich immer wieder in allen Situationen sei es beruflich oder privat aufheiterte.

Bei Uwe Drescher und Klaus Wasser, die sich für technische Fragen immer Zeit nahmen, vor allem wenn der Computer mal wieder abgestürzt war.

Bei einer guten Freundin, Dr. Annette Arntz, die mich nicht nur in meiner Arbeit unterstützte. Für die reichlichen konstruktiven Vorschläge und die ausgiebigen Diskussionen bei einem guten Tee oder einem Spaziergang.

Und bei meiner derzeitigen Mitbewohnerin Stefanie Hermann, die mir gezeigt hat, dass es auch noch andere Dinge im Leben gibt als Arbeiten.

Ganz besonders herzlich bei meiner gesamten Familie, meinen Eltern, vor allem meiner Mutter Johanna Friedel und meiner Tante Else Friedel, die mich auf ihre Weise während des gesamten Studiums und Lebens unterstützt haben und mir gezeigt haben, was Glauben heißt und ist.

Bei meinen Freunden von „daheim“ aus dem Baden-Ländle. Sigrid Mascha, ohne die ich wohl nicht so weit gekommen wäre, Angela Wabnitz, Simone Lipp, Claudia Mantel, Cathrin Müller und Markus Buttenmüller, die weite Teile meines Lebens mitgeprägt haben und die mir gezeigt haben, dass Freundschaft und die Heimat was ganz besonderes ist.

Bei allen anderen, die hier nicht namentlich erwähnt sind und mich auf meinem Weg begleitet haben.

Zu guter Letzt gebe ich jedem meinen Lieblingsspruch mit auf den Weg und sage allen, die ebenfalls einen wissenschaftlichen Werdegang einschlagen möchten, dass es sich lohnt, sich durch die Jahre zu kämpfen und durchzuhalten.

„Gib jedem Tag die
Chance, der
schönste deines
Lebens zu werden.“

(Mark Twain)

Angelika Friedel
April 2006, Köln, Deutschland

1	EINLEITUNG.....	12
1.1	Zur Physiologie der Skelettmuskulatur.....	14
1.1.1	Der Aufbau der Skelettmuskulatur.....	14
1.1.2	Die Entstehung neuer Skelettmuskelfasern.....	15
1.1.3	Satellitenzellen	15
1.2	Myostatin und weitere Gene, die bei der Differenzierung von Satellitenzellen entscheidend sind	18
1.2.1	Ein geschichtlicher Rückblick	18
1.2.2	Die Struktur von Myostatin	19
1.2.3	Die Lokalisation und der Wirkungsmechanismus von Myostatin	20
1.2.4	Myostatin und Sportwissenschaft	20
1.2.5	Der Notch-1-Signaltransduktionsweg	22
1.2.6	Notch-1 und Delta-1	24
1.2.7	Sox-8	25
1.3	Androgene und anabole Steroide	27
1.3.1	Androgene	28
1.3.2	Androgen-anabole Steroide.....	29
1.3.3	Anabole Steroide im Sport.....	29
1.4	Beschreibung der untersuchten Androgene, anabole Steroide und Anti-Androgene.....	31
1.4.1	Dihydrotestosteron	31
1.4.2	Tetrahydrogestrinon	31
1.4.3	Desoxymethyltestosteron	32
1.4.4	Norandrostendion	32
1.4.5	Flutamid.....	33
1.5	Zielsetzungen der Arbeit	34
2	MATERIAL UND METHODEN.....	36
2.1	Tierhaltung.....	36
2.2	Trainingsprotokolle.....	36
2.2.1	Experiment zur Analyse zeitabhängiger Trainingseffekte auf den mRNA Gehalt von Genen, welche bei der Differenzierung von Satellitenzellen eine entscheidende Rolle spielen.....	36
2.2.2	Experiment zur Analyse des mRNA Gehalts von Myostatin im <i>M. gastrocnemius</i> nach einer Applikation von Testosteron Propionat kombiniert mit einem Training.....	37
2.2.3	Durchführung eines klassischen Hershberger Assays zur Charakterisierung anaboler Substanzen <i>in vivo</i>	38
2.3	Organentnahme.....	39
2.4	mRNA Analyse	39
2.4.1	RNA-Isolation mittels Trizol®.....	39

2.4.2	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	41
2.4.3	DNase-Verdau.....	41
2.4.4	cDNA Synthese	42
2.4.5	Primer.....	43
2.4.6	Das Prinzip der PCR	45
2.4.7	Gelelektrophorese	47
2.4.8	Dokumentation der Gele.....	48
2.4.9	Die Real-Time RT-PCR	48
2.5	Rezeptorbindungstest	51
2.6	Zellkultur	51
2.6.1	Kulturbedingungen	52
2.6.2	Passagieren der Zellen.....	53
2.6.3	Bestimmung der Zellzahl.....	53
2.6.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	53
2.6.5	Hitzeinaktivierung des fötalen Kälberserums (FKS)	54
2.6.6	Medium für C2C12 Zellen.....	54
2.7	Behandlungen und Messverfahren.....	55
2.7.1	Hormonbehandlung.....	55
2.7.2	Durchflusszytometrie	55
2.7.3	Kinetische Bestimmung der Creatin-Kinase Aktivität (CK- Aktivität)	57
2.7.4	Messung der CK- Aktivität	57
2.7.5	Proteinbestimmung nach Lowry	58
2.7.6	Antagonisierung der Hormonbehandlung mittels Flutamid.....	59
2.8	Statistik	59
3	ERGEBNISSE.....	60
3.1	Effekte eines Schwimmtrainings auf die Differenzierung von Muskelzellen	60
3.2	Wirkung anaboler Steroide auf die Myoblastenproliferation und Myoblastendifferenzierung.....	64
3.2.1	Der Einfluss von anabolen Steroiden auf die Proliferation in der C2C12 Zelllinie	64
3.2.2	Der Einfluss von Androgenen und anabolen Steroiden auf die Induktion von Differenzierungsprozessen in C2C12 Zellen	67
3.2.3	Die Analyse der Wirkung von Androgenen und anabolen Steroiden auf den mRNA Gehalt in C2C12 Zellen.....	69
3.2.4	Analyse des Einflusses von Androgenen auf den mRNA Gehalt von Myostatin	73
3.3	Bindungsaffinität anaboler Steroide, Prohormone und „Designersteroide“ zu unterschiedlichen Rezeptoren.....	75
3.4	Analyse anaboler Substanzen im klassischen Hershberger Versuch	77

3.4.1	Effekte von anabolen Substanzen auf den mRNA Gehalt ausgewählter Gene in der Leber und der Skelettmuskulatur ..	81
3.5	Analyse der Kombination eines Trainings und einer gleichzeitigen Behandlung mit Androgenen auf den mRNA Gehalt von Myostatin im <i>M. gastrocnemius</i>.....	85
4	DISKUSSION.....	87
4.1	Der Einfluss von Androgenen und anabolen Steroiden auf die Proliferation und Differenzierung in der Myoblastenzelllinie C2C12	89
4.1.1	Wahl des Modellsystems C2C12.....	89
4.1.2	Der Einfluss von anabolen Steroiden auf die Proliferationsrate von C2C12 Zellen	89
4.1.3	Der Einfluss von Androgenen und anabolen Steroiden auf die Induktion von Differenzierungsprozessen in C2C12 Zellen	91
4.2	Die Analyse der Wirkung von Androgenen und anabolen Steroiden auf den mRNA Gehalt verschiedener Gene in C2C12 Zellen.....	93
4.2.1	Analyse des Einflusses von Androgenen auf den mRNA Gehalt von Myostatin.....	96
4.3	Die Effekte eines Trainings <i>in vivo</i> auf den mRNA Gehalt verschiedener Gene, die in den Prozess der Differenzierung involviert sind	98
4.4	Analyse molekularer Mechanismen der gewebspezifischen Wirkung von unterschiedlichen anabolen Steroiden	101
4.4.1	Analyse des Rezeptorbindungstests	101
4.4.2	Analyse der Substanzen im klassischen Hershberger Versuch.....	103
4.4.3	Analyse des mRNA Gehalts von Myostatin und AR im <i>M. gastrocnemius</i> nach Behandlung mit unterschiedlichen anabolen Substanzen	105
4.5	Analyse der Kombination eines Trainings und einer gleichzeitigen Behandlung mit Androgenen auf den mRNA Gehalt von Myostatin im <i>M. gastrocnemius</i>.....	106
4.6	Ausblick	108
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	111
6	LITERATURVERZEICHNIS	113
7	ANHANG.....	133
7.1	Abkürzungsverzeichnis	133

7.2	Abbildungsverzeichnis	134
7.3	Tabellenverzeichnis	137
7.4	Internetseiten.....	138
7.5	Lebenslauf	139

1 EINLEITUNG

Die Skelettmuskulatur des menschlichen Körpers zeichnet sich durch die Fähigkeit zur schnellen Adaptation und Regeneration aus. Die Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen ist sowohl aus medizinischer Sicht im Sinne der Gesundheitsprävention und der Behandlung akuter Erkrankungen dieses Gewebes, als auch aus trainingswissenschaftlicher Sicht in Hinblick auf eine Verbesserung der Leistungsfähigkeit des Athleten von größtem Interesse.

In den vergangenen Jahren wurde deutlich, dass die Homöostase der Skelettmuskulatur in großem Umfang durch ein komplexes Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren und anabol wirksamen Hormonen reguliert wird. Einer dieser Faktoren, Myostatin, auch GDF-8 (Growth and Differentiation Factor 8) genannt, steht seit einigen Jahren in besonderem Maße im Blickpunkt des wissenschaftlichen, aber auch des öffentlichen Interesses. Myostatin ist ein Schlüsselmolekül bei der Entwicklung und Adaptation der Skelettmuskulatur. Es wird bei therapeutischen Ansätzen, beispielsweise der Behandlung von Muskelerkrankungen wie Muskeldystrophien (Typ Duchenne, Typ Becker-Kiener etc.), aber auch bei Verjüngungstherapien, Lifestyledrogen und im Bereich des Dopings diskutiert. Hier liegen also sowohl der wertvolle Nutzen wie auch der denkbare Missbrauch äußerst eng beieinander.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, molekulare Mechanismen der Anpassung der Skelettmuskulatur genauer zu charakterisieren. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen lag hierbei auf der Analyse der Myostatin-assoziierten Signaltransduktion während der Neubildung von Myoblasten (Satellitenzellendifferenzierung) und im ausdifferenzierten Skelettmuskel in Abhängigkeit von Faktoren, die eine Adaptation der Skelettmuskulatur induzieren. Hier wurde im Besonderen die Wirkung von Training und/oder der Applikation von anabol wirkenden Hormonen analysiert.

Die so identifizierten molekularen Mechanismen wurden im zweiten Teil der Arbeit dazu genutzt, um die biologischen und pharmakologischen Wirkmechanismen von anabolen Steroiden, im Besonderen von Tetrahydrogestrinon (THG), Norandrostendion (NOR), Desoxymethyltestosteron (DMT), 1-Testo-

steron (1-Testo) und Propyltrenbolon (Propyl) zu untersuchen und potenzielle Nebenwirkungen derartiger Verbindungen zu identifizieren.

1.1 Zur Physiologie der Skelettmuskulatur

1.1.1 Der Aufbau der Skelettmuskulatur

Um Anpassungsmechanismen der Skelettmuskulatur studieren zu können, ist es nötig, ihren Aufbau (s. Abb. 1) zu kennen: Etwas weniger als 50% unserer Körpermasse besteht aus Skelettmuskulatur. Die meisten Skelettmuskeln sind durch Sehnen mit den Knochen verbunden (Brooks, 2003). Diese Verbindung ermöglicht es, Kräfte und Bewegungsvorgänge, die sich während einer Kontraktion der Skelettmuskulatur entwickeln, auf das Skelett zu übertragen. Kontraktion ist definiert durch die Aktivierung der Muskelfaser mit einer Tendenz zur Verkürzung der Fasern (Faulkner, 2003). Dieses Zusammenziehen beruht auf dem Zusammenwirken der Proteine Aktin und Myosin.

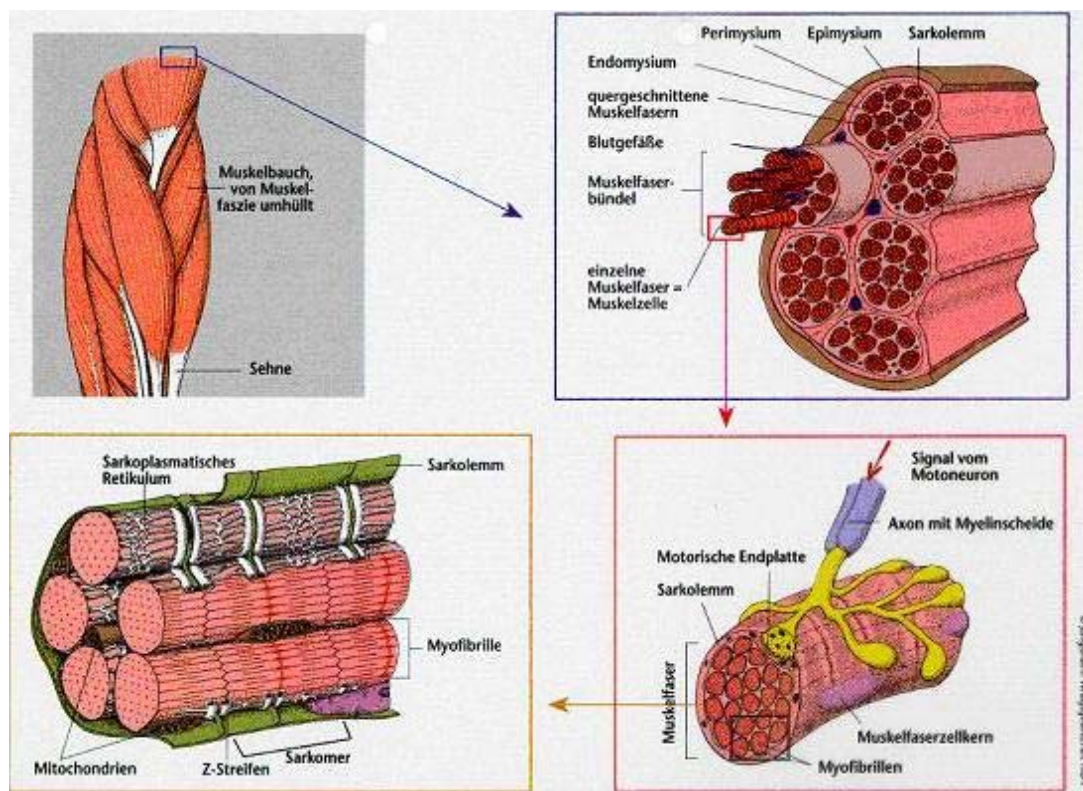


Abb. 1: Feinbau der quergestreiften Muskulatur (modifiziert nach P. DieI)

Über 600 Muskeln, die aus parallelen Bündeln von Muskelfasern bestehen, befinden sich im menschlichen Körper. Jede Muskelfaser ist ein Syncytium mit vielen Kernen, welches einige hundert Myofibrillen enthält. Die Z-Schei-

ben unterteilen die Myofibrillen in sogenannte Sarkomere – sich wiederholende kontraktile Einheiten. Ausgehend von den Z-Scheiben findet man nach beiden Seiten hin die Actinfilamente. Myosinfilamente finden sich parallel dazu in der A-Zone. Die für den Skelettmuskel charakteristische Querstreifung entsteht durch die regelmäßige Anordnung von Molekülen mit unterschiedlicher Dichte (Aktin und Myosin).

1.1.2 Die Entstehung neuer Skelettmuskelfasern

Die Vorläufer der Skelettmuskelfasern nennt man Myoblasten. Die Determinierung zum Myoblasten im frühen embryonalen Stadium hängt von Genregulatorproteinen – u.a. von Mitgliedern der MyoD- und MEF2-verwandten Proteine – ab. Dies sind Proteine, wie z.B. MyoD, Myf5, Myogenin, MRF4 oder MEF2, die nicht nur die Determinierung bestimmen, sondern teilweise auch die Differenzierung von Myoblasten zu Muskelfasern (Hawke und Garry, 2001).

Myoblasten und Myofibrillen reihen sich im Bindegewebe aneinander, welches aus Fibroblasten besteht. Die Entwicklung der Muskulatur wird durch die Gliederung und Orientierung der Muskelzellen in diesem Gefüge bestimmt. Bei der Differenzierung werden Faktoren aus Myoblasten ausgeschieden, welche das Wachstum der anderen Myoblasten fördern. Myostatin ist ein Faktor, der das Wachstum der Skelettmuskelfasern selbst begrenzt und somit als negativer Wachstumsregulator der Skelettmuskulatur angesehen werden kann.

Einige Myoblasten überdauern als ruhende Stammzellen im ausgewachsenen Skelettmuskel. Sie werden auch als Satellitenzellen bezeichnet.

1.1.3 Satellitenzellen

Muskelsatellitenzellen wurden erstmals 1961 in einem Frosch entdeckt und als solche identifiziert (Katz, 1961; Mauro, 1961). Sie sind eine Population von undifferenzierten Muskelzellen mit nur einem Kern, die in Säugetieren (Campion et al., 1981; Gamble et al., 1978), Vögeln (Hartley et al., 1992), Reptilien (Kahn und Simpson, 1974) und Amphibien (Popiela, 1976) nachgewiesen wurden. In Erscheinung treten sie ab Tag 17,5 *post coitum*, nachdem sich die ersten Muskelfasern geformt haben. Der exakte Ursprungsort

ist nicht bekannt, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass sie aus der dorsalen Aorta stammen (Seale und Rudnicki, 2000). Im menschlichen Muskel findet man die kleinen, abgeflachten Zellen, die sich im Ruhezustand befinden, in engem Kontakt mit der reifen Muskelzelle, eingebettet in die Basalmembranhülle. Bei Bedarf stehen sie zur endgültigen Ausdifferenzierung zur Verfügung, wie z.B. nach Muskelverletzungen. Nach einer Verletzung erfolgen drei charakteristische Phasen des Heilungsprozesses: Die Destruktions-, die Reparatur- und die Umbauphase. Die initiale Phase der Muskelerneuerung ist charakterisiert durch die Nekrose des zerstörten Gewebes und durch die Aktivierung unterschiedlicher inflammatorischer Antworten (Charge und Rudnicki, 2004). Die Reparaturphase ist gekennzeichnet durch die Regeneration der Muskelfasern und durch die Aktivierung der Satellitenzellen. Oft kommt es zu einer Überlappung der Reparatur- und Umbauphase (Jarvinen et al., 2000). Die Myoblasten verschmelzen in der Umbauphase, damit neue Muskelfasern gebildet werden können und um den kontraktile Muskelapparat zu rekonstruieren (Charge und Rudnicki, 2004). Studien zeigen, dass Unterschiede zwischen fötalen und adulten Myoblasten, wie z.B. in ihrer Sensitivität gegenüber einem Tumorpromotor (Cossu et al. 1983 und 1985), in ihrer Expression des Acetylcholinrezeptors (Cossu et al., 1987) und in der Art und Weise die Acetylcholinesterase zu exprimieren (Senni et al., 1987), existieren. Yablonka-Reuveni et al. (1987) zeigten, dass kultivierte Satellitenzellen im Gegensatz zu fötalen Myoblasten von Vögeln später zu Myotuben verschmelzen. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass auch spezifische Muster in der Expression der Myosinschwerkettenisoformen zwischen kultivierten Satellitenzellen und fötalen Myoblasten in Vögeln vorliegen (Feldman und Stockdale, 1992; Hartley et al., 1991 und 1992).

Bei Menschen und Mäusen sind diese ruhenden (Schultz et al., 1978), nicht fibrilaren, mononuklearen Zellen am zahlreichsten bei der Geburt vorhanden (geschätzt liegen sie bei ungefähr 32% der sublaminaren Kerne) (Cardasis und Cooper, 1975). Die Anzahl geht nach der Geburt zurück und stabilisiert sich bei 1 bis 5% der Skelettmuskelkerne in erwachsenen Mäusen (Bischoff, 1994). Die Anzahl der Satellitenzellen variiert in verschiedenen Muskeln und ist auf die Muskelfaserzusammensetzung zurückzuführen. So findet sich z.B. im *M. soleus* der Maus, der vorwiegend aus langsamen Muskelfasern be-

steht, eine größere Anzahl von Satellitenzellen, die in den ersten 12 Lebensmonaten zunimmt, jedoch im Alter abnimmt (Gibson und Schultz, 1983). Im menschlichen Muskel findet man ebenfalls eine Abnahme der Anzahl der Satellitenzellen mit zunehmendem Alter, was die verminderte Regeneration der Muskulatur bei älteren Menschen erklären könnte (Renault et al., 2002). Charifi et al. zeigten allerdings im Jahr 2003, dass Ausdauertraining den Rückgang der Satellitenzellenanzahl bei älteren Menschen vermindern kann, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass die schlechtere Regeneration im Alter nicht nur das Resultat einer limitierten Replikation älterer Satellitenzellen ist.

Die Entwicklung von Sarkopenie hängt direkt mit einer signifikanten Reduktion des regenerativen Potentials von Satellitenzellen zusammen, welche sich in einem ruhenden Stadium befinden, bis Signale von außen, z.B. ausgelöst durch Wachstumsfaktoren, den Wiedereintritt in den Zellzyklus auslösen (Fulle et al., 2004). Es ist denkbar, dass durch eine erhöhte Kapazität der Satellitenzellproliferation Sarkopenie verzögert oder geheilt werden kann. Es konnte bereits gezeigt werden, dass IGF-1 (insulin-like growth factor-1) den altersbedingten Rückgang und den Funktionsverlust in der Skelettmuskulatur durch erhöhte Satellitenproliferation unterstützen kann (Barton-Davis et al., 1999; Chakravathy et al., 2001). Schon ein einmaliges maximales exzentrisches Training kann eine Stimulierung der Satellitenzell-Vermehrung bei jungen und älteren Männern hervorrufen (Dreyer et al, 2006).

Verschiedene Wachstumsfaktoren können die Aktivierung und Proliferation der Satellitenzellen beeinflussen. Als Beispiel sei hier der Notch-1 Signaltransduktionsweg genannt (s. Kap. 1.2.5), der bei Muskelverletzungen aktiviert wird. Er ist u.a. bei der Bildung von Muskelfasern aus Satellitenzellen nach einer Verletzung der Muskulatur beteiligt (Conboy und Rando, 2002).

1.2 Myostatin und weitere Gene, die bei der Differenzierung von Satellitenzellen entscheidend sind

Myostatin, auch GDF-8 genannt, zählt zur Superfamilie der TGF- β verwandten Proteine, die eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung spielen (Nicholas et al., 2002). Es ist ein extrazelluläres Signalmolekül und wird üblicherweise von den Skelettmuskelzellen gebildet und sezerniert. Myostatin wirkt als negativer Regulator des Skelettmuskelwachstums (Ma et al., 2003; Hill et al. 2003). Bei einer Hemmung von Myostatin oder einem Gendefekt aufgrund unterschiedlicher Mutationen kommt es zu einem vermehrten Muskelwachstum. Bei einigen Sportlern, aber auch anderen Personen, konnte gezeigt werden, dass sie eine Mutation im Myostatingen aufweisen. Schuelke et al. (2004) zeigten das Vorhandensein einer Genmutation im Myostatingen bei einem Säugling.

1.2.1 Ein geschichtlicher Rückblick

Seit über 200 Jahren beschäftigen sich Wissenschaftler mit dem Phänomen des so genannten „double-muscled“ (= doppelte Muskelmasse) Phänotyps, der bei einigen Rinderrassen auftritt. Diese Rinder (z.B. „Belgian Blue“, „Piedmontese“, „Asturiana de los Valles“) weisen ein 20 – 30% höheres Muskelwachstum als normale Rinder gleichen Geschlechts auf (vgl. Abb. 2).

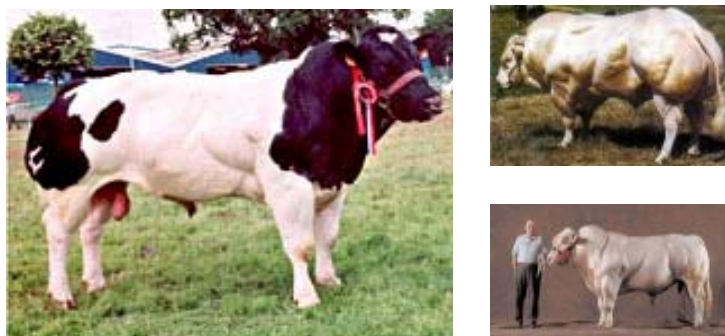


Abb. 2: Belgian Blue Rinder mit einem Defekt im Myostatingen. (Quelle: Bild links: http://www.dgm.org/medfo/forschungsberichte/Myostatin-Regulator_des_Muskelwachstums.html, 26.03.2006; Bild rechts oben: <http://www.champion-nutrition.com/champion/products/myostatin/research.php>, 26.03.2006; Bild rechts unten: <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/neuro/belgian.blue.jpg>, 26.03.2006)

Lange Zeit erschien die molekulare und genetische Grundlage dieses Phänomens rätselhaft, doch mit dem technischen Fortschritt wurde es möglich sogenannte „knock-out“ – Modelle zu entwickeln, die es ermöglichten, biochemische Signaltransduktionswege und Mechanismen der Genaktivität zu erforschen.

Anhand dieses Fortschritts und einem „knock-out“ – Mausmodell gelang es McPherron und ihrer Arbeitsgruppe von der Johns Hopkins Universität, 1997 das Myostatingen zu identifizieren. Die Inaktivierung des Myostatingens bei Rindern (Kambadur et al., 1997; McPherron et al., 1997) und bei Mäusen (McPherron und Lee, 1997; Szabo et al., 1998) bewirkt eine deutliche Zunahme der Skelettmuskelmasse der Tiere. Die Gewichtszunahme ist auf eine Hypertrophie (Zunahme der Faserdicke) und auf eine Hyperplasie (Zunahme der Muskelfaseranzahl) zurückzuführen (McPherron und Lee, 1997; Huet et al., 2001; Lee und McPherron, 2001).

1.2.2 Die Struktur von Myostatin

Mitglieder der TGF- β Superfamilie von Zytokinen besitzen eine charakteristische Aminosäuresequenz und Struktur, die ihre Funktion bestimmen. Einige der Mitglieder regulieren das Zellwachstum und die Differenzierung, während andere als Inhibitoren auf die Zellproliferation wirken (Piek et al., 1999). Im Laufe der Evolution wurde die Sequenz und die Funktion des Myostatingens kaum verändert, sondern liegt in einer hochkonservierten Form vor, obwohl Myostatin für die Fortpflanzung oder die Entwicklungsfähigkeit nicht essentiell ist. Vor allem ist der biologisch aktive Carboxyterminus des Proteins unter vielen Spezies bemerkenswert identisch. Bisherige Befunde zeigen, dass Myostatin als ein 375-Aminosäure großes Vorläuferprotein synthetisiert wird, welches durch Proteolyse zu einem 26 kDa Homodimer führt (McPherron et al. 1997, Rios et al. 2004, Thomas et al. 2000). Das aktive Myostatin besitzt somit eine Größe von 26 kDa; das latent assoziierte Peptid besitzt eine Größe von 40 kDa und der Vorläufer von Myostatin liegt bei 52 kDa (Budasz-Swidarska et al., 2005).

1.2.3 Die Lokalisation und der Wirkungsmechanismus von Myostatin

Bisher existieren nur wenige Untersuchungen zur Lokalisation des Myostatins in der Skelettmuskulatur (McPherron et al., 1997; Wehling et al., 2000; Ji et al., 1998). McPherron et al. (1997) beobachteten als erste, dass eine Myostatin mRNA-Expression im frühen Stadium von Vorläuferzellen und weiterhin in ausgewachsenen axialen und paraxialen Muskeln zu finden war. Doch eine genaue Lokalisation konnte bisher noch nicht erfolgen.

Bei Schweinen wurde eine Myostatin mRNA-Expression in Skelettmuskelfasern eines Fötus ab dem 59. Schwangerschaftstag beobachtet (Ji et al., 1998) und Gonzalez-Cadavid et al. (1998) konnten ein myostatinähnliches Protein in menschlichen Skelettmuskelfasern lokalisieren.

Lee und McPherron konnten 2001 zeigen, dass das C-terminale Ende des Myostatindimers an den Act RIIb (activin type IIB receptor) bindet. Diese Bindung konnte durch das activin-bindende Follistatinprotein und in höheren Konzentrationen durch das Propeptid Myostatin, gehemmt werden. Eine Bindung von Follistatin an den Rezeptor hat ebenso einen enormen Skelettmuskelwachstum, wie er bei Myostatin beobachtet werden konnte, zur Folge.

In der Studie von Yamanouchi et al. (2000) wurde in Satellitenzellen eine höhere Myostatin mRNA-Expression als in anderen Zellen gefunden. Der genaue Mechanismus, d.h. wie Myostatin auf Satellitenzellen wirkt und ob eine direkte oder indirekte Wirkung vorhanden ist, konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

1.2.4 Myostatin und Sportwissenschaft

Zahlreiche Studien belegen, dass Myostatin eine wichtige Rolle bei dem Wachstum des Skelettmuskels spielt (Tobin und Celeste, 2005; Martyn et al., 2004; Hill et al., 2003; Ma et al., 2003; Wehling et al., 2000). Es existieren auch einige Nachweise für eine Rolle von Myostatin bei der Adaptation der Skelettmuskulatur durch unterschiedliche Trainingsformen (Martin und Johnston, 2005; Matsakas et al., 2005; Willoughby, 2004, Lalani et al., 2000). Bisherige Studien belegen eine verringerte Expression von Myostatin bei Nagern nach Laufband- (Wehling et al., 2000) oder Schwimmtraining (Matsakas et al., 2005). In humaner Muskulatur wurde eine erhöhte mRNA Expression von Myostatin nach Krafttraining gemessen, doch die Autoren vermuten, dass dies keinen Effekt auf die trainingsinduzierte Zunahme an Mus-

kelkraft und -masse hat (Whilloughby, 2004). Eine Zunahme der Myostatinexpression wurde ebenfalls nach einer längeren Ruhephase im Skelettmuskel (Wehling et al., 2000; Carlson et al., 1999) oder nach einem Weltraumflug (Lalani et al., 2000) gemessen. Weiterhin wurde eine Erhöhung der Expression von Myostatin nach einer Immobilisation der Hinterläufe von Mäusen beobachtet (Carlson et al., 1999).

Zachwieja et al. (1999) und Wehling et al. (2000) zeigten einen Muskelverlust beim Menschen durch anhaltende Bettruhe, wobei Reardon et al. (2001) ebenso eine stark ansteigende Myostatinexpression in atrophierter Skelettmuskulatur beim Menschen feststellten.

Weiterhin untersuchten Kirk et al. (2000) die Rolle des Myostatins während der Regeneration des Skelettmuskels an männlichen Sprague-Dawley Ratten. Sie bestimmten erhöhte Myostatinwerte in nekrotischen Fasern und in zerstörtem Bindegewebe, sowie einen Myostatinprotein-Rückgang während der Synthese neuer Muskelfasern.

Die Expression von Myostatin mRNA in regenerierenden Skelettmuskeln von Ratten wurde von Yamanouchi et al. (2000) bestätigt. Diese Arbeitsgruppe wies ebenfalls auf erhöhte Myostatinwerte in den sich regenerierenden Skelettmuskeln hin. Diese Untersuchung bestätigt wiederum die Hypothese, dass eine erhöhte Myostatinmenge mit einer Atrophie der Muskulatur einhergeht.

Die Myostatin mRNA-Expression wurde bei Nagetieren nur in den sich schnell kontrahierenden Muskelfasern (Typ II) des *M. gastrocnemius* beobachtet (Carlson et al., 1999). Carlson et al. fanden heraus, dass die mRNA-Expression von Myostatin bei weiblichen Mäusen fasertypspezifisch ist und dass es zu einer gesteigerten Zunahme der mRNA-Expression von Myostatin während der Ruhigstellung der hinteren Gliedmaßen der Tiere kommt. Von einer unterschiedlichen Myostatinexpression in verschiedenen Muskelfasertypen berichteten auch Matsakas et al. (2005).

Diese unterschiedlichen Studien zeigen die enorme Rolle des Muskelwachstumsfaktors Myostatin sowohl bei einer Atrophie als auch bei der Adaptation der Skelettmuskulatur durch Bewegung und sportliches Training auf.

Dasarathy et al. (2004) analysierten die Myostatin mRNA- und Proteinexpression in einem Cirrhose-Rattenmodell, bei welchem die Tiere eine atrophe

Skelettmuskulatur aufzeigen und stellten eine erhöhte Myostatinexpression im *M. gastrocnemius* fest. Eine Färbung mit dem Proliferationsmarker PCNA (proliferating cell nuclear antigen) zeigte eine geringere Anzahl an aktiven Satellitenzellen in dem Cirrhose-Modell. Eine gestörte Satellitenzellfunktion ist möglicherweise für die Atrophie dieser Tiere verantwortlich.

Myostatin ist ein wichtiger Faktor bei der Proliferation und der Differenzierung von Satellitenzellen (Charge und Rudnicki, 2004; Glass, 2003; Joulia et al., 2003, McCroskery et al., 2003).

Die Resultate einiger Untersuchungen deuten auf die Möglichkeit hin, dass Myostatin in Satellitenzellen in einer parakrinen oder autokrinen Weise tätig ist (McPherron et al., 1997; Carlson et al., 1999; Wehling et al., 2000; Yamanouchi et al., 2000).

Thomas et al. (2000) haben mit Hilfe des in Abb. 3 dargestellten Modells versucht, die Funktion des Myostatins durch Hemmung der Myoblastenproliferation näher zu beschreiben.

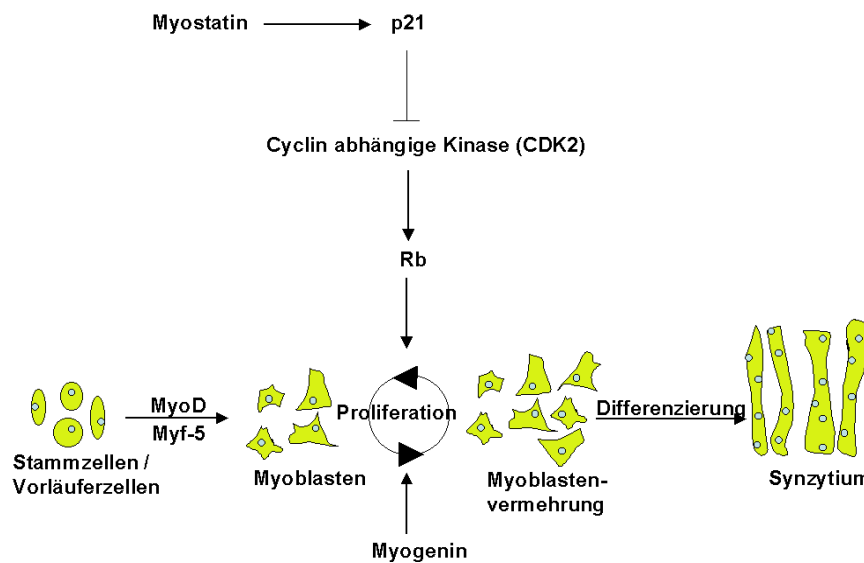


Abb. 3: Modell der Muskelzellentwicklung (nach Thomas et al., 2000)

1.2.5 Der Notch-1-Signaltransduktionsweg

Weiterführend sollen einige weitere Gene mit Bedeutung für die Kontrolle der Satellitenzellendifferenzierung beschrieben werden.

Eine Frage, die bis heute die Wissenschaftler bewegt, ist diejenige nach der Kontrolle des Zell- und Gewebewachstums. Wie zu Beginn dieses Kapitels

beschrieben wurde, ist Myostatin ein Faktor, der das Skelettmuskelwachstum reguliert. Doch nicht nur Myostatin kontrolliert den Muskelauf- und -abbau, sondern auch weitere Gene und Signaltransduktionswege, z.B. der Notch-1-Signaltransduktionsweg. Notch-1 mit seinen Liganden Delta-1 und Jagged-1, sowie Sox-8 spielen bei der Differenzierung der Zellen eine wesentliche Rolle und wurden in dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Nachfolgend wird nun ein Überblick über den Notch-1-Signaltransduktionsweg und die untersuchten Gene gegeben.

Der Notch-1-Signaltransduktionsweg (s. Abb. 4) ist ein hoch konservierter Signaltransduktionsweg für die Zell-Zell-Kommunikation. Er ist bei der Regulation der Differenzierung, der Proliferation und der Spezifizierung der Zellen entscheidend. Seine Aufgaben bestehen nicht nur darin, kontinuierlich das Gewebe, wie z.B. das Blut, die Haut oder das Darmepithel zu erneuern und die Stammzellen in einem proliferativen, pluripotenten und undifferenzierten Zustand zu erhalten, sondern lenkt auch die Zellvermehrung und setzt die Richtung der Zellentwicklung fest. Analog dazu wird er bei der Embryonalentwicklung benötigt, um das feinkörnige Muster differenzierter Zellen zu bilden (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Mumm und Kopan, 2000; Schweisguth, 2004).

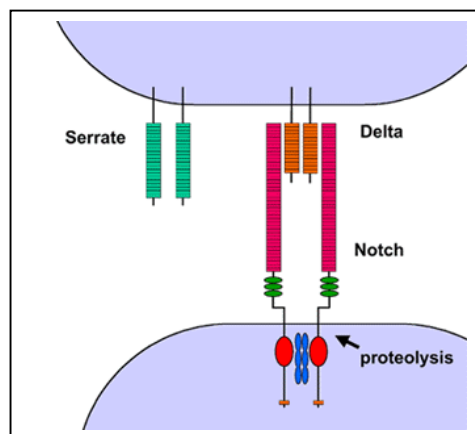


Abb. 4: Der Notch-1-Signaltransduktionsweg (bearbeitet, aus: www.biochem.northwestern.edu/holmgren/Glossary/Models/Notch-1_signaling.html, 18.03.2006)

Der Notch-1-Signaltransduktionsweg schafft in den unterschiedlichen Geweben die Voraussetzung, verschiedene Zelltypen hervorzubringen. Er ermöglicht einzelnen Zellen, so auf ihre Nachbarzellen einzuwirken, dass diese an-

dere Gene exprimieren als sie selbst. Liganden für den menschlichen Notch-1-Rezeptor sind Proteine, die sich in zwei Subklassen der DSL-Proteine (Delta-1 und Serrate-Lag 2) unterteilen. Im Menschen findet man 2 Liganden der Serrate-Proteine (Jagged-1 und Jagged-2), sowie drei Mitglieder der Delta-1-Proteine (Delta-1, Delta-3 und Delta-4). (Lindsell et al., 1995; Luo et al., 1997; Gray et al., 1999)

Bindet sich ein extrazelluläres Signalmolekül (z.B. Delta-1) auf der Oberfläche der Zielzelle an ein Transmembranprotein (z.B. Notch-1), so wird der Rezeptor aktiviert und eine Kaskade intrazellulärer Signale in Gang gesetzt. Dadurch wird in der Folge das Zellverhalten verändert. Im Vergleich zu anderen Signaltransduktionswegen ist dieser Übertragungsmechanismus zwischen Zellmembran und Kern einfach und direkt.

1.2.6 Notch-1 und Delta-1

Notch-1 ist, wie in Kapitel 1.2.5 erwähnt, ein Rezeptorprotein. Die Gene der Notch-1-Rezeptor-Proteine kodieren große, phylogenetisch konservierte Transmembranproteine, welche eine zentrale Rolle bei der Ausdifferenzierung von Stammzellen zu spezialisierten Zellen während der Zellentwicklung spielen.

Das Notch-1 Signal wird durch einen Transmembranrezeptor vermittelt und durch das Notch-1-Gen kodiert (Wharton et al., 1985; Kidd et al., 1986). Dem Notch-1-Genprodukt fällt die Aufgabe des Rezeptors zu. Bei einer Rezeptoraktivierung durch einen extrazellulären Liganden wird der intrazelluläre Teil des Notch-1-Rezeptors (intracellular portion of Notch-1 = ICN) von der Zellmembran abgespalten und tritt in den Zellkern ein, wo er an der transkriptionalen Aktivierung von nachgeschalteten Zielgenen beteiligt ist (Jarriault et al., 1995; Schroeter et al., 1998; Struhl und Greenwald, 1999). ICN's sind Polypeptide, die eine N-terminale RAM Domäne von ~110 Aminosäuren, sieben sich wiederholenden Ancyryn Folgen (Zweifel und Barrick, 2001A; Zweifel und Barrick, 2001B), eine weniger konservierte C-terminale Region inklusive einer transkriptionalen Aktivierungsdomäne und eine weitere C-terminale PEST-Sequenz beinhalten. Die Ancyryn-Folge ist die am stärksten konservierte Region und bedeutungsvoll für die bekannten Notch-1-Funktionen (Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

Doch was für eine Rolle spielt nun Notch-1 bei der Skelettmuskeladaptation? Conboy und Rando stellten im Jahr 2002 fest, dass Satellitenzellaktivierung, Proliferation und Zelldeterminierung durch den Notch-1-Signaltransduktionsweg reguliert werden. 2003 zeigten Conboy et al., dass eine Abnahme des Notch-1-Signals in älteren Muskeln zu einem altersbedingten Rückgang der Muskelregeneration führt. Zwei weitere Gruppen konnten zeigen, dass der Notch-1-Signaltransduktionsweg Muskeldifferenzierung von C2C12 Myoblasten hemmt (Shawber et al., 1996; Nofziger et al., 1999). Diese Untersuchungen zeigen die Bedeutung des Notch-1-Signaltransduktionsweges innerhalb der Adaptation der Skelettmuskulatur.

Delta-1 ist, wie in Kapitel 1.2.5 bereits erwähnt, ein Protein, wobei es sich ebenso wie bei Notch-1 auch bei dem Delta-1-Genprodukt um ein Transmembranprotein handelt, das eine extrazelluläre Domäne besitzt und eine repetitive Sequenz aufweist. Dem Genprodukt von Delta-1 fällt die Rolle des Liganden zu.

1.2.7 Sox-8

Die Sox-Gene sind verwandt mit der Familie der SRY (sex-determining region Y) Gene, die für die Festlegung des Geschlechts in Säugetieren verantwortlich sind (Schepers et al., 2000). Diese Gene beinhalten eine Sequenz, die den HMG (high mobility group) -Box Bereich kodiert, welcher für eine sequenzspezifische DNA Bindungsaktivität zuständig ist. Sox-Gene kodieren vermutlich transkriptionale Regulatoren, die in Verbindung mit der Entwicklung von Stammzellen zu spezialisierten Zellen stehen. Diese Familie, bestehend aus ca. 30 Mitgliedern, wird in 8 Gruppen unterteilt (Schepers et al., 2002).

Eine relativ gut charakterisierte Gruppe der Sox Proteine ist die Untergruppe E, die aus drei Mitgliedern – Sox-8, Sox-9 und Sox-10 – besteht. Sox-8 wurde als letztes (Pfeifer et al., 2000; Schepers et al., 2000) und in Mäusen, Hühnern und beim Menschen identifiziert (Bell et al., 2000; Pfeifer et al., 2000; Schepers et al., 2000).

Bestehende Untersuchungen über die Lokalisation von Sox-8 sind bisher teilweise widersprüchlich, doch es ist zu vermuten, dass Sox-8 während der Entwicklung in unterschiedlichen Organen und Geweben exprimiert wird, wie

z.B. im Nervensystem, im Auge, in den männlichen Keimdrüsen, in der Niere etc. Im erwachsenen Menschen findet man es vorwiegend im Gehirn und in den Hoden (Sock et al., 2001). Außerdem wird Sox-8 ebenso im Skelettmuskel exprimiert. Im Gegensatz dazu konnte Sox-8 im Herzmuskel und in der glatten Muskulatur nicht gefunden werden. Sox-8 ist ein spezifischer Marker für Satellitenzellen und hemmt die Muskelentwicklung (Schmidt et al., 2003). Die Bildung von Sox-8 wurde sowohl in nicht differenzierten als auch in differenzierten C2C12 Myoblasten nachgewiesen, wobei in differenzierten Zellen eine Reduktion der Expression festgestellt werden konnte. Die Untersuchungen von Schmidt et al. 2003 unterstützen ebenso die Vermutung, dass Sox-8 als spezifischer negativer Regulator fungiert und die Myoblastendifferenzierung hemmt.

1.3 Androgene und anabole Steroide

Das Wachstum der Skelettmuskulatur wird unter anderem durch Hormone beeinflusst. Hormone sind chemische Botenstoffe, die Signale von Zelle zu Zelle weiterleiten. Sie regulieren z.B. den Calcium-, Phosphat-, Wasser- und Elektrolythaushalt, sowie Gewebewachstum und -differenzierung. Die Steroidhormone bilden eine Klasse von Hormonen mit vielfältigen biochemischen Aufgaben. Sie umfasst z.B. Vitamine oder Sexualhormone (Östrogene, Androgene etc.); diese zählen zu einer Klasse von Naturstoffen, die in Tieren, Pflanzen und Pilzen vorkommt. Steroide, die eine starre Molekülstruktur haben, basieren (nahezu alle) auf Cholesterin (Abb. 5).

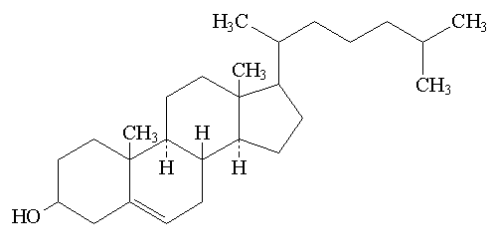


Abb. 5: Strukturformel des Cholesterins (www.namensreaktionen.de/cholesterin.html, 26.03.06)

Zu den Steroidhormonen zählen u.a. die Glucocorticoide, die Mineralocorticoide, die Gestagene, die Östrogene und die Androgene. Letztere sind per klassischer Definition männliche Geschlechtshormone, welche die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale und die Fortpflanzungsfunktionen des Mannes regulieren und allgemeine Auswirkungen auf den Stoffwechsel haben. Die Bildung erfolgt vorwiegend in den Hoden. Das wichtigste körpereigene Androgen ist das Testosteron.

Androgene wie auch Östrogene werden bei beiden Geschlechtern gebildet, jedoch in unterschiedlicher Menge.

Als anabole Steroide werden synthetisch hergestellte Steroide bezeichnet, die zur Steigerung von Muskelmasse beitragen, jedoch eine geringe ausgeprägte geschlechtsspezifische Wirkung aufweisen.

1.3.1 Androgene

Das wichtigste Gewebe zur Bildung der Steroidhormone ist neben den Hoden die Nebennierenrinde. Verschiedene Enzyme, wie Hydroxylasen, Desmolasen, Dehydrogenasen, Lyasen und Reduktasen beeinflussen dort die Bildung eines Hormons. Bei Frauen wird Testosteron in den Ovarien (Eierstöcken) und der Nebennierenrinde produziert. Durch Androgene wird das Muskel- und Knochenwachstum gefördert, d.h. sie sind anabol wirksam (Yin et al., 2003). Testosteron ist das am häufigsten zirkulierende Androgen, das in den Leydigischen Zellen durch Stimulation des luteinisierenden Hormons gebildet wird (Mooradian et al., 1987).

Androgene binden an den Androgenrezeptor (AR) und bilden mit diesem einen Komplex, der entweder an ein Promotor- oder ein Enhancer-Element der Zielgene bindet, um deren Transkription zu regulieren. Der AR ist wie die meisten Steroidrezeptoren aus einzelnen funktionalen Domänen aufgebaut: einer N-terminalen Domäne, welche die transkriptionale Aktivität reguliert, einer zentralen und hochkonservierten DNA-Bindungsdomäne, einem kurzen Gelenkbereich, sowie einem langen C-terminalen Bereich, der Ligandenbindungsdomäne (Evans, 1988). Die klassische Funktion des AR ist die Modulation der Expression von Zielgenen vorwiegend in Geschlechtsorganen.

Doch auch im Skelettmuskel der Ratte konnte der Androgenrezeptor charakterisiert werden (Krieg, 1976; Michel und Baulieu, 1980). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass der AR in Satellitenzellen von Schweinen zu finden ist (Doumit et al., 1996).

Über die Regulation von Myostatin und Androgenen gibt es eine Studie von Marcell et al. (2001), die jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Myostatin und der AR mRNA Expression in gesunden älteren Männern zeigen konnte. Möglicherweise hat Myostatin einen direkten Zielbereich an dem AR, da sich das androgen-responsive Element – neben anderen responsiven Elementen – im menschlichen Myostatinpromotor befindet (Ma et al., 2001). Um dieser Frage nachzugehen, wurden in der vorliegenden Arbeit *in vitro* Versuche in der murinen Myoblasten Zelllinie C2C12 (s. Kap. 2.6) durchgeführt.

1.3.2 Androgen-anabole Steroide

Androgen-anabole Steroide (AAS) sind synthetische Derivate des Hormons Testosteron. Im medizinischen Bereich werden sie z.B. bei einer Insuffizienz der Hoden, bei Wachstumsstörungen oder körperlicher Schwäche angewendet. AAS gehören zur Gruppe der Anabolika und werden im Sport zur Leistungssteigerung eingesetzt. Eine Auflistung der verbotenen Dopingsubstanzen findet man auf der „Verbotsliste 2006“ des Welt-Anti-Doping-Codes (internationaler Standard). Der Missbrauch von anabolen Steroiden führt zu einer Reihe von mentalen und physischen Nebenwirkungen. Weitere Nebenwirkungen sind z.B. Herzinfarkte, hervorgerufen durch ein zu schnelles Wachstum des Herzmuskels, Schädigungen in der Leber, hormonelle Störungen (Effemination bei Männern und Androgenisierung bei Frauen) sowie Störungen der Niere. Nandrolon (19-Nortestosteron) war das erste synthetische Analogon von Testosteron, welches eine ausreichend anabole-androgene Dissoziation in Tierexperimenten aufwies (Hershberger et al., 1953). Der „Hershberger-Assay“ ist ein klassischer Test (s. Kap. 2.2.3) und dient heute noch zur Charakterisierung der anabolen und/oder androgenen Wirksamkeit von Substanzen. In der vorliegenden Arbeit wurden einige Substanzen mit diesem Verfahren auf ihre Wirkung hin untersucht.

1.3.3 Anabole Steroide im Sport

Das Dopingproblem im Sport, sowie die Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln durch Athleten, stellt ein großes Problem dar, vor allem wenn man bedenkt, dass viele Nahrungsergänzungsmittel Substanzen enthalten können, die auf der Dopingliste stehen (Pipe und Ayotte, 2002). Der Anstieg dieses Trends des Missbrauchs ist u.a. auf eine Verkaufszunahme von pflanzlicher Medizin in den USA zurückzuführen (Gurley et al., 1998). Einige Nahrungsergänzungsmittel enthalten Substanzen, die bei erhöhter Einnahme über einen längeren Zeitraum mit einem hohen Gesundheitsrisiko verbunden sind; einige enthalten hohe Dosen von giftigen Inhaltsstoffen (Maughan, 2005). Trotzdem ist bei Profi-Sportlern die Experimentierfreudigkeit, was solche Nahrungsergänzungsmittel betrifft, erstaunlich hoch, doch sie riskieren damit nicht nur ihre sportliche Karriere, sondern auch ihre Ge-

sundheit. Pharmakologische Stoffe, wie Nandrolon, Methandienon, Stanozolol und deren Metaboliten sind v.a. in Bodybuildingkreisen bekannte anabole Steroide, die ursprünglich zu medizinischen Zwecken entwickelt wurden. Einige Steroide wie Trenbolon wurden ebenso von diversen Sportlern missbraucht. Eigens zu Dopingzwecken hergestellte synthetische Steroidhormone (sog. „Designersteroide“), wie z.B. Tetrahydrogestrinon oder Desoxymethyltestosteron, blieben jahrelang im Untergrund des Leistungssports von IOC und WADA unentdeckt. Dies macht auch die Grenzen etablierter Nachweisverfahren deutlich. Steroide mit unbekannter chemischer Struktur können in Routinetests nicht nachgewiesen werden.

Aus pharmakologischer und sportwissenschaftlicher Sicht liegen bisher nur unzureichende Kenntnisse über die leistungssteigernde und biologische Wirkung von anabolen Steroiden vor.

1.4 Beschreibung der untersuchten Androgene, anabole Steroide und Anti-Androgene

1.4.1 Dihydrotestosteron

Dihydrotestosteron (DHT), auch bekannt als 5- α Dihydrotestosteron oder 7 β -hydroxy-5 α -androstano-3-one, ist ein Hormon, das in der Prostata sowie in den Hoden, den Haarfollikeln und in der Nebenniere gebildet wird. DHT, ein biologisch aktiver Metabolit des Testosterons, wird gebildet, wenn das Enzym 5- α Reduktase Testosteron in DHT umwandelt (s. Abb 6). DHT gehört zur Klasse der Androgene und ist durch seine hohe Affinität zum Androgenrezeptor ca. 30fach potenter als Testosteron.

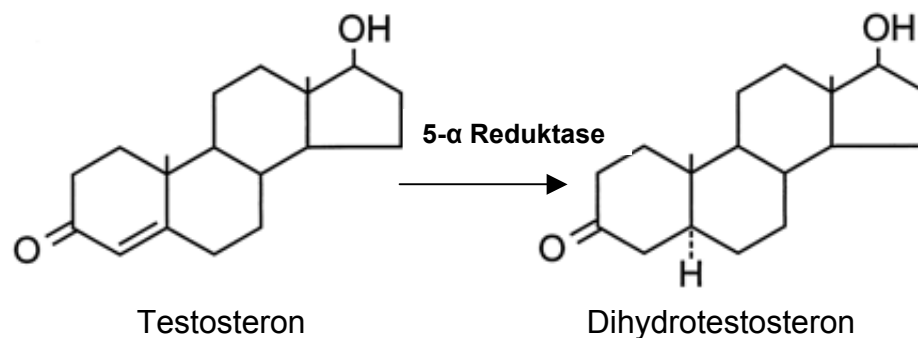


Abb. 6: Bildung von DHT (rechts) aus Testosteron (links) durch das Enzym 5- α Reduktase (Strukturformeln aus: <http://www.transgenderzone.com/library/ae/images/fig3.gif>; 26.03. 06)

1.4.2 Tetrahydrogestrinon

Tetrahydrogestrinon (THG) ist ein künstlich hergestelltes Steroidhormon, das ausschließlich zu Dopingzwecken synthetisiert und erst im Oktober 2003 von der USADA (United States Anti Doping Agency) entdeckt wurde. Daher wird THG auch als „Designer Steroid“ bezeichnet. Die Ausgangssubstanz ist das Gestrinon (s. Abb. 7), bei dem vermutlich vier Wasserstoffatome an die Ethinylgruppe an Position C-17 des Steroids addiert wurden (Dopinginformation des Instituts für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln).

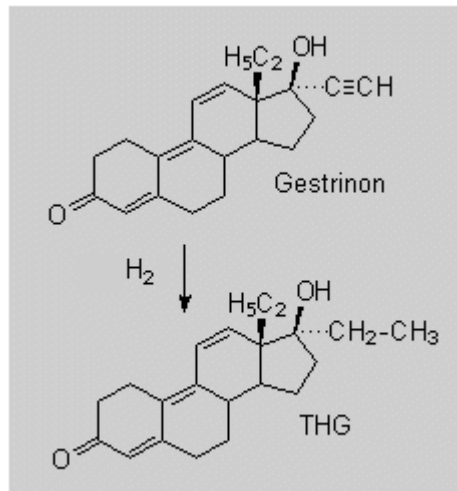


Abb. 7: Herstellung von THG aus der Ausgangssubstanz Gestrinon (<http://www.dshs-koeln.de/biochemie/index.html>; 26.03.2006)

Bisher liegen jedoch aus pharmakologischer und sportwissenschaftlicher Sicht nur unzureichende Kenntnisse über die leistungssteigernde und biologische Wirkung von THG vor. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass THG kein spezifischer Androgenrezeptor-Agonist ist, sondern eine Bindungsaffinität zu unterschiedlichen Rezeptoren (Progesteron- und Mineralcorticoidrezeptor), speziell zum Glucocorticoidrezeptor aufweist (Friedel et al., 2005). Folglich sind bei einer Einnahme massive Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen. *In vivo* Daten weisen darauf hin, dass THG eine anabole wie auch androgene Wirkung besitzt (Friedel et al., 2005).

1.4.3 Desoxymethyltestosteron

Wie THG ist auch DMT (Desoxymethyltestosteron) (17α-methyl-5α-androst-2-en-17β-ol), bekannt als „Madol“, ein weiteres „Designer Steroid“, das speziell für den Einsatz im Sport synthetisiert worden ist. Sekera et al. 2005 beschrieben seine Entdeckung, Synthese und Detektierung im Urin.

1.4.4 Norandrostendion

Norandrostendion (NOR) zählt zu den Prohormonen. Mit der Bezeichnung Prohormon sind so genannte „Testosteron-Vorläufer“ oder auch dem Nandrolon verwandte Verbindungen gemeint. Dabei handelt es sich um syn-

thetische Analoga endogener Steroide. Meist werden sie oral appliziert und erreichen eine der Anabolika vergleichbare Wirksamkeit. Seit einiger Zeit sind diese Substanzgruppen auch als Spray erhältlich.

Norandrostendion bezieht sich auf zwei Steroidisomere, dem Delta-4- und dem Delta-5 Isomer. Der Unterschied zwischen den beiden Isomeren liegt in der Position der Doppelbindung in der Ringstruktur. Delta-4 besitzt eine Doppelbindung zwischen dem 4. und 5. C-Atom; wobei bei dem Delta-5-Isomer die Doppelbindung zwischen dem 5. und 6. C-Atom liegt. Norandrostendion wird aus Androstendion in der Nebenniere und den Gonaden gebildet. Es wird durch einen Aromatase-Komplex zu Estron metabolisiert. Das Delta-4-, wie auch das Delta-5-Norandrostendion kann weiterhin durch das Enzym 17- β -hydroxysteroidhydrogenase zu Nortestosteron, auch bekannt als Nandrolon, metabolisiert werden.

1.4.5 Flutamid

Flutamid (FLU), 3'-trifluoromethyl-4'-nitro-2-methylpropinoyl-anilide, ist ein nicht steroidales Antiandrogen (Neri et al., 1972, Neri und Monahan, 1972). Flutamid weist keine weiteren hormonellen Aktivitäten auf und ist weltweit als Medikament für Patienten mit fortgeschrittenem Prostatakrebs anerkannt (Labrie et al., 1989; Chen et al., 2004; Pitts, 2004), wenn es mit unterschiedlichen Agonisten des LH-RH (luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon) kombiniert wird. Dieses Antiandrogen wird ebenso in Kombination mit oralen Kontrazeptiva für die Behandlung von Hirsutismus (Andrade et al., 1999) und krankhafter Hyperplasie der Prostata (Caine et al., 1975; Bonard und Almeida, 1975) eingesetzt.

1.5 Zielsetzungen der Arbeit

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Wirkmechanismen der Skelettmuskeladaptation durch Training, durch anabole Steroide und durch Kombination von Training und der Applikation von anabolen Steroiden.

Konkret sollte folgenden Fragestellungen mit Hilfe verschiedener *in vitro* und *in vivo* Testsysteme nachgegangen werden:

1. Welchen Einfluss hat ein sportliches Training auf den mRNA Gehalt von Genen (Myostatin und assoziierte Gene), die eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Satellitenzellen spielen?

Zur Klärung dieser Frage wurde ein Zeitreihen-Schwimmexperiment mit Ratten durchgeführt und den mRNA Gehalt ausgewählter Gene, die bei der Proliferation und Differenzierung der Satellitenzellen eine wichtige Rolle spielen, mittels semiquantitativer Real-Time PCR analysiert. Die mRNA Gehalte von Notch-1, Delta-1, Sox-8 und Myostatin wurden im *M. gastrocnemius* bestimmt.

2. Zeigen die ausgewählten Androgene und anabolen Substanzen in der Myoblastenzelllinie C2C12 einen Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation der Zellen? Besteht hierbei ein Dosis-Wirkungsverhältnis? Wie sind die Wirkstärken der einzelnen Substanzen gegenüber Dihydrotestosteron (DHT) und kann man die Effekte ggf. durch ein Antiandrogen antagonisieren?

Um Aufschluss über die Fragen zu bekommen, wurden verschiedene Experimente *in vitro* in der Zelllinie C2C12 durchgeführt. Um die Proliferationsrate zu messen, wurde in unbehandelten und behandelten Zellen die verschiedenen Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Zur Klärung des Differenzierungszustandes der Skelettmuskelzellen wurde die Creatin-Kinase Konzentration gemessen, die Aufschluss über den Differenzierungszustand der Zellen liefert. Weiterhin wurde der mRNA Gehalt von Genen, die bei der Satellitenzellendifferenzierung eine wichtige Rolle spielen,

untersucht. Antagonisierungsexperimente wurden mit dem Antiandrogen Flutamid durchgeführt und der mRNA Gehalt mittels semiquantitativer Real-Time PCR analysiert.

3. Sind die eingesetzten Substanzen anabol und/oder androgen wirksam? Wie wirken diese Substanzen *in vivo* auf den mRNA Gehalt in der Skelettmuskulatur? Existieren mögliche Nebenwirkungen bei der Einnahme?

Um die untersuchten Substanzen näher zu charakterisieren, wurde mit einigen ausgewählten Substanzen ein Rezeptorbindungstest und ein klassischer Hershberger-Assay im Rattenmodell durchgeführt und die Substanzen auf ihre androgene und/oder anabole Wirkung hin getestet. Dazu wurden die Gewichte der Prostata, der Samenblase und des *M. levator ani* bestimmt. Der mRNA Gehalt der ausgewählten Gene wurde im *M. gastrocnemius* analysiert. Um eine Vorstellung über mögliche Nebenwirkungen zu erhalten, wurde der mRNA Gehalt der Tyrosin Aminotransferase (TAT) in der Leber sowie die Lebergewichte gemessen.

4. Inwieweit hat die Kombination von Training und der Applikation von Testosteron-Propionat (TP) Einfluss auf den mRNA Gehalt spezifischer Gene in der Skelettmuskulatur? Hat eine supraphysiologische Dosis (Simulation eines gedopten Sportlers) in der Kombination mit Training einen anderen Einfluss auf die Muster des mRNA Gehalts in der Skelettmuskulatur als eine niedrige Behandlungsdosis?

Um diese Frage beantworten zu können, wurde ein weiteres Tierexperiment durchgeführt, wobei orchiektomierte und intakte Tiere mit TP behandelt wurden und ein dreitägiges Schwimmtraining absolvierten. Eine unbehandelte Gruppe und eine behandelte nicht trainierte Gruppe dienten jeweils als Kontrollgruppe. Der mRNA Gehalt von Myostatin wurde wiederum im *M. gastrocnemius* bestimmt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tierhaltung

Für alle Tierexperimente wurden männliche Wistar Ratten aus den Janvier Laboratorien (le Genest. St. Isle, France) verwendet und unter kontrollierten Bedingungen gehalten. Die Raumtemperatur lag bei $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, einer relativen Luftfeuchte von 50-80% und einem Hell-Dunkel-Zyklus, der auf jeweils 12 Stunden eingestellt war. Die Tiere wurden in unterschiedlichen Versuchsserien mit verschiedenen Protokollen trainiert (vgl. Kap. 2.2). Nach Anlieferung hatten die Tiere eine Akklimatisationszeit von sieben Tagen. Die Tiere hatten freien Zugang zu Standardfutter für Nagetiere der Firma Ssniff (Ssniff R10-Diet, Ssniff GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser *ad libitum*. Die Tiere wurden nach den Vorschriften der Europäischen Union für Gesundheit und Laborbenutzung gehalten und die Studien wurden von der Regionalbehörde genehmigt.

2.2 Trainingsprotokolle

2.2.1 Experiment zur Analyse zeitabhängiger Trainingseffekte auf den mRNA Gehalt von Genen, welche bei der Differenzierung von Satellitenzellen eine entscheidende Rolle spielen

Es wurden 20 männliche Wistar Ratten (Gewicht: $421\text{g} \pm 24\text{g}$; ca. 12 Wochen alt) randomisiert (d.h. nach dem Zufallsprinzip ausgewählt) und in vier Gruppen aufgeteilt (s. Tab. 1) – eine Kontrollgruppe und drei Trainingsgruppen (jeweils $n=5$). Die unterschiedlichen Gruppen wurden in unterschiedlichen Käfigen gehalten. Trainingsgruppe 1 absolvierte ein Schwimmtraining und die Tiere wurden 7h nach dem Training dekapitiert. Die zweite Trainingsgruppe führte ebenfalls ein einmaliges Schwimmtraining durch, wurde jedoch erst nach 24h dekapitiert. Die letzte Trainingsgruppe (3) durchlief ein dreitägiges Schwimmtraining mit jeweils zwei Trainingseinheiten pro Tag (morgens und abends) und wurde 24h nach dem letzten Training dekapitiert. Eine Trainingseinheit bestand aus 2 x 45 min Schwimmen mit einer Erholungspause von 10 min, in der die Tiere abgetrocknet und warm gehalten wurden (s. auch Tab. 1, Kap. 3.1).

Die Tiere schwammen in Wasserbecken mit einer Temperatur von 34-37°C, wobei die Temperatur während der gesamten Belastung konstant gehalten wurde. Die Becken wurden so weit mit Wasser gefüllt, dass die Tiere keine Möglichkeit hatten sich mit ihren Schwänzen am Boden abzustützen und so das Training zu beeinflussen.

Nach dem Training wurden die Tiere sofort abgetrocknet und wieder in die Käfige gesetzt. Die Kontrollgruppe wurde einmalig für 5 min in das Wasser gesetzt, um die Stresssituation und die Berührung mit dem Wasser zu simulieren. Vor und nach den Schwimmeinheiten hatten die Ratten freien Zugang zu Nahrung und Wasser.

2.2.2 Experiment zur Analyse des mRNA Gehalts von Myostatin im *M. gastrocnemius* nach einer Applikation von Testosteron Propionat kombiniert mit einem Training

Mit diesem Versuch wurde der Einfluss von Testosteron Propionat (TP) in Kombination mit Training auf unterschiedliche Gene, die bei der Proliferation und Differenzierung der Skelettmuskulatur eine wichtige Rolle spielen, untersucht. Für die Untersuchung wurden acht Gruppen à sechs Tiere randomisiert, die im Folgenden aufgelistet sind:

Gruppe 1: orchiektomierte Tiere (1. Kontrollgruppe)

Gruppe 2: orchiektomierte Tiere, die ein Training absolvierten

Gruppe 3: orchiektomierte Tiere, die mit TP behandelt wurden

Gruppe 4: orchiektomierte Tiere, die mit TP behandelt wurden und ein Training absolvierten

Gruppe 5: intakte Tiere (2. Kontrollgruppe)

Gruppe 6: intakte Tiere, die ein Training absolvierten

Gruppe 7: intakte Tiere, die mit TP behandelt wurden

Gruppe 8: intakte Tiere, die mit TP behandelt wurden und ein Training absolvierten.

Es wurden orchiektomierte Tiere eingesetzt, um die Einflussnahme endogener Hormonen ausschließen zu können. Die behandelten orchiektomierten Tiere bekamen eine TP-Dosis von 1 mg/kg/KG pro Tag (über einen Zeitraum von 7 Tagen) und die intakten Tiere eine von 10 mg/kg/KG pro Tag zur Simulation eines gedopten Athleten (über einen Zeitraum von 7 Tagen). Die Trai-

ningsgruppen absolvierten ein Schwimmtraining über 3 Tage; 2 Trainingseinheiten (2 x 45 min) pro Tag mit 10-minütiger Pause pro Trainingseinheit. Die folgende Abbildung 8 zeigt die Tiere beim Schwimmtraining und deren Versorgung nach Beendigung der Trainingseinheit.

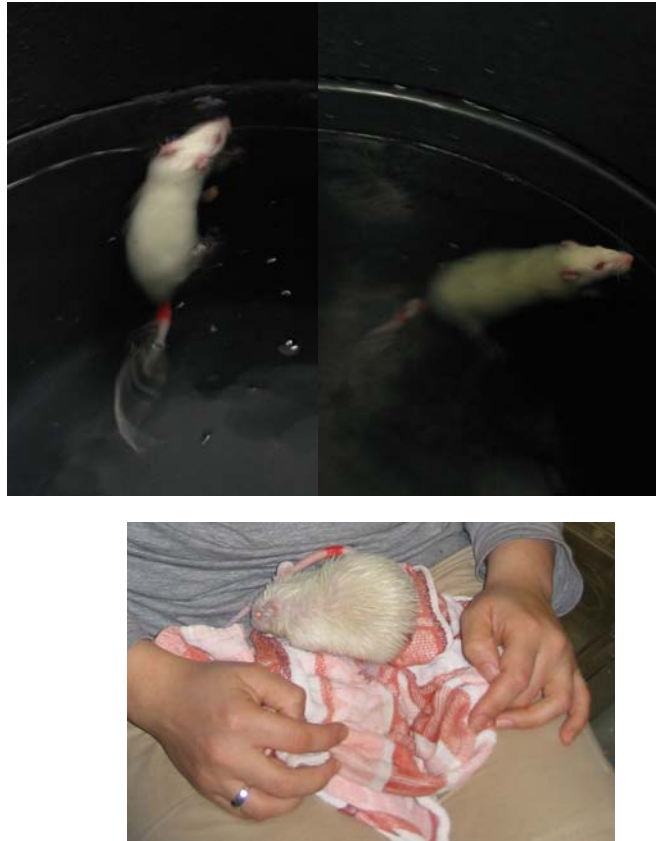


Abb. 8: Schwimmtraining (oben), Abtrocknen des Tieres nach dem Training (unten)

2.2.3 Durchführung eines klassischen Hershberger Assays zur Charakterisierung anaboler Substanzen *in vivo*

Der Hershberger Assay wurde nach den Vorschriften für den Hershberger Assay für Nagetiere durchgeführt (Yamasaki, 2003) und stellt einen klassischen Test dar, um die Androgenität und die anabole Wirkung von Substanzen zu testen. Die Ratten wurden orchiektomiert. Nach 7 Tagen wurden die Tiere in eine Behandlungsgruppe und eine Kontrollgruppe – pro Gruppe jeweils 6 Tiere – eingeteilt. Zur subkutanen Verabreichung wurden die zu testenden Substanzen (TP, THG, Norandrostendion, Desoxymethyltestosteron, 1-Testosteron und Propyltrenbolon) in Ethanol gelöst und mit Erdnussöl appliziert. Die Tiere wurden einmal pro Tag mit den Substanzen in einer

Konzentration von 1 mg/kg/KG behandelt. Die Kontrollgruppe bekam eine Injektion, die nur aus Ethanol und Erdnussöl bestand. Die Behandlungsdauer betrug 12 Tage.

2.3 Organentnahme

Die Tiere wurden durch Dekapitation 24 h nach Versuchsende (Ausnahme: Schwimmversuch 1. Trainingsgruppe 7 h nach Trainingsende) getötet (ungefähr zur jeweils gleichen Tageszeit: zwischen 9.00 und 11.00 Uhr). Für alle drei Experimente wurde das Gewicht der Tiere bestimmt und unterschiedliche Organe entnommen. Bei allen Versuchen wurde die Muskulatur (medialer und lateraler Teil des *M. gastrocnemius*, Abb. 9) und im Hershberger Assay zusätzlich der *M. levator ani*, die Prostata, die Samenblase sowie die Leber entnommen. Die Gewichte wurden sofort bestimmt und die Organe direkt in flüssigem Stickstoff (N₂) tiefgefroren und für den späteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

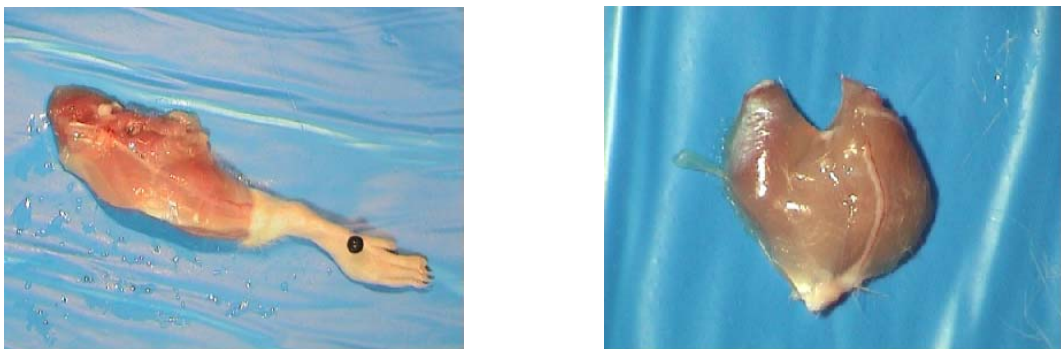


Abb. 9: Hinterbein der Ratte (links) und präparierter *M. gastrocnemius* (rechts)

2.4 mRNA Analyse

2.4.1 RNA-Isolation mittels Trizol®

Das Ziel der RNA-Präparation ist es, die Ribonukleinsäure aus den zuvor präparierten Muskelzellen zu isolieren. Das zu untersuchende Gewebe wurde in flüssigen Stickstoff gegeben, damit es während der Präparation nicht auftaut. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe eines Mörsers oder Hammers zerkleinert. Davon wurden 70-90 mg abgewogen und in ein Teflon-Gefäß gelegt. Das Gefäß wurde verschraubt und für 30-40 s in einen Dis-

membrator (Firma: Braun) gespannt, in dem das Gewebe mit einer Stahlkugel homogenisiert wurde. Danach wurde zu dem Gewebe 1000 µl Trizol® (Firma: Invitrogen) gegeben. Trizol® hat die Aufgabe, die Zellmembranen aufzubrechen. Die Inkubationszeit betrug bei Raumtemperatur ca. 5 min bis das Trizol®-Gewebe gemischt war. Die Zellen wurden mit einer 5 ml Spritze plus Kanüle suspendiert und anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (Volumen 2 ml) überführt.

Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß von Hand 15x umgedreht und anschließend bei Raumtemperatur 2-3 min inkubiert. Durch die folgende Zentrifugation (15 min, 2-8°C, 12000 x g, „Centrifuge 5417 R“ der Firma Eppendorf) wurden Polysaccharide, extrazelluläre Membranen und hochmolekulare DNA abgetrennt. Durch das Zentrifugieren erhielt man drei Schichten in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen: die oberste Schicht mit der wässrigen Phase, welche die RNA enthält. Diese wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die übrigen zwei Schichten wurden verworfen. Die RNA wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol in einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 2-8°C und 12000 x g. Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt, um ihn später auf das RNA-Gel aufzutragen. Das RNA-Pellet wurde mit 1000 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut 5 min bei 2-8°C und 7500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 15-20 min bei Raumtemperatur im Eppendorf-Reaktionsgefäß getrocknet. Anschließend wurde das RNA-Pellet je nach Größe in 30 bis 50 µl DEPC (Diethylpyrocarbonat)-behandeltem Wasser resuspendiert. Wurde die RNA-Konzentration nicht sofort bestimmt, so konnte das Eppendorf-Reaktionsgefäß bei - 80° eingefroren werden; dies konnte zum weiteren Lösen des Pellets beitragen.

RNA-Isolierung aus Zellen

Zur Präparation von RNA aus Zellen wurde zuerst das Medium abgesaugt und anschließend 1 ml Trizol® in die 75 cm² Zellkulturflasche gegeben. Nach einer Einwirkzeit von ca. 3 - 5 min wurde das Trizol mit den Zellen abgeschabt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Präparation der RNA erfolgt wie oben beschrieben.

2.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Nach dem Kalibrieren des Spektrophotometers (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) mit DEPC-Wasser konnte die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und des Reinheitsgrades in Quarzglasküvetten erfolgen. Dafür wurden die Proben im jeweiligen Aufnahmebuffer (hier: DEPC) 1:1000 verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen.

Der Quotient aus den Absorptionen gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der RNA und sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen. Erhebliche Schwankungen der Messungen könnten auf eine nicht vollständig gelöste RNA hinweisen.

Um visuell die Qualität der RNA zu überprüfen, wurde ein so genanntes RNA-Kontrollgel gegossen. Dazu wurden 1-3 µg RNA mit 2 µl 40%iger Succroselösung und Farbstoffen (Saccharose, Bromphenolblau, Xylencyanol) versetzt, mit TAE-Puffer auf insgesamt 12 µl aufgefüllt und auf ein 2%iges Agarosegel, das mit Ethidiumbromid (EtBr) [0,3 µg/ml] vermischt ist, aufgetragen.

In einer Gelkammer der Firma Biometra wurde die RNA bei einer Spannung von 75V in 1×TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Außer der RNA wurde auch ein Größenstandard als Marker und die Isopropanolproben aufgetragen. Unter ultraviolettem Licht wurde die 28S und 18S Bande der ribosomalen RNA sichtbar gemacht. An der Stelle, an der das Isopropanol aufgetragen wurde, sollten auf dem Bild keine Banden zu erkennen sein. Lassen sich trotzdem Banden erkennen, so war dies ein Indiz dafür, dass sich noch ein Rest der RNA in diesem Teil der Lösung befand und nicht die gesamte RNA vollständig gefällt wurde.

Anhand des Bandenmusters und der Bandenintensität kann man eine eventuelle Degradierung der RNA und Konzentrationsunterschiede in den einzelnen RNA-Proben erkannt werden.

2.4.3 DNase-Verdau

Da es bei der RNA-Präparation mittels Trizol® häufig zu DNA-Kontaminationen kommt, musste die RNA-Probe in einer Test-PCR auf ihren DNA-Gehalt untersucht werden.

Hierbei wurde in einer PCR (s. auch Kap. 2.4.6) statt cDNA 1 µl RNA-Mix pipettiert. Die Primer des Kontrollgens Cyclophilin (Cyc) wurden als interner

Standard verwendet. Sollte eine DNA-Kontamination vorhanden sein, so erkennt man diese an einem 212 bp (Basenpaare) großen Amplikon. Bei einer Amplifikation und somit einem Signal auf dem 2%igen Agarosegel befand sich DNA in der RNA-Probe. Um die Ergebnisse nicht zu verfälschen, sollte diese dann durch einen DNA-Verdau mit Hilfe von Desoxyribonuklease I abgebaut werden.

Der bei der DNA-Kontamination erforderliche DNase-Verdau (Firma Invitrogen) setzte sich wie folgt zusammen:

3 µg RNA

1 µl DNase Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 20 mM MgCl₂; 500 mM KCl)

1 µl DNase I [1U/µl]

Dieser Ansatz wird mit DEPC-behandeltem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert.

Die DNase wurde durch die Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA (Ethyldiamin-tetraessigsäure) und die Erwärmung auf 65°C für 5 min im Thermocycler der Firma Perkin Elmer inaktiviert. Dieser Reaktionsansatz konnte sofort für die cDNA-Synthese eingesetzt werden.

2.4.4 cDNA Synthese

Das Umschreiben von RNA in DNA, also die Synthese von cDNA ist ein fundamentaler Ausgangspunkt, um die Sequenzen von Transkripten zu klonen und zu sequenzieren oder in der PCR zu amplifizieren. Bei der Synthese der cDNA nutzt man eine charakteristische Eigenschaft von eukaryontischen mRNAs - nämlich die Aneinanderreihung von Adeninresten am 3'-Ende der mRNA. Dies geschieht mit Hilfe eines so genannten oligo(dT)-Primers, der ein Oligonukleotid aus Desoxythymidin-Nukleotiden darstellt und der komplementär an das poly(A)-Ende der mRNA bindet.

Für die cDNA-Synthese wurde das SUPERSRIPT II™ Preamplification System der Firma Invitrogen verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden oligo(dT)-Primer verwendet, um die cDNA-Synthese durchzuführen. Oligo(dT)-Primer sind spezifische Primer, die nur

mRNA in cDNA umschreiben, da sie an die 3'-poly(A)-Enden der mRNA binden.

Für die Synthese wurden – je nach vorhandener Menge – 3-5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Dazu wurde 1 µl oligo(dT)-Primer (0,5 µg/µl) gegeben und mit DEPC-H₂O auf 12 µl aufgefüllt. Die Proben wurden für 10 min bei 70°C inkubiert und für 1 min auf 4°C abgekühlt. Anschließend wurden je Probe 7 µl Reaktionspuffer zugegeben.

Reaktionspuffer pro Ansatz

2 µl	10 x RT Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCl)
2 µl	25 mM MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)
1 µl	10 mM dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
2 µl	<u>0,1 M DTT (Dithiothreitol)</u>
7 µl	Gesamtmenge

Die Erst-Strang-Synthese wird mit Hilfe des oligo(dT)-Primers durchgeführt. Als nächstes werden die Proben 5 min auf 42°C erhitzt, so dass sich die Primer anlagern können. Anschließend werden 0,8 µl Superscript™ II RT (200 U) zu jeder Probe hinzugefügt.

Die eigentliche cDNA-Synthese erfolgt bei 42°C für 50 min. Weiterhin werden die Reaktionsansätze für 15 min auf 70°C erhitzt, um die Synthese zu beenden. Durch Zugabe von 0,8 µl RNase H und einer Inkubation bei 37°C für 20 min erfolgt der Abbau der mRNA-Matrize. Die Aufbewahrung der cDNA erfolgt bei –20°C.

2.4.5 Primer

Die verwendeten Primer werden aus der cDNA-Sequenz der entsprechenden Gene abgeleitet. Die Sequenzinformationen stammen aus der EMBL-Gendatenbank. Bei der Auswahl der Primer werden folgende Aspekte berücksichtigt:

1. Die Länge der Primer sollte ungefähr 20-25 Basenpaare betragen; weniger als 18 bp und mehr als 25 bp führen zu schlechteren Ergebnissen.

2. Die Bindungsstelle sollte möglichst nahe am 3'-Ende (nach Möglichkeit eine G- oder C-Base) des Gens liegen, da in der cDNA-Synthese polyd(T)-Primer verwendet werden.
3. Das 3'-Ende sollte stärker hybridisieren als das 5'-Ende, und deshalb sollten mehrere T-Basen am 3'-Ende vermieden werden.
4. Das Verhältnis von Guanin und Cytosin zu Adenin und Thymin in den Nukleotiden sollte ungefähr 1:1 betragen.
5. Die Primer sollten möglichst keine repetitiven Sequenzen, d.h. Cluster (mehr als 3 oder 4 Basen, v.a. von Guanin) enthalten.
6. Primer dürfen keine sich selbst komplementierenden Sequenzen (Palindrome) aufweisen und die Schmelztemperatur sollte zwischen 55-70 °C liegen.
7. Es sollte überprüft werden, ob die Primer-Sequenz ausschließlich auf eine Stelle im „Template“ passt („Insert“).
8. Der Abstand der forward- und reverse-Primer (sense- und antisense-Primer) und damit die Länge des Amplikons sollte zwischen 200 und 400 bp betragen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Die Primer werden in sterilem Wasser (Ampuwa®) der Firma Fresenius gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/μl verdünnt. Die Sequenzen sind im Folgenden beschrieben:

Primer	Fragmentlänge
Cyclophilin	
5'- GGA TTC ATG TGC CAG GGT GG -3' (forward)	
5'- CAC ATG CTT GCC ATC CAG CC -3' (reverse)	212 bp
Myostatin	
5'- TAA CCT TCC CAG GAC CAG GA -3' (forward)	
5'- CAC TCT CCA GAG CAG TAA TT -3' (reverse)	225 bp

Sox-8

5`-GACCAGTACTTGCCCCTCAAT-3` (forward)

5`-TCAGCTGCTCCGTCTTGATCT-3` (reverse)

213 bp

Notch-1

5`-CCTCTCACCAATACCTG-3` (forward)

5`-GATGCCCTCGGACCAATCA-3` (reverse)

508 bp

Delta-1

5`-CTGAGGTGTAAGATGGAAGCG-3` (forward)

5`-CAACTGTCCATAGTCAATGG-3` (reverse)

244 bp

Jagged-1

5`-TGCAGCTGTCAATCACTTCG-3` (forward)

5`-CAGAATGACGCTTCCTGTGCG-3` (reverse)

361 bp

Androgenrezeptor

5`-GAGCAGATGGCAGTCATTCAG-3` (forward)

5`-CAGCTCTCTTGCAATAGGCTG-3` (reverse)

324 bp

2.4.6 Das Prinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = Polymerase Chain Reaction) ist eine chemische Methode zur Vermehrung eines spezifischen Genomfragments *in vitro* aus DNA und für die heutige molekulare Genetik unentbehrlich.

Eine automatisierte PCR kann nur mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase durchgeführt werden. Da beim ersten Arbeitsschritt der PCR die zu untersuchende DNA bei 94°C aufgeschmolzen wird, würde eine nicht hitzebeständige Polymerase zerstört werden und man müsste sie nach jedem Zyklus erneut zugeben. Der gesamte Reaktionszeitraum beträgt einige Stunden.

Folgende Reagenzien sind zur Durchführung einer PCR nötig: cDNA, PCR-Puffer, MgCl₂, dNTP's, Primer, TaqPolymerase® (Firma Invitrogen). Dieses spezifische Reaktionsgemisch wird einer zyklisch wiederkehrenden Abfolge

von verschiedenen Temperaturschritten ausgesetzt. Somit erreicht man eine Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnitts, die sogenannte Amplifikation.

Der Zyklus einer PCR besteht aus drei unterschiedlichen Temperaturschritten:

1. Denaturierung:

Bei einer Temperatur von 94°C schmilzt die zu erweiternde doppelsträngige DNA und man erhält einzelne Stränge.

2. Annealing:

Durch ein rasches Abkühlen auf eine Temperatur von ca. 55°C wird die Vereinigung der einzelnen Stränge verhindert und die Primer (zwei unterschiedliche Oligonukleotide mit entgegengesetzter Orientierung) lagern sich an die entsprechend komplementären Strangabschnitte der Ausgangs-DNA an.

3. Elongation/Extension:

Die TaqPolymerase® verlängert bei 72°C (von dem Primer aus) den DNA-Strang durch den Einbau der dNTP's bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Diese ist mit der ursprünglichen DNA identisch und dienen im nächsten Zyklus wieder als Ausgangs-DNA.

Die Zahl der Ausgangs-DNA verdoppelt sich in einem Zyklus; im Nachfolgenden erhält man die vierfache Menge, etc. So erhöht sich die Zahl der DNA theoretisch um 2^n (n = Anzahl der Zyklen).

Mit der Methode der semiquantitativen PCR ist es möglich, Genregulationen auf mRNA-Ebene zu analysieren (Murphy et al., 1990; Knauthe et al., 1996). Bei diesem Verfahren wird das zu untersuchende Gen mit einem gleichzeitig amplifizierten Standard verglichen, der nicht reguliert wird.

PCR Mastermix mit TaqPolymerase® für PCR (pro Ansatz):

28,8	µl	steriles <i>aqua bidest.</i> (Ampuwa®)
5	µl	10 x PCR Puffer (1 M Tris-HCl (pH 9,0); 0,4 M Ammoniumsulfat)
3	µl	50 mM MgCl ₂
4	µl	2,5 mM dNTP-Mix
0,2	µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase [5 U/µl]
41	µl	Gesamtmenge

2.4.7 Gelelektrophorese

DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge können aufgrund ihrer Größe im elektrischen Feld mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Für Auftrennungen im Bereich von 150-1000 bp eignen sich 1,5-2%ige Agarosegele. Wird an eine Gelmatrix eine Spannung angelegt, wandern die Moleküle abhängig von Größe und Ladung mit konstanter Geschwindigkeit zur Anode oder Kathode. Kleinere Moleküle können schneller die Gelporen passieren als größere.

Die Agarose wird in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und mit 1xTAE-Puffer in der Mikrowelle zum Kochen (100°C) gebracht, bis sich die Agarose schlierenfrei aufgelöst hat. Bei dem Erkalten der Lösung, d.h. sobald sie ca. 50°C erreicht hat, wird sie mit EtBr (0,3 µg/ml) versetzt. EtBr lagert sich zwischen den Basenpaaren ein (interkaliert) und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht. Nukleinsäuren lassen sich so durch EtBr sichtbar machen.

Als nächstes wird die Gellösung in eine vorbereitete Laufkammer gegossen und ein Kamm (zum Formen von Taschen) eingefügt. Dann wird die Lösung bis zum Erstarren ca. 15 min stehen gelassen.

Anschließend wird der Kamm entfernt und das Gel in eine mit 1xTAE-Laufpuffer gefüllte Gelkammer eingesetzt. Die Proben, die mit 10 µl Ladepuffer (Succrose und Farbstoffe) versetzt sind, können nun in die Taschen pipetiert werden. Als Längenstandard wird ein 100 bp Größenstandard (Firma: Invitrogen) verwendet, um die Länge der Fragmente bestimmen zu können. Die Gelelektrophorese erfolgt bei 75-90 V in einer Gelkammer der Firma Biometra. Nachdem die Farbfront ca. 7-8 cm gelaufen ist, wird der Vorgang gestoppt.

2.4.8 Dokumentation der Gele

Die Analysegele werden unter UV-Licht mit einer elektronischen Bildverarbeitungsanlage der Firma MWG aufgenommen. Die Speicherung der Bilder, in einem für Computer üblichen Format (tif-Datei), ermöglicht die weitere Bearbeitung mit speziellen Auswertungsprogrammen (Zero Scan).

2.4.9 Die Real-Time RT-PCR

Die Real-Time RT (reverse transkription)-PCR ist die modernste Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Es existieren verschiedene Nachweismethoden für die real time PCR; eine davon ist der unspezifische Einbau des Farbstoffs SYBR Green (Firma Bio-Rad) in doppelsträngige DNA. SYBR Green ist ein interkalierender Farbstoff und ermöglicht einen sensitiven Amplifikationsnachweis.

Ein Vorteil der Real-Time-RT-PCR ist, dass der Amplifikationsprozess in Real-Time verfolgt werden kann. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit genauer zu quantifizieren als bei konventionellen PCR Verfahren.

Die Untersuchungen wurden in einem iCycler® IQ der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) durchgeführt. Dieses PCR-System ist fähig, einen Fluoreszenzanstieg während der exponentiellen Phase der PCR zu messen und ermöglicht so eine exakte Darstellung der Kinetik ab dem ersten Zyklus. Zur Auswertung wird die iCycler® IQ Real Time Detection Software V 2.1. verwendet.

Basis für die quantitative Auswertung der Real-Time PCR Daten ist der sogenannte „Threshold Cycle“ (CT). Der „Threshold Cycle“ ist der Zyklus der PCR, in dem die Fluoreszenz einer Probe erstmals signifikant über ihre Hintergrundfluoreszenz hinaus ansteigt. Er ist ein zuverlässiger Indikator für die ursprüngliche Kopienzahl. Nach dem exponentiellen Anstieg der Kurve erreichen alle PCR-Verläufe ein Plateau. Ab diesem Zeitpunkt (ca. 35 Zyklen) erfolgt keine PCR-Produktbildung mehr.

Bei der Untersuchung wurde für jede PCR-Reaktion der jeweilige CT ermittelt. In der quantitativen Analyse wurde der CT des zu untersuchenden Gens mit einem Referenzgen abgeglichen.

Um den mRNA Gehalt eines spezifischen Gens gegen ein Referenzgen zu vereinheitlichen, werden die ΔCT Werte nach der folgenden Formel bestimmt:

$$\Delta CT = CT (\text{Experimentgen}) - CT (\text{Referenzgen})$$

Das Prinzip der Real-Time PCR wird in der folgenden Abbildung verdeutlicht:

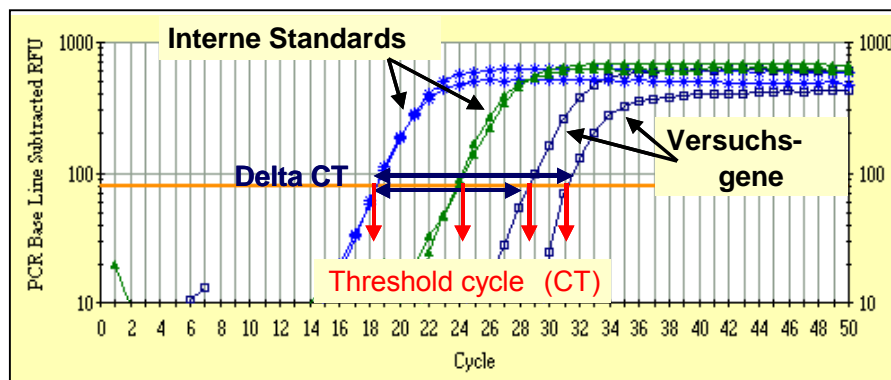


Abb. 10: Das Prinzip der Real-Time PCR

Um die Regulation eines einzelnen Gens zu ermitteln, wird der $\Delta\Delta CT$ Wert kalkuliert. Die folgende Gleichung stellt die Berechnung dar:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{GenGehalt des Trainingstieres}) - \Delta CT (\text{GenGehalt des Kontrolltieres})$$

Die Signifikanz wurde anhand der ermittelten $\Delta\Delta CT$ Werte berechnet. Um eine „Fold Induction“ zu berechnen, wird die folgende Gleichung benutzt:

$$\text{Fold Induction} = 2^{(-\Delta\Delta CT)}$$

Für jede Probe wurden mindestens drei PCR-Läufe von unterschiedlichen cDNA-Synthesen durchgeführt.

Die Fehlerbalken der $\Delta\Delta CT$ Werte zeigen die Reproduzierbarkeit der Daten. Um die Qualität und Reinheit der jeweiligen PCR-Produkte zu kontrollieren, wurde eine individuelle Schmelzkurvenanalyse verwendet.

Bei der Verwendung von SYBR Green kann ein Fluoreszenzanstieg durch Primer-Dimere verursacht werden. Eine Differenzierung zwischen den spezifischen und den unspezifischen Produkten kann mittels einer Schmelzkurvenanalyse erfolgen und so zu sicheren Ergebnissen beitragen (siehe Abb. 11).

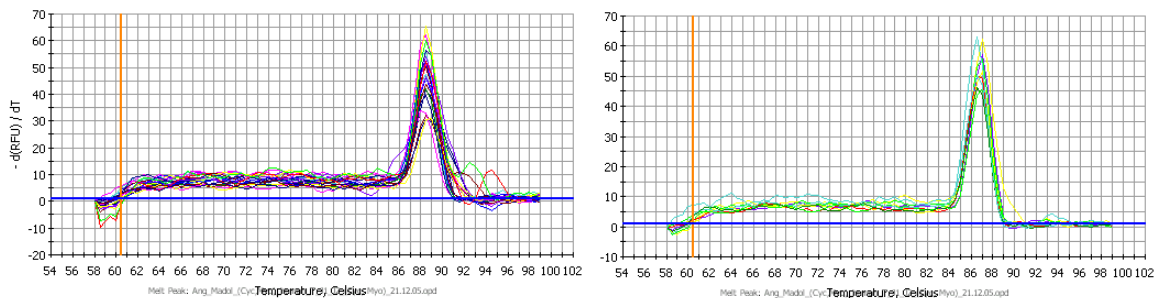


Abb. 11: Die Darstellung eines originalen Computerdiagramms des iCycler® IQ Real Time Detection Software V 2.1 zeigt eine Abbildung der Schmelzkurve von Cyclophilin (links) und Myostatin (rechts).

Die mit SYBR Green markierten PCR-Produkte werden nach Erhöhung der Temperatur kontinuierlich aufgeschmolzen.

Die damit einhergehende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet (Steuerwald et al., 1999). Kleinere Fragmente weisen einen niedrigeren Schmelzpunkt auf, so dass sie von den PCR-Produkten unterschieden werden können.

Das optische Modul der Real Time PCR ermöglicht es, 96 Proben gleichzeitig zu untersuchen.

PCR Mastermix mit TaqPolymerase® für Real Time PCR (pro Ansatz)

22,55	µl	steriles <i>aqua bidest.</i> (Ampuwa®)
5	µl	10 x PCR Puffer (1 M Tris-HCl (pH 9,0); 0,4 M Ammoniumsulfat)
3	µl	50 mM MgCl ₂
4	µl	2,5 mM dNTP-Mix
0,2	µl	Taq DNA-Polymerase [5 U/µl]
1,25	µl	Fluorescein

5	µl	SYBR® Green I
41	µl	Gesamtmenge

2.5 Rezeptorbindungstest

Bei dem Rezeptorbindungstest wurde analysiert, inwieweit eine der zu testenden Substanzen in der Lage ist, an einen Rezeptor zu binden, bzw. Substanzen von diesem Rezeptor zu verdrängen.

Folgende Substanzen wurden getestet: Tetrahydrogestrinon, Androstendione, Norandrostendion, Norbolethon, Propyltrenbolon und 1-Testosteron. Die Bindungsaffinität wurde für vier Rezeptoren (Androgenrezeptor, Glucocorticoidrezeptor, Progesteronrezeptor und Mineralocorticoidrezeptor) bestimmt. Die hierfür verwendeten Rezeptoren stammten aus Hi5-Zellcytosol. Folgende Tracer ($[^3\text{H}]$ -Liganden) wurden für die Durchführung des Tests radioaktiv markiert und verwendet:

$[^3\text{H}]$ Methyltrienolone (R1881) für den humanen Androgen-Rezeptortest

$[^3\text{H}]$ Dexamethason für den humanen Glucocorticoid-Rezeptortest

$[^3\text{H}]$ Progesteron für den humanen Progesteron-Rezeptortest

$[^3\text{H}]$ Aldosteron für den humanen Mineralocorticoid-Rezeptortest

Zur Durchführung des Tests wurde der Rezeptor mit dem jeweils radioaktiv markierten Tracer in Anwesenheit der zu testenden Substanz für 16 Stunden bei 0-4°C inkubiert. Dabei wurde in einer Testreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen gearbeitet ($[10^{-5}]$ bis $[10^{-9}]$).

Nach dem Ende der Inkubationszeit und dem Stoppen der Reaktion wurde der freie Tracer entfernt und der gebundene durch eine Szintillationsmessung bestimmt.

2.6 Zellkultur

Bei der Zelllinie C2C12 (s. Abb. 12) handelt es sich um eine Maus-Myoblasten Zelllinie. Diese Zelllinie wurde ursprünglich aus dem Mäusestamm C31+ gewonnen. Die Myoblasten wurden von Blau et al. (1985) etabliert. Eine Behandlung dieser Zellen mit BMP-2 (bone morphogenetic protein

2) induziert eine Differenzierung der Zellen in eine knochenbildende Zelle (Katagiri et al., 1994).

C2C12 Zellen besitzen die Fähigkeit sich auszudifferenzieren und schnell Myotuben zu bilden. Nach Ausdifferenzierung durch Zugabe eines Differenzierungsmediums, z.B. Pferdeserum, beginnen die Zellen Myotuben zu bilden und exprimieren charakteristische Muskelproteine.

Mit diesem Modell lassen sich Versuche mit anabolen Steroiden in C2C12 Zellen durchführen, um die Auswirkungen der Substanzen auf die molekularen Mechanismen von undifferenzierten und differenzierten Muskelzellen zu studieren.

C2C12 Zellen wachsen einschichtig (als Monolayer) und adhären auf dem Boden von Zellkulturflaschen. Die Zellen, die in den vorliegenden Experimenten verwendet wurden, wurden von der Firma ATCC (American Type Culture Collection; LGC Promochem, Wesel) mit der Nummer CRL-1772 bezogen.

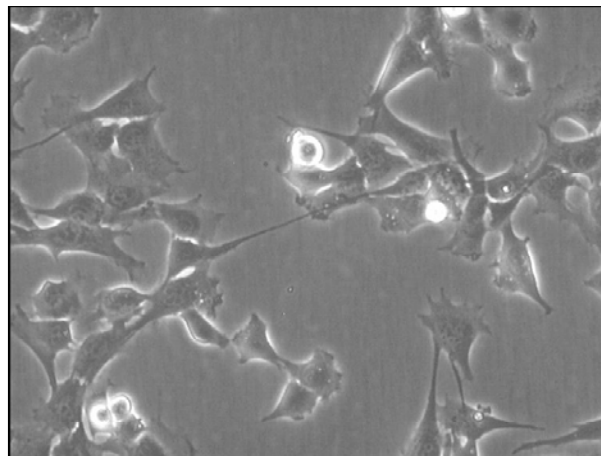


Abb. 12: C2C12 Zellen

2.6.1 Kulturbedingungen

C2C12 Zellen wurden in 75cm² Zellkulturflaschen mit 20 ml Medium (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM), Fa. Gibco), das 10% FKS (fötales Kälberserum), 4 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose, 1,5 g/l Natriumbicarbonat, 1,0 mM Natriumpyruvat und 20 ml/l Penicillin/Streptomycin enthielt, im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Ein Mediumswechsel erfolgte je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen zwei- bis dreimal pro Woche. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen nicht konfluent wuchsen. Somit

war eine regelmäßige Beobachtung der Zellen erforderlich. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sterilbank (Typ Laminar Air Flow, Firma Gelman) unter keim- und bakterienfreien Bedingungen.

2.6.2 Passagieren der Zellen

Zunächst wurde das verbrauchte Medium mit einer Glaspipette abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, wobei dieses dann wieder abgesaugt wurde. Im Folgenden wurden 2-3 ml erwärmtes Trypsin auf die Zellen gegeben, um die Zellen bei einer Inkubationszeit von 5 min im Brutschrank vom Boden der Kulturflaschen abzulösen. Nach mehrmaligem Spülen der Zellen mit serumhaltigem Medium, das die Wirkung des Trypsins stoppte, wurden diese in ein 25 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das Röhrchen mit den Zellen wurde bei 800 U/min und 20°C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. Ein Teil der Zellen konnte anschließend in eine neue Zellkulturflasche mit 20 ml Vollmedium überführt werden. Durch vorsichtiges Schwenken wurde eine gleichmäßige Verteilung der Zellen garantiert.

2.6.3 Bestimmung der Zellzahl

Sofern eine definierte Zellzahl für die Versuche erforderlich war, wurde die Anzahl der Zellen in einer Bürker-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm²; Firma Brandt) unter dem Mikroskop bei einer 160-fachen Vergrößerung bestimmt.

2.6.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen können für die Langzeitaufbewahrung bei –80°C eingefroren und bei –196°C in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Die Zellen wurden, wie in Kap. 2.6.2 beschrieben, passagiert und nach dem Zentrifugieren wird das Medium im Überstand abgesaugt. Die Resuspendierung des Zellpellets erfolgte in Freezing-Medium (Zusatz von 10% DMSO als Gefrierschutz). Anschließend wurde 1 ml der Zellsuspension in Kryo-Röhrchen (Firma Sarstedt) überführt. Das Freezing Medium wurde nur eisgekühlt verwendet, da das darin enthaltene DMSO toxisch wirkt und bei dieser Temperatur nicht aktiv ist. Für das Einfrieren der Zellen wurde der Nalgene™ Cryo

1°C Freezing Container verwendet, der eine Kühlung der Zellen um -1°C pro Minute ermöglichte, bis eine Zwischentemperatur von -80°C erreicht wurde. Nach einer Inkubationszeit von mind. 24 h bis 3 Tage konnten die Kryoröhrchen in den flüssigen Stickstoff zur Langzeitlagerung überführt werden. Zum Auftauen der Zellen wurden die Röhrchen in 37°C warmem Wasser unter leichtem Schwenken aufgetaut und in ein 25 ml Röhrchen überführt, das mit 9 ml warmem Medium gefüllt war. Wie in Kap. 2.6.2 beschrieben, wurden die Zellen abzentrifugiert, in 1 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche, die mit 19 ml warmen Medium gefüllt war, gegeben. Nach einer Stunde wurde die Anzahl der schon angehefteten Zellen am Boden der Zellkulturflasche überprüft, um die Neukultivierung zu gewährleisten.

2.6.5 Hitzeinaktivierung des fötalen Kälberserums (FKS)

Das FKS, welches dem Medium zugeführt wird, sollte wegen möglicherweise enthaltene Toxine und störende Komponenten des Komplementsystems hitzeinaktiviert werden. Dazu wird FKS im Wasserbad für 30 min auf 56°C erhitzt und in 50 ml Falcon-Röhrchen aliquotiert. Das hitzeinaktivierte FKS kann danach entweder direkt für die Herstellung eines Zellkulturmedium verwendet oder für eine spätere Anwendung bei -20°C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

2.6.6 Medium für C2C12 Zellen

Zum Ansetzen des Mediums werden autoklavierte Flaschen benutzt und 930 ml Aqua dest. abgemessen. Das Medium, welches in pulverisierter Form vorliegt, wird mit dem destillierten Wasser in der Flasche vermischt. Unter Rühren werden 20 ml Natriumbikarbonat (7,5%) dazu gegeben, vermischt und der pH Wert auf 6,7 - 6,8 eingestellt. Im Anschluss daran wird die Flasche mit destilliertem Wasser bis auf 1l aufgefüllt. Unter der Sterilbank wird das Medium sterilfiltriert, 100 ml entnommen und durch hitzeinaktiviertes FKS (oder Pferdeserum HS = horse serum) ersetzt. Das Pferdeserum wirkt mit einem Differenzierungsreiz auf die Zellen. Zusätzlich werden noch 20 ml/l Penicillin/Streptomycin zugegeben.

2.7 Behandlungen und Messverfahren

2.7.1 Hormonbehandlung

Für sämtliche Hormonversuche wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von $[10^{-3} \text{ M}]$ in 100% Ethanol angesetzt und für max. 4 Monate bei -20°C gelagert. Für alle Versuchsansätze wurden die benötigten Konzentrationen über eine Verdünnungsreihe aus diesen Stammlösungen frisch angesetzt. Die endgültige Ethanolkonzentration überschreitet in den einzelnen Versuchen nicht 0,1% des Kulturvolumens. Die Behandlung begann nach einer 24-stündigen Ruhephase. Folgende Substanzen wurden in der Zellkultur eingesetzt: Dihydrotestosteron, Tetrahydrogestrinon und Flutamid.

2.7.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt ein opto-elektronisches Messverfahren dar, das fokussierte Partikel in einem Flüssigkeitsstrom detektiert. Es basiert dabei auf dem Prinzip der quantitativen Fluorochromierung, d.h. der Färbung einzelner Komponenten mit geeigneten Fluorochromen. Neben der Detektion von Fluoreszenzsignalen wird auch eine Lichtstreuung (in der Vorwärts- und rechtwinkligen Richtung) registriert. Dies bedeutet, dass das Durchflusszytometer optische Signale unterschiedlicher Qualität verarbeiten kann (Genzlinger, 1999). Hierbei entspricht die relative Bestimmung des Streulichts in der Vorwärtsrichtung der Partikelgröße und die relative Bestimmung des seitlichen Streulichts der Granularität der Zelle (Coulter Electronics GmbH, 1989).

Neben vielen weiteren Anwendungsbereichen (z.B. Lymphozytentypisierung) ist es möglich mit Hilfe der Durchflusszytometrie festzustellen, in welchen Zellzyklusphasen sich die Zellen einer Zellpopulation befinden und ob eher proliferative oder apoptotische Prozesse vorherrschen.

Messprinzip: Die Bestimmung der Zellzyklusphasen und ihrer S-Phase-Population erfolgte nach der Methode von Nicoletti et al. (1991) mittels einer Färbung der DNA mit Propidium-Iodid (PI-Färbung). Die angefärbten Zellen werden kontinuierlich hintereinander an einer Lichtquelle (luftgekühlter Argonlaser) vorbeigeführt. Mit Hilfe von Pressluft gelangen die in Suspension vereinzelt vorliegenden Zellen in eine Kapillare, aus der sie in die Proben-

kammer geschleust werden. Dabei erzeugt ein Hüllstrom aus entgastem Wasser in der Kapillare eine laminare Strömung, mit der die Zellen zentriert und mit hoher Geschwindigkeit auf das Messelement zugeführt werden. Dadurch wird jede Zelle einzeln durch die optimale Fokussierungsebene des Objektivs geschleust. Jede einzelne Zelle emittiert - aufgrund der Fluoreszenzanregung des Farbstoffes (PI) - ein Lichtsignal, das proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorochrommenge ist. Dieses Lichtsignal wird in einem Photomultiplier verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Die eingehenden Signale führen zur Berechnung der Durchflussrate. Die auf diesem Wege gewonnenen Daten werden in Form von Histogrammen visualisiert (Genzlinger, 1999). Im Anschluss an die durchflusszytometrische Messung, die mit Hilfe der Coulter Durchflusszytometer-*Software* lediglich die *sub G₀*-Population (apoptotische Zellen) anzeigte, wurde eine Zellzyklusanalyse mit der *MultiCycle-Software* für *Windows* (Phoenix *flow systems*, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Hiermit war es möglich, den prozentualen Anteil der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen zu bestimmen.

Methodik: Die Zellen wurden durch die Zugabe von 300 µl Trypsin vom Boden gelöst und mit 3 ml PBS aufgenommen. Nach der Zentrifugation bei 1500 U/min, 4°C und 8 min wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. 500-600 µl der Zellsuspension wurden in das Durchflusszytometer-Röhrchen (Sarstedt) überführt und nochmals bei 1500 U/min, 4°C und 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und 500-600µl der PI- Färbelösung auf das Zellpellet pipettiert. Das Pellet wurde durch vorsichtiges Schütteln in Lösung gebracht und die Zellsuspension für 3-4 h bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Nach 1,5 - 2 h wurde die Suspension erneut geschüttelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Messröhrchen mit- samt ihres Inhalts in einen mit Eis gefüllten, lichtundurchlässigen Behälter gegeben, der auch während der Messung die gleichen Bedingungen erfüllte. Die Messung der Zellzyklusphase erfolgte anschließend am Durchflusszytometer.

PI- Färbelösung:

50 µg/ ml Propidium Iodid

0,1 % Triton-X

0.1 % Na- Citrat

2.7.3 Kinetische Bestimmung der Creatin-Kinase Aktivität (CK- Aktivität)

Creatin-Kinase (CK) ist ein intrazelluläres Enzym in Muskelgeweben. Ursprünglich wird die CK-Messung bei der *in vitro* Diagnostik von Muskelverletzungen angewendet. So kann vier Stunden nach einem Herzinfarkt eine Zunahme der Creatin-Kinasekonzentration beobachtet werden.

Die messbare Gesamt-CK-Aktivität im Serum setzt sich aus drei dimeren Isoenzymen zusammen: hauptsächlich aus der bis zu 95% vorkommenden muskulären CK-MM, der Herzmuskel spezifischen CK-MB mit weniger als 5% und der CK-BB, die sich im Nervengewebe und Magen-Darmtrakt befindet. Normalerweise ist die zuletzt genannte CK-BB im Muskelgewebe nicht nachweisbar. Für die CK-Messung in C2C12 Zellen mit und ohne Hormonbehandlung wurde die Methode modifiziert.

Die kinetische Bestimmung der Creatin-Kinase-Aktivität wird durch N-Acetylcholin in folgenden Schritten aktiviert:

1. Creatin- Phosphat + ADP \rightarrow Creatin + ATP (Enzym: CK)
2. ATP + D-Glukose \rightarrow Glukose-6-Phosphat + ADP (Enzym: Hexokinase)
3. Glukose-6-Phosphat + NADP⁺ \rightarrow Glukose-6-Phosphat + NADPH + H⁺ (Enzym: Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase)

2.7.4 Messung der CK- Aktivität

Ausgehend davon, dass die Creatin-Kinase einen besonders hohen Anteil an muskulären CK-MM aufweist, erscheint dieser Parameter dafür geeignet, sowohl intra- als auch extrazellulär Veränderungen von nicht differenzierten und differenzierten Zellen zu überprüfen.

Zur Messung wurden zunächst die Zellen mit einem Zellschaber aus den Flaschen oder von der Kultur-Platte geerntet; der Zellschaber wurde anschließend darüber mit 1 - 2 ml PBS abgespült. Die Zellsuspension wurde mit einer sterilen 5 ml Pipette entnommen und in ein 50 ml Röhrchen (Fa. Nunc) überführt. Daraufhin wurde es für 5 min, 1000 U/min und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet aufbewahrt.

Auf das Zellpellet wurden 150 μ l PBS gegeben und mit einem Homogenisator im Röhrchen (Fa. Nunc) mechanisch zerkleinert.

Die Creatin-Kinase befindet sich in der Lösung. Die 150 µl Zellsuspension mit den zerstörten Zellfragmenten wurde nachfolgend bei 4000 U/min bei 20°C für 5 min zentrifugiert. Von diesem Überstand wurden nun vorsichtig 100 µl entnommen, in ein CK-Messröhrchen (CK-Tube) überführt und verschlossen. Die 100 µl CK-Probe wurden daraufhin entweder direkt zur Messung in das Diagnosegerät ABX Pentra (Reagenzien ABX Pentra CK NAC CP Nr. A11A01632) gegeben oder im Kühlfach bei –20°C für maximal 1 Woche aufbewahrt. Es empfiehlt sich, eine direkte Messung des Proteingehalts durchzuführen und nicht erst nach einem erneuten Auftauen die Proben zu bestimmen. Der Gesamtproteingehalt wurde bei der Auswertung mit den CK- Werten abgeglichen.

2.7.5 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentration kann mit der Proteinbestimmung nach Lowry erfasst werden (Lowry et al. 1951). Proteine bilden mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex, wobei die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen reduziert werden. Mit dem Folin-Ciocalteu Reagenz bildet dieser einen blauen Komplex. Die resultierende Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt.

Als Vergleichswerte für die Proteinbestimmung dient eine Standardreihe mit 0,0 µg/µl; 0,25 µg/µl; 0,5 µg/µl; 0,75 µg/µl; 1,0 µg/µl; 1,5 µg/µl BSA (Rinderserumalbumin), die bei der Messung verschiedene Proteinkonzentrationen definiert und die Erstellung einer Standardkurve ermöglicht. Die Standardreihe setzt sich aus Präparations- und Gefrierpuffer im Verhältnis von 1:1 und der entsprechenden Menge an BSA zusammen.

In die „Wells“ der Mikrotiterplatte (Microtest™ Primaria Falcon®: Becton Dickinson Labware, Le Pont De Claix, F) werden je 5µl der vorgegebenen Standards, sowie die unbekanntenen Proteinproben mit je 25µl Reagent A (DC Protein Assay Reagent A: Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) und 200µl Reagent B (DC Protein Assay Reagent B: Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) in dieser Reihenfolge pipettiert. Anschließend inkubieren die Proben 15 min bei Raumtemperatur. Die resultierende Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt.

Die Konzentration wird in einem Photometer (Vmax Kintec microtiterplate reader: MWG Biotech AG, Ebersberg, BRD) gemessen. Mit einer Wellenlänge von 650 nm wird die Proteinkonzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in jedem Well erfasst. Aus den 6 Werten der gleichen Probe wird abschließend der Medianwert ermittelt.

2.7.6 Antagonisierung der Hormonbehandlung mittels Flutamid

Mit Hilfe des Antiandrogens Flutamid wurde überprüft, ob die beobachtete Induktion von Differenzierungsprozessen durch das anabole Steroid DHT über den Androgen-Rezeptor (AR) vermittelt wird.

Ein Antiandrogen wie Flutamid, welches hier verwendet wurde, konkurriert bei gleichzeitiger Applikation mit dem hier untersuchten Steroid um die AR. Für den Fall, dass die Induktion von Differenzierungsprozessen über den AR vermittelt wird, sollte der gezeigte Effekt teilweise oder komplett unterdrückt werden können.

Flutamid wurde mit einer Endkonzentration von $[10^{-6} \text{ M}]$ eingesetzt.

2.8 Statistik

Für die Tabellen und Graphiken der Versuchsergebnisse wurde das Programm Exel 2000 der Firma Microsoft[®] eingesetzt. Alle Werte werden im arithmetischen Mittelwert \pm der Standardabweichung angegeben.

Der Signifikanzunterschied für die mRNA Gehalts-Analysen und der Organgewichte (Samenblase, Prostata und *M. levator ani*, Leber) wurde mittels des zweiseitigen Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Der Mann-Whitney U-Test kann als Testvergleich zweier allgemeiner empirischer Verteilungen verwendet werden, d.h. er dient der Überprüfung, ob zwei unabhängige Gruppen zur selben Population gehören.

Die statistische Signifikanz wurde durch die folgenden Symbole festgesetzt:

$P < 0.001$	*** oder +++	sehr hochsignifikant
$P < 0.01$	** oder ++	hochsignifikant
$P < 0.05$	* oder +	signifikant

3 ERGEBNISSE

3.1 Effekte eines Schwimmtrainings auf die Differenzierung von Muskelzellen

Die Trainingseffekte eines Schwimmtrainings (einmaliges intensives Schwimmtraining und intensives Schwimmtraining über drei Tage, s. Tab. 1) auf das Muster des mRNA Gehalts von Genen, die bei der Differenzierung von Satellitenzellen von Bedeutung sind – u.a. Myostatin – wurden in diesem Versuch analysiert. Die mRNA Gehalts-Analyse erfolgte mittels Real-Time PCR und anschließender statistischer Auswertung der „Threshold Cycles“ (Schwellenwerte). Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über den Schwimmversuch mit Angabe der Versuchsgruppen und der Trainingszeiten.

Untersuchungsgruppen	Anzahl der Tiere	Training	Trainingszeiten	Dekapitation nach letzter Trainingseinheit
Gruppe 1	5	Einmaliges Schwimmtraining	2 x 45 min 10 min Pause	7 h
Gruppe 2	5	Einmaliges Schwimmtraining	2 x 45 min 10 min Pause	24 h
Gruppe 3	5	Drei Tage Schwimmtraining	2 x 45 min/Tag 10 min Pause	24 h
Gruppe 4	5	Kein Training (Kontrollgruppe)		

Tab. 1: Übersicht über die Trainingseinheiten der Untersuchungsgruppen für die Untersuchung der zeitabhängigen Trainingseffekte.

In diesem Versuch sollten die Effekte eines einzelnen oder über mehrere Tage durchgeführten Trainings auf den mRNA Gehalt von verschiedenen Genen im *M. gastrocnemius* innerhalb einer Zeitreihe analysiert werden.

Die folgenden Abbildungen 13-16 zeigen die Auswertungen für die mRNA-Gehalte von Notch-1, Delta-1, Sox-8 und Myostatin im *M. gastrocnemius* im Zeitverlauf. Zur RNA-Präparation wurde das Gewebematerial von Tieren gleicher Trainingsgruppen (n = 5) zusammengefasst und anschließend nach

der in Kapitel 2.4 beschriebenen Methode präpariert. In den Graphiken sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen PCR`s dargestellt. Die Kontrollgruppe wurde bei der Auswertung der einzelnen PCR`s auf den Wert eins gesetzt und weist somit keine Standardabweichung auf.

Betrachtet man die Ergebnisse von Notch-1 (Abb. 13), so bewirkt ein Training – unabhängig von der Trainingsdauer – keine signifikanten Unterschiede in dem mRNA Gehalt im *M. gastrocnemius*. Ein über mehrere Tage durchgeführtes Training führt zu einer nicht signifikanten Abnahme des mRNA Gehalts von Sox-8 (Abb. 15).

Aus vorausgegangenen Versuchen ist bekannt, dass der mRNA Gehalt von Myostatin nach einem Schwimmtraining über fünf Tage oder nach einem Langzeitlauftraining über drei Monate im *M. gastrocnemius* reprimiert wird (Matsakas et al., 2005; Matsakas, 2004).

Eine signifikante Reduktion des mRNA Gehalts nach einem dreitägigen Training lässt sich bei Delta-1 (s. Abb. 14) und eine hochsignifikante Reduktion des mRNA Gehalts bei Myostatin (s. Abb. 16) beobachten.

Ein einmaliger Trainingsreiz führt 7h nach der Belastung zu einer signifikanten Abnahme des mRNA Gehalts von Delta-1 (s. Abb. 14) und Myostatin (s. Abb. 16). 24h nach einem einmaligen Training lässt sich eine Abnahme des mRNA Gehalts von Delta-1 und Myostatin erkennen.

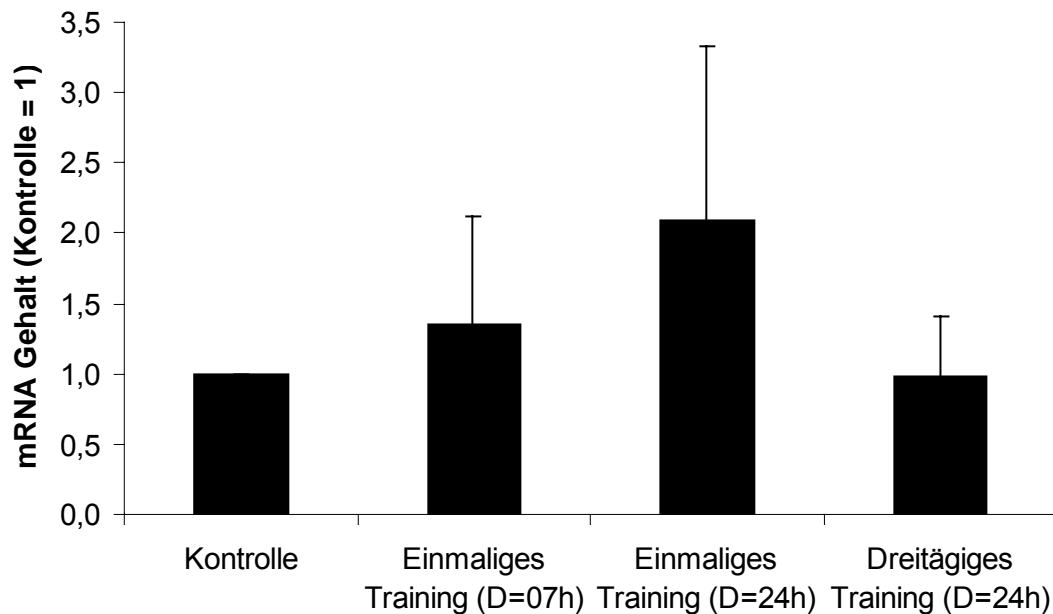
Notch-1 - *M. gastrocnemius* - Fold induction

Abb. 13: Notch-1 mRNA Gehalt im *M. gastrocnemius* für alle vier Gruppen normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe. Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. D= Dekapitation der Tiere nach Stunden. Zweiseitiger U-Test keine Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe.

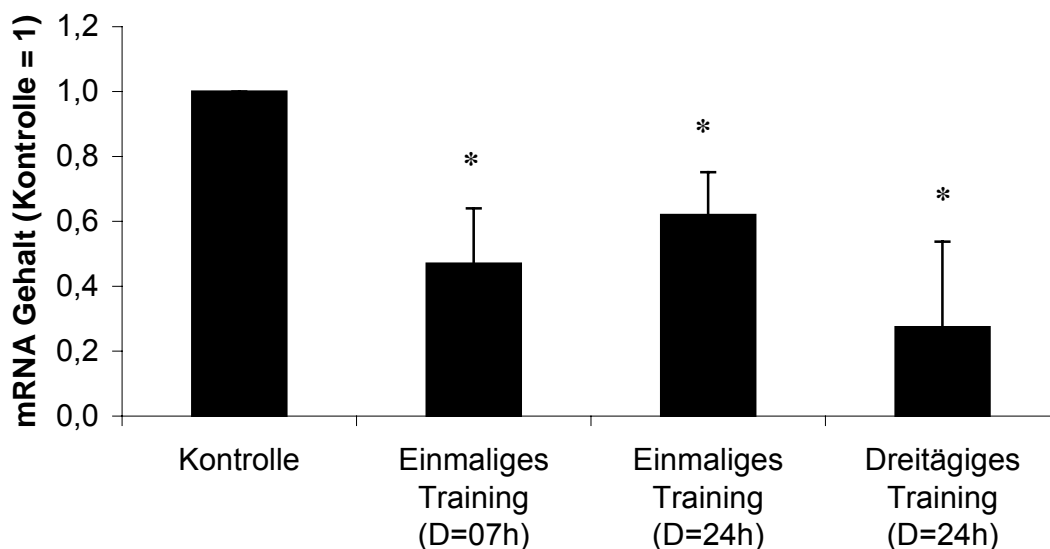
Delta-1 - *M. gastrocnemius* - Fold induction

Abb. 14: Delta-1 mRNA Gehalt im *M. gastrocnemius* für alle vier Gruppen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe. Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. D= Dekapitation der Tiere nach Stunden. Signifikant gegen Kontrolle (* $p < 0.05$, zweiseitiger U-Test)

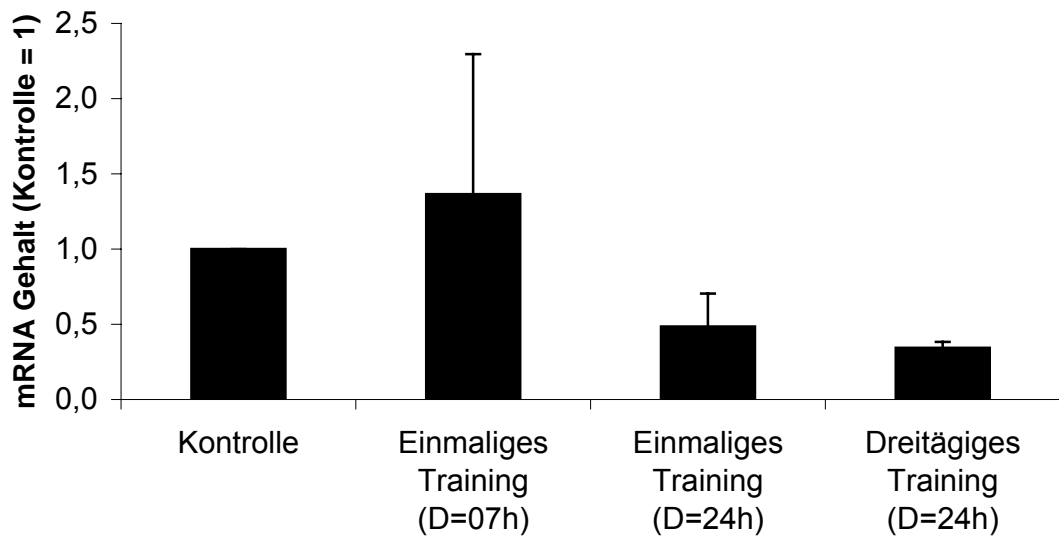
Sox-8 - *M. gastrocnemius* - Fold induction

Abb. 15: Sox-8 mRNA Gehalt im *M. gastrocnemius* für alle vier Gruppen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe. Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. D=Dekapitation der Tiere nach Stunden. Zweiseitiger U-Test keine Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe.

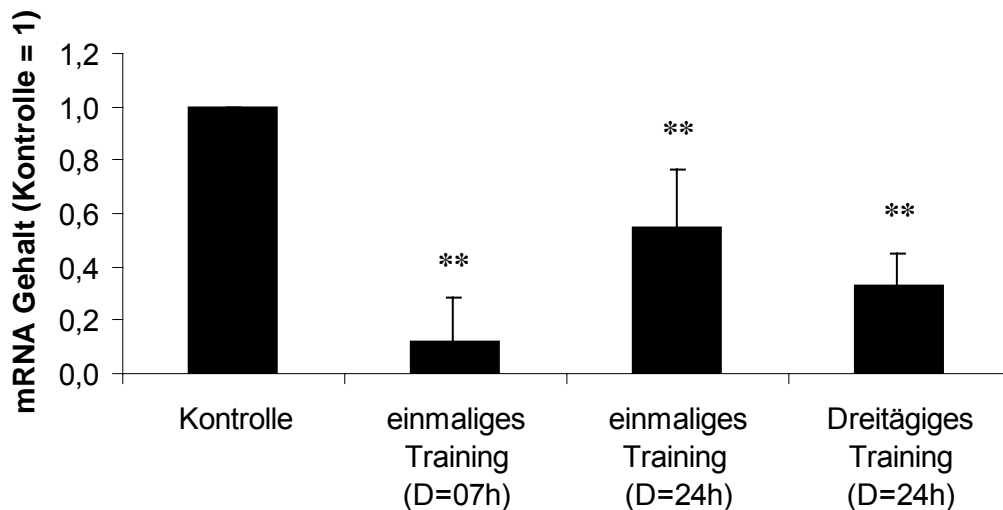
Myostatin - *M. gastrocnemius* - Fold induction

Abb. 16: Myostatin mRNA Gehalt im *M. gastrocnemius* für alle vier Gruppen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe. Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. D= Dekapitation der Tiere nach Stunden. Signifikant gegen Kontrolle (** $p < 0.01$, zweiseitiger U-Test)

3.2 Wirkung anaboler Steroide auf die Myoblastenproliferation und Myoblastendifferenzierung

3.2.1 Der Einfluss von anabolen Steroiden auf die Proliferation in der C2C12 Zelllinie

Durch die Bestimmung des Anteils der Zellen, die sich in der S-Phase (Proliferationsphase) befinden, ist es möglich, den Einfluss von anabolen Steroiden, wie Dihydrotestosteron, auf den Zellzyklus zu untersuchen. Gegenstand der Analyse war die Maus-Myoblastenzelllinie C2C12 (s. Kap. 2.6). Die Zellen wurden in Medium mit fötalem Kälberserum (FKS) und mit Pferdeserum (Horse Serum = HS), welches eine Differenzierung der Zellen induziert, kultiviert. Die Analyse mittels Durchflusszytometrie (s. Kap. 2.7.2) erfolgte nach viertägiger Behandlung der Zellen durch Färbung der DNA mit Propidiumiodid nach Nicoletti (Nicoletti et al., 1991). Anschließend wurde die Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen mit der Computersoftware *Multi-Cycle-Software* für *Windows* analysiert.

Für diese Versuche wurde DHT in zwei unterschiedlichen Konzentrationen [10^{-6} M] und [10^{-9} M] appliziert. Die folgenden Tabellen 2 und 3 zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus mindestens drei verschiedenen Messungen pro Versuch. Es wurden vier Versuche dargestellt. Die einzelnen Phasen – Synthese Phase (S-Phase), G1- und G2-Phase – sind tabellarisch aufgelistet:

		Zellzyklus		
	[M]	S [%]	G ₁ [%]	G ₂ [%]
FKS		25,5 ± 1,1	26,3 ± 2,9	50,4 ± 5,3
		12,5 ± 0,7	25,5 ± 2,7	49,9 ± 5
		15,7 ± 1,3	25,6 ± 0,2	49,9 ± 0,4
		29,2 ± 3,0	20,3 ± 0,1	40,4 ± 1,8
FKS + DHT	[10 ⁻⁶ M]	33,7 ± 0,7	24,1 ± 1,8	46,3 ± 3,1
		28,8 ± 3,5	25,5 ± 2,4	51,2 ± 1,7
		42,6 ± 1,3	19,4 ± 0,4	37,5 ± 0,9
		34,0 ± 0,9	24,1 ± 0,1	47,2 ± 0,1
	[10 ⁻⁹ M]	35,7 ± 1,7	23,9 ± 1,4	46,4 ± 2,7
		24,5 ± 1,6	23,6 ± 0,1	45,8 ± 0,2
		41,2 ± 3,3	20,5 ± 0,1	40,2 ± 1,1
		30,4 ± 1,2	24,8 ± 0,2	48,4 ± 0,5

Tab. 2: Mittelwerte der Messergebnisse der Zellzyklusanalyse (S-Phase, G1-Phase, G2-Phase) aus der Durchflusszytometrie. Angegeben ist der Mittelwert ± Standardabweichung für vier unabhängige Versuche. FKS = Zellen, die in DMEM/FKS gewachsen sind, DHT = Dihydrotestosteron

		Zellzyklus		
	[M]	S [%]	G ₁ [%]	G ₂ [%]
HS		18,2 ± 1,3	23,6 ± 1,0	45,7 ± 1,8
		8,2 ± 1,1	23,3 ± 0,2	46,0 ± 2,5
		11,9 ± 0,6	23,7 ± 0,1	46,6 ± 0,3
		24,2 ± 2,7	20,0 ± 0,2	39,6 ± 1,2
HS + DHT	[10 ⁻⁶ M]	28,8 ± 1,6	22,9 ± 0,3	44,8 ± 0,8
		16,2 ± 1,9	22,6 ± 0,2	44,2 ± 0,3
		20,5 ± 1,4	23,7 ± 0,1	46,4 ± 0,2
		29,7 ± 1,4	19,3 ± 0,1	38,8 ± 2,1
	[10 ⁻⁹ M]	27,0 ± 1,4	23,0 ± 0,1	45,0 ± 0,5
		14,9 ± 0,8	23,0 ± 0,2	44,5 ± 0,5
		24,1 ± 1,0	23,2 ± 0,2	45,6 ± 0,2
		23,9 ± 0,4	19,8 ± 0,1	38,7 ± 0,1

Tab. 3: Mittelwerte der Messergebnisse der Zellzyklusanalyse (S-Phase, G1-Phase, G2-Phase) aus der Durchflusszytometrie. Angegeben ist der Mittelwert ± der Standardabweichung für vier unabhängige Versuche. HS = Zellen, die in DMEM/HS gewachsen sind, DHT = Dihydrotestosteron

Exemplarisch sind in Abb. 17 drei Messdiagramme aus dem Durchflusszytometer dargestellt.

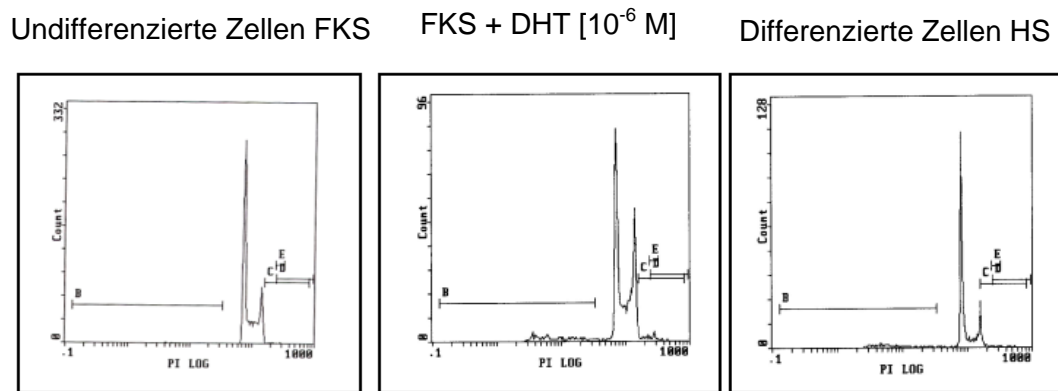


Abb. 17: Darstellung dreier Messdiagramme aus dem Durchflusszytometer. Dosisabhängige Zunahme der Proliferation der C2C12 Zellen (undifferenzierte Zellen in FKS gewachsen (li)) nach einer Behandlung mit DHT (DHT [10^{-6} M] behandelt (Mitte)) und in HS gewachsenen, differenzierten Zellen (re).

Die S-Phase ist in Abb. 18 dargestellt. In dem folgenden Diagramm (Abb. 19) sind die Mittelwerte aller Versuche auf die FKS-Kontrollgruppe (= eins) bezogen.

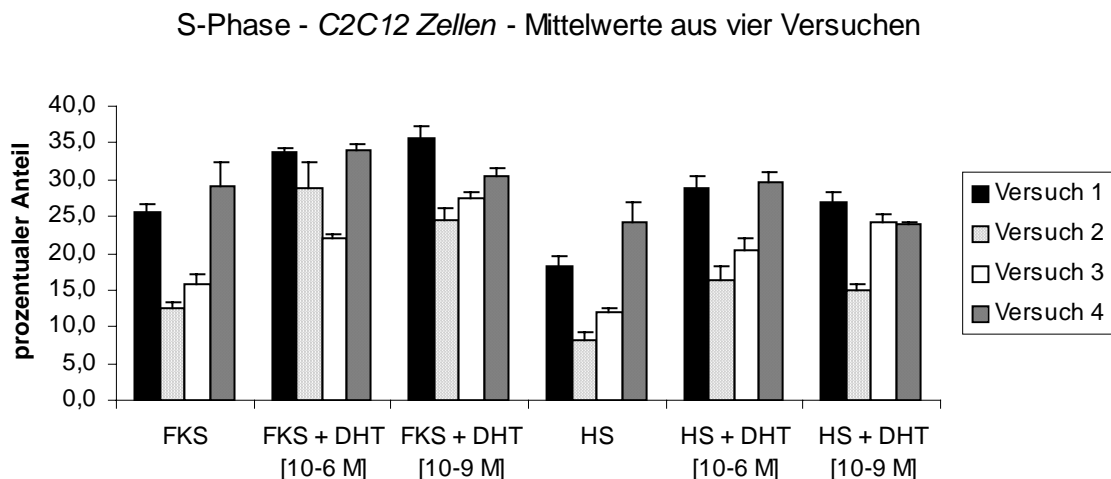


Abb. 18: Graphische Darstellung der S-Phase. Angegeben sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen. FKS = Zellen, die in fötalem Kälberserum gewachsen sind = Kontrolle; DHT = Dihydrotestosteron; HS = Zellen, die DMEM/HS gewachsen sind.

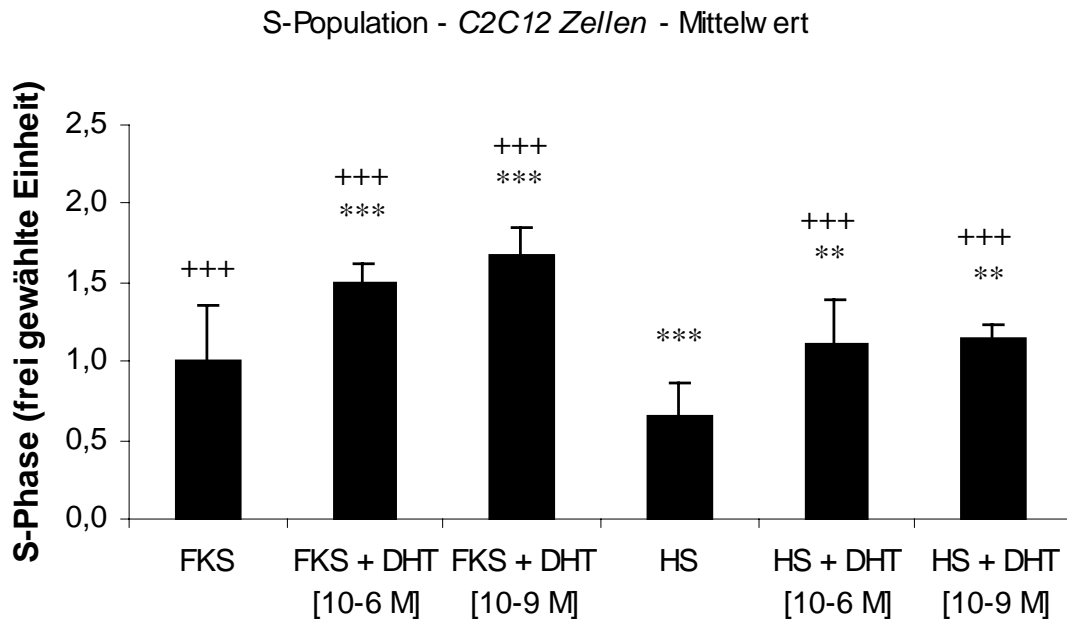


Abb. 19: Graphische Darstellung des Anteils der sich in der S-Phase befindlichen C2C12 Zellen aller Versuche. FKS = Zellen, die in DMEM/FKS gewachsen sind = Kontrolle = eingesetzt; DHT = Dihydrotestosteron; HS = Zellen, die in DMEM/HS gewachsen sind. * signifikant gegen FKS (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, zweiseitiger U-Test); + signifikant gegen HS (+++ $p < 0.001$, ++ $p < 0.01$, zweiseitiger U-Test)

Die Analyse der Behandlung undifferenzierter wie auch differenzierter Zellen mit DHT führt zu einer hochsignifikanten Zunahme des Anteils der Zellen, die sich in der S-Phase befinden. Dies weist auf eine erhöhte Proliferation hin. Eine Behandlung mit HS führt zu einer erniedrigten Anzahl der sich in der S-Phase befindlichen Zellen. Durch Zugabe von DHT kann dieser Effekt antagonisiert werden, was sich durch eine Zunahme der Zellen in der S-Phase zeigt.

3.2.2 Der Einfluss von Androgenen und anabolen Steroiden auf die Induktion von Differenzierungsprozessen in C2C12 Zellen

In dieser Untersuchung wurde der konzentrationsabhängige Einfluss von Androgenen und anabolen Steroiden auf die Differenzierung der Myoblastenzelllinie C2C12 bestimmt. Dazu wurde die Creatin-Kinase Aktivität der Zellen ermittelt. Der fortschreitende Prozess der Differenzierung geht mit einer Induktion von charakteristischen Skelettmuskelproteinen, z.B. Strukturproteine, wie die Myosinschwerketten, einher. Ein weiteres dieser Proteine ist die Creatin-Kinase, welche bei der Differenzierung von Muskelzellen ausgeschieden wird und somit als Indikator für eine fortschreitende Differenzierung

angesehen werden kann. Die C2C12-Zelllinie eignet sich für Differenzierungsuntersuchungen besonders gut, da sie Myotuben bildet und somit häufig als Modellsystem für die Muskelentwicklung verwendet wird (Yaffe et al., 1977; Desler et al., 1996). Durch eine Kultivierung der C2C12 Zellen in einem Medium, welches Pferdeserum enthält, differenzieren sich die Myoblasten zu langen kontraktiven Myotuben aus. Dadurch steigt die Creatin-Kinase Aktivität in den Zellen an und wird allgemein als repräsentativer Marker für eine fortschreitende Zelldifferenzierung angesehen (Lawson et al., 2000).

Die Abbildung 20 zeigt die Messung der Creatin-Kinase Aktivität nach einer Behandlung der C2C12 Zellen mit HS oder den Steroiden DHT und THG in zwei unterschiedlichen Konzentrationen ($[10^{-6} \text{ M}]$ und $[10^{-9} \text{ M}]$) nach einem Tag, sowie nach drei und sechs Tagen.

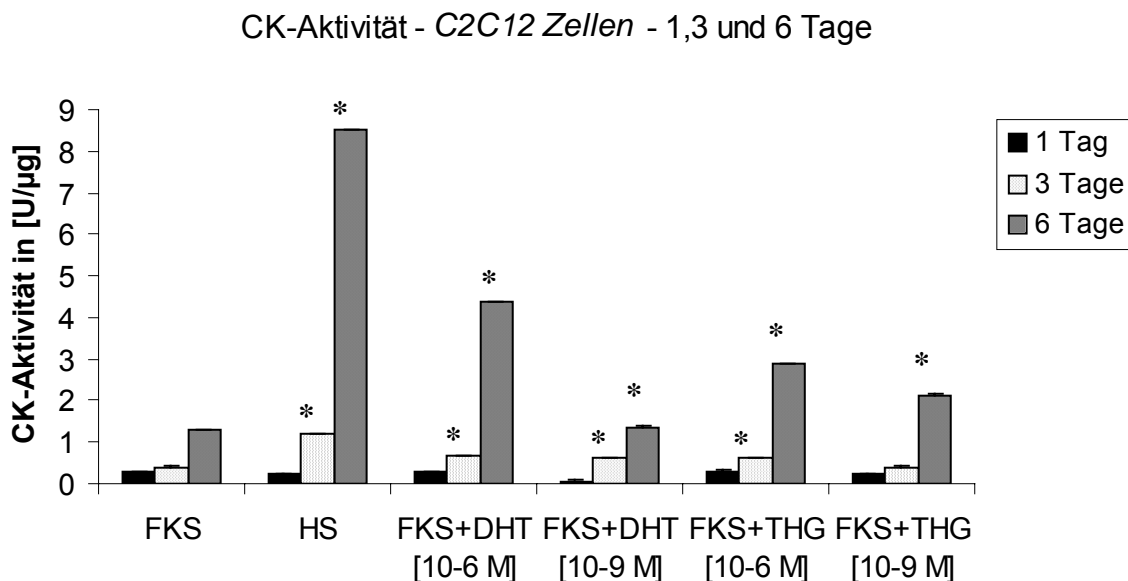


Abb. 20: Dargestellt ist die Creatin-Kinase Aktivität zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (ein Tag, drei Tage und sechs Tage). FKS = Zellen, die in DMEM/FKS gewachsen sind; HS = Zellen, die in DMEM/HS gewachsen sind; DHT = Dihydrotestosteron; THG = Tetrahydrogestrinon. * signifikant gegen FKS ($p < 0.05$, zweiseitiger U-Test)

Nach einem Behandlungstag lassen sich keine Unterschiede im Differenzierungszustand der Zellen erkennen. Ein signifikanter Anstieg der CK-Aktivität ist nach drei und sechs Tagen nach einer Behandlung mit HS zu erkennen, sowie nach einer Behandlung mit DHT und THG.

3.2.3 Die Analyse der Wirkung von Androgenen und anabolen Steroiden auf den mRNA Gehalt in C2C12 Zellen

Der mRNA Gehalt von Genen, wie Notch-1, Delta-1, Sox-8, Sox-9 und Jagged-1, die bei der Differenzierung von Satellitenzellen eine wichtige Rolle spielen, wurden in der C2C12 Zelllinie nach einer viertägigen Behandlung mit einem Differenzierungsmedium und mit DHT untersucht. Die C2C12 Myoblasten wurden – wie in den vorausgegangenen Untersuchungen – mit DHT in zwei Konzentrationen [10^{-6} M] und [10^{-9} M] behandelt und die Auswirkungen auf den mRNA Gehalt in C2C12 Zellen, die in FKS und in HS kultiviert wurden, gemessen. In den folgenden Abbildungen (Abb. 21-25) sind die mRNA Gehalte aufgezeigt.

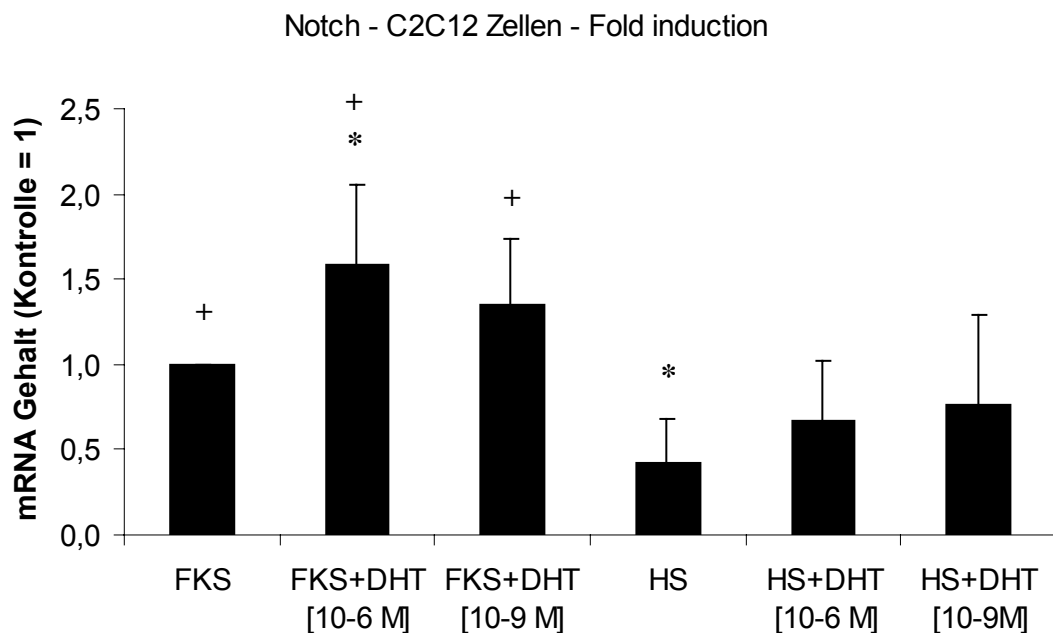


Abb. 21: Notch-1 mRNA Gehalt in C2C12 Myoblasten nach vier Tagen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe (FKS). Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. FKS = Zellen, die in DMEM/FKS gewachsen sind; HS = Zellen, die in DMEM/HS gewachsen sind; DHT = Dihydrotestosteron. * signifikant gegen FKS (* $p < 0.05$, zweiseitiger U-Test); + signifikant gegen HS (+ $p < 0.05$, zweiseitiger U-Test)

Nach einer Behandlung mit Dihydrotestosteron [10^{-6} M] steigt der mRNA Gehalt von Notch-1 signifikant an. Eine Behandlung mit Pferdeserum, welches die Differenzierung der C2C12 Zellen zu Myotuben auslöst, führt zu einer

signifikanten Erniedrigung des mRNA Gehalts von Notch-1. Diese Herabsetzung kann durch eine Behandlung mit dem Steroid DHT antagonisiert werden.

Der mRNA Gehalt des Notch-1 Liganden Delta-1 ist in der folgenden Abbildung 22 dargestellt.

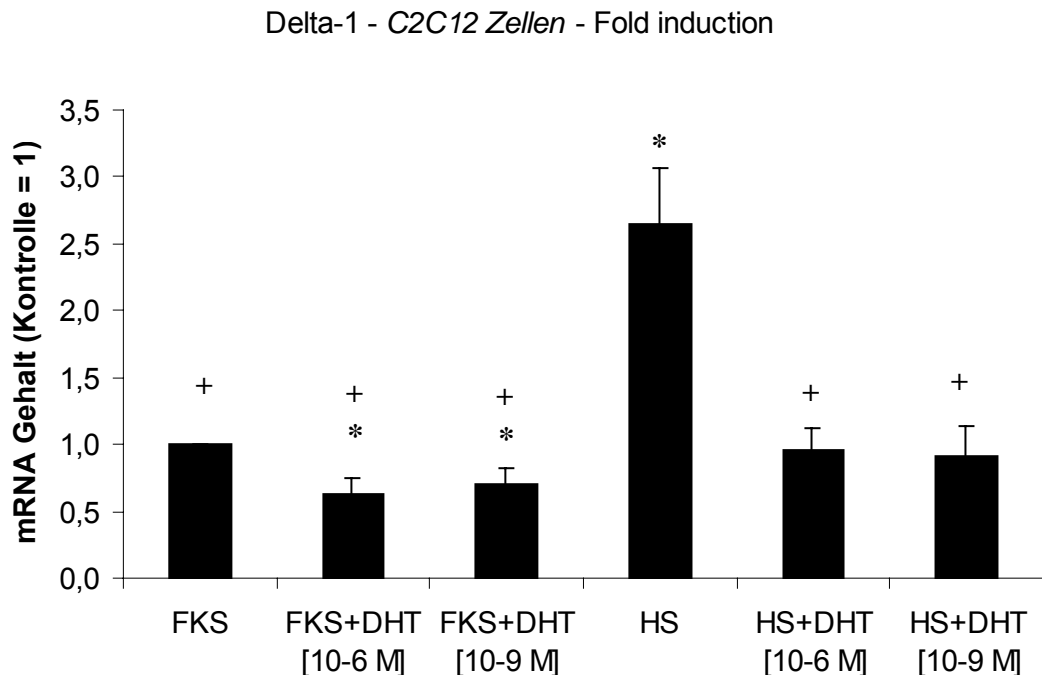


Abb. 22: Delta-1 mRNA Gehalt in C2C12 Myoblasten nach vier Tagen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe (FKS). Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. FKS = Zellen, die in DMEM/FKS gewachsen sind; HS = Zellen, die in DMEM/ HS gewachsen sind; DHT = Dihydrotestosteron. * signifikant gegen FKS (* $p < 0.05$, zweiseitiger U-Test); + signifikant gegen HS (+ $p < 0.05$, zweiseitiger U-Test)

Eine Behandlung der Zellen mit Dihydrotestosteron führt zu einem erniedrigten mRNA Gehalt von Delta-1. Eine Behandlung mit Differenzierungsmedium führt hingegen zu einer signifikanten Induktion des mRNA Gehalts von Delta-1, der durch DHT antagonisiert werden kann. Das Regulationsmuster, welches der Ligand Delta-1 zeigt, ist konträr zu dem mRNA Gehalt von Notch-1.

Der mRNA Gehalt von Sox-8 (Abb. 23) weist ein ähnliches Gehaltsmuster wie das von Delta-1 auf (s. Abb. 22). Durch eine Behandlung mit DHT wird der Sox-8 mRNA Gehalt erniedrigt. Die Applikation eines Differenzierungs-

mediums führt zu einem erhöhten mRNA Gehalt von Sox-8, der wiederum durch eine Zugabe von DHT antagonisiert werden kann.

Sox-8 - C2C12 Zellen - Fold induction

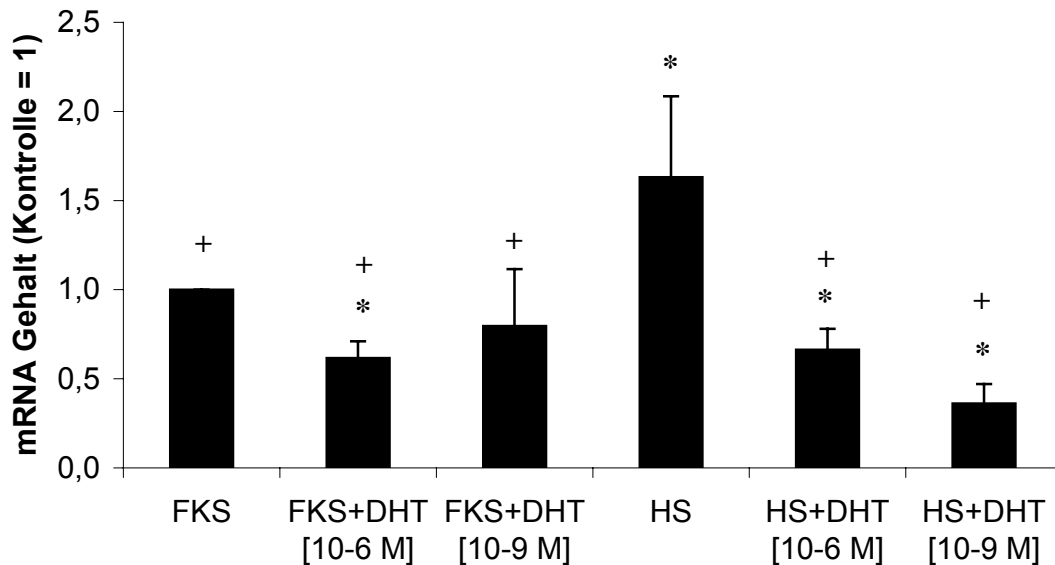


Abb. 23: Sox-8 mRNA Gehalt in C2C12 Myoblasten nach vier Tagen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe (FKS). Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. FKS = Zellen, die in DMEM/FKS gewachsen sind; HS = Zellen, die in DMEM/HS gewachsen sind; DHT = Dihydrotestosteron. * signifikant gegen FKS (* $p < 0.05$, zweiseitiger U-Test); + signifikant gegen HS (+ $p < 0.05$, zweiseitiger U-Test)

Aufgrund der CK-Aktivitätsveränderung ist ein entwicklungsabhängiges Expressionsverhalten für Notch-1, Delta-1 und Sox-8 erkennbar.

Bei den weiteren untersuchten Genen, wie Sox-9 und Jagged-1, konnten keine signifikanten Unterschiede und auch keine klaren Regulationstendenzen erkannt werden. Der mRNA Gehalt dieser zwei Gene ist im Folgenden dargestellt (Abb. 24 und 25):

Sox-9 - C2C12 Zellen - Fold induction

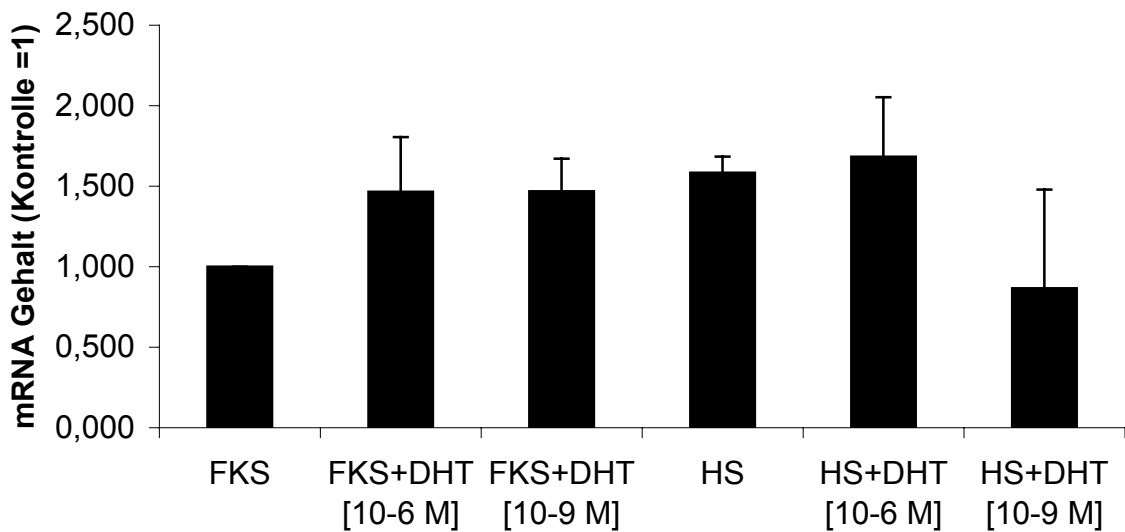


Abb. 24: Sox-9 mRNA Gehalt in C2C12 Myoblasten nach vier Tagen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe (FKS). Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. FKS = Zellen, die in DMEM/FKS gewachsen sind; HS = Zellen, die in DMEM/HS gewachsen sind; DHT = Dihydrotestosteron.

Jagged - C2C12 Zellen - Fold induction

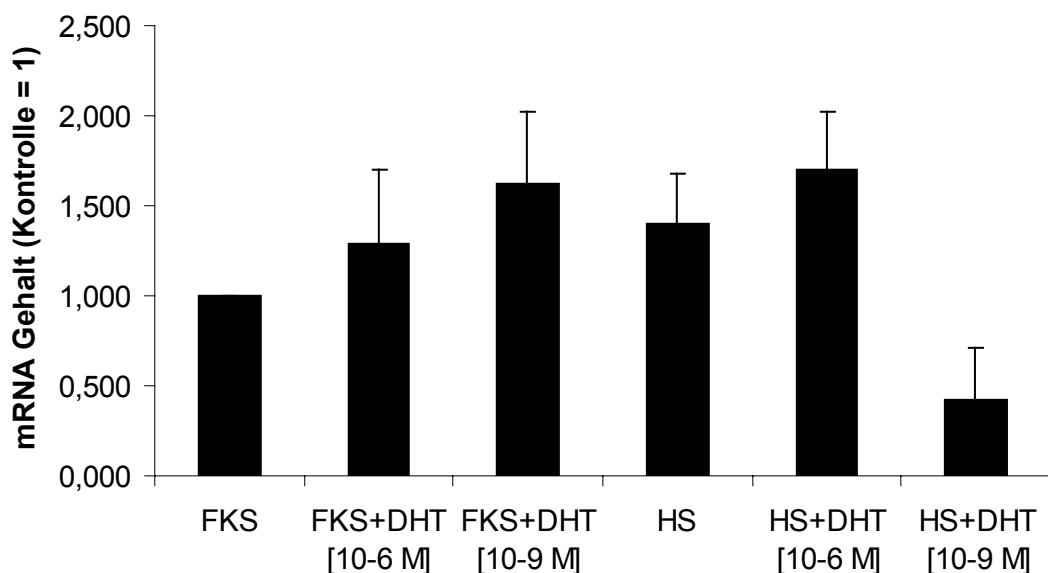


Abb. 25: Jagged-1 mRNA Gehalt in C2C12 Myoblasten nach vier Tagen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe (FKS). Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. FKS = Zellen, die in DMEM/FKS gewachsen sind; HS = Zellen, die in DMEM/HS gewachsen sind; DHT = Dihydrotestosteron.

3.2.4 Analyse des Einflusses von Androgenen auf den mRNA Gehalt von Myostatin

Bei den vorausgegangenen und den in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Versuchen konnte beobachtet werden, dass der mRNA Gehalt der untersuchten Gene durch eine Behandlung mit einem Differenzierungsmedium oder einer Behandlung mit DHT beeinflusst wird. In diesem Zusammenhang interessierte im Speziellen, ob die bisher beobachteten Regulationen über den Androgenrezeptor vermittelt werden. Für den Fall, dass die Induktion von Differenzierungsprozessen über den Androgenrezeptor vermittelt wird, sollte der gezeigte Effekt teilweise oder komplett durch Flutamid unterdrückt werden können. Um diese Frage zu klären, wurde ein Antagonisierungsexperiment mit dem Antiandrogen Flutamid (Kap. 2.6.12) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in DMEM/FKS mit DHT in zwei Konzentrationen [10^{-6} M] und [10^{-9} M] gehalten. Zwei weitere Gruppen wurden zusätzlich zur Applikation mit dem Antiandrogen Flutamid behandelt. Der mRNA Gehalt des Androgenrezeptors wurde anschließend mittels Real-Time PCR gemessen. Abbildung 26 zeigt den mRNA Gehalt des Androgenrezeptors.

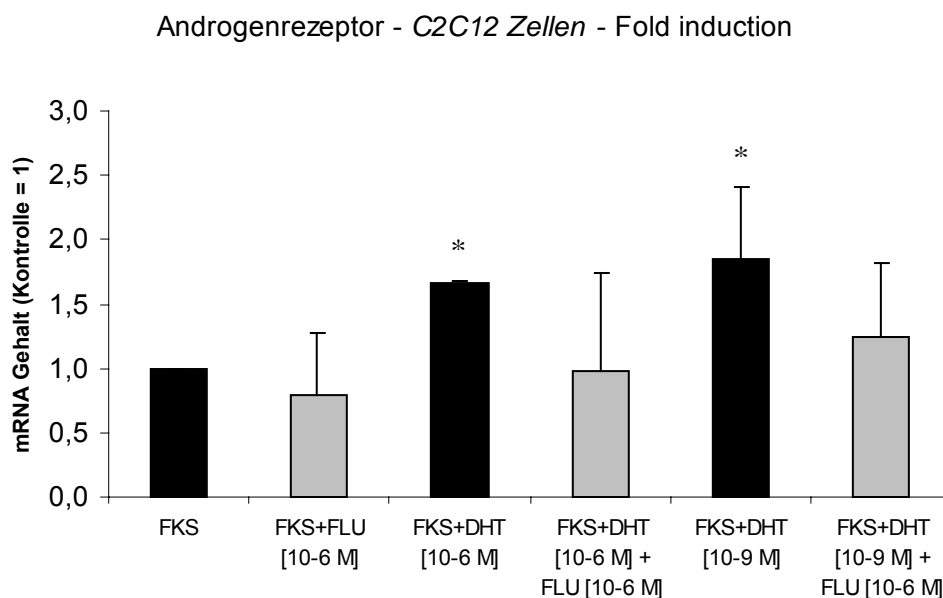


Abb. 26: Androgen Rezeptor mRNA Gehalt in C2C12 Myoblasten; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe (FKS). Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. FKS = Zellen, die in DMEM/FKS gewachsen sind; DHT = Dihydrotestosteron; FLU = Antiandrogen Flutamid. * signifikant gegen FKS (*p < 0.05, zweiseitiger U-Test)

Eine Behandlung der C2C12 Zellen mit DHT führt nach vier Tagen zu einem signifikant erhöhten mRNA Gehalt von AR (s. Abb. 26). Eine Applikation des Antiandrogens zeigt einen erniedrigten mRNA Gehalt für den Androgenrezeptor. Bei einer kombinierten Applikation von DHT und Flutamid ist der mRNA Gehalt von AR wiederum erniedrigt. Flutamid kann somit eine Behandlung mit DHT antagonisieren. Um nun weitere Aussagen über Myostatin und dessen Vermittlung machen zu können, wurde der Myostatin mRNA Gehalt gemessen. Dies zeigt die Abbildung 27.

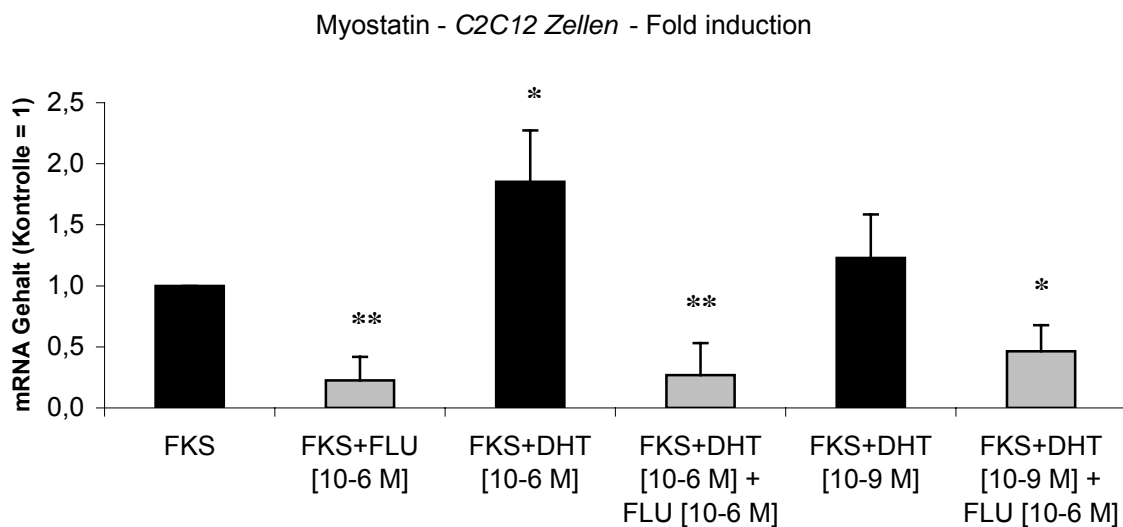


Abb. 27: Myostatin mRNA Gehalt in C2C12 Myoblasten; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe (FKS). Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. FKS = Zellen, die in DMEM/FKS gewachsen sind; DHT = Dihydrotestosteron; FLU = Antiandrogen Flutamid. * signifikant gegen FKS (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, zweiseitiger U-Test)

Die Regulationstendenzen des mRNA Gehalts von Myostatin gleichen denen des AR. Eine Applikation von DHT führt zu einem dosisabhängigen erhöhten mRNA Gehalt von Myostatin. Eine Behandlung der C2C12 Zellen mit Flutamid führt zu einem erniedrigten Myostatin mRNA Gehalt. Eine kombinierte Applikation von DHT und Flutamid hemmt auch hier hochsignifikant die Induktion von Myostatin durch DHT.

3.3 Bindungsaffinität anaboler Steroide, Prohormone und „Designersteroid“ zu unterschiedlichen Rezeptoren

Bisher wurde der Einfluss von Training und die Wirkung von Androgenen auf den mRNA Gehalt von Genen, die in den Prozess der Differenzierung involviert sind, analysiert. Der Rezeptorbindungstest soll dazu beitragen das pharmakologische Profil von anabolen Steroiden, Prohormonen und „Designersteroiden“ zu charakterisieren. Die Bindung eines Steroidhormons an seinen Rezeptor ist ein wichtiger Schritt bei der Initiierung seiner Wirkung. Eine bedeutende Frage bei der Entwicklung neuartigen Steroide ist die Bindungsspezifität und -präferenz der Substanz an einen bestimmten Rezeptor. Unspezifische Bindungen können ungewollte Nebenwirkungen hervorrufen und sollten somit ein Ausschlusskriterium bei dem Einsatz von Medikamenten darstellen. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die spezifischen Bindungsaffinitäten von Tetrahydrogestrinon, Androstendione, Norandrostendion, Norbolethon, Propyltrenbolon und 1-Testosteron an den Androgen-, Progesteron-, Mineralcorticoid- und Glucocorticoid-Rezeptor im Vergleich zu den spezifischen Liganden (R1881, Progesteron, Aldosteron und Dexamethasone) getestet. Die Bindungsaffinität der einzelnen Substanzen im Vergleich zur Referenzsubstanz ist in den folgenden Tabellen aufgelistet.

Test-substanzen	Androgenrezeptor	Test-substanzen	Glucocorticoidrezeptor
Referenzsubstanz R1881	1	Referenzsubstanz Dexamethasone	1
Tetrahydrogestrinon	1,35	Tetrahydrogestrinon	0,77
Androstendione	1,47	Androstendione	109,85
Norandrostendion	1,61	Norandrostendion	210,21
Norbolethon	1	Norbolethon	3,4
Propyltrenbolon	2,62	Propyltrenbolon	2,5
1-Testosteron	4,11	1-Testosteron	376,59

Tab. 4: Die im Rezeptorbindungstest analysierten Substanzen sind jeweils links aufgelistet. Die Bindungsaffinität zu verschiedenen Steroidhormonrezeptoren: Androgenrezeptor (linke Tabelle), bzw. den Glucocorticoidrezeptor (rechte Tabelle), sind dargestellt. Die Werte für die Rezeptoren in der Tabelle geben die jeweilige Konzentration der Substanzen an, die notwendig ist, um 50% des gebundenen (3H)markierten spezifischen Referenzliganden (= 1) für den jeweiligen Rezeptor (R1881, Dexamethason) zu ersetzen.

Test-Substanz	Progesteron-rezeptor	Test-Substanz	Mineralocorti-coidrezeptor
Referenzsubstanz Progesteron	1	Referenzsubstanz Aldosteron	1
Tetrahydrogestrinon	1,16	Tetrahydrogestrinon	1,7
Androstendione	159,53	Androstendione	7,86
Norandrostendion	33,25	Norandrostendion	8,68
Norbolethon	0,52	Norbolethon	7,05
Propyltrenbolon	2,36	Propyltrenbolon	6,82
1-Testosteron	113,16	1-Testosteron	30,99

Tab. 5: Die im Rezeptorbindungstest analysierten Substanzen sind jeweils links aufgelistet. Die Bindungsaffinität zu verschiedenen Steroidhormonrezeptoren: Progesteronrezeptor (linke Tabelle), bzw. den Mineralocorticoidrezeptor (rechte Tabelle), sind dargestellt. Die Werte für die Rezeptoren in der Tabelle geben die jeweilige Konzentration der Substanzen an, die notwendig ist, um 50% des gebundenen (3H)markierten spezifischen Referenzliganden (= 1) für den jeweiligen Rezeptor (Progesteron, Aldosteron) zu ersetzen.

Tetrahydrogestrinon zeigt im Gegensatz zu den anderen Substanzen eine hohe Bindungsaffinität zu allen getesteten Rezeptoren, wobei sich die höchste Bindungsaffinität für den Glucocorticoidrezeptor und den Progesteronrezeptor feststellen lässt. Für Androstendione, Norandrostendion und Norbolethon ist die Bindungsaffinität zum Androgenrezeptor am größten. Propyltrenbolon bindet mit ähnlicher Affinität an den Androgen-, den Glucocorticoid- und den Progesteronrezeptor, aber weniger an den Mineralocorticoidrezeptor.

Für 1-Testosteron wiederum lässt sich eine hohe spezifische Bindungsaffinität zum Androgenrezeptor feststellen und nur eine geringe Affinität zu allen anderen getesteten Rezeptoren.

3.4 Analyse anaboler Substanzen im klassischen Hershberger Versuch

Zur weiteren Charakterisierung der anabolen Substanzen *in vivo* wurde ein klassischer Hershberger Assay (Kap. 2.2.3) durchgeführt, um mögliche Nebenwirkungen der getesteten Substanzen sowie krankhafte Veränderungen der inneren Organe des Körpers durch diese zu identifizieren. Das bisherige Wissen über die Wirkungsweise dieser Substanzen ist in Mensch und Tier sehr begrenzt. Für den Versuch wurden die Substanzen: Tetrahydrogestrinon, Norandrostendion und Desoxymethyltestosteron, 1-Testosteron und Propyltrenbolon untersucht. Testosteron Propionat diente dabei als Kontrollsubstanz.

Die Samenblase, die Prostata und der *M. levator ani* wurden den getöteten Tieren nach 12 Behandlungstagen entnommen. Die Tiere wurden am Ende der Untersuchung gewogen und wiesen keine Gewichtsunterschiede auf. Die Organgewichte der Samenblase, der Prostata und des *M. levator ani* (Abb. 28-30) lassen auf eine androgene bzw. anabole Wirkung der Substanzen schließen. Die Leber wurde ebenfalls entnommen und gewogen, wobei die Gewichte in Abb. 31 dargestellt sind. Der Tyrosin Aminotransferase (TAT) mRNA Gehalt wurde in einigen Gruppen in der Leber bestimmt, um die Toxizität der Substanzen zu ermitteln.

In den folgenden Diagrammen sind alle Werte auf die orchiektomierte Kontrollgruppe (= eins) bezogen, um direkt Aussagen über die Wirkung der einzelnen Substanzen im Vergleich zur Kontrolle und zu den anderen Gruppen treffen zu können.

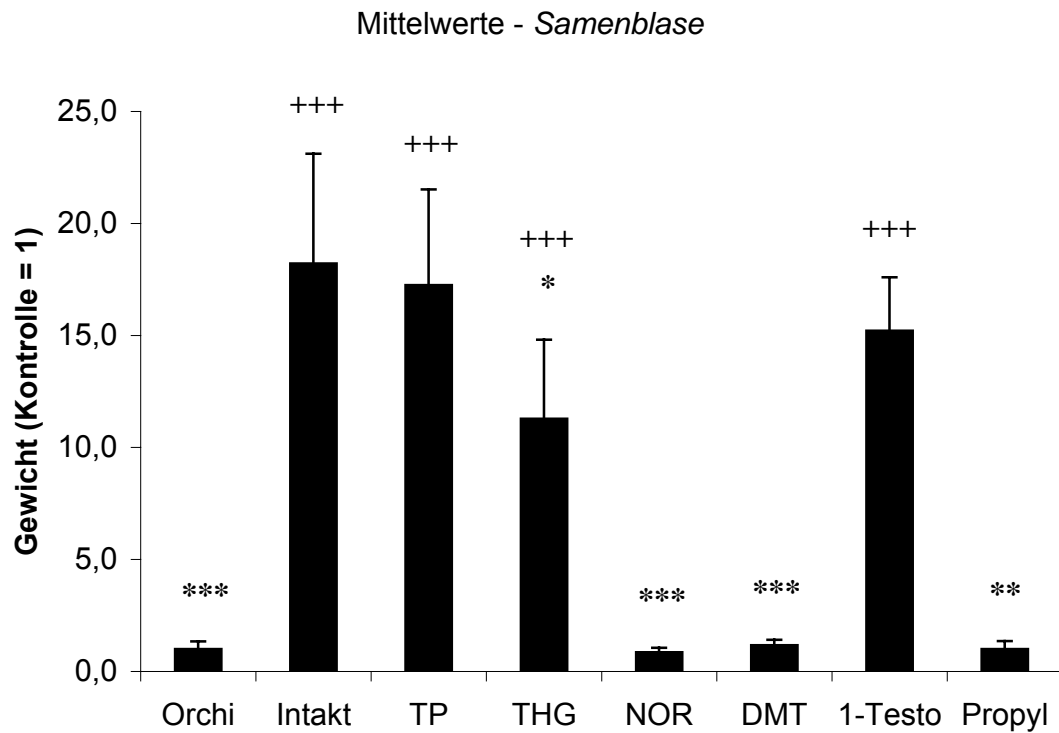


Abb. 28: Effekte auf das Gewicht der Samenblase in orchiektomierten (plus Behandlung von TP, THG, NOR, DMT, 1-Testo und Propyl) und intakten Ratten. Die orchiektomierte Gruppe wurde = eins gesetzt. Intakt = intakte Kontrollgruppe, Orchi = orchiektomierte Kontrollgruppe, TP = Testosteron Propionat, THG = Tetrahydrogestrinon, NOR = Norandrostendion, DMT = Desoxymethyltestosteron. * signifikant gegen Intakt (***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.5, zweiseitiger U-Test); + signifikant gegen Orchi (+++p < 0.001, zweiseitiger U-Test)

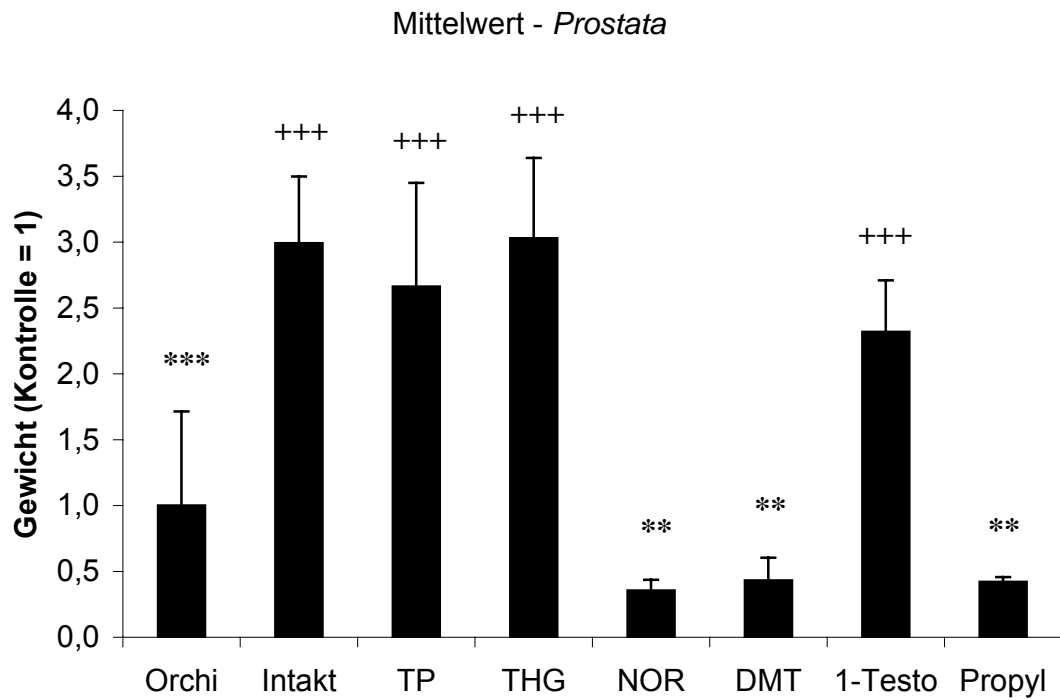


Abb. 29: Effekte auf das Gewicht der Prostata in orchiektomierten (plus Behandlung von TP, THG, NOR, DMT, 1-Testo und Propyl) und intakten Ratten. Die orchiektomierte Gruppe wurde = eins gesetzt. Intakt = intakte Kontrollgruppe, Orchi = orchiektomierte Kontrollgruppe, TP = Testosteron Propionat, THG = Tetrahydrogestrinon, NOR = Norandrostendion, DMT = Desoxymethyltestosteron. * signifikant gegen Intakt ($***p < 0.001$, $**p < 0.01$, zweiseitiger U-Test); + signifikant gegen Orchi ($+++p < 0.001$, zweiseitiger U-Test)

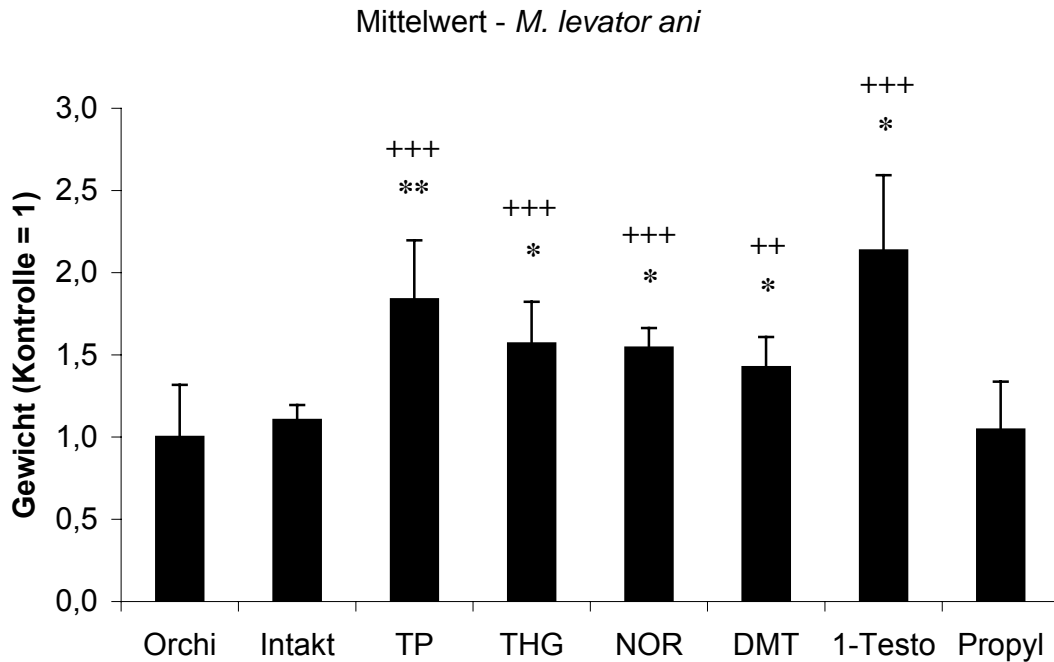


Abb. 30: Effekte auf das Gewicht des *M. levator ani* in orchiectomierten (plus Behandlung von TP, THG, NOR, DMT, 1-Testo und Propyl) und intakten Ratten. Die orchiectomierte Gruppe wurde = eins gesetzt. Intakt = intakte Kontrollgruppe, Orchi = orchiectomierte Kontrollgruppe, TP = Testosteron Propionat, THG = Tetrahydrogestrinon, NOR = Norandrosteron, DMT = Desoxymethyltestosteron. * signifikant gegen Intakt (**p < 0.001, **p < 0.01, zweiseitiger U-Test); + signifikant gegen Orchi (+++p < 0.001, ++p < 0.01, zweiseitiger U-Test)

Eine Behandlung der orchiectomierten Tiere mit TP, THG oder 1-Testo führt zu einer signifikanten Erhöhung des Samenblasengewichts (s. Abb. 28). Dieser Gewichtsanstieg der Samenblase ist für die drei weiteren getesteten Substanzen – NOR, DMT und Propyl – nicht zu beobachten. Die Gewichte der Prostata (Abb. 29) zeigen eine signifikante Zunahme nach einer Behandlung der Tiere mit TP, THG oder 1-Testo, jedoch keinen Effekt nach einer Applikation von NOR, DMT oder Propyl im Vergleich zur orchiectomierten Kontrollgruppe.

Die Gewichte des *M. levator ani* (Abb. 30), der ein androgen-sensitiver Muskel ist, sind bei allen Behandlungsgruppen signifikant erhöht.

Die Leber stellt ein Gewebe dar, welches sehr sensitiv auf eine Behandlung mit Steroidhormonen reagiert. Toxische Wirkungen auf das Lebergewebe, das Gewicht der Leber sowie der Anstieg spezifischer Enzyme wurden von Boada et al. (1999) beschrieben. Die Lebergewichte sind in Abbildung 31

dargestellt. Nach den jeweils unterschiedlichen Behandlungen weisen die Lebergewichte kaum Unterschiede auf. Das Lebergewicht für die Behandlungsgruppe mit 1-Testosteron ist signifikant erhöht, während das von Propyltrenbolon hochsignifikant erniedrigt ist.

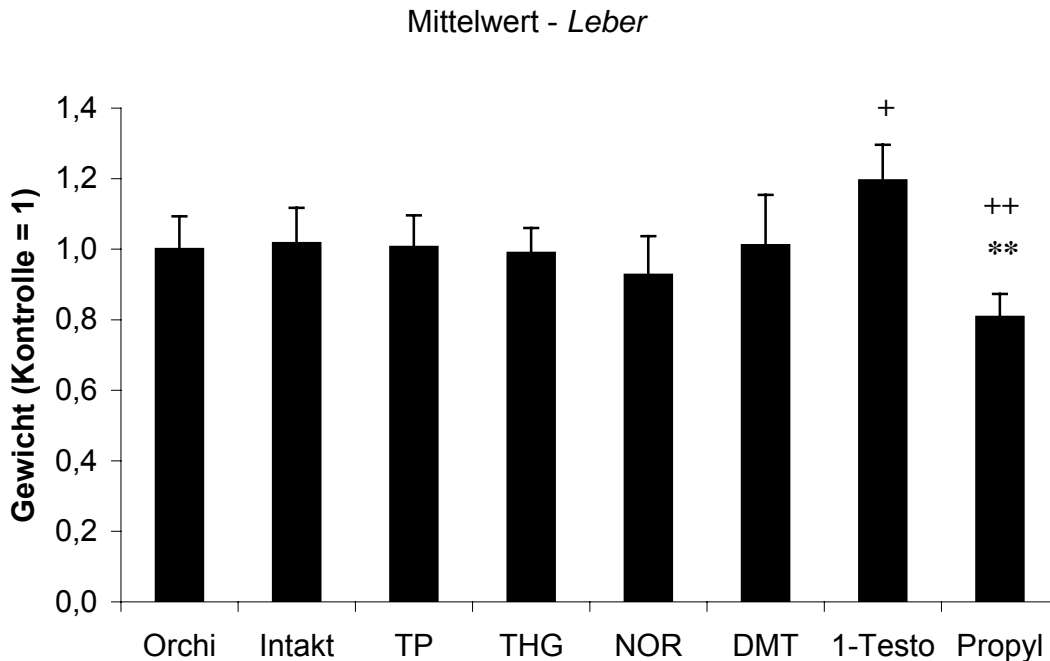


Abb. 31: Effekte von THG, NOR und DMT auf das Lebergewicht in orchiectomierten (plus Behandlung von TP, THG, NOR, DMT) und intakten Ratten. Intakt = intakte Kontrollgruppe, Orchi = orchiectomierte Kontrollgruppe, TP = Testosteron Propionat, THG = Tetrahydrogestrinon, NOR = Norandrostendion, DMT = Desoxymethyltestosteron. * signifikant gegen Intakt (** $p < 0.01$, zweiseitiger U-Test); + signifikant gegen Orchi (++) $p < 0.01$, + $p < 0.05$, zweiseitiger U-Test)

3.4.1 Effekte von anabolen Substanzen auf den mRNA Gehalt ausgewählter Gene in der Leber und der Skelettmuskulatur

Um weiter zu untersuchen, ob die hohe Bindungsaffinität einiger Substanzen, u.a. THG, zu Effekten im Glucocorticoid Signaltransduktionsweg führt, wurde der mRNA Gehalt der Tyrosin Aminotransferase (TAT) gemessen und ist in Abbildung 32 dargestellt. Die Promotoraktivität des TAT-Gens wird direkt über die Bindung des GR-Ligandenkomplexes an das GRE (Glucocorticoid-responsive Element) reguliert (Schmidt et al., 1987). TAT ist ein häufig genutzter Indikator für toxische Nebenwirkungen von Substanzen mit

hoher Affinität zum GR (Johansson et al., 2005). Die Effekte einer zwölf-tägigen Behandlung mit THG im Vergleich zu TP behandelten, intakten oder orchiectomierten Tieren führen zu einem signifikant erniedrigten TAT mRNA Gehalt in der Leber.

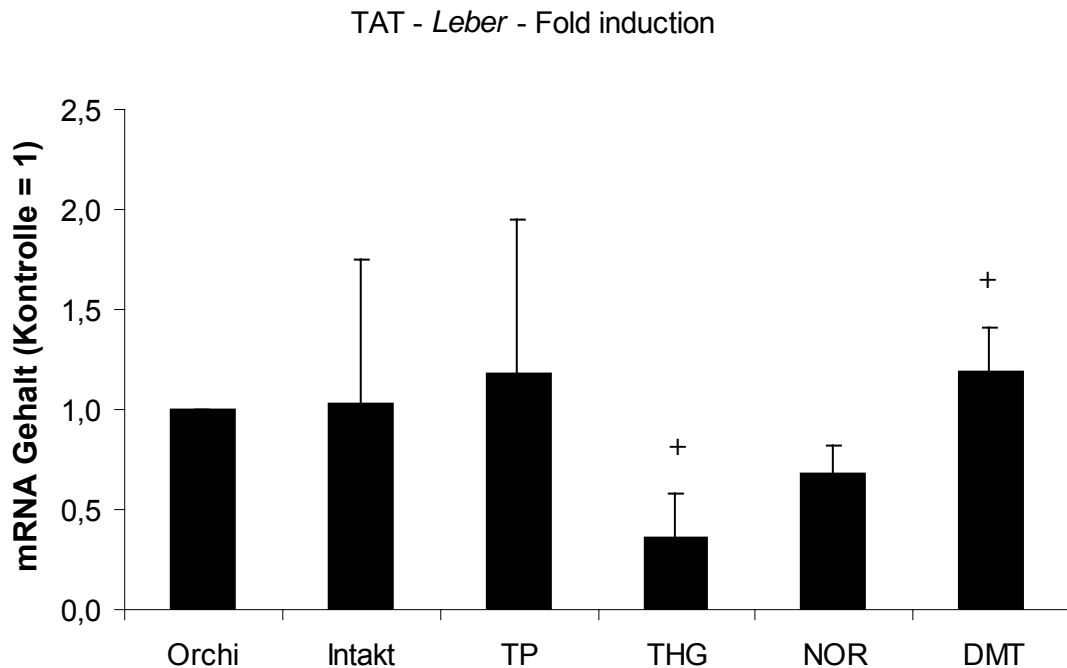


Abb. 32: TAT mRNA Gehalt in der Leber für alle Untersuchungsgruppen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe (orchi). Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. Orchi = orchiectomierte Kontrollgruppe, TP = Testosteron Propionat, THG = Tetrahydrogestron, NOR = Norandrostendion, DMT = Desoxymethyltestosteron. + signifikant gegen Orchi ($+p < 0.05$, zweiseitiger U-Test)

Eine signifikante Erhöhung des TAT mRNA Gehalts findet man nach einer Behandlung von DMT in der Leber. Eine nicht signifikante Repression ist durch die Substanz Norandrostendion zu erkennen.

Neben dem TAT mRNA Gehalt wurden in diesem Versuch auch der mRNA Gehalt von Myostatin und des Androgenrezeptors im *M. gastrocnemius* analysiert. Diese sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Auch hier wurde der Wert der orchiectomierten Kontrollgruppe gleich eins gesetzt.

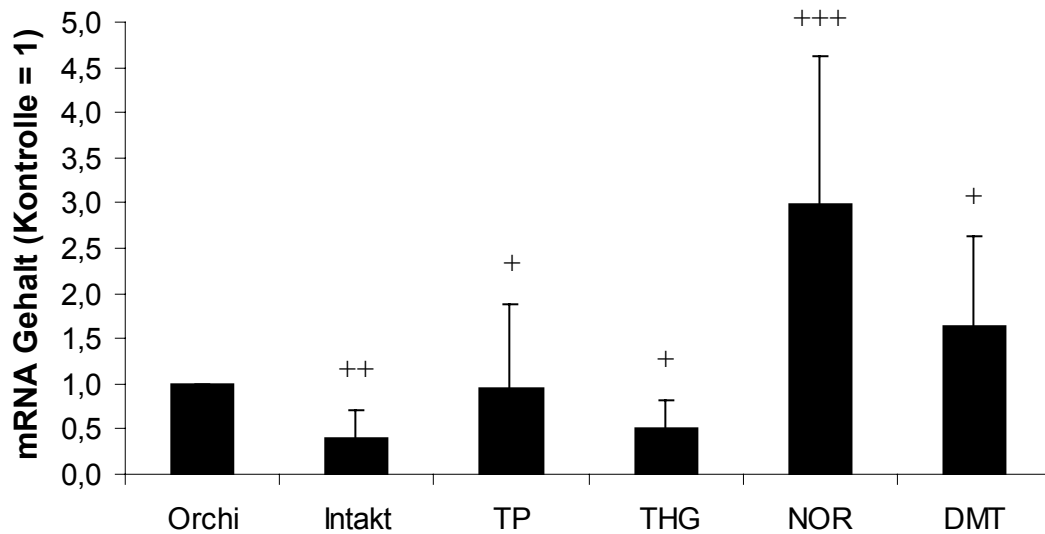
Myostatin - *M. gastrocnemius* - Fold induction

Abb. 33: Myostatin mRNA Gehalt im *M. gastrocnemius* für alle Untersuchungsgruppen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe (orchi). Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. Orchi = orchiektomierte Kontrollgruppe, TP = Testosteron Propionat, THG = Tetrahydrogestrinon, NOR = Norandrostendion, DMT = Desoxymethyltestosteron. + signifikant gegen Orchi (+p < 0.05, ++p < 0.01, +++p < 0.001, zweiseitiger U-Test)

Wie aus Abbildung 33 zu entnehmen, ist der Myostatin mRNA Gehalt in der mit Norandrostendion behandelten Gruppe im Vergleich zur orchiektomierten Kontrollgruppe sehr hochsignifikant erhöht. Eine signifikante Erhöhung des mRNA Gehalts von Myostatin lässt sich auch nach einer Behandlung mit DMT erkennen. Eine hochsignifikante Reduktion des mRNA Gehalts von Myostatin lässt sich im Vergleich der orchiektomierten Gruppe zur intakten Gruppe feststellen.

Abbildung 34 zeigt den mRNA Gehalts des Androgenrezeptors im *M. gastrocnemius* in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen. Eine Erhöhung des mRNA Gehalts des AR ist jedoch nur in den Gruppen, die mit TP, oder DMT behandelt wurden, zu erkennen. Für die Tiere, die mit NOR behandelt wurden, ist eine signifikante Zunahme des mRNA Gehalts von AR zu beobachten.

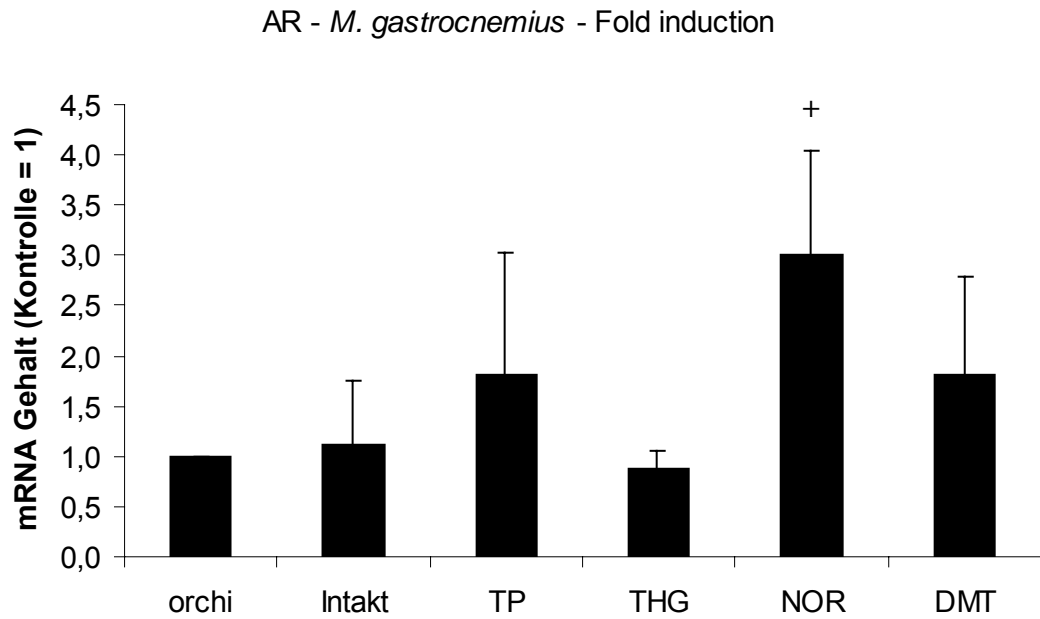


Abb. 34: Androgenrezeptor mRNA Gehalt im *M. gastrocnemius* für alle Untersuchungsgruppen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe (orchi). Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. Orchi = orchiektomierte Kontrollgruppe, TP = Testosteron Propionat, THG = Tetrahydrogestrinon, NOR = Norandrostendion, DMT = Desoxymethyltestosteron. + signifikant gegen Orchi ($+p < 0.05$, zweiseitiger U-Test)

3.5 Analyse der Kombination eines Trainings und einer gleichzeitigen Behandlung mit Androgenen auf den mRNA Gehalt von Myostatin im *M. gastrocnemius*

Der Einfluss einer Kombination von Training und einer Behandlung mit Testosteron Propionat auf den mRNA Gehalt von Myostatin wurde in einem speziellen Tierversuch untersucht. Der Untersuchungsaufbau und die Einteilung der Behandlungs- bzw. Trainingsgruppen ist in Kapitel 2.2.2 nachzulesen. In diesem Versuch wurden die Effekte einer Behandlung mit Testosteron Propionat (TP) in unterschiedlichen Dosen (1 mg/kg/Körpergewicht (KG) pro Tag für orchiektomierte Tiere oder 10 mg/kg/KG pro Tag für intakte Tiere) in Kombination mit einem Schwimmtraining auf den mRNA Gehalt von Myostatin untersucht. Die folgenden Abbildungen (Abb. 35 und 36) zeigen die mRNA Gehalte von Myostatin bei intakten und orchiektomierten Tieren.

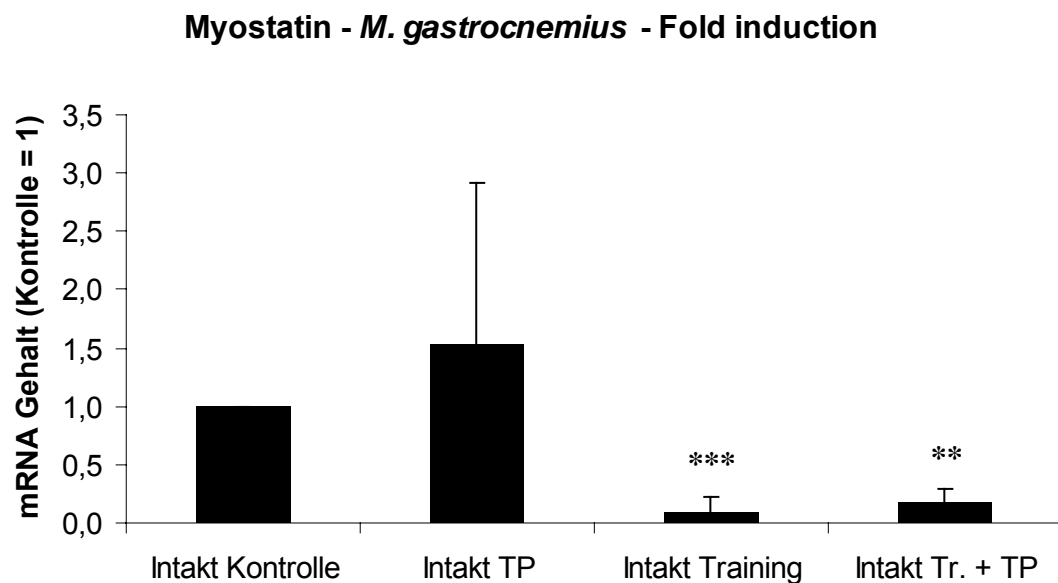


Abb. 35: Myostatin mRNA Gehalt im *M. gastrocnemius* für die intakten Tiere (Dosis: 10mg/kg/KG); normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe. Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. TP = Testosteron Propionat, Tr. = Training. * Signifikant gegen Intakt Kontrolle (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, zweiseitiger U-Test)

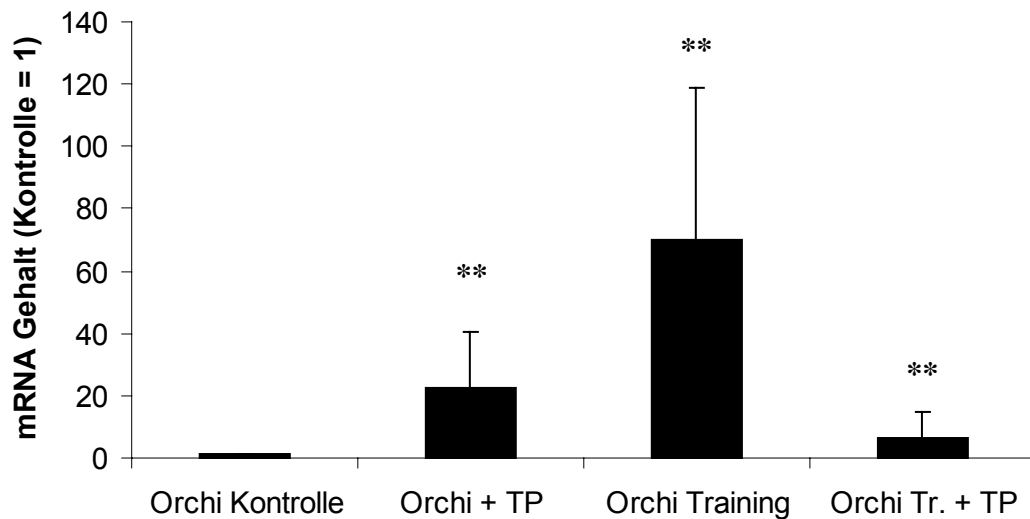
Myostatin - *M. gastrocnemius* - Fold induction

Abb. 36: Myostatin mRNA Gehalt im *M. gastrocnemius* für die orchietomierten Tiere (Dosis: 1mg/kg/KG); normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin. Alle Gruppen wurden normalisiert auf den ΔC_T Wert der Kontrollgruppe. Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kontrollgruppe wurde gleich eins gesetzt. Orchi = orchietomierte Tiere, TP = Testosteron Propionat, Tr. = Training. * Signifikant gegen Orchi Kontrolle (**p < 0.01, zweiseitiger U-Test)

In der intakten Gruppe führt ein Training zu einem hoch signifikant erniedrigten mRNA Gehalt von Myostatin (vgl. dazu auch Kap. 3.1, Abb. 16). Eine Behandlung der Tiere mit Testosteron Propionat zeigt keinen Effekt auf den Myostatin mRNA Gehalt im Vergleich zur intakten Kontrollgruppe. Die Kombination eines Trainings und einer Applikation von TP führt zu einem hochsignifikant erniedrigten mRNA Gehalt von Myostatin.

Bei der Analyse der orchietomierten Untersuchungsgruppe (s. Abb. 36) ist eine hochsignifikante Induktion des Myostatin mRNA Gehalts nach Verabreichung von Testosteron Propionat in einer Konzentration von 1mg/kg/KG pro Tag zu erkennen. Einen ebenfalls hochsignifikanten – noch größeren – induzierenden Effekt auf den Myostatin mRNA Gehalt lässt die orchietomierte Trainingsgruppe erkennen. Die Induktion des mRNA Gehalts von Myostatin durch eine Applikation von TP kann durch eine Kombination aus Behandlung und Training antagonisiert werden.

4 DISKUSSION

Die Skelettmuskulatur kann sich schnell an Veränderungen adaptieren. Die Anpassungen können aufgrund physiologischer Bedürfnisse (z.B. Hyperplasie oder Hypertrophie des Skelettmuskels) oder aufgrund krankhafter Veränderungen (z.B. Atrophie des Skelettmuskels) erfolgen und beinhalten sowohl strukturelle, metabolische als auch endokrinologische Adaptationen (Porter et al., 1995; Simoneau, 1995; Evans und Cannon, 1991). Anpassungen der Skelettmuskulatur sind normalerweise, sofern keine Gewebeschädigungen vorliegen, reversibel. Die Erhaltung der Skelettmuskulatur ist auf ihre außergewöhnliche und bemerkenswerte Regenerationsfähigkeit zurückzuführen (Carlson und Faulkner, 1983).

Eine entscheidende Rolle spielen hierbei die sogenannten Satellitenzellen, ein spezialisierter Stammzelltypus, aus dem durch Differenzierung und Zellverschmelzung die funktionelle Einheit des Skelettmuskels, die Muskelfaser entsteht. Dieses hochkomplexe Geschehen wird durch eine Vielzahl molekularer Mechanismen kontrolliert (Charge und Rudnicki, 2004). Bisher sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen weitgehend vor dem Hintergrund von Muskelerkrankungen und bei Regenerationsprozessen der Skelettmuskulatur untersucht worden. Hierbei wurde kaum berücksichtigt, dass auch die reguläre physiologische Adaptation der Skelettmuskulatur im Wesentlichen über diesen Prozess gesteuert wird. Das Verständnis inwieweit derartige molekulare Mechanismen in die trainingsbedingte Adaptation der Skelettmuskulatur involviert sind, ist jedoch für die Trainingswissenschaft, für die Gereontologie, für die Diabetologie und nicht zuletzt für die Antidopingforschung von größtem Interesse.

Die Identifikation und die Charakterisierung von molekularen Mechanismen der Adaptation der Skelettmuskulatur durch Training, insbesondere das Zusammenspiel mit Faktoren wie Geschlecht, Lebensalter oder unterschiedlichen endokrinologischen Rahmenbedingungen, stellt demnach ein sehr komplexes, aber auch innovatives und relevantes Arbeitsgebiet dar.

Die vorliegende Dissertation soll im Speziellen zum besseren Verständnis der Anpassung der Skelettmuskulatur beitragen und helfen, molekulare Me-

chanismen der Adaptation der Skelettmuskulatur im Zusammenspiel von Training, anabolen Steroiden oder Kombinationen aufzuklären.

Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit:

1. Der Einfluss von anabolen Steroiden auf molekulare Mechanismen der Satellitenzellendifferenzierung in einem Zellkulturmodell untersucht.
2. Der Einfluss von Trainingsreizen auf molekulare Mechanismen der Satellitenzellendifferenzierung *in vivo* in einem Tiermodell analysiert.
3. Verschiedene Prohormone und sogenannte „Designersteroid“ pharmakologisch *in vitro* und *in vivo* charakterisiert. Besonders wurde hierbei untersucht, ob identifizierte molekulare Mechanismen der Skelettmuskulatur substanzspezifisch beeinflusst werden.
4. In einem Kombinationsmodell *in vivo* die kombinierte Wirkung von anabolen Steroiden und Trainingsreizen auf molekulare Mechanismen der Satellitendifferenzierung analysiert.

4.1 Der Einfluss von Androgenen und anabolen Steroiden auf die Proliferation und Differenzierung in der Myoblastenzelllinie C2C12

Um die initiale Wirkung von Androgenen und anabolen Steroiden auf die Proliferation und die Differenzierung in der murinen Myoblastenzelllinie C2C12 zu untersuchen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Die Zellzyklusverteilung wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt, wobei aber nur die S-Phase der Zellen, die einen Rückschluss auf die Proliferation der Zellen erlaubt, ausgewertet wurde.

4.1.1 Wahl des Modellsystems C2C12

Alle *in vitro* Analysen der vorliegenden Dissertation wurden in der Zelllinie C2C12 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine murine Myoblasten-Zelllinie, die aus isolierten Myoblasten eines Mäusemuskels gewonnen und durch Blau et al. (1985) etabliert wurde. Skelettmuskelzellensysteme werden von vielen Wissenschaftlern benutzt, um Faktoren, die das Muskelwachstum beeinflussen, zu studieren. Der Vorteil von Zelllinien liegt in einer Kultivierung unter kontrollierten Bedingungen, weiterhin in einer homogenen Zellpopulation, die einen hohen Grad an Synchronität aufweist. Die C2C12 Zellen stellen ein exzellentes Modell für Differenzierungsuntersuchungen dar, da sie die spezielle Eigenschaft besitzen, sich in kürzester Zeit in Myotuben ausdifferenzieren zu können. Dabei exprimieren sie charakteristische Muskelproteine.

Die C2C12 Zelllinie zählt zu den am weitesten verbreiteten und auch am besten erforschten Zellsystemen zur Untersuchung der Muskelentwicklung (Yaffe et al., 1977; Desler et al., 1996) und der Anpassungsmechanismen der Muskulatur. Aus diesen Gründen wurden C2C12 Zellen für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit gewählt.

4.1.2 Der Einfluss von anabolen Steroiden auf die Proliferationsrate von C2C12 Zellen

Die Analyse der Zellzyklusverteilung mittels Propidiumiodidfärbung nach Nicoletti (Nicoletti et al., 1991) in einem Durchflusszytometer und eine

anschließende Auswertung der einzelnen Phasen liefert genaue Auskünfte über den jeweiligen Zustand der C2C12 Zellen nach Applikation von anabolen Substanzen. Die prozentualen Anteile der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G_0 , G1, G2 und S-Phase) und deren Zu- und Abnahme nach Behandlung mit einem anabolen Steroid oder einem Differenzierungsmedium im Vergleich zu einer nicht behandelten Kontrollgruppe (DMEM/FKS) lassen Aussagen über die Wirkung der Untersuchungssubstanzen auf die Myoblasten zu.

Die S-Phase ist charakterisiert durch den kontinuierlichen Anstieg des DNA-Gehalts der Zellen bis zum Erreichen einer originalgetreuen Kopie der Gesamt-DNA. Die Quantifizierung des Anteils von Zellen in der S-Phase für unbehandelte und behandelte C2C12-Zellen und deren Proliferationsrate sollte Auskunft über die proliferationsstimulierende Wirkung von Steroiden geben. Abbildung 19 zeigt für DHT eine dosisabhängige Zunahme des S-Phasen Anteils der untersuchten Zellpopulation, was als Zunahme der Proliferation gedeutet werden kann. Werden die C2C12 Myoblasten jedoch mit einem Medium, welches Pferdeserum enthält, behandelt, so wird die Proliferation der Zellen gehemmt. Eine Behandlung mit DHT kann diesen Effekt antagonisieren. Zusammenfassend zeigen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten eine Stimulation der Proliferatation von C2C12 Zellen durch DHT.

Die molekularen Mechanismen der Wirkung von Testosteron auf die Skelettmuskulatur wurde in der Vergangenheit zumeist auf Ebene des Zellstoffwechsels untersucht. So ist bekannt, dass Testosteron und Dihydrotestosteron *in vivo*, den Proteinauf- und -abbau beeinflussen, jedoch insgesamt die Proteinsynthese erhöhen (Martinez et al., 1984; Tucker und Merkel, 1987). Einige Forschungsgruppen konnten einen erhöhten Proteinabbau, vor allem nach einer Behandlung mit Trenbolonacetat, feststellen (Heitzman, 1980; Sinnett-Smith et al., 1983; Buttery und Sinnett-Smith, 1984). Daten über den Einfluss von Androgenen und anabolen Steroiden auf das Proliferationsverhalten von Muskelvorläuferzellen sind hingegen selten. Gospodarowicz et al. (1976) berichten von einer erhöhten Proliferationsrate in isolierten Myoblasten von Rindern nach Applikation von Testosteron, wohingegen Powers und Florini (1975) von einer proliferationshemmenden Wirkung von Testosteron auf Rattenmyoblasten berichten. Weitere Gruppen konnten nach einer

Androgenbehandlung in Satellitenzellen von Ratten (Thompson et al., 1989), Schweinen (Doumit et al., 1996) und in C2C12 Zellen (Lee, 2002) überhaupt keinen Effekt erkennen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen eindeutig eine dosisabhängige Proliferationsinduktion nach einer Applikation von DHT. Es ist nicht auszuschließen, dass die Diskrepanz zwischen den unterschiedlichen Datensätzen methodischen Ursprungs ist. Es ist daher offensichtlich, dass in Zukunft weitere *in vitro* Untersuchungen nötig sind, um den Einfluss von Androgenen auf die Proliferation von Muskelzellen zu untersuchen, um zu einem klaren Ergebnis zu gelangen.

4.1.3 Der Einfluss von Androgenen und anabolen Steroiden auf die Induktion von Differenzierungsprozessen in C2C12 Zellen

Neben der Frage, ob Androgene die Proliferation von Muskelvorläuferzellen beeinflussen ist auch zu klären, inwieweit die Differenzierung zu Myotuben hiervon beeinflusst wurde. Die Analyse des Differenzierungszustandes von C2C12 Zellen mittels Bestimmung der Creatin-Kinase-Konzentration wurde von Schwarz (2005) in unserem Institut etabliert (s. Kap. 2.7.4). Der Creatin-Kinase-Gehalt kann als repräsentativer Marker für den Differenzierungszustand von Muskelzellen angesehen werden (Hidenori et al., 2005).

Im Mittelpunkt dieser Untersuchung stand die Frage, ob Androgene und anabole Steroide die Differenzierung von C2C12 Zellen zu Myotuben beeinflussen. Undifferenzierte Zellen und Zellen, die in Medium mit Pferdeserum (welches Differenzierungsprozesse induziert) gewachsen sind, dienten in den vorliegenden Experimenten als Kontrolle. Die Induktion von Differenzierungsprozessen in C2C12 Zellen in Gegenwart von Medium mit Pferdeserum ist eine etablierte Methode (Sultan et al., 2006; Portier et al., 1999; Goto et al., 1999). Lawson und Purslow (2000) konnten nach fünftägiger Kultur in Gegenwart von 2% HS oder von serumfreien Medium eine post-konfluente Zunahme der CK-Aktivität feststellen, die mit dem Differenzierungsstatus korrelierte. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass Pferdeserum (HS) z.B. durch einen geringeren Wachstumsfaktorenanteil, vergleichbar mit der Wirkung von serumfreiem Medium, die Differenzierung der C2C12 Zellen auslöst.

Auch die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zeigen, dass die Kultur von C2C12 Myoblasten in Gegenwart von HS eine kontinuierliche, zeitabhängige und signifikante (nach drei und sechs Tagen) Induktion der Differenzierung bewirkt (s. Abb. 20). Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten zeigen auch in Zellen, die in DMEM/FKS gewachsen sind, eine geringere, jedoch ebenfalls eine zeitabhängige Zunahme der CK-Aktivität. Eine Ausdifferenzierung der Zellen, d.h. eine Verschmelzung der Myoblasten zu Myotuben, lässt sich bereits unter dem Lichtmikroskop beobachten. Möglicherweise induzieren Zell-Zell-Kontakte die im Wachstumsmedium erfolgenden Differenzierungsprozesse von C2C12 Zellen. Bei der Kultivierung der Zellen wurde durch regelmäßige mikroskopische Kontrolle und rechtzeitiges Passagieren ein konfluentes Wachsen der Zellen verhindert und Zell-Zell-Kontakte minimiert.

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit bewirkt eine Applikation von DHT oder einem „Designersteroid“ wie z.B. THG eine dosis- und zeitabhängige Induktion der Differenzierung der C2C12 Zellen in DMEM/FKS. Eine signifikante Zunahme des Differenzierungszustandes ist nach drei und sechs Tagen zu erkennen. Diese Induktion der CK-Aktivität ist in den Konzentrationen ($[10^{-6} \text{ M}]$ und $[10^{-9} \text{ M}]$) bei einer Applikation von DHT signifikant. Für THG lässt sich eine signifikante, dosisabhängige Zunahme der CK-Aktivität nach sechs Tagen beobachten (s. Abb. 20). Da die Wirkungsweisen von anabolen Steroiden, vor allem „Designersteroiden“, auf die Differenzierung von Muskelzellen bisher wenig untersucht wurden, existiert kaum Vergleichsliteratur. Die in dieser Arbeit gefundenen Befunde weisen jedoch darauf hin, dass anabole Steroide wie DHT, sowie „Designersteroide“ wie THG, die Differenzierung von C2C12 Myoblasten stimulieren. Bestätigt wird die Hypothese durch ein Antagonisierungsexperiment mit dem Antiandrogen Flutamid (Schwarz, 2005). Die Untersuchungen zeigen, dass eine Induktion der CK-Aktivität durch eine Applikation von DHT und THG in C2C12 Zellen konzentrationsabhängig durch Flutamid antagonisiert werden kann. Diese beobachteten Effekte könnten von großer Bedeutung für das Verständnis der molekularen Mechanismen der Skelettmuskeladaptation sein. Um die beobachteten Wirkmechanismen weiter zu charakterisieren und insbesondere die Rolle von

assoziierten Genen der Muskeldifferenzierung aufzuklären, wurde der mRNA Gehalt in unterschiedlichen Zellexperimenten untersucht.

4.2 Die Analyse der Wirkung von Androgenen und anabolen Steroiden auf den mRNA Gehalt verschiedener Gene in C2C12 Zellen

Um die molekularen Wirkungsmechanismen von Androgenen und anabolen Steroiden auf die Differenzierung von C2C12 Zellen weiter zu charakterisieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Regulationen von mRNA Gehalten von Genen, die in Zusammenhang mit Differenzierungsprozessen von Satellitenzellen stehen, analysiert. Hierzu wurden C2C12 Zellen mit FKS und HS und jeweils einer Applikation von DHT in zwei Konzentrationen ($[10^{-6}$ M] und $[10^{-9}$ M]) behandelt. Anschließend wurde die Gengehalte mittels Real-Time PCR nach RNA Isolation und cDNA Synthese bestimmt.

Der Notch-1-Signaltransduktionsweg ist als Mechanismus zur Steuerung von Differenzierungsprozessen unterschiedlicher Zelltypen bekannt. Die Bedeutung des Notch-1-Signaltransduktionsweges liegt in der Regulation der Zellproliferation, der Ausdifferenzierung von Stammzellen zu spezialisierten Zellen und der asymmetrischen Zellteilung während der Embryogenese (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Conboy und Rando, 2002). Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Versuche haben zur Klärung der Rolle des Notch-1-Signaltransduktionswegs bei der myogenen Differenzierung nach einer Behandlung mit einem anabolen Steroid beigetragen.

In der Literatur wird beschrieben, dass Notch-1 im Allgemeinen die Differenzierung von Zellen hemmt (Nofziger et al., 1999). Bezüglich der Differenzierungsprozesse im Skelettmuskel ist von Bedeutung, dass eine Aktivierung von Notch-1 die Expression von weiteren myogenen Faktoren wie MyoD, Myogenin und Mrf4 hemmt sowie das morphologische Erscheinungsbild komplett ausdifferenzierter, vielkerniger Myotuben beeinflusst (Jarriault et al., 1998; Kato et al., 1997; Kopan et al., 1994; Kuroda et al., 1999; Lindsell et al., 1995; Luo et al., 1997; Nofziger et al., 1999; Shawber et al., 1996).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen führt eine Behandlung mit Pferdeserum, welches eine Differenzierung der Zellen auslöst, zu einer signi-

fikanten Repression der mRNA Konzentration von Notch-1. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Daten.

Die Wirkung von Androgenen und anabolen Steroiden auf den Notch-1-Signaltransduktionsweg wurde bisher noch nicht untersucht. Die gewonnenen Daten zeigen einen signifikant erhöhten mRNA Gehalt des Membranproteins Notch-1 nach einer Applikation von DHT in einer Konzentration von $[10^{-6} \text{ M}]$ im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 21). Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass DHT entweder direkt oder indirekt den Notch-1 mRNA Gehalt beeinflusst. Dieser Befund ist mechanisch schwierig zu interpretieren, da er doch scheinbar im Widerspruch zu der Beobachtung steht, dass DHT, ebenso wie HS, Differenzierungsprozesse in C2C12 Zellen induziert. Die Beobachtung, dass DHT die HS induzierte Repression des Notch mRNA Gehalts antagonisieren kann, darf jedoch als indirekte Bestätigung des Befundes angesehen werden.

Um die molekularen Mechanismen weiter zu charakterisieren, wurde der mRNA Gehalt von Delta-1, einem Liganden von Notch-1, untersucht. Vergleicht man die Muster der mRNA Gehalte von Notch-1 und Delta-1 (Abb. 21 und Abb. 22), so lässt sich eine spiegelbildliche Regulation des Rezeptors zu seinem Liganden erkennen. Der Delta-1 mRNA Gehalt wird durch das Medium mit Pferdeserum signifikant induziert, während eine Behandlung mit DHT in Medium, welches FKS enthält, zu einer signifikanten Erniedrigung führt. In der Literatur ist beschrieben, dass eine Erhöhung der Konzentration des Liganden Delta-1 Notch-1 aktiviert, ein Prozess der wiederum die Differenzierung der Myoblasten hemmt (Delfini et al., 2000).

Das in der vorliegenden Arbeit beobachtete Regulationsmuster von Notch-1 und Delta-1 nach der Induktion von Differenzierungsprozessen durch HS könnte auf einen molekularen Kompensationsmechanismus hinweisen. Ist wenig Notch-1-Rezeptor vorhanden, wird von der Zelle offensichtlich kein Ligand Delta-1 gebildet. Wird dieser in die Umgebung abgegeben, wird die Differenzierung von Satellitenzellen zunächst gehemmt. Bedeutsam ist die Beobachtung, dass DHT die HS induzierte Stimulation des Delta-1 mRNA Gehalts komplett antagonisieren kann. Auch dies wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Ein weiterer Ligand von Notch-1 ist Jagged-1. Betrachtet man die Ergebnisse des mRNA Gehalts von Jagged-1 nach einer Behandlung mit Pferdeserum oder DHT, so lassen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen (Abb. 25).

Um die hier untersuchten molekularen Mechanismen zusätzlich zu charakterisieren, wären weitere Versuche, vor allem Antagonisierungsexperimente, sinnvoll, sowie Untersuchungen zur Expression und Lokalisation von Notch-1, Delta-1 und Jagged-1 auf Proteinebene, um die Regulationsmuster des mRNA Gehalts zu bestätigen.

Neben den Mitgliedern des Notch-1-Signaltransduktionsweges wurden in der vorliegenden Arbeit auch die mRNA Gehalte von Sox-8 und Sox-9 (Abb. 23 und Abb. 24) analysiert. Sox Proteine spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen. Eine erhöhte Expression von Sox-8 und Sox-9 hemmt die Differenzierung (Schmidt et al., 2003).

In den dargestellten Versuchen wurde eine signifikante Induktion des Sox-8 mRNA Gehalts nach einer Applikation mit Medium, welches Pferdeserum enthält, nachgewiesen. Eine Behandlung der C2C12 Myoblasten mit HS und DHT [10^{-6} M] führt jedoch zu einer signifikanten Reduktion. Es ist anzumerken, dass sich die Muster der mRNA Gehalte von Sox-8 und Delta-1 gleichen. Betrachtet man die mRNA Gehalte von Sox-9 (Abb. 24), so kann man keine signifikante Regulation nach einer Applikation von Pferdeserum oder DHT in C2C12 Zellen feststellen. Eine tendenzielle Induktion der mRNA von Sox-9 ist jedoch nach Behandlung der Zellen mit dem Differenzierungsmedium zu erkennen. Eine Erklärung hierfür könnten die Ergebnisse aus einer Untersuchung von Sock et al. im Jahr 2001 leisten, die eine Co-Expression von Sox-9 oder Sox-10 für die Expression von Sox-8 beschreiben und dies damit erklären, dass der Verlust von Sox-8 durch ein weiteres Protein aus der Subgruppe E der Sox-Proteine kompensiert wird. Sie konnten vor allem eine kombinierte Expression von Sox-8 mit Sox-9 in mesodermalen Derivaten finden. Ebenfalls ist die mRNA Expression für die zusammenhängende Expression der beiden Proteine möglicherweise von Bedeutung.

Die Ergebnisse für die Klasse der Sox-Proteine sind ebenfalls auf Proteinebene in weiterführenden Experimenten und Antagonisierungsversuchen zu bestätigen.

4.2.1 Analyse des Einflusses von Androgenen auf den mRNA Gehalt von Myostatin

Neben den Mitgliedern der Notch- und Sox-Proteine hat auch Myostatin einen Einfluss auf die Entwicklung der Skelettmuskulatur. Myostatin wird als negativer Regulator des Skelettmuskelwachstums beschrieben (McPherson et al., 1997). Um zu analysieren inwieweit der mRNA Gehalt von Myostatin durch Androgene beeinflusst wird, wurden C2C12 Zellen mit DHT dosisabhängig behandelt und der mRNA Gehalt von Myostatin im Vergleich zu einem klassisch androgenregulierten Gen, dem Androgenrezeptor, analysiert. Um zu untersuchen, ob die beobachteten Regulationen von Myostatin über den AR vermittelt werden, wurde zusätzlich ein Antagonisierungsexperiment durchgeführt. Hierbei ging es darum, die Frage zu beantworten, ob die von uns beobachteten Effekte der Androgene über den AR-vermittelten Mechanismus übertragen werden.

Um die Regulation von Myostatin interpretieren zu können, wurde als Referenz der mRNA Gehalt des AR analysiert. Tierexperimente sowie klinische Studien schreiben dem Androgenrezeptor Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle bei der Skelettmuskulaturentwicklung, der Zunahme an Skelettmuskelmasse und -kraft, sowie an der Proteinsynthese zu. Sinha-Hikim et al. zeigten im Jahr 2004, dass der AR in unterschiedlichen menschlichen Muskelzellen, vor allem in Satellitenzellen, exprimiert wird.

Die Ergebnisse aus einer Untersuchung von Lee (2002) belegen, dass der Androgenrezeptor möglicherweise das Myoblastenwachstum unterdrückt und die Myoblastendifferenzierung unterstützt.

Der mRNA Gehalt des Androgenrezeptors (AR) ist in Abbildung 26 dargestellt. Eine Applikation von DHT führt in den Versuchen der vorliegenden Dissertation zu einer Induktion des mRNA Gehalts des AR und zu einer Repression diesen durch Flutamid. Durch den Einsatz des Antiandrogens Flutamid in Kombination mit DHT ($[10^{-6} \text{ M}]$ und $[10^{-9} \text{ M}]$) konnte gezeigt werden, dass das Antiandrogen die Wirkung von DHT kompensieren kann. Somit verhält sich das Testsystem erwartungsgemäß.

Eine Applikation der C2C12 Zellen mit DHT führt außerdem zu einer deutlichen Stimulation des Myostatin mRNA Gehalts (Abb. 27). Eine Behandlung mit DHT in einer Konzentration von $[10^{-6} \text{ M}]$ zeigt einen signifikanten Anstieg

des Myostatin mRNA Gehalts. Dieser Effekt lässt sich durch Zugabe des Antiandrogens Flutamid antagonisieren. Daraus lässt sich schließen, dass Myostatin über den Androgenrezeptor vermittelten Signaltransduktionsweg beeinflusst wird. Über welche genauen molekulare Mechanismen der aktivierte Androgenrezeptor die Myostatinexpression beeinflusst, lässt sich nicht erschließen. Es besteht die Möglichkeit einer direkten Einflussnahme, bzw. über die Einbindung weiterer Transkriptionsfaktoren. In der Literatur finden sich derzeit keine Hinweise. Um eine fundierte Aussage treffen zu können ist die Durchführung weiterer Experimente notwendig.

Siriatt et al. (2006) untersuchten die Regulation der Genexpression eines an den Androgenrezeptor bindenden Co-Faktors (ARA-70 = androgen receptor associated protein-70) durch Myostatin. Sie konnten eine erhöhte Expression von ARA-70 im *M. biceps femoris* in Mäusen ohne Myostatin im Vergleich zu Muskeln aus Wildtyp-Mäusen feststellen. Eine Zugabe von exogenem Myostatin führte zu einem Absinken der ARA-70 Expression, so dass sie daraus schlossen, dass Myostatin ein negativer Regulator der ARA-70 Expression sein könnte. Aufgrund ihrer Ergebnisse und einer Hypertrophiezunahme durch ein Fehlen an Myostatin und einer erhöhten Expression von AR sind sie der Meinung, dass zumindest teilweise die Hypertrophie durch einen Mangel an Myostatin beeinflusst wird, der die Aktivität des AR über eine vermehrte ARA-70 mRNA Expression beeinflusst. ARA-70 ist bekannt als Co-Faktor, der den Androgenrezeptor stimuliert.

Die Untersuchung von Siriatt et al. (2006) unterstützt in Hinsicht auf die Regulation des AR die Vermutung, dass der AR durch Myostatin in den C2C12 Zellen reguliert wird. Auch bei diesem Experiment ist es notwendig, die Daten auf Proteinebene zu bestätigen.

4.3 Die Effekte eines Trainings *in vivo* auf den mRNA Gehalt verschiedener Gene, die in den Prozess der Differenzierung involviert sind

Durch die in den vorherigen Abschnitten gezeigte Regulationen durch Androgene in den *in vitro* Experimenten, konnte eine Vielzahl von Genen, die in Differenzierungsprozesse involviert sind, beeinflusst werden. In den folgenden beschriebenen *in vivo* Versuchen sollte die Frage geklärt werden, inwieweit der mRNA Gehalt differenzierungsrelevanter Gene im Skelettmuskel durch körperliche Aktivität beeinflusst werden. Zur Analyse zeit- und trainingsabhängiger Einflüsse auf die mRNA Gehalte wurde ein Schwimmexperiment durchgeführt (s. Kap. 2.2.1 und 3.1). Zur *in vivo* Bestimmung wurde der *M. gastrocnemius* ausgewählt, da in vorausgegangenen Untersuchungen dieser Muskel mit dem niedrigsten mRNA Gehalt von Myostatin nach einem Trainingsreize reagiert. Andere Muskeln, wie der *M. soleus*, lassen kaum Regulationstendenzen in Bezug auf den Myostatin mRNA Gehalt erkennen (Matsakas et al. 2005; Matsakas, 2004). Diese Effekte könnten auf die unterschiedlichen Fasertypzusammensetzungen der Muskeln zurückzuführen sein. Der *M. gastrocnemius* wird als ein Muskel beschrieben, der sich bei der Ratte vorwiegend aus schnellen Muskelfasern (Bär und Pette, 1988), während der *M. soleus* sich hauptsächlich aus langsamen Muskelfasern zusammensetzt (Demirel et al., 1999). Auch Carlson et al. (1999) zeigten eine enge Verbindung der Myostatinexpression mit der MHC IIb Isoform im Muskel.

Notch-1, Delta-1 und Sox-8 wurden neben Myostatin ebenfalls auf ihre Regulationen untersucht. Eine nähere Beschreibung der einzelnen Gene Myostatin, Notch-1, Delta-1 und Sox-8 erfolgte in Kap. 1.2.

Schwimmtraining mit Ratten ist eine oft genutzte Trainingsmethode in Studien, welche das Verhalten nach einer Applikation von pharmakologischen Wirkstoffen erforschen (Detke und Lucki, 1996; Yates et al., 1991), sowie für Untersuchungen von Trainingseffekten auf die Muskulatur von Tieren (Booth und Thomason, 1991). Für diesen Zweck wurde ein Schwimmtraining als Methode für ein einmaliges intensives, sowie über mehrere Tage durchgeführtes Ausdauer-Trainingsmodell eingesetzt. Für das Training über mehrere

Tage wurde der Zeitraum von drei Tagen gewählt, da davon auszugehen ist, dass nach dieser Trainingsperiode eine Adaptation auf molekularer Ebene zu erwarten ist, wie sie schon nach einem fünf Tage-Training beobachtet werden konnte (Matsakas, 2004).

Seit der Entdeckung von Myostatin im Jahr 1997 durch McPherron sind die Funktion, die Lokalisation sowie die Wirkungsweisen auf mehreren Gebieten weitgehend erforscht worden, darunter in der Tierzucht (Kambadur et al., 1997; McPherron und Lee, 1997), der Raumfahrt (Lalani et al., 2000), der klinische Therapie (Gonzalez-Cadavid et al., 1998; Sharma et al., 1999) und der Altersforschung (Ivey et al., 2000; Marcell et al., 2001). Mehrere Studien haben bisher die mRNA Expression von Myostatin nach einem Ausdauertraining mit unterschiedlichen Intensitäten untersucht (Carlson et al., 1999; Roth et al., 2003; Willoughby, 2004; Friedel, 2002; Matsakas, 2004), doch sie gelangten nicht zu einheitlichen Resultaten. Die Wirkungsweise von Myostatin in Folge von körperlichem Training oder seine Rolle bei der Differenzierung von Skelettmuskelzellen bedarf somit weiterer Untersuchungen. Friedel (2002) und Matsakas (2004) zeigten eine Repression des mRNA Gehalts von Myostatin nach langfristigem (über drei Monate) Ausdauertraining, wie auch nach einem Schwimmtraining über fünf Tage (Matsakas et al., 2005). Die Ergebnisse aus vorausgegangenen Studien belegten einen geschlechtsunspezifischen, erniedrigten mRNA Gehalt von Myostatin nach einem Trainingsreiz (Friedel, 2002; Matsakas, 2004).

Die Ergebnisse des im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Trainingsexperiments belegen, dass der Myostatin mRNA Gehalt (s. Abb. 16) nach drei Tagen Training hochsignifikant reprimiert wird. Dies ist in Übereinstimmung zu früheren Befunden, die ein ähnliche Regulation nach einem Schwimmtraining über fünf Tage ergaben. Interessanterweise ist bereits durch ein einmaliges Training nach sieben Stunden eine hochsignifikante Repression von Myostatin zu erkennen. Nach 24 Stunden ist die Repression abgeschwächt. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass der mRNA Gehalt von Myostatin durch ein einmaliges, wie auch über mehrere Tage durchgeführtes Training moduliert wird. Dies weist auf eine potentielle Rolle von Myostatin beim Umbau der Muskulatur als Reaktion auf einen Trainingsreiz hin.

Für die Regulation des mRNA Gehalts von Notch-1, Delta-1 und Sox-8 infolge eines Trainingsreizes existiert keine Vergleichsliteratur. Die vorliegende Dissertation stellt die erste Untersuchung hierfür dar. Der mRNA Gehalt von Notch-1 wird durch einen Trainingsreiz nicht signifikant reguliert (s. Abb. 13). Mit der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die mRNA Gehalte von Delta-1 (s. Abb. 14) und Sox-8 (s. Abb. 15) durch ein Training beeinflusst werden. Der mRNA Gehalt von Delta-1 wird vergleichbar mit demjenigen von Myostatin durch ein einmaliges wie auch ein dreitägiges Training signifikant reprimiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede des mRNA Gehalts von Sox-8 nachgewiesen werden. Dennoch ist eine Tendenz zur Erniedrigung des mRNA Gehalts von Sox-8 durch Training erkennbar.

Vergleicht man die Regulationstendenzen im Schwimmtraining mit den Experimenten *in vitro* in den C2C12 Zellen, so wird deutlich, dass die Gene Sox-8 und Delta-1 in einer ähnlichen Weise nach einem Trainingsreiz wie auch nach einer Applikation durch DHT reguliert werden. Abbildung 37 gibt einen Überblick über die Regulationen des mRNA Gehalts von Notch, Delta und Sox-8 *in vitro* und *in vivo*. Wie bei den Zellexperimenten bleibt hier festzuhalten, dass eine Bestätigung der Daten auf Proteinebene notwendig ist.

	Kontrollgruppe	HS	FKS + DHT [10 ⁻⁶ M]	Einmaliges Training 24h	Dreitägiges Training
Notch	—	↓	↑	↑	—
Delta	—	↑	↓	↓	↓ ↓
Sox-8	—	↑	↓	↓	↓

Tab. 6: Zusammenfassender Überblick über die Regulationen des mRNA Gehalts *in vitro* und *in vivo* für Notch, Delta und Sox-8 (Fingerprint)

4.4 Analyse molekularer Mechanismen der gewebsspezifischen Wirkung von unterschiedlichen anabolen Steroiden

In der vorliegenden Dissertation wurde die Wirkung von Androgenen und Trainingsreizen auf den mRNA Gehalt von unterschiedlichen, differenzierungsrelevanten Genen untersucht. Mit den in diesem Kapitel beschriebenen Versuchen sollen molekulare Mechanismen der gewebsspezifischen Wirkung von unterschiedlichen anabolen Steroiden aufgeklärt werden. Neben einer toxikologischen Risikobewertung relevanter Verbindungen, wie z.B. auch neuartiger „Designersteroid“ wie THG und DMT, war auch hier die Charakterisierung spezifischer molekularer Mechanismen, wie z.B. der Einfluss von Myostatin von Bedeutung.

Die am häufigsten verwendeten Dopingsubstanzen stellen die Gruppe der anabolen Steroidhormone dar. Seit diese auf der Verbotliste stehen, haben Trainer und Athleten versucht, neue Stoffe zu finden, die bei Dopingkontrollen nicht auffindbar sind. Gerüchte über solche neuartigen Steroide sind schon seit ca. 15 Jahren im Umlauf. Die Entdeckung von sogenannten „Designersteroiden“, welche nicht auf dem öffentlichen Markt erhältlich sind, sondern eigens entworfen, synthetisiert und in Umlauf gebracht wurden, um sie als unauffindbare Dopingsubstanz zu nutzen, stellen eine neue Klasse von Substanzen dar. Eine dieser Substanzen ist das „Designersteroid“ THG; diese wurde weder pharmakologisch noch toxikologisch analysiert, bevor sie von Trainern und Athleten mißbraucht wurde. Zur Dopingkontrolle und -prävention ist es aber notwendig, Auswirkungen und Nebenwirkungen solcher Substanzen zu erkennen und die Athleten darüber aufzuklären.

4.4.1 Analyse des Rezeptorbindungstests

Die vorliegende Studie sollte im Hinblick auf zukünftige Dopingkontrollen und zur Dopingprävention einige Substanzen pharmakologisch beschreiben und mögliche Nebenwirkungen aufdecken. Als Erstes sollte das pharmakologische Profil von Tetrahydrogestrinon (THG), Androstendion (AND), Norandrostendion (NOR), Norbolethon (NB), Propyltrenbolon (Propyl) und 1-Testosteron (1-Testo), sogenannte „Designersteroid“ und Prohormone, charakterisiert werden. Die Bindungsaffinität dieser Substanzen an den An-

drogen- (AR) und Glucocorticoid- (GR) (s. Tab. 4) sowie an den Progesteron- (PR) und Mineralcorticoidrezeptor (MR) (s. Tab. 5) wurde mittels eines Rezeptorbindungstests (s. Kap. 2.5) geprüft.

Bisher stand lediglich die Bindungsaffinität von THG an den AR im Interesse der Wissenschaft (Labrie et al., 2005). Die Daten aus der vorliegenden Dissertation (Tab. 4 und Tab. 5) zeigen, dass THG mit einer großen Affinität, aber unselektiv an den AR, jedoch auch an den GR, PR und MR bindet. Die hohe Bindungsaffinität von THG an den AR konnte in einem Transaktivierungstest im Androgenrezeptor-Hefesystem von mehreren Gruppen nachgewiesen werden (Friedel et al., 2005; Labrie et al. 2005). Die hohe Affinität an den PR stimmt mit Ergebnissen von Death et al. (2004) überein, die zeigten, dass THG PR-vermittelte Genaktivität in einem PR Transaktivierungssystem in Hefezellen aktiviert. Erstaunlicherweise war die Bindungsaffinität zu den zwei weiteren getesteten Rezeptoren ebenfalls hoch. In der Literatur wird THG als typisches anaboles Steroid beschrieben (Jasuja et al., 2005; Labrie et al., 2005). Die hier erhobenen Daten zeigen, dass die Affinität zu allen getesteten Rezeptoren sehr hoch ist und THG deshalb auch als Gestagen, Glucocorticoid oder Mineralocorticoid wirken könnte. Unerwünschte Nebenwirkungen, wie die Hemmung der Gonadotropin Ausschüttung oder die Hemmung der Spermienproduktion bzw. -reifung, die üblicherweise durch zu hohe Gestagenkonzentration beim Mann ausgelöst werden, scheinen durch THG jedoch unwahrscheinlich. Eine Bindung an den GR und MR steht oft in Zusammenhang mit glucocorticoiden oder mineralocorticoiden Hormonwirkungen und ist ein ernstzunehmendes Signal für schädliche Nebenwirkungen (Miller et al., 1993), z.B. auf die inneren Organe.

Für AND, NOR und 1-Testo liegt eine hohe und spezifische Bindungsaffinität an den AR vor. Propyl hingegen weist eine ähnliche Affinität zu dem AR, GR und PR auf.

Hefezellmodelle werden oft genutzt, um molekulare Mechanismen der Steroidhormonwirkung zu studieren. *In vitro* Daten aus Versuchen mit Hefezellen zeigen, dass 1-Testo eine vergleichbar hohe AR-Transaktivierungspotenz besitzt wie DHT (Friedel et al., 2006). Im Hinblick auf die hier gewonnenen Daten ist es wichtig hervorzuheben, dass Waterman und Lepesheva (2005) Hefen eine geringe Fähigkeit zuschreiben, Steroide aus Säugetieren zu me-

tabolisieren. Somit gibt die hohe Transaktivierungspotenz von 1-Testo im Hefemodell einen Hinweis darauf, 1-Testo als starken AR Agonisten, sogar ohne metabolisiert zu werden, zu sehen (Friedel et al., 2006).

4.4.2 Analyse der Substanzen im klassischen Hershberger Versuch

Aufgrund der im Rezeptorbindungstest erhobenen Daten sollten die durch ausgewählte Substanzen ausgelösten, physiologischen Veränderungen *in vivo* untersucht werden. Orchiektomierte, männliche Ratten wurden mit TP, THG, NOR, DMT, 1-Testo und Propyl nach dem klassischen Design des Hershberger Versuchs behandelt (Yamasaki et al., 2003). Intakte und orchiektomierte Tiere dienten als Kontrollgruppe.

Eine Behandlung mit TP, THG und 1-Testo führt zu einer Stimulation der Größe und des Gewichts von androgen-sensitivem Gewebe, wie z.B. der Samenblase (s. Abb. 28) und der Prostata (s. Abb. 29) in orchiektomierten Tieren. In Bezug auf diese Parameter haben THG und 1-Testo die gleiche Wirkstärke wie TP. Friedel et al. (2005 und 2006) untersuchen die Transaktivierung von THG und 1-Testo in einem Androgenrezeptor abhängigen Reporterexpressionssystem. Ergebnisse aus diesen Untersuchungen im Hefesystem zeigen für 1-Testo eine hohe Transaktivierungspotenz, was 1-Testo als starken Androgenrezeptor Agonist charakterisiert. Die Potenz von THG die AR-abhängige Reporterexpression zu transaktivieren, war ca. zehn mal schwächer als diejenige für die Referenzsubstanz DHT (Friedel et al., 2005). Dies stellt einen weiteren Indikator für die hohe androgene Potenz dieser Substanzen dar. Weiterhin sind THG und 1-Testo in der Lage – genau wie TP – den androgen-sensitiven *M. levator ani*, einen klassischen Biomarker für anabole Wirkung, zu stimulieren. Die Daten von THG stimmen mit Daten aus der Literatur überein, die eine androgene sowie anabole Wirkung für THG in orchiektomierten Ratten und Mäusen beschreiben (Labrie et al., 2005; Jasuja et al., 2005). Eine Behandlung der orchiektomierten Ratten mit Propyl hat eine niedrige anabole und androgene Wirkungsstärke. Interessanterweise führt eine Applikation von DMT und NOR zu einer geringen androgenen Wirkung in Prostata und Samenblase, jedoch zu einer hochsignifikanten anabolen Wirkung im *M. levator ani*. Diese zwei Substanzen könnten

somit als stark wirksame anabole Steroide mit SARM (selektive Androgenrezeptor Modulatoren) ähnlichen Eigenschaften beschrieben werden.

Ein zusätzliches Ziel dieser Studie war es, mögliche Nebenwirkungen der untersuchten Substanzen aufzudecken. Als Marker einer MR-Aktivierung wurden die Körper- und Organgewichte gemessen. Eine Aktivierung des MR kann Effekte auf die Wasseransammlung aufweisen und beeinflusst damit die Gewichtszunahme.

Die Gesamtgewichte der Tiere zeigten keine Unterschiede auf. Die Gewichte der Leber (s. Abb. 31) zeigten nur Unterschiede nach Behandlung mit 1-Testo und Propyl; die weiteren untersuchten Substanzen ließen keinen signifikanten Einfluss auf das Lebergewicht erkennen. Das kann ein Hinweis darauf sein, dass die hohe Affinität von THG an den MR keine physiologischen Effekte wie eine Erhöhung der Wassereinlagerung aufweist. Eine zwölf-tägige Behandlung könnte jedoch auch ein zu kurzer Zeitraum für eine Anpassung des Gewebes darstellen. Die Unterschiede im Lebergewicht bei 1-Testo und Propyl könnten auf einen möglichen Nebeneffekt hinweisen.

Die Aktivierung des GR führt möglicherweise zu einer Erhöhung von Glucocorticoid-sensitiven Marker-Genen in der Leber. Um die Regulation der Genexpression in Bezug auf molekulare Mechanismen und mögliche toxische Wirkungen der untersuchten Substanzen zu charakterisieren, wurde der Tyrosin Aminotransferase (TAT) mRNA Gehalt in der Leber (s. Abb. 32) mittels Real-Time PCR analysiert. TAT ist ein Gen, welches glucocorticoid-responsive Elemente (GREs) in der Promoterregion besitzt (Müller et al., 1985, Becker et al. 1986). Seine Expression wird direkt durch Glucocorticoide reguliert (Schmidt et al., 1987). Im Vergleich zu einer Behandlung mit TP führte eine Applikation von THG zu einer signifikanten Repression, die Behandlung mit DMT zu einer signifikanten Induktion des TAT mRNA Gehalts in der Leber. Die Applikation mit NOR führte zu einem erniedrigten TAT mRNA Gehalt. Eine Modulation dieses Genes *in vivo* könnte einen Hinweis geben, dass diese Substanzen mit dem GR interferieren. DMT aktivierte den TAT mRNA Gehalt. Dexamethasone, ein GR agonistischer Ligand, führt ebenso zu einer erhöhten TAT mRNA Expression in der Leber von Ratten. Im Gegensatz dazu reprimierten THG und NOR den mRNA Gehalt von TAT. Ein solches Regulationsmuster ist typisch für Substanzen wie Dimethylnitrosamin

(Miller et al, 1993) oder xenobiotische Substanzen, wie Tolyfluanid und Ketoconazol (Johansson et al., 2005), die für die Leber toxisch und karzinogen sind. Somit zeigten unsere Untersuchungen für THG und in geringerem Maße ebenfalls für NOR eine potentielle toxische Wirkung auf die Leber.

4.4.3 Analyse des mRNA Gehalts von Myostatin und AR im *M. gastrocnemius* nach Behandlung mit unterschiedlichen anabolen Substanzen

Im Weiteren wurden der Myostatin und der AR mRNA Gehalt im *M. gastrocnemius* mittels Real-Time PCR analysiert. Wie schon in den Antagonisierungsexperimenten nachgewiesen, zeigten die mRNA Gehalte von Myostatin und diejenige des AR ähnliche Regulationstendenzen auf. Eine Behandlung mit TP hat kaum einen Einfluss auf den mRNA Gehalt von Myostatin (s. Abb. 33) oder auf den von AR (s. Abb. 34).

Eine Behandlung mit THG führt zu einer Repression des mRNA Gehalts von Myostatin (signifikant) und AR. Dieses Regulationsmuster kann als Hinweis auf eine antiglucocorticoide Wirkung von THG gewertet werden. Die bisher im Rahmen dieser Dissertation gezeigten Befunde charakterisieren THG funktionell als Glucocorticoide (s. Kap. 2.4.1 und 2.4.5). Untersuchungen von Budasz-Swidarska (2005) zeigen, eine Zunahme der Myostatinexpression in glucocorticoide-behandelten C2C12 Myoblasten. Vor diesem Sachverhalt und im Hinblick auf die Beobachtung, dass Androgene wie Testosteron Propionat den Myostatin mRNA Gehalt nicht beeinflussen, kann eine Repression der des Myostatin mRNA Gehalts durch THG als antiglucocorticoide Wirkung interpretiert werden. Glucocorticoide sind bekannt dafür, dass sie einen negativen Einfluss auf die Hypertrophie haben, d.h. sie induzieren Proteinverlust und direkte, katabole Effekte und damit atrophische Prozesse in der Skelettmuskulatur (Sheffield-Moore und Urban, 2004; Almon und Dubois, 1990). Osteoporose, Diabetes, Myopathien, sowie beeinträchtigte Wundheilung sind die bekanntesten Nebeneffekte von Glucocorticoiden. Die antiglucocorticoide Wirkung von THG könnte daher als zusätzliche anabole Komponente gedeutet werden.

Im Gegensatz dazu wird der mRNA Gehalt von Myostatin durch eine Applikation von NOR (sehr hochsignifikant) und DMT (signifikant) induziert. Diese

beiden Substanzen sind am stärksten spezifisch anabol (s. Abb. 30) und wenig androgen (s. Abb. 28 und 29) wirksam. Wie bei den vorausgegangenen Versuchen müssen auch hier die erhaltenen Daten auf Proteinebene bestätigt werden.

4.5 Analyse der Kombination eines Trainings und einer gleichzeitigen Behandlung mit Androgenen auf den mRNA Gehalt von Myostatin im *M. gastrocnemius*

Die bisherigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der mRNA Gehalt von Myostatin *in vitro* in den C2C12 Zellversuchen nach einer Behandlung mit DHT moduliert wird. Aus den *in vivo* Daten geht hervor, dass der Myostatin mRNA Gehalt ebenfalls durch einen Trainingsreiz oder auch ein Training über mehrere Tage beeinflusst wird. Eine Behandlung von orchietomierten Tieren mit unterschiedlichen androgenen und anabolen Substanzen macht darüber hinaus deutlich, dass zumindest der mRNA Gehalt von Myostatin auch *in vivo* durch Androgene reguliert wird.

Um die kombinierten Einflüsse von Training und Androgenen auf den Myostatin mRNA Gehalt zu analysieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weiterer tierexperimenteller Versuch durchgeführt.

Während des hier beschriebenen Experiments wurden orchietomierte (ORX) und intakte (INT) Tiere mit unterschiedlichen Dosierungen an TP (1 mg/kg/KG für ORX und 10 mg/kg/KG für INT pro Tag) behandelt und absolvierten ein Schwimmtraining über drei Tage. Die hohe Dosierung für die INT Tiere sollte eine Dopingsituation eines Athleten simulieren.

Der Myostatin mRNA Gehalt in den unbehandelten intakten Tieren war, wie auch in dem vorherigen Schwimmversuch und in den Langzeitexperimenten (Matsakas et al. 2005; Matsakas, 2004), nach einem dreitägigen Training sehr hochsignifikant reprimiert (s. Abb. 35). Hiermit konnten die bisherigen erhobenen Daten der vorliegenden Dissertation in intakten Tieren bestätigt werden. Ebenso konnte eine hochsignifikante Erniedrigung des mRNA Gehalts von Myostatin nach einer Behandlung mit einer supraphysiologischen Dosis an TP in Kombination mit einem Training beobachtet werden. Testosteron Propionat unterstützt somit die Effekte eines Trainings auf den mRNA

Gehalt von Myostatin. Eine Applikation von TP ohne Training führt dagegen zu keinem Einfluss auf die Myostatin mRNA Regulation in intakten Tieren (s. Abb. 35).

Betrachtet man die Ergebnisse der orchiektomierten Tiere (s. Abb. 36), so wird deutlich, dass nach einer Behandlung dieser Tiere mit TP (vergleichbar mit einem intakten Tier) in Kombination mit Training der mRNA Gehalt von Myostatin wiederum reprimiert ist, was alle bisherigen Ergebnisse in intakten Tieren ebenfalls bestätigen.

Ein Training mit orchiektomierten Tieren induziert eine hochsignifikante Zunahme des Myostatin mRNA Gehalts. Die gleiche hochsignifikante Zunahme ist nach Applikation von TP zu erkennen. Die Kombination von Training und einer Applikation von TP führt zu keinem gleich hohen mRNA Gehalt von Myostatin. Im Vergleich zu unbehandelten, trainierten und orchiektomierten Tieren, kann man jedoch die starke Antagonisierung des Effekts beobachten. Diese Ergebnisse könnte einen Hinweis darauf geben, dass ein Training dieser Tiere ohne Steroide eher einen katabolen Effekt auf die Skelettmuskulatur aufweist.

Es ist bekannt, dass im Alter die Hormonproduktion von Frauen und in höherem Maße die von Männern abnimmt. Die wichtigen altersabhängigen Veränderungen in der männlichen Körperzusammensetzung sind hauptsächlich verknüpft mit der progressiven Abnahme von zirkulierenden anabolen Hormonen, von denen Testosteron eine bedeutende Rolle zukommt (Moretti et al, 2005). Dieser Hormonabfall hängt mit einer Abnahme der Muskelmasse zusammen. Konsequenz ist das häufige Auftreten von Sarkopenie, altersbedingter Muskelschwund, bei älteren Menschen. Eine mögliche Therapieform im Alter könnte ein gezieltes Muskelaufbautraining sein. In der hier durchgeführten Studie konnte allerdings beobachtet werden, dass ein sportliches Training in orchiektomierten Ratten möglicherweise einen katabolen Effekt auf die Muskulatur ausübt. Auch eine alleinige Applikation von TP scheint mit katabolen Effekten einher zu gehen. Diese Ergebnisse sind aus therapeutischer Sicht sehr hilfreich und lassen den Schluß zu, dass eine optimale Therapieform der Sarkopenie aus einer Kombination von sportlichem Krafttraining und einer gezielten Gabe von Androgenen bestehen könnte.

Im Hinblick auf die hier erhaltenen Daten und vor dem Hintergrund der bisher veröffentlichten Literatur zu diesem Themenkomplex gestaltet sich eine biologische Interpretation der Ergebnisse als äußerst schwierig. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass TP signifikante Veränderungen von Myostatin auf mRNA Ebene hervorruft und folglich Steroidhormone das Differenzierungsverhalten beeinflussen. Die hier gezeigten Wirkungen auf mRNA Ebene müssen auf Proteinebene zusätzlich bestätigt werden.

4.6 Ausblick

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuche zeigen deutlich, dass ein sportliches Training, sowie eine Behandlung mit anabolen Steroiden den mRNA Gehalt von unterschiedlichen Genen, die bei der Differenzierung von Satellitenzellen eine entscheidende Rolle spielen, in der Skelettmuskulatur moduliert. Die Regulationsmuster der untersuchten Gene (Myostatin, Notch-1, Delta-1, Sox-8 und AR) wurden *in vitro* und *in vivo* untersucht und dargestellt. Die molekularen Mechanismen der jeweiligen Signaltransduktionswege sind sehr komplex, dürfen jedoch nach den hier vorgestellten Resultaten nicht einzeln, sondern im Kontext betrachtet werden. Die Verknüpfung aller in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse ist für das Verständnis der molekularen Mechanismen der Muskeldifferenzierung und -proliferation im Zusammenhang wichtig (s. Abb. 37).

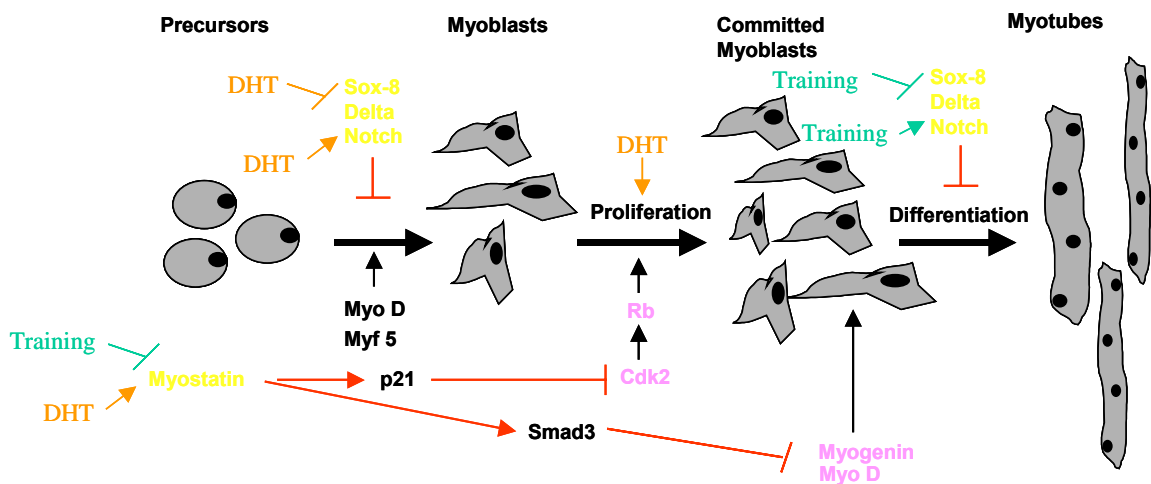
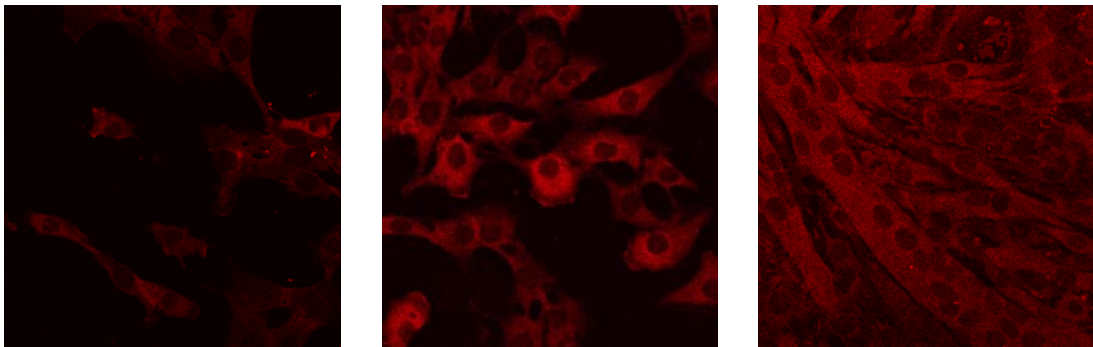


Abb. 37: Zusammenspiel von Training und Androgenen auf den Prozess der Proliferation und Differenzierung von Satellitenzellen.

Bei einer derartigen kombinatorischen Betrachtung wird deutlich, dass DHT und Training in gleicher Weise die mRNA Gehalte von Sox-8, Delta-1 und Notch-1 regulieren, also die gleichen molekularen Signaltransduktionswege aktivieren (Notch-1), bzw. hemmen (Sox-8 und Delta-1).

Die erhobenen Daten zeigen im Wesentlichen mRNA Gehaltsmuster der untersuchten Gene. In nachfolgenden Untersuchungen wird es wichtig sein, diese Daten auf Proteinebene zu bestätigen.

Erste Ergebnisse hierzu liegen bereits vor: So konnten die Expression und die Lokalisation von Myostatin in C2C12 Zellen nach unterschiedlichen Applikationen von Differenzierungsmedium und/oder DHT mit Hilfe der Immunocytochemie in einer Zeitreihe nachgewiesen werden (s. Abb. 38). In unterschiedlichen Geweben (humane Muskulatur (M. lateralis), Muskulatur aus der Ratte (*M. gastrocnemius*), C2C12 Zellen in DMEM/FKS oder DMEM/HS gewachsen) konnten zudem drei verschiedene Formen des Myostatinproteins im Western Blot detektiert werden: Die aktive Form bei 26 kDA, das latent assoziierte Protein bei 40 kDA und das Vorläuferprotein bei 52 kDA (s. Abb. 39).



a) Kontrolle

b) Myostatin: 4 Tage

c) Myostatin: 8 Tage

Abb. 38: Immunocytochemische Färbung von Myostatin in C2C12 Zellen a) Kontrolle b) 4 Tage und c) 8 Tage in DMEM/FKS gewachsen.

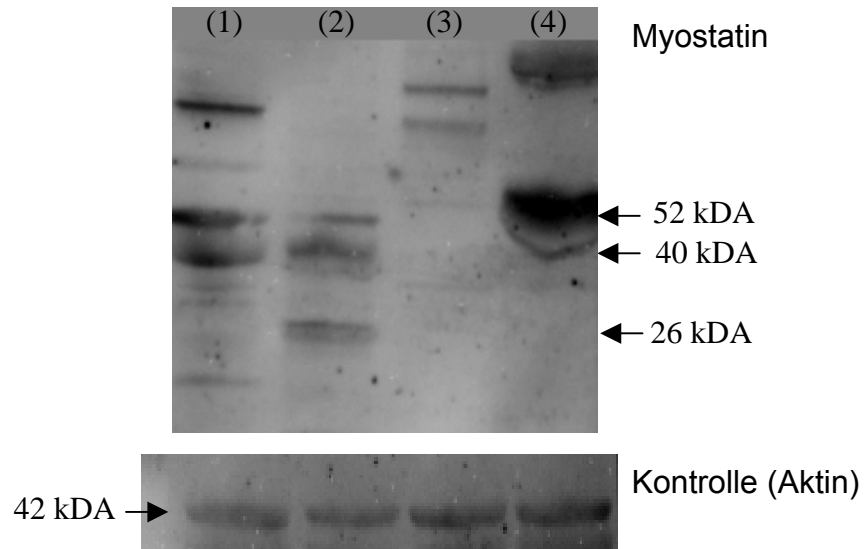


Abb. 39: Myostatin im Western Blot. Unten Aktinfärbung als Kontrolle, oben Myostatin (human (1), Ratte (2), C2C12 Zellen in DMEM/FKS (3) und DMEM/HS(4)). Drei Formen von Myostatin (52, 40 und 26 kDA) detektierbar.

Die entsprechenden Nachweise für Sox-8, Delta-1 und Notch-1 stehen derzeit noch aus; nach erfolgreicher Etablierung sollte dies aber eine Reihe neuer Untersuchungsmöglichkeiten und damit weitere wertvolle Einblicke in die Adaptation der Skelettmuskulatur gewähren.

Die damit gewonnen Erkenntnisse könnten von zukunftsweisender Bedeutung für die Konzipierung neuer innovativer Trainingsmethoden sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In den vergangenen Jahren hat eine Vielzahl an Studien verdeutlicht, dass die Homöostase und im Speziellen die Adaptation der Skelettmuskulatur an Trainingsreize aber auch an den Einfluss anabol wirksamer Hormone und Wachstumsfaktoren durch ein komplexes Zusammenspiel molekularer Wirkungsmechanismen moduliert wird. Einige dieser Faktoren, wie z.B. Myostatin, Notch-1, Delta-1 und Sox-8 stehen seit einiger Zeit, bedingt durch Diskussionen um Doping, aber auch altersbedingter Muskeldystrophieerkrankungen, im Blickpunkt des wissenschaftlichen, aber auch des öffentlichen Interesses.

Die genauen Zusammenhänge von Muskeldifferenzierung und molekularen Wirkungsmechanismen konnten allerdings noch nicht aufgeklärt werden.

Die vorliegende Dissertation untersucht:

1. Den Einfluss von Androgenen und anabolen Steroiden auf molekulare Mechanismen der Satellitenzellendifferenzierung *in vitro* und dessen Wirkungsmechanismus.
2. Den Einfluss von Training und/oder einer Applikation von Testosteron Propionat auf molekulare Mechanismen der Satellitenzellendifferenzierung *in vivo*.
3. Die substanz- und gewebsspezifische Wirkung sog. „Designersteroid“ und verschiedener Prohormone *in vitro* und *in vivo*.

Diesen Fragestellungen wurde mittels molekularbiologischer Analysemethoden wie PCR, Rezeptorbindungstest, Creatin-Kinasebestimmung und Durchflusssyztometrie in verschiedenen Trainingsmethoden an Ratten, sowie einem Zellkulturmodell mit murinen C2C12 Myoblasten nachgegangen.

Hierbei zeigte sich, dass Androgene und anabole Steroide das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Satellitenzellen positiv beeinflussen.

Eine Analyse der mRNA Gehalte von Sox-8, Notch-1 und Delta-1 wiesen die gleichen Regulationstendenzen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf. Eine androgenrezeptor-vermittelte Beeinflussung des Myostatin mRNA Gehalts

konnte durch Antagonisierungsexperimente mit dem Antiandrogen Flutamid nachgewiesen werden. Der Myostatin mRNA Gehalt wurde in Tierexperimenten nach Training und/oder einer Applikation von TP in intakten oder orchiektomierten Ratten unterschiedlich reguliert.

Die Charakterisierung der verschiedenen anabolen Steroiden und „Designersteroiden“ ergab für die einzelnen Substanzen verschiedene Bindungsaffinitäten zu den getesteten Rezeptoren (Androgen-, Glucocorticoid-, Progesteron- und Mineralocorticoidrezeptor). Diese Substanzen zeigten zudem in einem klassischen Hershberger-Assay anabole und/oder androgene Wirkung; bei einigen Substanzen konnten lebertoxische Nebenwirkungen nachgewiesen werden.

Eine kombinierte Betrachtung der erhobenen Daten macht deutlich, dass Training sowie anabole Steroide die untersuchten molekularen Signaltransduktionswege modulieren und dabei zum Teil ähnliche Regulationstendenzen aufweisen.

Die vorliegende Arbeit gewährt damit wertvolle Einblicke in die molekularen Mechanismen der Adaptation der Skelettmuskulatur.

Die damit gewonnenen Erkenntnisse könnten von zukunftsweisender Bedeutung für die Konzipierung neuer innovativer Trainingsmethoden und Ansätze in der Dopingprävention sein. Nicht zuletzt ergeben sich hieraus auch interessante neue therapeutische Behandlungsstrategien für Krankheiten wie Sarkopenie und andere Muskeldystrophien.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Almon RR & Dubois DC. Fiber-type discrimination in disuse and glucocorticoid-induced atrophy. *Med Sci Sports Exerc* 22: 304-311, 1990

Andrade RJ, Lucena MI, Fernandez MC, Suarez F, Montero JL & Fraga E. Fulminant liver failure associated with flutamide therapy for hirsutism. *Lancet* 353: 983-986, 1999

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD & Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770-776, 1999

Bär A & Pette D. Three fast myosin heavy chain in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 235: 153-155, 1988

Barton-Davis ER, Shoturma DI & Sweeney HL. Contribution of satellite cells to IGF-1 induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 167: 301-305, 1999

Becker PB, Gloss B, Schmidt W, Strahle U & Schutz G. In vivo protein-DNA interactions in a glucocorticoid response element require the presence of the hormone. *Nature* 324: 686-688, 1986

Bell KM, Western PS & Sinclair AH. Sox8 expression during chick embryogenesis. *Mech Dev* 94: 257-260, 2000

Bischoff R. The satellite cell and muscle regeneration. *Myology Volume 1. Secondth edition. Edited by: Engel AG and Franzini-Armstrong C. New York, McGraw-Hill, Inc.:* 79-118, 1994

Blau HM, Pavlath GK, Hardeman EC, Chiu C, Silberstein L, Webster SG, Miller SC & Webster C. Plasticity of differentiated state. *Science* 230: 758-766, 1985

- Boada LD, Zumbado M, Torres S, Lopez A, Diaz-Chico BN, Cabrera JJ, & Luzardo OP.** Evaluation of acute and chronic hepatotoxic effects exerted by anabolic-androgenic steroid stanozolol in adult male rats. *Arch Toxicol* 73: 465-472, 1999
- Bonard M & Almeida S.** Placebo-controlled double-blind study in human benign obstructive prostatic hypertrophy with flutamide. *Eur Urol* 2: 24-28, 1975
- Booth FW & Thomason DB.** Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev* 71: 541-585, 1991
- Brooks S.** Current topics for teaching skeletal muscle physiology. *Adv Physiol Educ* 27: 171-182, 2003
- Budasz-Swidarska M, Jank M & Motyl T.** Transforming growth factor- β 1 upregulates myostatin expression in mouse C2C12 myoblasts. *J Physiol Pharmacol* 56 : 195-214, 2005
- Buttery PJ & Sinnett-Smith PA.** The mode of action of anabolic agents with special reference to their effects in protein metabolism – some speculations: In Roche JF & Callagan DO (Ed.), Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands. *Manipulation of Growth in Farm Animals*: 211, 1984
- Caine M, Perlberg S & Gordon R.** The treatment of benign prostatic hypertrophy with flutamide: a placebo controlled study. *J Urol* 114: 564-566, 1975
- Campion DR, Richardson RL, Reagon JO & Kraeling RR.** Changes in the satellite cell population during postnatal growth of pig skeletal muscle. *J Anim Sci* 52: 1014-1018, 1981

- Cardasis CA & Cooper GW.** An analysis of nuclear numbers in individual muscle fibers during differentiation and growth: a satellite cell-muscle fiber growth unit. *J Exp Zool* 191: 347-358, 1975
- Carlson BM & Faulkner AJ.** The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. *Med Sci Sports Exerc* 15, 187-198, 1983
- Carlson CJ, Booth FW & Gordon SE.** Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol* 277: R601-606, 1999
- Chakravarthy MV, Booth FW & Spangenburg EE.** The molecular response of skeletal muscle satellite cells to continuous expression of IGF-1: implication for the rescue of induced muscular atrophy in aged rats. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 11: S44-48, 2001
- Charge SB & Rudnicki MA.** Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84: 109-138, 2004
- Charifi N, Kadi F, Feasson L & Denis C.** Effects of endurance training on satellite cell frequency in skeletal muscle of old men. *Muscle Nerve* 28: 87-92, 2003
- Chen DH, Kaung HL, Miller CM, Resnick MI & Marengo SR.** Microarray analysis of changes in renal phenotype in the ethylene glycol rat model of urolithiasis: potential and pitfalls. *BJU Int* 93: 637-650, 2004
- Conboy IM & Rando TA.** The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* 3: 397-409, 2002
- Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM & Rando TA.** Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 302: 1575-1577, 2003

- Cossu G, Molinaro M & Pacifici M.** Differential response of satellite cells and embryogenic myoblasts to a tumor promoter. *Dev Biol* 98: 520-524, 1983
- Cossu G, Cicinelli P, Fieri C, Coletta M & Molinaro M.** Emergence of TPA-resistant "satellite" cells during muscle histogenesis of human limb. *Exp Cell Res* 160: 403-411, 1985
- Cossu G, Eusebi F, Grassi F & Wanke E.** Acetylcholine receptors are present in undifferentiated satellite cells but not in embryonic myoblasts in culture. *Dev Biol* 123: 43-50, 1987
- Dasarathy S, Dodig M, Muc SM, Kalhan SC & McCullough AJ.** Skeletal muscle atrophy is associated with an increased expression of myostatin and impaired satellite cell function in the portacaval anastomosis rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G1124-1130, 2004
- Death AK, McGrath KC, Kazlauskas R & Handelsman DJ.** Tetrahydrogestrinone is a potent androgen and progestin. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2598-2500, 2004
- Delfini MC, Hirsinger E, Pourquié O & Duprez D.** Delta 1-activated Notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis. *Development* 127: 5213-5224, 2000
- Demirel HA, Powers SK, Naito H, Hughes M, and Coombes JS.** Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship. *J Appl Physiol* 86: 1002-1008, 1999
- Desler MM, Jones SJ, Smith CW & Woods TL.** Effects of dexamethasone and anabolic agents on proliferation and protein synthesis and degradation in C2C12 myogenic cells. *J Anim Sci* 74: 1265-1273, 1996

- Detke MJ & Lucki I.** Detection of serotonergic antidepressants in the rat forced-swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res* 73: 43-46, 1996
- Doumit ME, Cook DR & Merkel RA.** Testosterone up-regulates androgen receptors and decreases differentiation of porcine myogenic satellite cells *in vitro*. *Endocrinology* 137: 1385-1394, 1996
- Dreyer HC, Blanco CE, Sattler FR, Schroeder ET & Wiswell RA.** Satellite cell numbers in young and older men 24h after eccentric exercise. *Muscle Nerve* 33: 242-253, 2006
- Evans RM.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895, 1988
- Evans WJ & Cannon JG.** The metabolic effect of exercise-induced muscle damage. *Exerc Sport Sci Rev* 19 : 99-125, 1991
- Faulkner JA.** Terminology for contractions of muscles during shortening, while isometric, and during lengthening. *J Appl Physiol* 95: 455-459, 2003
- Feldman JL & Stockdale FE.** Temporal appearance of satellite cells during myogenesis. *Dev Biol* 153: 217-226, 1992
- Friedel A.** Etablierung eines Nachweisverfahrens zur Analyse der mRNA Expression in der Skelettmuskulatur ausdauertrainierter Ratten. Diplomarbeit, *Deutsche Sporthochschule Köln*, 2002
- Friedel A, Geyer H, Kamber M, Laudenbach-Leschowsky U, Thevis M, Vollmer G, Zierau O & Diel P.** Tetrahydrogestrinon is a potent but unselective binding steroid and effects glucocorticoid signalling in the liver. *Toxicol Lett*. Epub ahead of print, 2005

Friedel A, Geyer H, Kamber M, Laudenschach-Leschowsky U, Schänzer W, Thevis M, Vollmer G, Zierau O & Diel P. 17 β -hydroxy-5 α -androst-1-en-3-one (1-testosterone) is a potent androgen with anabolic properties. *Toxicol Lett*: accepted, 2006

Fulle S, Belia S & Di Tano G. Sarcopenia is more than a muscular deficit. *Arch Ital Biol* 143: 229-234, 2005

Gamble HJ, Fenton J & Allsopp G. Electron microscope observations on human fetal striated muscle. *J Anat* 126: 567-589, 1978

Genzlinger A. Apoptosebestimmung mittels 2-Parameter-Durchflusszytometrie, Agarose-Gelelektrophorese und Fluoreszenzmikroskopie nach Induktion durch α , β -ungesättigte Aldehyde und Ketone. Dissertation des FB Biologie, *Universität Kaiserslautern*, 1999

Gibson MC & Schultz E. Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle Nerve* 6: 574-580, 1983

Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med* 9: 344-350, 2003

Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S & Bhasin S. Organisation of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV infected men with muscle wasting. *Proc Natl Sci U S A* 95: 14938-14943, 1998

Gospodarowicz D, Weseman JJ, Moran S & Lindstrom J. Effects of fibroblast growth factor on the division and fusion of bovine myoblasts. *J Cell Biol* 70: 395-405, 1976

- Goto S, Miyazaki K, Funabiki T & Yasumitsu H.** Serum-free culture conditions for analysis of secretory proteinases during myogenic differentiation of mouse C2C12 myoblasts. *Anal Biochem* 272: 135-142, 1999
- Gray GE, Mann RS, Mitsiadis E, Henrique D, Carcangiu ML, Banks A, Leiman J, Ward D, Ish-Horowitz D & Artavanis-Tsakonas S.** Human ligands of the Notch receptor. *Am J Pathol* 154: 785-794, 1999
- Gurley BJ, Gardner SF, White LM & Wang PL.** Ephedrine pharmacokinetics after the ingestion of nutritional supplements containing Ephedra sinica (ma huang). *Ther Drug Monit* 20: 439-445, 1998
- Hartley RS, Bandman E & Yablonka-Reuveni Z.** Myoblasts from embryonic and adult skeletal muscle regulate myosin expression differently. *Dev Biol* 148: 249-260, 1991
- Hartley RS, Bandmann E & Yablonka-Reuveni Z.** Skeletal muscle satellite cells appear during late chicken embryogenesis. *Dev Biol* 153: 206-216, 1992
- Hawke TJ & Garry DJ.** Myogenic satellite Cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91: 534-551, 2001.
- Heitzman RJ.** Manipulation of protein metabolism, with special reference to anabolic agents. In: Buttery PJ & Lindsay DB (Ed.), Butterworths, London. *Protein Deposition in Animals*: 193, 1980
- Hershberger LG, Shipley EG & Meyer RK.** Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med* 83: 175-180, 1953
- Hidenori I, Hiroshi U, Ikuku I, Yutaka I, Takenori T, Tomiko A & Kanefusa K.** Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) blocks the differentiation of C2C12 myoblast cells. *J Cell Physiol* 202: 874-879, 2005

- Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM & Wolfman NM.** Regulation of myostatin in vivo by GASP-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrinol* 17: 1144-1154, 2003
- Huet C, Li ZF, Liu HZ, Black RA, Galliano MF & Engvall E.** Skeletal muscle cell hypertrophy induced by inhibitors of metalloproteases; myostatin as a potential mediator. *Am J Physiol* 281: C1624-C1634, 2001
- Ivey FM, Roth SM, Ferrell RE, Tracy BL, Lemmer JT, Hurlbut DE, Martel GF, Siegel EL, Fozard JL, Jeffrey Metter E, Fleg JL & Hurley BF.** Effects of age, gender, and myostatin genotype on the hypertrophic response to heavy resistance strength training. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55: M641-M648, 2000
- Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R & Israel A.** Signaling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377: 355-358, 1995
- Jarriault S, Le Bail O, Hirsinger E, Pourquoié O, Logeat F, Strong CF, Brou C Seidah NG & Israel A.** Delta-1 activation of notch-1 signaling results in HES-1 transactivation. *Mol Cell Biol* 18: 7423-7431, 1998
- Jarvinen TA, Kaariainen M, Jarvinen M & Kalimo H.** Muscle strength injuries. *Curr Opin Rheumatol* 12: 155-161, 2000
- Jasuja R, Catlin DH, Miller A, Chang YC, Herbst KL, Starcevic B, Artaza JN, Singh R, Datta G, Sarkissian A, Chandsawangbhuwana C, Baker M & Bhasin S.** Tetrahydrogestrinone is an androgenic steroid that stimulates androgen receptor-mediated, myogenic differentiation in C3H10T1/2 multipotent mesenchymal cells and promotes muscle accretion in orchidectomized male rats. *Endocrinology* 146: 4472-4478, 2005
- Ji S, Losinski RL, Cornelius SG, Frank GR, Willis GM, Gerrard DE, Depreux FF & Spurlock ME.** Myostatin expression in porcine tissues: tissue

specificity and developmental and postnatal regulation. *Am J Physiol* 275: R1265-1273, 1998

Johansson M, Johansson N & Lund BO. Xenobiotics and the glucocorticoid receptor: additive antagonistic effects on tyrosine aminotransferase activity in rat hepatoma cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96: 309-315, 2005

Jouliia D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B & Cabello G. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Res* 286: 263-275, 2003

Kahn EB & Simpson SB Jr. Satellite cells in mature, uninjured skeletal muscle of the lizard trail. *Dev Biol* 37: 219-223, 1974

Kambadur R, Sharma M, Smith TP & Bass JJ. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genom Res* 7: 910-916, 1997

Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A & Suda T. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127: 1755-1766, 1994

Kato H, Taniguchi Y, Kurooka H, Minoguchi S, Sakai T, Nomura-Okazaki S, Tamura K & Honjo T. Involvement of RBP-J in biological functions of mouse Notch1 and its derivatives. *Development* 124, 4133-4141, 1997

Katz B. The termination of the afferent nerve fibre in the muscle spondle of the frog. *Philos Trans Royal Soc Lond [Biol]* 243: 221-240, 1961

Kidd S, Kelley MR & Young MW. Sequence of the *Notch* locus of *Drosophila melanogaster*: Relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Mol Cell Biol* 6: 3094-3108, 1986

- Kirk S, Oldham J, Kambadur R, Sharma M, Dobbie P & Bass J.** Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol* 184: 356-363, 2000
- Kopan R, Nye JS & Weintraub H.** The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development* 120, 2385-2396, 1994
- Krieg M.** Characterization of the androgen receptor in the skeletal muscle of the rat. *Steroids* 28: 261-174, 1976
- Kuroda K, Tani S, Tamura K, Minoguchi S, Kurooka H & Honjo T.** Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. *J Biol Chem* 274, 7238-7244, 1999
- Labrie F, Dupont A, Cusan L, Manhes G, Bergeron N & Lacourciere Y.** Combination therapy with castration and flutamide: today`s treatment of choice for prostate cancer. *J Steroid Biochem* 33: 817-821, 1989
- Labrie F, Luu-The V, Calvo E, Martel C, Cloutier J, Gauthier S, Belleau P, Morissette J, Levesque MH & Labrie C.** Tetrahydrogestrinone induces a genomic signature typical of a potent anabolic steroid. *J Endocrinol* 184: 427-433, 2005
- Lalani R, Bhasin S, Byhower F, Tarnuzzer R, Grant M, Shen R, Asa S, Ezzat S & Gonzalez-Cadavid NF.** Myostatin and insulin-like growth factor-I and -II expression in the muscle of rats exposed to the microgravity environment of the NeuroLab space shuttle flight. *J Endocrinol* 167: 417-428, 2000
- Lawson MA & Purslow PP.** Differentiation of myoblast in serum-free Media: Effects of modified media are cell line specific. *Cell Tissue Organs* 167: 130-137, 2000

- Lee DK.** Androgen receptor enhances myogenin expression and accelerates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 408-413, 2002
- Lee JS & McPherron AC.** Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9306-9311, 2001
- Lindsell CE, Shawber CJ, Boulter J & Weinmaster G.** Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* 80: 909-917, 1995
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- Luo B, Aster JC, Hasserjian RP, Kuo F & Sklar J.** Isolation and functional analysis of a cDNA for human Jagged2, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor. *Mol Cell Biol.* 17: 6057-6067, 1997
- Ma K, Mallidis C, Artaza J, Taylor W, Gonzalez-Cadavid N & Bhasin S.** Characterisation of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1128-E1136, 2001
- Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, Arias J & Salehian B.** Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol* 285: E363-E371, 2003
- Marcell TJ, Harman SM, Urban RJ, Metz DD, Rodgers BD & Blackman MR.** Comparison of GH, IGF-1, and testosterone with mRNA of receptors and myostatin in skeletal muscle in older men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1159-E1164, 2001
- Martin CI & Johnston IA.** The role of myostatin and the calcineurin-signalling pathway in regulating muscle mass in response to exercise

training in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *J Exp Biol* 208: 2083-2090, 2005

Martinez JA, Buttery PJ & Pearson JT. The mode of action of anabolic agents: The effect of testosterone on muscle protein metabolism in the female rat. *Br J Nutr* 52: 515-521, 1984

Martyn JK, Bass JJ & Oldham JM. Skeletal muscle development in normal and double-muscled cattle. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 281: 1363-1371, 2004

Matsakas A, Friedel A, Hertrampf T & Diel P. Short-term endurance training results in muscle-specific decrease of myostatin mRNA content in rat. *Acta Physiol Scand* 183: 200-307, 2005

Matsakas A. Effects of exercise on the mRNA expression of growth factors, metabolic genes and myostatin heavy chain isoforms in skeletal muscle of the rat. Dissertation, *Deutsche Sporthochschule Köln*, 2004

Maughan, RJ. Contamination of dietary supplements and positive drug tests in sport. *J Sports Sci* 23: 883-889, 2005

Mauro A. Satellite cells of skeletal muscle fibres. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 493-495, 1961

McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M & Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 162: 1135-1147, 2003

McPherron AC, Lawler AM & Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 387: 83-90, 1997

McPherron AC & Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12457-12461, 1997

- Michel G & Baulieu EE.** Androgen receptor in rat skeletal muscle: characterization and physiological variations. *Endocrinology* 107: 2088-2098, 1980
- Miller MS, Buzard GS & McDowell AR.** In vivo inhibition of glucocorticoid-inducible gene expression by dimethylnitrosamine in rat liver. *Biochem Pharmacol* 45: 1465-1470, 1993
- Mooradian AD, Morley JE & Korenman SG.** Biological actions of androgens. *Endocrine Reviews* 8: 1-28, 1987
- Moretti C, Frajese GV, Guccione L, Wannenes F, De Martino Mu, Fabbri A, Frajese G.** Androgens and body composition in the aging male. *J Endocrinol Invest* 28: 56-64, 2005
- Müller G, Scherer G, Zentgraf H, Ruppert S, Herrmann B, Lehrach H & Schutz G.** Isolation, characterization and chromosomal mapping of the mouse tyrosine aminotransferase gene. *J Mol Biol* 5184: 367-373, 1985
- Mumm JS & Kopan R.** Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol.* 228: 151-165, 2000
- Neri RO, Florance K & Koziol P.** A biological profile of a nonsteroidal antiandrogen, SCH13521(4'-nitro-3'trifluoromethyliso-butyranylidide). *Endocrinology* 91: 427-437, 1972
- Neri RO & Monahan M.** Effects of a novel nonsteroidal antiandrogen on canine prostatic hyperplasia. *Invest Urol* 10: 123-130, 1972
- Nicholas G, Thomas M, Langley B, Somers W, Patel K, Kemp CF, Sharma M & Kambadur R.** Titin-cap associated with, and regulates secretion of myostatin. *J Cell Physiol* 193: 120-131, 2002

- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F & Riccardi C.** A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139: 271-279, 1991
- Nofziger D, Miyamoto A, Lyons KM & Weinmaster G.** Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Dev* 126: 1689-1702, 1999
- Pfeifer D, Poulat F, Holinski-Feder E, Kooy F & Scherer G.** The Sox8 gene is located within 700kb of the tip of chromosome 16p and is deleted in a patient with ATR-16 syndrome. *Genomics* 63: 108-116, 2000
- Piek E, Heldin CH & Ten Dijke P.** Specificity, diversity, and regulation of TGF- β superfamily signaling. *FASEB J* 13: 2105-2124, 1999
- Pipe A & Ayotte C.** Nutritional supplements and doping. *Clin J Sport Med* 12: 245-249, 2002
- Pitts WR Jr.** The use of flutamide as a single antiandrogen treatment for hormone-refractory prostate cancer. *BJU Int* 93: 1119-1120, 2004
- Popiela H.** Muscle satellite cells in urodele amphibians: facilitated identification of satellite cells using ruthenium red staining. *J Exp Zool* 198: 57-64, 1976
- Porter MM, Vandervoort AA & Lexell J.** Aging of human muscle: structure, function, adaptability. *Scand J Med Sci Sports* 5: 129-142, 1995
- Portier GL, Benders AG, Oosterhof A, Veerkamp JH & van Kuppevelt TH.** Differentiation markers of mouse C2C12 and rat L6 myogenic cell lines and the effect of the differentiation medium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35: 219-272, 1999

- Powers ML & Florini JR.** A direct effect of testosterone on muscle cells in tissue culture. *Endocrinology* 97: 1043-1047, 1975
- Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P & Byrne E.** Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve* 24: 892-899, 2001
- Renault V, Rolland E, Thornell LE, Mouly V & Butler-Browne G.** Distribution of satellite cells in the human vastus lateralis muscle during aging. *Exp Gerontol* 37: 1513-1514, 2002
- Rios R, Fernandez-Nocelos S, Carneiro I, Arce VM & Devesa J.** Differential response to exogenous and endogenous myostatin in myoblasts suggests that myostatin acts as an autocrine factor in vivo. *Endocrinology* 145: 2795-2803, 2004
- Roth SM, Martel GF, Ferrell RE, Metter EJ, Hurley BF & Rogers MA.** Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication. *Exp Biol Med* 228: 706-709, 2003
- Schepers GE, Bullejos M, Hosking BM & Koopman P.** Cloning and characterisation of the sry-related transcription factor gene *sox8*. *Nucleic Acids Res* 28: 1473-1480, 2000
- Schepers GE, Teasdale RD & Koopman P.** Twenty pair of *sox*: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human *sox* transcription factor gene families. *Dev Cell* 3: 167-179, 2002
- Schmidt E, Schmidt W, Jantzen M, Mayer D, Jastorff B & Schutz G.** Transcription activation of the tyrosine aminotransferase gene by glucocorticoids and cAMP in primary hepatocytes. *Eur J Biochem* 165: 499-506, 1987

- Schmidt K, Glase G, Wernig A, Wegner M & Rosorius O.** Sox8 is a specific marker for muscle satellite cells and inhibits myogenesis. *J Biol Chem* 278: 29769-29775, 2003
- Schroeter EH, Kisslinger JA & Kopan R.** Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393: 382-386, 1998
- Schultz E, Gibson MC & Champion T.** Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J Exp Zool* 206: 451-456, 1978
- Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF & Lee SJ.** Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 350: 2682-2688, 2004
- Schwarz JP.** Entwicklung eines in vitro Testverfahrens zur Detektion anaboler Substanzen in C2C12 Myoblasten. Diplomarbeit, *DSHS Köln*, 2005
- Schweisguth F.** Notch signaling activity. *Curr Biol.* 14: R129-138, 2004
- Seale P & Rudnicki MA.** A new look at the origin, function and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 218: 115-124, 2000
- Sekera MH, Ahrens BD, Chang YC, Starcevic B, Georgakopoulos C, Catlin DH.** Another designer Steroid: discovery, synthesis, and detection of 'madol' in urine. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19: 781-784, 2005
- Senni MI, Castsrignano F, Poiana G, Cossu G, Scarcella G & Biahioni S.** Expression of adult fast pattern of acetylcholin-esterase molecular forms by mouse satellite cells in culture. *Differentiation* 36: 194-198, 1987
- Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV, Fowke PJ & Bass JJ.** Myostatin, a transforming growth factor-

beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol* 180: 1-9, 1999

Shawber C, Nofziger D, Hsieh JJ, Lindsell C, Bogeler O, Hayward D & Weinmaster G. Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Dev* 112: 3765-2773, 1996

Sheffield-Morre M & Urban RJ. An overview of the endocrinology of skeletal muscle. *Trends Endocrinol Metab* 15: 110-115, 2004

Simoneau JA. Adaptation of human skeletal muscle to exercise-training. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19: 124-129, 1995

Sinha-Hikim I, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NT, Zheng W & Bhasin S. Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells: up-regulation by androgen treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5245-5255, 2004

Sinnott-Smith PA, Dumelow NW & Buttery PJ. Effects of trenbolone acetate on protein metabolism in male castrates and female lambs. *Br J Nutr* 50: 225-234, 1983

Siriatt V, Nicholas G, Berry C, Watson T, Hennebry A, Thomas M, Ling N, Sharma M & Kambadur R. Myostatin negatively regulates the expression of the steroid receptor co-factor ARA70. *J Cell Physiol* 206: 255-263, 2006

Sock E, Schmidt K, Hermanns-Borgmeyer I, Bosl MR & Wegner M. Idiopathic weight reduction in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor Sox8. *Mol Cell Biol* 21: 6951-6959, 2001

Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ & Brenner CA. Analysis of gene expression in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR. *Mol Hum Reprod* 5: 1034-1039, 1999

- Struhl G & Greenwald I.** Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 389: 522-525, 1999
- 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* 290: C650-659, 2006
- Szabo G, Dallmann G, Muller G, Patthy L, Soller M & Varga L.** A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. *Mamm Genome* 9: 671-672, 1998
- Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J & Kambadur R.** Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* 275: 40235-40243, 2000
- Thompson SH, Boxhorn LK, Kong WY & Allen RE.** Trenbolone alters the responsiveness of skeletal muscle satellite cells to fibroblast growth factor and insulin-like growth factor 1. *Endocrinology* 124: 2110-2117, 1989
- Tobin JF & Celeste AJ.** Myostatin, a negative regulator of muscle mass: implications for muscle degenerative diseases. *Curr Opin Pharmacol* 5: 328-332, 2005
- Tucker HA & Merkel RA.** Applications of hormones in the metabolic regulation of growth and lactation in ruminants. *Fed Proc* 46: 300-306, 1987
- Waterman MR & Lipesheva GI.** Sterol 14 alpha-demethylase, an abundant and essential mixed-function oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 418-422, 2005
- Wehling M, Cai B & Tidball JG.** Modulation of myostatin expression during modified muscle use. *FASEB J* 14: 103-110, 2000

- Wharton KA, Johansen KM, Xu T & Artavanis-Tsakonas S.** Nucleotide sequence from the neurogenic locus *Notch* implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 43: 567-581, 1985
- Willoughby DS.** Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. *Med Sci Sports Exerc* 36: 574-582, 2004
- Yablonka-Reuveni Z, Quinn LS & Nameroff M.** Isolation and clonal analysis of satellite cells from chicken pectoral muscle. *Dev Biol* 119: 252-259, 1987
- Yaffee D & Saxol O.** Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270: 725-727, 1977
- Yamanouchi K, Soeta C, Naito K & Tojo H.** Expression of myostatin gene in regenerating skeletal muscle of the rat and its localization. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 510-516, 2000
- Yamasaki K, Sawaki M, Ohta R, Okuda H, Katayama S, Yamada T, Ohta T, Kosaka T & Owens W.** OECD validation of the Hershberger assay in Japan: phase 2 dose response of methyltestosterone, vinclozolin, and p,p`DDE. *Environ Health Perspect* 111: 1912-1919, 2003
- Yates G, Panksepp J, Ikemoto S, Nelson E & Conner R.** Social isolation effects on the "behavioral despair" forced-swimming test: effect age and duration of testing. *Physiol Behav* 49: 347-353, 1991
- Yin D, Gao W, Kearbey JD, Xu H, Chung K, He Y, Marhefka CA, Veverka KA, Miller DD & Dalton JT.** Pharmacodynamics of selective androgen receptor modulators. *J Pharmacol Exp Ther* 304: 1334-1340, 2003

Zachwieja JJ, Smith SR, Sinha-Hikim I, Gonzales-Cadavid N & Bhasin S.

Plasma myostatin-immunoreactive protein is increased after prolonged bed rest with low-dose T3 administration. *J Gravit Physiol* 6: 11-15, 1999

Zweifel ME & Barrick D. Studies of the ankyrin repeats of the *Drosophila melanogaster* Notch receptor. 1. Solution conformational and hydrodynamic properties. *Biochemistry* 40: 14344-14356, 2001A

Zweifel ME & Barrick D. Studies of the ankyrin repeats of the *Drosophila melanogaster* Notch receptor. 2. Solution stability and cooperativity of unfolding. *Biochemistry* 40: 14357-14367, 2001B

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AAS	Androgen-anabole Steroide
AR	Androgenrezeptor
ARA-70	androgen receptor associated protein-70
BMP-2	bone morphogenetic protein 2
CK	Creatin-Kinase
Cyc	Cyclophilin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHT	5- α Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethyl Silfoxide
DMT	Desoxymethyltestosteron
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETBR	Ethidiumbromid
FKS	Fetales Kälberserum
FLU	Flutamid
GDF-8	Growth and Differentiation Factor 8
HMG	High Mobility Group
HS	Horse Serum (Pferdeserum)
ICN	Intracellular Portion of Notch-1
IOC	International Olympic Committee
LH-TH	lutinisierendes Hormon Releasing-Hormon
NOR	Norandrostendion
PEST	Proline, Glumatic acid, Serine and Threonine
Propyl	Propyltrenbolon
SRY	Sex-determining Region Y
TGF- β	Transforming growth factor beta 1
THG	Tetrahydrogestrinon
TP	Testosteron Propionat
USADA	United States Anti Doping Agency
WADA	World Anti-Doping Agency
1-Testo	1-Testosteron

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Feinbau der quergestreiften Muskulatur	14
Abb. 2: Belgian Blue Rinder mit einem Defekt im Myostatingen	18
Abb. 3: Modell der Muskelzellentwicklung (nach Thomas et al., 2000)	22
Abb. 4: Der Notch-1-Signaltransduktionsweg	23
Abb. 5: Strukturformel des Cholesterins	27
Abb. 6: Bildung von DHT (rechts) aus Testosteron (links) durch das Enzym 5- α Reduktase	31
Abb. 7: Herstellung von THG aus der Ausgangssubstanz Gestrinon.....	32
Abb. 8: Schwimmtraining (oben), Abtrocknen des Tieres nach dem Training (unten)	38
Abb. 9: Hinterbein der Ratte (links) und präparierter <i>M. gastrocnemius</i> (rechts).....	39
Abb. 10: Das Prinzip der Real-Time PCR	49
Abb. 11: Die Darstellung eines originalen Computerdiagramms des iCycler® IQ Real Time Detection Software V 2.1 zeigt eine Abbildung der Schmelzkurve von Cyclophilin (links) und Myostatin (rechts).	50
Abb. 12: C2C12 Zellen.....	52
Abb. 13: Notch-1 mRNA Gehalt im <i>M. gastrocnemius</i> für alle vier Gruppen normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin.....	62
Abb. 14: Delta-1 mRNA Gehalt im <i>M. gastrocnemius</i> für alle vier Gruppen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin.....	62
Abb. 15: Sox-8 mRNA Gehalt im <i>M. gastrocnemius</i> für alle vier Gruppen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin.....	63
Abb. 16: Myostatin mRNA Gehalt im <i>M. gastrocnemius</i> für alle vier Gruppen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin.....	63
Abb. 17: Darstellung dreier Messdiagramme aus dem Durchflusszytometer	66
Abb. 18: Graphische Darstellung der S-Phase.	66
Abb. 19: Graphische Darstellung des Anteils der sich in der S-Phase befindlichen C2C12 Zellen aller Versuche	67

Abb. 20: Dargestellt ist die Creatin-Kinase Aktivität zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (ein Tag, drei Tage und sechs Tage)	68
Abb. 21: Notch-1 mRNA Gehalt in C2C12 Myoblasten nach vier Tagen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin.....	69
Abb. 22: Delta-1 mRNA Gehalt in C2C12 Myoblasten nach vier Tagen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin.....	70
Abb. 23: Sox-8 mRNA Gehalt in C2C12 Myoblasten nach vier Tagen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin.....	71
Abb. 24: Sox-9 mRNA Gehalt in C2C12 Myoblasten nach vier Tagen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin.....	72
Abb. 25: Jagged-1 mRNA Gehalt in C2C12 Myoblasten nach vier Tagen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin.....	72
Abb. 26: Androgen Rezeptor mRNA Gehalt in C2C12 Myoblasten; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin.....	73
Abb. 27: Myostatin mRNA Gehalt in C2C12 Myoblasten; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin	74
Abb. 28: Effekte auf das Gewicht der Samenblase in orchiektomierten (plus Behandlung von TP, THG, NOR, DMT, 1-Testo und Propyl) und intakten Ratten	78
Abb. 29: Effekte auf das Gewicht der Prostata in orchiektomierten (plus Behandlung von TP, THG, NOR, DMT, 1-Testo und Propyl) und intakten Ratten	79
Abb. 30: Effekte auf das Gewicht des <i>M. levator ani</i> in orchiektomierten (plus Behandlung von TP, THG, NOR, DMT, 1-Testo und Propyl) und intakten Ratten	80
Abb. 31: Effekte auf das Lebergewicht in orchiektomierten (plus Behandlung von TP, THG, NOR, DMT, 1-Testo und Propyl) und intakten Ratten....	81
Abb. 32: TAT mRNA Gehalt in der Leber für alle Untersuchungsgruppen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin.....	82
Abb. 33: Myostatin mRNA Gehalt im <i>M. gastrocnemius</i> für alle Untersuchungsgruppen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin	83
Abb. 34: Androgenrezeptor mRNA Gehalt im <i>M. gastrocnemius</i> für alle Untersuchungsgruppen; normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin	84

Abb. 35: Myostatin mRNA Gehalt im <i>M. gastrocnemius</i> für die intakten Tiere (Dosis: 10mg/kg/KG); normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin	85
Abb. 36: Myostatin mRNA Gehalt im <i>M. gastrocnemius</i> für die orchietomierten Tiere (Dosis: 1mg/kg/KG); normalisiert gegen das Referenzgen Cyclophilin	86
Abb. 37: Zusammenspiel von Training und Androgenen auf den Prozess der Proliferation und Differenzierung von Satellitenzellen.....	108
Abb. 38: Immunocytochemische Färbung von Myostatin in C2C12 Zellen..	109
Abb. 39: Myostatin im Western Blot	110

7.3 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Übersicht über die Trainingseinheiten der Untersuchungsgruppen für die Untersuchung der zeitabhängigen Trainingseffekte..... 60
- Tab. 2: Mittelwerte der Messergebnisse der Zellzyklusanalyse (S-Phase, G1-Phase, G2-Phase) aus der Durchflusszytometrie. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung für vier unabhängige Versuche. FKS = Zellen, die in DMEM/FKS gewachsen sind, DHT = Dihydrotestosteron 65
- Tab. 3: Mittelwerte der Messergebnisse der Zellzyklusanalyse (S-Phase, G1-Phase, G2-Phase) aus der Durchflusszytometrie. Angegeben ist der Mittelwert \pm der Standardabweichung für vier unabhängige Versuche. HS = Zellen, die in DMEM/HS gewachsen sind, DHT = Dihydrotestosteron..... 65
- Tab. 4: Die im Rezeptorbindungstest analysierten Substanzen sind jeweils links aufgelistet. Die Bindungsaffinität zu verschiedenen Steroidhormonrezeptoren: Androgenrezeptor (linke Tabelle), bzw. den Glucocorticoidrezeptor (rechte Tabelle), sind dargestellt. Die Werte für die Rezeptoren in der Tabelle geben die jeweilige Konzentration der Substanzen an, die notwendig ist, um 50% des gebundenen (3H)markierten spezifischen Referenzliganden (= 1) für den jeweiligen Rezeptor (R1881, Dexamethason) zu ersetzen..... 75
- Tab. 5: Die im Rezeptorbindungstest analysierten Substanzen sind jeweils links aufgelistet. Die Bindungsaffinität zu verschiedenen Steroidhormonrezeptoren: Progesteronrezeptor (linke Tabelle), bzw. den Mineralocorticoidrezeptor (rechte Tabelle), sind dargestellt. Die Werte für die Rezeptoren in der Tabelle geben die jeweilige Konzentration der Substanzen an, die notwendig ist, um 50% des gebundenen (3H)markierten spezifischen Referenzliganden (= 1) für den jeweiligen Rezeptor (Progesteron, Aldosteron) zu ersetzen..... 76
- Tab. 6: Zusammenfassender Überblick über die Regulationen des mRNA Gehalts *in vitro* und *in vivo* für Notch, Delta und Sox-8 (Fingerprint) .. 100

7.4 Internetseiten

http://www.dgm.org	[Stand: 26.03.2006]
http://www.champion-nutrition.com	[Stand: 26.03.2006]
http://fig.cox.miami.edu	[Stand: 26.03.2006]
http://www.biochem.northwestern.edu	[Stand: 18.03.2006]
http://www.namensreaktionen.de	[Stand: 26.03.2006]
http://www.transgenderzone.com	[Stand: 26.03.2006]
http://www.dshs-koeln.de	[Stand: 26.03.2006]

7.5 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Angelika Friedel
Anschrift: Skagerrakstr. 4
Telefon: 0761-403381
E-mail: asj_f@web.de
Geburtsdatum: 20.12.1974
Geburtsort: Berchtesgaden
Familienstand: ledig
Religion: römisch-katholisch

Universitäre/Berufliche Laufbahn:

Seit Juni 2006 Angestellt als Postgraduate/Post-Doc bei
DSM Nutritional Products Ltd. Kaiseraugst,
Schweiz

Jan. 2004 Angestellt als wissenschaftliche Hilfskraft
am Institut für Kreislaufforschung und
Sportmedizin, Abt. molekulare und zelluläre
Sportmedizin an der Deutschen Sporthoch-
schule Köln

Feb. 2003 Angestellt als wissenschaftliche Hilfskraft
am Institut für Morphologie und Tumorfor-
schung an der Deutschen Sporthochschule
Köln

Seit Feb. 2003 Promotionsstudium an der Deutschen
Sporthochschule Köln

Hochschulstudium:

April 2001 – Dez. 2002 Hauptstudium im Schwerpunkt Training und
Leistung
Abschluss: Diplom Sportwissenschaftlerin
Diplomarbeit: „Etablierung eines Nachweis-
verfahrens zur Analyse der Myostatin

	mRNA Expression in der Skelettmuskulatur ausdauertrainierter Ratten“
April 2000 – April 2001	Grundstudium der Sportwissenschaft an der Deutschen Sporthochschule Köln
Okt. 1998 – April 2000	Lehramtsstudium für das Gymnasium, Sport und Biologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
Praktika:	
April 2002 – Okt. 2002	Studentische Hilfskraft am Institut für Morphologie und Tumorforschung
Feb. 2001 – Juli 2001	Studentische Hilfskraft am Institut für Trainings- und Bewegungslehre für das European College of Sport Science: Vorbereitung und Realisierung des „6th Annual Congress of the European College of Sport Science“
April 2002 – Aug. 2002	Mitorganisation des 4. Halbmarathons des Leichtathletik Teams der Deutschen Sporthochschule Köln.
Berufserfahrung:	
August 1997 – Oktober 1998	Angestellt als Tischlerin, Produktion und Montage, Firma Modutec, Au bei Freiburg i. Br.
Beruflicher Werdegang:	
Aug. 1997	Abschluss: Tischlergesellin
Aug. 1995 – Aug. 1997	Ausbildung zur Tischlerin (2. und 3. Lehrjahr) Speziialschreinerei Modutec (Modulare Einrichtungssysteme für die Kommunikationstechnik, Bernd Schwär GmbH)

Aug. 1995 – Aug. 1997 Ausbildung zur Betriebsassistentin des Handwerks

Aug. 1994 – Juni 1995 Einjährige Berufsfachschule für Holztechnik
Friedrich-Weinbrenner-Gewerbeschule,
Freiburg i. Br. (1.Lehrgang)

Schulische Ausbildung:

Aug. 1985 – Mai 1994 Deutsch-Französisches Gymnasium, Freiburg i. Br. Abschluss: Deutsch-französisches Abitur und Baccalauréat Franco-Allemand

August 1981 – Juni 1985 Gerhardt-Hauptmann-Grundschule, Freiburg i. Br.

Fremdsprachen:

Französisch Sehr gut in Wort und Schrift

Englisch Gut in Wort und Schrift

Italienisch Grundkenntnisse

Latein Grundkenntnisse