

**Frühe Veränderungen der Genexpression im
schnellen m. Tibialis anterior der Ratte bei chronisch
niederfrequenter Elektrostimulation**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

An der Fakultät für Biologie der Universität Konstanz

**Vorgelegt von
Achim Schneider**

Konstanz, Februar 1999

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Pette**
- 2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. R. Mutzel**

Danksagung

Ich möchte mich gerne bei allen bedanken, die mich in der Zeit meiner Dissertation begleitet haben.

Besonderen Dank richte ich an folgende Personen:

Dirk Pette, auf dessen Unterstützung ich stets zählen konnte.

Bernd Kirschbaum und Daniel Margerie für die Unterstützung bei der Etablierung des *Differential Display*.

Helmut Plattner und Massoud Momayesi für die Möglichkeit, radioaktive Experimente im Isotopenlabor am Sonnenbühl durchzuführen.

Matthias Hahn für sehr hilfreiche Diskussionen.

Inge Gast und Dieter Schopper für die Immunisierung von Schafen zur Gewinnung von polyklonalen MLP-Antikörpern.

Charles T. Putman für die Einarbeitung in die histochemischen Methoden.

Pico Caroni für die Bereitstellung des Anti-MLP-Antikörpers (MLP-Ak_K).

Regina Dieterle und Sabine Düsterhöft für die Kultivierung und Bereitstellung von Satellitenzellen.

Karim Sultan für die gute Zusammenarbeit bei der MLP- Immunhistochemie.

Kerstin Leuthäuser für die enge und fruchtbare Zusammenarbeit während ihres Vertiefungskurses und ihrer Diplomarbeit.

Raffaella Willmann, die mir zu allen Zeiten immer zur Seite gestanden hat.

Teile dieser Dissertation sind in Fachzeitschriften publiziert

Schneider, A.G., Sultan K.R. and D. Pette

Muscle LIM protein: expressed in slow muscle and induced in fast muscle by enhanced contractile activity.

Am J Physiol. 1999 Apr;276(4 Pt 1):C900-906.

Schneider, A.G., Leuthäuser K. and D. Pette

Parathyroid hormone-related protein is rapidly up-regulated in blood vessels of rat skeletal muscle by low-frequency stimulation.

Pflugers Arch. 1999 Dec;439(1-2):167-73.

Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
AMV	Avian Myeloblastosis
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreithol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol- <i>bis</i> (β -aminoethylether) tetraessigsäure
<i>g</i>	Gravitationskonstante
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin – N'-2-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
Hz	Hertz
kB	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
l	Liter
m	Milli
μ	Mikro
M	Molar
min	Minute
MMLV	Moloney- Mäuseleukämievirus
MOPS	3-[Morpholino] propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	Nano
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pipes	Piperazin- <i>bis</i> [2-ethansulfonsäure]
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerasekettenreaktion
sec	Sekunden
S	Sedimentationskoeffizient
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
1	Der adulte Skelettmuskel als Modellsystem für Plastizität	1
2	Die drei Klassen von Muskeln	2
3	Der Aufbau der Skelettmuskulatur	2
4	Die Funktionsweise der Skelettmuskulatur	4
5	Die Diversität der Skelettmuskulatur	5
6	Die Transkriptionskontrolle am Skelettmuskel	7
7	Regulierende Faktoren von schnellen und langsamen Muskeln	9
8	Die Plastizität des Skelettmuskels	11
9	Die schnell-zu-langsam Transformation infolge von CLFS	11
9.1	Die Veränderungen des kontraktiven Apparates	12
9.2	Die Veränderungen des Metabolismus	13
9.3	Die Veränderungen des Kalzium-regulierenden Systems	14
9.4	Die Reihenfolge der durch CLFS bedingten Anpassungen	15
9.5	Regulatorische Faktoren bei der CLFS	16
9.5.1	Veränderung von Metaboliten	16
9.5.2	Kovalente Modifikation von Proteinen	17
9.5.3	Änderungen in der Genexpression	17
10	Der Beitrag der vorliegenden Arbeit	19
10.1	Zielsetzung	19
10.2	Die Methode des Differential Display	20
10.3	Die Wahl der Versuchstiere und der untersuchten Muskeln	21
10.4	Das experimentelle Vorgehen	23
B	Material und Methoden	24
1	Tiere und Elektrostimulation	24
2	Differential Display	24
2.1	RNA-Präparation	24
2.2	RNA-Gelelektrophorese	25
2.3	Differential Display Reverse Transkription	25
2.4	Differential Display Polymerase Kettenreaktion	26
2.5	Gelelektrophoretische Auftrennung im Sequenziergel	26
2.6	Identifikation und Reamplifikation differentiell exprimierter Banden	27
3	Klonierung	27
3.1	Überprüfung und Reelution der identifizierten cDNAs	27
3.2	T-Addition	28
3.3	Ligation	28
3.4	One Step E-coli Transformation	28
3.5	Herstellung kompetenter Zellen	29
3.6	Transformation	29
3.7	Die klonierten cDNAs	29
3.8	Plasmidminipräparation	30
4	Sequenzierung der klonierten cDNAs	30
5	Northern Blot Hybridisierung	31
5.1	Northern Transfer	31
5.2	Hybridisierung	31

6	Die semiquantitative RT-PCR	32
7	Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen MLP	33
7.1	PeptidAuswahl und Immunisierung	33
7.2	Nonkompetitiver ELISA	33
7.3	Kopplung der Antigene an NHS-aktivierte Sepharose	34
7.4	Affinitätsreinigung der Anti-MLP Antikörper	34
8	Immunoblot	35
8.1	Herstellung von Proteinextrakten	35
8.2	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	35
8.3	Western Transfer	35
8.4	Immundetektion	36
8.5	Silberfärbung	36
9	Immunhistochemische Methoden	37
9.1	Immunhistochemische Färbung von Kryostatschnitten	37
9.1.1	Protokoll für den Anti-MLP Antikörper (MLP-Ak _S)	37
9.1.2	Spezifische Bedingungen für verschiedene Antikörper	37
9.2	Immunhistochemische Färbung von Satellitenzellen	38
9.2.1	Kultivierung von Satellitenzellen	38
9.2.2	Isolierung der Satellitenzellen	39
9.2.3	Färbung der Satellitenzellen	40
C	Ergebnisse	41
1	Im Differential Display identifizierte Banden	41
2	Das Muskel-LIM-Protein (MLP)	47
2.1	Nachweis der differentiellen Expression von MLP im Northern Blot	47
2.2	Die Herstellung von polyklonalen Anti-MLP Antikörpern	48
2.3	Der Nachweis von MLP im Immunoblot	49
2.4	Die Induktion von MLP bei der Differenzierung von Satellitenzellen	52
2.5	Der Versuch des immunhistochemischen Nachweises von MLP mit MLP-Ak _S	54
2.6	Der immunhistochemische Nachweis von MLP mit einem im Kaninchen hergestellten polyklonalen Antikörper gegen MLP	57
3	Das Parathyroidhormon verwandte Protein (PTHrP)	61
3.1	Der Nachweis von PTHrP mit Hilfe von semiquantitativer RT-PCR	61
3.2	Der immunhistochemische Nachweis von PTHrP	63
3.3	Expression von PTHrP im TA nach unterschiedlich langen Stimulationsdauern	67
D	Diskussion	70
1	Die Methode des <i>Differential Display</i>	70
2	Die Ergebnisse des <i>Differential Display</i>	71
3	Das Muskel-LIM-Protein (MLP)	73
3.1	Die Literatur zu MLP	73
3.1.1	LIM-Proteine werden in drei Gruppen unterteilt	73
3.1.2	MLP gehört zu der Familie der cystein rich proteins (CRP)	74
3.1.3	MLP ist ein wichtiger Faktor für die Differenzierung der Herzmuskulatur	75
3.1.4	Noch weitere LIM-Proteine sind im Skelettmuskel identifiziert worden	76
3.2	Die Diskussion der Ergebnisse	77
3.2.1	MLP wird im langsamen Muskel konstitutiv exprimiert und im schnellen Muskel bei CLFS hochreguliert	77
3.2.2	MLP wird spezifisch in den Muskelfasern exprimiert	77
3.2.3	Die Expression von MLP steht unter neuraler Kontrolle	79
3.2.4	MLP wirkt bei erhöhter kontraktiver Aktivität vielleicht als Adaptermolekül in der Z-Scheibe	79
4	Die β1-Untereinheit des Aktin Capping Proteins (CapZ)	80
5	Das Parathyroid-Hormon-ähnliche Protein (PTHrP)	82
5.1	Allgemeiner Überblick über die Literatur	82

5.1.1	PTHrP ist ein in fast allen Geweben exprimierter Faktor mit vielfältigen Funktionen	82
5.1.2	PTHrP wird posttranslational in mehrere aktive Peptide gespalten	82
5.1.3	Die Rolle von PTHrP im Herz- und Skelettmuskel	84
5.1.4	PTHrP ist in Blutgefäßen eine vasodilative Substanz	84
5.2	Die Diskussion der Ergebnisse	86
5.2.1	Die schnelle Induktion von PTHrP durch CLFS steht im Einklang mit seiner Rolle als <i>immediate early response</i> Gen	86
5.2.2	PTHrP konnte nicht in Muskelfasern nachgewiesen werden	87
5.2.3	PTHrP wird in Blutgefäßen des Soleus und TA exprimiert	87
5.2.4	Die Induktion von PTHrP erfolgt wahrscheinlich in den Blutgefäßen	87
5.2.5	Das durch CLFS hochregulierte PTHrP könnte eine Vasodilatation bewirken	88
5.2.6	Auch in den Kapillaren könnte PTHrP den Tonus regulieren	88
5.2.7	Die Induktion von PTHrP geht der Kapillarisation um mehrere Tage voraus	89
5.2.8	Die durch PTHrP induzierte Erweiterung der Blutgefäße könnte die Kapillarisation bei der CLFS bewirken	90
E	Zusammenfassung	92
F	Bibliographie	93

A Einleitung

1 Der adulte Skelettmuskel als Modellsystem für Plastizität

Skelettmuskeln sind für jede Art von Fortbewegung, sowie der Haltung des Körpers in einer bestimmten Position entgegen der Schwerkraft notwendig. Sie nehmen in adulten Säugetieren etwa 40% des Lebendgewichtes ein. Skelettmuskeln entstehen im Laufe der Embryonalentwicklung durch die Differenzierung von Vorläuferzellen, den Myoblasten. Im Laufe der Differenzierung wird die Expression von spezifischen Genen induziert, deren Proteine Muskeln von anders differenzierten Geweben unterscheiden. So werden spezifisch im Skelettmuskel zahlreiche Proteine exprimiert, die ihn zur Kontraktion befähigen (kontraktile Proteine). Der Vorgang der Differenzierung von Skelettmuskeln ist ein äußerst komplexer Vorgang, der viele Stadien umfaßt und oft bis zur Adoleszenz andauert.

Die verschiedenen Anforderungen, die an jeden Muskel gestellt werden, wie etwa kurze Maximalleistungen oder Ausdauerleistungen führen dazu, daß Muskeln sich zu außerordentlich heterogenen Organen differenzieren, bei denen keiner einem anderen völlig gleicht. Den adulten an seine Umgebung angepaßten Muskel bezeichnet man als „terminal differenziert“. Dieser Begriff impliziert, daß der Muskel den Endpunkt in seiner Entwicklung erreicht hat, der keine weitere Veränderung mehr zuläßt.

Der Begriff der terminalen Differenzierung ist allerdings besonders bei der Skelettmuskulatur unangebracht. Denn zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahrzehnte haben gezeigt, daß der Muskel eine außerordentliche Befähigung besitzt, sich bei Änderungen in seiner Beanspruchung, äußerst flexibel den neuen Erfordernissen anzupassen. Als besonders geeignet, zur Untersuchung der Plastizität des Skelettmuskels hat sich das Modell der chronisch niederfrequenten Elektrostimulation (CLFS) erwiesen. Studien aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dirk Pette haben in den letzten drei Dekaden umfassendes Beweismaterial dafür geliefert, daß sich ein schneller Muskel infolge von CLFS komplett umorganisieren kann, um sich den Erfordernissen, ständig aktiv zu sein, anzupassen. Ein schneller Skelettmuskel, der chronisch elektrisch stimuliert wird, wandelt sich in einem geordnet ablaufenden, mehrere Wochen umspannenden Prozeß in einen zur Ausdauerleistung befähigten langsam kontrahierenden Muskel um (Pette und Vrbova 1992). Die CLFS dient gleichzeitig als Paradebeispiel dafür, wie durch Training die Leistung von Skelettmuskeln beeinflusst werden kann.

2 Die drei Klassen von Muskeln

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen glatter und quergestreifter Muskulatur. Glatte Muskeln sind Bestandteil der inneren Organe und ihre Bewegungen unterliegen nicht der willkürlichen Steuerung. Sie werden als glatt bezeichnet, weil deren Aktin- und Myosinfilamente nicht regelmäßig angeordnet sind. Glatte Muskeln kontrahieren langsam und lang anhaltend. Quergestreifte Muskeln wiederum werden in Skelett- und Herzmuskel unterteilt. Sie unterscheiden sich in ihrer Organisation und ihrem Kontraktionsmechanismus nur wenig voneinander. Beide sind quergestreift, was auf der organisierten Anordnung ihrer kontraktile Filamente beruht. Während Skelettmuskeln durch den Nervenimpuls zur Kontraktion angeregt werden, wird der Herzmuskel durch spontan aktive Muskelzellen im Sinusknoten und in den Purkinjefasern erregt, wobei Nervenimpulse nur eine modulatorische Funktion haben. Im folgenden wird der Aufbau und die Funktionsweise der Skelettmuskulatur näher beschrieben, da sich die Untersuchungen der vorliegenden Studie auf diesen konzentrieren.

3 Der Aufbau der Skelettmuskulatur

Ein Skelettmuskel besteht aus Faserbündeln, die aus vielen parallel verlaufenden Muskelfasern zusammengesetzt sind (Abbildung 1). Je nach Spezies und Art des Muskels hat eine Muskelfaser einen Durchmesser von 5-200µm und durchmißt die Länge des gesamten Muskels. Muskelfasern sind vielkernige Synzytien, die durch die Verschmelzung vieler Myoblasten zu Myotuben während der Embryonalentwicklung entstanden sind. Jede Muskelfaser setzt sich aus einer Vielzahl von Myofibrillenbündeln zusammen. Eine Myofibrille besteht aus vielen longitudinal angeordneten Sarkomeren, der kleinsten kontraktile Einheit des Skelettmuskels. Diese sind durch Z-Scheiben voneinander abgegrenzt. Drei Filamentsysteme sind für das Sarkomer von Bedeutung: Die dünnen Filamente, die aus F-Aktin, Troponin und Tropomyosin und Nebulin bestehen, sind über α -Aktinin in der Z-Scheibe verankert. Die dicken Filamente bestehen aus vielen Isomyosinen, die mit ihren Schwänzen in der M-Linie (in der Mitte der H-Zone) verankert sind, während der Kopfbereich in die dünnen Filamente hineinreicht. Die Muskelkontraktion erfolgt durch das Ineinandergleiten der beiden Filamente. Ein drittes

Filament scheint für die Elastizität und Ruhespannung des Sarkomers verantwortlich zu sein. Es besteht aus dem Riesenprotein Titin, das von der Z-Scheibe bis zur M-Linie reicht. Es ist lateral mit dem dicken Filament verbunden. Wie eine Feder zieht sich sein N^o-terminaler Anteil im Bereich der Z-Scheibe bei jeder Kontraktion zusammen und wird anschließend wieder gedehnt (Labeit *et al.* 1997).

Der hierarchische Aufbau der Skelettmuskulatur

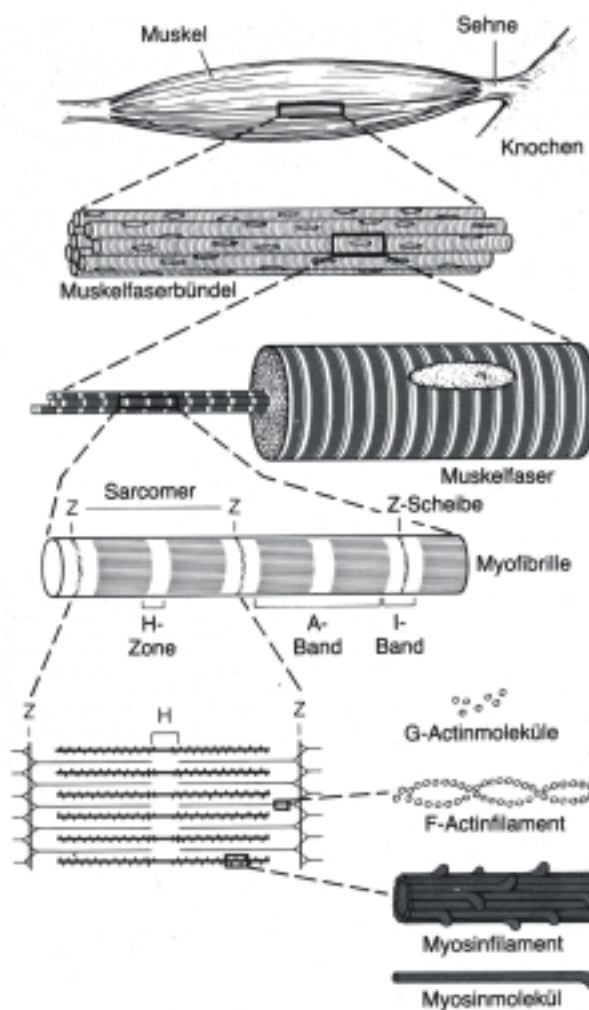


Abbildung 1

4 Die Funktionsweise der Skelettmuskulatur

Das über den Nerv kommende Aktionspotential erreicht die motorische Endplatte und führt hier zur Freisetzung des Neurotransmitters Azetylcholin. Dieses bindet an den Azetylcholinrezeptor im Sarkolemm, der Zellmembran der Muskelfaser. Als Folge davon entsteht ein postsynaptisches Potential, das wiederum in ein Aktionspotential umgewandelt wird. Es breitet sich entlang der Muskelfaser aus und wird über Membraneinstülpungen (T-Tubuli) zu den im Inneren gelegenen Muskelfasern geleitet. Das Aktionspotential bewirkt die Öffnung eines spannungsgesteuerten Kalziumkanals (Dihydropyridin-sensitiver Rezeptor). Der Einstrom von extrazellulären Kalziumionen triggert die Öffnung des von Kalzium gesteuerten Kalziumkanals (Ryanodin sensitiver Rezeptor) im sarkoplasmatischen Retikulum. Die erhöhte sarkoplasmatische Konzentration von Kalzium führt zur Muskelkontraktion. Die freigesetzten Kalziumionen binden an die Kalzium-bindende Untereinheit von Troponin (Troponin C).

Kontraktile Proteine

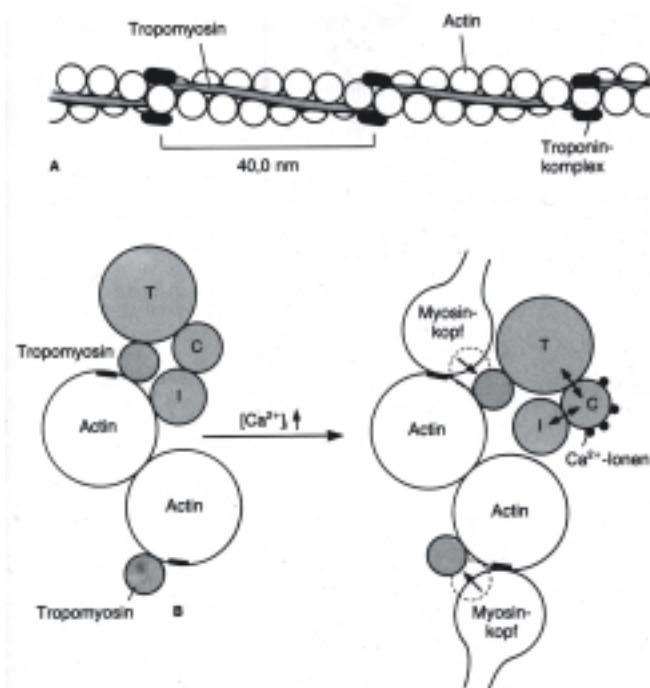


Abbildung 2: A) Anordnung von Troponin und Tropomyosin im Aktinfilament. B) Schematischer Querschnitt durch ein dünnes Filament. Die durch die erhöhte Kalziumkonzentration bewirkten Konformationsänderungen ermöglichen die Bindung der Myosinköpfes an Aktin. T,C und I bezeichnen die Untereinheiten von Troponin.

Sterische Veränderungen des Troponin werden an das Tropomyosin weitergeleitet, so daß die Bindung des Myosinkopfes an das Aktin möglich wird (Abbildung 2). Unter ATP-Verbrauch findet nun der Querbrückenzyklus statt: Der Myosinkopf rollt sich am Aktin entlang und zieht dabei am Querbrückengelenk. Dieser Vorgang findet bei einer einzelnen Kontraktion viele Male in Folge statt. Dadurch gleiten die dünnen Filamente zwischen die dicken Filamente hinein (Gleitfilamenttheorie), d.h. das Sarkomer verkürzt sich. Der aktive Rücktransport von Kalzium in das sarkoplasmatische Retikulum führt wieder zur Entspannung¹.

5 Die Diversität der Skelettmuskulatur

Jeder Skelettmuskel ist auf seine spezielle Aufgabe hin angepaßt. Deshalb ist kein Muskel einem anderen völlig identisch. Schon im letzten Jahrhundert konnte man rote und weiße Muskeln unterscheiden (Ranvier 1873). Nach Ranvier wurden rote Muskeln durch eine langsame Kontraktionsgeschwindigkeit aber erhöhte Ermüdungsresistenz im Vergleich zu weißen Muskeln charakterisiert². Tatsächlich gibt es aber auch schnelle rote Muskeln. Die Ermüdungsresistenz liegt in ihrem vorwiegend aeroben Stoffwechsel begründet. Moderne biochemische, enzymologische, physiologische und histochemische Methoden haben zu einer umfangreichen Charakterisierung verschiedener Muskeln und ihrer Muskelfasern (Pette und Staron 1990) geführt. Heute weiß man, daß die Heterogenität der Skelettmuskulatur in der Vielfalt ihrer Muskelfasern begründet ist.

Die Klassifizierung der Fasertypen erfolgt entweder nach dem metabolischen Enzymmuster (Barnard *et al.* 1971; Peter *et al.* 1972) oder nach der myofibrillären Aktomyosin-ATPase-Aktivität (mATPase-Aktivität) (Guth und Samaha 1969; Brooke und Kaiser 1970; Lutz *et al.* 1979; Staron und Pette 1986; Gorza 1990). Aufgrund ihrer metabolischen Enzyme können Muskelfasern in schnelle glykolytische (FG), schnelle oxidativ glykolytische (FOG) und langsame oxidative Fasern (SO) unterteilt werden (Barnard *et al.* 1971; Peter *et al.* 1972). Die Übergänge zwischen den auf dieser Methode klassifizierten Fasern sind allerdings fließend, so daß die Grenzen willkürlich gewählt werden müssen (Pette und Spamer 1986). Deshalb wird heute der Einteilung nach der mATPase-Aktivität der Vorzug gegeben, die streng mit der

¹ Kapitel 2, 3 und 4 sowie Abbildungen 1 und 2 sind aus Eckert *et al.* (1993) entnommen.

² Die Rotfärbung beruht auf dem erhöhten Kapillarierungsgrad, Myoglobingehalt und Mitochondriengehalt.

Kontraktionsgeschwindigkeit der Muskelfaser korreliert ist (Barany 1967; Bottinelli *et al.* 1994). Da die mATPase-Aktivität von den schweren Myosinketten (MHC) bestimmt wird, können den histochemisch bestimmten Fasern definierte MHC-Isoformen zugeordnet werden (Lutz *et al.* 1979; Staron und Pette 1986; Gorza 1990;). So werden heute histochemisch Typ IIB, Typ IID(X), Typ IIA und Typ I Fasern unterscheiden (Reihenfolge in abnehmender Kontraktionsgeschwindigkeit) (Pette und Staron 1990). Den Fasern werden die entsprechenden Isoformen MHCIIb, MHCII(x) und MHCIIa und MHC I zugeordnet. Im Skelettmuskel des Kaninchen sind inzwischen bereits drei der langsamen MHC-Isoformen identifiziert worden: MHCII α (Peuker und Pette 1995) , MHCIIa (Galler *et al.* 1997) und MHCII β , wobei letztere die vorherrschende Isoform ist. Diese ist wahrscheinlich auch mit der β -MHC-Isoform im Herzen identisch (Lompre *et al.* 1984). Noch weitere MHC-Isoformen, die während der Embryonalentwicklung, in spezialisierten Muskeln und in intrafusalen Fasern exprimiert werden, sind identifiziert worden (Tabelle 1). In gelelektrophoretischen Analysen von Einzelfasern ist zudem die Existenz von Hybridfasern mit zwei und mehr MHC-Isoformen nachgewiesen worden (Billeter *et al.* 1980; Staron und Pette 1993). Eine Auflistung sämtlicher bekannter muskelspezifischer MHC-Isoformen mit der Zuordnung zu Fasern und Muskeln ist in Tabelle 1 wiedergegeben (Pette und Staron 1997). Noch komplexer wird die Situation dadurch, daß sich eine MHC-Isoform mit den Isoformen der leichten Myosinketten zu verschiedenen Isomyosinen zusammenschließen kann (Staron und Pette 1987; Staron und Pette 1987)³. Zieht man in Betracht, daß es auch in der Kombination mit anderen kontraktile und metabolischen Proteinen eine große Variabilität gibt, so ist die Vielfalt der möglichen Muskelfasern nahezu unerschöpflich.

³ Isomyosin ist ein hexameres Protein das sich aus zwei MHC, zwei alkalischen und zwei regulatorischen leichten Myosinketten zusammensetzt.

In der Skelettmuskulatur von Säugetieren identifizierte Isoformen von MHC

Bezeichnung	Nomenklatur	Muskelfaser/ Vorkommen
Schnell zuckend	MHCIIb	Typ IIB, IIBD
Schnell zuckend	MHCII _{d(x)}	Typ IID, IIBD
Schnell zuckend	MHCIIa	Typ IIA, IIDA, IIC, IC
Schnell zuckend	MHC _{com}	Extraokular- und Larynxmuskeln
Schnell zuckend	MHCII _m	Kaumuskeln (Carnivoren, Primaten)
Langsam zuckend	MHCI (MHCI β)	Typ I, IC, IIC
Langsam zuckend	MHCI α	Extraokulärmuskeln, Diaphragma, Massetermuskel, schnell-zu-langsam transformierende Fasern, intrafusale Fasern
Langsam zuckend	MHCIa	Plantarismuskel (Kaninchen)
Langsam tonisch	MHCI _{ton}	Extraokular und Tensor Tympani Muskeln, intrafusale Fasern
Embryonal	MHC _{emb}	Myotuben, Extraokulärmuskeln, intrafusale und regenerierende extrafusale Fasern
Neonatal	MHC _{neo}	Neonatale, Extraokular- und Massetermuskeln, intrafusale und regenerierende extrafusale Fasern

Tabelle 1: Darstellung der in Skelettmuskeln von Säugetieren exprimierten Isoformen von MHC (modifiziert nach Pette und Staron 1997)

6 Die Transkriptionskontrolle am Skelettmuskel

Jedes Gen hat sein eigenes räumliches und zeitliches Expressionsmuster. Dieses wird von Transkriptionsfaktoren reguliert, die an definierte Motive in den Promotoren und Enhancern binden. Es ist die Kombination von vielen Faktoren, die entscheidet, ob ein Gen exprimiert wird oder nicht.

Für die Transkription von Genen im Skelettmuskel haben sich zwei Familien von Transkriptionsfaktoren herauskristallisiert, deren kooperatives Zusammenwirken für die muskelspezifische Expression von vielen Genen verantwortlich sind (Molkentin *et al.* 1995). Es sind dies die myogenen basischen Helix-Loop-Helix Proteine (myogene bHLH) (Weintraub

1993; Olson und Klein 1994) und die MEF2 Proteine, die zur Familie der MADS-Box Proteine gehören (Yu *et al.* 1992; Shore und Sharrocks 1995). Die Expression der vier myogenen bHLH-Proteine, Myf-5, MyoD, Myogenin und Myf-6, ist auf den Muskel beschränkt (Weintraub 1993; Olson und Klein 1994). Alle vier Proteine können Fibroblasten zu Myotuben konvertieren, und *in vivo* haben sie eine essentielle Bedeutung für die Determinierung (MyoD, Myf-5) und Differenzierung (Myogenin, Myf-6) von Muskelgewebe (Rudnicki und Jaenisch 1995; Arnold und Braun 1996). Die myogenen bHLH-Proteine binden als Heterodimere zusammen mit den ubiquitär exprimierten E-Proteinen, wie E12, E47 und HEB, die ebenfalls zur Familie der bHLH-Proteine gehören, an die regulatorischen Sequenzen ihrer Zielgene (Hu *et al.* 1992; Lassar *et al.* 1991). Die MEF2 Proteine, die ebenfalls von vier Genen kodiert werden (Mef2A-Mef2D), binden als Homo- oder Heterodimere an die DNA (Martin *et al.* 1994; Olson *et al.* 1995). Allerdings entstehen im Unterschied zu den myogenen bHLH-Proteinen durch differentielles Spleißen eine Vielfalt von MEF2-Isoformen, von denen viele nicht gewebespezifisch exprimiert werden. Die Expression von MEF2C allerdings ist auf den Skelettmuskel, das Gehirn und die Milz beschränkt (Martin *et al.* 1993; McDermott *et al.* 1993). Die myogenen bHLH-Proteine binden an E-Boxen mit dem Konsensus CANNTG (Lassar *et al.* 1989), MEF2-Proteine an MEF2-Bindestellen mit dem Konsensus (C/T)TA(A/T)₄TA(G/A) (Pollock und Treisman 1991; Andres *et al.* 1995; Fickett 1996). In vielen Promotoren und Enhancern sind diese Motive in einem definierten Abstand zueinander gelegen (Fickett 1996). Myogene bHLH- und MEF2-Proteine kooperieren dabei nicht nur funktionell miteinander, indem sie synergistisch die Transkription von Genen verstärken (Li und Capetanaki 1994; Naidu *et al.* 1995), sondern sie können auch aneinander binden (Molkentin und Olson 1996). Das Zusammenwirken beider Faktoren ist auch in Systemen beschrieben worden, bei denen nur einer von ihnen Kontakt zur DNA hat (Molkentin *et al.* 1995). Das öffnet die Möglichkeit, daß auch in Promotoren mit einem Bindemotiv für nur einen dieser Faktoren, ein Komplex aus bHLH-Proteinen und MEF2-Proteinen die Transkription aktiviert. Das Zusammenspiel von bHLH-Proteinen und MEF2-Proteinen ist somit ein wichtiges Prinzip für die muskelspezifische Transkription (Yun und Wold 1996).

Weitere Transkriptionsfaktoren sind für die Regulation muskelspezifischer Promotoren und Enhancer beschrieben worden, wie etwa der *myocyte nuclear factor* (MNF) (Bassel-Duby *et al.* 1994), der *serum response factor* (SRF) (Lee *et al.* 1991), TEF-1 (Knotts *et al.* 1994), der M-CAT Binfaktor (Mar und Ordahl 1990) und Oct-1 (Lakich *et al.* 1998). Einige von ihnen sind

nicht auf den Muskel beschränkt. Das Zusammenspiel vieler Faktoren entscheidet darüber, ob ein Gen aktiv ist oder nicht.

7 Regulierende Faktoren von schnellen und langsamen Muskeln

Trotz einer eingehenden Analyse vieler Promotoren und Enhancer ist erstaunlich wenig über die Mechanismen bekannt, die Gene in schnellen und langsamen Muskelfasern regulieren. Viele muskelspezifische Proteine werden in verschiedenen Isoformen exprimiert, die jeweils auf bestimmte Muskelfasertypen beschränkt sind. Es sind auch einige Promotor- und Enhancersequenzen beschrieben, die die Expression in schnellen oder langsamen Muskeln vermitteln. Dies gilt beispielsweise für die in schnellen Muskelfasern exprimierten Gene der leichten Myosinketten 1f und 3f (Rao *et al.* 1996; Kelly *et al.* 1997), des Troponin I_{fast} (Buonanno und Rosenthal 1996), der MHCIIb (Swoap 1998) und der Aldolase A (Salminen *et al.* 1994) und für die in langsamen Muskelfasern exprimierten Gene Troponin I_{slow} (Buonanno und Rosenthal 1996) und MHCIIβ (Knotts *et al.* 1996).

In den regulatorischen Regionen der Gene für das schnelle und das langsame Troponin I konnte je ein Enhancer von weniger als 150 Bp Länge identifiziert werden, der die spezifische Expression von Troponin I_{fast} in schnellen Muskeln und von Troponin I_{slow} in langsamen Muskeln vermittelt. Durch den Austausch der beiden Enhancer in transgenen Mäusen wurde die Expression der beiden Isoformen umgekehrt. Der Homologievergleich ergab, daß die Enhancer stark konserviert sind und gemeinsame Bindestellen für Transkriptionsfaktoren besitzen. Die Autoren spekulierten, daß sehr ähnliche Transkriptionskomplexe die spezifische Expression in schnellen und langsamen Muskeln steuern könnten (Buonanno und Rosenthal 1996).

Eine Hypothese, derzufolge unterschiedliche Zusammensetzungen der myogenen bHLH-Proteine wie das Verhältnis von MyoD zu Myogenin die Fasertyp-spezifische Expression vermitteln, ist diskutiert worden. So ist beschrieben worden, daß MyoD bevorzugt in schnellen Fasern, Myogenin hingegen in langsamen Fasern exprimiert (Hughes *et al.* 1993; Voytik *et al.* 1993) und daß Veränderungen des Verhältnisses von schnellen zu langsamen Fasern mit Veränderungen im Verhältnis von MyoD zu Myogenin korrelieren (Hughes *et al.* 1993). Allerdings haben Kraus und Pette (1997) keine strenge Korrelation der MHC-Isoformen mit

dem Verhältnis von MyoD zu Myogenin gefunden. Weiterhin hat der Knockout des Genes für MyoD gezeigt, daß die Fähigkeit dieser Mäuse, langsame und schnelle Isoformen von kontraktilen Proteinen zu exprimieren, erhalten bleibt (Rudnicki *et al.* 1992). Diese und noch weitere Befunde (Buonanno *et al.* 1998) sprechen gegen eine Rolle des MyoD/Myogenin-Verhältnisses für die Spezifizierung von langsamen und schnellen Muskelfasern.

Es gibt inzwischen Hinweise dafür, daß Id-Proteine eine Rolle bei der Spezifizierung von langsamen Fasern spielen könnten. Id-Proteine dienen generell als Antagonisten der Zelldifferenzierung (Jen *et al.* 1992). So kann Id die Differenzierung von Myoblasten hemmen, indem es die Bindung von E-Proteinen an die DNA verhindert (Jen *et al.* 1992). In höheren Vertebraten sind vier Gene für Id-Proteine (Id1-Id4) identifiziert worden (Riechmann *et al.* 1994). Kürzlich konnte in der Forelle gezeigt werden, daß die beiden Id-Proteine Tid1 und Tid2 ausschließlich in langsamen Muskelfasern exprimiert werden (Rescan 1997). Es gibt allerdings derzeit keine Befunde dafür, daß Id-Proteine auch in Säugetieren Fasertyp-spezifisch exprimiert werden.

Die derzeit vielversprechensten Ansätze für die Identifizierung von Faktoren, die Fasertypen spezifizieren, stammen aus Untersuchungen am menschlichen Gen für die Aldolase A, dessen muskelspezifischer Promoter in schnellen Muskeln aktiv ist (Salminen *et al.* 1994). Ein Bereich von nur 64 Bp Länge genügt, um in transgenen Mäusen, die spezifische Expression eines Reportergens in distinkten schnellen Muskeln zu erhalten. Diese Sequenz enthält weder eine Bindungsstelle für MyoD und noch für MEF2. Vielmehr ist ein Bindemotiv für MEF3 und NFI identifiziert worden, das die spezifische Expression in schnellen Muskeln steuert. Es existieren 12 verschiedene Isoformen von NFI, die als Dimer an die DNA binden. Im langsamen Soleus werden spezifisch die NFI-C γ und γ -Isoform, in dem schnellen Gastrocnemius Muskel die NFI-B β -Isoform exprimiert. Es ist daher möglich, daß NFI die molekulare Basis für die Muskeldiversifität bildet (Spitz *et al.* 1997). Die Bindungsstellen für MEF3 und NFI sind auch in der Promotorregion von 130 Bp Länge enthalten, die die durch den Nervenimpuls und durch kontraktile Aktivität induzierte Expression von einem Reportergen in transgenen Mäusen vermittelt (Spitz *et al.* 1998).

8 Die Plastizität des Skelettmuskels

Zahlreiche Faktoren beeinflussen den Phänotyp von Skelettmuskeln. Dazu gehören Ausdauertraining (Green *et al.* 1984; Adams *et al.* 1993;), Krafttraining (Caiozzo *et al.* 1996), Belastung und Entlastung (Booth und Criswell 1997), Denervation (Jakubiec-Puka *et al.* 1990), Schwerelosigkeit (Baldwin 1996), Alter (Porter *et al.* 1995; Larsson und Ansved 1995) und hormonelle Einflüsse (Caiozzo und Haddad 1996). Generell führen Faktoren, die eine erhöhte neuromuskuläre Aktivität bewirken zu einer schnell-zu-langsam Umwandlung, Faktoren hingegen, die die neuromuskuläre Aktivität und Muskelspannung erniedrigen, zu einer langsam-zu-schnell Umwandlung (Pette und Staron 1997).

Die Bedeutung des Nervenimpulses wurde erstmals in Kreuz-Reinnervationsexperimenten an Katzen gezeigt (Buller *et al.* 1960). Die Innervation eines schnellen Muskels durch den Nerv eines langsamen Muskels verringerte dessen Kontraktionsgeschwindigkeit. Ein langsamer Muskel hingegen, der von dem Nerven des schnellen Muskels innerviert wurde, reagierte mit erhöhter Kontraktionsgeschwindigkeit. Die Ergebnisse werden dahingehend interpretiert, daß ein verändertes Impulsmuster des Nerven dem Muskel eine Umstellung seiner Genexpression diktiert. Ein etabliertes Modell für die Untersuchung des Einflusses der neuromuskulären Aktivität auf den Muskel ist das der chronisch niederfrequenten Elektrostimulation (Chronic Low Frequency Stimulation, CLFS) (Pette und Vrbova 1992). Diese führt zu der Umwandlung eines schnellen, leicht ermüdbaren in einen langsamen und ausdauernden Muskel. Dieser Prozeß umfaßt den koordinierten Austausch von myofibrillären Proteinen durch andere Isoformen und eine Veränderung im Kalzium-regulierenden System und den Enzymen des Energiestoffwechsels.

9 Die schnell-zu-langsam Transformation infolge von CLFS

Die CLFS (Salmons und Vrbova 1969) erfolgt über zwei seitlich an den Peronealnerv implantierte Elektroden (Simoneau und Pette 1988). Durch die chronische elektrische Stimulation mit einer Frequenz, die der eines langsamen Muskels entspricht, wird ein ursprünglich schneller Muskel in einen langsam kontrahierenden, ermüdungsresistenten umgewandelt (Salmons und Vrbova 1969; Pette und Vrbova 1992). Dieser Effekt kann in geringerem Maße auch durch Ausdauertraining erreicht werden. Das Modell der CLFS hat allerdings den Vorteil, daß mit einem definierten Impulsmuster gezielt ein Muskel mit all

seinen motorischen Einheiten aktiviert wird, und zudem der kontralaterale Muskel als Kontrollmuskel verwendet werden kann. Außerdem sind die durch CLFS bewirkten Anpassungen umfassender als es durch bloßes Muskeltraining möglich ist. Im folgenden werden die Veränderungen auf der Ebene des kontraktilen Apparates, des Kalziumregulatorischen Systems und des Metabolismus beschrieben.

9.1 Die Veränderungen des kontraktilen Apparates

Bei der CLFS werden schnelle Isoformen von myofibrillären Proteinen durch Isoformen vom langsamen Typ ersetzt. Die schweren Myosinketten (Myosin Heavy Chains, MHC) werden in einer geordneten Folge ausgetauscht, so daß schnelle Muskelfasern in langsamere umgewandelt werden. In den schnellen Muskeln der Ratte werden die Typ IIB Fasern über Typ IID Fasern zu Typ IIA Fasern umgewandelt. Diese Übergänge finden zuerst auf der Ebene der mRNA statt (Jaschinski *et al.* 1998) und werden von Änderungen der Proteinsynthese gefolgt (Termin und Pette 1992). In der Ratte führt selbst die lang andauernde CLFS von bis zu 100d nicht zu einem wesentlichen Anstieg des Gehaltes an Typ I Fasern (Termin *et al.* 1989; Delp und Pette 1994; Jaschinski *et al.* 1998). Nur unter hypothyreoten Bedingungen kann durch CLFS der Übergang zu Typ I Fasern erreicht werden (Kirschbaum *et al.* 1990). In schnellen Muskeln von Kaninchen sind Typ IID Fasern dominierend. Die Transformation erfolgt hier von Typ IID über Typ IIA zu Typ I Fasern (Aigner *et al.* 1993). Das gesamte Spektrum umfaßt folgende Übergänge: TypIIB→ TypIID(X)→ TypIIA→ TypI β ⁴. Wie die durch Streckung induzierte Kraftentwicklung an gehäuteten Myofibrillen zeigt, weisen die MHC-Isoformen tatsächlich verschiedene Kinetiken auf, die gut mit der Kontraktionsgeschwindigkeit der Fasern korrelieren (Galler *et al.* 1994; Galler *et al.* 1996; Galler *et al.* 1997). Das bedeutet, daß die Kontraktionsgeschwindigkeiten tatsächlich in der molekularen Struktur der verschiedenen MHC-Isoformen begründet sind. Die schnell-zu-langsam Umwandlung ist energetisch vorteilhaft, da Typ I Fasern durch eine niedrigere „tension cost“ als Typ II Fasern charakterisiert sind (Crow und Kushmerick 1982; Bottinelli *et al.* 1994)⁵.

Auch bei Proteinen des dünnen Filaments wie dem Troponin und Tropomyosin werden schnelle durch langsame Isoformen ausgetauscht. Die größten Veränderungen sind beim Troponin T beobachtet worden. Hier findet zuerst ein Übergang innerhalb der vier schnellen Isoformen

⁴ Bei der CLFS des Kaninchens wird MHC α vorübergehend induziert, bevor der Übergang zu MHC β erfolgt.

⁵ Die „tension cost“ gibt die Menge an ATP an, die zur Entwicklung einer bestimmten Spannung benötigt wird.

nach dem Schema $TnT_{2f} \rightarrow TnT_{4f} \rightarrow TnT_{1f} \rightarrow TnT_{3f}$ statt. Anschließend wird TnT_{3f} durch die langsamen Isoformen TnT_{1s} und TnT_{2s} ausgetauscht (Härtner *et al.* 1989). Dieser Übergang korreliert zeitlich mit den Veränderungen innerhalb der MHC-Isoformen (Leeuw und Pette 1993). Das bedeutet, daß das Muster der Koexpression der MHC und von Troponin T während der CLFS erhalten bleibt. Auch beim α -Aktinin, das die Aktinfilamente in der Z-Scheibe lateral miteinander verbindet, wird die schnelle Isoform α -Aktinin_{2f} durch die langsame Isoform α -Aktinin_{1f/s} ausgetauscht (Schachat *et al.* 1988). Diese Veränderungen korrelieren zeitlich mit den Veränderungen der Troponin T Isoformen und mit der Zunahme der Dicke der Z-Scheibe (Eisenberg und Salmons 1981). Dickere Z-Scheiben charakterisieren den langsamen Muskel-Phänotyp (Eisenberg und Kuda 1976). Es ist möglich, daß der Austausch der myofibrillären Proteine von der Z-Scheibe aus dirigiert wird. Es muß Mechanismen geben, die für den koordinierten sequentiellen Umbau der Myofibrillen verantwortlich sind.

9.2 Die Veränderungen des Metabolismus

Die durch CLFS bewirkte Transformation von einem schnellen in einen langsamen Muskel ist von einer Erhöhung der aerob-oxidativen Kapazität begleitet. Diese manifestiert sich in der Zunahme an Enzymen des aeroben Stoffwechsels, der Mitochondriendichte und einer verbesserten Kapillarisation.

Frühe Anpassungen der Enzyme des Energiemetabolismus im stimulierten Muskel sind eine Induktion der Hexokinase II, deren mRNA bereits nach 12h einen ersten Höhepunkt (30-fache Erhöhung) erreicht, und die Translokation des Glukosetransporters 4 in das Sarkolemm (Hofmann und Pette 1994). Damit wird der erhöhte Bedarf an Glukose infolge der erhöhten Beanspruchung des Muskels gedeckt. Die späteren Anpassungen dienen der Erhöhung der aerob-oxidativen Kapazität. Es kommt zu einem umfangreichen Anstieg der Enzyme des aerob-oxidativen Stoffwechsels (Pette *et al.* 1972; Pette *et al.* 1973), der zeitlich mit dem Anstieg des relativen Mitochondrienvolumens korreliert (Reichmann *et al.* 1985). Während anfangs hauptsächlich Glukose als Brennstoff verwendet wird, findet allmählich eine Umstellung auf die Verbrennung von Fettsäuren statt. Diese ist nach 28d CLFS bei kontraktiver Aktivität auf die dreifache Menge erhöht, während der Glukoseverbrauch sich nicht von dem im unstimulierten Muskel unterscheidet (Hudlicka *et al.* 1980). Die Verbrennung von Fettsäuren wird durch die verbesserte Transportkapazität für Fettsäuren erleichtert. Tatsächlich steigt der

Gehalt des zytosolischen Fettsäure-Bindeproteins nach 21d CLFS auf den 3,5-fachen Wert an (Kaufmann *et al.* 1989).

Eine Verbesserung der Blutzufuhr wird durch die Vasodilatation (Hudlicka und Egginton 1994) und die verstärkte Kapillarisation im stimulierten Muskel erreicht. Schon nach 2d (Reichmann *et al.* 1985; Skorjanc *et al.* 1998) bzw. 4d (Brown *et al.* 1976) CLFS ist im Kaninchen ein Anstieg der Kapillaren pro Faser beobachtet worden, nach 10d hatte sich dieser Wert verdoppelt (Reichmann *et al.* 1985; Skorjanc *et al.* 1998). Der Blutfluß und Sauerstoffverbrauchs sowohl bei Ruhe als auch bei kontraktiver Aktivität ist nach 28d CLFS deutlich erhöht (Hudlicka *et al.* 1977). Die Sauerstoffaufnahme wird zusätzlich durch den erhöhten Myoglobingehalt (Pette *et al.* 1973; Kaufmann *et al.* 1989) erleichtert.

9.3 Die Veränderungen des Kalzium-regulierenden Systems

Auch die Freisetzung und Aufnahme von Kalzium wird durch die CLFS stark beeinflusst. Die Rate und Kapazität der Ca^{2+} -Aufnahme durch das SR ist in schnellen Muskeln des Kaninchen nach 2d CLFS um 50% reduziert (Heilmann und Pette 1979) Dies ist wahrscheinlich auf ein Abfallen der Aktivität der SR-Ca^{2+} -ATPase aufgrund einer Schädigung durch Proteinoxidation und Peroxynitrit vermittelte Nitrierung von Tyrosin zurückzuführen (Leberer *et al.* 1987; Klebl *et al.* 1998). Bereits nach wenigen Tagen setzt der Austausch der schnellen Isoform SERCA1a mit der langsamen Isoform SERCA2a ein (Leberer *et al.* 1989; Hicks *et al.* 1997;). Auch Phospholamban, das normalerweise im schnellen Muskel nicht exprimiert wird, kann durch CLFS induziert werden (Leberer *et al.* 1989). Der Zeitverlauf der Proteinmenge stimmt dabei mit dem der SERCA2a überein (Hu *et al.* 1995). Die mRNA für Parvalbumin, das als Ca^{2+} -Puffer im Cytosol von schnellen Muskeln wirkt (Heizmann und Berchtold 1987), nimmt in der Ratte mit einer Halbwertszeit von 26h ab (Leberer *et al.* 1986), jedoch ist die Abnahme auf Proteinebene stark verzögert (Huber und Pette 1996) und korreliert zeitlich mit dem Übergang von Typ IID zu Typ IIA Fasern. Damit folgt auch unter den Bedingungen der CLFS die Expression von Parvalbumin seiner Fasertyp-spezifischen Verteilung. Es wird in Typ IIA Fasern nicht mehr exprimiert. Der Proteingehalt der beiden an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Kalziumkanäle, dem Ryanodin-sensitiven Rezeptor und dem Dihydropyridin-sensitiven Rezeptor, ist nach 10d Stimulation im schnellen Muskel des Kaninchens deutlich gesunken (Ohlendieck *et al.* 1991). Zusammengenommen bedeutet dies,

daß die Kapazität der Freisetzung und Aufnahme von Kalzium durch die CLFS vermindert wird.

9.4 Die Reihenfolge der durch CLFS bedingten Anpassungen

Die Umwandlung der Fasertypen kann in der Ratte auf der Proteinebene ab einem Zeitpunkt von 6d mit einem starken Abfall von MHCIIb und einem drastischen Anstieg von MHCIIa beobachtet werden, dessen Anteil nach 36d im TA den Maximalwert von 80% erreicht hat (Jaschinski *et al.* 1998). Auch die Aktivität von Schlüsselenzymen des oxidativen Stoffwechsels wie der Citratsynthase und der Succinatdehydrogenase ist im Kaninchen erst ab einem Zeitpunkt von 10d erhöht und hat nach 50d immer noch nicht ihren Maximalwert erreicht (Skorjanc *et al.* 1998).

Bereits nach 8d CLFS, also noch vor der Umwandlung der Fasertypen und vor dem Anstieg der Aktivität mitochondrialer Enzyme, ist die Energiezufuhr in allen Fasern jedoch nicht mehr glykolytisch, sondern basiert offenbar weitgehend auf oxidativer Phosphorylierung (Green und Pette 1997). Eine verbesserte Sauerstoffzufuhr wird durch die Kapillarisation erreicht, die schon nach 2d einsetzt und sich bis nach 14d CLFS fortsetzt (Reichmann *et al.* 1985; Skorjanc *et al.* 1998). Zu diesem Zeitpunkt hat der Muskel im Kaninchen auch eine maximale Resistenz gegenüber Müdigkeit entwickelt (Simoneau *et al.* 1993). Das bedeutet, daß die verbesserte Blutzufuhr infolge erhöhter Kapillarisation hauptsächlich für die verbesserte Ausdauer verantwortlich ist und weniger die Erhöhung der aeroben Kapazität (Skorjanc *et al.* 1998).

Es gibt Hinweise dafür, daß im Kaninchen gleich nach Einsetzen der CLFS die schnellen Typ IIB und Typ IID(X) Fasern, deren Stoffwechsel vorwiegend glykolytisch ist, refraktär werden. Dafür spricht die erniedrigte isometrische Spannung von 40% im 1d lang vorstimulierten Muskel gegenüber dem nicht stimulierten Muskel (Cadefau *et al.* 1993). Erst nach 8d erreicht sie wieder einen Wert von 75% des Normalwertes (Green und Pette 1997). Auch elektromyographische Messungen (EMG) sprechen dafür, daß ein Teil der Muskelfasern einige Tage (6-8d) nach Beginn der CLFS refraktär ist (Klebl *et al.* 1998). Die EMG-Werte haben sich nach 10d und 20d CLFS deutlich erholt⁶. Dies wird als ein Indiz dafür interpretiert, daß die

⁶ Sie kehren allerdings nicht auf den Wert des unstimulierten Muskels, da sich inzwischen ein beträchtlicher Anteil der Fasern zu langsamen Muskelfasern transformiert hat. Diese sind durch ein kleineres Aktionspotential gegenüber schnellen Fasern gekennzeichnet (Hanson 1974).

inzwischen oxidativen Fasern wieder kontrahieren. Es ist allerdings noch unklar, ob dieses Phänomen auch bei der Ratte eintritt.

9.5 Regulatorische Faktoren bei der CLFS

Sind die Anpassungen des Muskels nach CLFS sehr umfassend beschrieben worden, so ist wenig über die regulatorischen Mechanismen und Signale bekannt. Es gibt inzwischen aber Hinweise, daß Metaboliten, kovalente Modifikationen und die Induktion von Genen mit regulierender Funktion eine Rolle spielen könnten.

9.5.1 Veränderung von Metaboliten

Durch die extreme Beanspruchung des zur permanenten Kontraktion gezwungenen Muskels kommt es zur Veränderung von zahlreichen Metaboliten. Jeder von diesen, der über längere Zeit verändert bleibt, ist ein potentieller Kandidat für eine regulatorische Funktion bei der CLFS. Green *et al.* (1992) stellten die Hypothese auf, daß die Energieladung, die als Verhältnis von ATP zu freiem ADP ausgedrückt wird, ein Signal für die Expression der verschiedenen MHC-Isoformen, aber auch für andere Veränderungen sein könnte. Im Gegensatz zu anderen Metaboliten, ist die Energieladung während der gesamten Dauer der CLFS erniedrigt (Green *et al.* 1992). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, daß auch infolge von durch β -GPA induzierter Erniedrigung der Energieladung ein moderater Übergang von schnellen zu langsamen MHC-Isoformen zu beobachten ist (Ren *et al.* 1995). In Untersuchungen an Einzelfasern konnte gezeigt werden, daß die Energieladung in allen Fasern des stimulierten Muskels erniedrigt ist (Conjard und Pette, unveröffentlichte Beobachtung). Es ist möglich, daß eine verringerte Energieladung die Funktion der Na/Ka-ATPase beeinträchtigt. Die dadurch bedingten Störungen des Ionengleichgewichtes könnten die Ursache dafür sein, daß Muskelfasern refraktär werden. Ebenso könnte die schnell-zu-langsam Transformation durch die verringerte Energieladung ausgelöst werden.

Ein weiterer Faktor ist O₂. Der erhöhte O₂-Verbrauch bei der CLFS könnte zu Hypoxie führen. Dadurch könnte die Kapillarisation induziert werden. Ein wichtiger Faktor bei der Angiogenese ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), der auch während der CLFS hochreguliert wird (Skorjanc *et al.* 1998; Hang *et al.* 1995). Die durch Hypoxie induzierte Expression von VEGF (Goldberg und Schneider 1994; Shweiki *et al.* 1992) wird durch ein

Hypoxie-sensitives Element im Promoter von VEGF reguliert (Minchenko *et al.* 1994). Es ist allerdings fraglich, ob bei der CLFS wirklich jemals Hypoxie auftritt.

Ein weiterer Faktor ist Kalzium. Es ist berichtet worden, daß die intrazelluläre Kalziumkonzentration des TA der Ratte in Ruhe unmittelbar nach Einsetzen der CLFS ansteigt (Sreter *et al.* 1987; Everts *et al.* 1993). Dieses Phänomen ist auch an Einzelfasern des m. Extensor digitorum longus (EDL) beobachtet worden (Carroll und Pette, unveröffentlichte Beobachtung). Der Anstieg der Kalziumtransienten, die nach 24h CLFS ihr Maximum erreichen, ist ein weiteres Indiz für eine regulatorische Rolle von Kalzium bei der CLFS (Carroll und Pette, unveröffentlichte Beobachtung). Dadurch könnten beispielsweise Kalzium-abhängige Proteinkinasen aktiviert werden, die wiederum die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflussen.

9.5.2 Kovalente Modifikation von Proteinen

Es gibt Hinweise darauf, daß die kovalente Modifizierung des Transkriptionsfaktors Myogenin eine Rolle bei der CLFS spielen könnte. An Myotuben des Huhnes ist gezeigt worden, daß die durch Denervierung induzierte Expression der α -Untereinheit von Azetylcholin durch elektrische Stimulation inhibiert werden kann. Dies erfolgt durch die Aktivierung der Proteinkinase C, die den Transkriptionsfaktor Myogenin phosphoryliert. Dieser verliert im phosphorylierten Zustand seine Fähigkeit, die Promotoren und Enhancer von Zielgenen zu aktivieren. Durch die kovalente Modifikation von myogenen Faktoren könnte bei der CLFS auch die Expression weiterer Gene reguliert werden.

9.5.3 Änderungen in der Genexpression

Durch die eben beschriebenen primären Ereignisse könnte eine Kaskade der Signaltransduktion in Gang gesetzt werden, die auf die Expression von Genen wirkt, die für Proteine mit regulatorischer Funktion kodieren. Im stimulierten Kaninchenmuskel ist bereits gezeigt worden, daß die mRNAs von c-jun, c-fos und egr-1 vorübergehend hochreguliert werden. Sie erreichen zwischen 4h und 8h CLFS ein Maximum, gefolgt von einem maximalen Proteingehalt nach 12h CLFS (Michel *et al.* 1994; Osbaldeston *et al.* 1995). Nach 7d CLFS erfolgt ein weiterer Anstieg im Proteingehalt, der bis zu 21d CLFS anhält. Alle drei Faktoren werden von *immediate early response* Genen kodiert. C-Jun und c-Fos bilden zusammen den Transkriptionsfaktor AP-1, der

eine wichtige Rolle bei der Differenzierung vieler Zellen und bei der Zellantwort auf physiologische Reize spielt. (Bohmann *et al.* 1987; Ransone und Verma 1990).

Die Induktion der Hitzeschockproteine HSP70 und α B-Krystallin ist im stimulierten m. Tibialis anterior (TA) des Kaninchens beobachtet worden (Neufer *et al.* 1996; Neufer und Benjamin 1996). Der Gehalt an mRNA von HSP70 steigt nach 24 h CLFS auf den 50-fachen Wert an, nimmt danach ab und erhöht sich ein weiteres Mal nach zwei Wochen CLFS. Der Proteingehalt ist nach 14d auf den 10-12-fachen Wert gestiegen. Ein ähnliches zeitliches Expressionsmuster ist für α B-Krystallin beobachtet worden. Die Expression beider Faktoren ist anfangs auf Typ I Fasern beschränkt, breitet sich später jedoch auch auf Typ II Fasern aus. Ihr Anstieg ist von erhöhten mRNA-Mengen der vier myogenen Faktoren MyoD, Myogenin, *myf-5* und MRF4 begleitet.

Die Frage bleibt offen, ob der Induktion von Hitzeschockproteinen und *immediate early response* Genen eine Bedeutung für die schnell-zu-langsam Transformation zukommt. Diese Proteine könnten vielleicht auch nur eine Reaktion auf den Streß sein. Im Kaninchenmuskel ist eine umfassende Degeneration der durch CLFS geschädigten Muskelfasern beobachtet worden (Maier *et al.* 1986).

10 Der Beitrag der vorliegenden Arbeit

10.1 Zielsetzung

Im vorigen Kapitel ist das Modell der CLFS vorgestellt worden, das besonders gut geeignet ist, um die Plastizität der “terminal differenzierten” Skelettmuskulatur zu untersuchen. Es ist gezeigt worden, daß durch CLFS die Umwandlung eines schnellen, leicht ermüdbaren in einen langsam-zuckenden, ausdauernden Muskel induziert wird. Dieser Prozeß der tiefgreifenden Umorganisation beinhaltet den Austausch von schnellen durch langsame Isoformen myofibrillärer Proteine, die Umwandlung von einem glykolytischen zu einem oxidativen Energiestoffwechsel und die Anpassung des Systems der Kalziumfreisetzung und –aufnahme an die Erfordernisse eines langsamen Muskels. Die Transformation des Muskels, die mehrere Wochen andauert, vollzieht sich in geordneter Weise und beinhaltet, wie der sequentielle Übergang der verschiedenen Isoformen von MHC und Troponin T besonders deutlich zeigt, mehrere Zwischenstufen. Die strenge Kopplung diskreter Isoformen von MHC und Troponin T und auch anderer Proteine legt, die Vermutung nahe, daß es übergeordnete Mechanismen gibt, die den Prozeß der schnell-zu-langsam Transformation koordinieren.

Als regulierende Faktoren werden metabolische Parameter wie die erniedrigte Energieladung, erhöhte Kalziumtransienten und Schwankungen in der Sauerstoffversorgung diskutiert. Auch die kovalente Modifikation durch Phosphorylierung von regulatorischen Proteinen könnte eine Rolle spielen. Diese und/oder andere Faktoren könnten zu der Kaskade der Signaltransduktion beitragen, die schließlich die Expression von Proteinen mit regulatorischer Funktion induziert. *Immediately early response* Proteine (c-jun, c-fos und egr-1) und Hitzeschockproteine (HSP-70 und α B-Krystallin) sind als Kandidaten für eine solche Funktion im Kaninchen vorgeschlagen worden. Es ist aber fraglich, ob diese Faktoren ursächlich an der schnell-zu-langsam Transformation beteiligt sind oder vielmehr Zellstreß reflektieren.

Das Ziel meiner Dissertation bestand darin, regulatorische Proteine zu identifizieren, die durch CLFS hochreguliert werden. Dabei wurde die Methode des *Differential Display* (Liang und Pardee 1992; Liang *et al.* 1993) gewählt, um differentiell exprimierte mRNA zu identifizieren. Mit dieser Methode kann ein großer Teil der in einem Gewebe exprimierten mRNA dargestellt werden. Ein großer Vorteil des *Differential Display* gegenüber anderen Methoden wie etwa der subtraktiven Hybridisierung besteht darin, daß mehr als zwei Zell- oder Gewebetypen miteinander verglichen werden können. Zudem ist es möglich, Änderungen des Gehaltes

spezifischer mRNA in beiden Richtungen, d.h. sowohl erniedrigte als auch erhöhte Mengen der mRNA nach CLFS darzustellen.

10.2 Die Methode des Differential Display

Die Methode des *Differential Display* dient dem Nachweis von differentiell exprimierter mRNA (Liang und Pardee 1992; Liang *et al.* 1993). Sie beruht auf der Amplifikation einer Subpopulation der in den untersuchten Geweben oder Zellen exprimierten mRNA durch reverse Transkription (RT) und anschließender Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Besonderheit der *Differential Display* RT-PCR liegt in den Primern: Für die reverse Transkription wird ein Poly(T)-Primer, mit einem zusätzlichen Anker von ein oder zwei Nukleotiden verwendet (3'-Primer). Damit wird die mRNA vom Ansatz des Polyadenylschwanzes aus revers transkribiert. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem Satz aus 9 3'-Primern mit der Sequenz T₁₁VV⁷ gearbeitet (Abbildung 3). Derselbe Primer wie für die reverse Transkription wird auch in der PCR zusammen mit einem arbiträren Dekamer (5'-Primer) eingesetzt (Abbildung 3). Dieses bindet mit statistischer Wahrscheinlichkeit an komplementäre Sequenzen, so daß bei jeder PCR etwa 20-100 cDNAs amplifiziert werden.

Die PCR-Produkte werden elektrophoretisch mit Hilfe von Sequenziergelen aufgetrennt. Durch den Vergleich des Bandenmusters werden differentiell exprimierte Gene identifiziert. Prinzipiell ist es möglich, durch die Anwendung vieler Primerkombinationen, sämtliche PolyARNAs in dem untersuchten Gewebe oder Zelltyp darzustellen und zu vergleichen. Bauer *et al.* (1993) haben aufgrund theoretischer Überlegungen die Behauptung aufgestellt, daß sich mit 25 Dekameren 95% der mRNA erfassen lassen⁸. Durch den Einbau von radioaktiv markierten Nukleotiden können die PCR-Produkte im Autoradiogramm nachgewiesen werden. Das Autoradiogramm dient auch dazu, differentiell exprimierte Banden auf dem Gel zu lokalisieren und zu isolieren. Die cDNA kann ein weiteres Mal amplifiziert werden und steht dann für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

⁷ V=A,C oder G. Primer mit T in der letzten Position sind ungeeignet, weil sie unspezifisch an den Polyadenylschwanz binden können.

⁸ Diese Behauptung wird allerdings durch Beobachtungen aus der Praxis eingeschränkt. Viele Sequenzen werden durch mehrere Banden vertreten, außerdem sind in wenigen Kopienzahlen exprimierte mRNAs unterrepräsentiert.

Schematische Darstellung des *Differential Display*

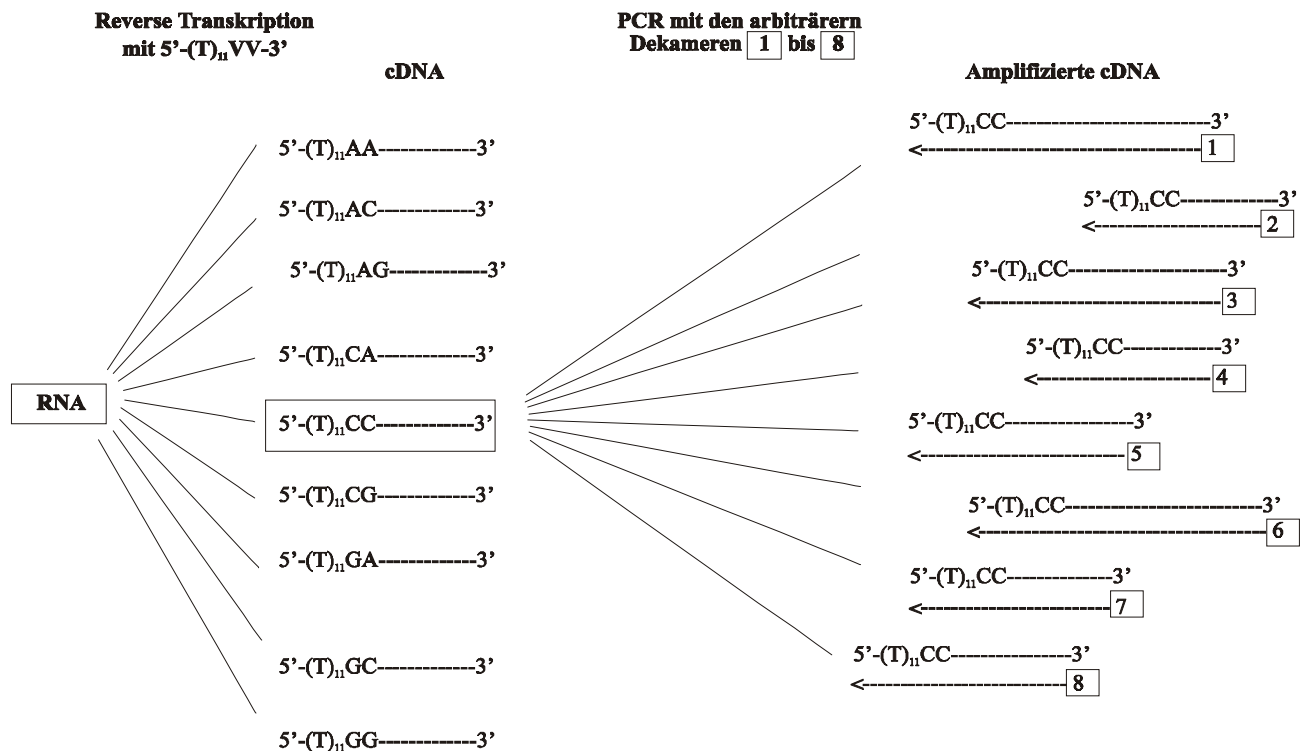


Abbildung 3: Die Kombination der Primer für die reverse Transkription und PCR im *Differential Display* ist hier schematisch dargestellt. Jede cDNA wurde mit 8 verschiedenen 5'-Primern amplifiziert.

10.3 Die Wahl der Versuchstiere und der untersuchten Muskeln

Um die frühen Veränderungen in der Genexpression infolge von CLFS zu untersuchen, wurden Ratten als Versuchstiere gewählt. Diese sind für die gewählte Fragestellung besser geeignet als Kaninchen, da CLFS in Ratten ausschließlich die schnell-zu-langsam Transformation induziert, während dieser Prozeß im Kaninchen von der Schädigung und Regeneration eines beträchtlichen Anteils der Muskelfasern überlagert ist (Maier *et al.* 1986; Delp und Pette 1994). Die Untersuchungen konzentrierten sich auf den schnellen m. Tibialis anterior (TA), dessen schnell-zu-langsam Transformation gut untersucht ist. Der TA besteht aus einem „weißen“ Kortex und einem „roten“ Kern. Beide Anteile bestehen jedoch zu über 90% aus den schnell-

zuckenden Typ II Fasern (Tabelle 2). Der stimulierte Muskel wurde mit dem kontralateralen Muskel desselben Tieres verglichen. Zusätzlich wurde noch der langsame Soleus mit in die Studie einbezogen, der sich zu 84% aus Typ I Fasern zusammensetzt (Tabelle 2). Durch den Vergleich von diesen drei Muskeln war es möglich zu unterscheiden, ob die identifizierten mRNAs lediglich die durch CLFS induzierten Änderungen spezifizieren oder auch den langsamen Muskel-Phänotyp.

Prozentuale Zusammensetzung der Fasertypen von TA und Soleus

Muskel	Typ I	Typ IIA	Typ IID(X)	Typ IIB
TA (rot)	7±2	30±3	37±7	26±1
TA (weiß)	2±1	18±5	34±2	46±8
Soleus	84±6	7±0	9±6	0

Tabelle 2: Die Werte drücken den prozentualen Anteil an der Gesamtzahl der Fasern ± SD aus. (aus Delp und Duan 1996)

Da sich erste Veränderungen des mRNA-Gehalts von Parvalbumin (Leberer und Pette 1986) und der Hexokinase II (Hofmann und Pette 1994) bereits innerhalb des ersten Tages nach Einsetzen der CLFS beobachten lassen, wurde die Stimulationsdauer auf 12h beschränkt. Damit sollte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, mRNAs von Proteinen zu identifizieren, die eine regulatorische Funktion bei der CLFS haben.

10.4 Das experimentelle Vorgehen

Für den *Differential Display* wurde die Gesamt-RNA vom kontralateralen und einem 12h stimulierten TA dargestellt. Einige differentielle Banden wurden nach der Elution aus dem Gel kloniert und sequenziert. Nach ihrer Identifizierung durch die Homologiesuche mit BLAST (Altschul *et al.* 1997)⁹ wurde die differentielle Expression mit der Methode des Northern Blot und mit semiquantitativer RT-PCR überprüft. Da zwei der identifizierten mRNAs von höchstem Interesse sind, wurde es vorgezogen, deren Expression auf Proteinebene weiter zu analysieren, statt mit der Identifizierung weiterer differentieller Banden fortzufahren. Das Potential der Methode des *Differential Display* kann in einer einzigen Arbeit nicht ausgeschöpft werden. In Immunoblots und immunhistochemischen Untersuchungen konnten interessante und überraschende Informationen über die zwei identifizierten regulatorischen Proteine gewonnen werden. Daraus ergeben sich wertvolle Informationen über deren potentielle Funktion bei der Transformation des Skelettmuskels infolge von CLFS.

⁹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

B Material und Methoden

1 Tiere und Elektrostimulation

Für die Untersuchungen wurden adulte männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 400g-470g verwendet. Den Tieren wurden für die indirekte chronische Elektrostimulation Elektroden seitlich an den Peronealnerven implantiert (Simoneau und Pette 1988). Die Elektrostimulation des m. Tibialis anterior (TA) erfolgte mit einem tonischen Impulsmuster von 10 Hz (Impulseweite von 0,2ms) für 12h bzw. 1d, 2d, 4d und 8d (jeweils 24h/d). Der Elektrostimulator war dabei am Rücken der Tiere befestigt und wurde über eine Photozelle mit Licht an- und ausgeschaltet. Die Muskeln wurden direkt nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert. Für die Untersuchungen wurden den Tieren der Soleus, der kontralaterale und der stimulierte TA, sowie in einigen Fällen auch Herz, Leber und Peronealnerv entnommen. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden die Muskeln in gestrecktem Zustand in Isopentan eingefroren.

2 Differential Display

2.1 RNA-Präparation

Nach Chomczynski und Sacchi (1987): Die gefrierfixierten Muskeln wurden im mit Stickstoff gekühlten Mörser pulverisiert. Bis zu 500mg Muskelpulver wurden in 2ml GTC-Lösung (4M Guanidinium-Thiocyanat, 25mM Natriumcitrat (pH7), 0,5% Sarkosyl, 0,1M β -Mercaptoethanol) eingewogen und sofort mit einem Rührstab (Polytron, Littau, Schweiz) bei 16000 U/min homogenisiert. Die erste Phenol-Chloroform-Extraktion erfolgte durch Zugabe von 0,25ml 2M Natriumacetat (leicht schütteln), 2,5ml Phenol (leicht schütteln) und 1,0ml Chloroform (stark vortexen). Die Phasentrennung erfolgte 10min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 10min lang bei 10000g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt. Die zweite Phenol-Chloroform-Extraktion erfolgte durch Zugabe von 2,5ml Phenol und 2ml Chloroform, das Gefäß wurde invertiert und für die Phasentrennung 10min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach abermaliger Zentrifugation für 10min bei 10000g und Raumtemperatur wurde die wäßrige Phase wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde durch die Zugabe von 2,5ml 2-Propanol für 1h bei -

45°C gefällt, 10min bei 10000g und 4°C zentrifugiert, und das Pellet wurde in 0,4ml GTC-Lösung resuspendiert. Die zweite Fällung erfolgte mit 0,6ml 2-Propanol für 1h bei -45°C. Danach wurde 10min lang bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 0,5ml 70%igem Ethanol gespült, jeweils 5min bei 13000 U/min (4°C) zentrifugiert, an der Luft getrocknet und in 100-200µl RNase-freiem TE-Puffer (10mM TrisCl (pH7,6), 10mM EDTA, (pH8,0)) resuspendiert. Dazu wurde die RNA mehrmals mit der Pipette aufgenommen und wieder ausgestoßen, 10min auf 65°C erhitzt und auf Eis gelegt.

2.2 RNA-Gelelektrophorese

Zur Entfernung von RNasen wurden Gelplatte, Gelkammer und Kämme über Nacht in 1% SDS eingelegt. Aliquots der RNA-Präparation (10µg) wurden mit 1µl Ethidiumbromid (100µg/ml) und 15µl 1,33x Probenpuffer (50% Formamid, 6% Formaldehyd, 0,2mM EDTA, 10% Glycerin, je 0,008% Bromphenolblau und Xylencyanol, 0,08% SDS, 30mM MOPS (pH7,4)) versetzt, 5 min bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem Formaldehyd-Agarosegel (1% Agarose in 0,5x MOPS-Puffer (pH7,4); 8% Formaldehyd) in einem Laufpuffer aus 0,5x MOPS-Puffer, (10x MOPS-Puffer: 0,2M MOPS (pH7,4) und 0,01M EDTA) bei maximal 140V während 1 bis 2h. Im UV-Licht (254nm) deutliche, vor wenig Hintergrundfärbung erkennbare Banden der 28S und 18S rRNA bestätigten die Reinheit und Integrität der präparierten RNA.

2.3 Differential Display Reverse Transkription

Nach Liang *et al.* (1993): 0,2µg RNA wurden in einem Volumen von 20µl revers transkribiert. Der Ansatz enthielt 1x RT-Puffer (GIBCO BRL, Eggenstein), 20µM dNTP (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 0,1% DTT, 2,5µM Downstream-Primer (Display Systems, Paris, Frankreich) und 5 Units MMLV-Reverse Transkriptase (RNaseH-frei, GIBCO BRL) Für jeden Downstream-Primer (d1-d9) wurde eine eigene Reaktion angesetzt. Folgendes Temperaturprofil wurde gewählt: 65°C für 5min; 37°C für 60min; 75°C für 5min. Die MMLV-Reverse Transkriptase wurde nach 10min bei 37°C dazugegeben. Es wurden Aliquote zu je 1µl cDNA und 3µl H₂O hergestellt und bei -20°C eingefroren.

2.4 Differential Display Polymerase Kettenreaktion

Nach Liang *et al.* (1993): Folgende Komponenten wurden in dieser Reihenfolge auf Eis in ein dünnwandiges 0,2ml-Reaktionsgefäß (Biozym, Hessisch Oldendorf) zu einem Gesamtvolumen von 20µl pipettiert: H₂O, 1x Amplifikationspuffer (Pharmacia) 0,5µM je dNTP (Pharmacia), 1,5mM MgCl₂, 0,5µM Upstream-Primer (Display Systems), 2µM Downstream-Primer (Display Systems), 0,1µM (2µCi) α-[³³P]dATP (Amersham, Little Chalfont, Großbritannien), Taq-Polymerase (Pharmacia). Zuletzt wurde alles zu den 4µl an aliquotierter cDNA pipettiert. Die Gefäße wurden gevortext, zentrifugiert und in den auf 4°C vorgekühlten Thermocycler (PTC-100, MJ Research, Watertown, USA) gestellt. Die PCR wurde nach dem folgendem Protokoll durchgeführt: 90sec bei 94°C; 30sec bei 94°C; 2min bei 40°C; 30sec bei 72°C; insgesamt 40 Zyklen; 5min bei 72°C. Je 9 Downstream-Primer (d1-d9) der Sequenz T₁₁VV (V=A,C oder G) wurden mit je 8 Upstream-Primern (u1-u8: GTTCATAGCC, CTGCATGATG, GAACCAGTAC, GATGGCATTG, ATACTCCGTC, TGCTAAAGGG, GTTCATGGTC, TTATGGCTCC) kombiniert.

2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung im Sequenziergel

Die Elektrophorese erfolgte mit dem Macrophor Sequencing System LKB2010 (LKB, Bromma, Schweden). Denaturierende Polyacrylamidgele [6% Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), 1x TBE (10mM Tris, 83,1mM Borsäure, 1mM EDTA), 7M Harnstoff, 0,08% APS, 0,08% TEMED] von den Ausmaßen 41x 15x 0,4cm wurden nach den Angaben des Herstellers gegossen. Nach 2h Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und in einem Wasserkreislauf auf 56°C temperiert. Im Elektrophoresepuffer (1x TBE) wurde das Gel mit Kämmen 30min lang vorlaufen gelassen. Die auf ein Volumen von 1-2µl reduzierte cDNA wurde in 5µl Probenpuffer (USB, Cleveland, USA) für 3min bei 90°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gelegt. Zwischen 2 und 5µl von jeder Probe wurden in die gut gespülten Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte unter folgenden Bedingungen: Spannung =1700V, Stromstärke =35mA, Leistung =60W, Temperatur =56,5°C, Dauer =3h. Sie wurde abgestoppt, nachdem das Xylencyanol durchgelaufen war (106 Nukleotide). Das Gel wurde auf Whatman-Papier (3MM Chr, Whatman International, Maidstone, England) übertragen und etwa 2h lang bei 65°C getrocknet. Zur Orientierung wurden zwei Fluoreszenzkleber (Stratagene, Heidelberg) befestigt. Ein Röntgenfilm (Biomax MR, Kodak, Rochester, USA) wurde über Nacht exponiert und am nächsten Tag entwickelt.

2.6 Identifikation und Reamplifikation differentiell exprimierter Banden

Auf dem Autoradiogramm wurde das Bandenmuster von stimulierten und nicht-stimulierten TA-Muskeln verglichen. Differentielle Banden in zwei verschiedenen Tieren wurden mit einem Stift markiert. Das Autoradiogramm wurde mit dem getrockneten Gel mit Hilfe der Fluoreszenzkleber in Deckung gebracht und fixiert. Mit einer Nadel wurde durch das Autoradiogramm an den vier Ecken der Bande durchstochen und das darunterliegende Gel somit markiert. Mit einem Skalpell wurde das markierte Stück ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dort wurde es in 100µl H₂O 10min lang getränkt und bei 100°C für 15min gekocht. Gel und Papier wurden durch Zentrifugation für 2min pelletiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden das 0,1fache Volumen an 3M Natriumacetat, das 4,5fache Volumen an Ethanol und Glykogen (Endkonzentration von 91µg/ml) hinzugefügt. Die Fällung dauerte 30min bei -70°C. Die DNA wurde für 10min bei 4°C pelletiert, in 200µl 85%igen Ethanol gespült, nochmals 5min zentrifugiert und nach dem Trocknen in 10µl H₂O resuspendiert. 4µl wurden für die Reamplifikation verwendet. Diese erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die *Differential Display* PCR mit folgenden Abwandlungen: Das Reaktionsvolumen betrug 40µl, die Konzentration für die dNTPs betrug 5µM je Nukleotid, radioaktives dATP wurde nicht hinzugefügt.

3 Klonierung

3.1 Überprüfung und Reelution der identifizierten cDNAs

Der Erfolg der Reamplifikation (Kapitel 2.6) wurde auf einem 1,5%igen Agarosegel (1,5% Agarose 0,5x TBE) überprüft. 16µl der PCR-Produkte wurden mit Probenpuffer versetzt und im elektrischen Feld getrennt. Die Länge der DNA wurde anhand von Markern abgeschätzt. Bei mehreren Amplifikationsprodukten wurde das mit der passenden Größe ausgewählt. Im langwelligen UV-Licht wurden die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem QIAquick-Extraktionskit (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

3.2 T-Addition

6µg des pBluescript® II SK+ Phagemids (Stratagene) wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRV vollständig linearisiert, auf einem Agarosegel gereinigt und überprüft. Das lineare Plasmid wurde mit dem QIAquick-Extraktionskit (QIAGEN, Hilden) aus dem Gel eluiert und gereinigt. An die 3'-Enden wurde in einem Reaktionsansatz von 20µl (1x *Taq*-Puffer (Pharmacia) 1mM TTP, 2,5units *Taq*-Polymerase (Pharmacia)) 2h lang bei 75°C Thymidinmonophosphat addiert. Die DNA wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion, Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung gereinigt und in 10µl H₂O resuspendiert.

3.3 Ligation

20ng linearisierter Vektor wurde mit einem bis zu 30-fachen Überschuß an gereinigtem PCR-Produkt mit 2,5units an T4-Ligase (Boehringer Mannheim) in 1x Ligationspuffer (Boehringer Mannheim) bei 16°C über Nacht ligiert. Einige Ligationen wurden auch mit wechselnden Temperaturen von 16°C bis 22°C, die in Schritten von 1°C jede Minute alterierten, durchgeführt.

3.4 One Step E-coli Transformation

Nach Chung und Miller (1993) Die *E. coli* Stämme TG1 oder XL1-BlueMRF['] wurden in 20ml Luria-Bertani Medium (LB: 10g Baktotrypton, 5g Bakto-Hefeextrakt, 10g NaCl auf 1l H₂O, pH7) angeimpft. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600nm (OD₆₀₀) verfolgt und bei einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 gestoppt. Die Bakterien wurden bei 1000g und 4°C für 10min pelletiert und in 1/10 Volumen eiskaltem TSS (10% Polyethylenglykol 8000, 5% Dimethylsulfoxid, 20mM MgCl₂; pH 6,5-6,8) resuspendiert. Aliquote von 100µl wurden 5-15min auf Eis inkubiert, bevor 1µl des Ligationsansatzes dazugegeben wurde. Die Transformation erfolgte zwischen 30 und 60min auf Eis. Die Bakterien wurden nach Zugabe von 0,9ml LB-Medium und 20mM Glukose 1h bei 37°C inkubiert, auf LB_{Amp}-Agarplatten (LB mit 20µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Es wurden Transformationseffizienzen zwischen 10⁶ und 10⁷ Kolonien pro zirkulärem Plasmid erreicht. Bande 19, 21, 22, 24, 35, 41 und 43 wurden mit dieser Methode in TG1 transformiert.

3.5 Herstellung kompetenter Zellen

Nach Inoue *et al.* (1990): Der *E. coli* Stamm XL1-BlueMRF^c wurde über Nacht in etwa 3ml SOB-Medium (2% Baktotrypton, 0,5% Hefeextrakt 10mM NaCl, 2,5mM KCl) und 20mM MgSO₄ angeimpft. 240ml SOB-Medium wurden mit 1,5ml der Vorkultur angeimpft. Die Kultur wurde 18-19h bei 18°C und 225 U/min auf einem Schüttler inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,69-0,7 wurde das Wachstum durch Abkühlung auf Eis unterbrochen. Die Kulturen wurden 10min bei 3500 U/min und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 80ml Transformationspuffer (10mM Pipes, 55mM MnCl₂, 15mM CaCl₂, 250mM KCl) resuspendiert. Nach der Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wurde das Pellet in 20ml Transformationspuffer langsam resuspendiert. Dimethylsulfoxid wurde zu einer Endkonzentration von 7% hinzugefügt. Nach 10-minütiger Ruhe auf Eis wurden die kompetenten *E. coli* zu 400µl oder 600µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. (Lagerung von mehreren Monaten möglich)

3.6 Transformation

Nach Hanahan (1983): 200µl kompetente Stämme von XL1 MRF^c (Kapitel 3.5) wurden unmittelbar nach dem Auftauen mit 1µl ligierten Plasmid auf Eis gemischt und 30min lang ebenfalls auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 30sec bei 42°C. Die Bakterien wurden für 2-5min auf Eis gelegt, mit 1ml SOB und 20mM Glukose gemischt und 30min unter starkem Schütteln bei 37°C kultiviert. Unter leichtem Zentrifugieren wurden die Bakterien pelletiert und in 200µl SOB-Medium und 20mM Glukose aufgenommen. Sie wurden auf LB_{Amp}-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Bande 4, 8 und 32 wurden auf diese Art kloniert.

3.7 Die klonierten cDNAs

Die aus dem *Differential Display* Gel eluierten und reamplifizierten DNA-Fragmente Bande 4, 8 und 32 wurden mit AT-Klonierung (Kapitel 3.2) in das Plasmid pBluescript[®] SK(+)Phagemid kloniert. Bande 19, 21, 22, 24, 35 und 43 wurde mit Restriktionsschnittstellen enthaltenden Primern reamplifiziert und nach der Restriktionsverdauung mit HindIII und PstI in das Plasmid pBluescript[®] SK(+) Phagemid kloniert. Bande 41 wurde mit Hilfe des pCR-Script Amp SK(+) Klonierungs Kits in das Plasmid pCR-Script[™] SK(+) nach den Angaben des Herstellers kloniert (Stratagene).

3.8 Plasmidminipräparation

1,5ml-Kulturen von *E. coli* wurden kurz abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100µl Puffer 1 (50mM TrisCl (pH8), 10mM EDTA) resuspendiert. 200µl Puffer 2 (200mM NaOH, 1% SDS) wurde dazugeben und das Reaktionsgefäß invertiert, 150µl Puffer 3 (2,55M Kaliumacetat (pH4,8)) wurden dazugegeben und das Reaktionsgefäß invertiert. Nach 5min Zentrifugation wurde der Überstand in neues Reaktionsgefäß überführt. (fakultativ: 200µl Phenol und 200µl Chloroform wurden dazugegeben und 5min lang zentrifugiert.) Ein 2,5-faches Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natriumacetat wurde hinzupipettiert, gut gemischt und 5min lang abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500µl 80%igen Ethanol gewaschen, nochmals 5min lang zentrifugiert und an der Luft getrocknet. Zuletzt wurde es in 20-50µl H₂O resuspendiert.

4 Sequenzierung der klonierten cDNAs

Die klonierten cDNAs Bande 32, Bande 8 und Bande 4 wurden eigenhändig sequenziert. Die Sequenzreaktionen wurde nach der Didesoxynukleotidmethode mit dem DIG-*Taq* DNA-Sequenzierungs Kit (Boehringer Mannheim) unter Verwendung von mit Digoxigenin markierten Standardprimern (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 2.5) aufgetrennt und anschließend in einem Vakuumtrockner 10min lang auf eine Nylonmembran transferiert (Hybond N, Amersham). Anschließend wurde die Membran mit dem Gel 3min lang unter UV-Licht (254nm) fixiert. Die Membran wurde 1min lang in Puffer 1 (100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, 0,3% Tween20, pH7,5) äquilibriert und anschließend 1h lang mit 0,5% in Puffer 1 gelöstem Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim) blockiert. Der an alkalische Phosphatase gekoppelte Anti-Digoxigenin-Antikörper wurde 1:15000-fach in der Blockierungslösung (Boehringer Mannheim) verdünnt und 30min bei Raumtemperatur auf die Membran appliziert. Danach wurde die Membran 4x 15min lang in Puffer 1 gewaschen. Sie wurde in Puffer 3 (100mM Tris (pH9,5), 100mM NaCl) äquilibriert und mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD, das 1:1000 in Puffer 3 verdünnt worden war, 5min lang zwischen zwei Plastikfolien inkubiert. Nach kurzem Abtropfen auf ein Papiertuch wurde die Membran zwischen zwei neuen Plastikfolien 15min lang bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurde ein der Röntgenfilm Fuji RX (Fuji Photo Film, Düsseldorf) aufgelegt und nach einer Exposition von 2h bis 16h entwickelt.

Die Sequenzierung der übrigen cDNAs wurde in Auftrag gegeben: L19, L21, L22, L24 und L35 wurden von der Firma GATC (Konstanz), L29, L41 und L43 von der Firma Sequiserve (München) sequenziert. Die DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms BLAST des NCBI (National Center for Biotechnology Information) mit bereits beschriebenen Sequenzen in der Datenbank (GenBank) verglichen.

5 Northern Blot Hybridisierung

5.1 Northern Transfer

Es wurde ein alkalischer Kapillartransfer nach Chomczynski (1992) durchgeführt: Der Transferpuffer (8mM NaOH, 3M NaCl, 2mM Sarkosyl) wurde über eine Brücke aus 2 Whatmanpapieren durch Kapillarkräfte auf einen „Sandwich“ mit dem folgenden Aufbau übertragen (von unten beginnend): Stapel an Zellulosetüchern, fünf in Transferpuffer getränkte Whatmanpapiere, in Transferpuffer getränkte Nylonmembran (Hybond N, Amersham), in H₂O äquilibriertes Gel, drei in Transferpuffer getränkte Whatmanpapiere, Küchenfolie, zwei Gewichte. Der Transfer vom Gel auf die Membran wurde 2-3h lang durchgeführt. Anschließend wurde die Membran 15min lang in 0,2M Natriumphosphatpuffer (pH6,7) äquilibriert, 15 min bei 80°C getrocknet und 3min lang unter UV-Licht (254nm) fixiert.

5.2 Hybridisierung

Zwei Oligonukleotide mit der Sequenz CCCTGAGAATTCACCATGCCG (MLP-oligo 1) und AAATGCACTCGAGCTACAAAGGAGGC (MLP-oligo 2) wurden zur Amplifikation einer 700 Bp langen, gegen MLP gerichteten DNA-Sonde synthetisiert (Interactiva, Ulm). 0,2µg cDNA, die durch reverse Transkription von Soleus RNA (Primer T₁₁GC) synthetisiert worden war, wurde in einem Reaktionsansatz aus 200nM MLP-oligo1, 200nM MLP-oligo2, 200µM dNTP, 100µM Dig11-dUTP (Boehringer Mannheim), 1x *Taq*-Puffer (Pharmacia), einer Einheit *Taq*-Polymerase (Pharmacia) mit dem folgenden Temperaturprofil amplifiziert: 3min bei 95°C, (30sec bei 95°C, 30sec bei 60°C, 1 min bei 72 °C) x35 Zyklen, 3min bei 72°C. Die Integrität der Sonde wurde auf einem 1%igen Agarosegel überprüft. 1µl der Sonde wurde für 2ml Hybridisierungslösung (50% Formamid, 5x SSC-Puffer, 50mM Natriumphosphat pH7, 2% Blocking-Reagenz (Boehringer, Mannheim), 0,1% Lauroylsarcosin, 50µg/ml Hefe RNA) verwendet. Die Prähybridisierung wurde bei 50°C für 2h, die Hybridisierung bei 68°C über

Nacht durchgeführt. Die Membran wurde anschließend zweimal für 5min in 2x SSC und 0,1% SDS und zweimal für 15min in 0,5x SSC und 0,1% SDS bei 68°C gewaschen. Die Detektion erfolgte mit einem an alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-Digoxigenin Antikörper und dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD nach den Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim).

6 Die semiquantitative RT-PCR

Für die Synthese von cDNA wurden folgende Komponenten eingesetzt: 1µg denaturierte, gelöste RNA, 10units AMV-Reverse Transkriptase (Pharmacia), AMV-Puffer (Pharmacia), 12,8units RNAsin (Boehringer Mannheim), 250µM je dNTP und 1µM des Primers GCAGCACCAAGATAACATTACAA. Die Ansätze wurden für 60min bei 50°C inkubiert. Für die PCR wurden 2µl der verdünnten cDNA in einem Gesamtvolumen von 20µl amplifiziert. Der Ansatz enthielt folgende Komponenten: 0,75units *Taq*-Polymerase (Pharmacia), 1x *Taq*-Puffer (Pharmacia), je 0,2µM TCTTCCAAGGACACGTTACAGG, GCAGCACCAAGATAACATTACAA, 200µM dNTP Es wurden jeweils Doppelansätze hergestellt. Folgendes Protokoll wurde für die Amplifikation verwendet: 95°C für 30sec, 50°C für 30sec, 72°C für 1min, 31 Zyklen; vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 3min lang auf 95°C erhitzt, zum Schluß 3min lang bei 72°C elongiert. Die PCR-Produkte wurden im Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Unter dem UV-Licht wurde es photographiert. Die densitometrische Auswertung der Filmschwärzung erfolgte durch zweidimensionale Integration mit dem Bildauswertungssystem von Syncotec (Asslar, Deutschland), das aus einer Videokamera und einem Bildprozessor besteht. Mit dem Programm wurde ein Negativ des Photos erzeugt und die nun dunkle Bande densitometrisch ausgewertet. Zur Abschätzung der relativen Änderung des mRNA-Gehaltes wurde folgendermaßen verfahren: Ausgehend von der Bandenintensität des nicht-stimulierten TA wurden in ihrer Intensität flankierende Banden des 12h stimulierten TA ausgewählt. Von den Extinktionswerten dieser vier Banden (Doppelbestimmungen von zwei Verdünnungen) wurde eine Regressionsgerade erstellt und über Einsetzen der Extinktionswerte des nicht stimulierten Muskels in die Geradengleichung die entsprechende cDNA-Verdünnung vom stimulierten Muskel ermittelt. Durch Vergleich dieser ermittelten Verdünnung mit der des nicht-stimulierten TA konnte der Unterschied im mRNA-Gehalt abgeschätzt werden.

7 Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen MLP

7.1 PeptidAuswahl und Immunisierung

Ein Hydrophobizitätsprofil von MLP wurde mit Hilfe der Software „PC-Gene“ analysiert (Kyte und Doolittle 1982). Es wurden drei Sequenzbereiche für die Immunisierung ausgewählt: GGLTHQVEKKE (Peptid 1), KSLESTNVTNKN GEL (Peptid 2) und NPSKFSAKFGESEKCPR (Peptid 3). Diese wurden 8 Mal an ein Poly-L-Lysin-Gerüst [(Peptid 1-3)₈K7A (Tam 1988)] gekoppelt (Institut für Peptidforschung, Hannover). Je 150µg Peptid, das in 500µl PBS (pH7,2) gelöst worden war, wurde zusammen mit 1ml Ribi Adjuvant System einem Schaf injiziert. Zur Erhöhung der Immunantwort wurden die Schafe im Abstand von drei Wochen mit der gleichen Menge an Antigen geboostert. Jeweils 10 Tage nach jedem Boost wurde dem Schaf Blut entnommen und das Serum in ELISAs auf Immunreaktivität gegenüber den Antigenen untersucht. Nach dem dritten Boost konnte keine Steigerung der Immunreaktivität festgestellt werden. Deshalb wurde nach dem fünften Boostern kein Antigen mehr gespritzt. Den Schafen wurde 4 Monate lang in regelmäßigen Abständen bis zu 200ml Blut entnommen und das Serum bis zur Verwendung eingefroren. Die Immunisierung wurde in der Tierforschungsanlage der Universität Konstanz unter der Leitung von Dr. D. Schopper und der Mitarbeit von Frau I.Gast durchgeführt.

7.2 Nonkompetitiver ELISA

Nach Carroll und Stollar (1983), Leberer *et al.* (1986) und Carpenter/Rose *et al.* (1992): Mikrotiterplatten wurden mit 200µl NaCO₃-Puffer (50mM NaCO₃ (pH9,6), 3mM NaN₃) gewaschen und anschließend mit 0,1µg des in 100µl NaCO₃-Puffer gelösten Antigens für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kavitäten wurden 6x in 200µl PBST (PBS, 0,05%Tween) gewaschen. Die Blockierung erfolgte in 200µl 1% Rinderserumalbumin, das in PBST gelöst war, für 1h bei 37°C. Die Kavitäten wurden 6x mit 200µl PBST gewaschen. Die Inkubation des in 100µl PBST gelösten Antiserums erfolgte 1-4h lang. Es wurden dabei Verdünnungen von 10⁻² bis 10⁻⁶ gewählt. Die Kavitäten wurden 6x in 200µl PBST gewaschen. 100µl mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Anti-Schaf IgG Antikörper (Sigma, Deisenhofen), der 1:30000 in PBST verdünnt war, wurde für 1h bei 20°C oder über Nacht bei 8°C inkubiert. Die Kavitäten wurden 6x in 200µl PBST gewaschen. Für die colorimetrische Detektion wurden die Kavitäten in 200µl Diethanolaminlösung (1M Diethanolamin/HCl pH10, 1mM MgCl₂) gewaschen. Die Farbreaktion erfolgte in 100µl 5mM p-Nitrophenylphosphat, das in Diethanolaminlösung gelöst

ist. Die Reaktion wurde mit 50µl 3M NaOH je nach Farbentwicklung nach 15min bis zu 1h beendet. Die Quantifizierung erfolgte in einem ELISA-Plattenleser (SLT, Crailsheim) bei 405nm.

7.3 Kopplung der Antigene an NHS-aktivierte Sepharose

Je 1mg Peptid 1, Peptid 2 und Peptid 3 wurden in 1ml Kopplungspuffer (0,5M NaCl, 0,2M Natriumcarbonat, pH8,3) gelöst. Eine NHS-aktivierte HiTrap-Säule (1ml) wurde mit mindestens 6ml eiskalter 1mM HCl gewaschen. Die Flußrate von 1ml/min wurde dabei nicht überschritten. Am oberen Ende wurde eine Spritze mit der Peptidlösung über einen Luer Adapter gekoppelt, am unteren Ende eine leere Spritze. Danach wurde die Peptidlösung 30min lang sanft hin und her gepumpt. Anschließend wurden überschüssige, aktive NHS-Gruppen blockiert und unspezifisch gebundene Liganden ausgewaschen. Die Säule wurde mit einer Abfolge von 6ml NE-Puffer (0,5M NaCl, 0,5M Ethanolamin/HCl, pH8,3), 6ml NA-Puffer (0,5M NaCl, 0,1M NaAc, pH4) und 6ml NE-Puffer gewaschen. Dann blieb sie 30min lang in NE-Puffer stehen. Es wurde mit 6ml NA-Puffer, 6ml NE-Puffer und 6ml NA-Puffer weitergewaschen. Der NA-Puffer wurde mit 20mM Natriumphosphat (pH7) ausgewaschen.

7.4 Affinitätsreinigung der Anti-MLP Antikörper

Eine mit dem Antigen (Peptid 1, Peptid 2 oder Peptid 3) gekoppelte 1ml HiTrap-Säule (Pharmacia) wurde an das ECONO-System (Bio-Rad, München) angeschlossen und mit 20mM Natriumphosphat (pH7) äquilibriert. Abzentrifugiertes Schafserum mit Immunreaktivität gegen das gekoppelte Peptid wurde auf pH7 eingestellt und auf die HiTrap-Säule (Pharmacia) aufgetragen. Es wurde so lang mit 20mM Natriumphosphat gewaschen, bis die Absorption bei 280nm wieder auf die Basislinie zurückgekehrt war, d.h. sämtliches ungebundenes Protein durchgelaufen war. Nun wurde mit 100mM Glycin/HCl (pH2,7) eluiert. Das Eluat wurde in 1ml Fraktionen gesammelt. In die Reaktionsgefäße wurde 100µl 1M Tris/HCl (pH9) vorgelegt. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde mit der BioRad Proteinbestimmungs-Lösung (Bio-Rad Laboratories) bestimmt. Die Fraktionen 4,5 (und 6) enthielten jeweils den gereinigten Anti-MLP Antikörper. Sie wurden bei 8°C nach Zugabe von 5mM NaN₃ aufbewahrt.

8 Immunoblot

8.1 Herstellung von Proteinextrakten

Die in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Muskeln wurden gewogen, im Mörser pulverisiert und in 10ml Lysepuffer (10mM HEPES, 5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM EDTA, 5mM β -Merkaptoethanol, 0,5mM PMSF, 2 μ g/ml Aprotinin, 10 μ g/ml Leupeptin, pH7,5) pro Gramm Muskel mit einem Rührstab (Polytron, Kinematica) homogenisiert. Das Homogenat wurde durch Glaswolle filtriert und anschließend bei 1000g für 8min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1/20 des Ausgangsvolumens an Aufbewahrungspuffer (75mM HEPES, 60mM KCl, 15mM NaCl, 0,1mM EDTA, 0,1mM EGTA, 0,5mM DTT, 0,5mM Spermidin, 0,5mM PMSF, 40% Glycerin, pH7,5) aufgenommen und resuspendiert. Das resuspendierte Pellet und der Überstand wurden einer Proteinkonzentrationsbestimmung unterzogen (Kapitel 7.4) und aufbewahrt.

8.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Es wurden Gele mit der Abmessung von 65x 8x 0,12cm gegossen. Das Trenngel setzte sich aus 0,375M Tris (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,05% TEMED und 15% Polyacrylamid zusammen. Das Sammelgel (0,125M Tris pH6,8, 0,1%SDS, 0,1%APS, 0,075%TEMED, 4% Polyacrylamid) war maximal 2cm hoch. Die Proben wurden mit 4x Probenpuffer (0,2M Tris (pH6,8), 10% SDS, 80% Glycerin, 0,6%Bromphenolblau, 0,04% β -Merkaptoethanol) versetzt und 3min lang bei 100°C denaturiert. In einer Elektrophoresekammer wurde die beiden Pole in Laufpuffer (25mM Tris (pH,8,3), 192mM Glycin, 0,1% SDS) getaucht und eine Spannung von 100V angelegt, bis die Bromphenolblaufront am unteren Rand angekommen war. Proteinstandards von 45, 24, und 18 kD dienten als Referenz für die Proteingröße.

8.3 Western Transfer

In eine Plastiktasche wurde in einer mit Leitungswasser gefüllten Wanne ein „Sandwich“ nach dem folgendem Schema aufgebaut: Kathode- 2 Schwämme- 2 Whatmanpapiere- Polyacrylamidgel- Nitrozellulosemembran (Protran, 0,2 μ m Porengröße, Schleicher und Schüll, Dassel)- 2 Whatmanpapiere- 2 Schwämme- Anode. Die Whatmanpapiere und die Nitrozellulosemembran wurden zuvor kurz in Transferpuffer (25mM Tris (pH8,3), 0,192mM Glycin, 20% Methanol, 0,02% SDS) getränkt. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer für 100min bei 90V auf Eis. Die Stromstärke stieg von 0,4A auf bis zu 2A gegen Ende des Transfers. Zur Kontrolle wurde die Membran für 1min mit Ponceau-S Lösung (Serva,

Heidelberg) gefärbt und anschließend mit H₂O gewaschen. Die Membran wurde beschriftet und für die Immundetektion in PBS entfärbt.

8.4 Immundetektion

Die Membran wurde für 1h in PBS (140mM NaCl, 1,5mM KH₂PO₄, 8,1mM Na₂HPO₄, 2,7mM KCl, pH7,4) mit 5% Magermilchpulver blockiert. Der Anti-MLP Antikörper wurde über Nacht in PBS mit 0,5% Magermilchpulver bei 8°C inkubiert und anschließend 3x 10min lang in PBS gewaschen. Anschließend wurde

a) ein mit alkalischer Phosphatase-gekoppelter Anti-Schaf-IgG Antikörper (Sigma), der 1:30000 in PBS mit 0,5% Milchpulver verdünnt worden war, 2h lang inkubiert. Die Membran wurde 3x 10min lang mit PBS gewaschen und kurz in Detektionspuffer (100mM Tris (pH9,5), 100mM NaCl und 50mM MgCl₂) äquilibriert. Dann erfolgte die chemiluminometrische Detektion mit CSPD[®] (Boehringer Mannheim). Dazu wurde CSPD 1:100 in Detektionspuffer verdünnt, dieser in einer Plastikhülle 5min lang auf die Membran appliziert, anschließend überschüssige Flüssigkeit auf ein Papiertuch getupft, die Membran in eine neue Plastikhülle gegeben und 10min lang bei 37°C inkubiert. Der Röntgenfilm Hyperfilm-MP, (Amersham) oder Fuji-RX, (Fuji Photo Film, Düsseldorf) wurde 2h bis über Nacht aufgelegt und entwickelt.

b) ein mit Peroxidase gekoppelter Anti-Schaf-IgG Antikörper (Sigma), der 1:2500 in PBS mit 0,5% Milchpulver verdünnt worden war, 2h lang inkubiert, danach 3x 10min lang mit PBS gewaschen. Die Membran wurde 3x 10min lang in Waschpuffer (100mM Tris (pH 7,5), 150mM NaCl) gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem Enhanced-Chemiluminescent-System (ECL, Amersham). ECL Lösung 1 und 2 wurden zu gleichem Anteil gemischt, die Membran 1min damit inkubiert, überschüssige Flüssigkeit auf ein Papiertuch abgetropft, die Membran in eine Plastikhülle gelegt und ein Röntgenfilm (ECL-Film, Amersham) 5-15min exponiert und entwickelt.

8.5 Silberfärbung

Nach Blum *et al* (1987): Das Gel wurde in Lösung A (50% Methanol, 10% Essigsäure) 30min lang fixiert und in Lösung B (5% Methanol 7,5% Essigsäure) 30min lang weiterfixiert und gequollen. Es wurde 2x 15min lang mit H₂O gewaschen, 1min lang in 0,02% NaSSO₄ sensitiviert und wieder 2x 1min lang in H₂O gewaschen. Die Färbung erfolgte in 0,2% Silbernitrat und 1mM Formaldehyd für 30min. Nach abermaligem Waschen mit H₂O für 1min

wurde das Gel mit 6% Na₂CO₃ und 6mM Formaldehyd entwickelt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Reaktion wurde mit einigen Körnern Zitronensäure abgestoppt. Das Gel wurde 15min lang in H₂O gewaschen und in 20% Ethanol aufbewahrt.

9 Immunhistochemische Methoden

9.1 Immunhistochemische Färbung von Kryostatschnitten

9.1.1 Protokoll für den Anti-MLP Antikörper (MLP-Ak_s)

Im Kryostaten wurden gestreckte, in schmelzendem Isopentan (-159°C) eingefrorene und in flüssigen Stickstoff aufbewahrte Muskeln in 9µm dicke Scheiben geschnitten und auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern gesammelt. Diese wurden entweder 1-2h an der Luft getrocknet oder zur Lagerung bei -70°C aufbewahrt. Die Schnitte wurden 10min in Azeton bei -20°C fixiert, einige Minuten getrocknet, mit einem hydrophoben PAP-Pen (MBT, Freiburg) umrandet, anschließend wieder getrocknet. Nach dem Waschen für 3x 10min in PBS wurden sie 15min lang in 3% H₂O₂ in Methanol inkubiert. Nach dem abermaligen Waschen für 3x 10 min in PBS wurden sie 1-2h lang in Blockierlösung (5% Magermilchpulver in PBS) inkubiert, anschließend mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C dekoriert. Die Schnitte wurden 3x 10min lang mit PBS gewaschen und in biotinyliertem Anti-Schaf-IgG Antikörper (Vectastain ABC Reagenz, Vector Laboratories, Burlingame, USA), der 1:400 in Blockierungslösung verdünnt war, für 30 min inkubiert. Die Schnitte wurden 3x 10 min in PBS gewaschen mit einem Avidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex nach den Angaben des Herstellers für 30min inkubiert (Vectastain ABC Reagenz, Vector Laboratories). Nach abermaligem Waschen für 3x 10min fand die Farbreaktion mit Diaminobenzidin für 5-10min statt (DAB Substratkit, Vectastain ABC Reagenz, Vector Laboratories). Die gefärbten Schnitte wurden mehrmals in Wasser gewaschen, gegebenenfalls mit Harris' Hämatoxylin gegengefärbt, in einer aufsteigenden Ethanol-/ Xylolreihe dehydriert und mit einem Deckglas in Entellan (Merck, Darmstadt) eingebettet.

9.1.2 Spezifische Bedingungen für verschiedene Antikörper

Kaninchen Anti-MLP Antikörper (MLP-Ak_k) (Caroni *et al.* 1994): Fixierung mit 3,6% Formaldehyd in PBS, Blockierung mit 2% Rinderserum Albumin, 10% Ziegenserum, 10% Magermilchpulver in PBS (pH 7,4); MLP-Ak_k in 1:100 Verdünnung, sekundärer Antikörper:

biotinylierter Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG Antikörper (Vectastain ABC Reagenz, Vector Laboratories).

Monoklonale Antikörper gegen schwere Myosinketten: Blockierung mit 2% BSA, 10% Pferdeserum in PBS (pH 7,4); Anti-MHCI Antikörper (7HCS15) 10µg/ml, Anti-MHCIIA Antikörper (SC-71) 10µg/ml, Anti-MHCIID(X) Antikörper (BF-35) 10µg/ml (Schiaffino *et al.* 1989); sekundärer Antikörper: biotinylierter Pferde-Anti-Maus-IgG Antikörper (Vectastain ABC Reagenz, Vector Laboratories)

Monoklonaler Anti-Neurofilament 68 Antikörper (Klon NR4, Sigma); Verdünnung 1:100; sekundärer Antikörper: biotinylierter Pferde-Anti-Maus-IgG Antikörper

Polyklonaler Kaninchen Anti-Ratten-Fibronectin Antikörper (BIOMOL Feinchemikalien, Hamburg); Verdünnung 1:250; polyklonaler Kaninchen Anti-Mensch-PTHrP(34-53) Antikörper (Calbiochem, Cambridge); Verdünnung 1:100; polyklonaler Kaninchen Anti-Laminin Antikörper (ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA); Verdünnung 1:300; Blockierung jeweils mit 1% BSA; sekundärer Antikörper: biotinylierter Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG Antikörper (Vectastain ABC Reagenz, Vector Laboratories)

Für die Immunneutralisation wurden die Antigene jeweils in einem 10-fachen molaren Überschuß für 2h mit dem entsprechenden Antikörper präinkubiert: 10µg/ml PTHrP(34-53) (Calbiochem); 15µg/ml Peptid 1.

Die Negativkontrollen wurden mit Schaf-IgG (Dianova, Hamburg) und Kaninchen-IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) in derselben Konzentration wie der eingesetzte Antikörper durchgeführt.

9.2 Immunhistochemische Färbung von Satellitenzellen

9.2.1 Kultivierung von Satellitenzellen

Die Satellitenzellen wurden 5d lang in Wachstumsmedium (DMEM, 5% fötales Kälberserum (GIBCO), 0,1% Mito-TM-Serum Extender (Beckton Dickinson, Heidelberg), 1% von 250µg/ml Amphotericin, (Biochrom KG, Berlin), 0,5% Gentamycin (10mg/ml, Biochrom KG, Berlin), 140mM CaCl₂, 200mM Glutamin, 20ng/ml aFGF (gentechnisch hergestellt, heparingekoppelt,

Boehringer Mannheim)). Am zweiten Tag wurde das Medium gewechselt. Ab dem fünften Tag wurden die Zellen in Differenzierungsmedium (DMEM-F12/ Glutamax II (GIBCO), 1% Amphotericin, 0,5% Gentamycin, 140mM CaCl₂, 10% Pferdeserum, 2% Fötale Kälberserum) kultiviert. Die Zellen wurden in einer wassergesättigten Atmosphäre bei einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Nach 2d, 5d, und 8d wurden die Zellen für die immunhistochemische Färbung fixiert.

9.2.2 Isolierung der Satellitenzellen

Nach Dusterhöft und Pette (1993): Die Satellitenzellen wurden aus dem Soleus, Diaphragma und Tibialis anterior isoliert. Es wurden dabei jeweils immer 10 Muskeln aus fünf männlichen Wistar-Ratten im Alter von zwischen 11 und 14 Wochen isoliert. Die Muskeln wurden den Tieren unter sterilen Bedingungen entnommen und in Dulbecco's modification of minimal essential medium (DMEM) überführt (232,8mM NaCl, 108mM KCl 1,6mM MgSO₄, 2,4mM NaH₂PO₄, 2g/l D(+)-Glukose, 0,68% Phenolrot, 0,8% essentielle MEM-Aminosäuren x50 ohne Glutamin (Biochrom, Berlin), 0,1% nicht essentielle MEM-Aminosäuren x100 (Biochrom, Berlin), 0,4% MEM-Vitamine x100 (GIBCO BRL, Eggenstein)). Sehnen, Haut und Bindegewebsreste wurden entfernt und die Muskeln fein zerschnitten. Der Muskelbrei wurde unter Rühren 60min lang bei 37°C mit Dispase (13,5units/g Muskel, Boehringer Mannheim) und Kollagenase TypIII (600units/g Muskel, Worthington, Freehold, NJ, USA) verdaut. Danach wurde Pferdeserum (HS) zu einer Endkonzentration von 10% hinzugefügt. Nach der Zentrifugation für 3min bei 300 U/min in der Labofuge GL (Heräus) wurde der Überstand durch eine doppelte Schicht Nylonsieb gaze (50µm, Sekop Siebdruckfachhandel, Oberkirch) filtriert. Das Pellet wurde in DMEM mit 10% HS resuspendiert und ebenfalls durch die Sieb gaze filtriert. Die Zellsuspension wurde 5min lang bei 1300 U/min in der Labofuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3ml DMEM mit 10% HS resuspendiert und auf einem Percoll Gradienten (LKB Pharmacia, Freiburg) aufgetragen: 7ml 20% Percoll wurden über 3ml 60% Percoll geschichtet. Die Zellsuspension wurde daraufgegeben und 5min bei 11000g zentrifugiert. Die Rotor wurde ungebremst auslaufen lassen. Die Satellitenzellen in der Grenzschicht zwischen 60% und 20% Percoll wurden abgenommen. Die Zellen wurden zweimal in DMEM mit 10% HS gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von $7,9 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ auf mit Matrigel (Becton Dickinson, Heidelberg) beschichteten Schalen ausplattiert. Das Matrigel war zuvor in einer Konzentration von 3,5mg/ml in DMEM auf die Platte aufgebracht worden.

9.2.3 Färbung der Satellitenzellen

Die Färbung erfolgte im wesentlichen wie die an Muskelschnitten mit folgenden Ausnahmen: Nach dem Entfernen des Mediums werden die Zellen 3x 5min in PBS gewaschen und für 5min in 95% Methanol/ 5% Essigsäure bei -20°C fixiert. Nach dem Waschen für 3x 5min in PBS setzt obiges Protokoll beim Methanol/ H_2O_2 -Schritt ein. Nach der Farbreaktion wurde die Platte 3x 10 min in PBS gewaschen und in PBS aufbewahrt.

C Ergebnisse

1 Im Differential Display identifizierte Banden

Insgesamt wurden 8 5'-Primer mit 9 3'-Primern kombiniert, so daß 72 Primerkombinationen für die *Differential Display* RT-PCR verwendet wurden. Bei jeder Amplifikation konnten nach der Auftrennung im Sequenziergel etwa 20 Banden auf dem Autoradiogramm identifiziert werden¹⁰. Insgesamt sind etwa 1440 Banden identifiziert worden, von denen jede eine mRNA repräsentiert. Unter diesen Banden sind jene isoliert worden, die sich in ihrer Intensität deutlich zwischen dem kontralateralen und stimulierten TA in zwei verschiedenen Tieren unterschieden. 41 Banden mit einer Länge zwischen 150-600 Nukleotiden wurden isoliert, von denen die meisten im Bereich von 250-350 Nukleotiden lagen. Bei drei von diesen Banden zeigte der stimulierte TA ein schwächeres Signal als der nicht-stimulierte TA, alle übrigen Banden wurden durch die Elektrostimulation verstärkt. Die cDNA von 10 Banden wurde kloniert, sequenziert und mit BLAST (Altschul *et al.* 1997)¹¹ auf Homologien mit Sequenzen in GenBank untersucht. Ausschnitte aus Autoradiogrammen zeigen diese 10 durch *Differential Display* erhaltenen Banden (Abbildung 4). In Tabelle 3 ist die Zuordnung zu bekannten Sequenzen dargestellt.

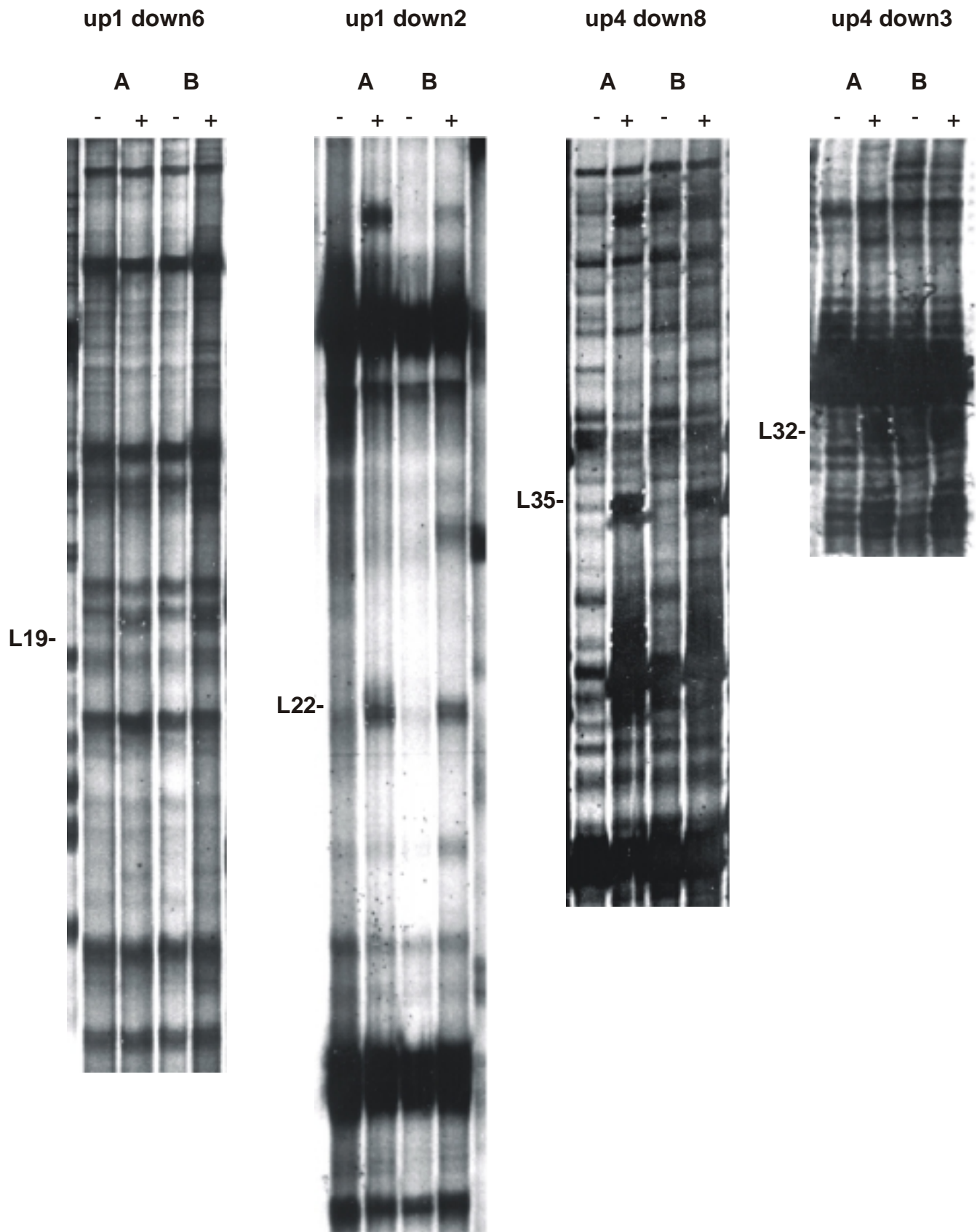
8 Banden konnten insgesamt 6 bekannten DNA-Sequenzen zugeordnet werden, wobei zwei DNA-Sequenzen von jeweils zwei Banden repräsentiert werden. Bande 4 und 35 zeigen keine Homologie zu Sequenzen von GenBank. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um partielle Sequenzen von bisher nicht identifizierten Genen. Bande 32 und 41 repräsentieren den basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (aFGF) bzw. das ribosomale S21 Protein (Goodrich *et al.* 1989; Chan *et al.* 1995). Die differentielle Expression der mRNA dieser beiden Proteine ließ sich in Northern Blots nicht bestätigen. Bande 21 und 22 können einem Abschnitt des mitochondrialen Genoms der Ratte zugeordnet werden (Gadaleta *et al.* 1989). Es ist möglich, daß das mitochondriale Genom verstärkt transkribiert wird, um Proteine der Atmungskette und rRNA zu synthetisieren, es läßt sich jedoch nicht ausschließen, daß Spuren von

¹⁰ Für die Identifizierung im Autoradiogramm wurde [α -³³P]dATP eingebaut. Dieses zeichnet sich durch hohe Sensitivität und Spezifität aus und bietet gegenüber [³⁵S]dATP zusätzlich den Vorteil, daß es thermisch stabil ist und die Umgebung nicht kontaminiert (Tokuyama und Takeda 1995).

¹¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

Differentielle Banden nach der *Differential Display* RT-PCR

A)



Differentielle Banden nach der Differential Display PCR

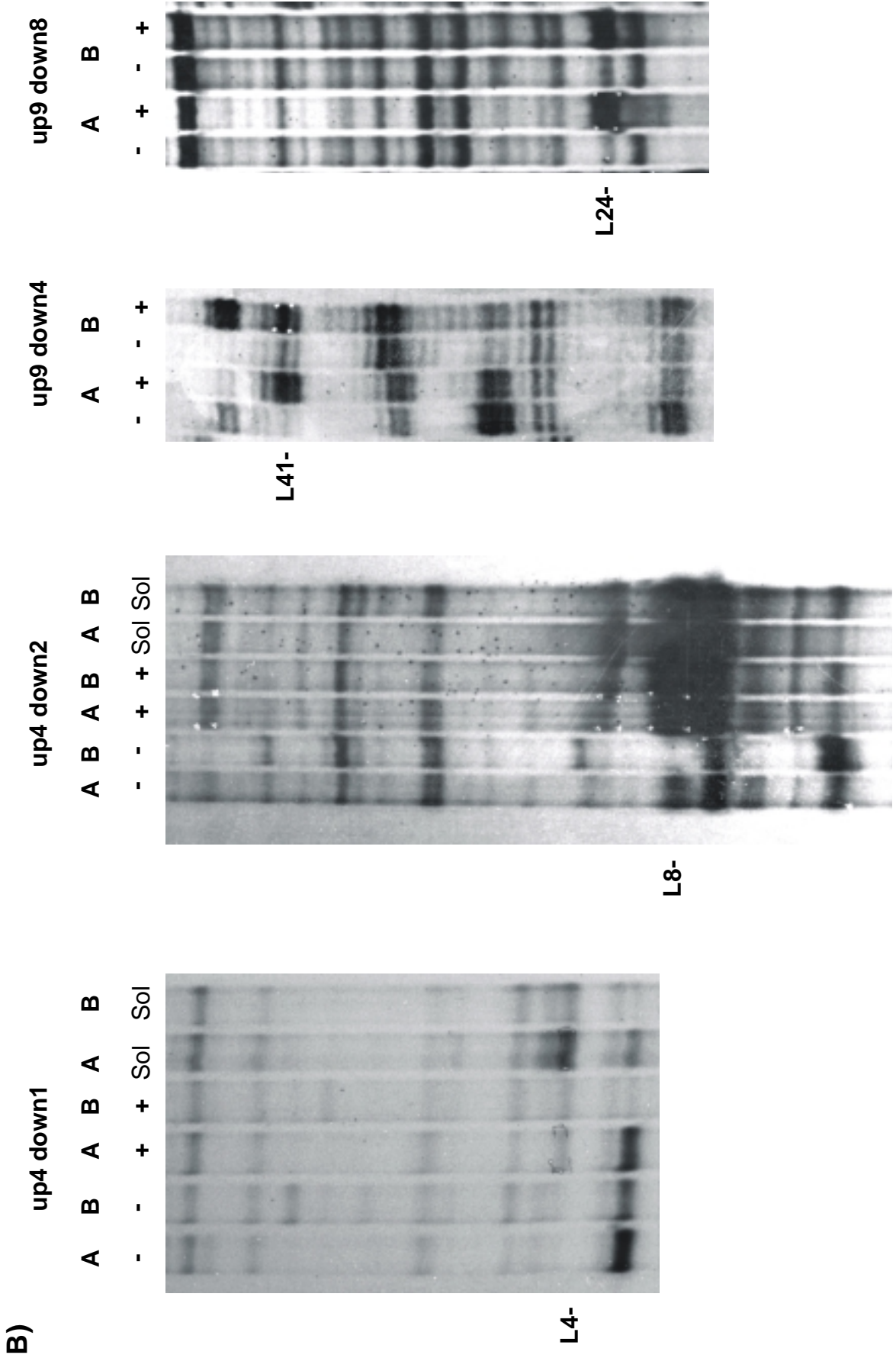


Abbildung 4: Durch *Differential Display* RT-PCR erhaltene cDNA wurde in Sequenziergele aufgetrennt. Ausschnitte aus Autoradiogrammen sind hier gezeigt. Die vier Bandenmuster wurden mit unterschiedlichen Kombinationen aus Upstream- und Downstream- Primern (up, down) erzeugt. Differentielle Banden sind mit L und einer Zahl bezeichnet. A und B kennzeichnen verschiedene Tiere. Plus (+) bezeichnet 12h stimulierte TA-Muskeln, minus (-) die Kontrollmuskeln.

Ergebnisse der Homologiesuche mit BLAST

Bande	Name	Länge	Zugeordnetes Protein	Accession
4	u4d1 α 1	280	Unbekannt	
8	u4d2 γ	300	Muskel-LIM-Protein (MLP)	X81193
19	u1d6 α	380	β 1-Untereinheit des Aktin Capping Proteins (Maus)	U10406
21	u1d2 α	370	Mitochondriales Genom	X14848
22	u1d2 β	260		
24	u2d8 α	340	Parathyroidhormon verwandtes Protein (PTHrP)	M316034
43	u7d8 β	400		
32	u4d3 δ	180	Saurer Fibroblastenwachstumsfaktor (aFGF)	X14232
35	u4d8 γ	320	Unbekannt	
41	u9d4 β	190	Ribosomales S21 Protein	X79059

Tabelle 3: 10 DNA-Sequenzen wurden verglichen: Jede Bande trägt einen Namen, der durch die bei der Amplifikation verwendeten Primer und einen griechischen Buchstaben festgelegt ist. Die Länge bezeichnet die geschätzte Anzahl der Nukleotide nach der Elution. Der jeweiligen Bande wurde ein Protein zugeordnet, sowie der Zahlencode (Accession), unter dem die cDNA in GenBank zugänglich ist.

mitochondrialer DNA in der RNA-Präparation amplifiziert worden sind.

Die Sequenz der Bande 19 weist auf einer Länge von 340 Nukleotiden eine Übereinstimmung von 96% mit der β 1-Untereinheit des Aktin Capping Proteins der Maus auf (Schafer *et al.* 1994). Der kodierende Bereich am 5'-Ende der cDNA, der den 36 C-terminalen Aminosäuren des Proteins entspricht, ist sogar zu 100% mit dem korrespondierenden Abschnitt der Maus-cDNA identisch.

cDNAs ohne Homologien mit bekannten Sequenzen

Bande 35#46

GATGGCATTG CATTCCCTGTA AACACTGACT ATTCCGTATG TACAGAAATC
 GATGGTGAGT TTCCTAACAG AGTGACTIONTGA TAATTTTTTTC TTGACTGATA
 ATTATGAAAA TTTGGGGCCT TGATCTGTGT ACTGCTGTCC AATTTTGTCC
 TCTCTACCTC TTTCCCTCTT TCTNTTAATT CCTTCCTTTT CTTTCTGTGC
 CAAGGCCTGA GCCTGGGGTT CCAAGCGTGT TAGGGAATCA CTTTCCCATC
 ACGTTACATC CCCAGCTAAT AGTTTTATTG TTTTCAATAG TTTATATTTA
 CTCTTTTGCA **AAAAAAAA**

Bande 35#49

GATGGCATTG GCAGAATTAA GTGTGGGGTG GATTAGACTT TTCATCTCAA
 AGTGGACAGG AAGAGCCTCC AGGTGACCCA GTTACCCAG TAGCCCTACT
 TCCTCCAACC AGGCCTTATC CTACCCTTCA TCACCTTCCA GTGAGTGCCA
 TAATCCACTG ACGAGATCGT CTTCAGGCTC CATTGCTCT GGAAAAGCCT
 GTCANCTGGC AGTCACCTCC AACACCTGAG ACCCTGGGAG TGGTGGTGGT
 GATGGAGGAG CACCTCATAT TCAGACCACA GCTGTTTCAT TTTAAATGCT
 TACTCTTCAG **CAAAAAAAAA**

Bande 4

GATGGCATTG GGCAGCAGAA TGACATGAAA AGATAACATA AACTTTGGGG
 CAAACAGGAT GAATATTGAT GGATCCAAAT GTCTTATGTT CTGTGGGGTT
 CTTCAATCTA AAAATTGATG TTAGCAGAAG CAAAATGAC TACTCGATTG
 CATGGACATT CCTTTAGAGA AAATCTGTCT GCTTGAAAC CATAATTGTG
 GTTTTTTCAGA ATTTATTATA AGGCCTCTTT TTTTCTTATC ATCTATATAT
 CTTACAGGAT CTCTTAT**CAA TGCCATC**

Abbildung 5: Die drei unbekannt Sequenzen sind hier dargestellt. Fettdruck bezeichnet die Primer bzw. ihre komplementären Sequenzen, die für den *Differential Display* verwendet wurden. Bande 4 ist das Ergebnis der Amplifikation mit 2 identischen 5'-Primern.

Die Bande 19 kann daher sicher der β 1-Untereinheit des Aktin Capping Proteins der Ratte zugeordnet werden. Dieses Protein ist auch als CapZ bekannt. Bande 4 und 35 zeigen keine Homologien zu bekannten Sequenzen (Abbildung 5). Klon 46 und 49 von Bande 35 bestehen aus Sequenzen, die völlig verschieden sind (Abbildung 5). Dies ist entweder darauf zurückzuführen, daß sich die Bande im Sequenziergel aus zwei Amplifikationsprodukten mit identischer Nukleotidzahl zusammengesetzt hat oder aber, daß kontaminierende DNA kloniert worden ist. Beide Sequenzen von Bande 35 sind bisher unbekannt. Durch Screening einer cDNA-Bibliothek könnte die komplette Sequenz identifiziert und das entsprechende Protein daraus abgeleitet werden.

Schließlich wurde noch der Bande 8 das Muskel-LIM-Protein (MLP) (Arber *et al.* 1994) und den Banden 24 und 43 das Parathyroidhormon-verwandte Protein (PTHrP) (Yasuda *et al.* 1989) zugeordnet. MLP ist als ein essentieller Faktor bei der Regulation der Myogenese in Zellkulturen beschrieben worden (Arber *et al.* 1994). Der Phänotyp von Knockout- Mäusen unterstreicht die Bedeutung von MLP (Arber *et al.* 1997): Die gestreifte Muskulatur ist schon von Geburt an pathologisch schwach, und die Tiere entwickeln wenige Wochen nach der Geburt eine dilatative Kardiomyopathie mit Hypertrophie. Die Expression von MLP im adulten Skelettmuskel ist bisher noch nicht beschrieben worden.

PTHrP ist ein Proprotein, daß in mindestens fünf aktive Peptide gespalten werden kann, die autokrin und parakrin auf ihre Zielgewebe wirken. PTHrP wird in fast allen untersuchten Geweben und Zelltypen exprimiert und erfüllt vielfältige Funktionen. Die Expression von PTHrP im Skelettmuskel ist zwar beschrieben worden, über seine Funktion dort ist jedoch nichts bekannt.

MLP und PTHrP sind Kandidaten für Proteine mit einer regulatorischen Funktion bei frühen Prozessen der CLFS. Ihre Rolle im adulten Skelettmuskel bei der schnell-zu-langsam Umwandlung wurde anhand der zeitlichen Expression und ihrer Lokalisation weiter untersucht. Im folgenden sind die Ergebnisse für diese beiden Proteine dargestellt.

2 Das Muskel-LIM-Protein (MLP)

2.1 Nachweis der differentiellen Expression von MLP im Northern Blot

Um die differentielle Expression von MLP zu überprüfen, wurden Northern Blot Experimente durchgeführt. Gleiche Mengen an Gesamt-RNA wurden im Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit Hilfe einer mit Digoxigenin markierten DNA-Sonde nachgewiesen. Die Integrität der RNA wurde zuvor auf dem Gel unter kurzzeitigem UV-Licht überprüft. Der Nachweis der 18S und der 28S rRNA-Banden in vergleichbarer Stärke schließt eine Degradation aus. Nur ein schwaches Signal wurde im nicht-stimulierten TA bei etwa 950 Nukleotiden erhalten, dieses war hingegen im 12h stimulierten TA und im Soleus sehr stark (Abbildung 6). Die im *Differential Display* gefundenen Unterschiede zwischen diesen drei Muskeln reflektieren somit die differentielle Expression der mRNA von MLP.

Nachweis der mRNA von MLP durch Northern Hybridisierung

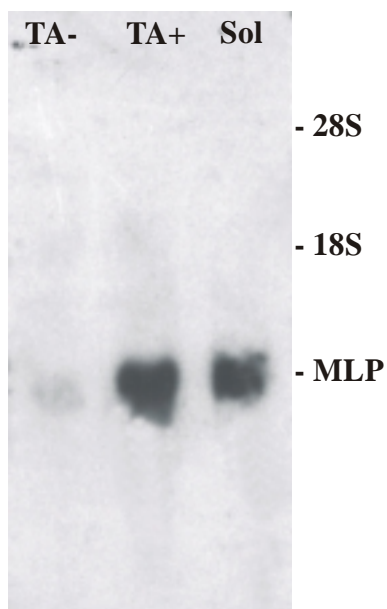


Abbildung 6: Eine mit Digoxigenin markierte Sonde wurde mit je 10 μ g Gesamt-RNA von Soleus, kontralateralen TA und 12h stimulierten TA hybridisiert. Das Signal in der Region von 950 Nukleotiden korrespondiert mit der mRNA von MLP.

2.2 Die Herstellung von polyklonalen Anti-MLP Antikörpern

Um die Expression von MLP auf Proteinebene zu untersuchen, wurden polyklonale Antikörper gegen drei Peptide (Peptid 1-3) aus verschiedenen Regionen von MLP erzeugt (Abbildung 7). Gegen die Sequenz des C-terminal gelegenen Peptid 1 ist zuvor bereits ein Antikörper beschrieben worden (Arber *et al.* 1994). Peptid 2 und Peptid 3 wurden aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaft ausgewählt worden. Peptid 3 ist zwischen den beiden LIM-Domänen gelegen, Peptid 2 hingegen liegt innerhalb der zweiten LIM-Domäne (Abbildung 7).

Die drei Peptide zeigten in ELISAs unterschiedliche Immunreaktivitäten gegenüber den Antiseren: Während Peptid 1 noch bei Serumverdünnungen von bis zu 10^{-6} eine Immunreaktivität aufwies, reagierten Peptid 2 nur bei Verdünnungen von bis zu 10^{-4} und Peptid 3 sogar nur bei bis zu 10^{-3} . Dieses Ergebnis zeigte, daß der Antikörper gegen Peptid 1 die stärkste Affinität für sein Antigen aufwies. Als Negativkontrolle diente das Präimmunserum des jeweils gleichen Schafes in der gleichen Verdünnung.

Die Wahl der Peptide für die Immunisierung

A)

Name	Position	Anzahl	Aminosäuresequenz	Schaf
Peptid 1	182-194	11	GGLTHQVEKKE	Momo
Peptid 2	152-166	15	KSLESTNVTNKNL	Mimi
Peptid 3	106-122	17	NPSKFSAKFGESEKCPR	Lucky

B)

MPNWGGGAKC **GACDKTVYHA** **EEIQCNRSF** **HKTCFHCMA**C **RKALDSTVA** **AHESEIYCKV**
CYGRKYGPKG IGFGQGAGCL STDTGEHLGL QFQQSPKPAR AATTSNPSKF **SAKFGESEKC**
PRCGKSVYAA **EKVMGGGKPW** **HKTCFP**CAIC GKSLESTNVT **DKDGELYCKV** **CYAKNFGPTG**
 IGFGGLTHQV EKKE

Abbildung 7: Die für die Immunisierung eingesetzten Peptide sind hier dargestellt. A) Jedes Peptid ist dem damit immunisierten Schaf zugeordnet. B) Hier ist die Primärstruktur von MLP dargestellt. Die Aminosäuren der beiden LIM-Domänen sind fett, die Aminosäuren, die mit Zink einen Komplex eingehen, sind gesperrt gedruckt, und die Sequenzen der drei Peptide sind unterstrichen.

2.3 Der Nachweis von MLP im Immunoblot

Der Zeitverlauf der Expression von MLP im stimulierten TA wurde im Immunoblot untersucht. Muskelextrakte wurden nach einer SDS-PAGE auf einer Nitrozellulosemembran detektiert. Die Antiseren reagierten mit einer Vielzahl von Proteinen, so daß kein spezifisches Signal für MLP identifiziert werden konnte. Deshalb wurden die Antiseren auf einer Affinitätssäule gegen das für die Immunisierung verwendete Peptid gereinigt. Lediglich der Antikörper gegen Peptid 1 erzeugte ein Signal im Bereich von 22 kD, dem Molekulargewicht von MLP. Der Antikörper gegen Peptid 2 zeigte kein Signal, der gegen Peptid 3 reagierte mit einer Vielzahl von Protein-Banden, von denen keine mit dem Molekulargewicht von MLP korrespondierte. Der polyklonale gegen das Peptid 1 von MLP gerichtete Antikörper wurde für die weiteren Experimente verwendet und wird im folgenden als MLP-Ak_S bezeichnet.

Als nächstes wurden Homogenate vom Soleus, vom Herzmuskel und von TA-Muskeln, die unterschiedlich lang stimuliert worden waren, im Immunoblot untersucht. Es ist zuvor beschrieben worden, daß MLP im adulten Herz der Maus exprimiert wird, während es im Skelettmuskel nach der Geburt herunterreguliert wird (Arber *et al.* 1997). Deshalb wurde der Herzmuskel als Positivkontrolle gewählt. Abbildung 8 A, B und C zeigen das Ergebnis von drei verschiedenen Stimulationsreihen. Sowohl im Herzen als auch im Soleus und 8d stimulierten TA wurde ein starkes Signal erhalten. Im kontralateralen sowie im 1d stimulierten TA war MLP nicht nachweisbar. In A konnte MLP bereits nach 2d CLFS detektiert werden, in B und C jedoch erst nach 4d. Dies deutet auf eine gewisse Variabilität bei verschiedenen Tieren hin. Die Präinkubation des Antikörper mit einem 10-fachen molaren Überschuß an Antigen führte zu einem Verschwinden der Bande von 22 kD (Abbildung 8 D). Dies ist der entscheidende Beweis dafür, daß diese Bande tatsächlich MLP repräsentiert. Der MLP-Ak_S erkennt auch unspezifische Signale, die in B nur schwach ausgeprägt sind, in A jedoch im hochmolekularen Bereich sehr stark. Dies deutet darauf hin, daß der MLP-Ak_S auch Epitope von anderen Proteinen erkennt. Die Proteine von A, B und C sind zu unterschiedlichen Zeiten präpariert worden. Geringfügige Veränderungen im Ablauf und Protokoll der Proteinpräparation sind wahrscheinlich für die unterschiedliche Intensität der unspezifischen Banden verantwortlich. Trotz dieser einzelnen unspezifischen Signale zeigt die Abbildung 8 deutlich, daß der MLP-Ak_S MLP mit hoher Spezifität im Immunoblot erkennt.

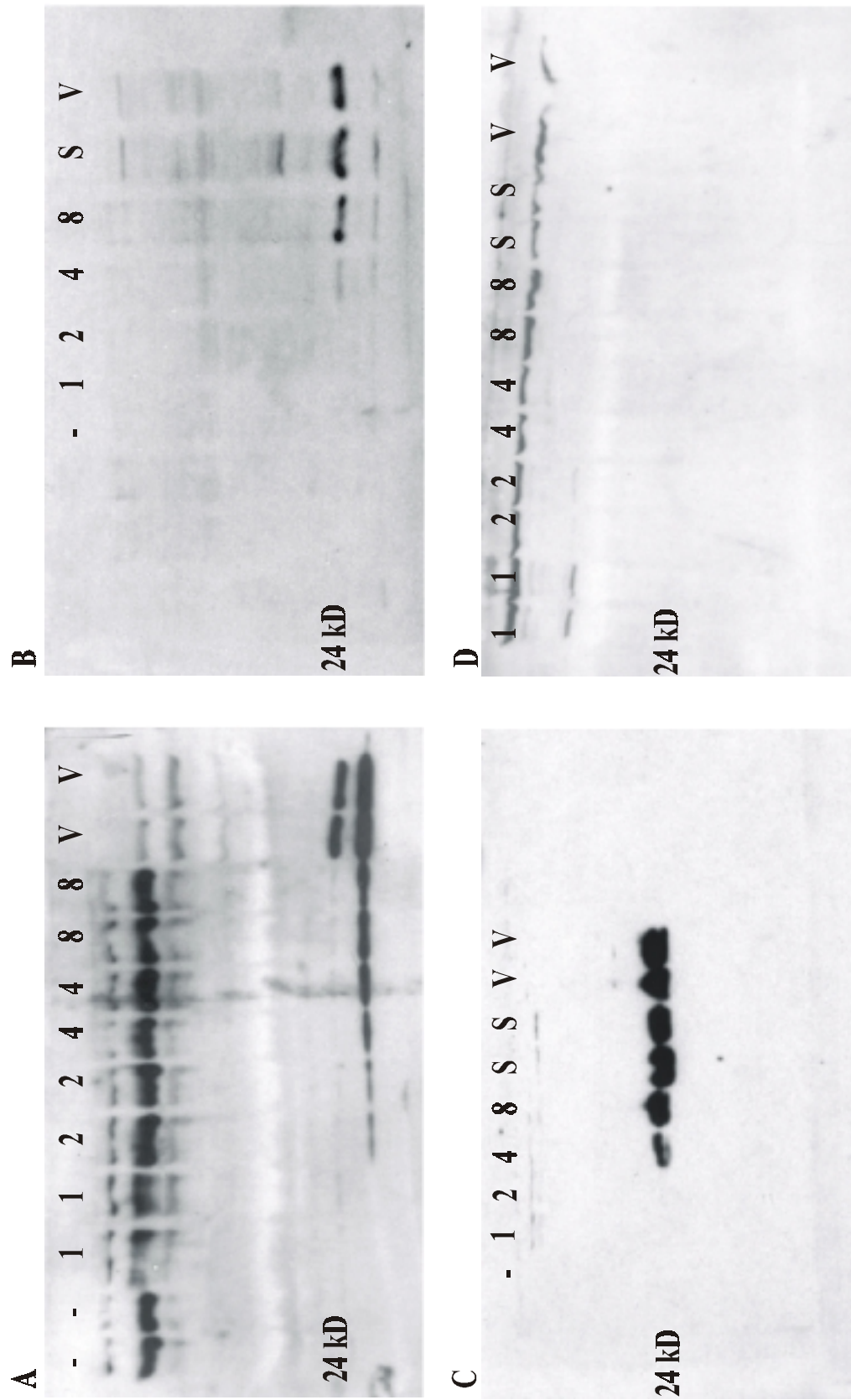


Abbildung 8: 100 µg Proteinextrakt wurden pro Gelbahn aufgetragen (A, C und D), 50 µg in B. Die Ergebnisse von drei verschiedene Stimulationsreihen sind dargestellt (A, B und C). MLP wurde mit 1,5 µg/ml MLP-Ak₅ nachgewiesen. Um die Spezifität der Reaktion zu zeigen, wurde in einem parallelen Experiment zu C der MLP-Ak₅ mit einem 10-fachen molaren Überschuß an Peptid 1 präinkubiert (D). Zahlen bezeichnen die Stimulationsdauern in Tagen.

Die Quantifizierung der Unterschiede in der Expression fällt schwer, da in dem nicht stimulierten TA kein Signal erhalten wurde. Unter einer Vielzahl von Experimenten konnte nur ein Mal nach langer Detektion MLP als schwaches Signal im unstimulierten TA nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß MLP in Mengen, die an der Nachweisgrenze des Immunoblots liegen, im TA konstitutiv exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Auch in diesem Experiment verstärkte sich das Signal erst nach 4d CLFS. Das bedeutet, daß MLP mit einer Zeitverzögerung von 2-3d gegenüber der mRNA hochreguliert wird. Es wurde auch der Versuch unternommen, MLP direkt auf dem Gel mit Hilfe von Silberfärbungen nachzuweisen (Abbildung 9). Es konnte jedoch im Bereich von 22kD keine Bande mit einem Zeitverhalten wie im Immunoblot nachgewiesen werden. Die Menge von MLP in 10µg Gesamtprotein liegt also unterhalb der Nachweisgrenze der Silberfärbung (ungefähr 10ng).

Silberfärbung von Muskelextrakten

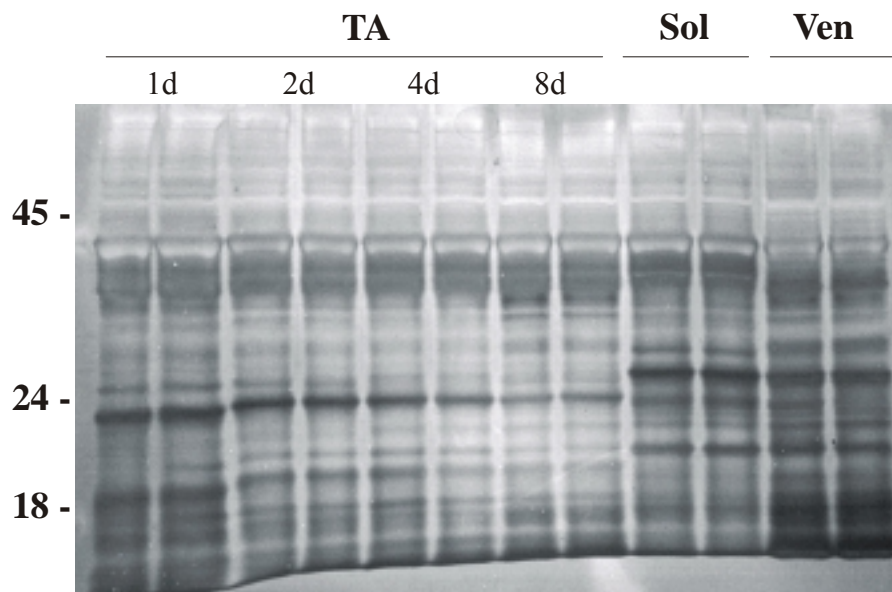


Abbildung 9: 20µg Protein- Homogenate von verschiedenen Muskeln wurden in einem 15%igen Lämmigel aufgetrennt: Vom TA wurden verschiedene Stimulationszeitpunkte ausgewählt. Links ist die Größe der Marker in kD spezifiziert.

2.4 Die Induktion von MLP bei der Differenzierung von Satellitenzellen

MLP wird bei der Myogenese zum Zeitpunkt der Fusion von Myoblasten zu Myotuben exprimiert (Arber *et al.* 1994). Dies ist sowohl an C2-Myoblasten als auch an Primärkulturen von embryonalen Hühnermuskeln gezeigt worden. Um zu überprüfen, ob der MLP-Ak_S auch Zellkulturen spezifisch färbt, wurden Primärkulturen von Satellitenzellen untersucht. Satellitenzellen sind Myoblasten von adulten Muskeln, die zur Proliferation und Differenzierung aktiviert werden, wenn Muskelfasern nach Verletzung regenerieren (Schultz und McCormick 1994; Anderson 1998). Auch bei der durch CLFS induzierten schnell-zu-langsam Transformation in der Ratte findet eine Aktivierung von Satellitenzellen statt (Delp und Pette 1994).

Abbildung 10 zeigt, daß 5d kultivierte Myoblasten aus dem TA noch nicht gefärbt sind, nach 8d weisen die inzwischen differenzierten Myotuben jedoch eine starke Immunreaktivität für MLP auf. Schaf-IgG in der gleichen Konzentration färbt weder Myoblasten noch Myotuben. Das gleiche Bild wurde auch an Satellitenzellen vom Soleus und vom Diaphragma erhalten. Damit ist gezeigt, daß auch bei der Differenzierung von Satellitenzellen die Expression von MLP induziert wird. Gleichzeitig ist der Beweis erbracht, daß der MLP-Ak_S auch bei der immunzytochemischen Färbung MLP spezifisch erkennt.

Die Expression von MLP in Primärkulturen von Satellitenzellen

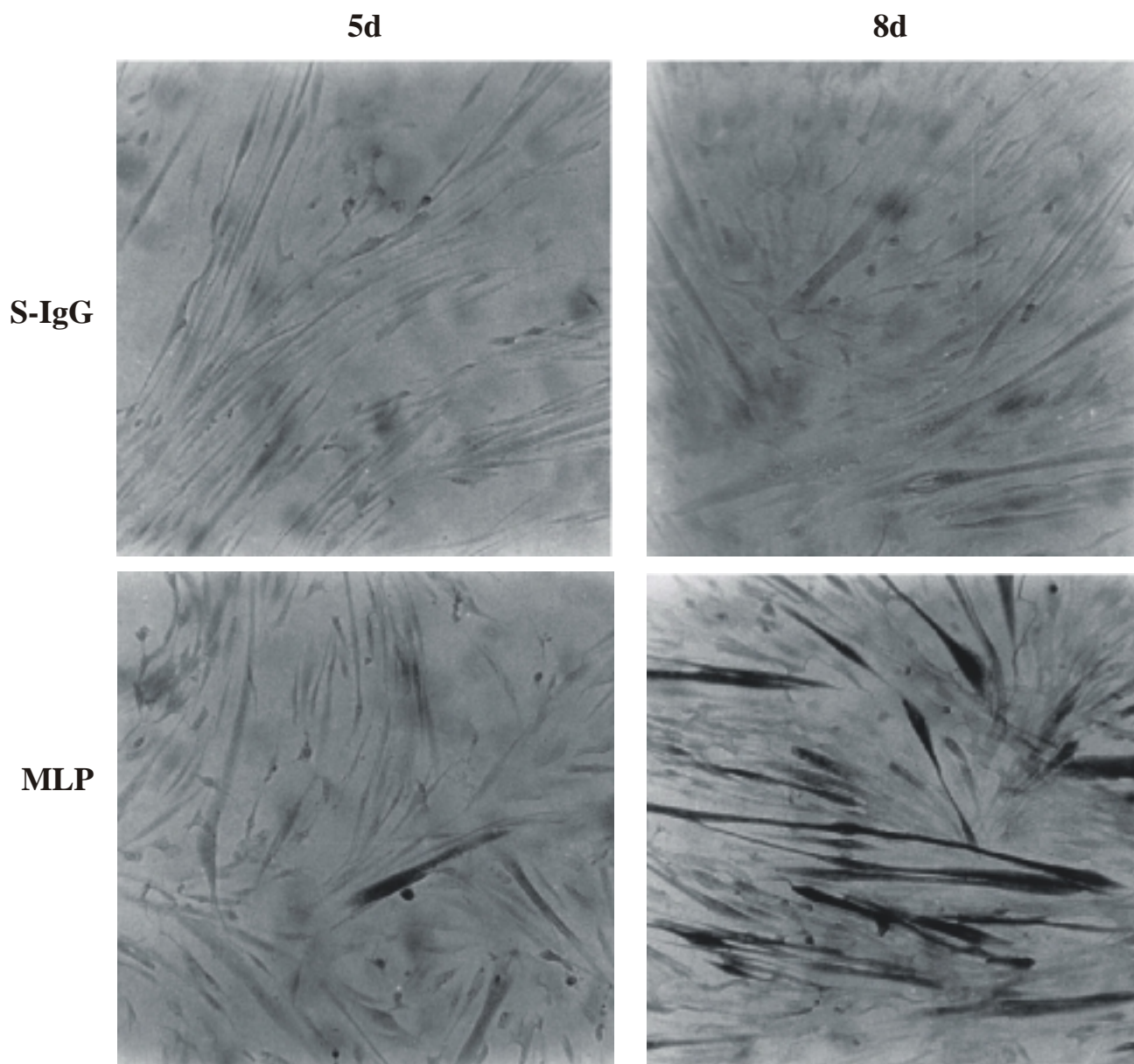


Abbildung 10: 5d und 8d kultivierte Satellitenzellen des TA sind hier einander gegenübergestellt. Die Zellen wurden mit $1,5\mu\text{g/ml}$ MLP-Ak_S gefärbt. Als negative Kontrolle wurde Schaf-IgG (S-IgG) der gleichen Konzentration verwendet.

2.5 Der Versuch des immunhistochemischen Nachweises von MLP mit MLP-Ak_S

Um MLP in den untersuchten Skelettmuskeln zu lokalisieren und die Unterschiede seiner Expression zwischen dem kontralateralen und stimulierten TA zu identifizieren, wurden immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten durchgeführt. Die spezifische Färbung von differenzierten Satellitenzellen hat gezeigt, daß der MLP-Ak_S nicht nur das denaturierte Protein, wie es im Immunoblot vorliegt, erkennt, sondern auch natives MLP-Protein.

Zunächst wurden Gewebeschnitte des Soleus und des TA miteinander verglichen. Die großen Unterschiede der Signale zwischen diesen beiden Muskeln im Immunoblot ließ erwarten, daß auch die immunhistochemische Färbung sehr unterschiedlich ausfallen würde. Jedoch waren beide Muskeln mit gleicher Intensität gefärbt (Abbildung 11). Sowohl die Kontrolle mit Schaf-IgG als auch mit einem zehnfachen molaren Überschuß an Peptid 1 waren negativ. Das gab einen Hinweis darauf, daß der MLP-Ak_S und nicht andere IgG-Moleküle mit den Zielmolekülen reagierten, und daß der MLP-Ak_S die Bindung spezifisch mit seiner Antigenbindestelle eingeht. Wie der Ausschnitt aus dem Soleus verdeutlicht, sind auch Blutgefäße gefärbt. Ebenso sind die Muskelfasern uniform gefärbt. Die Variation der verschiedenen Parameter des Protokolls (Fixierung, Blockierung, Inkubationsdauer, Konzentrationen der Antikörper) führte zu keiner spezifischen Färbung. Alle Befunde deuten darauf hin, daß der MLP-Ak_S im Gefrierschnitt unspezifisch viele Strukturen erkennt, so daß Unterschiede des MLP-Gehaltes dadurch maskiert werden. Das gleiche Bild bietet der Vergleich des kontralateralen, 4d stimulierten und 8d stimulierten TA (nicht gezeigt).

Besonders auffällig war die starke Färbung von Strukturen, die durch Kontrollfärbungen mit einem gegen Neurofilament 68 gerichteten Antikörper als Axonenbündel identifiziert werden konnten (Abbildung 12). Diese waren in jedem untersuchten TA und Soleus gleich intensiv gefärbt. Um die Expression von MLP in den Axonen zu überprüfen, wurden Proteinextrakte des Peronealnerves im Immunoblot untersucht. Im Gegensatz zum Herzmuskel als Positivkontrolle konnte im Peronealnerv MLP nicht nachgewiesen werden (Abbildung 13). Dies legt nahe, daß auch die Färbung der Axonenbündel unspezifisch ist. Vermutlich erkennt der MLP-Ak_S mit besonders hoher Affinität ein Antigen, das im Peronealnerv exprimiert wird. Es ist also nicht gelungen experimentelle Bedingungen zu finden, unter denen, der MLP-Ak_S sein Antigen im Gefrierschnitt spezifisch erkennt.

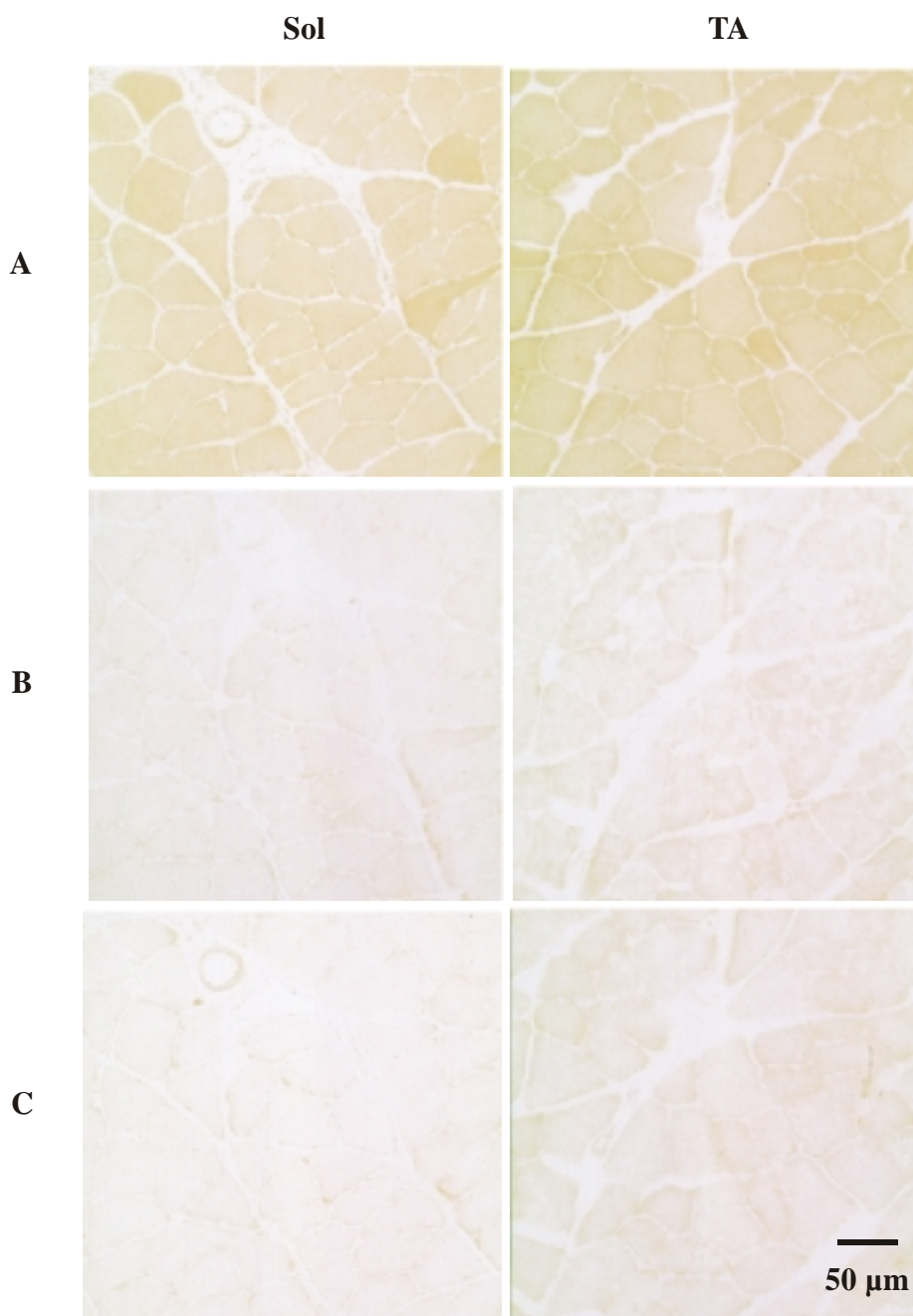
Die immunhistochemische Färbung des Soleus und TA mit dem MLP-Ak_S

Abbildung 11: TA und Soleus sind hier einander gegenübergestellt. Die Schnitte wurden in der Konzentration der Antikörper von 1,5μg/ml inkubiert. Die Färbung erfolgte mit MLP-Ak_S (A), mit Schaf-IgG (B) und mit MLP-Ak_S, der mit einem 10-fachen Überschuss an Peptid 1 präinkubiert wurde (C). Gleiche Ausschnitte von seriellen Schnitten sind gezeigt.

Die Färbung von Axonenbündeln mit dem MLP-Ak_s

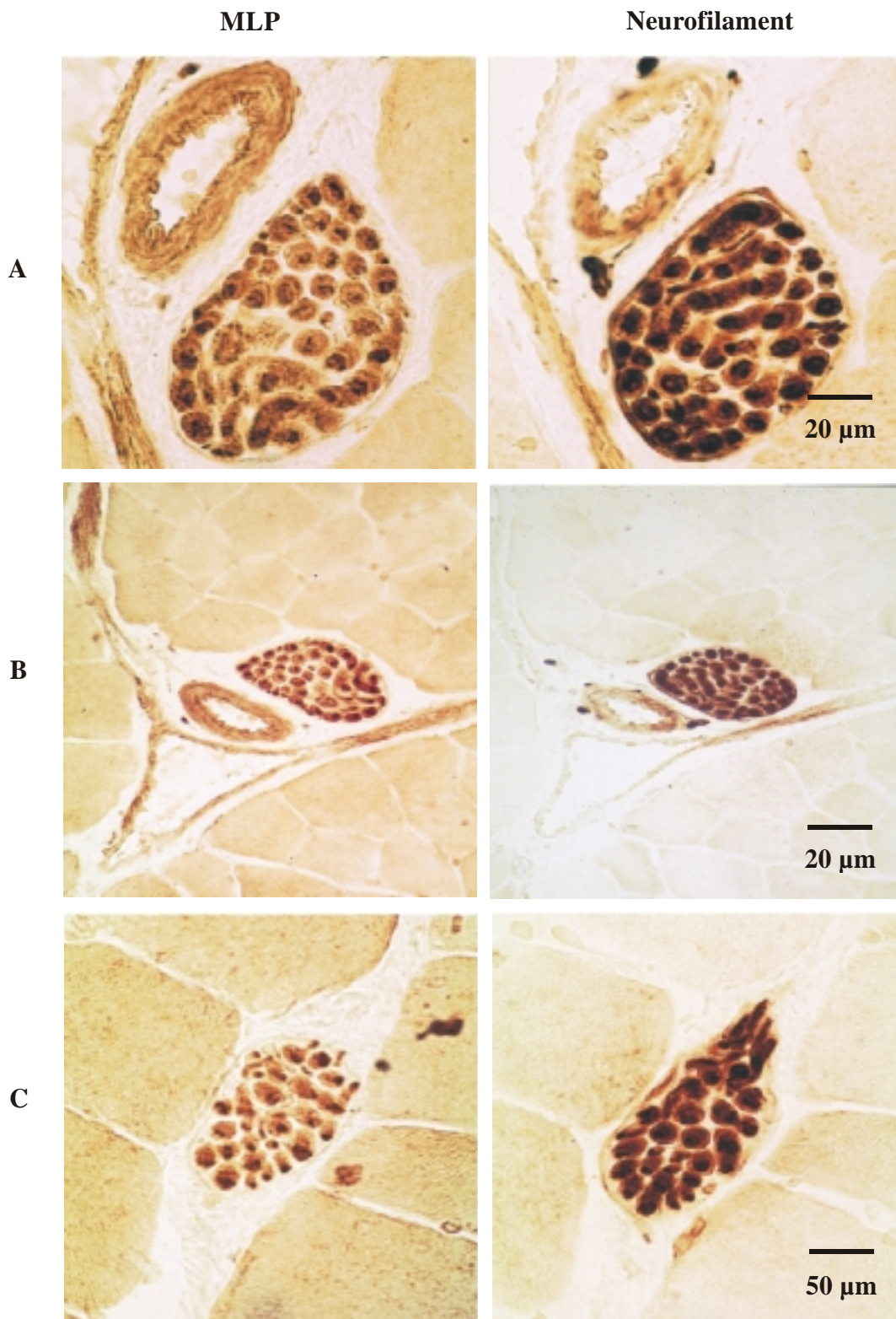


Abbildung 12: Drei verschiedene Axonenbündel (A, B und C) eines TA-Muskels wurden mit 1,5μg/ml MLP-Ak_s und mit einem Antikörper gegen die 68 kD Untereinheit des Neurofilaments gefärbt. Gleiche Ausschnitte von seriellen Schnitten sind hier gezeigt.

Der Nachweis von MLP im Peronealnerv

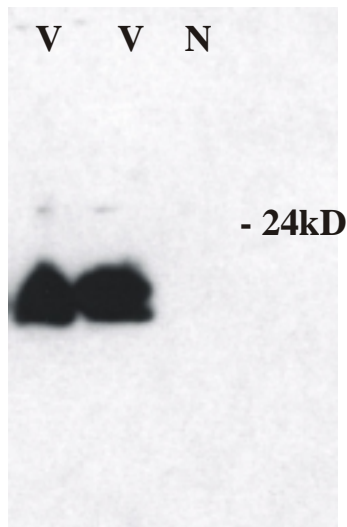


Abbildung 13: 100 μg Proteinextrakt vom Herzmuskel und 30 μg vom Peronealnerv wurden in einem 15%igen Lämmliigel aufgetrennt und dem Nachweis im Immunoblot unterzogen. MLP wurde mit 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Affinitätsgereinigtem MLP-Ak_s nachgewiesen.

2.6 Der immunhistochemische Nachweis von MLP mit einem im Kaninchen hergestellten polyklonalen Antikörper gegen MLP

Da mit dem MLP-Ak_s in Gewebeschnitten MLP nicht identifiziert werden konnte, wurde für weitere Untersuchungen ein im Kaninchen produzierter polyklonaler Antikörper verwendet (Arber *et al.* 1994). Dieser wird im folgenden als MLP-Ak_K bezeichnet. Erste Kontrollversuche zeigten, daß dieser den Herzmuskel stark färbte, jedoch nur eine äußerst schwache Immunreaktivität mit der Leber aufwies. Dies lieferte einen ersten Hinweis dafür, daß MLP mit diesem Antikörper in Gewebeschnitten spezifisch erkannt wird. Im Einklang mit den Ergebnissen des Immunoblots färbte MLP-Ak_K den Soleus stark, reagierte hingegen nur sehr schwach mit einigen Fasern des nicht stimulierten TA.

In einem weiteren Versuch wurde der nicht stimulierte TA mit dem 4d und dem 8d stimulierten TA verglichen (Abbildung 14). Während im Kontrollmuskel nur 8% der Muskelfasern eine schwache Färbung aufwiesen, waren nach 4d Elektrostimulation etwa 18% der Fasern MLP-positiv, wobei die Färbung in vielen Fasern intensiver war als die in den Fasern des nicht stimulierten Muskels. Nach 8d hatte sich die Färbung auf fast alle Muskelfasern ausgeweitet.

**Der immunhistochemische Nachweis von MLP im TA
mit MLP-Ak_K nach unterschiedlich langen Stimulationsdauern**

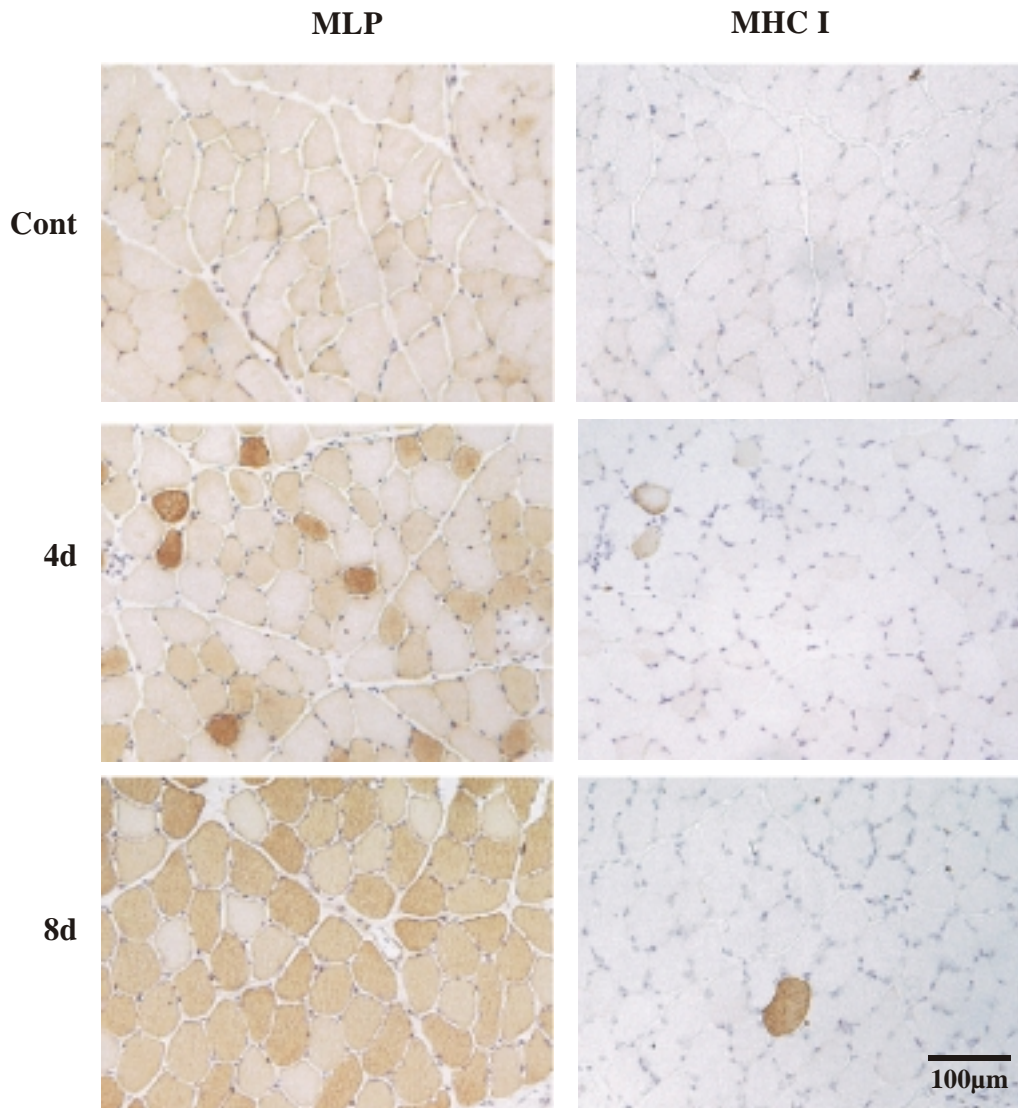


Abbildung 14: Die immunhistochemische Färbung für MLP und MHC I in seriellen Schnitten des TA von Kontrollmuskeln, 4d stimulierten und 8d stimulierten Muskeln. Die gezeigte Ausschnitte wurden nach ihrem niedrigen Gehalt an Typ I Fasern ausgewählt. Im 4d und 8d stimulierten TA sind zwei und eine Faser respektive leicht gegen MHC I gefärbt.

Um die MLP-Färbung den Fasertypen zuzuordnen, wurden serielle Querschnitte gegen MLP und gegen vier verschiedene Isoformen von MHC gefärbt. Da die Fasertypisierung im 8d stimulierten TA durch das Auftauchen von Hybridfasern infolge der einsetzenden Fasertyp-Umwandlungen schwierig ist, wurde für diese Untersuchung der 4d lang stimulierte TA ausgewählt (Abbildung 15). Im Kontrollmuskel beschränkte sich die MLP-Färbung ausschließlich auf Typ I und Typ IIA Fasern. Jedoch waren nur 35% der Typ IIA-Fasern und 5% der Typ I Fasern MLP-positiv (Tabelle 4). Dieser Anteil stieg im 4d elektrisch stimulierten Muskel auf 53% bzw. 37% der Typ IIA und der Typ I Fasern. Zu diesem Zeitpunkt waren auch 4% der Typ IID(X) Fasern gegen MLP gefärbt (Tabelle 4).

In keinem der untersuchten Muskeln wurde eine Färbung des Nukleus registriert. Die Färbung innerhalb der Muskelfasern war homogen. Zusätzlich waren auch einige Blutgefäße schwach gefärbt. Diese Färbung ist wahrscheinlich unspezifisch.

Zusammenfassend kann man sagen, daß MLP ursprünglich in einigen, aber keinesfalls in allen Typ IIA und Typ I Fasern des TA exprimiert wird. Durch CLFS wird es zunächst (4d) in diesen Fasern induziert. Nach 8d hat sich die Expression von MLP auf fast alle Fasern ausgeweitet.

Die Quantifizierung der MLP Färbung nach Fasertypen

		Total	Typ I	Typ IIA	Typ IID(X)
Kontroll-TA	Analysierte Fasern	1271	46	356	258
	% MLP-positiv	8 (\pm 4)	5	35 (\pm 16)	0
4d stimulierter TA	Analysierte Fasern	1333	83 ^a	377	317
	% MLP-positive	18 (\pm 6)*	37 (\pm 7)*	53 (\pm 16)**	4

Tabelle 4: Die Zahlen sind Werte \pm SD. * $p < 0,01$; ** $p < 0,04$ gegenüber der Kontrolle

^a, Der höhere Wert im stimulierten Muskel reflektiert nicht einen Anstieg in dem Anteil an Typ I Fasern.

Die Zuordnung der MLP-Färbung zu Fasertypen

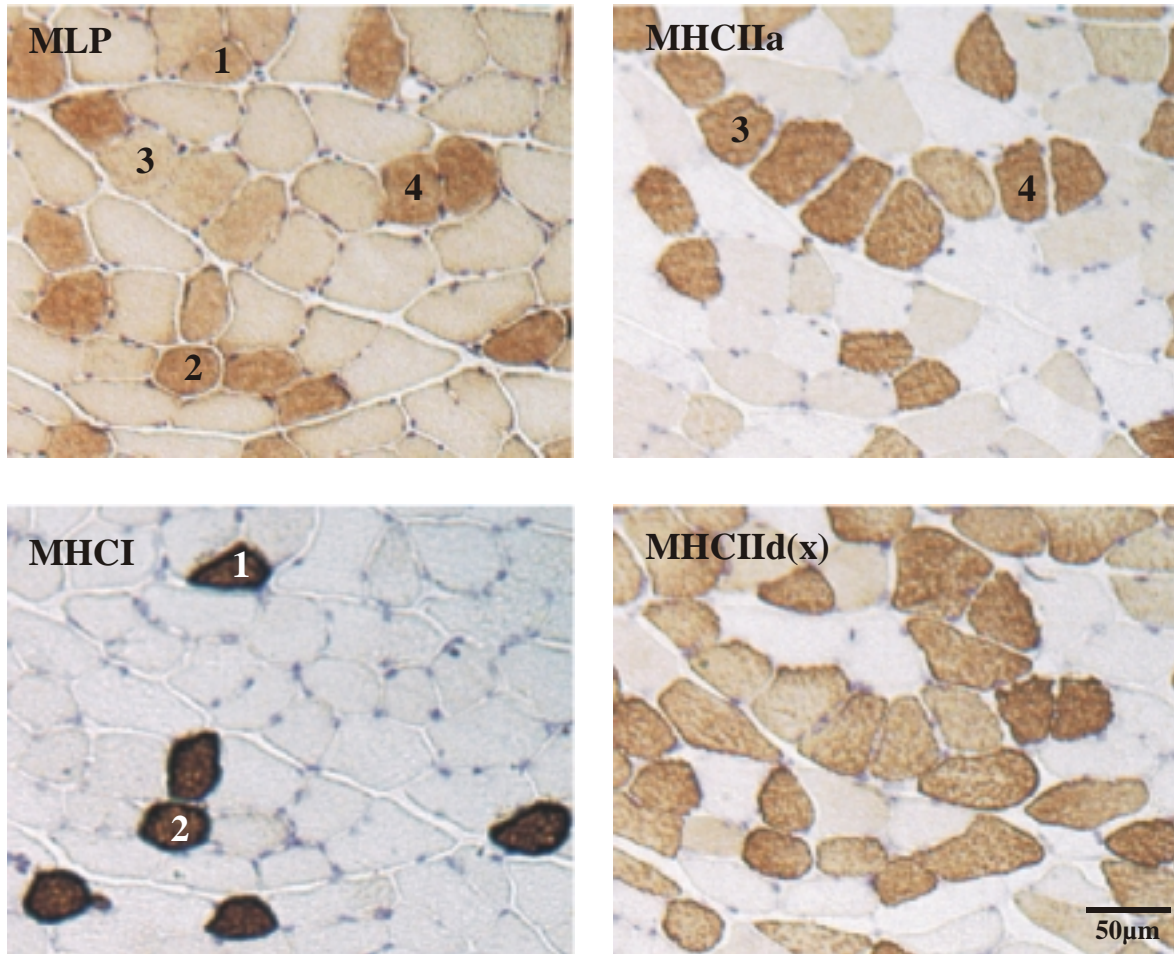


Abbildung 15: Serielle Querschnitte eines 4d stimulierten TA wurden immunhistochemisch mit dem MLP-Ak_κ, mit 7HCS-15 (MHCI), SC-71 (MHCIIA) und BF-35, der alle Fasern außer Typ IID(X) erkennt, gefärbt. Beachte zwei Typ I Fasern (1,2), die unterschiedliche Mengen an MLP exprimieren, eine Typ IIA Faser, die negativ für MLP (3) und eine Typ IIA Faser, die intensiv gegen MLP gefärbt ist (4).

3 Das Parathyroidhormon verwandte Protein (PTHrP)

3.1 Der Nachweis von PTHrP mit Hilfe von semiquantitativer RT-PCR

Die differentielle Expression von PTHrP wurde mit Hilfe von semiquantitativer RT-PCR überprüft. Verschiedene Verdünnungen der RNA vom kontralateralen TA und 12h stimulierten TA wurden in parallelen Ansätzen revers transkribiert, amplifiziert und auf einem Polyacrylamidgel dargestellt (Abbildung 16). Während im kontralateralen TA nur bei einer Verdünnung von 1:10 das Amplifikationsprodukt von 249 Nukleotiden als schwache Bande nachgewiesen werden konnte, hatte das Signal des 12h stimulierten TA bei einer Verdünnung von 1:1000 fast die gleiche Intensität. Durch densitometrische Auswertung konnte ein 80-facher Unterschied zwischen dem mRNA-Gehalt des kontralateralen und des 12h stimulierten TA bestimmt werden. Der Vergleich dieser beiden Muskeln in insgesamt vier Ratten zeigte Unterschiede in der gleichen Größenordnung. Insgesamt wurde ein 70-80 fach erhöhter Gehalt an PTHrP-mRNA im 12h stimulierten gegenüber dem kontralateralen TA ermittelt.

Semiquantitative Bestimmung der PTHrP mRNA durch RT-PCR

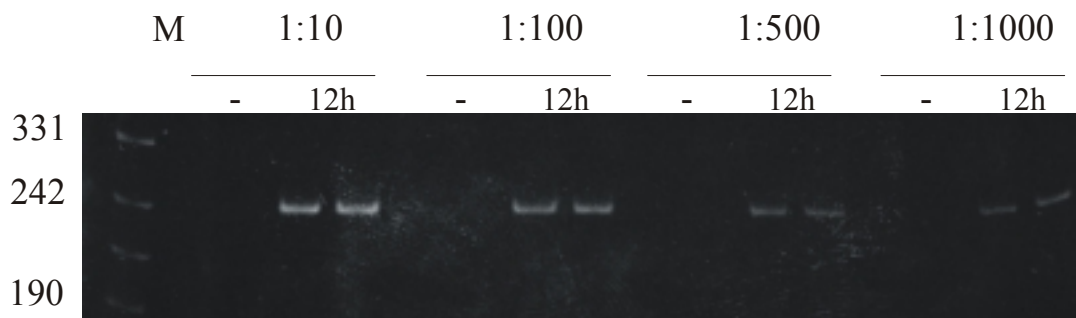


Abbildung 16: Die amplifizierte DNA wurde in einem Polyacrylamidgel dargestellt und mit Ethidiumbromid gefärbt. M bezeichnet den Marker, links ist die Nukleotidzahl seiner Banden beschrieben. Verschiedene Verdünnungen der gleichen Ausgangskonzentration an RNA vom kontralateralen (-) und 12h stimulierten TA wurden amplifiziert.

Auf die gleiche Weise wurden verschiedene Zeitpunkte der CLFS miteinander verglichen, um den Zeitverlauf der mRNA-Expression zu bestimmen. Abbildung 17 zeigt, daß das Signal nach 12h und 1d erhöht ist jedoch nach 2d wieder auf seinen Ausgangswert zurückgekehrt ist, auf dem es auch nach 4d CLFS bleibt. Die Soleus-Muskeln der kontralateralen und stimulierten Seite zeigen ein schwaches Signal, das dem des kontralateralen TA vergleichbar ist. PTHrP ist also ein Faktor, dessen mRNA bei CLFS nur vorübergehend hochreguliert wird und bereits nach 2d wieder auf ihren Ausgangswert zurückgekehrt ist. Die mRNA von PTHrP kennzeichnet nicht den langsamen Muskelphänotyp, da sie im Soleus genauso schwach exprimiert wird wie im kontralateralen TA.

Der Zeitverlauf der Induktion der PTHrP-mRNA

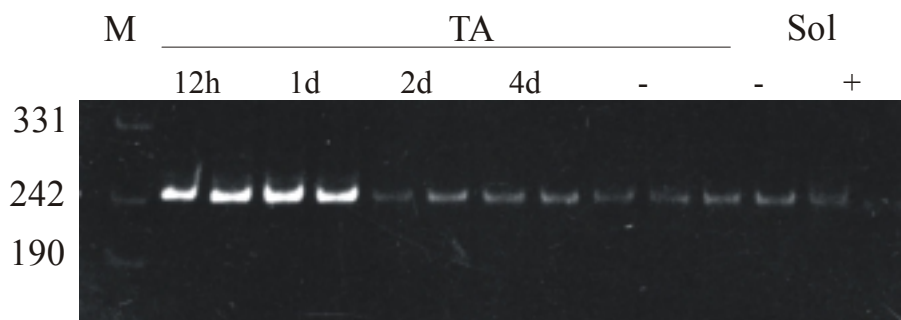


Abbildung 17: Die amplifizierte DNA wurde in einem Polyacrylamidgel dargestellt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Am linken Rand ist den Banden des Markers (M) ihre Nukleotidzahl zugewiesen. Die PTHrP-mRNA vom nicht stimulierten TA (-), vom 12h, 1d, 2d, 4d stimulierten TA, vom Soleus der kontralateralen (-) und der stimulierten (+) Seite wurde amplifiziert.

3.2 Der immunhistochemische Nachweis von PTHrP

Um PTHrP im Muskel zu lokalisieren, wurden Kryostatschnitte immunhistochemisch gefärbt. Wie Abbildung 18 A zeigt, sind im Soleus und im TA nicht die Muskelfasern gefärbt, sondern Strukturen, die wie Blutgefäße aussehen. IgG vom Kaninchen in gleicher Konzentration wie der Anti-PTHrP(34-53) Antikörper färben diese Strukturen nicht (Abbildung 18 B). Auch kann der Anti-PTHrP(34-53) Antikörper durch die Präabsorption des Antikörpers mit PTHrP(34-53) neutralisiert werden (Abbildung 18 C). Das bedeutet, daß die Färbung der Blutgefäß-ähnlichen Strukturen spezifisch ist.

Um die Blutgefäße und insbesondere die Kapillaren eindeutig zu identifizieren, wurden serielle Schnitte mit Antikörpern gegen PTHrP, Fibronectin und Laminin gefärbt. Laminin ist ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix, die als Basallamina sowohl die Muskelfasern als auch die Endothelschicht der Blutgefäße umschließt. Fibronectin ist ein intermediäres Filament, das besonders stark in der Basallamina der Blutgefäße exprimiert wird. Es ist bereits gezeigt worden, daß der immunhistochemische Nachweis von Fibronectin eine ebenso gute Nachweismethode für Blutgefäße im Muskel ist, wie die saure myofibrilläre ATPase-Färbung (Skorjanc *et al.* 1998).

Abbildung 19 und 20 zeigen die Färbungen mit den drei Antikörpern im Vergleich. Die Kapillaren einer ausgewählten Muskelfaser sind hier jeweils exemplarisch markiert. In Abbildung 20 werden die gleichen Kapillaren von jedem der drei verwendeten Antikörper gefärbt. Bei der Färbung gegen Laminin sind einige Kapillaren schwer zu identifizieren, da auch die Basallamina der Muskelfasern stark gefärbt wird. Einige Kapillaren heben sich nur schwach heraus. Auch der Anti-Fibronectin-Antikörper färbt neben den Blutgefäßen noch das Interstitium. Der Anti-PTHrP(34-53) Antikörper hingegen ist spezifisch gegen die Blutgefäße gerichtet. Mit ihm können sogar einige geöffnete Kapillaren identifiziert werden. Hier schließen die Endothelzellen einen Ring um das nicht gefärbte Lumen.

Es gibt jedoch auch einzelne Kapillaren, die nicht auf jedem Schnitt erkannt werden (Abbildung 19). In der ausgewählten Muskelfaser gibt es ein Blutgefäß, daß zwar mit den Antikörpern gegen Laminin und Fibronectin erkannt wird, nicht jedoch mit dem Anti-PTHrP(34-53) Antikörper. Dies könnte vielleicht darin begründet sein, daß die Kapillare an dieser Stelle ihre Richtung ändert und die Ebene des gegen PTHrP gefärbten Schnittes nicht mehr oder zumindest nicht an der gleichen Stelle erreicht.

Der immunhistochemische Nachweis von PTHrP im Soleus und TA

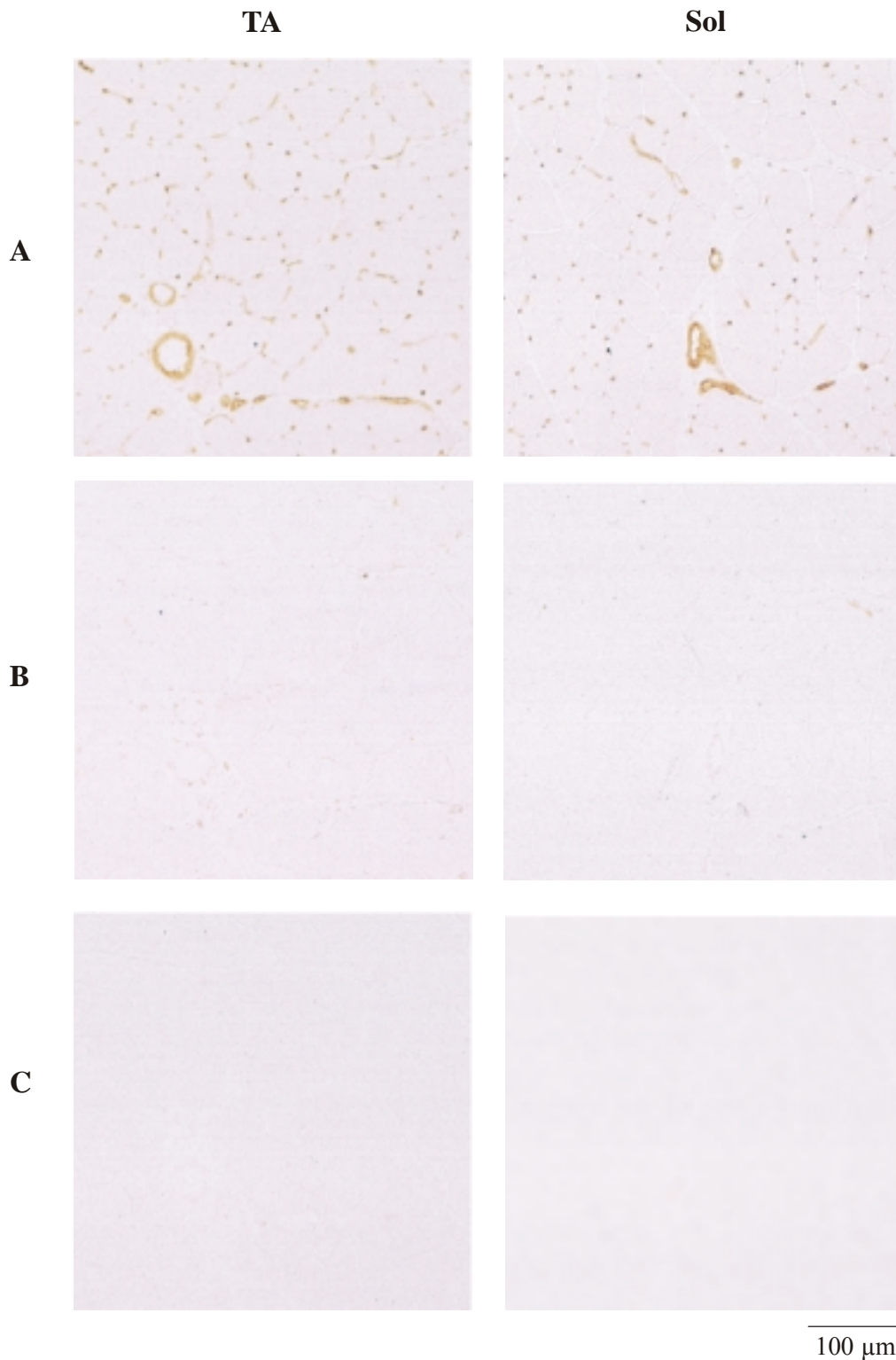


Abbildung 18: Querschnitte des TA und Soleus sind mit verschiedenen Antikörpern gefärbt: A) Anti-PTHrP(34-53) Antikörper; B) Anti-PTHrP(34-53) Antikörper mit einem 10-fachen molaren Überschuss an PTHrP(34-53); C) IgG vom Kaninchen. Gleiche Ausschnitte von seriellen Schnitten sind hier gezeigt.

Die Färbung von Blutgefäßen mit verschiedenen Antikörpern

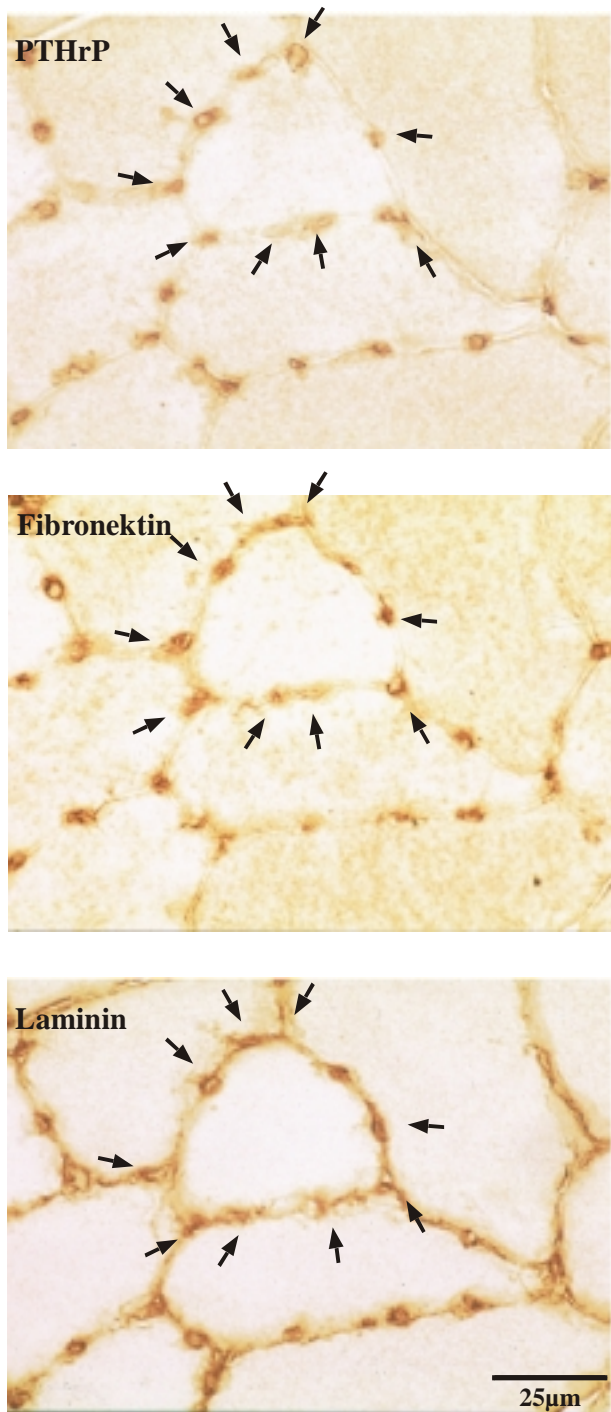


Abbildung 19: Serielle Schnitte eines unstimulierten TA sind hier gegen PTHrP, Fibronectin und Laminin gefärbt. Die Pfeile markieren die Kapillaren von einer ausgewählten Muskelfaser.

Die Färbung von Blutgefäßen mit verschiedenen Antikörpern

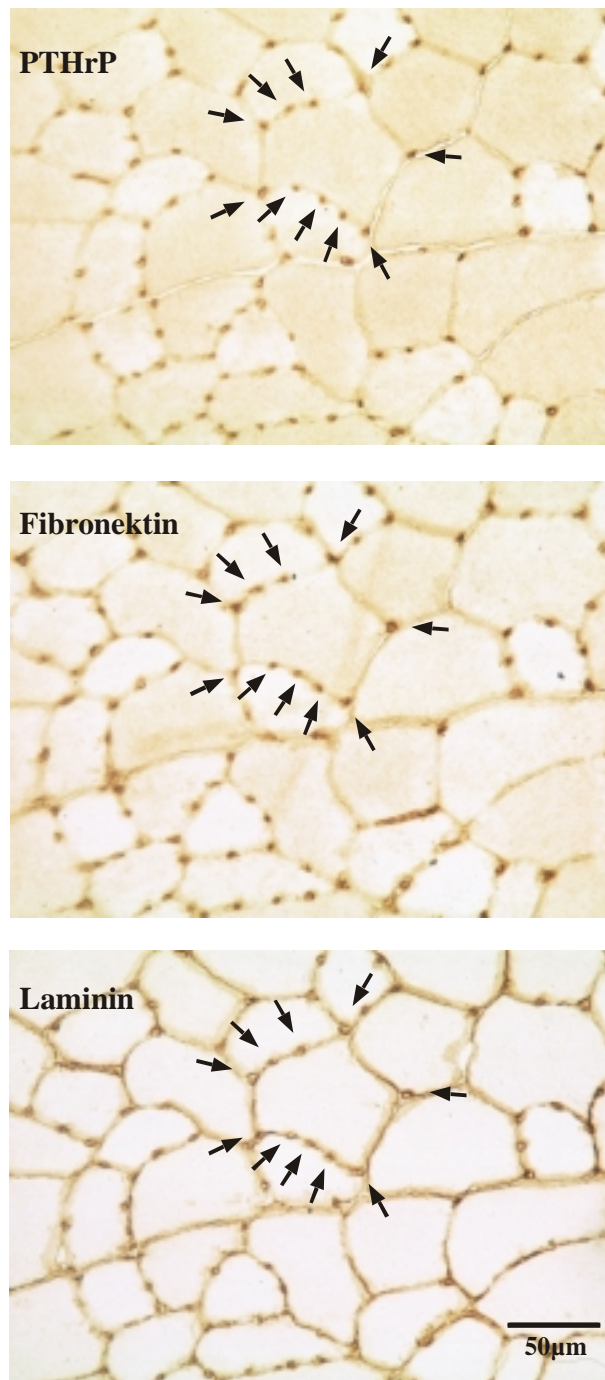


Abbildung 20: Serielle Schnitte eines unstimulierten TA sind hier gegen PTHrP, Fibronectin und Laminin gefärbt. Die Pfeile markieren die Kapillaren von einer ausgewählten Muskelfaser.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Anti-PTHrP(34-53) Antikörper Blutgefäße im Skelettmuskel mit hoher Spezifität erkennt und daher zu deren Nachweis geeignet ist.

3.3 Expression von PTHrP im TA nach unterschiedlich langen Stimulationsdauern

Querschnitte von TA-Muskeln, die unterschiedlich lang elektrisch stimuliert worden waren, wurden mit dem Anti-PTHrP(34-53) Antikörper gefärbt. Zu keinem Zeitpunkt konnte MLP in den Muskelfasern nachgewiesen werden (Abbildung 21) Das bedeutet, daß durch CLFS die Expression von PTHrP nicht in den Muskelfasern induziert wird. In allen untersuchten Muskeln waren wieder die Blutgefäße spezifisch gefärbt. Wie im Kaninchen gut untersucht ist, wird durch CLFS eine starke Vermehrung der Kapillarisation im Muskel induziert. Ein erster Anstieg der Anzahl der Kapillaren pro Muskelfaser konnte dort bereits nach 2d CLFS beobachtet werden. Nach 10d hat sich dieser Wert bereits verdoppelt (Reichmann *et al.* 1985; Skorjanc *et al.* 1998).

Um auch in der Ratte die Zunahme der Kapillarisation zu dokumentieren, wurden Soleus, unstimulierte, 4d und 8d stimulierte TA-Muskeln untersucht und in den in Abbildung 21 gezeigten Querschnitten quantifiziert. Dabei wurde die Zahl der Kapillaren pro Faser (C/F) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Quantitative Auswertung der Kapillarisation

Muskel	Kap	Fasern	Fläche (in μm^2)	Kap/Faser
TA0	967	271	862990	3,5 \pm 0,6
TA4	750	216	831980	3,5 \pm 0,8
TA8	974	190	923130	5,2 \pm 0,7
Soleus	422	81	417400	5,2 \pm 0,4

Tabelle 4: Die Anzahl der Kapillaren (Kap) pro Faser wurde im nicht stimulierten, 4d stimulierten und 8d stimulierten TA (TA0, TA4 und TA8 respektive) quantifiziert. Werte \pm SD sind dargestellt.

Die Anzahl der Kapillaren pro Faser ist nach 4d CLFS noch nicht gegenüber dem des unstimulierten TA erhöht. In beiden Muskeln fallen auf eine Muskelfaser durchschnittlich 3,5 Kapillaren. Nach 8d jedoch hat sich die Anzahl der Kapillaren pro Muskelfaser auf einen Wert von 5,2 erhöht. Eine ebenso hohe Kapillardichte wurde für den Soleus erhalten. Dies ist ein Indiz dafür, daß die Kapillarisation in der Ratte zwischen 4d und 8d CLFS stattfindet. Es ist nicht bekannt, ob längere Stimulationsdauern noch zu einem weiteren Anstieg der Kapillarisation führen würden.

PTHrP-Färbung des TA nach unterschiedlich langen Stimulationsdauern

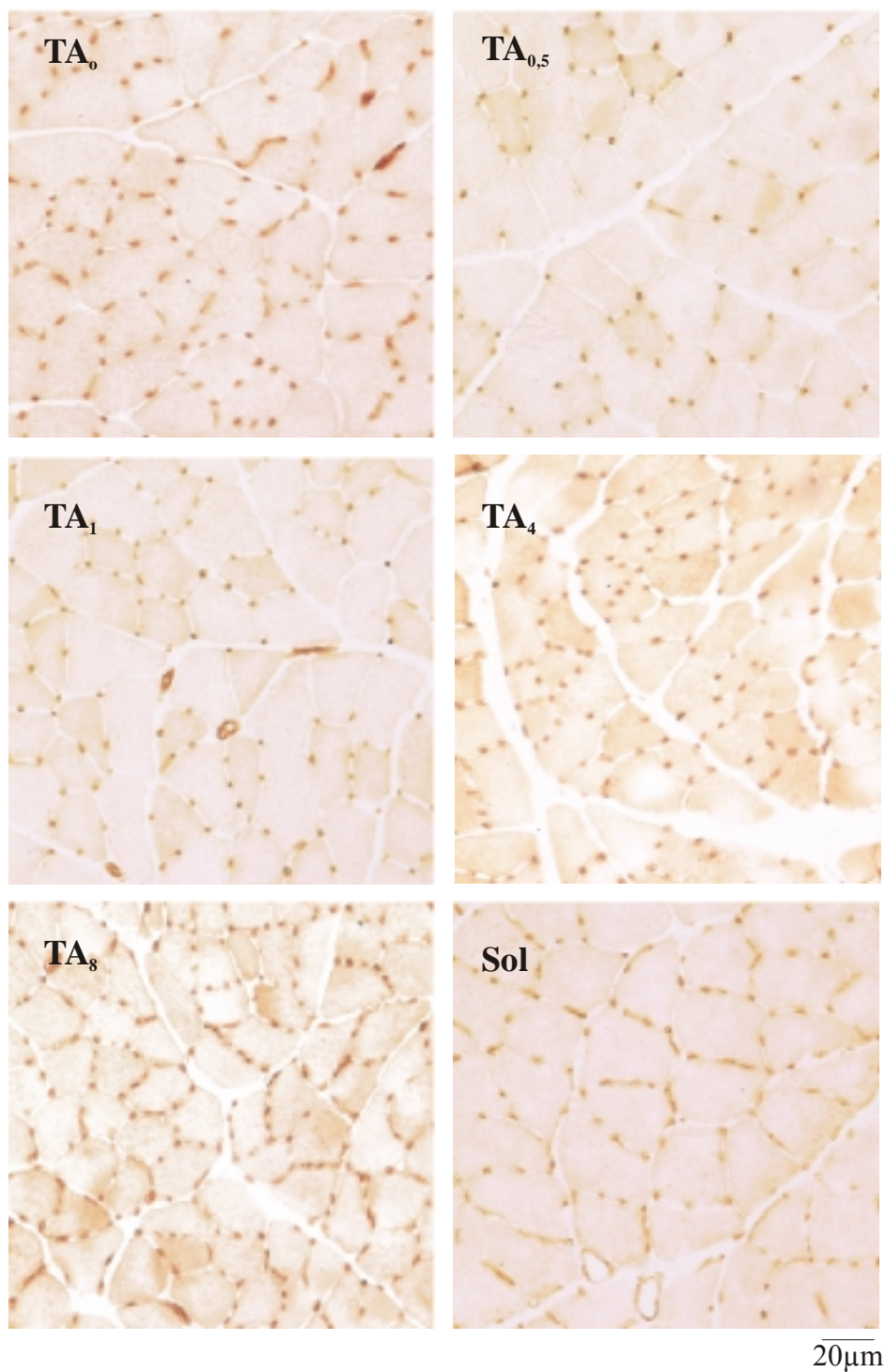


Abbildung 21: TA Muskeln, die unterschiedlich lang stimuliert worden sind, und ein Soleus sind mit dem Anti-PTHrP(34-53) Antikörper gefärbt worden. Ausschnitte von Querschnitten sind hier gezeigt.

D Diskussion

1 Die Methode des *Differential Display*

Der *Differential Display* ist eine neue Methode zur Identifizierung differentiell exprimierter mRNA. Auch wenn es inzwischen gut ausgearbeitete Protokolle gibt, deren Anwendung die schnelle Identifizierung von differentiell exprimierten Genen verspricht, ist diese Methode sehr anspruchsvoll. Die eigenen Erfahrungen haben gezeigt, daß die größte Schwierigkeit darin besteht, ein reproduzierbares Bandenmuster zu erhalten, aus dem man mit einiger Verlässlichkeit differentielle Banden isolieren kann. Die niedrigen Anlagerungstemperaturen der Primer, die notwendig sind, um viele Banden gleichzeitig zu amplifizieren, machen die Amplifikation äußerst anfällig gegenüber Störungen jeglicher Art. So ist beschrieben worden, daß die Verwendung der Reaktionsgefäße von bestimmten Herstellern ein kritischer Schritt sein kann (Chen *et al.* 1994). Auch die eigenen Erfahrungen haben gezeigt, daß es schwer ist, sämtliche Parameter zu kontrollieren, die das Bandenmuster beeinflussen können. Neben der Befolgung der allgemeinen Regeln, die für jede PCR gelten, wurden folgende zusätzliche Maßnahmen getroffen, um die Amplifikation reproduzierbar zu machen:

- 1) Die cDNAs wurden gleich nach der reversen Transkription aliquotiert und nur einmal für jede PCR aufgetaut.
- 2) Die Bewegungen beim Ansatz der PCR-Reaktionen wurden soweit wie möglich standardisiert.
- 3) Es wurde keine DNase Verdauung vor der Amplifikation durchgeführt.

Die Reamplifikation der eluierten cDNAs gelang bei über 90% der Banden. Manchmal traten noch zusätzliche PCR-Produkte auf, doch die Identifizierung der richtigen Bande war meistens durch die Abschätzung der Länge leicht möglich.

Als schwierig erwies sich die Klonierung der amplifizierten cDNAs in einen Vektor. Sowohl die Klonierung mit einem A/T-Überhang als auch mit einem stumpfen Ende zeigten niedrige Effizienzen. Schließlich wurden die cDNAs nochmals mit Primern, denen eine Schnittstelle für die Restriktionsenzyme HindIII und PstI hinzugefügt worden ist, amplifiziert. Die Klonierung der mit diesen Enzymen geschnittenen cDNAs verlief erfolgreich. Versuche, schon beim

Differential Display Primer mit Restriktionsschnittstellen einzusetzen, schlugen fehl, da diese kein reproduzierbares Bandenmuster erzeugten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Methode des *Differential Display* höchste Ansprüche an den Experimentator stellt. Viel Zeit war notwendig, um bei der PCR sämtliche Parameter zu kontrollieren. Doch wie die gelungene Identifizierung von differenziell exprimierter mRNA zeigt, führte die Methode schließlich zum Erfolg.

2 Die Ergebnisse des *Differential Display*

Die Ergebnisse zeigen das gewaltige Potential der Methode des *Differential Display*. Insgesamt wurden in dieser Studie etwa 1440 Banden amplifiziert. Dies entspricht etwa 10% der geschätzten mRNA-Spezies. 41 Banden (3%) zeigten starke Unterschiede in ihrer Intensität zwischen dem kontralateralen und stimulierten TA. Von 10 Banden wurden die DNA-Sequenzen ermittelt, die mit Hilfe von BLAST bekannten Sequenzen zugeordnet werden konnten.

Wie zu erwarten, repräsentieren nicht alle isolierten cDNAs differentiell exprimierte Gene: So konnten zwei Banden dem mitochondrialen Genom zugeordnet werden. Da vor dem *Differential Display* keine DNase Verdauung durchgeführt wurde, ist es sehr wahrscheinlich, daß hier Spuren von kontaminierender mitochondrialer DNA amplifiziert worden sind. Die differentielle Expression des ribosomalen S21 Proteins und des sauren Fibroblasten-Wachstumsfaktors (aFGF) konnte in Northern Blots nicht bestätigt werden. Falsch-Positive Banden sind ein häufiges Problem dieser Methode. So konnten beispielsweise Sun *et al.* (1994) 70% der im *Differential Display* identifizierten mRNAs die differentielle Expression mit anderen Methoden nicht als differentiell exprimiert bestätigen.

Die verbleibenden 6 Sequenzen sind jedoch von höchstem Interesse. Drei von ihnen sind noch unbekannt, und jede von ihnen gehört wahrscheinlich zu einem bisher noch nicht identifizierten Gen. Beim Aktin Capping Protein, dessen β 1-Untereinheit identifiziert wurde, handelt es sich um ein Protein, das die Länge von Aktinfilamenten reguliert. Seine mögliche Rolle bei der CLFS wird später (siehe Kapitel 4) kurz diskutiert. Das Parathyroidhormon verwandte Protein (PTHrP) und das Muskel LIM-Protein (MLP) sind regulatorische Proteine, über deren Funktion

im Skelettmuskel bislang nichts bekannt ist. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zu diesen beiden Proteinen sollen im folgenden ausführlich diskutiert werden.

3 Das Muskel-LIM-Protein (MLP)

3.1 Die Literatur zu MLP

3.1.1 LIM-Proteine werden in drei Gruppen unterteilt

LIM-Proteine sind durch das Vorhandensein von mindestens einer LIM-Domäne definiert. Diese besteht aus 50-60 Aminosäuren mit dem Konsensus $(CX_2CX_{16-23}HX_2C)X_2(CX_2CX_{16-21}CX_{2-3}(C/D/H))$ (Freyd *et al.* 1990; Sanchez-Garcia und Rabbitts 1994; Dawid *et al.* 1995). Eine LIM-Domäne besteht aus einem LIM-Doppelfinger, der durch die Komplexbildung von zwei Zinkionen durch jeweils vier Aminosäuren gebildet wird (Kosa *et al.* 1994; Michelsen *et al.* 1994; Khoo und Cousins 1994) (Abbildung 23). Im Unterschied zu Zinkfingern binden LIM-Finger nach dem derzeitigen Kenntnisstand nicht an DNA, sondern wechselwirken mit anderen Proteinen (Schmeichel und Beckerle 1994). LIM-Proteine werden aufgrund von verschiedenen Klassen von LIM-Domänen in drei Gruppen unterteilt (Taira *et al.* 1995; Dawid *et al.* 1998)¹²:

- 1) LIM-Proteine mit gepaarten LIM-Domänen der Klasse A und B
- 2) LIM-Proteine mit ein bis zwei LIM-Domänen der Klasse C
- 3) LIM-Proteine mit bis zu 5 C-terminal gelegenen LIM-Domänen der Klasse D

LIM-Proteine der Gruppe 1 sind vorwiegend im Zellkern lokalisiert. Viele von ihnen sind Transkriptionsfaktoren mit zusätzlicher Homöodomäne. Es gibt in dieser Gruppe allerdings auch Proteine, die lediglich aus LIM-Domänen bestehen wie z.B. LMO2¹³, das für die Erythrozytenbildung benötigt wird (Warren *et al.* 1994). Alle Proteine dieser Gruppe spielen bei der Differenzierung von Zelltypen und Geweben während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle. LIM-Proteine der Gruppe 2 und 3 sind überwiegend im Cytoplasma lokalisiert. Viele von ihnen sind mit dem Cytoskelett assoziiert wie z.B. CRP1 (Weiskirchen *et al.* 1995), Zyxin (Sadler *et al.* 1992), und Paxillin (Turner und Miller 1994). Alle drei Proteine sind an Adhäsionsplaques lokalisiert und könnten dort eine Rolle bei der Anheftung von Zellen an die extrazelluläre Matrix spielen.

¹² Das ursprüngliche Klassifikationsschema unterteilt LIM-Proteine in LIM-Homöoproteine, N-terminale LIM-Proteine und C-terminale LIM-Proteine. Die Gruppierung nach verschiedenen Typen von LIM-Domänen erscheint aber angemessener, da dadurch auch die Bindungspartner und die Funktion spezifiziert werden.

¹³ LMO2 ist auch unter den Namen Rhombotin2 (RBTN2) und TTG2 bekannt.

Den LIM-Proteinen ist die Fähigkeit gemein, mit ihren LIM-Domänen Protein-Protein Wechselwirkungen einzugehen (Schmeichel und Beckerle 1994). Damit erfüllen LIM-Proteine eine Funktion als molekularer Adapter, indem sie mehrere Proteine zu einem funktionalen Komplex zusammenführen, damit dieser seine Aktivität an einem definierten Ort entfalten kann (Dawid *et al.* 1998).

3.1.2 MLP gehört zu der Familie der cystein rich proteins (CRP)

MLP gehört zu den LIM-Proteinen der Gruppe 2 (Taira *et al.* 1995; Dawid *et al.* 1998). Dazu gehören Proteine wie das *cysteine-rich intestinal protein* (CRIP) (Birkenmeier und Gordon 1986) und das Drosophila Muskel LIM-Protein1 (DMLP1) (Arber *et al.* 1994), die nur aus einer einzigen LIM-Domäne bestehen und die Familie der *cystein-rich-proteins* (CRP) (Weiskirchen *et al.* 1995), deren Mitglieder (CRP1, CRP2, MLP/CRP3) sich aus zwei LIM-Domänen mit einem Abstand von 58 AS zusammensetzen. Jede LIM-Domäne ist von einer Glycin-reichen Domäne gefolgt (Abbildung 23).

Die CRP sind durch starke Homologien gekennzeichnet. In *Blot Overlay*-Experimenten ist für alle drei Proteine die Bindung an α -Aktinin und Zyxin gezeigt worden (Louis *et al.* 1997). Wie aus Transfektionsstudien an kultivierten Fibroblasten hervorgeht, sind alle drei überexprimierte CRPs mit dem Aktin-Cytoskelett assoziiert (Louis *et al.* 1997). Diese Befunde deuten darauf hin, daß die drei Mitglieder der CRPs ähnliche Funktionen erfüllen könnten. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer gewebespezifischen Verteilung. Während CRP1 in vielen Geweben und Zelltypen exprimiert wird (Louis *et al.* 1997), ist die Expression von CRP2 auf die glatte Muskulatur von Blutgefäßen beschränkt (Jain *et al.* 1996). MLP wiederum wird spezifisch in der gestreiften Muskulatur exprimiert (Arber *et al.* 1994).

Wie Experimente mit anti-sense-RNA in Zellkulturen und Knockoutexperimente *in vivo* zeigen, ist MLP ein essentieller Faktor für die Differenzierung der gestreiften Muskulatur (Arber *et al.* 1994; Arber *et al.* 1997). CRP2 scheint in Analogie dazu eine wichtige Funktion bei der Differenzierung von glatter Muskulatur in den Blutgefäßen haben. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, daß bei Dedifferenzierung von glatter Gefäßmuskulatur infolge von Verletzung die mRNA von CRP2 drastisch herunterreguliert wird (Jain *et al.* 1996). Der Mechanismus von MLP und CRP2 in den unterschiedlichen Geweben könnte dabei gleich sein. CRP2 kann bei Transfektion in C2-Myoblasten sogar den positiven Effekt von MLP auf die Differenzierung zu Myotuben imitieren (Arber und Caroni 1996).

Die schematische Darstellung von MLP

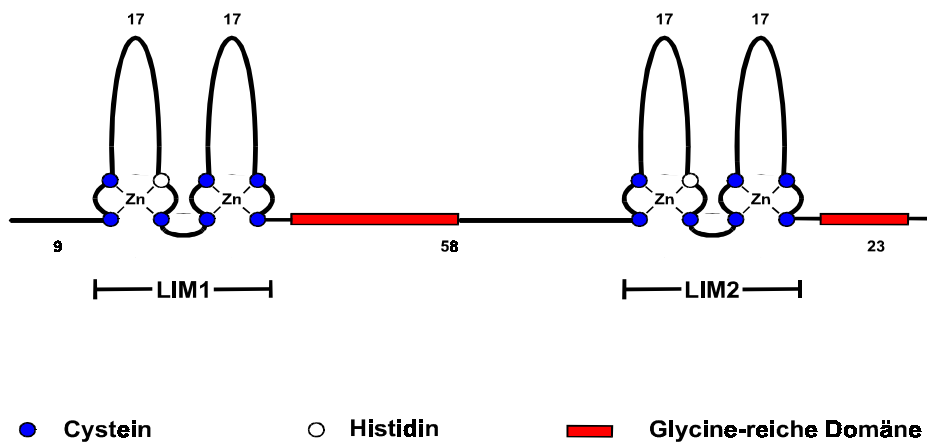


Abbildung 23: MLP ist hier schematisch dargestellt. Die Zahlen kennzeichnen die Anzahl der Aminosäuren vor, zwischen und hinter den LIM-Domänen, sowie die Zahl der Aminosäuren in den LIM-Fingern. Die Struktur von CRP1 und CRP2 entspricht der von MLP.

3.1.3 MLP ist ein wichtiger Faktor für die Differenzierung der Herzmuskulatur

Wie an der Maus gezeigt worden ist, wird MLP im Herz früh während der Embryonalentwicklung exprimiert, in sämtlichen Skelettmuskeln mit positiver MyoD-Färbung ist es am Tag 15,5 der Embryonalentwicklung nachweisbar. Seine Expression wird bei der Differenzierung zu Myotuben induziert. Während es im Herz auch postnatal auf hohem Niveau exprimiert ist, wird es in den Skelettmuskeln zwei Wochen nach der Geburt herunterreguliert und ist im adulten Tier nicht mehr nachweisbar (Arber *et al.* 1997). MLP ist in der Umgebung der Z-Scheiben lokalisiert und kann an α -Aktinin binden (Louis *et al.* 1997), das ein zentraler Bestandteil der Z-Scheibe ist. Das legt nahe, daß MLP direkt an die Z-Scheibe gebunden ist.

Einen Hinweis auf die Funktion von MLP in der Z-Scheibe liefert der Phänotyp von Mäusen, in denen beide Kopien des MLP-Genes durch homologe Rekombination zerstört worden sind (Arber *et al.* 1997): Die Herzen der Tiere sind bereits bei der Geburt außergewöhnlich weich und entwickeln wenig Kraft. Nach einigen Tagen erkranken die Tiere an einer dilativen Kardiomyopathie mit Hypertrophie. Wie ultrastrukturelle Analysen zeigen, ist die Anordnung der Myofibrillen gestört. Diese Defekte werden mit geringerer Ausprägung auch in den Skelettmuskeln beobachtet. In kultivierten Kardiomyocyten von neugeborenen Mäusen kann durch die Überexpression von transfiziertem MLP die geordnete myofibrilläre Organisation

wieder hergestellt werden. In Übereinstimmung mit den Befunden, daß MLP mit seiner zweiten LIM-Domäne (LIM2) an das Aktin-Cytoskelett gebunden ist (Arber und Caroni 1996), kann ein Konstrukt mit doppelter LIM2-Domäne (LIM2-LIM2) ebenfalls an die Z-Scheibe binden, jedoch ohne dabei die Myofibrillen wieder zu ordnen. Beide LIM-Domänen von MLP (LIM1 und LIM2) sind also für dessen Funktion in der Z-Scheibe notwendig (Arber *et al.* 1997). Es ist zu vermuten, daß LIM1 einen bisher nicht identifizierten Bindungspartner hat, der die geordnete Anordnung der Myofibrillen vermittelt.

Arber *et al.* (1997) vertreten die Hypothese, daß MLP nicht nur an der lateralen Anordnung der Myofibrillen beteiligt ist, sondern auch an der Verbindung der außen gelegenen Myofibrillen zum Sarkolemm. Beide Verbindungen finden über Z-Scheiben-assoziierte Strukturen statt. Die Myofibrillen sind mit dem Sarkolemm durch Costamere (Goncharova *et al.* 1992) lateral verankert. Die Costamere zeigen eine besonders starke Immunreaktivität gegen MLP. Arber *et al.* (1997) schlagen daher vor, daß MLP ein Adaptermolekül für die geordnete Ausrichtung der Myofibrillen ist.

3.1.4 Noch weitere LIM-Proteine sind im Skelettmuskel identifiziert worden

Neben MLP sind im Skelettmuskel weitere LIM-Proteine identifiziert worden. Das *actinin-associated LIM-protein* (ALP) wird spezifisch im differenzierten Skelettmuskel exprimiert¹⁴ (Xia *et al.* 1997). Dieses Protein setzt sich aus einer N-terminalen PDZ-Domäne und einer C-terminalen LIM-Domäne zusammen. Auch PDZ-Domänen vermitteln Protein-Protein Wechselwirkungen und charakterisieren zahlreiche Proteine, die an das Cytoskelett gebunden sind (Ponting und Phillips 1995). Für ALP ist gezeigt worden, daß es mit seiner PDZ-Domäne an die *spektrin-like-repeats* von α -Aktinin 2 bindet (Xia *et al.* 1997). Der Bindungspartner für die LIM-Domäne ist allerdings noch nicht identifiziert worden.

Eine weitere Familie von LIM-only-Proteinen mit spezifischer Expression in der gestreiften Muskulatur ist die Familie der *skeletal muscle LIM-proteins* (SLIM), von der drei Isoformen (SLIM1, SLIM2, SLIM3) identifiziert werden konnten (Morgan und Madgwick 1996). Alle SLIM Proteine bestehen aus vier LIM-Domänen und einem zusätzlichen einzelnen LIM-Finger. Nach Chan *et al.* (1998) wird SLIM3 auch *heart specific four and a half LIM-only protein2* (FHL2) genannt¹⁵, da in dieser Studie eine starke Expression im menschlichen Herz,

¹⁴ Eine alternativ gespleißte Isoform ist allerdings in geringer Menge auch im Herz identifiziert worden.

¹⁵ SLIM1 wird in Analogie dazu FHL1 genannt.

jedoch nur eine geringe im Skelettmuskel beobachtet werden konnte. Sowohl ALP als auch die SLIM-Proteine werden während der Embryonalentwicklung induziert.

3.2 Die Diskussion der Ergebnisse

3.2.1 MLP wird im langsamen Muskel konstitutiv exprimiert und im schnellen Muskel bei CLFS hochreguliert

Wie mit der Methode des *Differential Display* gezeigt und in Northern Blots bestätigt worden ist, wird die mRNA von MLP im schnellen m. Tibialis anterior (TA) nach einer Stimulationsdauer von 12h stark hochreguliert. Der Kontrollmuskel zeigt ein schwaches Signal, was darauf hindeutet, daß ein gewisses Grundniveau der mRNA von MLP auch im unstimulierten TA exprimiert wird, möglicherweise aber nur in einigen Typ I und Typ IIA Fasern. In Immunoblots konnte gezeigt werden, daß die erhöhte Menge an mRNA auch translatiert wird. Ein schwaches Signal für MLP konnte zum ersten Mal nach 4d CLFS nachgewiesen werden (in einem Tier bereits nach 2d), nach 8d ist es stark exprimiert und weist dort ein ebenso starkes Signal auf wie im Soleus und im Herzmuskel, in dem MLP bekanntermaßen stark exprimiert wird (Arber *et al.* 1994). Damit ist gezeigt, daß MLP im adulten Tier nicht auf das Herz beschränkt ist, sondern auch in langsamen Muskeln vorkommt und in schnellen Muskeln unter den Bedingungen der CLFS induziert werden kann.

Arber *et al.* (1994) haben im Immunoblot nur ein schwaches Signal für den Skelettmuskel der Ratte im Vergleich zum Herzmuskel erhalten. Der untersuchte Skelettmuskel wurde jedoch nicht näher spezifiziert. Wahrscheinlich handelte es sich um einen Muskel, der vorwiegend aus schnellen Fasern zusammengesetzt war. Auch die von Arber *et al.* (1997) beobachtete Herunterregulierung von MLP in postnatalen und adulten Skelettmuskeln der Maus ist möglicherweise auf die schnellen Muskeln beschränkt. Die vorliegende Arbeit jedenfalls beschreibt erstmalig die Expression von MLP in einem adulten Skelettmuskel.

3.2.2 MLP wird spezifisch in den Muskelfasern exprimiert

Die Lokalisierung von MLP gelang durch die immunhistochemische Färbung von Querschnitten. Dabei wurden der Soleus, der Herzmuskel und unterschiedlich lang stimulierte TA-Muskeln analysiert. In allen Muskeln beschränkte sich die Färbung auf die Muskelfasern. Eine Immunreaktivität im Kern, wie sie für kultivierte Myotuben beschrieben ist, konnte hier nicht beobachtet werden. Es ist möglich, daß MLP lediglich im frühen Myotubenstadium im

Kern lokalisiert ist. In kultivierten Myotuben ist MLP zunächst im Kern, dann mit einer gewissen Zeitverzögerung im Cytosol nachweisbar (Arber *et al.* 1994).

Die immunhistochemischen Daten stimmen gut mit den Ergebnissen des Immunoblots überein. Die starke MLP-Bande von Extrakten des Herzmuskels, des Soleus und des 8d stimulierten TA im Immunoblot spiegelt sich darin wider, daß in den immunhistochemischen Färbungen alle Muskelfasern gefärbt sind (für den Soleus hier nicht gezeigt). Im nicht-stimulierten TA hingegen konnte eine schwache MLP-Färbung in nur einigen Muskelfasern beobachtet werden. Der immunhistochemische Nachweis ist also sensitiver als der Immunoblot, in dem kein Signal für den kontralateralen TA erhalten wurde. Die im Immunoblot beobachtete Induktion von MLP nach 4d zeigt sich auch in der immunhistochemischen Färbung in einer deutlichen Zunahme der Anzahl an MLP-positiven Fasern.

MLP charakterisiert nicht einen spezifischen Fasertyp. Im nicht-stimulierten und auch noch im 4d stimulierten TA ist die Expression von MLP fast ausschließlich auf Typ I und Typ IIA Fasern beschränkt. Aber im Gegensatz zum Soleus, in dem jede Faser MLP exprimiert, wird MLP nur in 35% der Typ II Fasern und 5% der Typ I Fasern des nicht stimulierten TA exprimiert. Nach 4d CLFS hat sich der Anteil von MLP-positiven Typ IIA und Typ I Fasern auf 53% und 37% erhöht. Auch konnten hier 4% Typ IID Fasern identifiziert werden, die MLP exprimierten. Nach 8d hat sich die Expression von MLP auf nahezu alle Fasern des Muskels ausgeweitet. Dieses Expressionsmuster weist eine bemerkenswerte Übereinstimmung mit dem der Hitzeschockproteine α B-Krystallin und HSP70 im TA des Kaninchens auf (Neufer *et al.* 1996; Neufer und Benjamin 1996). Die Expression dieser Proteine ist anfangs ebenfalls auf eine Subpopulation der Typ I und Typ IIA Fasern beschränkt, die nach 1 und 3 Tagen zunimmt. Nach 21d CLFS sind sämtliche Fasern der untersuchten Muskeln gefärbt.

Eine Interpretation der vorliegenden Befunde fällt nicht leicht, weil MLP weder einen Fasertyp noch den Übergang zwischen zwei Fasertypen charakterisiert. So kann die zunächst auf einige Typ I und Typ IIA Fasern beschränkte Expression von MLP nicht den Übergang zu einem langsameren Fasertyp begleiten, da sich in der Ratte die schnell-zu-langsam Umwandlung im wesentlichen bis zu Typ IIA Fasern vollzieht. Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus der Tatsache, daß Typ I und Typ IIA Fasern durch eine erhöhte oxidative Kapazität gekennzeichnet sind, die sie gegenüber Ermüdung resistent macht. Untersuchungen am TA des Kaninchen geben Hinweise darauf, daß Typ IIB und Typ IID(X) Fasern bereits wenige Minuten nach Einsetzen der CLFS refraktär werden und erst nach etwa 6-8d wieder anfangen zu zucken

(Cadefau *et al.* 1993; Green und Pette 1997; Hicks *et al.* 1997). Die Krafterzeugung erfolgt während dieser Zeit wahrscheinlich bevorzugt durch die Typ I und Typ IIA Fasern. Die frühe Induktion von MLP nach 4d CLFS könnte daher mit der permanenten kontraktiven Aktivität dieser Fasern korrelieren. Dies würde auch eine Erklärung dafür liefern, daß beim Soleus MLP in sämtlichen Fasern exprimiert wird. Dieser Muskel wirkt der Schwerkraft entgegen und hat daher ein tonisches Aktivitätsmuster. Der phasisch aktive TA hingegen hat nur wenige MLP-positive Fasern, deren Anteil infolge erhöhter kontraktiver Aktivität bei CLFS ansteigt. Nach etwa 8d haben sich die zuvor refraktären Fasern auf den aeroben Metabolismus umgestellt und tragen mit zur Erzeugung von Kraft bei. Daher weitet sich die Expression von MLP auch auf diese Fasern aus. Diese Argumentation steht allerdings unter dem Vorbehalt, daß noch nicht bekannt ist, ob in der Ratte analog zum Kaninchen die Muskelfasern durch CLFS refraktär werden.

3.2.3 Die Expression von MLP steht unter neuraler Kontrolle

Bei der CLFS wird dem Peronealnerven ein Impulsmuster aufgezwungen, das dem eines langsamen Motoneurons ähnlich ist. Dieses überlagert das schnelle Impulsmuster, das weiterhin dem Muskel übermittelt wird. Die Hochregulierung von MLP unter diesen Bedingungen gibt einen Hinweis darauf, daß dessen Expression unter neuraler Kontrolle steht. Die Beobachtung, daß MLP bei der Denervierung eines Beinmuskels der Ratte hochreguliert wird (Arber *et al.* 1994), legt nahe, daß dessen Expression durch das Impulsmuster eines schnellen Nerven reprimiert wird.

3.2.4 MLP wirkt bei erhöhter kontraktiver Aktivität vielleicht als Adaptermolekül in der Z-Scheibe

Da in der vorliegenden Studie keine Immunfluoreszenzfärbungen an Längsschnitten durchgeführt wurden, ist es nicht sicher, ob MLP hier, ebenso wie im Herzmuskel in der Nähe der Z-Scheibe lokalisiert ist. Wenn dies der Fall ist, so stellt sich die Frage nach dessen Funktion in der Z-Scheibe. Ebenso wie alle übrigen Komponenten des Skelettmuskels ist die Z-Scheibe in höchsten Maße plastisch d.h. ändert ihre molekularen und strukturellen Eigenschaften bei veränderter funktioneller Beanspruchung. Langsame Muskelfasern haben dickere Z-Scheiben als schnelle (Eisenberg und Kuda 1976), und CLFS führt nach ein bis zwei Wochen zu einer ersten Zunahme der Dicke der Z-Scheiben, die sich über mehrere Wochen fortsetzt (Eisenberg und Salmons 1981).

Wie oben diskutiert, korreliert die Expression von MLP mit der kontraktiven Aktivität der Muskelfasern. Stark beanspruchte Muskelfasern unterliegen einem erhöhten Verschleiß, der sich in einem erhöhten Protein-Turnover widerspiegelt. Dieser ist beim Soleus gegenüber dem TA deutlich erhöht. Von der Z-Scheibe aus wird der Aufbau des Sarkomers während der Myofibrillogenese organisiert (Vigoreaux 1994; Fürst und Gautel 1995) und möglicherweise auch der durch CLFS induzierte Umbau des Sarkomers. In den Typ IIA und Typ I Fasern, wo MLP zunächst exprimiert wird, könnte MLP eine Funktion bei dem geordneten Austausch von Proteinen infolge eines erhöhten Turnovers erfüllen, in den sich transformierenden Typ IID und Typ IIB Fasern, in denen MLP nach 8d CLFS exprimiert wird, könnte es noch zusätzlich an dem durch CLFS induzierten Austausch von schnellen durch langsame Proteine beteiligt sein.

Es ist gezeigt worden, daß MLP mit der LIM2-Domäne an die Z-Scheibe bindet (Arber und Caroni 1996; Arber *et al.* 1997), die LIM1-Domäne bleibt also noch frei für weitere Bindungspartner. MLP erfüllt wahrscheinlich nur eine Rolle als molekularer Adapter (Arber und Caroni 1996), der den oder die Bindungspartner an die richtige Stelle plaziert. Im Hinblick auf die beobachtete Bindung des LIM-Proteins ALP an α -Aktinin 2 (Xia *et al.* 1997) stellt sich die Frage, ob dieser Faktor ein Bindepartner von MLP ist. Alle Hypothesen über die Funktion von MLP bleiben spekulativ, bevor die Proteine, die mit MLP wechselwirken, identifiziert worden sind.

4 Die β 1-Untereinheit des Aktin Capping Proteins (CapZ)

Zur β 1-Untereinheit des Aktin Capping Protein CapZ wurden zwar keine weiteren Untersuchungen zur Bestätigung seiner differentiellen Expression durchgeführt. Trotzdem soll die mögliche Rolle dieses Faktors vor dem Hintergrund der Literatur kurz diskutiert werden.

Die β 1-Untereinheit bildet zusammen mit der α -Untereinheit das Aktin Capping Protein CapZ. Dieses Protein bindet an das „bärtige“ Ende von F-Aktin und schützt dieses daher vor unkontrollierter Polymerisation und Depolymerisation. Gleichzeitig bildet CapZ den Ausgangspunkt für die Polymerisation am punktierten Ende von F-Aktin (Caldwell *et al.* 1989). Im Muskel ist CapZ in der Z-Scheibe lokalisiert (Casella *et al.* 1987). Beim Zusammenbau des Sarkomers wird es in die entstehende Z-Scheibe eingebaut, bevor sich die Aktinfilamente zur I-

Bande organisieren (Schafer und Waddle 1993). Verhindert man die Bindung von CapZ an Aktin, so hemmt dies auch den Einbau von Aktin in das Sarkomer (Schafer *et al.* 1995). Es wird daher vermutet, daß bei der Myofibrillogenese das bereits in der Z-Scheibe verankerte CapZ Aktinfilamente mit der richtigen Polarität an der Z-Scheibe verankert (Schafer *et al.* 1995).

Bei der CLFS werden nach den bisherigen Befunden die Aktinfilamente nicht ausgetauscht, jedoch könnte deren Länge am bärtigen Ende in der Z-Scheibe verändert werden. Bei der Zunahme der Dicke der Z-Scheibe infolge von CLFS vergrößert sich auch der Überlappungsbereich der entgegengesetzt ausgerichteten Aktinfilamente von zwei Sarkomeren. Die Neusynthese der $\beta 1$ -Untereinheit von CapZ könnte einen erhöhten Turnover dieses Proteins anzeigen, der dadurch zu erklären ist, daß CapZ aktiv entfernt wird, um die vorübergehende Aktinpolymerisation in der Z-Scheibe zuzulassen. Diese wird dann durch Bindung von neusynthetisiertem CapZ beendet. Die Regulation könnte über anionische Phospholipide wie Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphat (PIP₂) erfolgen, von denen bereits bekannt ist, daß sie die Dissoziation des CapZ von Aktin verursachen (Schafer *et al.* 1996).

5 Das Parathyroid-Hormon-ähnliche Protein (PTHrP)

5.1 Allgemeiner Überblick über die Literatur

5.1.1 PTHrP ist ein in fast allen Geweben exprimierter Faktor mit vielfältigen Funktionen

Das Parathyroid-Hormon-ähnliche Protein (PTHrP) ist 1987 als der Faktor identifiziert worden, der bei dem Syndrom der *humoral hypercalcemia of malignancy* (HHM), einen erhöhten Kalziumspiegel im Blut der Patienten hervorruft (Martin 1989). Die Ursache von HHM ist meistens ein Nierenkarzinom, bei dem die Tumorzellen PTHrP in das Blut sezernieren. PTHrP hat seinen Namen aufgrund großer Homologien seiner 13 N-terminalen Aminosäuren zu dem Parathyroidhormon (PTH) und der Wirkung beider Faktoren über den gemeinsamen PTH/PTHrP-Rezeptor erhalten (Segre *et al.* 1992). Es muß dabei jedoch klar unterschieden werden, daß PTH nur von der Parathyroiddrüse produziert wird und die systemische Kalziumhomöostase durch seine Wirkung im Skelett und in der Niere reguliert (Habener *et al.* 1984). PTHrP hingegen wird nahezu in jedem Gewebe exprimiert (Halloran und Nissenson 1992) und entfaltet seine Wirkung, sofern die Zellen nicht neoplastisch transformiert sind, nur lokal begrenzt.

Die Funktionen von PTHrP sind dabei vielfältig und können, wie folgt, zusammengefaßt werden (Wysolmerski und Stewart 1998):

- Kontrolle von frühen Vorgängen der Embryonalentwicklung
- Kontrolle von Proliferation, Differenzierung und Apoptose
- Stimulation des transepithelialer Kalziumtransport in der Plazenta, der Brustdrüse und dem Nierentubulus
- Entspannung der glatten Muskulatur

5.1.2 PTHrP wird posttranslational in mehrere aktive Peptide gespalten

PTHrP wird von einem Gen kodiert, das in den verschiedenen Spezies stark konserviert ist. So gibt es zwischen dem Gen des Menschen und dem von Nagetieren in der Region von Aminosäure 1-111 nur eine Abweichung von drei Aminosäuren. Während jedoch das menschliche Gen durch differentielles Spleißen drei verschiedene Translationsprodukte erzeugt, die sich am C-Terminus ab der Aminosäure 140 unterscheiden (Gillespie und Martin 1994),

gibt es bei der Ratte nur ein primäres Produkt von 142 Aminosäuren Länge (Karaplis *et al.* 1990).

Dieses wird posttranslational in mindestens fünf verschiedene Peptide gespalten, von denen jedes eine eigene Funktion und wahrscheinlich auch seinen eigenen Rezeptor hat: Das N-terminale Peptid PTHrP(1-36) wirkt in der Regel über den klassischen PTH/PTHrP-Rezeptor (Segre *et al.* 1992), es gibt aber auch Hinweise auf einen weiteren, strukturell bisher noch nicht charakterisierten Rezeptor, über den das N-terminale Peptid wirken kann (Orloff *et al.* 1995). PTHrP(1-36) bewirkt die Dilatation von Blutgefäßen und aktiviert die Knochenresorption. Das C-terminale Peptid PTHrP(107-139) hat im endochondralen Skelett genau den gegenteiligen Effekt, indem es die Knochenresorption durch Osteoklasten inhibiert (Fenton *et al.* 1991a; Cornish *et al.* 1997) und wird deshalb auch Osteostatin genannt (Fenton *et al.* 1991b). Für das mittlere Peptid sind bisher drei Varianten, mit unterschiedlichen C-Termini identifiziert worden: PTHrP(38-94), PTHrP(38-95), PTHrP(38-101) (Wu *et al.* 1996). Dies ist im Einklang damit, daß der Bereich zwischen den Aminosäuren 87 und 106 mehrere Schnittstellen für Prohormon-Konvertasen (Steiner 1998) enthält. Es ist noch nicht bekannt, inwiefern sich die drei mittleren Peptide in ihrer Funktion unterscheiden. Es gibt jedenfalls bereits Hinweise darauf, daß PTHrP(67-86), das in allen drei mittleren Peptiden enthalten ist, über einen eigenen Rezeptor wirkt. Anders als beim klassischen PTH/PTHrP-Rezeptor verläuft die Signaltransduktion beim PTHrP-Rezeptor für das mittlere Peptid nicht über den Proteinkinase A-Weg, sondern den Proteinkinase C-Weg wie an Squamous Karzinomzellen gezeigt worden ist (Orloff *et al.* 1996). Das mittlere Peptid bewirkt den materno-fötalen Kalziumgradienten, indem es die Kalziumpumpe in der Plazenta aktiviert (Kovacs *et al.* 1996).

Nach der Prozessierung des Prohormons werden die Peptide entweder auf dem konstitutiven (z.B. in Osteoblasten und der glatten Muskulatur) oder aber, in *dense core* sekretorische Granula verpackt, auf dem regulierten Sekretionsweg (z.B. in Neuronen des ZNS und in der Parathyroiddrüse) sezerniert. Die Art der Sekretion hängt davon ab, ob die Zelle, die PTHrP sezerniert, einen neurosekretorischen Apparat besitzt oder nicht (Plawner *et al.* 1995).

Nach seiner Sekretion entfaltet PTHrP autokrin und parakrin seine Wirkung. In vielen Fällen ist gezeigt worden, daß der PTH/PTHrP-Rezeptor in Zellen exprimiert wird, die dem Gewebe, das PTHrP sezerniert, unmittelbar benachbart sind. So wird beispielsweise bei der Knorpelbildung PTHrP im Perichondrium exprimiert, während der PTH/PTHrP-Rezeptor in den heranreifenden Chondrozyten exprimiert wird (Lee *et al.* 1995).

Inzwischen gibt es auch Hinweise darauf, daß PTHrP seine Wirkung intrakrin entfalten kann. So ist beispielsweise in Knochenzellen PTHrP im Nukleus, speziell im Nukleolus lokalisiert. Der Eintritt in den Kern ist abhängig von PTHrP(87-106), eine Sequenz mit vielen basischen Aminosäuren, die starke Homologien zu der nukleolären Lokalisierungssequenz von retroviralen Proteinen aufweist. In kultivierten Chondrozyten ist gezeigt worden, daß die Deletion dieser Region nicht nur den Eintritt in den Zellkern, sondern auch den apoptotischen Zelltod verhindert (Henderson *et al.* 1995). Auf welchem Weg PTHrP in den Zellkern gelangt und wie es dort wirkt, ist bisher unbekannt.

5.1.3 Die Rolle von PTHrP im Herz- und Skelettmuskel

PTHrP wird im Herzmuskel sowohl im Atrium als auch im Ventrikel exprimiert, wobei es im Atrium auf dem regulierten Weg sezerniert wird (Deftos *et al.* 1993). Es erhöht dabei sowohl die Herzschlagfrequenz (chronotroper Effekt) als auch den Blutausstoß pro Herzschlag (inotroper Effekt) (Nickols *et al.* 1989; Ogino *et al.* 1995). Der chronotrope Effekt ist mit einer direkten Wirkung von PTHrP auf das Reizleitungssystem verbunden, indem PTHrP den Schrittmacherstrom im Sinusknoten erhöht (Hara *et al.* 1997). Der inotrope Effekt wird indirekt durch die vasodilative Wirkung von PTHrP auf die Koronargefäße vermittelt (Ogino *et al.* 1995). Die Expression von PTHrP im Herz wird durch erhöhten Blutdruck induziert. Dadurch kann die verstärkte Belastung kompensiert werden (Takahashi *et al.* 1995).

Auch in der Skelettmuskulatur ist PTHrP identifiziert worden. PTHrP-Protein ist in der embryonalen und neonatalen Skelettmuskulatur der Ratte (Campos *et al.* 1991; Burton *et al.* 1992) und des Menschen nachgewiesen worden (Kramer *et al.* 1991; Moseley *et al.* 1991). Wie immunhistochemische Befunde zeigen, ist PTHrP dabei in den Muskelfasern lokalisiert. Auch die mRNA für den PTH/PTHrP-Rezeptor ist in der Skelettmuskulatur von Ratten in Northern Blots identifiziert worden (Tian *et al.* 1993; Urena *et al.* 1993). Über die Rolle von PTHrP in den Muskelfasern ist allerdings nichts bekannt.

5.1.4 PTHrP ist in Blutgefäßen eine vasodilative Substanz

PTHrP ist in der glatten Muskulatur von allen bisher untersuchten Geweben als ein Relaxans beschrieben worden. In der glatten Muskulatur der Blutgefäße (VSMC) wirkt PTHrP daher als vasodilative Substanz (Philbrick *et al.* 1996). PTHrP kann in Zellkulturen von glatter Muskulatur durch Vasokonstriktoren wie Angiotensin II, Endothelin 1, Norepinephrin,

Bradykinin, Serotonin und Thrombin aber auch durch mechanische Reize induziert werden (Hongo *et al.* 1991; Pirola *et al.* 1993; Pirola *et al.* 1994). Dies ist durch das Aufblasen eines Ballons in der Aorta, die zyklische Streckung von glatter Muskulatur in Kultur und auch geringe Bewegungen der Kulturschale demonstriert worden (Noda *et al.* 1994; Pirola *et al.* 1994). An der glatten Muskulatur der Rattenaorta erfolgt die mechanische Induktion von PTHrP über einen Proteinkinase C- abhängigen Weg (Noda *et al.* 1996).

Außer für PTHrP ist auch für PTH eine vasodilative Wirkung beschrieben worden. Es ist gezeigt worden, daß PTHrP(1-36) diesen Effekt hat, nicht jedoch Peptide aus dem mittleren und C-terminalen Bereich. Die Signaltransduktion erfolgt durch die Bindung an den klassischen PTH/PTHrP-Rezeptor, der in der glatten Muskulatur der Gefäße exprimiert wird (Nickols *et al.* 1990; Okano *et al.* 1994). Dabei wird der cAMP-Spiegel erhöht, ein Signal für die Muskelrelaxation. Außer dem Adenylatzyklase/Proteinkinase A-Weg ist auch der Guanylatzyklase/NO-Synthase-Weg an der Signaltransduktion beteiligt (Massfelder *et al.* 1996). Die Wirkung über den PTH/PTHrP-Rezeptor ist unabhängig von den Endothelzellen, wie durch die Entfernung der Endothelschicht gezeigt worden ist (Massfelder *et al.* 1996). Allerdings ist die Expression von PTHrP auch in den Endothelzellen beobachtet worden (Ishikawa *et al.* 1994).

Der PTH/PTHrP-Rezeptor koppelt in den Blutgefäßen nicht, wie es in Knochen beobachtet worden ist (Rabbani *et al.* 1997), an den Proteinkinase C-Weg. Dies ist physiologisch sinnvoll, da die Erhöhung des Kalziumspiegels Vasokonstriktion bewirken und dem Effekt von cAMP entgegenlaufen würde. Wie an COS-7 Zellen gezeigt worden ist, vermittelt PTHrP über das G(α)q-Protein die Aktivierung der Proteinkinase C (Offermanns *et al.* 1996). G(α)q wird zwar in den VSMC exprimiert (Maeda *et al.* 1996), jedoch kann der Proteinkinase C-Weg nur durch dessen Überexpression induziert werden. Dies spricht dafür, daß das G(α)q-Protein in VSMC entweder eine höhere Affinität zu anderen Rezeptoren hat oder aber kompartimentiert wird und daher für den PTH/PTHrP-Rezeptor nicht zur Verfügung steht.

5.2 Die Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Die schnelle Induktion von PTHrP durch CLFS steht im Einklang mit seiner Rolle als *immediate early response* Gen

Wie mit der Methode der semiquantitativen RT-PCR gezeigt wurde, führt CLFS von nur 12h zu einem mindestens 70-fachen Anstieg der mRNA von PTHrP gegenüber dem Kontrollmuskel. Dies ist der höchste bisher registrierte Anstieg eines Faktors, der durch CLFS induziert wird. Der Anstieg ist vorübergehend, denn nach 2d CLFS ist die Menge an mRNA bereits auf ihrem Ausgangswert zurückgekehrt und steigt auch bei einer Stimulation von bis zu 4d nicht mehr an. Wie die geringen Mengen an mRNA im Soleus und im nicht-stimulierten TA zeigen, wird PTHrP im Skelettmuskel auf niedrigem Niveau konstitutiv exprimiert, unabhängig davon, ob es sich um einen schnellen oder um einen langsamen Muskel handelt.

Die schnelle Induzierbarkeit steht im Einklang mit anderen Studien, in denen gezeigt wurde, daß die Expression von PTHrP die Merkmale eines *immediate early response* Genes hat. So kann PTHrP in kultivierten Keratinozyten der Ratte durch Serum, Wachstumsfaktoren oder Cycloheximid nach wenigen Minuten induziert werden (Allinson und Drucker 1992). Es ist daher möglich, daß auch durch CLFS die Expression der mRNA von PTHrP bereits nach sehr viel kürzerer Zeit als 12h aktiviert wird. Die *immediate early response* Gene sind durch eine kurze Halbwertszeit ihrer mRNA charakterisiert. Dafür sind multiple Kopien des AUUUA-Motivs in der 3'-untranslatierten Region verantwortlich. Diese Motive sind auch im Gen von PTHrP identifiziert worden, dessen Halbwertszeit in kultivierten Keratinozyten 90min beträgt (Allinson und Drucker 1992). Die kurze Halbwertszeit der mRNA von PTHrP steht auch im Einklang damit, daß die mRNA nach der CLFS von 1d noch in voller Höhe exprimiert wird, aber bereits nach dem zweiten Tag auf den Ausgangswert zurückkehrt ist.

Die Induktion der *immediate early response* Gene c-fos und c-jun im 4h elektrisch stimulierten Kaninchenmuskeln ist vor diesem Hintergrund interessant (Michel *et al.* 1994; Osbaldeston *et al.* 1995). Beide Proteine sind außer in den Muskelfasern noch in den interstitiellen Zellen und Endothelzellen der Blutgefäße identifiziert worden. C-jun, c-fos und PTHrP könnten daher in den Blutgefäßen durch ein gemeinsames Signal hochreguliert werden.

5.2.2 PTHrP konnte nicht in Muskelfasern nachgewiesen werden

In der vorliegenden Arbeit ist PTHrP nicht in den Muskelfasern des Soleus und des TA detektiert worden. Auch unter den Bedingungen der CLFS mit einer Dauer von 12h, 1d, 2d und 4d ist PTHrP nicht in nachweisbaren Mengen in den Muskelfasern des TA induziert worden. In der Skelettmuskulatur der Ratte ist PTHrP immunhistochemisch bisher nur bei embryonalen und neonatalen Tieren nachgewiesen worden (Campos *et al.* 1991; Burton *et al.* 1992). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß PTHrP nicht in adulten TA- und Soleus-Fasern exprimiert wird. Die starke Färbung in den Blutgefäßen dieser Muskeln dient damit zugleich als positive Gewebekontrolle und zeigt das Fehlen einer PTHrP-Färbung in den Muskelfasern selbst.

5.2.3 PTHrP wird in Blutgefäßen des Soleus und TA exprimiert

In allen untersuchten Muskeln wurde eine starke Färbung der Blutgefäße beobachtet, und zwar sowohl in großen Blutgefäßen als auch in Kapillaren. Dies ist in guter Übereinstimmung mit Befunden, denen zufolge PTHrP in den VSMC exprimiert wird und dort als vasodilative Substanz wirkt (Hongo *et al.* 1991; Philbrick *et al.* 1996). Die PTHrP-Färbung der Kapillaren hingegen läßt sich nicht mit der Expression in den VSMC erklären. Hier sind die Endothelzellen lediglich von den Perizyten umgeben (Shimada *et al.* 1992). Allerdings ist PTHrP auch in Endothelzellen identifiziert worden (Ishikawa *et al.* 1994). Da Endothelzellen und Perizyten lichtmikroskopisch nicht unterschieden werden können, bleibt die Frage ungeklärt, ob auch letztere PTHrP exprimieren (siehe auch Kapitel 5.2.6).

5.2.4 Die Induktion von PTHrP erfolgt wahrscheinlich in den Blutgefäßen

Da in sämtlichen untersuchten Skelettmuskeln die Färbung der Blutgefäße mit PTHrP beobachtet wurde, stellt sich die Frage nach dessen Induktion durch CLFS. Aus den Daten der semiquantitativen RT-PCR wäre zu erwarten gewesen, daß die Intensität der Färbung im 12h- und 24h- stimulierten TA viel höher ist als in den anderen Muskeln. Als ein Protein, das von einem *immediate early response* Gen kodiert ist, wird die mRNA von PTHrP ohne große Zeitverzögerung translatiert und sezerniert (Allinson und Drucker 1992). Auch wenn es hier nicht gezeigt werden konnte, ist es daher sehr wahrscheinlich, daß die erhöhte mRNA in den Blutgefäßen translatiert wird.

Es gibt zwei mögliche Erklärungen dafür, daß keine Unterschiede in der Intensität der Anfärbung zwischen den Blutgefäßen gefunden worden sind: Die erste Erklärung liegt in der Methode der immunhistochemischen Anfärbung selbst begründet. Quantitative Aussagen sind

schwer zu treffen, weil diese Methode nur qualitative Ergebnisse liefert. Lediglich sehr große Unterschiede in den Menge an Protein können als unterschiedlich starkes Signal sichtbar gemacht werden. Es ist also gut möglich, daß der Anstieg der PTHrP-Proteinmenge wesentlich geringer ist als der gewaltige Anstieg der mRNA und daß dieser geringe Unterschied immunhistochemisch nicht nachzuweisen ist. Die zweite Erklärung gründet sich auf die Tatsache, daß PTHrP sezerniert wird. Es kann immunhistochemisch nur nachgewiesen werden, solange es sich in der Zelle befindet. In dem gleichen Ausmaß, wie sich die Translation von PTHrP erhöht, könnte sich auch die Sekretionsgeschwindigkeit ändern. In diesem Fall würde die Menge an PTHrP, das sich im sekretorischen Apparat auf dem Weg aus der Zelle befindet, zu keinem Zeitpunkt erhöht sein, obwohl mehr PTHrP produziert und sezerniert wird.

5.2.5 Das durch CLFS hochregulierte PTHrP könnte eine Vasodilatation bewirken

Wie schon in Abschnitt 5.1.4 beschrieben wurde, kann PTHrP allein durch mechanische Faktoren hochreguliert werden. Dies könnte auch für den elektrisch stimulierten Muskel gelten. So könnte die permanente Streckung und Stauchung der Blutgefäße infolge der erhöhten kontraktiven Aktivität des Muskels bewirken, daß die mRNA von PTHrP hochreguliert wird.

Da keine Studien an den Rezeptoren durchgeführt wurden, ist nicht bekannt, wo das von den Blutgefäßen sezernierte PTHrP seine Wirkung entfaltet. Obwohl ein parakriner Effekt von PTHrP auf die Muskelfasern nicht ausgeschlossen werden kann, ist es jedoch wahrscheinlicher, daß die Wirkung von PTHrP auf die Blutgefäße selbst beschränkt ist. Seine Bedeutung für die Vasodilatation durch Relaxation der glatten Muskulatur ist in der Literatur gut dokumentiert (Philbrick *et al.* 1996). Durch seine relaxierende Wirkung auf die VSMC könnte es als lokaler Modulator des Gefäßtonus und des lokalen Blutflusses dienen. Für die CLFS könnte dies bedeuten, daß PTHrP während des ersten Tages induziert wird, damit sich die Gefäße erweitern. In der Tat ist ein Anstieg des Blutflusses bei Ruhe bereits nach 2d CLFS beobachtet worden (Hudlicka und Eginton 1994). Auch die Anzahl der perfundierten Kapillaren steigt lange, bevor eine Kapillarisation stattfindet (Cotter und Hudlicka 1979). Durch den verstärkten Blutfluß wird der erhöhte Bedarf an Sauerstoff gedeckt. Das durch die erhöhte kontraktile Aktivität hochregulierte PTHrP könnte somit zu einer vorübergehenden Erhöhung des Blutflusses führen.

5.2.6 Auch in den Kapillaren könnte PTHrP den Tonus regulieren

Ist in den größeren Blutgefäßen wie Arterien, Arteriolen, Venolen und Venen die Aufgabe von PTHrP als vasodilative Substanz durch die Literatur gestützt und fügt sich gut in das Modell der

CLFS, so stellt sich die Frage nach seiner Funktion in den Kapillaren. Diese bestehen lediglich aus einer Schicht von Endothelzellen, die das Lumen bilden, und einer eng anliegenden Schicht von Perizyten. Mit Hilfe von Raster-Elektronenmikroskopie konnten drei Typen von Perizyten nach ihrer Morphologie unterschieden werden (Shimada *et al.* 1992). Die Perizyten vom Typ II, die den Übergang von den terminalen Arteriolen zu den Kapillaren charakterisieren, weisen große Ähnlichkeiten mit glatten Muskelzellen auf, indem sie mit ihren Fortsätzen die Arteriolen völlig umschließen. Diese morphologischen Befunde sowie die Expression von für die glatte Muskulatur spezifischem α -Aktin stützen die Hypothese, daß Perizyten kontraktile Zellen sind, die den mikrovaskulären Blutfluß regulieren. Somit könnte die Expression von PTHrP in den Endothelzellen oder Perizyten autokrin oder parakrin die Relaxation der Perizyten und dadurch den erhöhten Blutfluß in den Kapillaren bewirken. Die Möglichkeit der aktiven Regulation des Kapillartonus ist hypothetisch und müßte noch bewiesen werden.

5.2.7 Die Induktion von PTHrP geht der Kapillarisation um mehrere Tage voraus

Eine der durch CLFS bedingten Anpassungen ist die verbesserte Kapillarisation des stimulierten Muskels. Es stellt sich dabei die Frage, ob der erhöhte Gehalt an PTHrP-mRNA nach 12h und 24h CLFS einfach durch die Tatsache erklärt werden kann, daß bereits mehr Kapillaren pro Muskelmasse existieren. Das ist allerdings unwahrscheinlich, weil im Soleus und im 8d stimulierten TA, die beide stark kapillarisiert sind, kein Anstieg im Gehalt an mRNA von PTHrP im Vergleich zum unstimulierten TA erfolgt. Bereits nach zwei Tagen CLFS ist die mRNA wieder auf ihren ursprünglichen Wert zurückgekehrt. Es ist jedoch auch nach 4d CLFS keine erhöhte Kapillarisation festzustellen. Erst im Zeitraum zwischen 4d und 8d CLFS steigt die Anzahl der Kapillaren pro Faser von 3,5 auf 5,2. Die Erhöhung der mRNA von PTHrP geht der Kapillarisation um mindestens 3d voraus. Der 70-fache Anstieg der mRNA nach 12h CLFS reflektiert daher die Induktion in den vorhandenen Kapillaren und nicht die bereits einsetzende Bildung neuer Kapillaren. Aufgrund des großen zeitlichen Abstandes zwischen der Hochregulierung der mRNA von PTHrP und dem Einsetzen der Kapillarisation ist es daher auch wenig wahrscheinlich, daß PTHrP einen direkten Einfluß auf die Neubildung von Blutgefäßen hat.

Die Wirkung von PTHrP auf die Proliferation von VSMC ist noch nicht ausreichend untersucht (Massfelder *et al.* 1997): Während PTHrP (1-36) und (1-141) im Medium die Proliferation von kultivierten VSMC der Rattenaorta inhibierte, führte das durch Gentransfer in den Zellen exprimierte Protein zu einer Anregung der Proliferation. Insgesamt ist eine Rolle von PTHrP

bei der Angiogenese nicht erwiesen. Es ist daher naheliegend, daß PTHrP bei der CLFS eine vasodilative Wirkung entfaltet. Im folgenden Abschnitt wird erläutert, wie PTHrP indirekt doch an der Kapillarisation beteiligt sein könnte.

5.2.8 Die durch PTHrP induzierte Erweiterung der Blutgefäße könnte die Kapillarisation bei der CLFS bewirken

Was ist das Signal für die Kapillarisation des chronisch stimulierten Muskels? In mehreren Studien ist gezeigt worden, daß der erhöhte Blutfluß zur Neubildung von Kapillaren führt. So konnte durch verschiedene vasodilative Substanzen wie beispielsweise Dipyridamol (Ljungqvist *et al.* 1984) und Ethanol (Mall *et al.* 1982) die Kapillarisation induziert werden. Auch Prazosin (Ziada *et al.* 1989), das durch seinen vasodilativen Effekt den Blutfluß im Skelettmuskel fast verdreifacht, bewirkt dort die Kapillarisation, nicht jedoch im Herzmuskel, wo es keinen Einfluß auf den Blutfluß ausübt.

PTHrP ist ebenfalls eine vasodilative Substanz und dessen frühe Hochregulierung nach 12h CLFS legt die Hypothese nahe, daß PTHrP hier eine Erweiterung der Blutgefäße bewirkt. In der Tat ist nach 2d CLFS im TA der Ratte ein erhöhter Blutfluß in Ruhe gemessen worden (Hudlicka und Egginton 1994). An anderen Modellen ist gezeigt worden, daß Hypoxie die Kapillarisation einleitet. Hypoxie ist auch das Signal für die Induktion von VEGF, dem wichtigsten Faktor bei der Angiogenese. VEGF scheint auch bei der Kapillarisation des chronisch stimulierten Muskel beteiligt zu sein, wie die frühe Hochregulierung seiner mRNA (Hang *et al.* 1995; Skorjanc *et al.* 1998) zeigt. Der Zeitverlauf hierfür ist biphasisch mit einem ersten Maximum nach 1d und einem zweiten größeren Anstieg, der nach 4d einsetzt und nach 8d sein Maximum erreicht (Skorjanc *et al.* 1998). Allerdings kann Hypoxie im chronisch stimulierten Muskel die Kapillarisation nicht induzieren, wie Experimente zeigen, in denen die Blutzufuhr gedrosselt wurde (Hudlicka und Price 1990). In der Tat scheint der erhöhte Blutfluß das Signal für die Kapillarisation zu sein.

Auf welche Weise wirkt sich der erhöhte Blutfluß auf die Kapillarisation aus? Durch den erhöhten Blutfluß nimmt die Fließgeschwindigkeit des Blutes in den Kapillaren zu, so daß stärkere Scherkräfte auf das Kapillarbett wirken (Dawson und Hudlicka 1993). Wie in Zellkultur gezeigt wurde, können Scherkräfte die Proliferation von Endothelzellen induzieren (Ando *et al.* 1987). Dies ist in Übereinstimmung mit Befunden, denen zufolge neue Kapillaren bevorzugt dort sprießen, wo die alten Kapillaren am stärksten gekrümmt sind (Myrhage und Hudlicka 1978). An dieser Stelle treffen die Erythrozyten mit der größten Kraft auf die

Gefäßwand. Elektronenmikroskopische Untersuchungen am TA haben auch gezeigt, daß die luminale Glykokalix in den Endothelzellen nach 2d und 4d elektrischer Stimulation beschädigt ist (Brown *et al.* 1996). Somit könnten durch Scherstreß hervorgerufene Verletzungen, den Endothelzellen entweder direkt oder über freigesetzte Faktoren das Signal zur Proliferation geben.

Als solche Faktoren werden außer VEGF der *endothelial cell stimulating angiogenic factor* (ESAF), NO und Prostaglandine diskutiert (Brown *et al.* 1995; Hang *et al.* 1995; Hudlicka 1998). ESAF wird in den Muskelfasern des TA in umgekehrt proportionaler Menge zum Grad ihrer Kapillarisation exprimiert. Nach 7d CLFS ist die Menge an ESAF im glykolytischen Kortex des TA um den Faktor 3 erhöht, während sie im oxidativen Kern, dessen Kapillarisation nicht mehr zunimmt, unverändert bleibt (Brown *et al.* 1995).

Zusammenfassend läßt sich folgende Hypothese formulieren: PTHrP wird in den Blutgefäßen konstitutiv exprimiert, um den Gefäßtonus konstant zu halten. Infolge von CLFS wird es bereits nach wenigen Stunden hochreguliert. Es bewirkt die Relaxation der VSMC in den großen Blutgefäßen (siehe Abschnitt 5.2.5) und möglicherweise auch der Perizyten in den Kapillaren (siehe Abschnitt 5.2.6). Durch den erhöhten Blutfluß wird die Sauerstoffversorgung verbessert. Infolge der erhöhten Scherkräfte und/oder der Dehnung der Gefäßwand werden Faktoren wie VEGF, ESAF u.a. freigesetzt und/oder induziert, wodurch die Endothelzellen zur Proliferation angeregt werden. Die Kapillarisation führt zu einer weiteren Verbesserung der Sauerstoffversorgung nach etwa vier Tagen. Die erhöhte Expression von PTHrP erfolgt nur vorübergehend innerhalb der ersten 24h der CLFS, um die Zeit bis zum Einsetzen der Kapillarisation zu überbrücken. Sein Effekt auf die Kapillarisation ist daher indirekt.

E Zusammenfassung

Chronisch niederfrequente Elektrostimulation führt zur Umwandlung eines schnellen in einen langsamen und ausdauernden Skelettmuskel. Umfangreiche Veränderungen auf der Ebene der kontraktilen Proteine, des Energiestoffwechsels und der Kalziumaufnahme und -freisetzung sind beschrieben worden.

Zur Identifizierung von Genen, deren Proteine eine regulatorische Funktion bei diesem Umwandlungsprozeß haben, wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode des *Differential Display* angewandt. Unter den mRNAs, die im schnellen m. Tibialis anterior nach 12h CLFS drastisch hochreguliert werden, konnte das Muskel LIM-Protein (MLP) und das Parathyroidhormon-ähnliche Protein (PTHrP) identifiziert werden.

MLP ist ein wichtiger Faktor für die Muskeldifferenzierung, wurde bisher jedoch nicht in der adulten Skelettmuskulatur nachgewiesen. In der vorliegenden Studie wurde MLP im Immunoblot als starke Bande im Herzmuskel, im langsamen Soleus und im 8d elektrisch stimulierten schnellen TA nachgewiesen, nicht jedoch im kontralateralen TA. Während im nicht-stimulierten TA nur ~8% der Muskelfasern immunhistochemisch schwach gefärbt waren, stieg der Anteil der MLP-positiven Fasern nach 4d CLFS auf ~18%. Die Expression von MLP ist im nicht-stimulierten TA auf eine Subpopulation von Typ I und Typ IIA Fasern beschränkt, wird nach 4d CLFS hauptsächlich in diesen Fasern induziert und hat sich nach 8d CLFS auf nahezu alle Fasern ausgeweitet. Eine Korrelation der MLP-positiven Fasern mit einer erhöhten kontraktilen Aktivität wird diskutiert.

Die mRNA von PTHrP ist nach 12h CLFS um den Faktor 70-80 hochreguliert, ist allerdings nach 2d wieder auf ihren Ausgangswert zurückgekehrt. Zwischen dem langsamen Soleus und schnellen TA bestehen bezüglich der Gehalte an PTHrP-mRNA keine Unterschiede. Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, daß PTHrP in allen untersuchten Muskeln in den Blutgefäßen lokalisiert ist. Die bekannte Rolle von PTHrP als vasodilative Substanz in der glatten Muskulatur der Blutgefäße legt die Vermutung nahe, daß das durch die CLFS induzierte PTHrP die Blutgefäße erweitert. Damit läßt sich auch der von anderen Autoren gezeigte erhöhte Blutfluß nach 2d CLFS erklären. MLP und PTHrP stellen somit zwei Faktoren mit potentieller regulatorischer Funktion für die durch CLFS induzierten Anpassungen des schnellen TA dar.

F Bibliographie

Adams GR, Hather BM, Baldwin KM and Dudley GA. Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. (1993) *J. Appl. Physiol.* **74** p911-915

Aigner S, Gohlsch B, Hamalainen N, Staron RS, Uber A, Wehrle U and Pette D. Fast myosin heavy chain diversity in skeletal muscles of the rabbit: heavy chain IId, not IIb predominates. (1993) *Eur. J. Biochem.* **211** p367-372

Allinson ET and Drucker DJ. Parathyroid hormone-like peptide shares features with members of the early response gene family: rapid induction by serum, growth factors, and cycloheximide. (1992) *Cancer Res.* **52** p3103-3109

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25** p3389-3402

Anderson JE. Studies of the dynamics of skeletal muscle regeneration: the mouse came back! (1998) *Biochem. Cell Biol.* **76** p13-26

Ando J, Nomura H and Kamiya A. The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells. (1987) *Microvasc. Res.* **33** p62-70

Andres V, Cervera M and Mahdavi V. Determination of the consensus binding site for MEF2 expressed in muscle and brain reveals tissue-specific sequence constraints. (1995) *J. Biol. Chem.* **270** p23246-23249

Arber S and Caroni P. Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. (1996) *Genes Dev.* **10** p289-300

Arber S, Halder G and Caroni P. Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. (1994) *Cell* **79** p221-231

Arber S, Hunter JJ, Ross J, Jr., Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR and Caroni P. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardio-myopathy, and heart failure. (1997) *Cell* **88** p393-403

Arnold HH and Braun T. Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review. (1996) *Int. J. Dev. Biol.* **40** p345-353

Baldwin KM. Effect of spaceflight on the functional, biochemical, and metabolic properties of skeletal muscle. (1996) *Med. Sci. Sports Exerc.* **28** p983-987

Barany M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. (1967) *J. Gen. Physiol.* **50** p197-218

Barnard RJ, Edgerton VR, Furukawa T and Peter JB. Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. (1971) *Am. J. Physiol.* **220** p410-414

Bassel-Duby R, Hernandez MD, Yang Q, Rochelle JM, Seldin MF and Williams RS. Myocyte nuclear factor, a novel winged-helix transcription factor under both developmental and neural regulation in striated myocytes. (1994) *Mol. Cell Biol.* **14** p4596-4605

Bauer D, Muller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P and Strauss M. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). (1993) *Nucleic Acids Res.* **21** p4272-4280

Billeter R, Weber H, Lutz H, Howald H, Eppenberger HM and Jenny E. Myosin types in human skeletal muscle fibers. (1980) *Histochemistry* **65** p249-259

Birkenmeier EH and Gordon JL. Developmental regulation of a gene that encodes a cysteine-rich intestinal protein and maps near the murine immunoglobulin heavy chain locus. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83** p2516-2520

Blum H, Beier H and Gross HJ. (1987) *Electrophoresis* **8** p93-97

Bohmann D, Bos TJ, Admon A, Nishimura T, Vogt PK and Tjian R. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. (1987) *Science* **238** p1386-1392

Booth FW and Criswell DS. Molecular events underlying skeletal muscle atrophy and the development of effective countermeasures. (1997) *Int. J. Sports Med.* **18 Suppl 4** p265-269

Bottinelli R, Canepari M, Reggiani C and Stienen GJ. Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. (1994) *J. Physiol. (Lond)* **481** p663-675

Brooke MH and Kaiser KK. Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. (1970) *J. Histochem. Cytochem.* **18** p670-672

Brown MD, Cotter MA, Hudlicka O and Vrbova G. The effects of different patterns of muscle activity on capillary density, mechanical properties and structure of slow and fast rabbit muscles. (1976) *Pflugers Arch.* **361** p241-250

Brown MD, Egginton S, Hudlicka O and Zhou AL. Appearance of the capillary endothelial glycocalyx in chronically stimulated rat skeletal muscles in relation to angiogenesis. (1996) *Exp. Physiol.* **81** p1043-1046

Brown MD, Hudlicka O, Makki RF and Weiss JB. Low-molecular-mass endothelial cell-stimulating angiogenic factor in relation to capillary growth induced in rat skeletal muscle by low-frequency electrical stimulation. (1995) *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* **15** p111-116

Buller AJ, Eccles JC and Eccles RM. Interaction between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their response. (1960) *J. Physiol. (Lond.)* **150** p417-439

Buonanno A, Cheng J, Venepally P, Weis J and Calvo S. Activity-dependent regulation of muscle genes: repressive and stimulatory effects of innervation [In Process Citation]. (1998) *Acta Physiol. Scand.* **163** pS17-26

Buonanno A and Rosenthal N. Molecular control of muscle diversity and plasticity. (1996) *Dev. Genet.* **19** p95-107

Burton PB, Moniz C, Quirke P, Malik A, Bui TD, Juppner H, Segre GV and Knight DE. Parathyroid hormone-related peptide: expression in fetal and neonatal development. (1992) *J. Pathol.* **167** p291-296

Cadefau JA, Parra J, Cusso R, Heine G and Pette D. Responses of fatigable and fatigue-resistant fibres of rabbit muscle to low-frequency stimulation. (1993) *Pflugers Arch.* **424** p529-537

Caiozzo VJ and Haddad F. Thyroid hormone: modulation of muscle structure, function, and adaptive responses to mechanical loading. (1996) *Exerc. Sport. Sci. Rev.* **24:321-61** p321-361

Caiozzo VJ, Haddad F, Baker MJ and Baldwin KM. Influence of mechanical loading on myosin heavy-chain protein and mRNA isoform expression. (1996) *J. Appl. Physiol.* **80** p1503-1512

Caldwell JE, Heiss SG, Mermall V and Cooper JA. Effects of CapZ, an actin capping protein of muscle, on the polymerization of actin. (1989) *Biochemistry* **28** p8506-8514

Campos RV, Asa SL and Drucker DJ. Immunocytochemical localization of parathyroid hormone-like peptide in the rat fetus. (1991) *Cancer Res.* **51** p6351-6357

Carpenter/Rose AB, Conway de Macario NR, Fahey EJJ, Friedman H and Penn GME. (1992) Enzyme-linked immunoassays in: Manual of clinical laboratory immunology. American Society of Microbiology, Washington. p2-9

Carroll SB and Stollar BD. Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolks of immunized hens. (1983) *J. Biol. Chem.* **258** p24-26

Casella JF, Craig SW, Maack DJ and Brown AE. Cap Z(36/32), a barbed end actin-capping protein, is a component of the Z-line of skeletal muscle. (1987) *J. Cell Biol.* **105** p371-379

Chan KK, Tsui SK, Lee SM, Luk SC, Liew CC, Fung KP, Waye MM and Lee CY. Molecular cloning and characterization of FHL2, a novel LIM domain protein preferentially expressed in human heart. (1998) *Gene* **210** p345-350

Chan YL, Olvera J and Wool IG. The primary structures of rat ribosomal proteins: the characterization of the cDNAs for S21 and L39, corrections in the sequences of L7 and L18a, and the identification of L33. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213** p1042-1050

Chen Z, Swisshelm K and Sager R. A cautionary note on reaction tubes for differential display and cDNA amplification in thermal cycling. (1994) *BioTechniques* **16** p1002-1006

Chomczynski P. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. (1992) *Anal. Biochem.* **201** p134-139

Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. (1987) *Anal. Biochem.* **162** p156-159

Chung CT and Miller RH. Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells. (1993) *Methods Enzymol.* **218** p621-627

- Cornish J, Callon KE, Nicholson GC and Reid IR.** Parathyroid hormone-related protein-(107-139) inhibits bone resorption in vivo. (1997) *Endocrinology* **138** p1299-1304
- Cotter M and Hudlicka O.** Effect of different patterns of long-term stimulation on muscle performance [proceedings]. (1979) *J. Physiol. (Lond)* **292** p20P-21P
- Crow MT and Kushmerick MJ.** Chemical energetics of slow- and fast-twitch muscles of the mouse. (1982) *J. Gen. Physiol.* **79** p147-166
- Dawid IB, Breen JJ and Toyama R.** LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. (1998) *Trends. Genet.* **14** p156-162
- Dawid IB, Toyama R and Taira M.** LIM domain proteins. (1995) *C. R. Acad. Sci. III.* **318** p295-306
- Dawson JM and Hudlicka O.** Can changes in microcirculation explain capillary growth in skeletal muscle? (1993) *Int. J. Exp. Pathol.* **74** p65-71
- Deftos LJ, Burton DW and Brandt DW.** Parathyroid hormone-like protein is a secretory product of atrial myocytes. (1993) *J. Clin. Invest.* **92** p727-735
- Delp MD and Duan C.** Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. (1996) *J. Appl. Physiol.* **80** p261-270
- Delp MD and Pette D.** Morphological changes during fiber type transitions in low-frequency-stimulated rat fast-twitch muscle. (1994) *Cell Tissue Res.* **277** p363-371
- Dusterhoft S and Pette D.** Satellite cells from slow rat muscle express slow myosin under appropriate culture conditions. (1993) *Differentiation.* **53** p25-33
- Eckert R, Randall D und Augustine G.** Kapitel 9 in: Tierphysiologie (1993), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Eisenberg BR and Kuda AM.** Discrimination between fiber populations in mammalian skeletal muscle by using ultrastructural parameters. (1976) *J. Ultrastruct. Res.* **54** p76-88
- Eisenberg BR and Salmons S.** The reorganization of subcellular structure in muscle undergoing fast- to slow type transformation. A stereological study. (1981) *Cell Tissue Res.* **220** p449-471
- Everts ME, Lomo T and Clausen T.** Changes in K⁺, Na⁺ and calcium contents during in vivo stimulation of rat skeletal muscle. (1993) *Acta Physiol. Scand.* **147** p357-368
- Fenton AJ, Kemp BE, Hammonds RG, Jr., Mitchelhill K, Moseley JM, Martin TJ and Nicholson GC.** A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved pentapeptide region of parathyroid hormone-related protein; PTHrP[107-111]. (1991) *Endocrinology* **129** p3424-3426
- Fenton AJ, Kemp BE, Kent GN, Moseley JM, Zheng MH, Rowe DJ, Britto JM, Martin TJ and Nicholson GC.** A carboxyl-terminal peptide from the parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by osteoclasts. (1991) *Endocrinology* **129** p1762-1768
- Fickett JW.** Quantitative discrimination of MEF2 sites. (1996) *Mol. Cell Biol.* **16** p437-441
- Fickett JW.** Coordinate positioning of MEF2 and myogenin binding sites. (1996) *Gene* **172** pGC19-GC32
- Freyd G, Kim SK and Horvitz HR.** Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. (1990) *Nature* **344** p876-879
- Furst DO and Gautel M.** The anatomy of a molecular giant: how the sarcomere cytoskeleton is assembled from immunoglobulin superfamily molecules. (1995) *J. Mol. Cell Cardiol.* **27** p951-959
- Gadaleta G, Pepe G, De Candia G, Quagliariello C, Sbisà E and Saccone C.** The complete nucleotide sequence of the *Rattus norvegicus* mitochondrial genome: cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates. (1989) *J. Mol. Evol.* **28** p497-516
- Galler S, Hilber K, Gohlsch B and Pette D.** Two functionally distinct myosin heavy chain isoforms in slow skeletal muscle fibres. (1997) *FEBS Lett.* **410** p150-152
- Galler S, Hilber K and Pette D.** Force responses following stepwise length changes of rat skeletal muscle fibre types. (1996) *J. Physiol. (Lond)* **493** p219-227

Galler S, Hilber K and Pette D. Stretch activation and myosin heavy chain isoforms of rat, rabbit and human skeletal muscle fibres. (1997) *J. Muscle Res. Cell Motil.* **18** p441-448

Galler S, Schmitt TL and Pette D. Stretch activation, unloaded shortening velocity, and myosin heavy chain isoforms of rat skeletal muscle fibres. (1994) *J. Physiol. (Lond)* **478 Pt 3** p513-521

Gillespie MT and Martin TJ. The parathyroid hormone-related protein gene and its expression. (1994) *Mol. Cell Endocrinol.* **100** p143-147

Goldberg MA and Schneider TJ. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** p4355-4359

Goncharova EJ, Kam Z and Geiger B. The involvement of adherens junction components in myofibrillogenesis in cultured cardiac myocytes. (1992) *Development* **114** p173-183

Goodrich SP, Yan GC, Bahrenburg K and Mansson PE. The nucleotide sequence of rat heparin binding growth factor 1 (HBGF-1). (1989) *Nucleic. Acids. Res.* **17** p2867

Gorza L. Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. (1990) *J. Histochem. Cytochem.* **38** p257-265

Green HJ, Ball-Burnett M, Chin ER, Dux L and Pette D. Time-dependent increases in Na⁺,K⁺-ATPase content of low-frequency-stimulated rabbit muscle. (1992) *FEBS Lett.* **310** p129-131

Green HJ, Klug GA, Reichmann H, Seedorf U, Wiehrer W and Pette D. Exercise-induced fibre type transitions with regard to myosin, parvalbumin, and sarcoplasmic reticulum in muscles of the rat. (1984) *Pflugers Arch.* **400** p432-438

Green HJ and Pette D. Early metabolic adaptations of rabbit fast-twitch muscle to chronic low-frequency stimulation. (1997) *Eur. J. Appl. Physiol.* **75** p418-424

Guth L and Samaha FJ. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. (1969) *Exp. Neurol.* **25** p138-152

Habener JF, Rosenblatt M and Potts JT, Jr. Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. (1984) *Physiol. Rev.* **64** p985-1053

Halloran BP and Nissenson RA. Normal Physiology and Its Role in Cancer. in: Parathyroid Hormone-Related Protein (1992), Boca Raton, FL, CRC

Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. (1983) *J. Mol. Biol.* **166** p557-580

Hang J, Kong L, Gu JW and Adair TH. VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle. (1995) *Am. J. Physiol.* **269** p1827-H1831

Hanson J. Effects of repetitive stimulation on membrane potentials and twitch in human and rat intercostal muscle fibres. (1974) *Acta Physiol. Scand.* **92** p238-248

Hara M, Liu YM, Zhen L, Cohen IS, Yu H, Danilo P, Jr., Ogino K, Bilezikian JP and Rosen MR. Positive chronotropic actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide are associated with increases in the current, I(f), and the slope of the pacemaker potential. (1997) *Circulation* **96** p3704-3709

Hartner KT, Kirschbaum BJ and Pette D. The multiplicity of troponin T isoforms. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. (1989) *Eur. J. Biochem.* **179** p31-38

Heilmann C and Pette D. Molecular transformations in sarcoplasmic reticulum of fast-twitch muscle by electro-stimulation. (1979) *Eur. J. Biochem.* **93** p437-446

Heizmann CW and Berchtold MW. Expression of parvalbumin and other Ca²⁺-binding proteins in normal and tumor cells: a topical review. (1987) *Cell Calcium* **8** p1-41

Henderson JE, Amizuka N, Warshawsky H, Biasotto D, Lanske BM, Goltzman D and Karaplis AC. Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death. (1995) *Mol. Cell Biol.* **15** p4064-4075

Hicks A, Ohlendieck K, Gopel SO and Pette D. Early functional and biochemical adaptations to low-frequency stimulation of rabbit fast-twitch muscle. (1997) *Am. J. Physiol.* **273** pC297-C305

- Hofmann S and Pette D.** Low-frequency stimulation of rat fast-twitch muscle enhances the expression of hexokinase II and both the translocation and expression of glucose transporter 4 (GLUT-4). (1994) *Eur. J. Biochem.* **219** p307-315
- Hongo T, Kupfer J, Enomoto H, Sharifi B, Giannella-Neto D, Forrester JS, Singer FR, Goltzman D, Hendy GN and Pirola C.** Abundant expression of parathyroid hormone-related protein in primary rat aortic smooth muscle cells accompanies serum-induced proliferation. (1991) *J. Clin. Invest.* **88** p1841-1847
- Hu JS, Olson EN and Kingston RE.** HEB, a helix-loop-helix protein related to E2A and ITF2 that can modulate the DNA-binding ability of myogenic regulatory factors. (1992) *Mol. Cell Biol.* **12** p1031-1042
- Hu P, Yin C, Zhang KM, Wright LD, Nixon TE, Wechsler AS, Spratt JA and Briggs FN.** Transcriptional regulation of phospholamban gene and translational regulation of SERCA2 gene produces coordinate expression of these two sarcoplasmic reticulum proteins during skeletal muscle phenotype switching. (1995) *J. Biol. Chem.* **270** p11619-11622
- Huber B and Pette D.** Dynamics of parvalbumin expression in low-frequency-stimulated fast-twitch rat muscle. (1996) *Eur. J. Biochem.* **236** p814-819
- Hudlicka O.** Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation? [In Process Citation]. (1998) *Microcirculation.* **5** p7-23
- Hudlicka O, Brown M, Cotter M, Smith M and Vrbova G.** The effect of long-term stimulation of fast muscles on their blood flow, metabolism and ability to withstand fatigue. (1977) *Pflugers Arch.* **369** p141-149
- Hudlicka O and Egginton S.** Early changes in muscle blood flow and performance induced by chronic electrical stimulation of rat fast muscles. (1994) *Journal of Physiology* **477** p37-38
- Hudlicka O and Price S.** The role of blood flow and/or muscle hypoxia in capillary growth in chronically stimulated fast muscles. (1990) *Pflugers Arch.* **417** p67-72
- Hudlicka O, Tyler KR and Aitman T.** The effect of long-term electrical stimulation on fuel uptake and performance in fast skeletal muscles (1980). In: *Plasticity of muscle.* De Gruyter, Berlin. p401-408
- Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ and Peterson CA.** Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. (1993) *Development* **118** p1137-1147
- Inoue H, Nojima H and Okayama H.** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. (1990) *Gene* **96** p23-28
- Ishikawa M, Ouchi Y, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Namiki A, Yamaguchi T and Orimo H.** Immunocytochemical detection of parathyroid hormone-related protein in vascular endothelial cells. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199** p547-551
- Jain MK, Fujita KP, Hsieh CM, Endege WO, Sibinga NE, Yet SF, Kashiki S, Lee WS, Perrella MA, Haber E and Lee ME.** Molecular cloning and characterization of SmLIM, a developmentally regulated LIM protein preferentially expressed in aortic smooth muscle cells. (1996) *J. Biol. Chem.* **271** p10194-10199
- Jakubiec-Puka A, Kordowska J, Catani C and Carraro U.** Myosin heavy chain isoform composition in striated muscle after denervation and self-reinnervation. (1990) *Eur. J. Biochem.* **193** p623-628
- Jaschinski F, Schuler M, Peuker H and Pette D.** Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms of rat muscle during forced contractile activity. (1998) *Am. J. Physiol.* **274** pC365-C370
- Jen Y, Weintraub H and Benezra R.** Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: in vivo association of Id with E2A proteins. (1992) *Genes Dev.* **6** p1466-1479
- Karaplis AC, Yasuda T, Hendy GN, Goltzman D and Banville D.** Gene-encoding parathyroid hormone-like peptide: nucleotide sequence of the rat gene and comparison with the human homologue. (1990) *Mol. Endocrinol.* **4** p441-446
- Kaufmann M, Simoneau JA, Veerkamp JH and Pette D.** Electrostimulation-induced increases in fatty acid-binding protein and myoglobin in rat fast-twitch muscle and comparison with tissue levels in heart. (1989) *FEBS Lett.* **245** p181-184
- Kelly RG, Zammit PS, Schneider A, Alonso S, Biben C and Buckingham ME.** Embryonic and fetal myogenic programs act through separate enhancers at the MLC1F/3F locus. (1997) *Dev. Biol.* **187** p183-199

Khoo C and Cousins RJ. Purification and properties of rat cysteine-rich intestinal protein. (1994) *Biochem. J.* **299** p445-450

Kirschbaum BJ, Kucher HB, Termin A, Kelly AM and Pette D. Antagonistic effects of chronic low frequency stimulation and thyroid hormone on myosin expression in rat fast-twitch muscle. (1990) *J. Biol. Chem.* **265** p13974-13980

Klebl BM, Ayoub AT and Pette D. Protein oxidation, tyrosine nitration, and inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in low-frequency stimulated rabbit muscle. (1998) *FEBS Lett.* **422** p381-384

Knotts S, Rindt H, Neumann J and Robbins J. In vivo regulation of the mouse beta myosin heavy chain gene. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** p31275-31282

Knotts S, Sanchez A, Rindt H and Robbins J. Developmental Modulation of a beta myosin heavy chain promoter-driven transgene. (1996) *Dev. Dyn.* **206** p182-192

Kosa JL, Michelsen JW, Louis HA, Olsen JJ, Davis DR, Beckerle MC and Winge DR. Common metal ion coordination in LIM domain proteins. (1994) *Biochemistry* **33** p468-477

Kovacs CS, Lanske B, Hunzelman JL, Guo J, Karaplis AC and Kronenberg HM. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93** p15233-15238

Kramer S, Reynolds FH, Jr., Castillo M, Valenzuela DM, Thorikay M and Sorvillo JM. Immunological identification and distribution of parathyroid hormone-like protein polypeptides in normal and malignant tissues. (1991) *Endocrinology* **128** p1927-1937

Kraus B and Pette D. Quantification of MyoD, myogenin, MRF4 and Id-1 by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in rat muscles--effects of hypothyroidism and chronic low-frequency stimulation. (1997) *Eur. J. Biochem.* **247** p98-106

Kyte J and Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. (1982) *J. Mol. Biol.* **157** p105-132

Labeit S, Kolmerer B and Linke WA. The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology. (1997) *Circ. Res.* **80** p290-294

Lakich MM, Diagana TT, North DL and Whalen RG. MEF-2 and Oct-1 bind to two homologous promoter sequence elements and participate in the expression of a skeletal muscle-specific gene. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** p15217-15226

Larsson L and Ansved T. Effects of ageing on the motor unit. (1995) *Prog. Neurobiol.* **45** p397-458

Lassar AB, Buskin JN, Lockshon D, Davis RL, Apone S, Hauschka SD and Weintraub H. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. (1989) *Cell* **58** p823-831

Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, Baltimore D and Weintraub H. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. (1991) *Cell* **66** p305-315

Leberer E, Hartner KT, Brandl CJ, Fujii J, Tada M, MacLennan DH and Pette D. Slow/cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban mRNAs are expressed in chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. (1989) *Eur. J. Biochem.* **185** p51-54

Leberer E, Hartner KT and Pette D. Reversible inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase by altered neuromuscular activity in rabbit fast-twitch muscle. (1987) *Eur. J. Biochem.* **162** p555-561

Leberer E and Pette D. Immunochemical quantification of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase, of calsequestrin and of parvalbumin in rabbit skeletal muscles of defined fiber composition. (1986) *Eur. J. Biochem.* **156** p489-496

Leberer E, Seedorf U and Pette D. Neural control of gene expression in skeletal muscle. Calcium-sequestering proteins in developing and chronically stimulated rabbit skeletal muscles. (1986) *Biochem. J.* **239** p295-300

Lee K, Deeds JD and Segre GV. Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. (1995) *Endocrinology* **136** p453-463

Lee TC, Chow KL, Fang P and Schwartz RJ. Activation of skeletal alpha-actin gene transcription: the cooperative formation of serum response factor-binding complexes over positive cis-acting promoter serum response elements displaces a negative-acting nuclear factor enriched in replicating myoblasts and nonmyogenic cells. (1991) *Mol. Cell Biol.* **11** p5090-5100

- Leeuw T and Pette D.** Coordinate changes in the expression of troponin subunit and myosin heavy-chain isoforms during fast-to-slow transition of low-frequency-stimulated rabbit muscle. (1993) *Eur. J. Biochem.* **213** p1039-1046
- Li H and Capetanaki Y.** An E box in the desmin promoter cooperates with the E box and MEF-2 sites of a distal enhancer to direct muscle-specific transcription. (1994) *EMBO J.* **13** p3580-3589
- Liang P, Averboukh L and Pardee AB.** Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. (1993) *Nucleic. Acids. Res.* **21** p3269-3275
- Liang P and Pardee AB.** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. (1992) *Science* **257** p967-971
- Ljungqvist A, Tornling G, Unge G, Jurdal EB and Laren B.** Capillary growth in the heart and skeletal muscle during dipyridamole treatment and exercise. (1984) *Prog. Appl. Micro.* **4** p9-15
- Lompre AM, Nadal-Ginard B and Mahdavi V.** Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. (1984) *J. Biol. Chem.* **259** p6437-6446
- Louis HA, Pino JD, Schmeichel KL, Pomies P and Beckerle MC.** Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** p27484-27491
- Lutz H, Weber H, Billeter R and Jenny E.** Fast and slow myosin within single skeletal muscle fibres of adult rabbits. (1979) *Nature* **281** p142-144
- Maeda S, Wu S, Juppner H, Green J, Aragay AM, Fagin JA and Clemens TL.** Cell-specific signal transduction of parathyroid hormone (PTH)-related protein through stably expressed recombinant PTH/PTHrP receptors in vascular smooth muscle cells. (1996) *Endocrinology* **137** p3154-3162
- Maier A, Gambke B and Pette D.** Degeneration-regeneration as a mechanism contributing to the fast to slow conversion of chronically stimulated fast-twitch rabbit muscle. (1986) *Cell Tissue Res.* **244** p635-643
- Mall G, Mattfeldt T, Rieger P, Volk B and Frolov VA.** Morphometric analysis of the rabbit myocardium after chronic ethanol feeding - early capillary changes. (1982) *Basic. Res. Cardiol.* **77** p57-67
- Mar JH and Ordahl CP.** M-CAT binding factor, a novel trans-acting factor governing muscle-specific transcription. (1990) *Mol. Cell Biol.* **10** p4271-4283
- Martin JF, Miano JM, Hustad CM, Copeland NG, Jenkins NA and Olson EN.** A Mef2 gene that generates a muscle-specific isoform via alternative mRNA splicing. (1994) *Mol. Cell Biol.* **14** p1647-1656
- Martin JF, Schwarz JJ and Olson EN.** Myocyte enhancer factor (MEF) 2C: a tissue-restricted member of the MEF-2 family of transcription factors. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90** p5282-5286
- Martin TJ.** Humoral hypercalcemia of malignancy. (1989) *Horm. Res.* **32** p84-88
- Massfelder T, Dann P, Wu TL, Vasavada R, Helwig JJ and Stewart AF.** Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94** p13630-13635
- Massfelder T, Stewart AF, Endlich K, Soifer N, Judes C and Helwig JJ.** Parathyroid hormone-related protein detection and interaction with NO and cyclic AMP in the renovascular system. (1996) *Kidney Int.* **50** p1591-1603
- McDermott JC, Cardoso MC, Yu YT, Andres V, Leifer D, Krainc D, Lipton SA and Nadal-Ginard B.** hMEF2C gene encodes skeletal muscle- and brain-specific transcription factors. (1993) *Mol. Cell Biol.* **13** p2564-2577
- Michel JB, Ordway GA, Richardson JA and Williams RS.** Biphasic induction of immediate early gene expression accompanies activity-dependent angiogenesis and myofiber remodeling of rabbit skeletal muscle. (1994) *J. Clin. Invest.* **94** p277-285
- Michelsen JW, Sewell AK, Louis HA, Olsen JL, Davis DR, Winge DR and Beckerle MC.** Mutational analysis of the metal sites in an LIM domain. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** p11108-11113
- Minchenko A, Salceda S, Bauer T and Caro J.** Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene. (1994) *Cell Mol. Biol. Res.* **40** p35-39

Molkentin JD, Black BL, Martin JF and Olson EN. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. (1995) *Cell* **83** p1125-1136

Molkentin JD and Olson EN. Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93** p9366-9373

Morgan MJ and Madgwick AJ. Slim defines a novel family of LIM-proteins expressed in skeletal muscle. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225** p632-638

Moseley JM, Hayman JA, Danks JA, Alcorn D, Grill V, Southby J and Horton MA. Immunohistochemical detection of parathyroid hormone-related protein in human fetal epithelia. (1991) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73** p478-484

Myrhage R and Hudlicka O. Capillary growth in chronically stimulated adult skeletal muscle as studied by intravital microscopy and histological methods in rabbits and rats. (1978) *Microvasc. Res.* **16** p73-90

Naidu PS, Ludolph DC, To RQ, Hinterberger TJ and Konieczny SF. Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis. (1995) *Mol. Cell Biol.* **15** p2707-2718

Neufer PD and Benjamin IJ. Differential expression of B-crystallin and Hsp27 in skeletal muscle during continuous contractile activity. Relationship to myogenic regulatory factors. (1996) *J. Biol. Chem.* **271** p24089-24095

Neufer PD, Ordway GA, Hand GA, Shelton JM, Richardson JA, Benjamin IJ and Williams RS. Continuous contractile activity induces fiber type specific expression of HSP70 in skeletal muscle. (1996) *Am. J. Physiol.* **271** pC1828-C1837

Nickols GA, Nana AD, Nickols MA, DiPette DJ and Asimakis GK. Hypotension and cardiac stimulation due to the parathyroid hormone-related protein, humoral hypercalcemia of malignancy factor. (1989) *Endocrinology* **125** p834-841

Nickols GA, Nickols MA and Helwig JJ. Binding of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein to vascular smooth muscle of rabbit renal microvessels. (1990) *Endocrinology* **126** p721-727

Noda M, Katoh T, Takuwa N, Kumada M, Kurokawa K and Takuwa Y. Synergistic stimulation of parathyroid hormone-related peptide gene expression by mechanical stretch and angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** p17911-17917

Noda M, Takuwa Y, Katoh T and Kurokawa K. Mechanical force regulation of vascular parathyroid hormone-related peptide expression. (1996) *Kidney Int. Suppl.* **55** pS154-S155

Offermanns S, Iida-Klein A, Segre GV and Simon MI. G alpha q family members couple parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide and calcitonin receptors to phospholipase C in COS-7 cells. (1996) *Mol. Endocrinol.* **10** p566-574

Ogino K, Burkhoff D and Bilezikian JP. The hemodynamic basis for the cardiac effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein. (1995) *Endocrinology* **136** p3024-3030

Ohlendieck K, Briggs FN, Lee KF, Wechsler AW and Campbell KP. Analysis of excitation-contraction-coupling components in chronically stimulated canine skeletal muscle. (1991) *Eur. J. Biochem.* **202** p739-747

Okano K, Wu S, Huang X, Pirola CJ, Juppner H, Abou-Samra AB, Segre GV, Iwasaki K, Fagin JA and Clemens TL. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP) receptor and its messenger ribonucleic acid in rat aortic vascular smooth muscle cells and UMR osteoblast-like cells: cell-specific regulation by angiotensin- II and PTHrP. (1994) *Endocrinology* **135** p1093-1099

Olson EN and Klein WH. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. (1994) *Genes Dev.* **8** p1-8

Olson EN, Perry M and Schulz RA. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. (1995) *Dev. Biol.* **172** p2-14

Orloff JJ, Ganz MB, Nathanson MH, Moyer MS, Kats Y, Mitnick M, Behal A, Gasalla-Herraiz J and Isales CM. A midregion parathyroid hormone-related peptide mobilizes cytosolic calcium and stimulates formation of inositol trisphosphate in a squamous carcinoma cell line. (1996) *Endocrinology* **137** p5376-5385

- Orloff JJ, Kats Y, Urena P, Schipani E, Vasavada RC, Philbrick WM, Behal A, Abou-Samra AB, Segre GV and Juppner H.** Further evidence for a novel receptor for amino-terminal parathyroid hormone-related protein on keratinocytes and squamous carcinoma cell lines. (1995) *Endocrinology* **136** p3016-3023
- Osbaldeston NJ, Lee DM, Cox VM, Hesketh JE, Morrison JF, Blair GE and Goldspink DF.** The temporal and cellular expression of c-fos and c-jun in mechanically stimulated rabbit latissimus dorsi muscle. (1995) *Biochem. J.* **308** p465-471
- Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA and Stempel KE.** Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. (1972) *Biochemistry* **11** p2627-2633
- Pette D, Muller W, Leisner E and Vrbova G.** Time dependent effects on contractile properties, fibre population, myosin light chains and enzymes of energy metabolism in intermittently and continuously stimulated fast twitch muscles of the rabbit. (1976) *Pflugers Arch.* **364** p103-112
- Pette D, Smith ME, Staudte HW and Vrbova G.** Effects of long-term electrical stimulation on some contractile and metabolic characteristics of fast rabbit muscles. (1973) *Pflugers Arch.* **338** p257-272
- Pette D and Spamer C.** Metabolic properties of muscle fibers. (1986) *Fed. Proc.* **45** p2910-2914
- Pette D and Staron RS.** Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. (1990) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **116** p1-76
- Pette D and Staron RS.** Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. (1997) *Int. Rev. Cytol.* **170:143-223** p143-223
- Pette D, Staudte HW and Vrbova G.** Physiological and biochemical changes induced by long-term stimulation of fast muscle. (1972) *Naturwissenschaften.* **59** p469-470
- Pette D and Vrbova G.** Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. (1992) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **120** p115-202
- Peuker H and Pette D.** Reverse transcriptase-polymerase chain reaction detects induction of cardiac-like alpha myosin heavy chain mRNA in low frequency stimulated rabbit fast-twitch muscle. (1995) *FEBS Lett.* **367** p132-136
- Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, Vasavada RC, Weir EC, Broadus AE and Stewart AF.** Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. (1996) *Physiol. Rev.* **76** p127-173
- Pirola CJ, Wang HM, Kamyar A, Wu S, Enomoto H, Sharifi B, Forrester JS, Clemens TL and Fagin JA.** Angiotensin II regulates parathyroid hormone-related protein expression in cultured rat aortic smooth muscle cells through transcriptional and post-transcriptional mechanisms. (1993) *J. Biol. Chem.* **268** p1987-1994
- Pirola CJ, Wang HM, Strgacich MI, Kamyar A, Cercek B, Forrester JS, Clemens TL and Fagin JA.** Mechanical stimuli induce vascular parathyroid hormone-related protein gene expression in vivo and in vitro. (1994) *Endocrinology* **134** p2230-2236
- Plawner LL, Philbrick WM, Burtis WJ, Broadus AE and Stewart AF.** Cell type-specific secretion of parathyroid hormone-related protein via the regulated versus the constitutive secretory pathway. (1995) *J. Biol. Chem.* **270** p14078-14084
- Pollock R and Treisman R.** Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets. (1991) *Genes Dev.* **5** p2327-2341
- Ponting CP and Phillips C.** DHR domains in syntrophins, neuronal NO synthases and other intracellular proteins. (1995) *Trends. Biochem. Sci.* **20** p102-103
- Porter MM, Vandervoort AA and Lexell J.** Aging of human muscle: structure, function and adaptability [see comments]. (1995) *Scand. J. Med. Sci. Sports* **5** p129-142
- Rabbani SA, Harakidas P, Gladu J, Srivastava S, Diarra A, Sauve R, Karaplis AC, Henderson JE, Goltzman D and Hendy GN.** Expression and characterization of recombinant rat parathyroid hormone-related peptide (1-141) and an amino-terminally-truncated analogue (38-141). (1997) *Mol. Cell Endocrinol.* **130** p13-21
- Ransone LJ and Verma IM.** Nuclear proto-oncogenes fos and jun. (1990) *Annu. Rev. Cell Biol.* **6** p539-557
- Ranvier L.** Proprietes et structure differentes des muscles rouges et des muscles blanc chez les lapin et chez les raies. (1873) *C. R. Acad. Sci. Paris* **77** p1030-1034

- Rao MV, Donoghue MJ, Merlie JP and Sanes JR.** Distinct regulatory elements control muscle-specific, fiber-type-selective, and axially graded expression of a myosin light-chain gene in transgenic mice. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16** p3909-3922
- Reichmann H, Hoppeler H, Mathieu-Costello O, von Bergen F and Pette D.** Biochemical and ultrastructural changes of skeletal muscle mitochondria after chronic electrical stimulation in rabbits. (1985) *Pflugers Arch.* **404** p1-9
- Ren JM, Ohira Y, Holloszy JO, Hamalainen N, Traub I and Pette D.** Effects of beta-guanidinopropionic acid-feeding on the patterns of myosin isoforms in rat fast-twitch muscle. (1995) *Pflugers Arch.* **430** p389-393
- Rescan PY.** Identification in a fish species of two Id (inhibitor of DNA binding/differentiation)-related helix-loop-helix factors expressed in the slow oxidative muscle fibers. (1997) *Eur. J. Biochem.* **247** p870-876
- Riechmann V, van Cruchten I and Sablitzky F.** The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3. (1994) *Nucleic. Acids. Res.* **22** p749-755
- Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S and Jaenisch R.** Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. (1992) *Cell* **71** p383-390
- Rudnicki MA and Jaenisch R.** The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. (1995) *Bioessays* **17** p203-209
- Sadler I, Crawford AW, Michelsen JW and Beckerle MC.** Zyxin and cCRP: two interactive LIM domain proteins associated with the cytoskeleton. (1992) *J. Cell Biol.* **119** p1573-1587
- Salminen M, Maire P, Concordet JP, Moch C, Porteu A, Kahn A and Daegelen D.** Fast-muscle-specific expression of human aldolase A transgenes. (1994) *Mol. Cell Biol.* **14** p6797-6808
- Salmons S and Vrbova G.** The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. (1969) *J. Physiol. (Lond)* **201** p535-549
- Sanchez-Garcia I and Rabbitts TH.** The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. (1994) *Trends. Genet.* **10** p315-320
- Schachat F, Williams RS and Schnurr CA.** Coordinate changes in fast thin filament and Z-line protein expression in the early response to chronic stimulation. (1988) *J. Biol. Chem.* **263** p13975-13978
- Schafer DA, Hug C and Cooper JA.** Inhibition of CapZ during myofibrillogenesis alters assembly of actin filaments. (1995) *J. Cell Biol.* **128** p61-70
- Schafer DA, Jennings PB and Cooper JA.** Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. (1996) *J. Cell Biol.* **135** p169-179
- Schafer DA, Korshunova YO, Schroer TA and Cooper JA.** Differential localization and sequence analysis of capping protein beta- subunit isoforms of vertebrates. (1994) *J. Cell Biol.* **127** p453-465
- Schafer DA, Waddle JA and Cooper JA.** Localization of CapZ during myofibrillogenesis in cultured chicken muscle. (1993) *Cell Motil. Cytoskeleton* **25** p317-335
- Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, Gundersen K and Lomo T.** Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. (1989) *J. Muscle Res. Cell Motil.* **10** p197-205
- Schmeichel KL and Beckerle MC.** The LIM domain is a modular protein-binding interface. (1994) *Cell* **79** p211-219
- Schultz E and McCormick KM.** Skeletal muscle satellite cells. (1994) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **123** p213-257
- Segre GV, Abou-Samra AB, Juppner H, Schipani E, Force T, Urena P, Freeman M, Kong XF, Kolakowski LF, Jr. and Hock J.** Characterization of cloned PTH/PTHrP receptors. (1992) *J. Endocrinol. Invest.* **15** p11-17
- Shimada T, Kitamura H and Nakamura M.** Three-dimensional architecture of pericytes with special reference to their topographical relationship to microvascular beds. (1992) *Arch. Histol. Cytol.* **55** p77-85
- Shore P and Sharrocks AD.** The MADS-box family of transcription factors. (1995) *Eur. J. Biochem.* **229** p1-13
- Shweiki D, Itin A, Soffer D and Keshet E.** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. (1992) *Nature* **359** p843-845

- Simoneau JA, Kaufmann M and Pette D.** Asynchronous increases in oxidative capacity and resistance to fatigue of electrostimulated muscles of rat and rabbit. (1993) *J. Physiol. (Lond)* **460** p573-580
- Simoneau JA and Pette D.** Species-specific effects of chronic nerve stimulation upon tibialis anterior muscle in mouse, rat, guinea pig, and rabbit. (1988) *Pflugers Arch.* **412** p86-92
- Skorjanc D, Jaschinski F, Heine G and Pette D.** Sequential increases in capillarization and mitochondrial enzymes in low-frequency-stimulated rabbit muscle. (1998) *Am. J. Physiol.* **274** pC810-C818
- Spitz F, De Vasconcelos ZA, Chatelet F, Demignon J, Kahn A, Mira JC, Maire P and Daegelen D.** Proximal sequences of the aldolase A fast muscle-specific promoter direct nerve- and activity-dependent expression in transgenic mice. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** p14975-14981
- Spitz F, Salminen M, Demignon J, Kahn A, Daegelen D and Maire P.** A combination of MEF3 and NFI proteins activates transcription in a subset of fast-twitch muscles. (1997) *Mol. Cell Biol.* **17** p656-666
- Sreter FA, Lopez JR, Alamo L, Mabuchi K and Gergely J.** Changes in intracellular ionized Ca concentration associated with muscle fiber type transformation. (1987) *Am. J. Physiol.* **253** pC296-C300
- Staron RS and Pette D.** Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers. (1986) *Histochemistry* **86** p19-23
- Staron RS and Pette D.** Nonuniform myosin expression along single fibers of chronically stimulated and contralateral rabbit tibialis anterior muscles. (1987) *Pflugers Arch.* **409** p67-73
- Staron RS and Pette D.** The multiplicity of combinations of myosin light chains and heavy chains in histochemically typed single fibres. Rabbit tibialis anterior muscle. (1987) *Biochem. J.* **243** p695-699
- Staron RS and Pette D.** The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. (1993) *Histochemistry* **100** p149-153
- Steiner DF.** The proprotein convertases. (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2** p31-39
- Sun Y, Hegamyer G and Colburn NH.** Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells: one is homologous to human tissue inhibitor of metalloproteinases-3. (1994) *Cancer Res.* **54** p1139-1144
- Swoap SJ.** In vivo analysis of the myosin heavy chain IIB promoter region. (1998) *Am. J. Physiol.* **274** pC681-C687
- Taira M, Evrard JL, Steinmetz A and Dawid IB.** Classification of LIM proteins [letter]. (1995) *Trends. Genet.* **11** p431-432
- Takahashi K, Inoue D, Ando K, Matsumoto T, Ikeda K and Fujita T.** Parathyroid hormone-related peptide as a locally produced vasorelaxant: regulation of its mRNA by hypertension in rats. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208** p447-455
- Tam JP.** Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high- density multiple antigenic peptide system. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85** p5409-5413
- Termin A and Pette D.** Changes in myosin heavy-chain isoform synthesis of chronically stimulated rat fast-twitch muscle. (1992) *Eur. J. Biochem.* **204** p569-573
- Termin A, Staron RS and Pette D.** Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low-frequency stimulation of rat fast hindlimb muscles. A single-fiber study. (1989) *Eur. J. Biochem.* **186** p749-754
- Tian J, Smogorzewski M, Kedes L and Massry SG.** Parathyroid hormone-parathyroid hormone related protein receptor messenger RNA is present in many tissues besides the kidney. (1993) *Am. J. Nephrol.* **13** p210-213
- Tokuyama Y and Takeda J.** Use of ³³P-labeled primer increases the sensitivity and specificity of mRNA differential display. (1995) *BioTechniques* **18** p424-425
- Turner CE and Miller JT.** Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. (1994) *J. Cell Sci.* **107** p1583-1591

Urena P, Kong XF, Abou-Samra AB, Juppner H, Kronenberg HM, Potts JT, Jr. and Segre GV. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues. (1993) *Endocrinology* **133** p617-623

Vigoreaux JO. The muscle Z band: lessons in stress management. (1994) *J. Muscle Res. Cell Motil.* **15** p237-255

Voytik SL, Przyborski M, Badylak SF and Konieczny SF. Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles. (1993) *Dev. Dyn.* **198** p214-224

Warren AJ, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Smith AJ and Rabbitts TH. The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. (1994) *Cell* **78** p45-57

Weintraub H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. (1993) *Cell* **75** p1241-1244

Weiskirchen R, Pino JD, Macalma T, Bister K and Beckerle MC. The cysteine-rich protein family of highly related LIM domain proteins. (1995) *J. Biol. Chem.* **270** p28946-28954

Wu TL, Vasavada RC, Yang K, Massfelder T, Ganz M, Abbas SK, Care AD and Stewart AF. Structural and physiologic characterization of the mid-region secretory species of parathyroid hormone-related protein. (1996) *J. Biol. Chem.* **271** p24371-24381

Wysolmerski JJ and Stewart AF. The physiology of parathyroid hormone-related protein: an emerging role as a developmental factor. (1998) *Annu. Rev. Physiol.* **60** p431-460

Xia H, Winokur ST, Kuo WL, Altherr MR and Bredt DS. Actinin-associated LIM protein: identification of a domain interaction between PDZ and spectrin-like repeat motifs. (1997) *J. Cell Biol.* **139** p507-515

Yasuda T, Banville D, Rabbani SA, Hendy GN and Goltzman D. Rat parathyroid hormone-like peptide: comparison with the human homologue and expression in malignant and normal tissue. (1989) *Mol. Endocrinol.* **3** p518-525

Yu YT, Breitbart RE, Smoot LB, Lee Y, Mahdavi V and Nadal-Ginard B. Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. (1992) *Genes Dev.* **6** p1783-1798

Yun K and Wold B. Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.* **8** p877-889

Ziada A, Hudlicka O and Tyler KR. The effect of long-term administration of alpha 1-blocker prazosin on capillary density in cardiac and skeletal muscle. (1989) *Pflugers Arch.* **415** p355-360