
Molekulare Mechanismen der Muskeldegeneration

Stefan Michael Mehaffey



München 2020

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik mit Friedrich-Baur-Institut
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Leiterin: Univ. Prof. Dr. med. Marianne Dieterich

Molekulare Mechanismen der Muskeldegeneration

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Stefan Michael Mehaffey
aus Schwäbisch Hall
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. Matthias Elstner Prof. Dr. Andreas Bender
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Lorenzl
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL
Tag der mündlichen Prüfung:	09.07.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Grundlagen und klinische Relevanz der Skelettmuskulatur	1
1.2	Einteilung und grundlegende Funktionen	1
1.2.1	Muskelarten.....	1
1.2.2	(Historische) allgemeine Klassifikation der Skelettmuskulatur	2
1.2.3	Energiestoffwechsel der Skelettmuskeln.....	4
1.2.4	Die Rolle des Calciums im Skelettmuskel	4
1.3	Besonderheiten der Fasertypen	5
1.3.1	Morphologie	5
1.3.2	Einflussfaktoren auf die Fasertypenverteilung.....	5
1.3.3	Fasertypenwechsel	6
1.3.4	Stand der Forschung und mögliche wissenschaftliche Ansätze.....	7
2	Zielsetzung	9
3	Material und Methoden.....	10
3.1	Gewebeproben.....	10
3.2	Kryoschnitte.....	11
3.3	Immunhistochemie	12
3.3.1	Myosinfärbung.....	12
3.3.2	COX/SDH-Färbung	14
3.4	Bestimmung der Fasertypenverteilung.....	17
3.5	Lasermikrodissektion.....	18
3.6	Isolierung von DNA und RNA.....	20
3.7	Reverse Transkription, Präamplifikation & Labeling der RNA für den Microarray	20
3.8	Reverse Transkription & Präamplifikation der RNA für die PCR	21
3.9	Bestimmung der RNA/cDNA-Qualität und Quantität	21
3.10	Microarray Genomanalyse	22

3.11	Real-Time PCR	22
4	Ergebnisse	25
4.1	Bestimmung der Fasertypenverteilung.....	26
4.2	Microarray Genomanalyse	27
4.2.1	Allgemeine Ergebnisse - Übersicht	28
4.2.2	Fasertypspezifische Genexpression	31
4.2.3	Geschlechtsspezifische Unterschiede.....	36
4.2.1	Muskelspezifische Unterschiede	38
5	Diskussion	41
5.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	41
5.2	Diskussion Material und Methoden	41
5.2.1	Gewebeproben.....	41
5.2.2	Myosinfärbung.....	42
5.2.3	Lasermikrodissektion	42
5.2.4	Microarray Genomanalyse	43
5.3	Diskussion Ergebnisse	43
5.3.1	Fasertypenverteilung.....	43
5.3.2	Microarray Genomanalyse	44
6	Literaturverzeichnis	59
7	Anhang.....	67

1 Einführung

1.1 Grundlagen und klinische Relevanz der Skelettmuskulatur

Skelettmuskulatur entspricht circa 40 Prozent unserer Körpermasse. Im Zusammenspiel mit Knochen, Sehnen, Bändern und neuronaler Innervation ist sie verantwortlich für die komplexen Funktionen unseres Bewegungsapparats. Grundlegende Aufgaben wie Fortbewegung, Ernährung und Kommunikation werden durch sie ebenso erst ermöglicht, wie hoch komplexe Bewegungsabläufe in Sport und Handwerk.

Ab dem 50. Lebensjahr verliert der Mensch jährlich zunächst ein bis zwei Prozent seiner Muskelmasse, ab dem 60. Lebensjahr bis zu drei Prozent (1). Obwohl dieser Verlust während des Alterns bis zu einem bestimmten Grad als physiologischer Prozess bezeichnet werden darf, können bestimmte Grenzwerte überschritten werden. Gemäß der Konsensveröffentlichung der „European Working Group on Sarcopenia in Older People“ (EWGSOP) wird der Verlust von Muskelmasse gemeinsam mit der Abnahme der Muskelkraft oder der Skelettmuskelfunktion ab diesen Limits als pathologisch eingestuft – man spricht von Sarkopenie (2). Bis zu 50 Prozent der über 80 jährigen leiden somit an pathologischem Verlust ihrer Muskelmasse (1,3–5).

Die Lebensqualität sarkopener Patienten ist deutlich vermindert. Alltägliche Aufgaben wie Körperpflege oder sich Anziehen benötigen immer mehr Zeit oder sind überhaupt nicht mehr möglich. Die Gebrechlichkeit und hohe Sturzgefahr sarkopener Patienten sind ein starker Risikofaktor für eine erhöhte Morbidität und Mortalität (3,6,7). Nicht zuletzt in Zeiten des demographischen Wandels nimmt die Bedeutung gesunden Alterns schnell zu.

1.2 Einteilung und grundlegende Funktionen

1.2.1 Muskelarten

Die Muskeln des menschlichen Körpers übernehmen viele verschiedene Funktionen, die weit über das reine Bewegen eines Gelenks hinausgehen.

Zunächst unterscheidet man glatte Muskulatur von quergestreifter Muskulatur. Glatte Muskulatur ist für die kontraktile Eigenschaften der Blut- und Lymphgefäße, sowie der Hohlorgane mit Ausnahme des Herzens zuständig. Zur quergestreiften Muskulatur gehören die Herz- und Skelettmuskeln. Die lichtmikroskopisch sichtbare Querstreifung der Herz- und Skelettmuskeln entsteht durch die fortlaufende Anordnung von Sarkomeren, den kleinsten zur Kontraktion fähigen Einheiten im Muskel (8,9).

1.2.2 (Historische) allgemeine Klassifikation der Skelettmuskulatur

Die weitere Unterteilung der Skelettmuskulatur lässt sich weit zurückverfolgen. Schon im frühen 18. Jahrhundert wurde der Muskel in weiße und rote Bereiche aufgeteilt, *Boerhaave* beispielsweise hielt die unterschiedliche Blutversorgung für die Ursache, im 19. Jahrhundert wurde dann auch funktionell zwischen schnellen und langsamen Muskelfasern unterschieden (10). In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts waren neue biochemische Methoden ausschlaggebend für die weitere Einteilung der Muskelfasern: die bis heute gängige Einteilung in Typ I, Typ IIa, Typ IIb, Typ IIx – Fasern, etc. hat hier ihren Ursprung (11,12). In den achtziger Jahren wurden schließlich die Isoformen der Myosin Schwere Kette (MYHC) mit den Stoffwechsel- und Kontraktionseigenschaften in Verbindung gebracht (13–15). Diese bis heute gültige Einteilung zählt drei Hauptfasertypen des Menschen: Typ I oder „slow oxidative“ (SO), Typ IIa oder „fast oxidative glycolytic“ (FOG), und Typ IIx oder „fast glycolytic“ (FG). Für eine Zusammenfassung der wichtigsten Eigenschaften der verschiedenen Fasertypen siehe *Tabelle 1*.

Tabelle 1: Skelettmuskelfasertypen

Fasertyp	Typ I	Typ IIa	Typ IIx
Vorherrschende MYHC-Isoform	MYH7	MYH2	MYH1
Kontraktionsgeschwindigkeit	langsam	schnell	sehr schnell
Ermüdung	spät	schnell	sehr schnell
Glykolyse	kaum	viel	überwiegend
Oxidativer Stoffwechsel	überwiegend	mittel	kaum
Vaskularisierung	stark	mittel	gering
Farbe	rot	weiß	

Die Unterschiede innerhalb eines Muskels gehen weit über die Einteilung in drei Fasertypen hinaus, Überschneidungen und Unterschiede sind heute schon auf vielen Ebenen bekannt (16). Die Klassifikation nach vorrangiger MYHC- Expression mag unter Umständen also nur eine vorübergehende Lösung sein, allerdings stimmt der so bestimmte Fasertyp gut mit Morphologie und Funktion überein.

Neben den wichtigen MYHC Typen 1, 2 und 7, aufgrund derer die Fasertypen klassifiziert werden, liegen beim Menschen noch weitere Isoformen vor. MYH13 kodiert für eine Isoform, die nur in extraokulären Muskeln exprimiert wird, MYH3 und MYH8 sind unverzichtbare Proteine in embryonischen und neonatalen Muskeln (17). In einigen Kopf- und Halsmuskeln werden MYH7b, MYH15 und MYH16 gefunden.

Bei der „Myosin Leichte Kette“ bestehen essentielle (MYLC1) und regulatorische (MYLC2) Untereinheiten. Auch hier werden jeweils verschiedene Isoformen in langsamen und schnellen Muskeln exprimiert, teilweise weisen auch zwei vergleichbare, langsame Muskelfasern verschiedene MYLCs auf (18).

1.2.3 Energiestoffwechsel der Skelettmuskeln

Der Energiebedarf der Skelettmuskeln ist starken Schwankungen unterworfen, somit müssen verlässliche und effiziente Möglichkeiten der ATP-Gewinnung gegeben sein. Es stehen drei Hauptmechanismen zur (Re-)Synthese von ATP zur Verfügung: 1. durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien, 2. Glykolyse und 3. die Aktivität der Kreatinkinase. Phosphokreatin stellt nur eine kleine Energiereserve der Muskeln dar, hat aber die höchste energetische Bindung und ist am schnellsten verfügbar. Die Glykolyse nimmt die wichtigste Rolle im anaeroben Stoffwechsel des Muskels ein. Glucose und Glykogen werden zu Laktat abgebaut, oder als Pyruvat in den Citratzyklus eingeschleust. Die Energie steht relativ schnell zu [17–19]r Verfügung und Glykolyse ist in größerem Umfang möglich als die Phosphorylierung von Kreatin. Ketonkörper, Fettsäuren und Pyruvat können schließlich im Citratzyklus abgebaut werden. Die Reaktionen des Citratzyklus sowie die oxidative Phosphorylierung finden nur im Mitochondrium bei verfügbarem Sauerstoff statt. Typ I Fasern mit überwiegend aerobem Stoffwechsel verfügen folglich über die größte Auswahl an Substraten. Außerdem stellt aerober Stoffwechsel die effizienteste Variante große Mengen an ATP zu generieren dar, allerdings dauert es am längsten die Energie bereit zu stellen.

1.2.4 Die Rolle des Calciums im Skelettmuskel

Calcium ist einer der wichtigsten intrazellulären Botenstoffe und übernimmt auch die Funktion der Signaltransduktion nach Erregung einer Muskelfaser. Dabei korrelieren Dauer, Amplitude und Zeitverlauf des Calciumstromes einerseits mit verschiedenen Erregungsmustern des Motorneurons (19), andererseits mit Dauer, Amplitude und zeitlichem Verlauf der Kontraktion. Schnelle Fasertypen verfügen über mehr sarkoplasmatisches Retikulum (SR) (20), außerdem enthalten sie mehr spannungsabhängige Calciumkanäle im SR, was eine stärkere Aktivierung der ebenfalls vermehrten Ryanodinrezeptoren (21) durch zytosolisches Calcium bewirkt. Neben den bereits genannten Möglichkeiten zur Aktivierung der Ryanodinrezeptoren (1. zytosolischer Calcium Anstieg, 2. durch spannungsabhängige Calciumkanäle) bestehen noch weitere, beispielsweise durch mechanische Reizung. Zusätzlich zu seiner Aufgabe im Rahmen der Muskelkontraktion spielt Calcium als ‚second-messenger‘ eine wichtige Rolle. Über Calmodulin können Kinasen wie die

Calmodulin-abhängige Kinase (CaMK) und die Myosinleichtkettenkinase, sowie Phosphatasen wie Calcineurin aktiviert werden.

1.3 Besonderheiten der Fasertypen

1.3.1 Morphologie

Als äußerst aktives Gewebe unterliegt Skelettmuskel kontinuierlichen Veränderungen und wird ständig an aktuelle Bedingungen angepasst. Muskelmasse, Funktion und Zusammensetzung sind extrem dynamisch reguliert. So ist bei Bodybuildern durch konsequentes Training eine ausgeprägte Hypertrophie möglich. Ohne äußere Reize kommt es allerdings rasch zum Verlust von Skelettmuskulatur, der M. gastrocnemius medialis beispielsweise atrophiert bei ruhiggestelltem Unterschenkel um circa 23% in nur sechs Wochen (22).

Gleichermaßen unterliegt die Größe der Einzelfaser vielen Einflüssen. Muskelfasern von Männern sind im Durchschnitt größer als die von Frauen, ihr Durchmesser nimmt im Alter ab, ebenso variiert die Fasergröße zwischen den Fasertypen. Die Größe ist negativ mit der Mitochondriendichte korreliert, Typ I Fasern sind also in der Regel kleiner als Typ II Fasern (23). Allerdings spielt auch die Funktion des Muskels eine Rolle, Typ I Fasern sind in langsamen Muskeln eher größer, Typ II Fasern dagegen in schnellen Muskeln.

Die Zusammensetzung eines Muskels hängt generell von der überwiegenden Art der Belastung ab. Beispielsweise hat der M. soleus einen hohen Anteil an Typ I Fasern, während beim M. vastus lateralis oft Typ II Fasern überwiegen (24).

Eine ‚künstliche‘ Modulation von Fasergröße und -verteilung wäre sowohl bei der altersbedingten Sarkopenie, als auch bei der großen Gruppe der Myopathien von hohem therapeutischem Interesse.

1.3.2 Einflussfaktoren auf die Fasertypenverteilung

Die Fasertypenverteilung ist teilweise genetisch festgelegt, es bestehen dabei deutliche interindividuelle Unterschiede (25). Im Gegensatz dazu spielen ethnische Unterschiede eine geringe Rolle. Bei Kaukasiern ist der Anteil der Typ I Fasern im

Vergleich mit Schwarzafrikanern etwas erhöht, dieser Unterschied ist dabei aber deutlich geringer, als allgemein angenommen (26,27).

Geschlechtsspezifische Unterschiede bestehen nicht nur auf Ebene der absoluten Muskelmasse und der Stoffwechseleigenschaften (Frauen verbrennen unter Belastung eher Lipide als Männer (28)), auf Transkriptomebene sind zumindest Gene zur Regulierung der Muskelmasse differentiell reguliert (29).

1.3.3 Fasertypenwechsel

Sowohl physiologische als auch pathologische Einflussgrößen können zu einer Transdifferenzierung der Fasertypen führen. Die wichtigsten darunter sind 1.) Mechanische Belastung (30), 2.) Innervation (31) und 3.) Hormonspiegel, im Speziellen der Schilddrüsenstatus (32). Unter diese drei Gruppen fallen ferner auch Mikrogravitation (33,34), Fettleibigkeit, Gewichtsverlust und Insulinsensitivität (35).

Körperliches Training mit kontinuierlicher Belastung wie Schwimmen und Laufen führen zum Wechsel von schnellen zu langsamen MYHC-Eigenschaften, insbesondere von Typ IIx zu Typ IIa. Durch Entlastung, im Mausmodell durch ‚Aufhängen‘ der hinteren Gliedmaßen simuliert, wird das Gegenteil, also der Wechsel zu schnelleren Fasertypen bewirkt (36). Ebenso sind die Muster der Motorneuronenerregung entscheidend, chronische Stimulation führt zu einem Wechsel zu langsameren MYHC, während seltene und hochfrequente Muster, typisch für schnelle MYHC, auch zur Transdifferenzierung in Richtung Typ IIa, beziehungsweise Typ IIx führen (31,37). Unabhängig von der Innervation führt eine hypothyreote Stoffwechsellage zu einem Wechsel zu langsameren Fasertypen, eine Hyperthyreose begünstigt hingegen die Ausbildung schnellerer MYHCs (32). Siehe *Abbildung 1-1* zur Zusammenfassung.

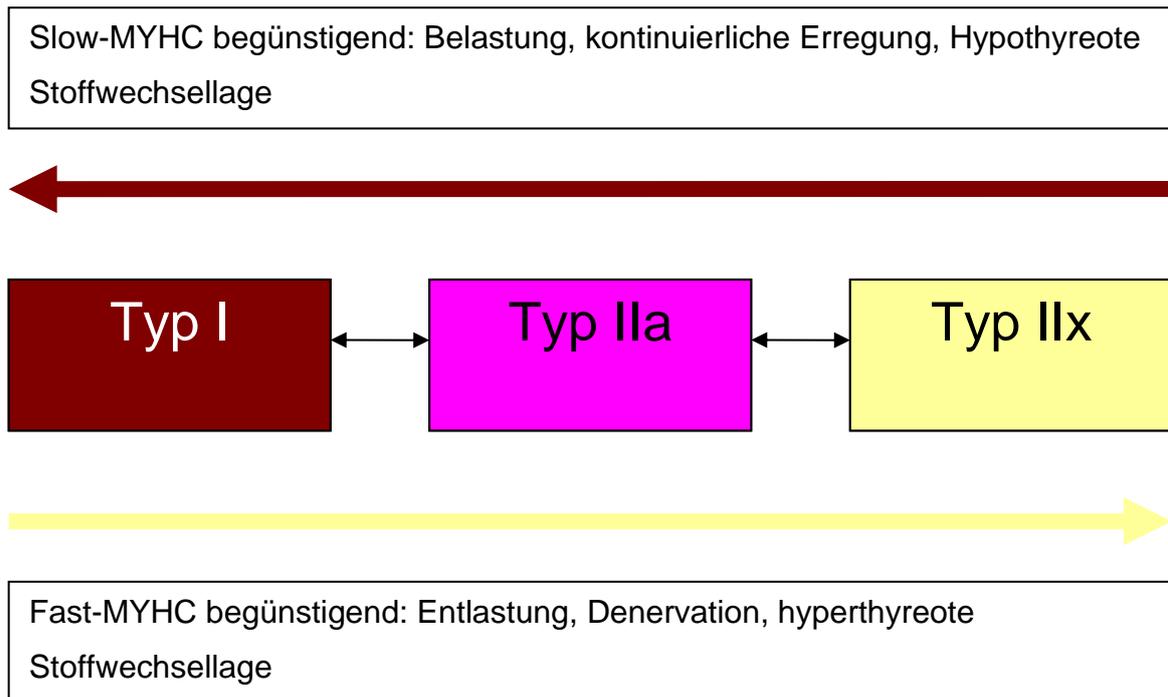


Abbildung 1-1: Transdifferenzierung der Fasertypen in adultem Skelettmuskel

1.3.4 Stand der Forschung und mögliche wissenschaftliche Ansätze

Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Fasertypenwechsels können Signalweganalysen erbringen. Bis heute bestehen nur ungenaue Vorstellungen darüber, wie Signale zur Transdifferenzierung auf molekularer Ebene vermittelt werden. Außerdem beinhaltet ein Wechsel des kontraktiven Apparates, also v.a. der Myosinkettenproteine, nicht automatisch einen Wechsel der Stoffwechselkapazitäten (16). Einige Transkriptionsfaktoren wirken zwar auf mehrere Systeme, für viele gilt das aber nicht. *Schiaffino et al.* (38) heben drei Mechanismen hervor, die eine koordinierte Gegenregulation von schnellen und langsamen Muskelgenen ermöglichen:

1.) Bifunktionelle Transkriptionsfaktoren, die bestimmte Gene aktivieren, während sie andere hemmen (39), 2.) Bidirektionale Promotoren, die gleichzeitig sense und antisense Transkripte bilden (40) und 3.) in MYHC Genen enthaltene MicroRNAs (41–43).

Bezüglich übergeordneter Signalwege bleiben noch viele Details ungeklärt. Allem Anschein nach gibt es keine unabhängigen, alle Systeme zeitgleich kontrollierenden Transkriptionsfaktoren und –regulatoren, vielmehr scheint die Fasertypregulierung aus einer komplizierten Kombination verschiedener Signalwege, Promoter und Transkriptionsfaktoren zu bestehen.

Es darf allerdings davon ausgegangen werden, dass am Anfang aller wichtigen Kaskaden ein intrazellulärer Messenger steht, beispielsweise das schon oben beschriebene Calcium. Energiestoffwechselmetaboliten wie ADP, AMP und Lipide dürften eine ebenso wichtige Rolle spielen wie Sauerstoffmangel und Mechanozeption (z.B. Muskelspannung) (44).

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung des Skelettmuskels auf Ebene der Genexpression. Auf dieser Grundlage sollen entscheidende Regulationsmechanismen des Fasertypenwechsels identifiziert werden. Transkriptionsanalysen auf diesem Gebiet sind selten, insbesondere bei humanem Gewebe. Bisherige Arbeiten aus Homogenat werden aber der Tatsache nicht gerecht, dass Skelettmuskel ein äußerst heterogenes Gewebe darstellt. Um eine angemessene Unterscheidung zwischen den Fasertypen gewährleisten zu können, wurde die Microarray-Genomanalyse fasertypspezifisch durchgeführt.

Hierfür war zunächst die Etablierung einer Methode zur Identifizierung der einzelnen Muskelfasertypen erforderlich.

Neben Genen zur Regulation des Fasertypenwechsels sollte insbesondere auf Signalwege zu folgenden Gebieten geachtet werden:

- Kontraktile Elemente & Zytoskelett
- Energiestoffwechsel
- Oxidativer Stress und antioxidative Mechanismen

Vor dem Hintergrund der differenziellen Vulnerabilität der verschiedenen Fasertypen könnten die erfassten Daten langfristig einen Beitrag zur Therapie der altersbedingten Sarkopenie leisten.

3 Material und Methoden

3.1 Gewebeproben

Es wurden 22 Skelettmuskelbiopsien aus Musculus biceps brachii und Musculus quadriceps femoris untersucht. Ausgewählt wurden Biopsien von sowohl weiblichen als auch männlichen Patienten im Alter von 15 bis 73 Jahren. Die Gewebeproben wurden vom Friedrich-Baur-Institut der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München bereitgestellt. Ausschlusskriterien waren eine mäßig erhöhte Kreatinkinase (CK > 500 U/l), pathologische Befunde in Licht- und Elektronenmikroskopie, pathologische Befunde bei der biochemischen Untersuchung der Atmungskettenkomplexe, sowie eine manifeste Hyper- oder Hypothyreose. Die Gewebeproben wurden direkt nach Entnahme bei -80° Celsius tiefgefroren. Für weitere Informationen zu den Muskelbiopsien siehe *Tabelle*.

Tabelle 2: Patienteninformationen

Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Alter	15	17	20	21	22	23	32	33	34	43	43
Geschlecht	w	w	w	m	m	m	w	m	m	m	w
Entnahmeort	q	b	b	b	b	q	b	q	q	q	q
Nummer	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Alter	45	49	53	58	59	61	66	68	70	72	73
Geschlecht	m	m	w	m	m	m	w	w	m	m	w
Entnahmeort	b	b	q	b	q	q	b	q	b	q	q

Tabelle : Allen Muskelproben sind Alter in Jahren bei Entnahme der Biopsie, Geschlecht (m = männlich; w = weiblich), sowie Entnahmeort der Biopsie (b = m. biceps brachii; q = m. quadriceps femoris) zugeordnet.

3.2 Kryoschnitte

Die Muskelbiopsien wurden mindestens zehn Minuten vor dem Schneiden in das Kryotom umgelagert, um eine bessere Qualität der Schnitte bei erhaltener RNA-Qualität zu gewährleisten. Die Kammertemperatur betrug -18°C , die Objektkopftemperatur -15°C und der Schnittwinkel betrug 4° . Sukzessive Schnitte wurden mit $10\ \mu\text{m}$ Schnittdicke auf Glasobjektträger und mit $20\ \mu\text{m}$ Schnittdicke auf Membranobjektträger nach folgendem Schema aufgenommen:

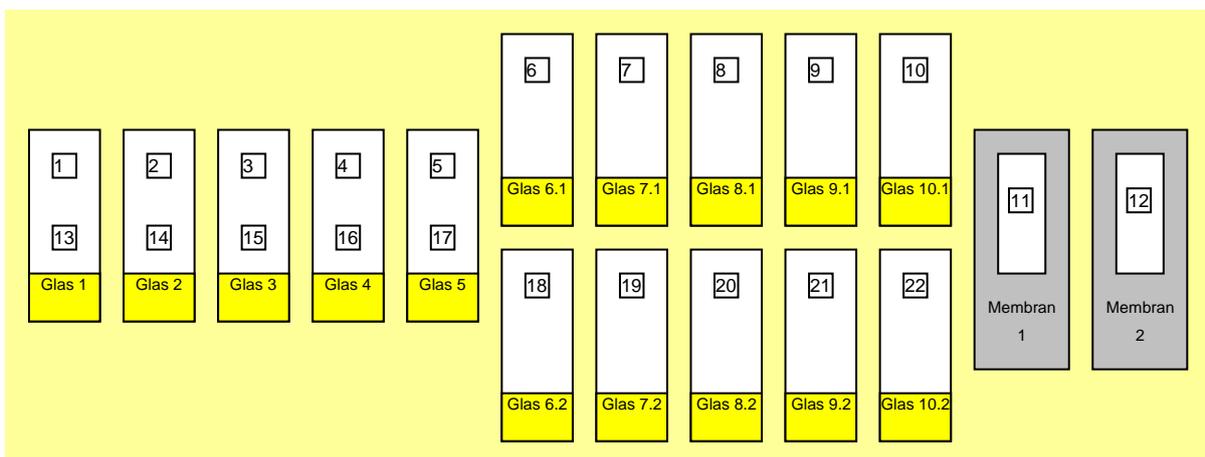


Abbildung 3-1: Gefrierschnitte.

Die fortlaufenden Nummern geben an in welcher Reihenfolge die Schnitte aufgenommen wurden.

Die Membranobjektträger wurden sofort nach Aufnahme der Schnitte einzeln in 50 ml Falcons gegeben und bei -80°C gelagert. Die Glasobjektträger wurden bei -20°C in Objektträgerboxen gelagert.

Tabelle 2: Geräte & Verbrauchsmaterial für die Erstellung von Gewebsschnitten

Geräte & Verbrauchsmaterial	Produktnummer	Hersteller
Objektträger SuperFrost® Plus	J1800AMNZ	Gerhard Menzel GmbH
Leica FrameSlides PPS-Membrane 1,2 µm	11505268	MicroDissect GmbH
Kryostat Leica CM 1950		Leica Microsystems

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 Myosinfärbung

Zur Unterscheidung der Muskelfasertypen wurden Antikörper gegen MyHC-Proteine verwendet. Myosin slow von Sigma-Aldrich bindet an die MyH7 Isoform in Typ I-Fasern, Myosin A4.74 von der *Developmental Studies Hybridoma Bank* (University of Iowa) an das für Typ IIa-Fasern charakteristische MyH2-Protein. Für die Doppelfärbung der beiden Antikörper wurden ein DAB Färbekit und ein Alkalische Phosphatase Färbekit verwendet. Demnach erscheinen Typ I Fasern braun, Typ IIa Fasern rot und Typ IIx Fasern weiß (ungefärbt). Das folgende Protokoll wurde in Anlehnung an Raheem et al. (45) etabliert.

Tabelle 3: Chemikalien und Verbrauchsmaterial der Myosinantikörperfärbung

Chemikalien und Verbrauchsmaterial	Produktnummer	Hersteller
Acetone	1.00013.1000	Merck
Albumin, from bovine serum	A7906-50G	Sigma-Aldrich

Anti-Mouse/Rabbit poly hrp IHC detection kit	2774	Millipore
Deckgläser Menzel #1	BB024060A1	Gerhard Menzel GmbH
Ethanol absolute Molecular biology grade	A3678, 1000	AppliChem
Kaisers Glyceringelatine	1.09242.0100	Merck
myosin (human fast fibers)	A4.74	Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa)
myosin slow	M8421	Sigma-Aldrich
PBS-Puffer 1M (10X) pH 7,4	P32799	Apotheke Innenstadt des Klinikums der Universität München
Permanent AP Red Kit	ZUC001-125	Zytomed Systems
ZytoChem Plus AP Polymer Kit	POLAP-006	Zytomed Systems

Tabelle 4: Protokoll der Myosinantikörperfärbung

Myosinantikörperfärbung
1. Die Präparate 10 Minuten in Aceton fixieren
2. 5 Minuten trocknen lassen
3. 5 Minuten mit Reagent 1 des AP-Kit Blocken
4. 2 Minuten in PBS waschen
5. Primärantikörper A4.74 1:1000 in BSA/PBS 2% verdünnen und ca. 25 µl pro Schnitt auftragen. 30 Minuten bei 37°C inkubieren
6. 15 Minuten in PBS waschen. Nach jeweils 5 Minuten den Waschpuffer wechseln
7. 20 Minuten mit Reagent 2 des AP-Kit Postblocken
8. 15 Minuten in PBS waschen. Nach jeweils 5 Minuten den Waschpuffer wechseln

9. 30 Minuten mit Sekundärantikörper AP-Polymer/Reagent 3 des AP-Kit inkubieren
10. 6 Minuten in PBS waschen. Nach jeweils 2 Minuten den Waschpuffer wechseln
11. 8µl Chromogen Permanent AP Red und 0,7µl Levamisol in 500µl Chromogenpuffer verdünnen. Kurz vortexen, dann 25µl pro Schnitt auftragen. 20 Minuten inkubieren
12. Kurz in Aqua dest. waschen
13. 30 Minuten Blocken in BSA/PBS 2%
14. Primärantikörper myosin slow 1:8000 in BSA/PBS 2% verdünnen und ca. 25 µl pro Schnitt auftragen. 45 Minuten bei 37°C inkubieren
15. 6 Minuten in PBS waschen. Nach 3 Minuten den Waschpuffer wechseln
16. 30 Minuten mit Sekundärantikörper anti-mouse poly horseradish peroxidase inkubieren
17. 6 Minuten in PBS waschen. Nach 3 Minuten den Waschpuffer wechseln
18. 12,5 µl DAB-Chromogen in 500µl Chromogenpuffer verdünnen. Kurz vortexen, dann 25µl pro Schnitt auftragen. 30 Minuten inkubieren
19. Kurz in Aqua dest. waschen
20. 5 Minuten in Leitungswasser bläuen
21. Dehydrieren in einer Alkoholreihe. Jeweils eine Minute in 75%, 90%, 100%, 100% Ethanol tauchen.
22. Mit Kaisers Glyceringelatine eindeckeln

3.3.2 COX/SDH-Färbung

Die COX/SDH-Färbung prüft die biochemische Aktivität der Komplexe II und IV der Atmungskette. Oxidativer Stress im Rahmen des aeroben Stoffwechsels kann im höheren Alter und bei speziellen Pathologien zur Schädigung diverser Zellbestandteile führen. Die mitochondriale DNA ist im Gegensatz zur nukleären DNA aufgrund der Kompartimentierung besonders früh betroffen. Während die Succinatdehydrogenase (SDH) komplett nukleär kodiert und lange stabil exprimiert ist, kodieren für die Cytochrom C Oxidase (COX) funktionell wichtige Gene der mtDNA. Dabei deutet ein niedriges COX/SDH-Verhältnis auf eine defekte Muskelfaser mit niedriger oxidativer

Kapazität hin. Die sequentielle COX/SDH-Färbung ermöglicht die Identifikation COX-defizienter Fasern.

Im ersten Schritt färben sich COX-positive Zellen braun. COX-defiziente Fasern bleiben zunächst ungefärbt. Im zweiten Schritt können sie aber durch eine erhaltene SDH-Aktivität blau angefärbt werden, was bei den COX-intakten Zellen ausbleibt. Bei weit fortgeschrittener Schädigung der mtDNA kann die SDH-Expression auch gesteigert sein, die Fasern werden dann als SDH⁺⁺ (SDH doppelt positiv) bezeichnet. Die Färbung wurde nach *Seligman et al.* durchgeführt (46).

Tabelle 5: Chemikalien und Verbrauchsmaterial der COX/SDH-Färbung

Chemikalien und Verbrauchsmaterial	Produktnummer	Hersteller
3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate	D-5637-10G	Sigma-Aldrich
Catalase From Bovine Liver	C-9322-1G	Sigma-Aldrich
Cytochrome c from horse heart	C-2506-1G	Sigma-Aldrich
Deckgläser Menzel #1	BB024060A1	Gerhard Menzel GmbH
Kaisers Glyceringelatine	1.09242.0100	Merck
Nitrotetrazolium Blue chloride	N6876-1G	Sigma-Aldrich
PBS-Puffer 1M (10X) pH 7,4	P32799	Apotheke Innenstadt des Klinikums der Universität München
Phenazine methosulfate	P9625-1G	Sigma-Aldrich
Sodium azide 0.1 M solution	08591-1ML-F	Sigma-Aldrich
Sodium succinate dibasic hexahydrate	S2378-500G	Sigma-Aldrich

Tabelle 6: Protokoll zur Herstellung der Aliquots der COX/SDH-Färbung

Diaminobenzidin (DAB) Aliquots 800µl

1. 54mg 5mM DAB in 15ml Aqua dest. auflösen
2. 15ml 0,2M Phosphatpuffer zugeben (pH 7,5)
3. pH der Lösung auf 7,0 bei 25°C einstellen
4. je 800µl in 1,5ml Eppendorf-Tubes aliquotieren, eventuell Tubes mit kleinem Loch im Deckel benutzen
5. Schnellgefrieren in flüssigem Stickstoff
6. bei -80°C aufbewahren

Cytochrom c Aliquots 420µl

1. 93mg 500 µM Cytochrom c in 15ml 0,1M PBS auflösen
2. pH der Lösung auf 7,0 bei 25°C einstellen
3. je 420µl in 1,5ml Eppendorf-Tubes aliquotieren
4. bei -20°C aufbewahren

Natriumsuccinat Aliquots 250µl

1. 3,5g Natriumsuccinat in 10ml 0,1M Phosphatpuffer auflösen
2. pH der Lösung auf 7,0 bei 25°C einstellen
3. je 250µl in 1,5ml Eppendorf-Tubes aliquotieren
4. bei -20°C aufbewahren

NitroBlauTetrazolium Aliquots 800µl

1. 49mg NitroBlau Tetrazolium in 10ml 0,1M Phosphatpuffer auflösen
2. pH der Lösung auf 7,0 bei 25°C einstellen
3. je 800µl in 1,5ml Eppendorf-Tubes aliquotieren
4. bei -20°C aufbewahren

Phenazinmethosulfat Aliquots 250µl

1. Für lichtgeschützte Verhältnisse bei Aliquotierung und Aufbewahrung sorgen
2. 6,12mg Phenazinmethosulfat in 10ml 0,1M Phosphatpuffer auflösen
3. pH der Lösung auf 7,0 bei 25°C einstellen
4. je 250µl in 1,5ml Eppendorf-Tubes aliquotieren
5. bei -20°C aufbewahren

Natriumazid Aliquots 100µl

1. 32,5mg Natriumazid in 5ml 0,1M Phosphatpuffer auflösen
2. pH der Lösung auf 7,0 bei 25°C einstellen
3. je 100µl in 1,5ml Eppendorf-Tubes aliquotieren

4. bei -20°C aufbewahren

Tabelle 7: Protokoll der COX/SDH-Färbung

COX/SDH-Färbung
1. Die Präparate 10 Minuten in Aceton fixieren
2. 5 Minuten trocknen lassen
3. 200µl Cytochrom c und etwas Catalase in 800µl Diaminobenzidin geben und vortexen
4. die Lösung auf den Schnitt auftragen und 60 Minuten bei 37°C inkubieren
5. 10 Minuten in PBS waschen. Nach 5 Minuten den Waschpuffer wechseln
6. 100µl Natriumsuccinat, 100µl Phenazinmethosulfat und 10 µl Natriumazid in 800µl NitroBlau Tetrazolium geben und vortexen
7. die Lösung auf den Schnitt auftragen und lichtgeschützt 45 Minuten bei 37°C inkubieren
8. 10 Minuten in PBS waschen. Nach 5 Minuten den Waschpuffer wechseln
9. Dehydrieren in einer Alkoholreihe. Jeweils eine Minute in 75%, 90%, 100%, 100% Ethanol tauchen.
10. Mit Kaisers Glycingelatine eindeckeln

3.4 Bestimmung der Fasertypenverteilung

Zur Analyse der Fasertypenverteilung wurden die myosin gefärbten Schnitte komplett ausgezählt. Unter der mittelstarken Vergrößerung (63-fach) des Leica LMD 6000 Mikroskops wurden zunächst Übersichtsaufnahmen aller Präparate angefertigt. Mit der Funktion ‚CellCounter‘ des Programms *ImageJ* wurden auf den Übersichtsaufnahmen die einzelnen Fasern farblich markiert und gezählt. Nur teilweise angeschnittene, randständige Fasern wurden nicht in die Zählung mit aufgenommen.

Tabelle 8: Geräte und Software zur Bestimmung der Fasertypenverteilung

Geräte und Software	Produktnummer	Hersteller
Leica LMD6000 System	-	Leica Microsystems
Leica LMD Software	-	Leica Microsystems
ImageJ	Open Source Software	Wayne Rasband, National Institutes of Health

3.5 Lasermikrodissektion

Die Lasermikrodissektion ist ein computer- und lasergestütztes Verfahren um exakt definierte Bereiche dünner histologischer Präparate ‚auszuschneiden‘. Diese wurden bei unserem Versuchsansatz auf Leica *FrameSlides* mit einer PPS-Membran von 1,2 µm aufgenommen (siehe 3.2 Kryoschnitte). Der Vorteil gegenüber klassischen Membranobjektträgern aus Glas liegt in einer höheren Effektivität beim Schneiden.

Vor Beginn der Lasermikrodissektion wurden die Schnitte in 100% Ethanol dehydriert und getrocknet. Am Bildschirm wurden Muskelfasern zuerst mit einer angemessenen Vergrößerung (400-fach) markiert, die der Laser daraufhin ausschneidet. Da es sich bei den Gewebeproben um ungefärbte Schnitte handeln musste, wurden die Fasertypen anhand sukzessiver Schnitte mittels Myosinfärbung identifiziert (siehe 3.3.1 Myosinfärbung). COX-defiziente Zellen wurden durch die COX/SDH-Färbung (siehe 3.3.2 COX/SDH-Färbung) identifiziert und von unserem Versuch ausgeschlossen. 100 Zellen jedes Fasertyps wurden in Eppendorf-Tubes aufgefangen und anschließend in 65µl *RLT Plus Puffer* des *AllPrep® DNA/RNA Micro Kit* von Qiagen lysiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

Tabelle 9: Geräte und Verbrauchsmaterial der Lasermikrodissektion

Geräte & Verbrauchsmaterial	Produktnummer	Hersteller
0.5ml Reaction Tube	82-0350-A	PEQLAB Biotechnologie GmbH
AllPrep® DNA/RNA Micro Kit	80284	Qiagen
Ethanol absolute	A3678, 1000	AppliChem

Molecular biology grade		
Leica FrameSlides PPS-Membrane 1,2 µm	11505268	MicroDissect GmbH
Leica LMD6000 System	-	Leica Microsystems
Leica LMD Software	-	Leica Microsystems

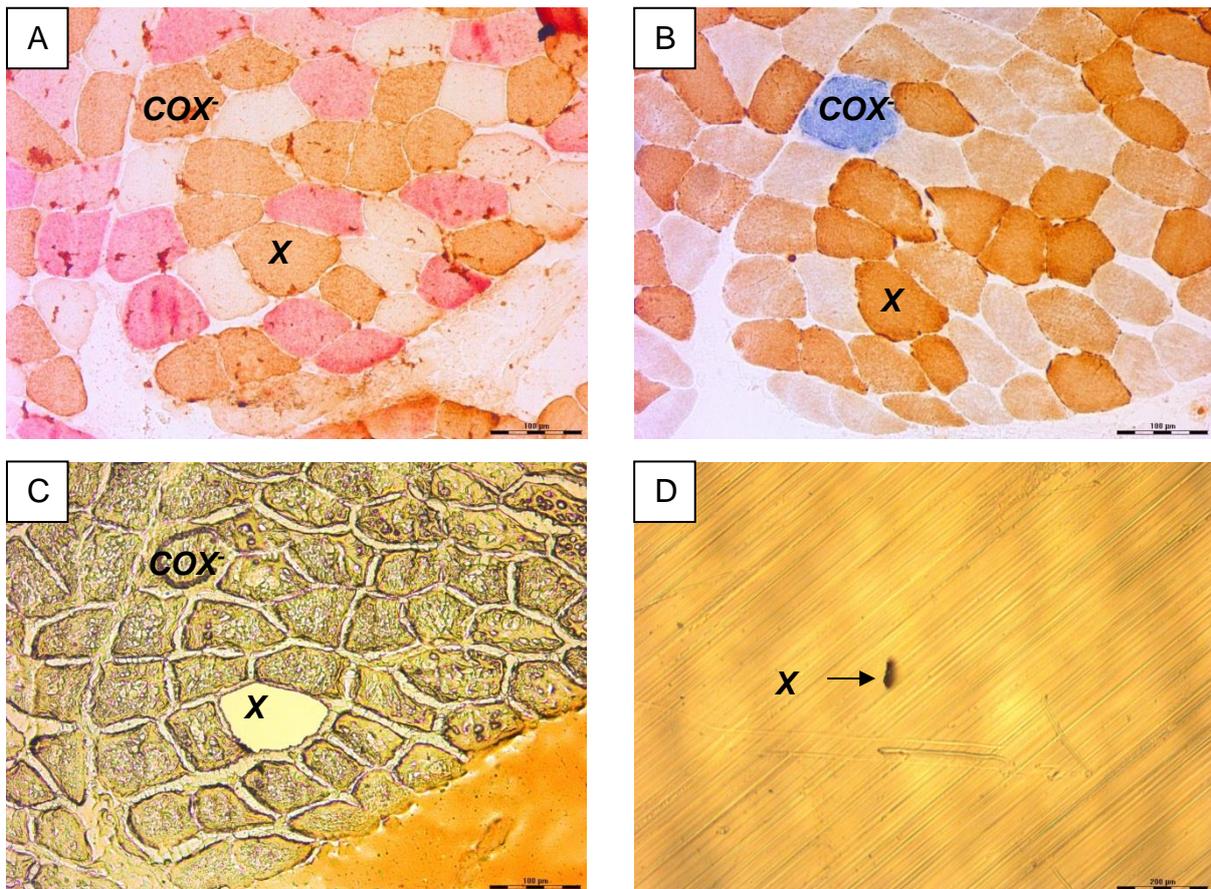


Abbildung 3-2: Beispiel für die Lasermikrodissektion

Anhand der Myosinantikörperfärbung (Bild A) wird die gewünschte Zelle ausgewählt (mit X markiert: Typ I Faser). COX-defiziente Zellen werden anhand der COX/SDH-Färbung (Bild B) identifiziert und von einer weiteren Verwendung ausgeschlossen (mit COX⁻ markiert: COX negative Faser). Bild C zeigt den ungefärbten Schnitt auf dem Membranobjektträger. Die gewünschte Typ I Faser wurde bereits per Laser ausgeschnitten und befindet sich im Auffangbehälter (Bild D).

3.6 Isolierung von DNA und RNA

DNA und RNA wurden nach Protokoll des Herstellers mit dem *AllPrep® DNA/RNA Micro Kit* von Qiagen isoliert. Eingesetzt wurden die 65 µl Lysate der Lasermikrodissektion. Vom Protokoll abweichend wurde die DNA nicht in Pufferlösung, sondern in Wasser eluiert.

Zusatz für Microarray: Die 14µl zur RNA-Eluierung wurden zwei Mal über die Säule gegeben und anschließend mit einer Vakuumzentrifuge auf 6µl konzentriert.

Tabelle 10: Verbrauchsmaterial zur Probenisolierung

Verbrauchsmaterial	Produktnummer	Hersteller
AllPrep® DNA/RNA Micro Kit	80284	Qiagen

3.7 Reverse Transkription, Präamplifikation & Labeling der RNA für den Microarray

Die RNA wurde nach Protokoll des Herstellers mittels Ovation *PicoSL WTA System* von Nugen revers transkribiert, aufgereinigt und präamplifiziert. Anschließend wurden die Proben mit dem *Encore Biotin IL Module* von Nugen für den Microarray gelabelt.

Tabelle 11: Geräte & Verbrauchsmaterial für die Reverse Transkription, Präamplifikation & das Labeling der RNA für den Microarray

Geräte & Verbrauchsmaterial	Produktnummer	Hersteller
Ovation PicoSL WTA System	3310	Nugen
Encore Biotin IL Module	4200	Nugen
Peqstar 2X	95-07002	Peqlab

3.8 Reverse Transkription & Präamplifikation der RNA für die PCR

Die reverse Transkription der RNA wurde nach Protokoll des Herstellers mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit den gepoolten *Taqman® Assays* und dem *Taqman® PreAmp Mastermix* präamplifiziert (14 Zyklen)

Tabelle 12: Geräte & Verbrauchsmaterial für die Reverse Transkription & Präamplifikation der RNA für die PCR

Geräte & Verbrauchsmaterial	Produktnummer / Assay-ID	Hersteller
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4368814	Applied Biosystems
Taqman® PreAmp Master Mix (2X)	4391128	Applied Biosystems
Peqstar 2X	95-07002	Peqlab
GAPDH	Hs02758991_g1	Applied Biosystems
HDAC5	HS00608366_m1	Applied Biosystems
HDAC7	HS00248789_m1	Applied Biosystems
MCU	HS00293548_m1	Applied Biosystems
MYH1	MYH1	Applied Biosystems
MYH2	MYH2	Applied Biosystems
MYH7	MYH7	Applied Biosystems
MYOD1	MYOD1	Applied Biosystems
MYOM1	MYOM1	Applied Biosystems
PPARA	Hs00947539_m1	Applied Biosystems
PPP3CB	Hs00917458_m1	Applied Biosystems
PPP3CC	HS00194467_m1	Applied Biosystems

3.9 Bestimmung der RNA/cDNA-Qualität und Quantität

Während der Aufreinigung und Amplifikation wurden RNA und später cDNA zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Menge und Qualität wurden mit dem *Agilent Bioanalyzer 2100* und *RNA Pico Chips* nach Protokoll des Herstellers bestimmt. Die totale RNA wird bei dieser Methode kapillarelektrophoretisch aufgetrennt, detektiert und anhand einer geeichten Probe, der sogenannten Ladder, normiert. Bei der Auswertung wurde auf erhöhte Degradation und das Verhältnis der beiden ribosomalen RNA-Untereinheiten geachtet.

Tabelle 13: Geräte und Verbrauchsmaterial zur Bestimmung der Probenqualität und -quantität

Geräte & Verbrauchsmaterial	Produktnummer	Hersteller
2100 Bioanalyzer Desktop Bundle	G2940CA	Agilent Technologies
Agilent RNA 6000 Pico Kit	5067-1513	Agilent Technologies
Agilent RNA 6000 Pico Ladder	5067-1535	Agilent Technologies
TPersonal Thermocycler	050-552	Biometra GmbH

3.10 Microarray Genomanalyse

Die Genexpressionsanalyse der fertigen Proben wurde im Helmholtz-Zentrum Neuherberg auf Microarray-Chips des Typs *HumanWG-6 v3.0* von Illumina nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

3.11 Real-Time PCR

Zur Validierung der Microarrayergebnisse wurde bei jeweils drei Muskelproben von ‚alten‘ und ‚jungen‘ Patienten eine quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion von ausgewählten Genen durchgeführt. Außerdem wurde zur Deletionsbestimmung

der mitochondrialen DNA eine RT-PCR vorwiegend nukleär kodierter, beziehungsweise vorwiegend mitochondrial kodierter DNA durchgeführt.

Tabelle 14: Geräte und Verbrauchsmaterial zur für die RT-PCR

Geräte & Verbrauchsmaterial	Produktnummer / Assay-ID	Hersteller
StepOnePlus Real-Time PCR System with Laptop	4376598	Applied Biosystems
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	4364341	Applied Biosystems
ACTB	Hs03023880_g1	Applied Biosystems
GAPDH	Hs02758991_g1	Applied Biosystems
HDAC5	HS00608366_m1	Applied Biosystems
HDAC7	HS00248789_m1	Applied Biosystems
HumanND1_ANY	Custom Made	Applied Biosystems
HumanND4_ANY	Custom Made	Applied Biosystems
MCU	HS00293548_m1	Applied Biosystems
MYH1	MYH1	Applied Biosystems
MYH2	MYH2	Applied Biosystems
MYH7	MYH7	Applied Biosystems
MYOD1	MYOD1	Applied Biosystems
MYOM1	MYOM1	Applied Biosystems
PPARA	Hs00947539_m1	Applied Biosystems
PPP3CB	Hs00917458_m1	Applied Biosystems
PPP3CC	HS00194467_m1	Applied Biosystems

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Fasertyp-spezifische Genexpressionsprofile von 22 Muskelbiopsien angefertigt. Aufgrund zu geringer Anteile an Typ IIx Fasern einiger Muskelbiopsien resultierten insgesamt 59 Analysen.

Zunächst wurden anhand definierter Ausschlusskriterien geeignete Muskelbiopsien ausgewählt, welche keine primäre Muskelerkrankung aufwiesen (siehe 3.1).

Anschließend wurde eine immunhistochemische Färbung in Anlehnung an Raheem et al. (45) etabliert, um eine eindeutige Zuordnung einzelner Skelettmuskelfasern zu den unterschiedlichen Fasertypen zu gewährleisten. Die Validität der Färbung konnte mittels qPCR bestätigt werden.

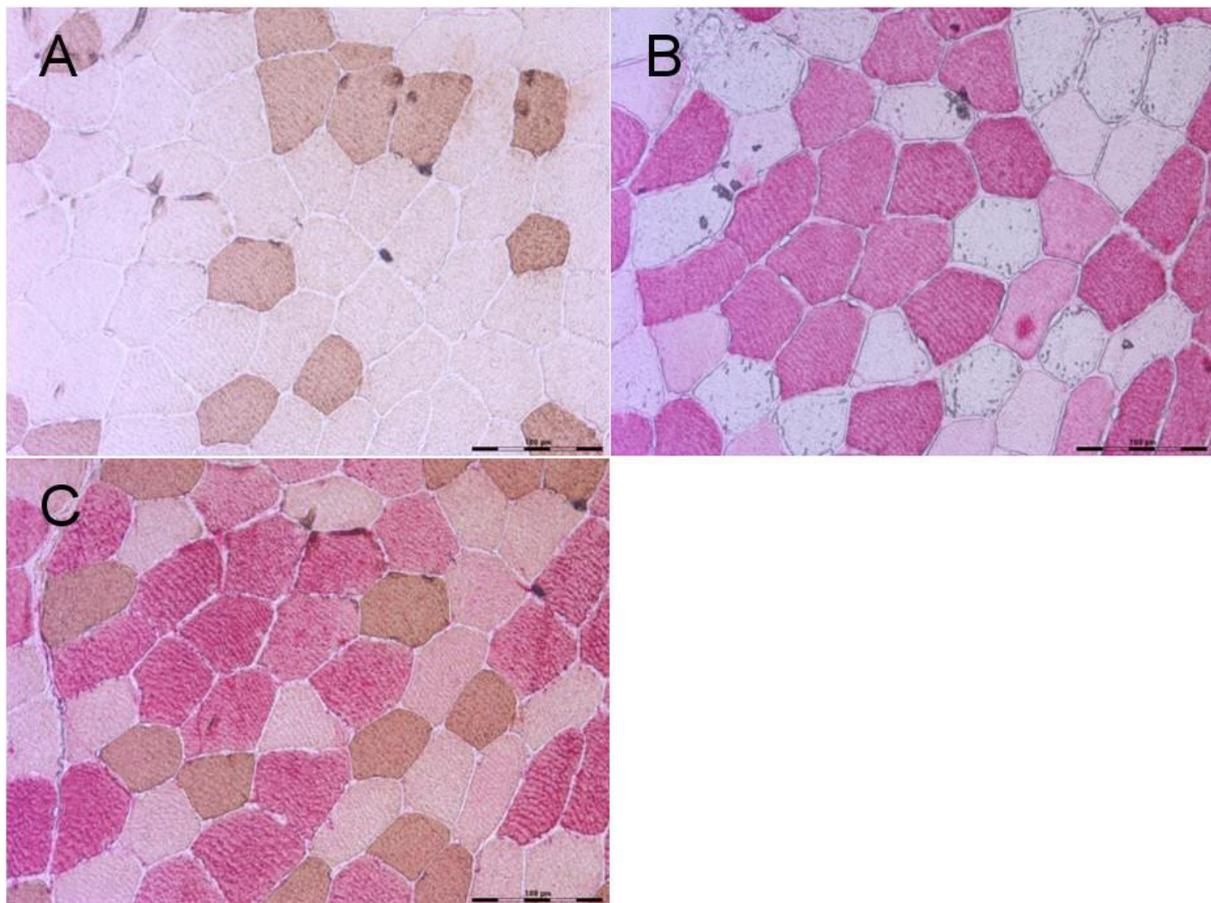


Abbildung 4-1: Etablierung der Myosindoppelfärbung

Bild A: Färbung des Fasertyp I mittels DAB-Färbekit

Bild B: Färbung des Fasertyp IIa mittels AP-Färbekit

Bild C: Kombination der o.g. Färbungen, Fasertyp IIx erscheint ungefärbt (weiß/grau)

4.1 Bestimmung der Fasertypenverteilung

Initial wurden die Biopsien hinsichtlich der Faserverteilung analysiert, um eine Aussagekraft im Vergleich zu publizierten Daten zu gewährleisten. Hierzu zählen die prozentuale Verteilung der einzelnen Fasertypen unter Berücksichtigung der ausgewählten Biopsiemuskeln, des Geschlechtes und des Alters.

Ausgezählt wurden insgesamt 24 verschiedene Skelettmuskelschnitte, die zu gleichen Teilen auf *Musculus biceps brachii* und *Musculus quadriceps femoris* entfielen. 22 der hinsichtlich der Faserverteilung quantifizierten Muskelbiopsien wurden anschließend in die Transkriptomanalyse eingeschlossen.

Im Mittel wurden 2762,5 Fasern pro Schnitt den einzelnen Typen zugeordnet, der kleinste Schnitt zählte 416 Fasern, der größte 5346. Die Standardabweichung betrug ± 1436 . Die Auszählung der Muskelfasertypen ergab für beide Muskeln eine ähnliche Zusammensetzung. Je etwa 40 Prozent der Muskelfasern entfallen im Mittel auf die Typen I und IIa, die restlichen 20 Prozent sind Typ IIx Fasern. *M. biceps brachii* und *M. quadriceps femoris* weisen keine größeren Unterschiede bezüglich der Fasertypenverteilung auf.

Tabelle 15: Mittlere Fasertypenverteilung der eingeschlossenen Muskeln

Fasertyp	M. biceps brachii	M. quadriceps femoris
Typ I	40%	42%
Typ IIa	37%	37%
Typ IIx	23%	21%

Abbildung 4-2 zeigt die prozentuale Verteilung der Fasertypen I, IIa und IIx in Abhängigkeit vom Alter bei Biopsieentnahme in Lebensjahren. Graphik A zeigt die Verteilung von Fasertyp I, Graphik B von Fasertyp IIa und Graphik C Fasertyp IIx. Unabhängig vom Biopsiemuskel kommt es prozentual zu einem Anstieg von Fasertyp I ($p=0.027$; lineare Regressionsanalyse).

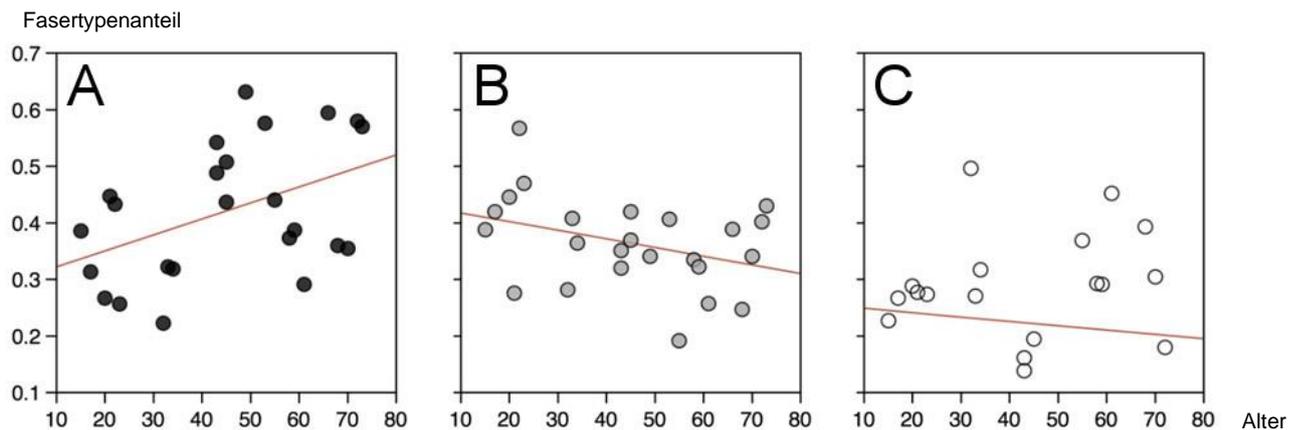


Abbildung 4-2: Anteilige Fasertypenverteilung in Relation zum Alter bei Biopsie in Jahren der Fasertypen I (Bild A), IIa (Bild B) und IIx (Bild C)

Tabelle 16: Geschlechtsspezifische Fasertypenverteilung zeigt die Fasertypenverteilung in Bezug auf das Geschlecht des Spenders. Es ergaben sich keine relevanten Unterschiede (weiblich n=10; männlich n=14)

Tabelle 16: Geschlechtsspezifische Fasertypenverteilung

Fasertyp	weiblich	männlich
Typ I	41%	41%
Typ IIa	36%	37%
Typ IIx	23%	22%

4.2 Microarray Genexpressionsanalyse

Nach der histologisch-morphologischen Charakterisierung der Skelettmuskelfasern erfolgte anschließend die Isolierung mittels Lasermikrodissektion. Gemäß des sogenannten ‚proof of concept‘-Prinzips sollte zunächst geprüft werden, ob die Genexpression der MYHC-Strukturgene, anhand derer die histologische Identifizierung erfolgte, dementsprechend differenziell reguliert ist. Abbildung 4-3 zeigt die Genexpressionsverhältnisse der einzelnen Fasertypen im Vergleich in der qPCR, genormt auf das ‚Housekeeping‘-Gen GAPDH. Die fold-changes geben jeweils an, um welch vielfaches ein Gen im erstgenannten gegenüber dem zweitgenannten Fasertyp

exprimiert wird. Beispielsweise erkennt man anhand der MYH2 Analyse, dass selbiges in Typ I Fasern circa 25fach geringer als in Typ IIa Fasern exprimiert wird und ungefähr 30 mal häufiger in Typ IIa Fasern als in Typ IIx Fasern. So lässt sich durch Abbildung 4-3 nachprüfen, dass die Zuordnung der einzelnen Fasertypen durch unsere MYHC-Färbung funktioniert und die korrekte Auswahl der Muskelfasertypen gegeben ist.

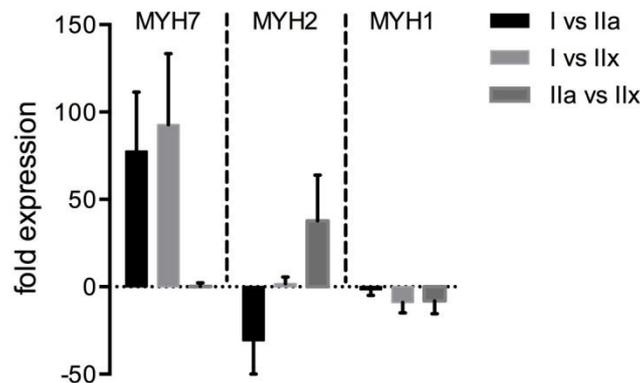


Abbildung 4-3: quantitative Expression der Fasertyp-definierenden MYHC-Gene

Nachdem der Versuchsaufbau aus Färbungen, RNA-Isolierung und (semi-)quantitativer Genexpressionsanalyse humanen Muskels erfolgreich etabliert werden konnte, wurden typspezifisch Einzelfasern durch Lasermikrodissektion gepoolt. Nach Lyse der Fasern und Isolierung der RNA wurde diese revers transkribiert, aufgereinigt und vervielfältigt. Die gelabelten Proben wurden anschließend auf Microarray-Chips analysiert.

4.2.1 Allgemeine Ergebnisse - Übersicht

Insgesamt standen 59 individuelle Genexpressionsprofile zur Verfügung.

Tabelle 17: Anzahl der Arrays je Fasertyp und Entnahmeort

	Typ I	Typ IIa	Typ IIx
Biceps	11	11	8
Quadriceps	11	11	7

Darüber hinaus stammten die Biopsien von weiblichen und männlichen Spendern unterschiedlichen Alters. Die zu analysierenden Parameter sind nochmals in Abbildung 4-4 veranschaulicht.

Genexpression in Bezug auf:

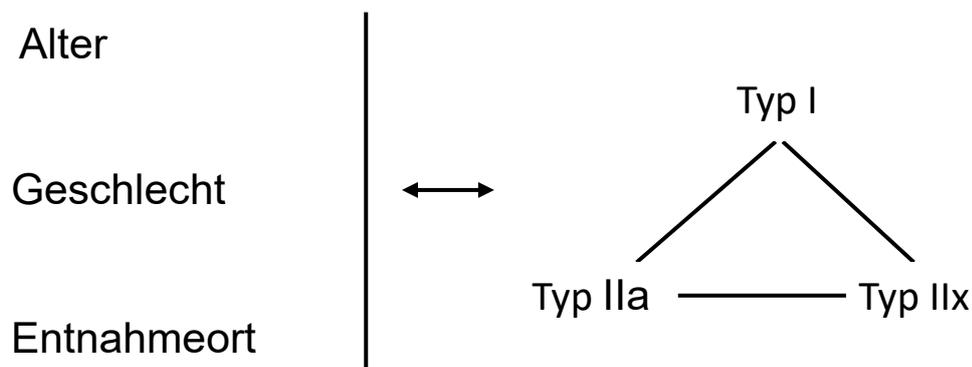


Abbildung 4-4: Zu untersuchende Parameter unserer Genexpressionsanalyse

Zunächst wurde durch ANOVA die differentielle Genexpression der einzelnen Fasertypen wie folgt analysiert:

- Typ I vs Typ IIa
- Typ I vs Typ IIx
- Typ IIa vs Typ IIx

Der normalisierte Datensatz zum Vergleich der Genexpression verschiedener Fasertypen wurde nach Benjamini & Hochberg für multiples Testen korrigiert. Danach wurde er zur Auswertung in das Signalweg- und Netzwerkanalyseprogramm *Ingenuity Pathway Analysis (IPA®)* von QIAGEN geladen.

Mit einem p-Wert unter 0,05 nach Benjamini-Hochberg-Korrektur ergaben sich zwischen den Fasertypen I und IIa somit 3187 differentiell regulierte Gene, zwischen den Fasertypen I und IIx 3234 und zwischen den Fasertypen IIa und IIx 1153. Die ‚heatmap‘ aus Abbildung 4-5 gibt einen Überblick über die Verteilung der differentiell regulierten Gene der Untersuchungen Fasertypen I vs IIa, I vs IIx und IIa vs IIx.

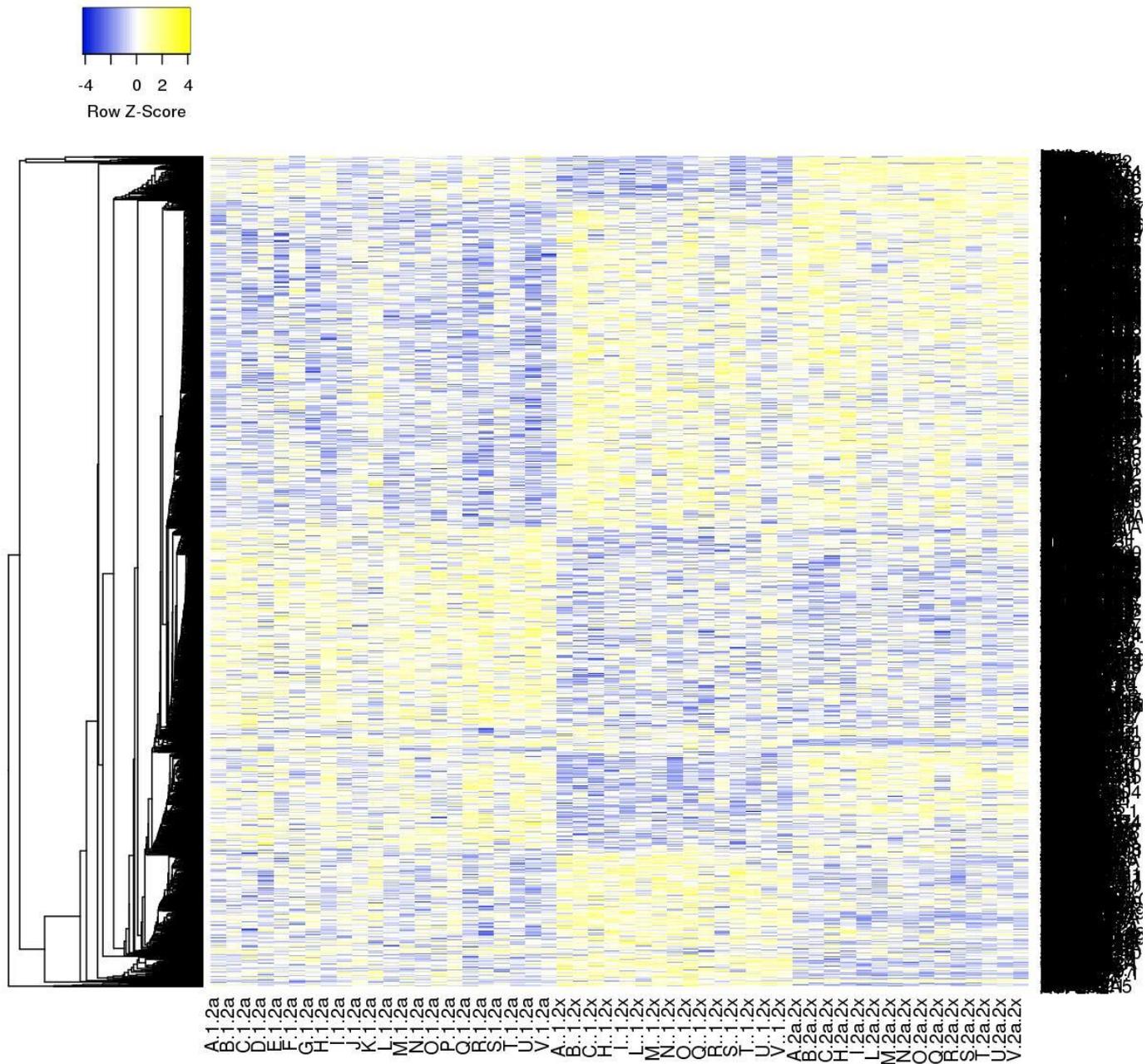


Abbildung 4-5: Heatmap von 2000 differentiell regulierten Genen

Spalten zeigen einzelne Muskelproben (A-V), jeweils den 3 Untersuchungen Fasertypen I vs IIa, I vs IIx und IIa vs IIx zugeordnet. Die differentiell regulierten Gene sind als Zeilen organisiert. Eine verminderte Expression ist durch blaue Farbe in verschiedenen Intensitäten gekennzeichnet, eine gesteigerte Expression durch verschiedene Gelbtöne.

Erstellt mit <http://www.heatmapper.ca/expression/>

4.2.2 Fasertypspezifische Genexpression

Die jeweils zehn Gene mit dem niedrigsten p-Wert der o.g. Untersuchungen sind in Tabelle 18 dargestellt. Schon bei oberflächlicher Betrachtung dieser wenigen Gene fällt die fasertypspezifische Expression auf. Als weiterer Beweis für die Validität unseres Versuchssettings mit Identifizierung, Dissektion und nachfolgender in-vitro-Transkription sowie Array-Analyse zeigen sich biologisch sinnvolle Gene, beispielsweise aus den Bereichen Zellskelett und Stoffwechsel, differenziell reguliert. Beispiele der zwischen den Fasertypen I und IIa am deutlichsten differentiell regulierten Gene dieser Gruppen stellen ACAD9, TNNT3 oder FBP2 dar, siehe ebenfalls Tabelle 18.

Tabelle 18: Die 10 signifikantesten Gene der Untersuchungen I vs IIa, I vs IIx und IIa vs IIx

Symbol	Genbezeichnung	Illumina Identifier	p-Wert	Fold Change
<i>Fasertypen I-IIa</i>				
ACAD9	acyl-CoA dehydrogenase family, member 9	ILMN_17 75579	2,84E-15	-3,076
XPO4	exportin 4	ILMN_16 57873	1,66E-14	8,485
TNNT3	troponin T type 3 (skeletal, fast)	ILMN_17 20231	5,52E-14	- 23,867
RPA1	replication protein A1, 70kDa	ILMN_17 95719	5,52E-14	-2,858
ATG9	autophagy related 9A	ILMN_24 10975	5,52E-14	-2,638
POLB	polymerase (DNA directed), beta	ILMN_17 67894	5,52E-14	3,452
KLHDC 8B	kelch domain containing 8B	ILMN_16 95246	5,52E-14	3,776
PDLIM 1	PDZ and LIM domain 1	ILMN_17 88955	5,52E-14	12,141
FBP2	fructose-1,6-bisphosphatase 2	ILMN_18 04005	6,40E-14	-6,907
FBXW8	F-box and WD repeat domain containing 8	ILMN_17 09056	7,80E-14	- 16,563
<i>Fasertypen I-IIx</i>				

AUP1	ancient ubiquitous protein 1	ILMN_16 51378	5,80E-11	-1,969
PDLIM1	PDZ and LIM domain 1	ILMN_17 88955	7,59E-11	17,029
TECRL	trans-2,3-enoyl-CoA reductase-like	ILMN_17 81280	4,28E-10	29,218
ATG9A	autophagy related 9A	ILMN_24 10975	6,65E-10	-2,947
GPD1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	ILMN_17 64175	6,65E-10	-3,494
XPO4	exportin 4	ILMN_16 57873	9,33E-10	10,516
FBXW8	F-box and WD repeat domain containing 8	ILMN_17 09056	1,68E-09	-
PFKM	phosphofructokinase, muscle protein kinase, AMP-activated,	ILMN_20 43809	2,83E-09	-2,332
PRKAG3	gamma 3 non-catalytic subunit	ILMN_17 16754	2,83E-09	-3,993
LDHB	lactate dehydrogenase B	ILMN_17 28132	3,58E-09	10,172
AUP1	ancient ubiquitous protein 1	ILMN_16 51378	5,80E-11	-1,969
PDLIM1	PDZ and LIM domain 1	ILMN_17 88955	7,59E-11	17,029
<i>Fasertypen Ila-Ilx</i>		ILMN_17		
RGS10	regulator of G-protein signaling 10	ILMN_16 33538	9,39E-07	-3,222
NUCB2	nucleobindin 2	ILMN_17 55913	5,04E-05	-1,626
PRKAG3	protein kinase, AMP-activated, gamma 3 non-catalytic subunit	ILMN_17 16754	5,04E-05	-1,822
STBD1	starch binding domain 1	ILMN_16 73950	5,04E-05	-1,533
ATP5G1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C1 (subunit 9)	ILMN_16 76393	1,45E-04	0,828
PLN	phospholamban	ILMN_17 30811	1,45E-04	0,419
WNT4	wingless-type MMTV integration site family, member 4	ILMN_16 66392	1,88E-04	-1,707
CBX1	chromobox homolog 1	ILMN_17 70244	2,82E-04	-1,453

		ILMN_17		
FRZB	frizzled-related protein	16246	2,82E-04	0,180

Während die Analyse einzelner hochsignifikanter Gene Rückschlüsse auf die Validität der Methode zulässt und außerdem einzelne interessante Kandidatengene identifiziert werden können, bleibt die zugrundeliegende Genregulation durch diese oberflächliche Betrachtung jedoch verborgen. Aus diesem Grund wurden die jeweiligen Gentabellen im Signalweg-Analyseprogramm IPA untersucht. Tabelle 19 listet jeweils die zehn Signalwege der drei Untersuchungen auf, welche die höchste Signifikanz bezüglich differentieller Regulation zeigen. Wie zuvor bei der Betrachtung einzelner Gene gehören viele der hoch signifikanten Signalwege den Bereichen Zellskelett und Stoffwechsel an, insbesondere die Signalwege „Mitochondrial Dysfunction“ und „Oxidative Phosphorylation“ zeigen sich in allen drei Untersuchungen am stärksten differentiell reguliert. Weiter Signalwege lassen sich Zellzyklussteuerung und Proliferationskontrolle zuordnen, z.B. „Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling“, „Cardiac Hypertrophy Signaling“, „Breast Cancer Regulation by Stathmin1“, oder „PPAR α /RXR α Activation“.

Außerdem findet sich „NRF2-mediated Oxidative Stress Response“ unter den wichtigsten Signalwegen, antioxidative Mechanismen sind besonders in der Untersuchung I-IIa differentiell reguliert.

Tabelle 19: Die 10 signifikantesten Signalwege der Untersuchungen I vs IIa, I vs IIx und IIa vs IIx

Anerkannte Signalwege	p-Wert	Gene
IPA Top 10		↑/↓
<i>Fasertypen I-IIa</i>		
Mitochondrial Dysfunction	6,87E-12	43/13
Oxidative Phosphorylation	2,81E-09	32/4
Calcium Signaling	7,28E-09	31/24
Epithelial Adherens Junction Signaling	2,66E-08	21/27
Actin Cytoskeleton Signaling	3,22E-07	30/30

NRF2-mediated Oxidative Stress Response	8,9E-07	23/29
Integrin Signaling	1,06E-06	21/34
Insulin Receptor Signaling	1,9E-06	16/24
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	2,12E-06	13/30
Cardiac Hypertrophy Signaling	2,83E-06	23/36
<i>Fasertypen I-IIx</i>		
Mitochondrial Dysfunction	1,48E-21	60/11
Oxidative Phosphorylation	6,47E-19	47/2
Actin Cytoskeleton Signaling	1,66E-10	31/37
Epithelial Adherens Junction Signaling	2,74E-10	21/31
Calcium Signaling	5,37E-08	28/25
Integrin Signaling	7,2E-08	23/35
ILK Signaling	2,57E-07	30/24
PPAR α /RXR α Activation	5,04E-07	21/29
Breast Cancer Regulation by Stathmin1	7,17E-07	21/34
PI3K/AKT Signaling	3,56E-06	14/24
<i>Fasertypen IIa-IIx</i>		
Mitochondrial Dysfunction	4,7E-14	24/2
Oxidative Phosphorylation	2,37E-13	20/0
TCA Cycle II (Eukaryotic)	3,09E-05	6/0
PPAR α /RXR α Activation	6,17E-05	7/8
Fatty Acid β -oxidation I	1,26E-04	6/0
Mevalonate Pathway I	2,49E-04	4/0
Phenylalanine Degradation IV (Mammalian, via Side Chain)	4,81E-04	4/0
Ketolysis	6,96E-04	3/0
Aspartate Degradation II	6,96E-04	3/0
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	8,07E-04	5/0

Neben den direkt gemessenen Transkriptionsprofilen ermöglicht das Analyseprogramm IPA auch indirekte Rückschlüsse auf die differentielle Expression wichtiger Schlüsselgene, deren absolute Expression womöglich unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze liegt. Anhand anderer Gene beteiligter Signalwege kann so in manchen Fällen eine Aussage zur Wahrscheinlichkeit einer Aktivierung oder Deaktivierung, zumindest jedoch bezüglich der differentiellen Regulierung getroffen werden. In Tabelle 20 sind die jeweils fünf signifikantesten dieser sogenannten „Upstream Regulators“ aufgeführt. Aus dem Bereich der fasertypspezifischen Genexpression sind v.a. *MYOD1* sowie *PPARGC1* (PGC-1 α) hervorzuheben. Beide werden als mögliche Schlüsselgene in den Bereichen Faserentwicklung und -typspezifische Genexpression diskutiert (47–50)

Tabelle 20: Die 5 signifikantesten „Upstream-Regulators“ der Untersuchungen I vs IIa, I vs IIx und IIa vs IIx

Upstream Regulator	Molecule Type	p-value of overlap	Predicted Activation State	Activation z-score	Fold Change
<i>Fasertypen I-IIa</i>					
DMD	other	7,03E-13		-1,641	
miR-124-3p (and other miRNAs w/seed)					
AAGGCAC)	mature microrna	7,64E-11		1,398	
PRKAG3	other transcription	3,08E-10			-2,477
PML	regulator transcription	1,30E-09		1,087	
MYOD1	regulator	2,16E-09		-1,113	-1,209
<i>Fasertypen I-IIx</i>					
	transcription				1,393
PPARGC1A	regulator transcription	9,82E-15	Activated	3,924	
MYC	regulator	2,75E-14		-0,539	

DMD	other	4,52E-14	Inhibited	-2,236
INSR	kinase ligand- dependent	8,31E-13	Activated	4,990
PPARD	nuclear receptor	7,46E-12		1,238
<i>Fasertypen Ila-Ilx</i>				
RICTOR	other	1,92E-10	Inhibited	-2,887
DMD	other	2,15E-08		-1,294
INSR	kinase transcription	2,21E-08	Activated	3,657
MED30	regulator transcription	9,70E-08		
PPARGC1A	regulator	1,94E-07		1,973

4.2.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Nachfolgend wurde auf eine fasertypspezifische Analyse verzichtet. Vielmehr zeigt Tabelle 21 exemplarisch die zehn signifikantesten Gene der Gegenüberstellung männlicher und weiblicher Muskelbiopsien. Die hoch signifikanten Ergebnisse sind sinnvoll, stellen sie doch fast ausschließlich Y-chromosomal kodierte Gene dar. Diese kodieren überwiegend für Varianten von an der Translation beteiligten Proteinen. EIF1AY und CYorf14 sind unter den „Top 10“ dabei doppelt detektiert, was sich auf unterschiedliche Gensonden (hier ‚*Illumina Identifier*‘) zurückführen lässt.

Tabelle 21: Die zehn signifikantesten Gene männlicher und weiblicher Muskeln im Vergleich

Symbol	Genbezeichnung	Illumina Identifier	p-Wert	Fold Change
<i>Geschlecht männlich vs weiblich</i>				
EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	ILMN_1755537	4,4422 5E-25	59,8801 749
RPS4Y1	ribosomal protein S4, Y-linked 1	ILMN_1783142	2,5366 1E-24	44,4042 7158
EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	ILMN_2228976	2,6143 5E-18	7,36228 3681
CYorf14	testis-specific transcript, Y-linked 14 (non-protein coding)	ILMN_2052438	3,7235 4E-12	5,21308 1911
RPS4Y2	ribosomal protein S4, Y-linked 2	ILMN_2191331	8,1690 4E-12	6,13946 2894
CYorf15A	taxilin gamma pseudogene, Y-linked	ILMN_1670821	1,2822 6E-11	3,13765 1385
CYorf14	testis-specific transcript, Y-linked 14 (non-protein coding)	ILMN_2052433	4,256 E-09	2,23060 6417
ZFY	zinc finger protein, Y-linked	ILMN_2090059	4,2741 3E-09	1,41040 593
ZRSR2	zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine rich 2	ILMN_1773868	1,3558 3E-08	- 1,66788 5448
SNRPN	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	ILMN_1656537	1,4479 8E-08	2,20531 8778

Wie auch bei der Analyse geschlechtsspezifischer Einzelgene sind bei den signifikantesten Signalwegen Gene mit Funktionen bei der Translation am deutlichsten differentiell reguliert. Es ergibt sich ein heterogenes Bild. Sowohl Gene mit Einfluss auf den Zellzyklus, als auch auf verschiedene Stoffwechselprozesse finden sich unter den „Top 10“. Die absolute Anzahl der differentiell regulierten Gene der einzelnen Signalwege ist dabei aber geringer als beispielsweise im Vergleich der Fasertypen

untereinander. Insbesondere die Untersuchungen der Fasern I vs IIa und I vs IIx zeigen deutlich höhere Signifikanzen als der Vergleich der geschlechtsspezifischen Genexpression.

Tabelle 22: Die zehn signifikantesten Signalwege männlicher und weiblicher Muskeln im Vergleich

Anerkannte Signalwege	p-Wert	Gene
IPA Top 10		↑/↓
<i>Geschlecht männlich vs weiblich</i>		
EIF2 Signaling	9,75E-08	38/36
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	7,94E-05	26/30
Mitochondrial Dysfunction	1,22E-03	36/18
Oxidative Phosphorylation	1,44E-03	26/9
mTOR Signaling	2,05E-03	33/30
Protein Ubiquitination Pathway	2,49E-03	44/40
Oxidative Ethanol Degradation III	4,42E-03	2/7
BMP signaling pathway	5,49E-03	17/12
Ethanol Degradation IV	5,74E-03	2/8
Glycolysis I	7,66E-03	7/5

4.2.1 Muskelspezifische Unterschiede

Mit sieben Vertretern stellt die Gruppe der Homöoboxgene die überwiegende Mehrheit der zehn signifikantesten Gene des Vergleiches von *M. biceps brachii* und *M. quadriceps femoris*. Dieser Gruppe von Genen wird eine Bedeutung im Rahmen der embryonalen Entwicklung zugesprochen. Die Expression spezifischer Homöobox- oder kurz Hoxgene legt hierbei die Ausbildung einzelner Gewebe auf der rostral-kaudalen Achse fest. Interessanterweise lässt sich somit auch anhand des Genexpressionsprofils adulten Skelettmuskels auf die Lokalisierung der Biopsieentnahme schließen.

Tabelle 23: Die zehn signifikantesten Gene der Biopsiemuskeln im Vergleich

Symbol	Genbezeichnung	Illumina Identifier	p-Wert	Fold Change
<i>m. biceps brachii vs m. quadriceps femoris</i>				
HOXC9	homeobox C9	ILMN_171 8898	1,60E- 13	2,897
HOXC6	homeobox C6	ILMN_179 4492	1,75E- 13	11,093
HOXC10	homeobox C10	ILMN_172 5899	1,72E- 12	2,297
HOXC4	homeobox C4	ILMN_171 9975	2,68E- 12	5,724
HOXC8	homeobox C8	ILMN_171 8285	2,96E- 12	2,682
MYLK4	myosin light chain kinase family, member 4	ILMN_167 3535	2,39E- 06	-2,534
HOXA5	homeobox A5	ILMN_175 3613	2,58E- 06	-2,091
ABLIM1	actin binding LIM protein 1	ILMN_178 5424	4,14E- 06	-2,215
HOXA9	homeobox A9	ILMN_173 9582	6,80E- 06	-1,586
CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	ILMN_165 6415	1,28E- 05	1,311

Beim Vergleich der zwischen M. biceps brachii und M. quadriceps femoris unterschiedlich regulierten Signalwege fallen die niedrigen p-Werte in Tabelle 24 auf. Zu den signifikantesten Signalwegen gehören „Mitochondrial Dysfunction“ und „Oxidative Phosphorylation“. Beide beinhalten überwiegend differentiell regulierte Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen. Der Signalweg „*Ephrin Receptor Signaling*“ spielt bei der embryonalen Entwicklung, sowie Zellmigration eine Rolle. Eine Steuerung durch die o.g. Homöoboxgene wird diskutiert (51).

Tabelle 24: Die zehn signifikantesten Signalwege der Biopsiemuskeln im Vergleich

Anerkannte Signalwege	p-Wert	Gene
IPA Top 10		↑/↓
<i>m. biceps brachii vs m. quadriceps femoris</i>		
Mitochondrial Dysfunction	2,94E-04	20/9
Ephrin Receptor Signaling	9,36E-04	13/18
Oxidative Phosphorylation	2,25E-03	14/4
UVB-Induced MAPK Signaling	5,47E-03	8/4
Virus Entry via Endocytic Pathways	6,87E-03	10/7
γ-glutamyl Cycle	9,39E-03	4/1
G Beta Gamma Signaling	1,37E-02	8/8
Salvage Pathways of Pyrimidine Ribonucleotides	1,85E-02	11/5
CNTF Signaling	1,92E-02	7/3
Ephrin A Signaling	1,92E-02	4/6

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Mit dieser Arbeit wurde erstmals ein Fasertyp-spezifischer Ansatz verfolgt, um humanen Skelettmuskel auf Ebene der Genexpression zu charakterisieren.

Die Auszählung der Muskelschnitte ergab ein sich mit der Literatur deckendes Ergebnis der Fasertypenverteilung.

Bei der Analyse der 22 gepoolten Muskelbiopsien ergaben sich nach Korrektur nach Benjamini & Hochberg zwischen den Fasertypen I und IIa 3187 differentiell regulierte Gene, zwischen den Fasertypen I und IIx 3234 und zwischen den Fasertypen IIa und IIx 1153. Als Fasertyp-spezifisch konnten insbesondere Gene des kontraktile Apparats, des Energiestoffwechsels, der Oxidative Stress – Response, von Reparaturmechanismen, sowie der Signalwege zur Fasertypendifferenzierung detektiert werden. Bei einigen Molekülen wurden Isoformen entdeckt, die bei bestimmten Fasertypen bevorzugt hochreguliert werden, beispielsweise Calcineurin, die AMP-Kinase oder Histon-Deacetylasen.

5.2 Diskussion Material und Methoden

5.2.1 Gewebeproben

Aufgrund o.g. Ausschlusskriterien und der vorangegangenen Abklärung durch das Friedrich-Baur-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München konnten strukturelle Muskelerkrankungen bei den eingeschlossenen Probanden ausgeschlossen werden. Die in unsere Arbeit einbezogenen Proben erfüllten unsere sämtlichen Bedingungen gesunden Skelettmuskelgewebes. Gerade bei Biopsien von Patienten höheren Lebensalters lässt sich allerdings eine neurogene Inaktivitätsatrophie anhand dieser Kriterien nicht komplett ausschließen.

Der große Vorteil unserer Studie ist der Fasertyp-spezifische Ansatz mit humanem Skelettmuskelgewebe. Während in vergleichbaren Studien oft nur Transkriptomanalysen aus Skelettmuskelhomogenat oder gar anderer Spezies

durchgeführt wurden (52–55) wird unser Versuchsaufbau dem heterogenen humanen Skelettmuskel gerecht. Abzuwarten bleibt, inwiefern sich Muskelfasern des gleichen Typs in verschiedenen Muskeln unterscheiden. Der Vergleich der Biopsiemuskeln M. biceps brachii und M. quadriceps femoris ergab nur geringe Unterschiede in Bezug auf die Genexpression.

5.2.2 Myosinfärbung

Die von uns etablierte Myosinantikörperfärbung setzte sich aus zwei Färbeschritten zusammen. In einem ersten Schritt wurden Typ IIa Fasern mit einem Alkalische Phosphatase-Kit rot gefärbt, später Typ I Fasern mit Diaminobenzidin braun. Mit Hilfe dieser Färbung konnten die Fasern auf sukzessiven Schnitten eindeutig den Fasertypen zugeordnet werden. Im Vergleich mit Einfachfärbungen der MYHC-Isoformen konnte die Selektion der gewünschten Faser mit dem LMD-Mikroskop erheblich beschleunigt werden. Die manuelle Auszählung der Fasern wurde ebenfalls vereinfacht und konnte anhand einer einzigen Übersichtsaufnahme durchgeführt werden.

Bei der bisher gängigen Färbemethode wurden pH-metrisch die ATPase-Eigenschaften der verschiedenen Fasertypen zur histochemischen Differenzierung benutzt. Diese komplizierte Färbemethode sei jedoch nicht nur sehr fehleranfällig, vielmehr sei neben einem progredienten Verblässen der Färbung das unspezifische Anfärben von Kapillaren ein zentrales Problem (45).

5.2.3 Lasermikrodissektion

Durch die Lasermikrodissektion wurde unser fasertypspezifischer Ansatz erst ermöglicht. Durch kein anderes Verfahren lassen sich ähnlich präzise Muskelfasern aus einem Gewebsschnitt lösen. Anhand gefärbter vorangehender oder nachfolgender Schnitte war die Identifizierung der Faser in der Regel eindeutig möglich. Nachteilig stellte sich der vergleichsweise hohe zeitliche Aufwand zur Gewinnung der 100 Fasern jedes Fasertyps dar, sowie der Verlust von ca. 30% der ‚ausgeschnittenen‘ Faserquerschnitte; diese waren nicht im Auffanggefäß zu finden.

5.2.4 Microarray Genomanalyse

Mittels Microarray lässt sich eine große Anzahl an Genen simultan bezüglich ihrer Expression untersuchen. Während beispielsweise bei der RT-PCR für jedes Gen spezielle Primer zugefügt werden müssen, können Microarray-Genomanalysen den Großteil des humanen Genoms zeitgleich untersuchen. Als nur semiquantitatives Verfahren kann es allerdings nur eingeschränkt Aussagen über genaue Relationen treffen.

5.3 Diskussion Ergebnisse

5.3.1 Fasertypenverteilung

Unsere Auswertung der Fasertypenverteilung ergab Werte, die sich weitgehend mit der vorhandenen Literatur decken. Allerdings wurden Typ II Fasern in morphologischen Studien der 1970er und 1980er Jahre noch nicht in schnell oxidative (Typ IIa) und schnell glykolytische Fasern (Typ IIx) unterteilt, weshalb genauere Vergleiche hier nicht möglich sind.

Während Essén-Gustavsson et. al. (56), Larsson et. al. (57) und Lexell et. al. (58) auf Anteile der Typ I Fasern zwischen 40 und 60 Prozent kamen, ergaben sich in unserer Untersuchung im Schnitt 41% Typ I Fasern, womit sich unsere Ergebnisse im unteren Bereich einreihen.

Ebenso waren deutliche interindividuelle Unterschiede der Fasertypenverteilung bei unseren Biopsien vorhanden. Simoneau et. al. (25) fanden bei ihren Patienten heraus, dass ein Viertel der untersuchten Muskelproben des M. quadriceps femoris über 65% oder unter 35% Typ I Fasern enthielten. Bei unseren M. quadriceps femoris Biopsien waren vier der zwölf untersuchten Muskeln außerhalb dieser Werte – alle unter 35%. Überraschenderweise unterschieden sich die Mittelwerte der Fasertypenverteilung zwischen M. biceps brachii und M. quadriceps femoris bei den von uns untersuchten Muskeln nicht signifikant. Lediglich die Standardabweichungen der Typ I Fasern des M. quadriceps femoris und der Typ IIa Fasern des M. biceps brachii waren jeweils etwas höher im Vergleich zum anderen Muskel. Aufgrund fehlender Literatur zur Verteilung der Muskelfasern im m. biceps brachii ist hier kein Vergleich möglich.

Im Vergleich der Fasertypenverteilung zwischen Biopsien männlicher und weiblicher Patienten konnte aufgrund der zu geringen Fallzahl ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Tendenziell lässt sich bezüglich des M. biceps brachii ein höherer Anteil der Typ I Fasern bei Männern vermuten, während beim M. quadriceps femoris dieser bei Frauen erhöht scheint. Aufgrund der hohen Standardabweichung bleibt unsere Analyse dieses Ergebnis jedoch schuldig. Weitere Studien müssten mit entsprechenden Fallzahlen belegen, inwiefern muskelspezifische intersexuelle Unterschiede in der Fasertypenverteilung bestehen. Essén-Gustavsson et. al. konnten bei ca. 30 Probanden pro Geschlecht allerdings ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Fasertypenverteilung feststellen (56).

Zusammenfassend bleibt anzumerken, dass sich heutige Annahmen überwiegend auf Untersuchungen des m. quadriceps femoris stützen, wobei meist nur männliche Probanden untersucht wurden. Um aussagekräftige Ergebnisse zur geschlechtsspezifischen Muskelphysiologie zu erhalten, wäre eine genaue Kenntnis der Faserverteilung im jeweiligen Muskel aber hilfreich.

Unsere Ergebnisse belegen jedoch, dass bezüglich der Faserverteilung interindividuell deutlich größere Unterschiede vorliegen, als zwischen Muskeln verschiedener Geschlechter.

5.3.2 Microarray Genomanalyse

Mit jeweils 3187 (Fasertypen I-IIa), 3234 (Fasertypen I-IIx), und 1153 (Fasertypen IIa-IIx) differentiell regulierten Genen (stringent nach Benjamini & Hochberg korrigiert) ergaben sich bedeutende Unterschiede des Transkriptoms der einzelnen Skelettmuskelfasertypen. Von besonderem Interesse sind die Ergebnisse bezüglich der Signalwege zur Fasertypendifferenzierung, sowie der antioxidativen Enzyme und Indikatoren von oxidativem Stress.

5.3.2.1 Kontraktiler Apparat

Erwartungsgemäß ergaben sich deutliche Unterschiede bezüglich der für Proteine des kontraktilen Apparates kodierenden Gene. Neben den geläufigen MYHC-Varianten 1, 2 und 7 fanden sich mit Myh10 und Myh14 aber auch ‚non-muscle myosine‘ unter den

in Typ I Fasern vermehrt exprimierten Genen. Als Funktion dieser Gene wird eine zentrale Rolle im Bereich der Zelladhäsion und –migration angenommen (59). Eine Fasertyp-spezifische Expression im Muskel wurde bisher noch nicht diskutiert.

Neben den Genen für die schwere Kette des Myosins ergaben sich auch deutliche Unterschiede bei *Troponin* und *Tropomyosin*. Insbesondere beansprucht aber auch die leichte Kette des Myosins die Aufmerksamkeit, hier zeigte sich der deutlichste Unterschied zwischen den Typ II Fasern. Myl5 ergab eine deutlich höhere Expression zu Gunsten der Typ II Fasern.

5.3.2.2 Energiestoffwechsel

Erwartungsgemäß ergaben sich bezüglich der Gene der wichtigsten Enzyme der Glycolyse keine Überraschungen. Die höchste Expression zeigte sich bei Typ II Fasern, die niedrigste bei Typ I Fasern.

Ebenso verhielt es sich bei den Genen der β -Oxidation. Die Ausnahme bildete das Gen der ‚*long chain family 4*‘ der Acyl-CoA Synthetase, das als Gen eines Isoenzym in den schnelleren Fasertypen höher exprimiert war.

Die Gene der Atmungskette zeigten die deutlichsten Expressionsunterschiede bei den Komplexen I und IV. Auch hier war die stärkste Expression erwartungsgemäß bei Typ I Fasern zu sehen, während Typ II Fasern die schwächste Expression zeigten. Wie auch die Ergebnisse zu Genen des kontraktiven Apparats sind diese auch als weitere Validierung unseres Versuchssettings zu sehen.

5.3.2.3 Oxidative Stress Response und Antioxidantien

1956 stellte Denham Harman seine Theorie der freien Radikale vor (60). Er konstatierte die intrazelluläre Entstehung freier Radikale durch oxidative Enzyme, während er Spurenelemente im Extrazellulärraum als hauptverantwortlich für die Entstehung der freien Radikale befand. Aufgrund ihres oxidativen Potentials komme es zur Schädigung wichtiger Zellbestandteile und dadurch im weiteren Verlauf zur Alterung des jeweiligen Gewebes und degenerativen Erkrankungen.

Im Speziellen kommt es durch freie Radikale unter anderem zur Oxidation von Proteinen, Lipiden DNA, RNA, Doppelstrangbrüchen der DNA, und in der Folge

außerdem zur Schädigung beispielsweise einzelner Zellorganellen, der Zellmembranen und zur Entkopplung wichtiger Stoffwechselprozesse (61).

Aufgrund fehlender protektiver Resultate von Antioxidantien änderte Harman seine Theorie 1972 und identifizierte das Mitochondrium als wichtigste Quelle und gleichzeitig wichtigstes Ziel freier Radikale (62).

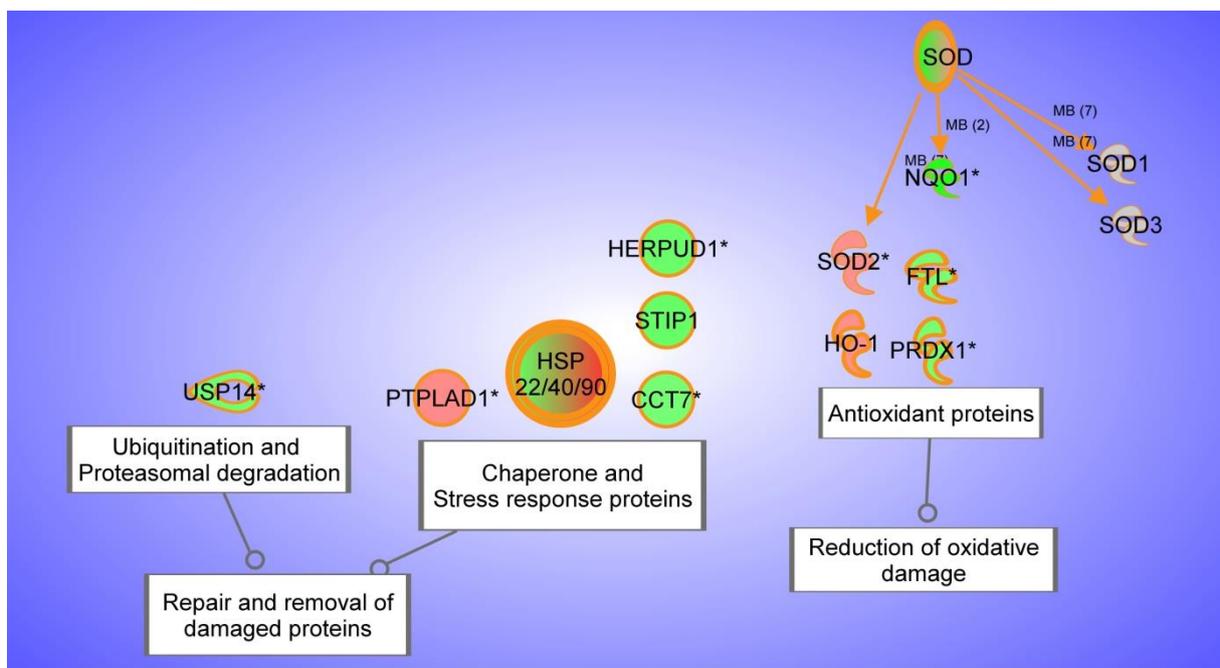
Durch die Kompartimentierung entstehen vergleichsweise hohe Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies innerhalb des Mitochondriums. Insbesondere bei Schädigung der mtDNA kann es zur verminderten Expression der für bestimmte Atmungskettenkomplexe kodierenden Gene kommen (5) (siehe auch 3.3.2, Verhältnis nukleär und mitochondrial kodierter Komplexe).

Dem Körper stehen zur Bewältigung des oxidativen Stresses eine ganze Reihe verschiedener Reparatursysteme und antioxidative Mechanismen zur Verfügung. Die wichtigsten Vertreter antioxidativer Enzyme stellen Superoxiddismutase und Glutathion in Verbindung mit Glutathionreduktase und γ -peroxidase dar (63,64).

Schäden der DNA, von Lipiden und Proteinen können begrenzt mit Hilfe von Reparaturmechanismen diverser Enzyme, durch Re-Synthese und normalem Umsatz der betroffenen Elemente behoben werden (61,65–67).

Neben erwartungsgemäß differentiell regulierten Signalwegen zu Zellskelett und Energiestoffwechsel, konnten diverse Gene identifiziert werden, welche in Zusammenhang mit oxidativem Stress von einzelnen Muskelfasertypen unterschiedlich stark exprimiert werden. Bei den durch oxidativen Stress aktivierten Genen traten im Besonderen HERPUD1 (*homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1*) und STIP1 (*stress-induced-phosphoprotein 1*) hervor. Am stärksten in Typ II Fasern insbesondere gegenüber Typ I Fasern exprimiert, lässt dies am ehesten auf höhere oxidative Belastung der Typ II Fasern schließen. Da aber in Typ I Fasern ungleich mehr oxidativer Stoffwechsel stattfindet, wären bessere antioxidative Mechanismen der Typ I Fasern eine plausible Erklärung. In der Tat zeigt sich eine deutliche differentielle Regulierung der verschiedenen Hitzeschockproteine und antioxidativen Enzyme. Die größten Unterschiede liegen bei den Hitzeschockproteinen vor, insbesondere die Typen HSPB3, HSPB6 und HSPB7 waren in Typ I Fasern am höchsten exprimiert, während HSPB1 und HSPB8 in Typ II Fasern höher exprimiert waren.

Die mitochondriale Superoxiddismutase (SOD2) war entsprechend der höheren mitochondrialen Dichte in Typ I Fasern auch in selbigen höher exprimiert. Die Glutathionreduktase hingegen zeigte in Typ II Fasern die stärkste Expression. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, es könnte ein Zusammenhang zwischen besseren antioxidativen Mechanismen der Typ I Fasern und dem relativen Anstieg der Typ I Fasern im Alter bestehen. Dementsprechend wäre der relative Anstieg der Typ I Fasern im Alter nicht ausschließlich auf einen Fasertypenwechsel zurückzuführen, sondern vielmehr auf einen übermäßigen Zelluntergang der Typ II Fasern aufgrund schlechterer antioxidativer Kapazität. Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit Daten auf Proteomebene könnte hier wertvolle Schlüsse liefern. Leider sind fasertypspezifische Ergebnisse (in humanem Gewebe) hier nach bestem Wissen des Autors noch nicht vorhanden (68).



© 2000-2012 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abbildung 5-1: Differentielle Regulation von Genen im Zusammenhang mit oxidativem Stress der Fasertypen I und IIa

In Fasertyp I höher regulierte Gene sind rot markiert, in Fasertyp IIa höher regulierte Gene grün. Liegen unterschiedlich regulierte Untereinheiten vor ergibt sich ein Mischbild der Farben

5.3.2.4 Regulierung der Fasertypdifferenzierung

Während die nachfolgend besprochenen Gene vor allem in myogenen Stammzellen wie Satellitenzellen eine wichtige Rolle spielen, werden sie auch im Zusammenhang mit der relativen Zunahme der Typ I Fasern im Alter diskutiert. Bisher ist noch nicht abschließend geklärt, ob diese Zunahme alleine dem längeren Überleben der Typ I Fasern geschuldet ist (Mögliche Mechanismen siehe 5.3.2.3), oder ob ein Wechsel von Typ II zu Typ I Fasern während des physiologischen Alterns auch in größerem Umfang erfolgt. Aus diesem Grund ist eine fasertypspezifische Expression dieser Signalwege von ausgesprochenem großem Interesse.

Calmodulin bindet Calcium und fungiert in Muskelfasern als Calciumsensor. Der Calcium-Calmodulinkomplex reguliert unterschiedliche weitere Faktoren, darunter Calcineurin und CaMKII. Calmodulin war überraschenderweise in Typ II Fasern höher reguliert, ebenso Gene der CaMKII, einer Isoform von NFAT, sowie MYOD1.

Der Calcineurin-NFAT-Signalweg (NFAT = *nuclear factor of activated t-cells*) wurde schon mehrfach mit Transdifferenzierung zu langsameren Fasertypen in Verbindung gebracht und in vivo mittels loss-of-function Versuchen validiert (69–72). Unklar ist, ob dieser Signalweg unter bestimmten Umständen auch die Differenzierung zu Typ IIa Fasern begünstigt. Allen et al. konnten durch Transfektion mit Calcineurin- sowie NFAT-Plasmiden die Aktivität des IIa Promoter steigern (73). Calabria et al. brachten verschiedene NFAT-Isoformen-Kombinationen mit der Transkription verschiedener MYHCs in Zusammenhang. In Typ I Fasern sind laut Calabria et al. Im Gegensatz zu Typ II Fasern alle vier NFAT-Isoformen vorhanden (74). Calcineurin hat eine sehr hohe Affinität zum Calcium-Calmodulinkomplex und wird deshalb schon bei niedrigen Calciumspiegeln, die vor allem bei slow-muscle-Aktivität auftreten, aktiviert. Bei höheren Calciumspiegeln wird auch die CaMKII aktiviert. Ob CaMKII nur für belastungsinduzierte Hypertrophie (75), oder auch für die Fasertypenregulation eine Rolle spielt ist noch ungeklärt. Ebenso, ob nur die maximalen Calciumkonzentrationen oder auch der zeitliche Verlauf für die Aktivierung von Calcineurin und CaMKII ausschlaggebend sind, wie Gundersen et al. es vorschlagen (44).

MEF2 zeigte sich nur in der Variante A differentiell reguliert, ebenfalls zu Gunsten der Typ II Fasern. Die *Myocyte Enhancer factor 2* (MEF2) Transkriptionsfaktoren sind ein weiteres direktes Ziel von Calcineurin. Während die unmittelbaren Effekte von MEF2

auf die fasertypspezifische Troponinexpression mittlerweile stark bezweifelt werden (44), wird angenommen, dass MEF2 über andere Transkriptionsfaktoren Einfluss auf bestimmte Eigenschaften der Muskelfasertypen hat. Es konnte gezeigt werden, dass MEF2 den Promoter von Myogenin transaktiviert (47,76), einem wichtigen Molekül für die Induktion von Faktoren des oxidativen Stoffwechsels.

Die katalytische Untereinheit von Calcineurin zeigte hingegen ein heterogenes Bild, die alpha- und beta-Isoenzyme waren in den Typ I Fasern am schwächsten exprimiert, die gamma-Isoform hingegen am stärksten.

Wie schon oben erwähnt ist der Calciumspiegel nicht die einzige Quelle für Signale zur Transdifferenzierung. Die AMP-Kinase (AMPK) beispielsweise reagiert auf hohe AMP-Spiegel und somit auf ein ‚Energiedefizit‘, wie es bei persistierender Belastung auftritt (77).

Bezüglich der AMPK wurden einzelne Untereinheiten von verschiedenen Fasertypen bevorzugt transkribiert. PRKAG1 war in Typ I Fasern höher exprimiert, PRKAG3 hingegen in Typ II Fasern.

Wahrscheinlich vermittelt AMPK einen Wechsel der MYHCs zu Gunsten der Typ I Fasern (78), die Wirkungen auf den oxidativen Stoffwechsel sind umstritten. Möglicherweise werden diese über PGC-1 α vermittelt (76), dem entscheidenden Regulator für Stoffwechsellenzyme, insbesondere des oxidativen Stoffwechsels. PGC-1 α ist eine wichtige Schnittstelle vieler Signalwege, so regulieren auch Calcineurin und CaMK die Expression (79). PGC-1 α selbst ist kein Transkriptionsfaktor, steuert aber als Koaktivator verschiedenste Moleküle, wie zum Beispiel NRF1 (80) und NRF2 (81). Neben Calciumspiegel-abhängigen Transkriptionsfaktoren wie MEF2, hat PGC-1 α auch direkt einen bedeutenden Einfluss auf den Calciumhaushalt der Muskelfasern (80). Ursprünglich wurde PGC-1 α als Koaktivator von PPAR γ in braunem Fettgewebe beschrieben (82), im Muskel allerdings ist PPAR δ das wichtigere und höher exprimierte Ziel.

Aus der Gruppe der *bHLH* (basic Helix Loop Helix) Transkriptionsfaktoren sind vor allem MYOD und Myogenin hervorzuheben. Während der embryonalen Entwicklung ist MYOD für die spezifische Myogenese zuständig, Myogenin signalisiert die weitere Entwicklung der Myoblasten in Myotubes (50,83). Beide binden ein spezielles Promotorelement, die sogenannte ‚E-box‘. Welche Rolle MYOD und Myogenin in adultem Muskel bei Belastung spielen ist noch unklar, Evidenz liegt bisher lediglich für den Einfluss der Schilddrüsenhormone und der Innervation vor (84). Drei mögliche

Mechanismen werden diskutiert, wie MYOD zumindest die MYHC-Expression zu Gunsten schnellerer Isoformen beeinflussen könnte: 1.) direkt als Transkriptionsfaktor für Typ II MYHCs, 2.) durch Chromatinstrukturveränderung, 3.) indirekt als Transkriptionsfaktor für dritte Moleküle (44). Im Gegensatz zu MYOD kommt Myogenin vor allem in Typ I Muskelfasern vor. Myogenin scheint keinen direkten Einfluss auf die Filamente des kontraktilen Apparats zu haben, steigert aber die Expression oxidativer Enzyme der Mitochondrien. Außerdem verkleinert sich die Muskelfaser unter Myogenineinfluss, was ein weiterer Hinweis auf die vorwiegende Expression in langsamen Muskelfasern sein könnte (85). Myogenin und NRF1 zeigten in unserer Untersuchung keine signifikanten Unterschiede in ihrer Expression. In der Gruppe der „Upstream-Regulatoren“ wird jedoch eine stärkere Aktivierung für MYOD1 in Typ IIa Fasern gegenüber Typ I Fasern angenommen, ebenso nehmen wir eine vermehrte Aktivität von PGC-1 α in Typ I und IIa Fasern gegenüber IIx Fasern an.

Der Lipidsensor PPAR δ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor, Isoform δ*), als die im Skelettmuskel wichtigste Isoform, war nicht differentiell reguliert, PPAR α zeigte sich aber in Typ I Fasern höher exprimiert. PPARs sind Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, als Liganden fungieren freie Fettsäuren. Nach Belastung ist PPAR δ höher exprimiert (86), eventuell können Effekte, wie der Wechsel der fasertypspezifischen kontraktilen und metabolischen Proteine, auch allein durch Ernährung induziert werden (87). Zur Zusammenfassung der wichtigsten Signalwege siehe *Abbildung 5-2*.

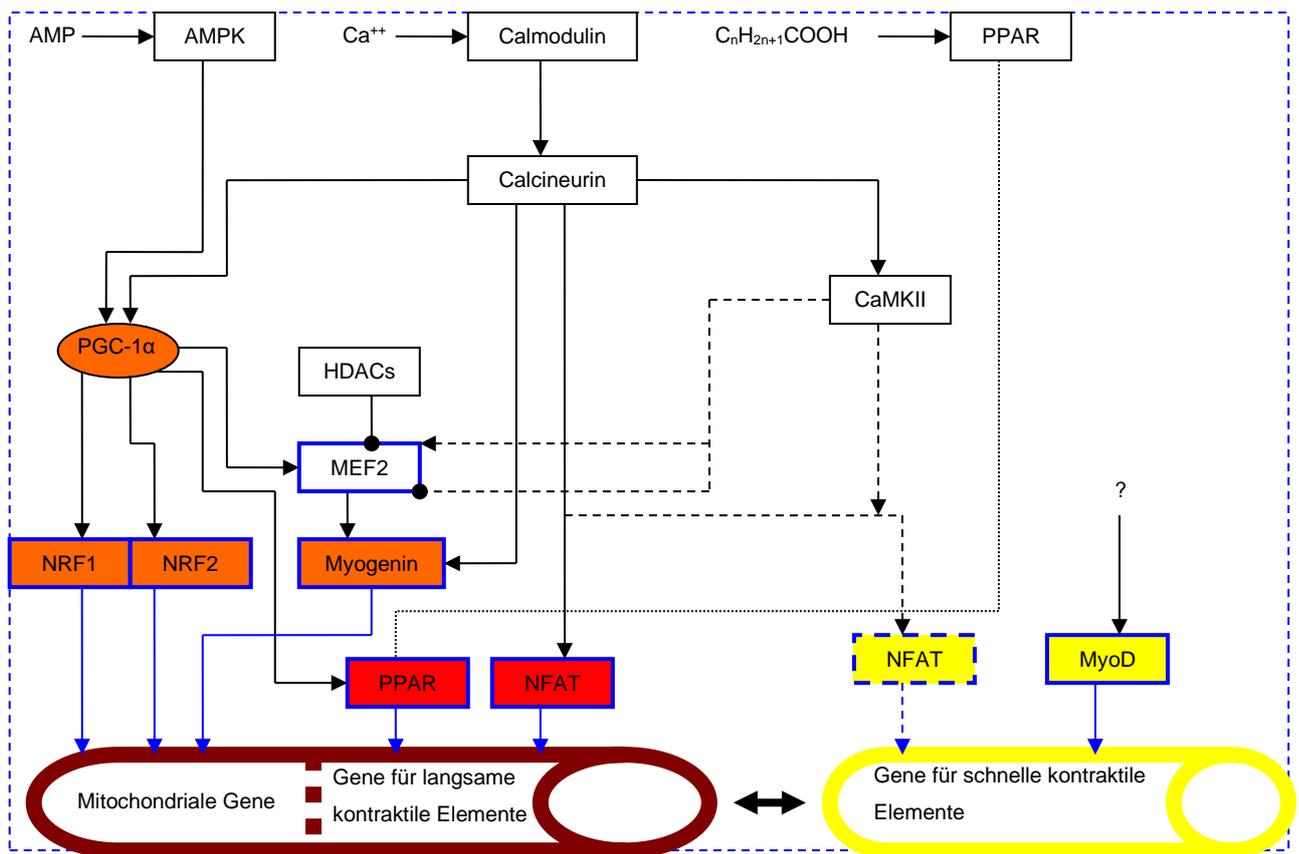


Abbildung 5-2: Vereinfachte Darstellung möglicher Signalwege der Fasertypenregulierung

Zu Abbildung 5-2: AMPK, Calmodulin und PPAR fungieren als Sensoren für Energiemangel, Calciumspiegel und Lipidangebot. Hypothetische Signalwege werden nur gestrichelt dargestellt. Transkriptionsfaktoren und –regulatoren sind farbig mitochondrialen Genen und zweier Gruppen kontraktile Elemente zugeordnet: orange mitochondrial, rot langsam kontraktile, gelb schnell kontraktile

Histoneacetyltransferasen (HDACs) der Klasse IIa spielen im Muskel ebenfalls eine Rolle. Ihre Funktion beschränkt sich nicht auf die Chromatinstruktur (Wirkungen auf die Chromatinstruktur erzielen vielleicht sogar nur Klasse I HDACs (88)), sie regulieren auch viele Transkriptionsfaktoren. HDACs sind in den einzelnen Muskelfasertypen differentiell exprimiert, jedoch steht die stärkere Expression in langsamen Muskelfasern niedrigeren Proteinlevels gegenüber; es wird ein selektiver Abbau in Typ I Muskelfasern über das Ubiquitin/Proteasom-System angenommen (89). Mögliche Ziele der HDACs um die schnellen Eigenschaften einer Muskelfaser zu erhalten sind Transkriptionsfaktoren der MEF2-Gruppe (38,44).

Unter den Histondeacetylasen konnten zwei spezielle Formen identifiziert werden, die fasertypspezifisch reguliert sind. HDAC5 war in Typ I Fasern deutlich stärker exprimiert, während HDAC7 in Typ IIa Fasern die höchste Expression zeigte.

Auch bei der gesonderten Betrachtung aktivierter Transkriptionsregulatoren („*Upstream-regulators*“) waren viele Gene mit Einfluss auf die Fasertypendifferenzierung, wie PGC-1 α zu finden. Diese Ergebnisse basieren nicht auf tatsächlich gemessenen Werten, stattdessen werden anhand der Expression assoziierter Gene Rückschlüsse auf die Aktivierung bestimmter Transkriptionsregulatoren gezogen. Für generell sehr niedrig exprimierte Gene kann somit eine gute Schätzung ermöglicht werden.

In der Gesamtschau deuten diese Ergebnisse durchaus auf eine mögliche Aktivierung von Signalwegen zur Transdifferenzierung. Um relevante Ergebnisse zu einem direkten Fasertypenwechsel im Alter zu erhalten, müsste fasertypspezifisch ein größeres Patientenkollektiv älterer Menschen mit einer jungen Kontrollgruppe verglichen werden. Um die Schwierigkeiten im Zusammenhang mit dem hohen Zeitaufwand für relativ geringe RNA-Mengen zu umgehen, könnten Myozytenkulturen, die bereits Merkmale eines einzelnen Fasertyps aufweisen, hormonell zur Transdifferenzierung angeregt werden. In einer anschließenden Genexpressionsanalyse zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Stimulation ließen sich noch präzisere Ergebnisse zur Induktion der Transdifferenzierung gewinnen.

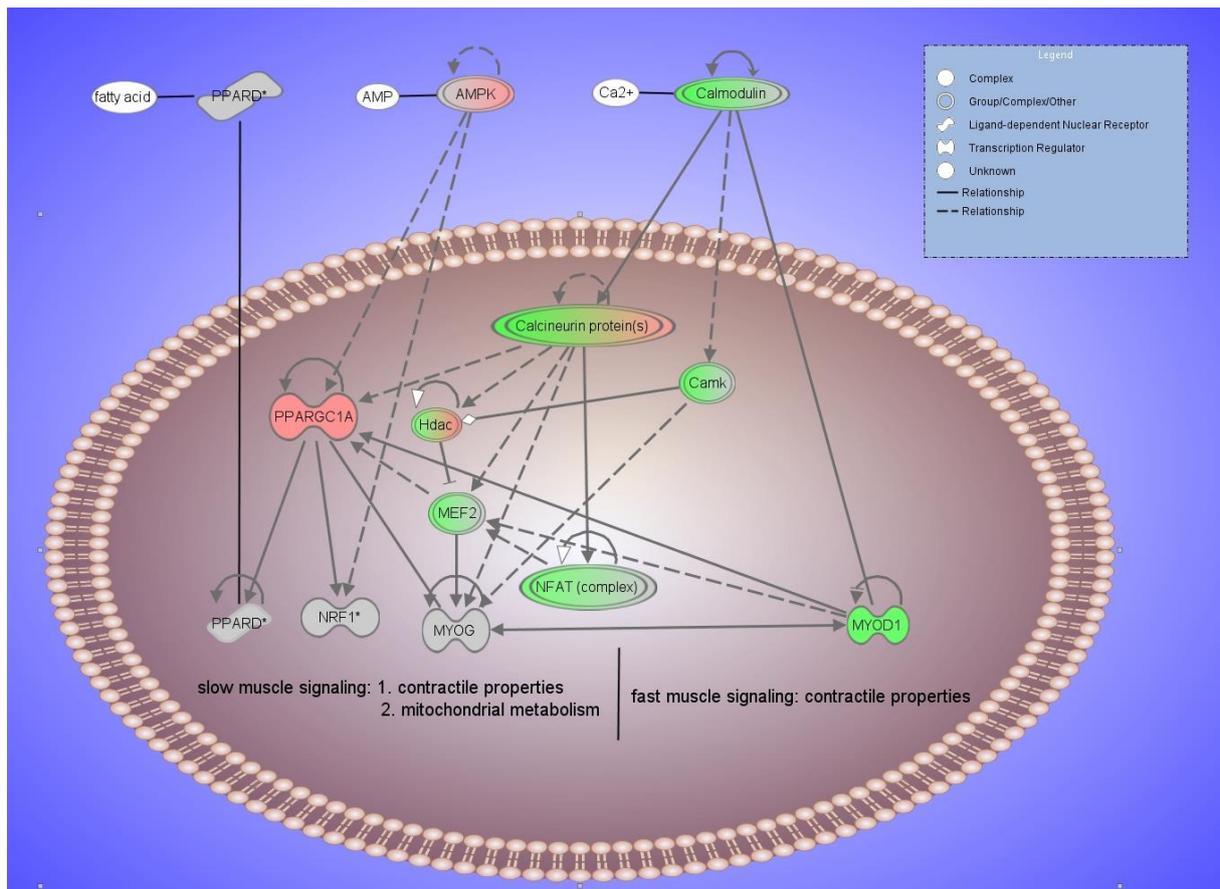


Abbildung 5-3: Signalweg zur Regulierung der Fasertypendifferenzierung – Untersuchung Fasertypen I versus IIx

In Fasertyp I höher regulierte Gene sind rot markiert, in Fasertyp IIx höher regulierte Gene grün. Liegen unterschiedlich regulierte Untereinheiten vor, ergibt sich ein Mischbild der Farben

5.3.2.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Beim Vergleich der Genexpression von Muskelbiopsien männlicher und weiblicher Spender ergaben sich deutlich weniger signifikante Unterschiede als beim Vergleich der einzelnen Muskelfasertypen. Die meisten differentiell regulierten Gene sind y-chromosomal kodiert. Wir konnten verschiedene dieser Gene ermitteln, die unmittelbar am Aufbau der Ribosomen beteiligt sind. Mittels ‚Proteomics‘ ließe sich überprüfen, inwiefern sich der Aufbau der Ribosomen phänotypisch unterscheidet.

Zu den ebenfalls hochsignifikant exprimierten Genen gehören ZFY und ZRSR2, kodierend für Y-chromosomal, beziehungsweise X-chromosomal kodierte

Zinkfingerproteine. Für welche Prozesse diese als Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, ist insbesondere bei ZFY nicht abschließend bekannt.

Unter den nicht gonosomal kodierten differentiell regulierten Genen finden sich SNRPN (*„small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N“*) und SNURF (*„SNRPN reading frame“*). Die Funktion der kodierten nukleären ribosomalen Proteine ist ebenfalls nicht abschließend geklärt. Ob nukleäre Translation in signifikantem Ausmaß Effekte hat ist bisher kontrovers diskutiert, Reid et. al schlagen drei Hauptpunkte vor, bei welchen eine Beteiligung möglich erscheint (90):

- Proteinsynthese
- Qualitätskontrolle durch Initiation von „non mediated decay“ von Genen mit verfrühten Stop Codons
- Unspezifische Enzymaktivität

Sollten SNRPN oder SNURF die Rolle der o.g. Qualitätskontrolle besitzen, könnten geschlechtsspezifische Unterschiede im Bereich der Zellerhaltung daraus resultieren. Generell gelten für Frauen und Männer unterschiedliche Risikofaktoren für Sarkopenie. Tay et al. untersuchten Risikofaktoren für Sarkopenie im Alter und konnten neben Mangelernährung (für Frauen deutlich erhöhtes relatives Risiko) und hoher Triglyceridwerte (deutlich erhöhtes Risiko für Sarkopenie bei Männern) verschiedene weitere biochemische Parameter identifizieren, die geschlechtsspezifisch das Risiko für Sarkopenie erhöhten (91).

5.3.2.6 Muskelspezifische Unterschiede

Die untersuchten Muskelgruppen M. biceps brachii und M. quadriceps femoris weisen eher Unterschiede in Bezug auf ihre Fasertypanteile auf, als auf Transkriptomebene. Interessanterweise findet man im Vergleich der RNA verschiedene Muskeln differentiell regulierte embryonale Gene. Homöoboxgene legen im Rahmen der embryonalen Entwicklung die Lokalisation auf der rostral-kaudalen Achse fest. Diese Informationen sind auch im adulten Alter noch im Transkriptom nachweisbar. Möglicherweise kann diese Information zukünftig in der Rechtsmedizin bei der Zuordnung verschiedener Gewebe nützlich sein.

Auf Ebene der Signalwege zeigt sich „*ephrin receptor signaling*“ differentiell reguliert. Dieser Signalweg spielt ebenfalls im Rahmen der embryonalen Entwicklung sowie Zellmigration eine Rolle.

5.3.2.7 Zusammenfassung

Die fasertypspezifische Genexpression zeigt sich auf unterschiedlichsten Ebenen deutlich differentiell reguliert. Die überwiegende Mehrheit der Gene sind biologisch sinnvoll den Bereichen Zellskelett und Energiestoffwechsel zuzuordnen.

Bezüglich des Fasertypenwechsels im Alter zeigt unsere Untersuchung allerdings, dass neben der möglichen Transdifferenzierung einzelner Fasertypen v.a. der größere absolute Verlust von Typ II Fasern gegenüber Typ I Fasern für den relativen Anstieg der Typ I Fasern verantwortlich sein könnte. Typ I Fasern sind zwar größerem oxidativem Stress ausgesetzt, unsere Transkriptomanalyse lässt jedoch auch auf bessere antioxidative Mechanismen schließen.

Im Bereich der wahrscheinlich für die Fasertypentwicklung direkt verantwortlichen Gene kann unsere Studie keine eindeutigen Ergebnisse präsentieren. Zwar zeigten sich beispielsweise Histondeacetylasen oder Calcineurinisoformen differentiell exprimiert, um eine abschließende Aussage darüber treffen zu können müssten in einer weiteren Studie ausschließlich in der Transdifferenzierung begriffene Muskelfasern untersucht werden. Ein möglicher Ansatz wäre die hormonelle in-vitro-Stimulation von Myozytenkulturen, die bereits Kennzeichen eines bestimmten Fasertyps tragen. Anschließend müsste erneut das Genexpressionsprofil bestimmt werden.

Der Vergleich der Genregulation weiblicher und männlicher Biopsien ergab nur geringe Unterschiede, vor allem gonosomal kodierte, ribosomale Gene zeigten unterschiedliche Expressionen.

Ähnlich erging es beim Vergleich von m. biceps brachii und m. quadriceps femoris, allerdings ließ die Microarrayanalyse des Transkriptoms adulter Muskeln mittels Homöoboxgenen Rückschlüsse auf die Lokalisation der Biopsieentnahme zu.

Als Arbeit aus dem Bereich der Grundlagenforschung soll und kann unsere Studie keine Therapieempfehlungen für die Sarkopenie geben. Nichtsdestotrotz soll hier erneut die Brücke zur Einleitung geschlagen werden, da in Kapitel 1.3.3 Mechanische Belastung (30), Innervation (31) und Hormonspiegel (32) als wichtigste

Einflussfaktoren für Stoffwechsel und Zellskelett genannt wurden. Findet eine kontinuierliche Stimulation statt, beispielsweise durch Krafttraining, mag der Trainingseffekt bei Älteren zwar geringer sein, wirkt der Sarkopenie aber dennoch deutlich entgegen (92,93). Dieser Effekt lässt sich durch eine angemessene Ernährung verstärken. Neben des Ausgleichs nutritiver Mangelerscheinungen vieler älterer Menschen (94) wirkt die anabole Wirkung einer angepassten Ernährung ebenso der Sarkopenie entgegen (54).

6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
AMPK	Adenosinmonophosphat-Kinase
bHLH	Basic Helix Loop Helix, Gruppe von Transkriptionsaktivatoren, u.a. MYOD1 und Myogenin
CAMK	Calmodulin-abhängige Kinase
COX	Cytochrom C Oxidase
HDAC	Histondeacetylase
HERPUD1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1,
IPA	Ingenuity Pathway Analysis – Signalweg- und Netzwerkanalyseprogramm der Firma Qiagen
M.	Musculus
MEF2	Myocyte Enhancer Factor 2
MYHC	Myosine Heavy Chain / schwere Kette des Myosins, meist in Kombination mit der Nummer einer Isoform
MYLC1	Myosine Light Chain / leichte Kette des Myosins, essentielle Untereinheit
MYLC2	Myosine Light Chain / leichte Kette des Myosins, regulatorische Untereinheit
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-Cells
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor</i>
PRKAG1 / PRKAG3	Untereinheiten der AMP-Kinase
SDH	Succinatdehydrogenase

SNRPN	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N
SNURF	SNRPN reading frame´
SOD	Superoxiddismutase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STIP1	stress-induced-phosphoprotein 1

7 Literaturverzeichnis

1. Morley JE, Anker SD, von Haehling S. Prevalence, incidence, and clinical impact of sarcopenia: facts, numbers, and epidemiology—update 2014. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2014 Dec;5(4):253–9.
2. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*. 2010 Jan 7;39(4):412–23.
3. Dodds RM, Roberts HC, Cooper C, Sayer AA. The epidemiology of sarcopenia. *J Clin Densitom*. 2015 Oct;18(4):461–6.
4. Janssen I. The epidemiology of sarcopenia. *Clin Geriatr Med*. 2011 Aug;27(3):355–63.
5. Abellan van Kan G. Epidemiology and consequences of sarcopenia. *J Nutr Health Aging*. 2009 Oct;13(8):708–12.
6. Dupuy C, Lauwers-Cances V, Guyonnet S, Gentil C, Abellan Van Kan G, Beauchet O, et al. Searching for a relevant definition of sarcopenia: results from the cross-sectional EPIDOS study. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2015 Jun;6(2):144–54.
7. He H, Liu Y, Tian Q, Papasian CJ, Hu T, Deng H-W. Relationship of sarcopenia and body composition with osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2016 Feb;27(2):473–82.
8. Hanson J, Huxley HE. Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature*. 1953 Sep 19;172(4377):530–2.
9. Huxley AF, Niedergerke R. Measurement of the striations of isolated muscle fibres with the interference microscope. *J Physiol (Lond)*. 1958 Dec 30;144(3):403–25.
10. Needham DM. Red and white muscle. *Phys Rev C Nucl Phys*. 1956;(6):1–27.
11. Bárány M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol*. 1967 Jul;50(6):Suppl:197-218.
12. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol*. 1970 Oct;23(4):369–79.
13. Reiser PJ, Moss RL, Giulian GG, Greaser ML. Shortening velocity in single fibers from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. *J Biol Chem*. 1985 May 8;260(16):9077–80.
14. Staron RS, Pette D. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers. *Histochemistry*. 1986;86(1):19–23.
15. Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, et al. Three myosin

- heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil.* 1989 Jun;10(3):197–205.
16. Cadenas E, Boveris A, Chance B. Low-level chemiluminescence of hydroperoxide-supplemented cytochrome c. *Biochem J.* 1980 Apr 1;187(1):131–40.
 17. Berg JS, Powell BC, Cheney RE. A millennial myosin census. *Mol Biol Cell.* 2001 Apr;12(4):780–94.
 18. Bicer S, Reiser PJ. Myosin light chain isoform expression among single mammalian skeletal muscle fibers: species variations. *J Muscle Res Cell Motil.* 2004;25(8):623–33.
 19. Baylor SM, Hollingworth S. Intracellular calcium movements during excitation-contraction coupling in mammalian slow-twitch and fast-twitch muscle fibers. *J Gen Physiol.* 2012 Apr;139(4):261–72.
 20. Schiaffino S, Margreth A. Coordinated development of the sarcoplasmic reticulum and T system during postnatal differentiation of rat skeletal muscle. *J Cell Biol.* 1969 Jun;41(3):855–75.
 21. Franzini-Armstrong C, Ferguson DG, Champ C. Discrimination between fast- and slow-twitch fibres of guinea pig skeletal muscle using the relative surface density of junctional transverse tubule membrane. *J Muscle Res Cell Motil.* 1988 Oct;9(5):403–14.
 22. Sone T. [Epidemiology of bone and joint disease - the present and future - . Diagnosis of sarcopenia : techniques for assessing muscle mass]. *Clin Calcium.* 2014 May;24(5):727–32.
 23. Saltin BG PD. Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. Vol. *Handbook of Physiology. Skeletal muscle.* 1983. 555–632 p.
 24. Lexell J. Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1995 Nov;50 Spec No:11–6.
 25. Simoneau JA, Bouchard C. Genetic determinism of fiber type proportion in human skeletal muscle. *FASEB J.* 1995 Aug;9(11):1091–5.
 26. Ama PF, Simoneau JA, Boulay MR, Serresse O, Thériault G, Bouchard C. Skeletal muscle characteristics in sedentary black and Caucasian males. *J Appl Physiol.* 1986 Nov;61(5):1758–61.
 27. Duey WJ, Bassett DR, Torok DJ, Howley ET, Bond V, Mancuso P, et al. Skeletal muscle fibre type and capillary density in college-aged blacks and whites. *Ann Hum Biol.* 1997 Aug;24(4):323–31.
 28. Kiens B. Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiol Rev.* 2006 Jan;86(1):205–43.

29. Welle S, Tawil R, Thornton CA. Sex-related differences in gene expression in human skeletal muscle. *PLoS ONE*. 2008 Jan 2;3(1):e1385.
30. Pette D. The adaptive potential of skeletal muscle fibers. *Can J Appl Physiol*. 2002 Aug;27(4):423–48.
31. Pette D, Vrbová G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1992;120:115–202.
32. Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science*. 1986 Feb 7;231(4738):597–600.
33. Sandonà D, Desaphy J-F, Camerino GM, Bianchini E, Ciciliot S, Danieli-Betto D, et al. Adaptation of mouse skeletal muscle to long-term microgravity in the MDS mission. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e33232.
34. Fitts RH, Trappe SW, Costill DL, Gallagher PM, Creer AC, Colloton PA, et al. Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol (Lond)*. 2010 Sep 15;588(Pt 18):3567–92.
35. Ahmetov II, Vinogradova OL, Williams AG. Gene polymorphisms and fiber-type composition of human skeletal muscle. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2012 Aug;22(4):292–303.
36. Giger JM, Bodell PW, Zeng M, Baldwin KM, Haddad F. Rapid muscle atrophy response to unloading: pretranslational processes involving MHC and actin. *J Appl Physiol*. 2009 Oct;107(4):1204–12.
37. Ausoni S, Gorza L, Schiaffino S, Gundersen K, Lømo T. Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J Neurosci*. 1990 Jan;10(1):153–60.
38. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*. 2011 Oct;91(4):1447–531.
39. McCullagh KJA, Calabria E, Pallafacchina G, Ciciliot S, Serrano AL, Argentini C, et al. NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Jul 20;101(29):10590–5.
40. Rinaldi C, Haddad F, Bodell PW, Qin AX, Jiang W, Baldwin KM. Intergenic bidirectional promoter and cooperative regulation of the Iix and Iib MHC genes in fast skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Jul;295(1):R208–218.
41. Hagiwara N, Ma B, Ly A. Slow and fast fiber isoform gene expression is systematically altered in skeletal muscle of the Sox6 mutant, p100H. *Dev Dyn*. 2005 Oct;234(2):301–11.

42. Hagiwara N, Yeh M, Liu A. Sox6 is required for normal fiber type differentiation of fetal skeletal muscle in mice. *Dev Dyn*. 2007 Aug;236(8):2062–76.
43. van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell*. 2009 Nov;17(5):662–73.
44. Gundersen K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2011 Aug;86(3):564–600.
45. Raheem O, Huovinen S, Suominen T, Haapasalo H, Udd B. Novel myosin heavy chain immunohistochemical double staining developed for the routine diagnostic separation of I, IIA and IIX fibers. *Acta Neuropathol*. 2010 Apr;119(4):495–500.
46. Seligman AM, Karnovsky MJ, Wasserkrug HL, Hanker JS. Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *J Cell Biol*. 1968 Jul;38(1):1–14.
47. Friday BB, Mitchell PO, Kegley KM, Pavlath GK. Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD. *Differentiation*. 2003 Apr;71(3):217–27.
48. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang C-Y, Wu Z, Boss O, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 2002 Aug 15;418(6899):797–801.
49. Summermatter S, Thurnheer R, Santos G, Mosca B, Baum O, Treves S, et al. Remodeling of calcium handling in skeletal muscle through PGC-1 α : impact on force, fatigability, and fiber type. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2012 Jan 1;302(1):C88-99.
50. Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2005 Oct;16(4–5):585–95.
51. Arvanitis DN, Davy A. Regulation and misregulation of Eph/ephrin expression. *Cell Adh Migr*. 2012 Apr;6(2):131–7.
52. Edwards MG, Anderson RM, Yuan M, Kendzioriski CM, Weindruch R, Prolla TA. Gene expression profiling of aging reveals activation of a p53-mediated transcriptional program. *BMC Genomics*. 2007 Mar 23;8:80.
53. Welle S, Brooks AI, Delehanty JM, Needler N, Thornton CA. Gene expression profile of aging in human muscle. *Physiol Genomics*. 2003 Jul 7;14(2):149–59.
54. Wu I-C, Lin C-C, Hsiung CA, Wang C-Y, Wu C-H, Chan D-CD, et al. Epidemiology of sarcopenia among community-dwelling older adults in Taiwan: a pooled analysis for a broader adoption of sarcopenia assessments. *Geriatr Gerontol Int*. 2014 Feb;14 Suppl 1:52–

- 60.
55. Campbell WG, Gordon SE, Carlson CJ, Pattison JS, Hamilton MT, Booth FW. Differential global gene expression in red and white skeletal muscle. *Am J Physiol, Cell Physiol.* 2001 Apr;280(4):C763-768.
56. Essén-Gustavsson B, Borges O. Histochemical and metabolic characteristics of human skeletal muscle in relation to age. *Acta Physiol Scand.* 1986 Jan;126(1):107–14.
57. Larsson L, Sjödin B, Karlsson J. Histochemical and biochemical changes in human skeletal muscle with age in sedentary males, age 22–65 years. *Acta Physiol Scand.* 1978 May;103(1):31–9.
58. Lexell J, Downham D, Sjöström M. Distribution of different fibre types in human skeletal muscles. Fibre type arrangement in m. vastus lateralis from three groups of healthy men between 15 and 83 years. *J Neurol Sci.* 1986 Feb;72(2–3):211–22.
59. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Nov;10(11):778–90.
60. Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal.* 2003 Oct;5(5):557–61.
61. Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994 Dec;102 Suppl 10:5–12.
62. Melton LJ, Khosla S, Riggs BL. Epidemiology of sarcopenia. *Mayo Clin Proc.* 2000 Jan;75 Suppl:S10-12; discussion S12-13.
63. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem.* 1989 May 15;264(14):7761–4.
64. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979 Jul;59(3):527–605.
65. Breimer LH. Repair of DNA damage induced by reactive oxygen species. *Free Radic Res Commun.* 1991;14(3):159–71.
66. Davies KJ. Protein modification by oxidants and the role of proteolytic enzymes. *Biochem Soc Trans.* 1993 May;21(2):346–53.
67. Sevanian A, Wratten ML, McLeod LL, Kim E. Lipid peroxidation and phospholipase A2 activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: a structural basis for enzyme activation. *Biochim Biophys Acta.* 1988 Aug 12;961(3):316–27.
68. Ohlendieck K. Proteomics of skeletal muscle differentiation, neuromuscular disorders and fiber aging. *Expert Rev Proteomics.* 2010 Apr;7(2):283–96.

69. Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* 1998 Aug 15;12(16):2499–509.
70. Parsons SA, Wilkins BJ, Bueno OF, Molkenin JD. Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin Aalpha and Abeta gene-targeted mice. *Mol Cell Biol.* 2003 Jun;23(12):4331–43.
71. Parsons SA, Millay DP, Wilkins BJ, Bueno OF, Tsika GL, Neilson JR, et al. Genetic loss of calcineurin blocks mechanical overload-induced skeletal muscle fiber type switching but not hypertrophy. *J Biol Chem.* 2004 Jun 18;279(25):26192–200.
72. Serrano AL, Murgia M, Pallafacchina G, Calabria E, Coniglio P, Lømo T, et al. Calcineurin controls nerve activity-dependent specification of slow skeletal muscle fibers but not muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Nov 6;98(23):13108–13.
73. Allen DL, Sartorius CA, Sycuro LK, Leinwand LA. Different pathways regulate expression of the skeletal myosin heavy chain genes. *J Biol Chem.* 2001 Nov 23;276(47):43524–33.
74. Calabria E, Ciciliot S, Moretti I, Garcia M, Picard A, Dyar KA, et al. NFAT isoforms control activity-dependent muscle fiber type specification. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 Aug 11;106(32):13335–40.
75. Rose AJ, Kiens B, Richter EA. Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. *J Physiol (Lond).* 2006 Aug 1;574(Pt 3):889–903.
76. Edmondson DG, Cheng TC, Cserjesi P, Chakraborty T, Olson EN. Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle-specific enhancer factor MEF-2. *Mol Cell Biol.* 1992 Sep;12(9):3665–77.
77. Wojtaszewski JF, Nielsen P, Hansen BF, Richter EA, Kiens B. Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. *J Physiol (Lond).* 2000 Oct 1;528 Pt 1:221–6.
78. Röckl KSC, Hirshman MF, Brandauer J, Fujii N, Witters LA, Goodyear LJ. Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. *Diabetes.* 2007 Aug;56(8):2062–9.
79. Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 Jun 10;100(12):7111–6.
80. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, et al.

Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 1999 Jul 9;98(1):115–24.

81. St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, et al. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem*. 2003 Jul 18;278(29):26597–603.
82. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998 Mar 20;92(6):829–39.
83. Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, et al. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat*. 2003 Jan;202(1):59–68.
84. Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development*. 1993 Aug;118(4):1137–47.
85. Hughes SM, Chi MM, Lowry OH, Gundersen K. Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice. *J Cell Biol*. 1999 May 3;145(3):633–42.
86. Mahoney DJ, Parise G, Melov S, Safdar A, Tarnopolsky MA. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB J*. 2005 Sep;19(11):1498–500.
87. Nakazato K, Song H. Increased oxidative properties of gastrocnemius in rats fed on a high-protein diet. *J Nutr Biochem*. 2008 Jan;19(1):26–32.
88. Méjat A, Ramond F, Bassel-Duby R, Khochbin S, Olson EN, Schaeffer L. Histone deacetylase 9 couples neuronal activity to muscle chromatin acetylation and gene expression. *Nat Neurosci*. 2005 Mar;8(3):313–21.
89. Potthoff MJ, Wu H, Arnold MA, Shelton JM, Backs J, McAnally J, et al. Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers. *J Clin Invest*. 2007 Sep;117(9):2459–67.
90. Reid DW, Nicchitta CV. The enduring enigma of nuclear translation. *J Cell Biol*. 2012 Apr 2;197(1):7–9.
91. Tay L, Ding YY, Leung BP, Ismail NH, Yeo A, Yew S, et al. Sex-specific differences in risk factors for sarcopenia amongst community-dwelling older adults. *Age (Dordr)*. 2015 Dec;37(6):121.
92. Raue U, Trappe TA, Estrem ST, Qian H-R, Helvering LM, Smith RC, et al. Transcriptome signature of resistance exercise adaptations: mixed muscle and fiber type

- specific profiles in young and old adults. *J Appl Physiol*. 2012 May;112(10):1625–36.
93. Scott D, Blizzard L, Fell J, Jones G. The epidemiology of sarcopenia in community living older adults: what role does lifestyle play? *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011 Sep;2(3):125–34.
94. Kim TN, Choi KM. Sarcopenia: definition, epidemiology, and pathophysiology. *J Bone Metab*. 2013 May;20(1):1–10.

8 Anhang

Tabelle 25: Fasertypen I versus IIx - die 15 signifikantesten Upstream Regulatoren

Upstream Regulator	Molecule Type	p-value of overlap	Predicted Activation State	Activation z-score	Fold Change
ESRRA	ligand-dependent nuclear receptor	8,68E-16	Activated	5,433	1,492
MYC	transcription regulator	5,27E-13		0,224	-1,194
DMD	other	6,29E-13	Inhibited	-2,478	1,100
INSR	kinase	7,60E-13	Activated	5,071	1,055
PPARGC1A	transcription regulator	9,07E-13	Activated	3,187	1,393
MED30	transcription regulator	3,35E-10			-1,058
MYOD1	transcription regulator	9,92E-10		-0,630	-1,570
PPARD	ligand-dependent nuclear receptor	2,84E-09		0,823	1,020
KLF15	transcription regulator	8,84E-09	Activated	2,298	1,122
MAPT	other	3,54E-08			-1,078
HTT	transcription regulator	3,90E-08		-1,303	
PRKAG3	kinase	9,69E-08			-3,993
TFAM	transcription regulator	1,10E-07	Activated	3,051	1,265
PSEN1	peptidase	1,74E-07		-0,248	1,034
APP	other	2,17E-07		1,203	-1,033

Tabelle 26: Fasertypen IIa versus IIx - die 15 signifikantesten Upstream Regulatoren

Upstream Regulator	Molecule Type	p-value of overlap	Predicted Activation State	Activation z-score	Fold Change
ESRRA	ligand-dependent nuclear receptor	1,91E-10	Activated	3,322	1,229
MED30	transcription regulator	4,00E-10			1,016
DMD	other	5,72E-08		-1,294	1,097
INSR	kinase	1,40E-07	Activated	3,867	1,010
PPARA	ligand-dependent nuclear receptor	8,41E-07		1,317	1,077
PPARGC1A	transcription regulator	2,88E-06		1,760	1,369
IGF1R	transmembrane receptor	6,91E-06		1,655	-1,043
PRKAG3	kinase	7,31E-06			-1,822
MT3	other	8,89E-06		-1,000	1,073
LIPE	enzyme	1,18E-05		0,447	1,087
NR4A1	ligand-dependent nuclear receptor	1,81E-05		-0,192	1,024
KLF15	transcription regulator	6,63E-05		1,363	1,013
ERBB2	kinase	8,32E-05		-0,977	-1,177
HTT	transcription regulator	8,62E-05			
DNMT3L	transcription regulator	8,68E-05			-1,061

Eidesstattliche Versicherung

Name: Stefan Mehaffey

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel
„Molekulare Mechanismen der Muskeldegeneration“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 28. Juli 2020

Stefan Michael Mehaffey

Ort, Datum

Unterschrift