Aus der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie
(Univ.-Prof. Dr. med. W. Lehmann)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

FOXO3 in myogener Differenzierung vor dem Hintergrund von Sarkopenie und Kachexie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Marlene Charlotte Gsänger

aus

Bamberg

Göttingen 2023

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in	Prof. Dr. med. A. Schilling
Ko-Betreuer/in:	Prof. Dr. med. H. Siggelkow

Prüfungskommission

Referent/in	Prof. Dr. med. A. Schilling
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. H. Siggelkow
Drittreferent/in:	Prof. Dr. hum. biol. M. Schön
Datum der mündlichen Prüfung:	20.11.2024

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "FOXO3 in myogener Differenzierung vor dem Hintergrund von Sarkopenie und Kachexie" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Stuttgart, den …… ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **I**

Abbildungsverzeichnis ..... **III**

Tabellenverzeichnis ..... **IV**

Abkürzungsverzeichnis ..... **V**

1 Einleitung **1**

1.1 Sarkopenie und Kachexie 1
1.1.1 Definitionen 1
1.1.2 Klinische Bedeutung 2
1.1.3 Pathophysiologie 3
1.1.4 Aktuelle Therapieansätze und Problematik 3
1.2 Molekulare Mechanismen von Muskelatrophie 4
1.3 Transkriptionsfaktor FOXO3 6
1.4 RNA-Interferenz 7
1.5 Myogene Differenzierung 9
1.5.1 Differenzierungsmarker *Myog* und *MyH4* 10
1.5.2 Zelllinie C2C12 11
1.6 Zielsetzung und Fragestellung 11

2 Material und Methoden **13**

2.1 Material 13
2.1.1 Verbrauchsmaterialien 13
2.1.2 Chemikalien 14
2.1.3 Zelllinie und Zellkulturreagenzien 14
2.1.4 siRNAs, Plasmid 15
2.1.5 PCR-Puffer, Primer 16
2.1.6 Kits 16
2.1.7 Geräte 17
2.1.8 Computer Software 18
2.2 Methoden 19
2.2.1 Handhabung der Zelllinie 19
2.2.2 Färbung differenzierter Zellen 22
2.2.3 Transfektion mit siRNA 23
2.2.4 Genexpressionsversuch *Foxo3-knockdown* und Differenzierung 26
2.2.5 Proliferationsassay *Foxo3-knockdown* 30
2.2.6 Genexpressionsversuch Wildtyp-Zellen und Kontrolltransfektion 31

3 Ergebnisse **33**

3.1 Etablierung der Zelllinie C2C12 33

3.1.1 Aussaat- und Konfluenzversuch ... 33
3.1.2 Auswahl des Differenzierungsmediums ... 33
3.1.3 Färbung differenzierter Zellen ... 35
3.1.4 Prüfung des Transfektionserfolges ... 37
3.2 Genexpressionsversuch *Foxo3-knockdown* und Differenzierung ... 40
3.2.1 *Knockdown*-Effekt auf *Foxo3* ... 41
3.2.2 *Knockdown*-Effekt auf *Atrogin*-1 ... 43
3.2.3 Einfluss des *knockdown* auf die Differenzierung ... 45
3.3 Proliferationsassay *Foxo3-knockdown* ... 50
3.4 Genexpressionsversuch Wildtyp-Zellen und Kontrolltransfektion ... 51
4 Diskussion ... 54
4.1 Etablierung der Zelllinie C2C12 ... 54
4.1.1 Auswahl des Differenzierungsmediums ... 54
4.1.2 Prüfung des Transfektionserfolges ... 55
4.2 Genexpressionsversuch *Foxo3-knockdown* ... 55
4.2.1 *Knockdown*-Erfolg *Foxo3* ... 55
4.2.2 *Knockdown*-Effekt auf *Atrogin-1* ... 57
4.2.3 Einfluss des *knockdown* auf die Differenzierung ... 59
4.3 Proliferationsassay *Foxo3-knockdown* ... 61
4.4 Genexpressionsversuch Wildtyp-Zellen und Kontrolltransfektion ... 63
4.5 Bedeutung von FOXO3 für Sarkopenie ... 64
4.6 Limitationen und Ausblick ... 66
5 Zusammenfassung ... 68
6 Literaturverzeichnis ... 70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Mechanismen von Muskelatrophie 6
Abbildung 2: Mechanismus der RNA-Interferenz 9
Abbildung 3: Zellpopulationen im Laufe der Myogenese mit Marker-Genen (Auswahl) 10
Abbildung 4: Komplexbildung und Mechanismus von Lipofectamine 24
Abbildung 5: Aufbau Hauptversuch 27
Abbildung 6: Aufbau Wildtyp-Versuch 32
Abbildung 7: Ergebnis Aussaat und Konfluenzversuch 34
Abbildung 8: Ergebnis Auswahl des Differenzierungsmediums 35
Abbildung 9: Ergebnis Färbung differenzierter Zellen mit Hämalaun und Methylenblau 36
Abbildung 10: Ergebnis Färbung differenzierter Zellen mit DAPI 36
Abbildung 11: Ergebnis Prüfung des Tranfektionserfolges, Etablierung des Protokolls 38
Abbildung 12: Ergebnis Prüfung des Transfektionserfolges, Zelldichte nach Aussaat 39
Abbildung 13: Ergebnis Prüfung des Transfektionserfolges, Differenzierung 40
Abbildung 14: Ergebnis *knockdown* von *Foxo3*, Gruppenvergleich 42
Abbildung 15: Ergebnis *knockdown* von *Foxo3*, zeitlicher Verlauf in jeder Gruppe 42
Abbildung 16: Effekt des *Foxo3-knockdown* auf *Atrogin-1,* Gruppenvergleich 44
Abbildung 17: Effekt des *Foxo3-knockdown* auf *Atrogin-1*, zeitlicher Verlauf in jeder Gruppe 44
Abbildung 18: Effekt des *Foxo3-knockdown* auf den Zellphänotyp in der Differenzierung 46
Abbildung 19: Effekt des *Foxo3-knockdown* auf *Myog,* Gruppenvergleich 47
Abbildung 20: Effekt des *Foxo3-knockdown* auf *Myog*, zeitlicher Verlauf in jeder Gruppe 47
Abbildung 21: Effekt des *Foxo3-knockdown* auf *MyH4,* Gruppenvergleich 49
Abbildung 22: Effekt des *Foxo3-knockdown* auf *MyH4*, zeitlicher Verlauf in jeder Gruppe 49
Abbildung 23: Ergebnis Proliferationsassay 51
Abbildung 24: *Foxo3*-Expression in Wildtyp- und kontroll-transfizierten Zellen, Gruppenvergleich 52
Abbildung 25: *Foxo3*-Expression in Wildtyp- und kontroll-transfizierten Zellen, zeitlicher Verlauf in jeder Gruppe 53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialen 13
Tabelle 2: Chemikalien 14
Tabelle 3: Zelllinie C2C12 14
Tabelle 4: Zellkulturreagenzien 14
Tabelle 5: Zusammensetzung der Zellkulturmedien 15
Tabelle 6: *short interfering* Ribonukleinsäuren (siRNAs) 15
Tabelle 7: Plasmid 16
Tabelle 8: Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Puffer 16
Tabelle 9: Primer 16
Tabelle 10: Kits 16
Tabelle 11: Geräte 17
Tabelle 12: Computer Software 18
Tabelle 13: Zusammensetzung der getesteten Differenzierungsmedien im Vergleich 22
Tabelle 14: Versuche zur Prüfung des Transfektionserfolges 25
Tabelle 15: Protokoll zur Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) 28
Tabelle 16: Temperaturprogramm für die quantitative *real time*-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) 29
Tabelle 17: Mittelwert und Standardabweichung der Zellzahl für verschiedene Transfektionsprotokolle 39
Tabelle 18: Relative *forkhead box O3* (*Foxo3*)-Expression 43
Tabelle 19: Relative *Atrogin-1* Expression 45
Tabelle 20: Relative *Myog*-Expression 48
Tabelle 21: Relative *myosin heavy chain 4* (*MyH4*)-Expression 50
Tabelle 22: Relative *forkhead box O3* (*Foxo3*)-Expression, Wildtypversuch 53

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
B	Behandlungs/*knockdown*-Gruppe/-Zellen,
cDNA	komplementäre DNA
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
Ct	*cycle threshold*
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DM	Differenzierungsmedium
DMEM	*Dulbecco's modified eagle medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	*Dulbecco's phosphate-buffered saline*
dsRNA	doppelsträngige RNA
EWGSOP	European Working Group on Sarkopenia in Older People
FBS	fetales Rinderserum *(fetal bovine serum)*
FGF	*fibroblast growth factor*
FOX	*forkhead box*
FOXO	*forkhead box O*
FOXO3	*forkhead box O3*
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phopsphat-Dehydrogenase
GFP	*green fluorescent protein*
GM	Wachstumsmedium *(growth medium)*
HS	Pferdeserum *(horse serum)*
IGF-1	*insulin-like growth factor 1*
IGF-2	*insulin like growth factor 2*
K	Kontrollgruppe/-zellen
LC3	*microtubule-associated protein 1, light chain 3*
LM	Lichtmikroskop
M-, S-, G1/2/0-Phase	Mitose-, Synthese-, Lücke/*gap* 1/2/0 - Phase des Zellzyklus
MHCIIb	Myosin schwere Kette IIb *(myosin heavy chain IIb),* muskuläres Protein
miRNA	mikro Ribonukleinsäure
MRF	*myogenic regulatory factor*
MRF4	*muscle-specific regulatory factor 4*
mRNA	*messenger RNA*
mTOR	*mammalian target of rapamycin*
MuRF-1	*muscle RING-finger protein-1*

Myf-5	*myogenic factor 5*
MyH4	Myosin schwere Kette 4 (*myosin heavy chain 4*), MHCIIb-kodierendes Gen
MyoD	*myoblast determination protein 1*
Myog	Myogenin-kodierendes Gen
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	*phosphate buffered saline*
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pmaxGFP	GFP - exprimierendes Plasmid
qPCR	quantitative *real time*-Polymerase-Kettenreaktion
RISC	*RNA induced silencing complex*
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies *(reactive oxygen species)*
RT	Raumtemperatur
SARMs	selektive Androgen-Rezeptor Modulatoren
shRNA	*small hairpin RNA*
siRNA	*short interfering RNA*
TGFβ	*transforming growth factor β*
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
WT	Wildtypgruppe/-zellen

1 Einleitung

1.1 Sarkopenie und Kachexie

1.1.1 Definitionen

Sarkopenie und Kachexie sind weit verbreitete komplexe Syndrome bzw. Erkrankungen des Muskelgewebes. Die European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) beschreibt Sarkopenie in ihrer überarbeiteten Konsensusdefinition als

> *muscle disease rooted in adverse muscle changes that accrue across a lifetime […] defined by low levels of measures for three parameters: (1) muscle strength, (2) muscle quantity/quality and (3) physical performance as an indicator of severity.* (Cruz-Jentoft et al. 2019).

Entsprechend dieser Definition handelt es sich bei Sarkopenie um eine Erkrankung, die schleichend über Jahre entsteht und sich insbesondere durch einen Kraft- und Funktionsverlust der Muskulatur auszeichnet. Neben einem (eher geringen) Verlust an Muskelmasse steht die reduzierte Qualität der Muskulatur – z. B. durch Einlagerung von Fettgewebe – im Vordergrund (Cruz-Jentoft et al. 2019). Der Verlust von Muskelkraft, -masse und -funktion übersteigt bei sarkopenen Patienten das für den Alterungsprozess physiologische Maß (Kemmler et al. 2017).

Kachexie wird von Evans et al. (2008) wie folgt definiert:

> *cachexia, is a complex metabolic syndrome associated with underlying illness and characterized by loss of muscle with or without loss of fat mass. The prominent clinical feature of cachexia is weight loss in adults.*

Damit ist sie im Gegensatz zur Sarkopenie ein metabolisches Syndrom und zeichnet sich insbesondere durch das Zugrundeliegen einer Krankheit aus. Beispielhaft sind hier chronische Herz- oder Niereninsuffizienz, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD), chronische Infektion, Sepsis sowie insbesondere maligne Erkrankungen zu nennen. Klinisch apparent wird Kachexie durch einen schnellen und gravierenden Gewichtsverlust aufgrund des Verlustes von Muskel- und teilweise auch Fettgewebe (Evans et al. 2008).

Neben den zitierten Konsensusdefinitionen für Sarkopenie und Kachexie existieren weitere Definitionen derselben Phänomene. Unter anderem haben verschiedene Gruppen spezielle Definitionen von Kachexie aufgrund einzelner Krankheiten (Tumorkachexie, Kachexie bei chronischer Niereninsuffizienz) erarbeitet (Fearon et al. 2011; Koppe et al. 2019). In der Literatur herrscht allen Bemühungen um klare Definitionen zum Trotz bisher ein

uneinheitlicher Sprachgebrauch, indem beispielsweise beide Begriffe synonym verwendet werden oder Sarkopenie unter Kachexie subsumiert wird.

Sarkopenie und Kachexie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Dynamik (Entwicklung von Sarkopenie über Jahrzehnte gegenüber wenigen Monaten bei Kachexie), Teilaspekten ihrer Pathophysiologie (s. u.), sowie der klinischen Präsentation (Funktionsverlust gegenüber Massen- und Gewichtsverlust). Dennoch ist die Unterscheidung beider Phänomene im klinischen Alltag oft nicht möglich. Ein wichtiger Grund hierfür ist, dass bisher für keine der beiden Erkrankungen eine allgemein anerkannte operationale Definition oder ein diagnostischer Algorithmus zur Verfügung steht. Auf der anderen Seite können sich Sarkopenie und Kachexie gegenseitig bedingen und treten in einem gemeinsamen Kollektiv – älteren und häufig vielfach erkrankten Patienten – auf (Rolland et al. 2011).

1.1.2 **Klinische Bedeutung**

Die Anwendung der bisher existierenden unterschiedlichen Definitionen von Sarkopenie führt zu schwankenden Prävalenzzahlen derselben (Bijlsma et al. 2013). Eine neuere Metaanalyse ergab jedoch eine Prävalenz von etwa 10 % bei gesunden Individuen ab 60 Jahren (Shafiee et al. 2017). Häufig zitierte Zahlen zur Prävalenz von Kachexie reichen von 5 – 15 % bei schwerer chronischer Herzinsuffizienz (von Haehling und Anker 2014) bis zu 80 % bei Pankreas- und Magenkarzinom (Argilés et al. 2014).

Sarkopenie und Kachexie haben weitreichende Konsequenzen, einerseits individuell für betroffene Patienten, andererseits für Gesundheitssysteme weltweit. Zu diesen Konsequenzen zählen insbesondere Sturzereignisse, Frakturen, Funktionsverlust in der Durchführung von Alltagsaktivitäten, geringe Lebensqualität und letztendlich eine gesteigerte Mortalität. Kosten für das Gesundheitssystem steigen sowohl direkt durch die Behandlung von auftretenden Komplikationen als auch indirekt durch Produktivitätsausfälle der Betroffenen (Tan und Fearon 2008; Morley et al. 2014; Cruz-Jentoft et al. 2019). Eine Überblicksarbeit und Metaanalyse von Beaudart et al. (2017a) vergleicht die Ergebnisse mehrerer prospektiver Studien der letzten Jahre, in denen häufig benannte Folgen von Sarkopenie untersucht wurden. Unter Anwendung der Sarkopenie-Definition nach EWGSOP (2010) konnte ein relevanter Anstieg von Mortalität, Funktionsverlust, Sturzereignissen und Krankenhauseinweisungen im sarkopenen Kollektiv bestätigt werden. Der geringeren Lebensqualität im Vergleich zu nicht-sarkopenen Personen trägt aktuell die Entwicklung eines neuen Fragebogens Rechnung, der spezifisch die Lebensqualität sarkopener Menschen erfasst (Beaudart et al. 2017b). Die durch Sarkopenie verursachten Gesundheitskosten der USA schätzt eine viel beachtete Arbeit für das Jahr 2000 auf 18,5 Milliarden USD, entsprechend 1,5 % der gesamten Gesundheitsausgaben des Landes in diesem Jahr. Da lediglich direkte Kosten in die Schätzung mit einbezogen wurden, ist anzunehmen, dass es sich dabei um eine Unterschätzung des tatsächlichen Wertes handelt (Janssen et al. 2004). Ein aktuelleres Review bestätigt den Trend zu höheren

Gesundheitskosten bei sarkopenen im Vergleich zu nicht-sarkopenen Personen. Die Autoren beklagen jedoch eine große Heterogenität im Design der verglichenen Studien sowie in der verwendeten Definition von Sarkopenie (Bruyère et al. 2019). Aussagekräftige und aktuelle Zahlen zum „Kostenfaktor Sarkopenie" sind zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar.

Kachexie verschlechtert zusätzlich das Therapie-Ansprechen von Patienten, beispielsweise durch eine höhere Toxizität von Chemotherapeutika bei kachektischen Tumorpatienten (Vaughan et al. 2013). Für Sarkopenie definiert als reduzierte Muskelmasse konnten sowohl für verschiedene onkologische (Joglekar et al. 2015) als auch nicht-onkologische (Hossain et al. 2021) Operationen Nachteile gezeigt werden: Patienten mit geringerer Muskelmasse zeigten mehr post-operative Komplikationen, längere Krankenhausaufenthalte und ein kürzeres Überleben.

1.1.3 Pathophysiologie

Die Pathogenese von Sarkopenie und Kachexie ist multifaktoriell und weist einige Gemeinsamkeiten auf. Durch Bewegungsmangel, unzureichende Nahrungsaufnahme und einen Mangel an anabol wirksamen Hormonen wie Testosteron, Wachstumshormon und *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) fehlt es an Reizen zur Muskelproteinsynthese. Entzündung ist ein zentrales Schlüsselelement der Kachexie, doch auch altersbedingt lässt sich eine (geringgradige) chronische Erhöhung von Entzündungsmarkern nachweisen. Diese Infektmarker begünstigen den Abbau von Muskelprotein und verursachen gleichzeitig Resistenzen gegen die anabole Wirkung von Insulin und IGF-1 (Rolland et al. 2011). Gesteigerter oxidativer Stress wirkt zusätzlich katabol (Vaughan et al. 2013; Liguori et al. 2018). Im Rahmen der Sarkopenie-Entwicklung reduzieren außerdem neuromuskuläre Veränderungen und die Einlagerung von Fett im Muskel die Muskelqualität und -leistung (Liguori et al. 2018). Für die Kachexie bedingt die zugrunde liegende Krankheit weitere Aspekte der Pathogenese: Tumore verbrauchen große Mengen an Glucose und Aminosäuren, welche durch Proteolyse und Gluconeogenese bereitgestellt werden. Zudem werden Aminosäuren für die Synthese von Akute-Phase-Proteinen genutzt (Argilés et al. 2014). Bei COPD-Patienten tragen Hyperkapnie und konsekutive Azidose zur Aktivierung der Proteolyse bei (Barreiro und Jaitovich 2018) und in Fällen von kardialer Kachexie erhöht verstärkte Atemarbeit aufgrund von Dyspnoe den Energieverbrauch (Rahman et al. 2016)

Die molekularen Mechanismen, welche innerhalb von Muskelzellen Hypertrophie und Atrophie regulieren, werden in Kapitel 1.2 eingehender beleuchtet.

1.1.4 Aktuelle Therapieansätze und Problematik

Wie in Kapitel 1.1.2 dargelegt, haben Sarkopenie und Kachexie relevante Auswirkungen auf Morbidität, Mortalität und Gesundheitskosten. Durch niedrige Geburtenzahlen und eine gestiegene Lebenserwartung steigt der Anteil älterer Menschen in Deutschland. 2014 hatten 21 % der Deutschen bereits das 65. Lebensjahr erreicht oder überschritten (Statistisches

Bundesamt 2016) und auch die jüngste Bevölkerungsvorausberechnung aus dem Jahr 2019 bestätigt den Alterungstrend in der Bevölkerung (Statistisches Bundesamt 2019). Da es sich bei Sarkopenie und Kachexie um Folgeerscheinungen von Alter und chronischer Krankheit handelt (s. 1.1.1), ist im Rahmen des demografischen Wandels auch mit einer steigenden Belastung durch diese beiden Phänomene zu rechnen. Trotz der großen Relevanz und intensiver Forschung (Cruz-Jentoft et al. 2019; Naito 2019) existiert bisher keine allgemein anerkannte Therapie. Bisherige Therapieansätze für Sarkopenie und Kachexie weisen Überschneidungen auf und lassen sich in medikamentöse und nicht-medikamentöse Maßnahmen einteilen. Nicht-medikamentöse Maßnahmen sind verschiedene Trainingsprogramme sowie eine Optimierung der Ernährung, beispielsweise durch einen erhöhten Proteingehalt und Zusatz von Vitamin D. Medikamentöse Maßnahmen zielen auf anabole Effekte (durch Testosteron oder selektive Androgen-Rezeptor Modulatoren, SARMs) oder Appetitsteigerung (durch den Ghrelin-Rezeptor Agonisten Anamorelin). Unglücklicherweise weisen diese Ansätze teils ein ungünstiges Nebenwirkungsprofil auf (Testosteron) oder führen trotz Zunahme der Muskelmasse zu widersprüchlichen Ergebnissen in Bezug auf Kraft und Leistungsfähigkeit (Anamorelin, SARMs). Körperliches Training ist bisher das einzige dieser Konzepte, für das ein positiver Effekt auf die körperliche Leistungsfähigkeit von Probanden nachgewiesen werden konnte (Liguori et al. 2018; Naito 2019). So konnte in der breit angelegten LIFE-Studie (*Lifestyle Interventions and Independence for Elders*) ein langfristiges und strukturiertes Trainingsprogramm das Risiko für eine schwere und dauerhafte Einschränkung der Mobilität signifikant reduzieren (Pahor et al. 2014). Es besteht somit weiterhin Bedarf an wirkungsvollen und gut verträglichen Medikamenten, um der Muskelatrophie entgegenzuwirken.

1.2 Molekulare Mechanismen von Muskelatrophie

Bislang sind vier Hauptwege bekannt, die im Skelettmuskel den Abbau von Proteinen vermitteln: der Calpain-abhängige und der Caspase-abhängige Weg, das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und der Autophagie-Lysosomen-Weg (Bowen et al. 2015), im Folgenden kurz mit Autophagie bezeichnet. In diesem Kapitel soll nun eine Achse von Regulatoren beschrieben werden, welche die Aktivität des UPS und der Autophagie beeinflusst. Eine Übersicht dieses regulatorischen Systems bietet Abbildung 1.

Wie bereits in Kapitel 1.1.3 angedeutet, begünstigen Wachstumsfaktoren die Synthese von Muskelproteinen. Insulin und Wachstumsfaktoren wie IGF-1, Erythropoetin und weitere aktivieren die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), welche wiederum die Serin/Threonin-Kinase Akt über eine Phosphorylierung aktiviert. Akt aktiviert die Kinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR) und mTOR aktiviert über weitere Zwischenschritte die Synthese von Muskelproteinen (Sartorelli und Fulco 2004; Greer und Brunet 2005). In *in vivo* - Experimenten führt der Akt/mTOR-Signalweg zu Muskelhypertrophie und kann Atrophie durch Denervierung verhindern (Bodine et al. 2001). Zusätzlich zur Aktivierung von mTOR

hemmt Akt den Transkriptionsfaktor *forkhead box O3* (FOXO3) durch Phosphorylierung an Threonin 32, Serin 253 und Serin 313 (Greer und Brunet 2005). FOXO3 reguliert die Expression der beiden E3 Ubiquitin-Ligasen Atrogin-1 (Sandri et al. 2004) und *muscle RING-finger protein-1* (MuRF-1) (Stitt et al. 2004; Bollinger et al. 2014). Im UPS werden Proteine mit Polyubiquitin-Ketten für den Abbau im 26S-Proteasom markiert. Die Bindung der Ubiquitin-Kette an ein ausgewähltes Protein wird durch die entsprechende spezifische E3-Ligase katalysiert. Atrogin-1 und MuRF-1 werden muskelspezifisch exprimiert und sind bei Atrophie maßgeblich am Abbau von – insbesondere kontraktilen – Muskelproteinen beteiligt (Lecker et al. 2006). Weitere Gene, deren Transkription FOXO3 positiv reguliert, gehören dem Autophagie-Lysosomen-Weg an (Mammucari et al. 2007; Zhao et al. 2007). Dieser dient dem Abbau von Proteinen und ganzen Organellen durch die Aufnahme in Autophagosomen, deren Verschmelzung mit Lysosomen und anschließende Hydrolyse durch lysosomale Enzyme. Eine basale Autophagie-Aktivität ist essentiell für die Homöostase gesunder Zellen. Bei Überaktivierung dagegen verstärkt sie durch den Verlust wichtiger Zellbestandteile die Entwicklung von muskulärer Atrophie (Fanzani et al. 2012). Mit UPS und Autophagie koordiniert FOXO3 somit zwei essentielle Stoffwechselwege der Atrophie-Entstehung (Mammucari et al. 2007). Zudem existieren Hinweise für eine direkte Aktivierung von *forkhead box O* (FOXO) - Transkriptionsfaktoren durch oxidativen Stress, für einen hemmenden Effekt von FOXO auf mTOR und von mTOR auf das Autophagie-System (Hay 2011). In der Pathogenese der Kachexie wird dem UPS eine zentrale Rolle zugeschrieben und Marker von Autophagie sind in katabolen Situationen erhöht. Zu UPS-Markern bei älteren Personen und im Tiermodell der Sarkopenie liegen bisher widersprüchliche Daten vor (Bowen et al. 2015).

Muskelmasse ist abhängig von einem Gleichgewicht zwischen Muskelproteinauf- und -abbau (Liguori et al. 2018). Der Transkriptionsfaktor FOXO3 aktiviert das UPS und das Autophagie-System, zwei Hauptwege des Proteinabbaus im atrophierenden Muskel. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit einer hemmenden Wirkung auf die Proteinsynthese über die Wirkung auf mTOR. FOXO3 befindet sich somit an einem Knotenpunkt dieses regulatorischen Systems. Im folgenden Kapitel soll FOXO3 mit seinen Funktionen eingehender betrachtet werden.

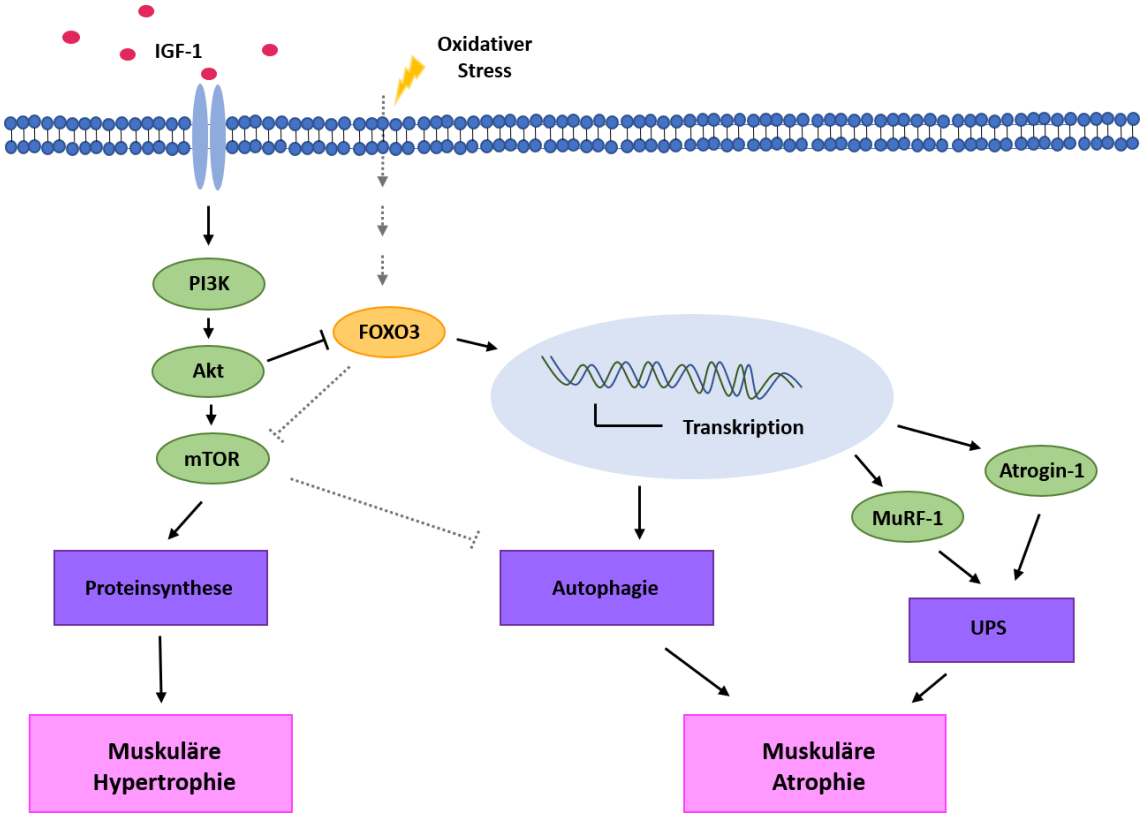


Abbildung 1: Molekulare Mechanismen von Muskelatrophie

Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) aktiviert über die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) die Kinase Akt. Aktives Akt aktiviert über *mammalian target of rapamycin* (mTOR) Muskelproteinsynthese und somit muskuläre Hypertrophie und inaktiviert den Transkriptionsfaktor *forkhead box O3* (FOXO3). Ist FOXO3 aktiv, begünstigt es die Expression von Autophagie-Proteinen und den E3 Ubiquitin-Ligasen Atrogin-1 und *muscle RING-finger protein-1* (MuRF-1) des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS), welche zu muskulärer Atrophie führen. Weitere mögliche Zusammenhänge sind die Aktivierung von FOXO3 durch oxidativen Stress, Hemmung von mTOR durch FOXO3 und von Autophagie durch mTOR. Modifiziert nach (Zhao et al. 2007; Hay 2011; Bowen et al. 2015).

1.3 Transkriptionsfaktor FOXO3

Die Familie der *forkhead box* (FOX) – Transkriptionsfaktoren ist evolutionär von einfachsten Organismen bis zu Säugetieren erhalten und zeichnet sich durch eine gemeinsame Domäne zur Bindung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus. Eine Untergruppe dieser Proteine stellen die FOXO-Transkriptionsfaktoren dar. Bei Säugern gehören ihr FOXO1, FOXO3, FOXO4 und FOXO6 an (Liu et al. 2018). Je nach Gewebe zeigen die vier *FOXO*-Gene unterschiedliche Expressionsmuster und erfüllen andere Aufgaben (Stefanetti et al. 2018) über die Transkriptionsregulation verschiedenster Gene. Die Bindung der FOXO-Faktoren an die DNA wird über die *forkhead box* vermittelt und führt überwiegend zu einer Aktivierung der Transkription. Doch auch eine hemmende Wirkung ist möglich (Greer und Brunet 2005). Die Aktivität von FOXO3 wird durch vielfältige Mechanismen wie Acetylierung, Methylierung und die Bindung von mikro Ribonukleinsäure (miRNA) reguliert (Stefanetti et

al. 2018). Den prominentesten Regulationsmechanismus stellt die bereits in 1.2 erwähnte Phosphorylierung durch Akt oder andere Kinasen dar (Liu et al. 2018). Phosphoryliertes FOXO3 wird vom Protein 14-3-3 gebunden und aus dem Kern transportiert (Greer und Brunet 2005). Im Zytoplasma wird es anschließend vom UPS abgebaut (Liu et al. 2018).

Zu den zellulären Funktionen, welche von den FOXO-Transkriptionsfaktoren und ihren Zielgenen beeinflusst werden, zählen Glukosemetabolismus, Apoptose, DNA-Reparatur und die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS). Durch Aktivierung von Zellzyklus-Inhibitoren und Unterdrückung von promitotischen Faktoren hemmen sie die Proliferation von Zellen. Gemeinsam mit der FOXO-vermittelten Hochregulierung von Genen zur DNA-Reparatur und ROS-Entgiftung könnte die bremsende Wirkung auf den Zellzyklus erklären, warum FOXO häufig als Tumorsuppressor wirkt (Greer und Brunet 2005). Zudem werden FOXO-Transkriptionsfaktoren mit außergewöhnlicher Langlebigkeit assoziiert, sowohl in diversen Modellorganismen als auch beim Menschen. In verschiedenen Populationsstudien konnte ein Zusammenhang zwischen bestimmten Varianten von FOXO3 und hohem Alter (sowie dem späten bzw. selteneren Auftreten altersbedingter Erkrankungen) nachgewiesen werden. Der Mechanismus, über welchen FOXO zur Langlebigkeit beiträgt, scheint pleiotrop zu sein und beinhaltet vermutlich verschiedene FOXO-kontrollierte Zellfunktionen wie Metabolismus und Apoptose (Martins et al. 2016). Auch bei der Differenzierung von Zellen spielt FOXO eine Rolle. Je nach Zellart und FOXO-Typ wurden sowohl Stimulation als auch Hemmung der Differenzierung beschrieben (Greer und Brunet 2005). Für die Differenzierung von Muskelvorläuferzellen zu Muskelfasern konnten einige Arbeiten eine positive Rolle von FOXO3 zeigen (Hu et al. 2008; Dentice et al. 2010; Peng et al. 2017). In ausdifferenzierten Muskelzellen führt eine dauerhafte Aktivierung von FOXO3 zu Atrophie (Greer und Brunet 2005), wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben.

1.4 RNA-Interferenz

Bei der Ribonukleinsäure (RNA) -Interferenz (RNAi) handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, die sich einen endogenen Prozess zur Genregulation zunutze macht. Seit ihrer Entdeckung in den 1990er Jahren hat sie sich schnell weiterentwickelt und zu einer Standardmethode etabliert.

Der zentrale Mechanismus der RNAi spielt sich im Zytoplasma ab: doppelsträngige RNAs (dsRNA) werden von der Nuklease *Dicer* zu kürzeren Doppelsträngen geschnitten, den *short interfering RNAs* (siRNA). Diese besitzen eine Länge von ca. 21 Nukleotiden mit je zwei Nukleotiden Überhang an den 3‘-Enden. Im nächsten Schritt wird die fertig geschnittene siRNA in den *RNA induced silencing complex* (RISC) geladen (Kurreck 2009), ein Komplex, der neben der siRNA verschiedene Proteine enthält (Dana et al. 2017). Bei Aktivierung des RISC wird die Doppelstrang-Struktur der siRNA aufgetrennt: Während der Strang mit dem thermodynamisch stabileren 5‘-Ende abgespalten wird, bildet der verbleibende Strang den

Leitstrang. Er ermöglicht die Bindung des RISC an komplementäre *messenger RNA* (mRNA), welche anschließend durch das im Komplex enthaltene Protein Argonaut 2 gespalten wird. Durch den so vermittelten Abbau von mRNA können siRNAs sequenz-spezifisch Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene hemmen.

siRNAs werden chemisch synthetisiert und mit verschiedenen Techniken in Zellen eingebracht, um Genexpression künstlich zu beeinflussen. Es handelt sich hierbei um einen vorübergehenden Effekt. In Zellkultur kann ein Effekt meist 48 h nach Transfektion mit siRNA beobachtet werden und hält in der Regel einige Tage an. Da das Zielgen nicht vollständig abgeschaltet wird, spricht man von *knockdown* statt von *knockout* wie im transgenen Tiermodell (Kurreck 2009). Die Techniken, mit denen siRNAs in ihre Zielzellen eingebracht werden, lassen sich in virale und nicht-virale Systeme unterscheiden. Ein weit verbreitetes nicht-virales System stellen Liposomen-basierte Träger dar (Dana et al. 2017), zu denen unter anderem das hier verwendete Lipofectamine® 2000 gehört (Dalby et al. 2004). Liposomen-basierte Transfektion wird auch Lipofektion genannt. Die Funktionsweise von Lipofectamine® 2000 wird in Kapitel 2.2.3.1 erläutert.

Neben siRNAs existieren weitere kleine nicht-kodierende RNAs, die auf ähnliche Weise funktionieren: *small hairpin RNAs* (shRNA) beinhalten *sense* und *antisense* Strang in einer Haarnadelstruktur und werden von *Dicer* zu siRNA geschnitten. Sie werden durch virale Vektoren eingebracht und exprimiert (Mülhardt 2013) und ermöglichen einen langfristigeren *knockdown*. Die bereits in Kapitel 1.3 erwähnten miRNAs werden endogen gebildet. Durch RNAi und Hemmung der Translation sollen sie ca. 30 % aller Protein-kodierenden Gene bei Säugern regulieren (Kurreck 2009). Hudson et al. zeigten beispielsweise in einer Arbeit von 2014, dass die miRNA miR-182 die *FOXO3*-Expression in atrophierendem Skelettmuskel senkt. *Piwi-interacting RNAs* (piRNA) werden ebenfalls endogen gebildet und kommen in Keimbahnzellen vor (Kurreck 2009). Neben der Spaltung von mRNA und der Hemmung der Translation sollen dsRNAs auch die Transkription beeinflussen können. Dies wurde jedoch bisher nicht für Säuger nachgewiesen (Kurreck 2009; Mülhardt 2013). Abbildung 2 stellt den Mechanismus der RNAi schematisch dar.

Praktisch kommt die RNAi in der Analyse von Genfunktionen *in vitro* und *in vivo* zur Anwendung. Zudem lässt sich das Prinzip der RNAi für die Entwicklung moderner Medikamente nutzen, da es ermöglicht, pathogenetische Schlüsselgene selektiv abzuschalten. Für die Tumortherapie wurden beispielsweise siRNAs bestimmt, welche sich gegen Onkogene richten oder gegen Faktoren, die Resistenz gegen Chemo- und Radiotherapie vermitteln (Dana et al. 2017). Unerwünschte Wirkungen von siRNAs in der Anwendung stellen *off-target* Effekte und die Aktivierung der Interferonantwort dar. Bereits eine relativ geringe Homologie zu einer mRNA, die nicht dem Zielgen entspricht, kann in Rahmen des *off-target* Effekts zu deren *knockdown* durch die eingesetzte siRNA führen. Derartige Nebenwirkungen sollen insbesondere in der therapeutischen Anwendung vermieden werden. Eine weitere Herausforderung für die Entwicklung wirksamer Medikamente stellt

die systemische Gabe dar. Die siRNAs sollen das Zielgewebe erreichen, ohne auf dem Weg dorthin abgebaut zu werden. Chemische Modifikationen des Begleitstranges können unter anderem das Risiko von *off-target* Effekten reduzieren und gleichzeitig die Stabilität der siRNA erhöhen. Aufgrund verschiedener Schwierigkeiten, die mit dem systemischen Transport von siRNAs einhergehen, wurden für die ersten klinischen Studien topisch wirksame Medikamente mit intravitrealer oder intranasaler Applikation ausgewählt (Kurreck 2009).

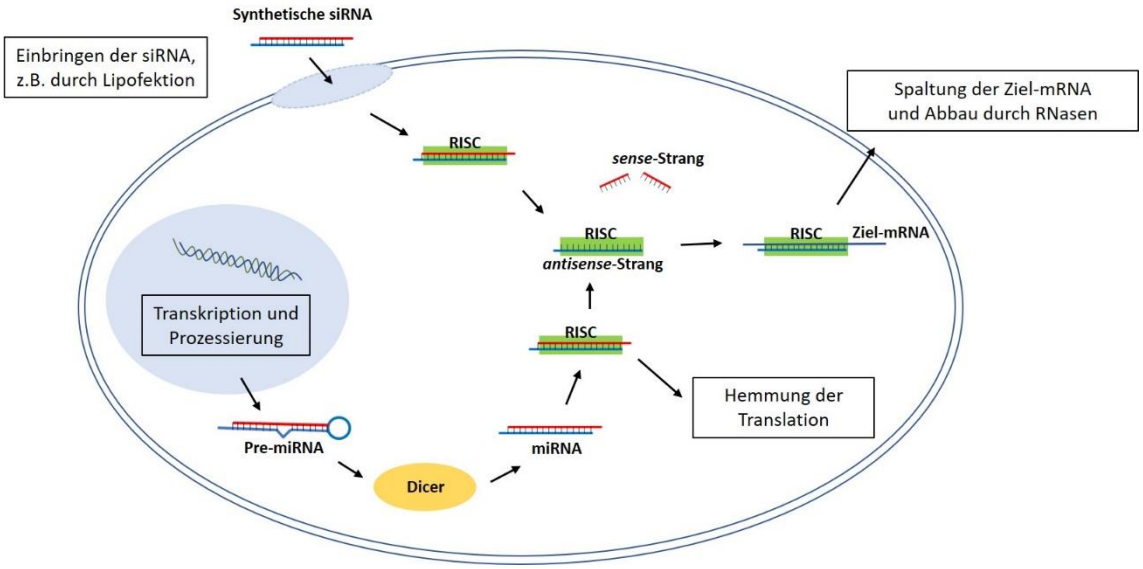


Abbildung 2: Mechanismus der RNA-Interferenz

Künstlich synthetisierte short interfering Ribonukleinsäuren (siRNA) werden durch Lipofektion oder andere Verfahren in die Zelle eingeschleust. Mikro RNAs (miRNA) werden endogen gebildet und wie andere doppelsträngige RNAs (dsRNA) von der Nuklease *Dicer* zu kürzeren Doppelsträngen geschnitten, den aktiven siRNAs oder miRNAs. Gemeinsame Endstrecke ist das Laden in den *RNA induced silencing complex* (RISC), das Auftrennen der Doppelstrang-Struktur und Abspalten des *sense*-Stranges. Der *antisense*-Strang bindet als Leitstrang an komplementäre *messenger RNA* (mRNA) und ermöglicht deren Spaltung und Abbau. miRNAs hemmen zusätzlich auf anderem Weg die Translation. Modifiziert nach (Kurreck 2009; Dana et al. 2017).

1.5 Myogene Differenzierung

Skelettmuskulatur besteht aus Bündeln langer und mehrkerniger Muskelfasern (Chal und Pourquié 2017). Der Begriff Myogenese beschreibt die Entstehung von Muskelgewebe ab der frühen Embryonalphase bis hin zur reifen Muskulatur des Erwachsenen. Sie lässt sich in verschiedene Phasen unterteilen und wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Botenstoffen und Transkriptionsfaktoren gesteuert. Wird adultes Muskelgewebe geschädigt, so aktiviert dies die Regeneration durch Satellitenzellen. Diese liegen den Muskelfasern innerhalb der Basalmembran an und befinden sich bis zu ihrer Aktivierung in einem Ruhezustand. Bei Muskelverletzungen proliferieren sie und differenzieren zu neuen Muskelfasern. Gleichzeitig erhalten sie durch asymmetrische Zellteilung einen Pool an

Stammzellen aufrecht. Myogenese und Regeneration durch Satellitenzellen weisen viele Gemeinsamkeiten auf, so z. B. bei den beteiligten Transkriptionsfaktoren (Bentzinger et al. 2012). Beiden gemeinsam ist außerdem die Entstehung von Muskelfasern in einem mehrschrittigen Prozess: teilungsfähige Vorläuferzellen - die Myoblasten - proliferieren, bis sie zu Myozyten differenzieren. Diese wiederum fusionieren miteinander, zuerst zu kleinen unreifen, dann zu größeren reifen Myotuben. Erkenntnisse über diese Abläufe wurden überwiegend anhand von Zellkultur-Versuchen gewonnen, unter anderem an der hier verwendeten Zelllinie C2C12 (s. 1.5.2). Vollständig ausgereifte und strukturierte Muskelfasern lassen sich dagegen nur *in vivo* nachweisen (Abmayr und Pavlath 2012). Die wichtigsten Schritte der myogenen Differenzierung und die beteiligten Transkriptionsfaktoren sind schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

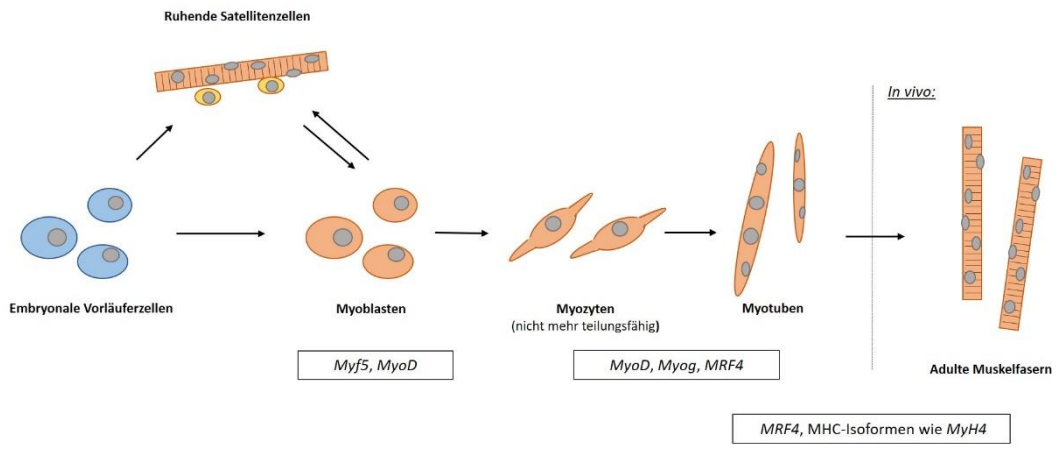


Abbildung 3: Zellpopulationen im Laufe der Myogenese mit Marker-Genen (Auswahl)

Aus embryonalen Vorläuferzellen gehen aktive Myoblasten und Satellitenzellen hervor. Während die Myoblasten an der embryonalen Myogenese beteiligt sind, werden Satellitenzellen im späteren Leben bei Verletzungen aktiviert und differenzieren zu Myoblasten. Myoblasten können umgekehrt als Satellitenzellen in den Ruhezustand zurückkehren. Aktivierte Myoblasten differenzieren zu Myozyten, welche durch Fusion Myotuben und schließlich adulte Muskelfasern bilden. Die Marker-Gene lassen sich in den entsprechenden Entwicklungsstadien nachweisen, zu ihren Funktionen siehe Fließtext. *myogenic factor 5* (*Myf-5*), *myoblast determination protein 1* (*MyoD*), Myogenin (*Myog*), *muscle-specific regulatory factor 4* (*MRF4*), *myosin heavy chain 4* (*MyH4*). Modifiziert nach (Abmayr und Pavlath 2012; Bentzinger et al. 2012; Singh und Dilworth 2013; Chal und Pourquié 2017)

1.5.1 Differenzierungsmarker *Myog* und *MyH4*

Eine prominente Rolle unter den erwähnten Transkriptionsfaktoren nehmen die sogenannten *myogenic regulatory factors* (MRFs) ein. Zu dieser Gruppe gehören *myogenic factor 5* (Myf-5), *myoblast determination protein 1* (MyoD), Myogenin und *muscle-specific regulatory factor 4* (MRF4). Die vier MRFs zeigen strukturelle Gemeinsamkeiten und werden räumlich und zeitlich nach einem komplexen Muster unterschiedlich stark exprimiert. Nach aktuellem

Wissensstand wirken Myf-5 und MyoD *upstream* der beiden anderen MRFs und vermitteln die grundsätzliche Determination von Vorläuferzellen zur Myogenese. Myogenin und MRF4 ermöglichen die Expression von spezifischen Genen, z. B. zur Fusion von Myoblasten oder von strukturellen Proteinen (Bentzinger et al. 2012).

Die vorliegende Arbeit untersucht im Rahmen des Hauptversuches die Expression von *Myog* (dem Gen, welches für Myogenin codiert), sowie von Myosin schwere Kette 4 (*myosin heavy chain 4, MyH4*). *Myog* lässt sich in C2C12-Zellen, welche zur Differenzierung angeregt wurden, vor dem Auftreten phänotypischer Veränderungen nachweisen (Andrés und Walsh 1996). Das Gen *MyH4* kodiert für das muskuläre Protein Myosin schwere Kette IIb (*myosin heavy chain IIb*, MHCIIb), welches im erwachsenen Muskel in schnell-zuckenden Muskelfasern vorkommt (Tsukamoto et al. 2018). In differenzierenden C2C12-Zellen tritt MHCIIb erst nach Myogenin und nach seinen Isoformen MHCIIa und MHCIIx auf (Brown et al. 2012). Entsprechend werden *Myogenin* und *MyH4* in dieser Arbeit als Marker für frühe respektive terminale Differenzierung der C2C12-Zellen genutzt.

1.5.2 **Zelllinie C2C12**

Bei der hier verwendeten Zelllinie C2C12 handelt es sich um Mausmyoblasten, die sich von Satellitenzellen ableiten (Burattini et al. 2004). Sie wurden von Blau et al. (1983) als Subklon der Linie C2 generiert. Die C2-Zellen wiederum wurden ursprünglich von Yaffe und Saxel (1977) aus Muskeln von C3H-Mäusen isoliert, welche 70 Stunden zuvor mit einer Zange verletzt worden waren. C2C12-Zellen wachsen adhärent als Monolayer, proliferieren bei hohem Serumgehalt im Medium und differenzieren unter Serumentzug (Burattini et al. 2004). Unter Zusatz von 20 % fetalem Rinderserum (*fetal bovine serum*, FBS) zeigen sie eine Verdopplungszeit von etwa zwölf Stunden. Nach Wechsel auf serumarmes Medium beginnen sie innerhalb von ein bis zwei Tagen zu fusionieren, bilden im weiteren Verlauf Strukturen des kontraktilen Apparates aus und zeigen schließlich sogar spontane Kontraktionen (McMahon et al. 1994).

1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Wie in Kapitel 1.1.4 dargelegt, fehlt es für Sarkopenie und Kachexie bisher an wirksamen und verträglichen Medikamenten, um der Muskelatrophie entgegenzuwirken. Argilés et al. forderten bereits 2014, dass Medikamente gegen tumorbedingte Kachexie sowohl anti-katabol als auch anabol wirksam sein sollten. Der Transkriptionsfaktor FOXO3 befindet sich an einer Schlüsselstelle der Regulation von anabolen und katabolen Prozessen im Skelettmuskel (s. 1.2) und stellt somit ein interessantes Ziel für die Entwicklung neuer Medikamente dar. Eine Reduktion der FOXO3-Aktivität mithilfe von RNAi-Techniken könnte den Muskelkatabolismus hemmen und im besten Falle sogar umkehren. Als erster Schritt in diese Richtung soll in dieser Arbeit die Ausschaltung von FOXO3 in der Zellkultur untersucht werden.

Dabei werden folgende Fragen geprüft:

Wie lassen sich C2C12-Zellen besonders effektiv zu Myotuben differenzieren? Lassen sich undifferenzierte und differenzierte C2C12-Zellen mittels Lipofektion transfizieren? Lässt sich durch siRNA ein *knockdown* von FOXO3 erzielen? Wenn ja, wie stark ist der *knockdown*, wie lange hält er an und wie wirkt er sich auf die Expression des FOXO3-Zielgens *Atrogin-1* sowie auf die zellulären Funktionen Differenzierung und Proliferation aus? Hat das Transfektionsreagenz Lipofectamine® 2000 einen eigenen Effekt auf die *Foxo3*-Expression in C2C12-Zellen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden zunächst verschiedene Protokolle zur Differenzierung und Transfektion auf ihre Effektivität überprüft. Anschließend wurden im Rahmen des Hauptversuches C2C12-Zellen mit siRNA gegen *Foxo3* transfiziert und zur Differenzierung angeregt. Über einen Beobachtungszeitraum von zehn Tagen wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt und mittels quantitativer *real time*-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) die mRNA-Level von *Foxo3*, *Atrogin-1* und den zwei Differenzierungsmarkern *Myog* und *MyH4* bestimmt. Mittels Celigo® wurde die Proliferationsrate von *knockdown*-Zellen mit der von kontroll-transfizierten Zellen verglichen. Zum Ausschluss von eigenen Effekten des Transfektionsreagenz auf die *Foxo3*-Expression wurden mRNA-Level von *FOXO3* aus Wildtypzellen und kontroll-transfizierten Zellen mittels qPCR untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialen

Einfrierröhrchen CryoPure Gefäß (1,0 ml)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pasteurpipetten, Glas	Brand, Wertheim, Deutschland
PCR-Platte 96-Well Multiplate®, farblos	BioRad, Hercules, CA USA
PCR SingleCap 8er-Softstrips 0,2 ml, farblos	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
PCR SoftTubes 0,2 ml, farblos	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
PCR-Versiegelungsfolie Microseal® ‚B' Film	BioRad, Hercules, CA USA
Pipetten, serologisch (5 ml, 10 ml, 25 ml)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere® plus Filter Tips (20 µl, 100 µl)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere® Filter Tips (1250 µl)	SARSTED, Nümbrecht Deutschland
Pipettenspitzen TipOne® (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	STARLAB, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße EPPENDORF TUBES® DNA LoBind (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röhrchen, Falcon Tube (15 ml, 50 ml)	SARSTED, Nümbrecht Deutschland
Zellkulturflaschen T75	SARSTED, Nümbrecht Deutschland
Zellkulturplatten 24-Well LABSOLUTE®	Th. Geyer, Renningen, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Ethanol, vergällt 99,8 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Formaldehydlösung 4 % (stab.) phosphatgepuffert	CHEMSOLUTE®, Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Kristallviolett	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methylenblau-Lösung alkalisch nach Löffler	Fluka BioChemika, Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS) Tabletten	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
2-Propanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Wasser, destilliert; DNase- und RNasefrei UltraPure™	Invitrogen™ by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

2.1.3 Zelllinie und Zellkulturreagenzien

Tabelle 3: Zelllinie C2C12

C2C12, ATCC® CRL-1772™	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA

Tabelle 4: Zellkulturreagenzien

Antibiotikum Pen Strep (P/S), (+ 10.000 Units/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), (+ 4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamine; Pyruvat)	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Fetales Rindeserum (*fetal bovine serum,* FBS) FBS Premium	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Lipofectamine® 2000	Invitrogen™ by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Opti-MEM *Reduced Serum Medium*	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Pferdeserum (*donor horse serum*, HS)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Trypan Blau (0,4 %)	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Trypsin/EDTA 10x (0,5 %/0,2 %)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland

Tabelle 5: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Wachstumsmedium (*growth medium,* GM)	DMEM + 1 % P/S + 10 % FBS
Differenzierungsmedium (DM)	DMEM + 1 % P/S + 1 % HS (in Vorversuchen alternativ auch 2 % HS, 1 % FBS, 2 % FBS)

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Penicillin/Streptomycin (P/S), fetales Rinderserum (FBS); Pferdeserum (HS).

2.1.4 **siRNAs, Plasmid**

Tabelle 6: *short interfering* Ribonukleinsäuren (siRNAs)

Foxo3a Silencer Pre-designed siRNA 100380, 40 nmol	Ambion® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Luciferase GL2 Duplex D-001100-01-20, 20 nmol	Dharmacon™, Lafayette, CO, USA

Tabelle 7: Plasmid

pmaxGFP™ (*green fluorescent protein*) (3486 bp)	Lonza, Basel, Schweiz

2.1.5 **PCR-Puffer, Primer**

Tabelle 8: Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Puffer

SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	BioRad, Hercules, CA, USA

Tabelle 9: Primer

Primer			Sequenz [5' – 3']
mAtrogin-1	F		CAG CTT CGT GAG CGA CCT C
	R		GGC AGT CGA GAA GTC CAG TC
mGAPDH	F		AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG
	R		GGG GTC GTT GAT GGC AAC A
mFOXO3	F		CGC TGT GTG CCC TAC TTC
	R		CCC GTG CCT TCA TTC TGA
mMyH4	F		AGG ACC AAC TGA GTG AAG TGA
	R		GGG AAA ACT CGC CTG ACT CTG
mMyog	F		GCA GGC TCA AGA AAG TGA ATG
	R		TAG GCG CTC AAT GTA CTG GAT

Alle Primer wurden hergestellt von Microsynth Seqlab in Göttingen, Deutschland.
(F = *forward*, R = *reverse*, m = *mouse*)

2.1.6 **Kits**

Tabelle 10: Kits

iScript™ cDNA Synthesis Kit (cDNA = komlementärer Desoxyribonukleinsäure)	BioRad, Hercules, CA, USA

RNeasy® Mini Kit (250)	Quiagen, Hilden, Deutschland

2.1.7 **Geräte**

Tabelle 11: Geräte

Celigo® S Cell Imaging Cytometer	Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, KS, USA
Eismaschine S-No. 140693	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Einfrierbox Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Containers	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Inkubator C200	Labotect, Göttingen, Deutschland
Kühltruhe (-20 °C) öko super	LIEBHERR, Bulle, Schweiz
Kühltruhe (-20 °C)	LIEBHERR, Bulle, Schweiz
Kühltruhe (-80 °C) DF9014	ilShin® Europe, Ede, Niederlande
Kühltruhe (-80 °C) TSX Series with V-Drive	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kühltruhe (-140 °C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikroskop DMi8 mit Kamera DMC6200	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop DM IRBE mit Kamera DC 200	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop DM IRE2 mit Kamera DFC 350 FX	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
PCR-Gerät C1000™ Thermal Cycler CFX96™ Real-Time System	BioRad, Hercules, CA, USA
Pipetten Eppendorf Reference (10, 100, 1000)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe accu-jet®	Brand, Wertheim, Deutschland
Pumpe Vacusafe	INTEGRA Biosciences, Biebertal, Deutschland
Scanner Epson V700 Photo	Seiko Epson, Suwa, Japan
Spektrophotometer/Fluorometer DS-11 FX+	DeNovix, Wilmington, DE, USA

Sterilbank SterilGard Hood (Class II, Typ A/B3)	The Baker Company, Sanford, ME, USA
Thermocycler Labcycler	Sensoquest, Göttingen, Deutschland
Vortexmischer REAX 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Vortexmischer Vortex-Genie	Wilten Instrumenten, Etten-Leur, Niederlande
Wasserbad C76 Water Bath Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Zählkammer Neubauer improved	Brand, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5702	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Labofuge 400	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Mikro 120	Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge SPROUT™	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland

2.1.8 **Computer Software**

Tabelle 12: Computer Software

CFX Manager 3.1	BioRad, Hercules, CA, USA
GraphPad Prism v5.04	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
ImageJ 1.52a	NIH, Bethesda, MD, USA (Schneider et al. 2012)
ImageJ 1.52e	NIH, Bethesda, MD, USA (Schneider et al. 2012)
Leica Application Suite X	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica DC Camera Leica IM 50	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica FW 4000	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmond, WA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Handhabung der Zelllinie

Die verwendeten C2C12-Zellen (ATCC® CRL-1772™; American Type Culture Collection (ATCC) wurden in T75-Kulturflaschen mit 10 ml Wachstumsmedium (*growth medium*, GM) kultiviert. Ihre Konfluenz erreichte maximal 90 %. Die Kulturflaschen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre gehalten. Jede Manipulation an den Zellen wurde unter der Sterilbank mit sterilen Medien durchgeführt. Verwendete Geräte und Hilfsmittel waren entweder steril verpackt oder wurden vor der Nutzung mit 70 % Ethanol abgesprüht, um potenzielle Kontaminationen zu beseitigen. Zwei- bis dreimal pro Woche wurden die Konfluenz und der Phänotyp der Zellen im Lichtmikroskop (LM) beurteilt und diese entsprechend der Konfluenz gesplittet. *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS), Differenzierungsmedium (DM) und GM wurden vor Subkultivierung, Aussaat und Mediumwechsel im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Alle Arbeitsschritte erfolgten - wenn nicht anders angegeben - bei Raumtemperatur (RT). Die Zusammensetzung der Kulturmedien ist in 2.1.3 aufgeführt.

2.2.1.1 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Konfluente Zellen in Passage 14 wurden als Stockkultur eingefroren. Als Medium hierfür wurde komplettes GM mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. DMSO wird beim Einfrieren von Zellen als Frostschutzmittel verwendet. Es diffundiert in die Zellen und verhindert dort die Bildung von Eiskristallen, wirkt in der eingesetzten Konzentration aber auch toxisch (Gstraunthaler und Lindl 2013). Aus diesem Grund müssen einzelne Schritte beim Auftauen und Einfrieren zügig erfolgen, um die Zellen nicht zu lange dem toxischen Einfluss des DMSO auszusetzen. Die Zellen wurden wie in den folgenden Abschnitten beschrieben trypsiniert und gezählt, um die Zellzahl in einem Milliliter Zellsuspension zu ermitteln. Anschließend wurden die Zellen für drei Minuten bei 300 x g abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde nun mit dem DMSO-haltigen Medium resuspendiert und dabei so verdünnt, dass eine Verdünnung von zwei Millionen Zellen pro Milliliter entstand. Aliquots von 1 ml Zellsuspension wurden in Einfrierröhrchen abgefüllt und eingefroren. Hierfür wurden sie zunächst in einer Einfrierbox mit 2-Propanol für 24 h in den -80 °C Gefrierschrank gestellt. Am nächsten Tag konnten sie in den -140 °C Gefrierschrank verbracht werden.

Zur Kultivierung frischer Zellen wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens in der Hand erwärmt und anschließend in einer T75-Flasche mit 10 ml GM angesät. Das Wärmen in der Hand sollte das Auftauen beschleunigen und eine rasche Verdünnung des DMSO durch das Medium ermöglichen. Am nächsten Tag wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt und das Medium ausgetauscht, um den schädigenden Einfluss des DMSO weiter zu reduzieren. Weitere ein bis zwei Tage später wurden die Zellen entsprechend ihrer Konfluenz gesplittet wie im Folgenden beschrieben.

2.2.1.2 Subkultivierung der Zellen

In der Regel hatten die Zellen nach etwa drei Tagen in Flaschen der Größe T75 eine Konfluenz von 80-90 % erreicht. Aufgrund ihrer hohen Wachstumsrate konnten sie in einem Verhältnis von 1:30 oder 1:40 gesplittet werden. Hierfür wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml DPBS gespült, um etwaige Reste des Mediums zu entfernen. Proteaseinhibitoren, die natürlicherweise in tierischem Serum und somit in den verwendeten Medien enthalten sind, würden sonst das Trypsin inaktivieren (Gstraunthaler und Lindl 2013). Nach Absaugen des DPBS wurden die Zellen für ca. sechs Minuten mit 2 ml Trypsin bei 37 °C inkubiert. Ließ sich die durch Trypsin vermittelte Ablösung der Zellen vom Untergrund sowie von den Nachbarzellen im Mikroskop bestätigen, wurde die Reaktion durch die Zugabe von 8 ml GM gestoppt und die Suspension in ein 15 ml Falcon überführt. Dieses wurde für drei Minuten bei einer Beschleunigung von 800 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut abgesaugt, das entstandene Zellpellet mit 10 ml GM resuspendiert und eine adäquate Menge der Suspension in einer frischen T75-Flasche mit GM angesät. Um die Zellen möglichst gleichmäßig über den gesamten Flaschenboden zu verteilen, wurde die Flasche mehrfach in Form einer liegenden Acht geschwenkt. Auf die gleiche Weise wurden auch Zellen nach der Aussaat in Wellplatten (s. u.) verteilt.

2.2.1.3 Ermittlung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl und anschließende Aussaat der gewünschten Anzahl von Zellen erfolgte in der Regel nach Subkultivierung unter Verwendung der verbliebenen Zellsuspension. Gezählt wurde in einer Neubauer *improved* -Zählkammer unter dem Mikroskop mit zehnfacher Vergrößerung. 20 µl Zellsuspension wurden in einem 1,5 ml-Tube mit 20 µl Trypan Blau vermischt. Der Farbstoff Trypan Blau färbt tote Zellen blau an, während er die Zellmembran vitaler Zellen nicht durchdringen kann und ermöglicht so eine Unterscheidung (Gstraunthaler und Lindl 2013). Je 20 µl dieser Mischung wurden in jede Hälfte der Zählkammer pipettiert und jeweils die Zellen innerhalb der vier Eckquadrate oben und unten gezählt. Jedes Eckquadrat besteht aus vier Mal vier kleineren Quadraten. Gezählt wurden alle vitalen Zellen, die sich im Inneren eines dieser Quadrate sowie auf der rechten und der oberen Begrenzungslinie eines Eckquadrats befanden. Aus den Zellzahlen der vier Eckquadrate wurde der Mittelwert gebildet, die Mittelwerte der oberen und unteren Hälfte erneut gemittelt. Durch die Formel

Mittelwert x Verdünnungsfaktor (2) x kammerspezifischer Faktor (10.000)

ergab sich die Zellzahl in einem Milliliter. Unter Anwendung des Dreisatzes konnte von diesem Wert ausgehend das Volumen berechnet werden, welches die gewünschte Anzahl an Zellen enthielt. Dieses wurde dann in die Wells von 24-Well-Platten pipettiert. Das Gesamtvolumen in einem Well betrug in der Regel 500 µl, die entsprechende Menge GM wurde vor Zugabe der Zellsuspension vorgelegt.

2.2.1.4 Wechsel des Mediums

Ein Austausch des Mediums wurde nur bei Zellen durchgeführt, welche in 24-Well-Platten ausgesät waren. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt, jedes Well mit 500 µl DPBS gespült und mit 500 µl frischem Medium aufgefüllt. Dieser Vorgang war nötig, wenn von GM zu DM gewechselt wurde, um die Differenzierung einzuleiten (s. u.). Darüber hinaus wurde in allen Differenzierungsversuchen das DM alle 48 h gewechselt, um die ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und die Entfernung von Stoffwechselprodukten zu gewährleisten.

2.2.1.5 Aussaat- und Konfluenzversuch

Der Aussaatversuch wurde durchgeführt, um zu ermitteln, welche Zellzahl nach 24 h zu welcher Zelldichte im Well führt. Die Ergebnisse des Versuchs wurden der Planung aller weiteren Experimente zugrunde gelegt. Zunächst wurde die Zellzahl in einem Milliliter Suspension ermittelt wie oben beschrieben. Auf einer 24-Well Platte wurden dann unterschiedliche Volumina davon angesät, je zwei Wells mit der gleichen Zellzahl. Getestet wurden Anzahlen von 20.000 Zellen bis 240.000 Zellen pro Well in 20.000er Schritten (20.000, 40.000, 60.000 usw.). Da die C2C12-Zellen eine sehr rasche Adhärenz am Wellboden zeigten, wurde die Platte nach jedem zweiten pipettierten Well geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen am Wellgrund zu gewährleisten. Aufgrund des 72-stündigen Beobachtungszeitraums wurde ein Gesamtvolumen von 2 ml pro Well verwendet, welches nicht gewechselt wurde. 24, 48, und 72 h nach dem Aussäen wurden alle Wells unter dem LM in fünf- und zehnfacher Vergrößerung fotografiert und hinsichtlich ihrer Konfluenz beurteilt.

2.2.1.6 Auswahl des Differenzierungsmediums

Für einige Versuche war die Differenzierung der myoblastischen Zellen zu Myotuben notwendig. Hierfür wurde 24 h nach Aussaat das Medium im Well von GM zu DM gewechselt wie bereits beschrieben. Generell zeichnet sich DM durch einen geringeren Serumgehalt im Vergleich zum proliferationsfördernden GM aus. Der Wechsel von Serum-reichem zu Serum-armem Medium ist eine etablierte Methode, um Differenzierung in Myoblasten zu induzieren (De Arcangelis et al. 2003) und verschiedene Autoren verwenden *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) mit geringen Konzentrationen von FBS oder Pferdeserum (*horse serum*; HS) (Burattini et al. 2004; Song und Lee 2010; White et al. 2013). Um ein Medium auszuwählen, welches die Zelllinie besonders effektiv zur Differenzierung anregt, wurde zunächst eine 24-Well-Platte mit 80.000 Zellen pro Well besät. Am nächsten Tag wurde das Medium durch mögliche DM ersetzt. Hierbei wurden jeweils sechs Wells mit dem gleichen DM versetzt. Die Zusammensetzung der DM ist in Tabelle 13 aufgeführt. Nach der Induktion der Differenzierung wurde die Platte für acht Tage weiter kultiviert. Alle 48 h erfolgte ein Mediumwechsel mit dem jeweiligen DM. Von Tag vier bis acht der Differenzierung wurden die Wells unter dem LM in fünf-, zehn- und 20-facher Vergrößerung

fotografiert, um die Entwicklung der Morphologie zu dokumentieren. Der Tag der Induktion (Wechsel von GM zu DM) wurde hier und in allen folgenden Versuchen Tag 0 genannt.

Tabelle 13: Zusammensetzung der getesteten Differenzierungsmedien im Vergleich

Grundmedium	**Serumkomponente**
DMEM + 1 % P/S	2 % HS
	1 % HS
	2 % FBS
	1 % FBS

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Penicillin/Streptomycin (P/S), Pferdeserum (HS), fetales Rinderserum (FBS).

2.2.2 **Färbung differenzierter Zellen**

Ein Versuchsziel war zu zeigen, dass sich die myoblastischen C2C12-Zellen durch längere Kultivierung in DM zu Myotuben differenzieren lassen. Myotuben sind lang gestreckte Synzytien mit mehreren Zellkernen. Sie sind kleiner als Muskelfasern *in vivo*, enthalten im Vergleich weniger Kerne und sind weniger organisiert (Abmayr und Pavlath 2012). Dennoch bietet sich eine Kernfärbung an, um die Mehrkernigkeit der entstehenden Fasern zu demonstrieren. Es wurden drei unterschiedliche Färbungen durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen: Hämalaun, Methylenblau und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI).

2.2.2.1 Hämalaun- und Methylenblau-Färbung

Für die Hämalaun- und die Methylenblau-Färbung wurden 80.000 Zellen pro Well ausgesät. 24 h später waren sie etwa 80-90 % konfluent und es wurde die Differenzierung mit 2 % HS in DMEM + 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) begonnen. Alle 48 h erfolgte ein Mediumwechsel. An Tag sechs der Differenzierung wurden sie in folgender Weise gefärbt: Die Wells wurden mit 500 µl DPBS gewaschen, zehn Minuten lang mit 400 µl 4 % Formaldehydlösung fixiert und erneut mit 500 µl DPBS gewaschen. Anschließend folgte die Färbung von je einem Well mit 300 µl Hämalaun oder Methylenblau für zwei, fünf oder zehn Minuten. Der Farbstoff wurde hiernach mit sterilem destilliertem Wasser abgewaschen, bis er nicht mehr ins Wasser ausfärbte. Zum Aufbewahren und Fotografieren der Zellen wurde das destillierte Wasser abgesaugt und erneut durch DPBS ersetzt. Unter dem LM wurden Bilder in fünf-, zehn- und 20-facher Vergrößerung angefertigt.

2.2.2.2 DAPI-Färbung

Zellen für die DAPI-Färbung wurden ebenfalls als 80.000 pro Well ausgesät und mit 1 % HS in DMEM + 1 % P/S für sechs Tage differenziert. Auch hier wurde das DM alle 48 h gewechselt. Sie wurden mit 500 µl DPBS gewaschen, zehn Minuten mit 400 µl 4 % Formaldehydlösung fixiert und erneut mit 500 µl DPBS gespült. DAPI wurde 1:1000 in

unsterilem DPBS verdünnt und 300 µl der verdünnten Lösung wurden für fünf Minuten zum Färben auf die Zellen gegeben. Abschließend wurde fünf Mal mit DPBS gespült und schließlich 500 µl DPBS auf den Zellen belassen. Bei DAPI handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff, welcher speziell an DNA bindet und somit die Kerne anfärbt (Gstraunthaler und Lindl 2013). Durch einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus bleicht die Fluoreszenz von DAPI unter Lichteinfluss aus (Gallardo-Escárate et al. 2007). Um dies zu vermeiden, wurden sowohl alle Gefäße, die DAPI enthielten, als auch die damit gefärbten Zellen als Lichtschutz mit Aluminiumfolie bedeckt. Fotos der gefärbten Zellen wurden als Lichtbilder und als Fluoreszenzbilder jeweils in zehn- und 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Overlay-Bilder wurden mithilfe von ImageJ (Schneider et al. 2012) aus den Originalbildern erstellt.

2.2.3 **Transfektion mit siRNA**

2.2.3.1 Transfektionsprotokoll

Die Transfektion der Zellen wurde mit Lipofectamine® 2000 durchgeführt. Wie andere lipid-basierte Transfektionsreagenzien bildet Lipofectamine® 2000 in serumfreiem Medium positiv geladene Liposomen. Diese können mit negativ geladenen Nukleinsäuren komplexieren und diese durch Fusion mit der ebenfalls anionischen Zellmembran und durch Endyzytose ins Zytoplasma einschleusen. Im Plasma verlassen die Komplexe die Endosomen. Eingeschleuste DNA gelangt - nun ohne die Komplex-Lipide - in den Zellkern, wo sie zur Expression kommt. Der Eintritt in den Zellkern erfolgt vermutlich überwiegend durch Kernöffnung während der Mitose (Chesnoy und Huang 2000; Dalby et al. 2004). siRNA entfaltet ihre Wirkung im Zytoplasma und muss daher nicht in den Zellkern aufgenommen werden (s. 1.4). Für die durchgeführten *knockdown*-Versuche wurden C2C12-Zellen mit siRNA gegen *Foxo3* oder Luciferase-siRNA als Kontrolle transfiziert. Bei den vorher durchgeführten Versuchen zum Transfektionserfolg wurde ein *green fluorescent protein* (GFP)-exprimierendes Plasmid eingebracht (pmaxGFP). Die Funktionsweise von Lipofectamine® ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

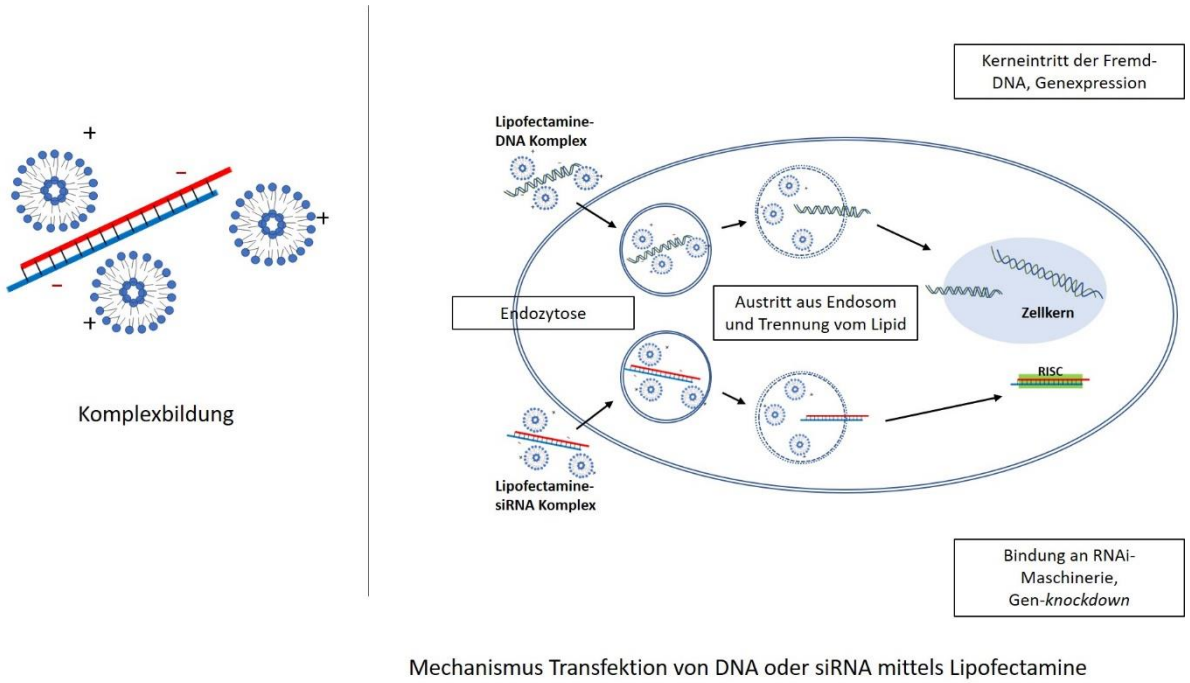


Abbildung 4: Komplexbildung und Mechanismus von Lipofectamine

Links: Lipofectamine® bildet Liposomen, die mit Nukleinsäuren komplexieren. Rechts: Komplexe aus Liposomen und Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder *short interfering* Ribonukleinsäure (siRNA) gelangen per Endozytose in die Zielzelle. In der Zelle verlassen die Nukleinsäuren Endosom und Lipid, DNA gelangt in den Zellkern und kommt dort zur Expression, siRNA entfaltet ihre Wirkung im Zellplasma durch Bindung an den *RNA induced silencing complex* (RISC). Modifiziert nach (Chesnoy und Huang 2000; Kurreck 2009; Thermo Fisher Scientific Inc. 2020a; Thermo Fisher Scientific Inc. 2020b).

In leichter Abweichung vom empfohlenen Protokoll des Herstellers (Thermo Fisher Scientific, invitrogen by life technologies 2013) wurde nach Vorversuchen (s. u.) wie folgt vorgegangen: Am Vortag der Transfektion wurden in 24-Well-Platten 60.000 Zellen pro Well ausgesät. Diese erreichten innerhalb der 24 h bis zur Transfektion eine Konfluenz von 60-80 %. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium mit frischen GM gewechselt. Für jedes zu transfizierende Well wurde 1 µl Lipofectamine® 2000 in ein Reaktionsgefäß mit 49 µl Opti-MEM gegeben. In einem zweiten Tube wurden 1000 ng Plasmid-DNA bzw. 3 µl einer 20 µM siRNA-Lösung mit Opti-MEM ebenfalls auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht. Beide Gemische wurden durch einmaliges kurzes Starten und Stoppen der Zentrifuge „anzentrifugiert“ und dann für fünf Minuten stehen gelassen. Anschließend wurde das DNA- bzw. siRNA-Gemisch dem Lipofectamine-Gemisch zugefügt. Der neue Mix (Gesamtgemisch) wurde durch Pipettieren durchmischt und für weitere 20 Minuten stehen gelassen. Danach wurden 100 µl des Gesamtgemisches in jedes Well gegeben. Die Zugabe erfolgte tropfenweise in Kreisform. Nach Zugabe des Transfektionsgemisches wurde die Wellplatte geschwenkt wie bereits beschrieben und zurück in den Inkubator gestellt. Der gesamte Transfektionsvorgang wurde bei RT unter der Sterilbank durchgeführt. Das Opti-MEM wurde vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

2.2.3.2 Prüfung des Transfektionserfolges

Der Erfolg der Transfektion mittels Lipofectamine® 2000 wurde vor den Hauptversuchen in verschiedenen Settings geprüft. Getestet wurden dabei verschiedene Protokolle und die Transfektion unterschiedlicher Zellpopulationen. Tabelle 14 gibt einen Überblick über diese Versuche.

Tabelle 14: Versuche zur Prüfung des Transfektionserfolges

Protokoll	**Zellpopulation**	**Details**
Herstellerprotokoll (Thermo Fisher Scientific, invitrogen by life technologies 2013)	80.000 C2C12 undifferenziert	Lipofectamine-Gemisch/DNA-Gemisch: keine Inkubationszeit Gesamtgemisch: 5 min Inkubation bei RT
Modifiziert	80.000 C2C12 undifferenziert	Lipofectamine-Gemisch/DNA-Gemisch: 5 min Inkubation bei RT Gesamtgemisch: 20 min Inkubation bei RT
Modifiziert	60.000 C2C12 undifferenziert	Lipofectamine-Gemisch/DNA-Gemisch: 5 min Inkubation bei RT Gesamtgemisch: 20 min Inkubation bei RT
		➔ Nach 48 h Fotodokumentation Induktion der Differenzierung (DM mit 2 % HS, Wechsel alle 48 h) und Beobachtung für weitere sechs Tage
Modifiziert	80.000 C2C12, sechs Tage DM (2 % HS, Wechsel alle 48 h)	Lipofectamine-Gemisch/DNA-Gemisch: 5 min Inkubation bei RT Gesamtgemisch: 20 min Inkubation bei RT

Desoxyribonukleinsäure (DNA), Raumtemperatur (RT), Differenzierungsmedium (DM), Pferdeserum (HS).

Um die Transfektion überprüfbar zu machen, wurden die Zellen mit pmaxGFP transfiziert (s. 2.2.3.1). GFP lässt sich zum qualitativen Nachweis erfolgreicher Transfektion in lebenden Zellen einsetzen. Unter Anregung mit ultraviolettem Licht oder blauem Licht leuchtet es grün. Die volle Leuchtintensität wird dabei erst nach 48 bis 72 h erreicht, da das Protein nach Transfektion zunächst exprimiert werden muss und dann eine gewisse Reifezeit benötigt (Mülhardt 2013) Die transfizierten Wells wurden nach 24 h und 48 h kontrolliert und fotografiert. Lichtbild-Fotos wurden in zehn- und 20-facher Vergrößerung mit 70 % Autobelichtung aufgenommen. Fluoreszenzbilder wurden zehnfach vergrößert mit 70 % Autobelichtung sowie 1,9 s Belichtungszeit und 20-fach vergrößert mit 1,9 s Belichtungszeit

fotografiert. Fluoreszenzbilder undifferenzierter Zellen in zehnfacher Vergrößerung wurden mit dem ImageJ Multipoint Tool ausgezählt. Für jedes Protokoll (Hersteller, modifiziert mit 80.000 und modifiziert mit 60.000 Zellen) und jeden Zeitpunkt (24 und 48 h nach Transfektion) wurde in jeweils drei Bildern die Zahl der fluoreszierenden Zellen bestimmt. Anschließend wurden Mittelwert und Standardabweichung in Microsoft Excel berechnet.

2.2.4 Genexpressionsversuch *Foxo3-knockdown* und Differenzierung

2.2.4.1 Versuchsaufbau und Ablauf

In diesem Versuch wurde die Expression verschiedener Gene in C2C12-Zellen im Verlauf der Differenzierung und nach *knockdown* von *Foxo3* oder nach Behandlung mit einer Kontroll-siRNA untersucht. Analysierte Gene waren *Foxo3*, *Atrogin-1*, *Myog* und *MyH4*. Für den Versuch wurden in zwei 24-Well-Platten jeweils 10 Wells zu 60.000 Zellen angesät. Am Folgetag zeigten sie eine Konfluenz von ca. 70 % und wurden entsprechend dem modifizierten Protokoll (s. o.) transfiziert (Versuchstag 0). Auf einer Platte erfolgte die Transfektion mit siRNA gegen *Foxo3*, auf der anderen als Kontrolle mit einer siRNA gegen das beim Menschen nicht exprimierte Gen *Luciferase*. Am nun folgenden Versuchstag 1 wurde auf beiden Platten mit der Differenzierung der Zellen durch DM mit 1 % HS begonnen. Insgesamt wurde der Versuch bis zu Versuchstag 9 (acht Tage Differenzierung) fortgeführt. Ab Versuchstag 0 (Tag der Transfektion, 24 h nach Aussaat) wurden die Zellen täglich einmal unter dem LM in zehn-, 20- und 40-facher Vergrößerung fotografiert, um ihre Vitalität sowie die Entwicklung der Morphologie zu dokumentieren. Zudem wurde ab Tag 0 jeden Tag aus einem Well pro Gruppe (Behandlungsgruppe B und Kontrollgruppe K) RNA isoliert (s. u.). Das Medium in den Wells wurde nach Beginn der Differenzierung alle 48 h gewechselt wie oben beschrieben. Insgesamt wurde die Analyse mit den beschriebenen Techniken an drei unterschiedlichen Wells pro Zeitpunkt und Gruppe (B und K) durchgeführt, entsprechend drei biologischen Replikaten. Einen schematischen Überblick über den Versuchsaufbau gibt Abbildung 5.

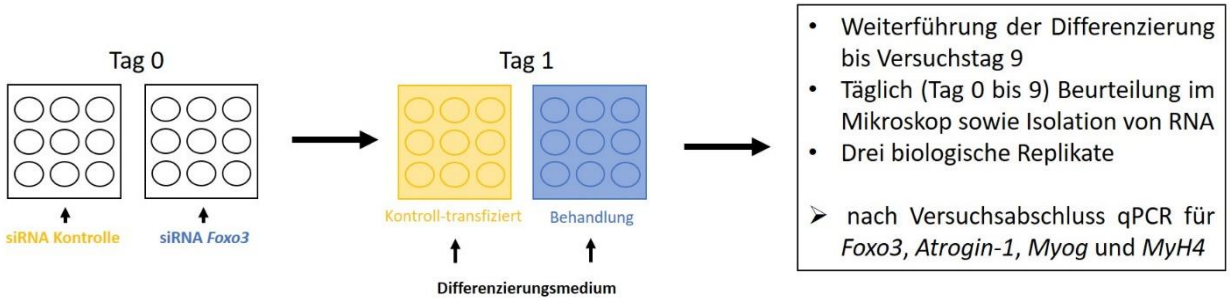


Abbildung 5: Aufbau Hauptversuch

short interfering Ribonukleinsäure (siRNA), *forkhead box O3* (*Foxo3*), quantitative *real time*-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), *Myog* (Myogenin), *myosin heavy chain 4* (*MyH4*). Weitere Erläuterung siehe Text.

2.2.4.2 RNA-Isolation

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Kulturzellen erfolgte unter Verwendung des RNeasy® Mini Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend dem Herstellerprotokoll. Ergänzend zu den Anweisungen des Herstellers wurden die zu lysierenden Zellen vor dem ersten Schritt einmal mit DPBS gespült, welches hierfür nicht erwärmt werden musste. Zentrifugationen wurden statt mit 8000 x g mit 13.523 x g durchgeführt, Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit entsprach bei der verwendeten Zentrifuge 18.406 x g. Die isolierte RNA wurde in einem Gesamtvolumen von 30 µl Ribonuklease (RNase)-freiem Wasser gelöst. Ab der Lyse der Zellen war es wichtig, wenn möglich auf Eis zu arbeiten und alle Reaktionsgefäße weitestgehend geschlossen zu halten. Für jedes Tube und jeden Arbeitsschritt wurde eine neue Desoxyribonuklease (DNase)- und RNase-freie Pipettenspitze verwendet.

Der RNA-Gehalt der gewonnenen Probe wurde unmittelbar nach der Isolation bestimmt. Hierfür wurden 1,5 µl Probe auf die Messsonde des Spektrophotometers pipettiert, nachdem dieses auf das verwendete RNase-freie Wasser geeicht worden war. Neben dem RNA-Gehalt jeder Probe wurden als Qualitätskontrolle auch die Quotienten der Absorption bei 260 nm/280 nm und 260 nm/230 nm protokolliert. Nukleinsäuren absorbieren Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm. Das Verhältnis der Absorption bei 260/280 sollte für RNA etwa bei 2,0 liegen. Ein Quotient über 2,2 gibt Hinweise auf Kontamination mit basischen Verbindungen, ein Wert unter 1,9 auf Verunreinigung durch Säuren, Phenol oder Proteine. Ergänzend deutet ein 260/230-Wert über 2,0 - 2,2 auf Kontamination mit organischen Verbindungen hin (DeNovix, Inc. 2014). Nach dieser Messung wurden die Proben bei -80 °C zur Lagerung eingefroren.

2.2.4.3 cDNA-Synthese

Zur Synthese von komplementärer DNA (cDNA) wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA, USA) nach Herstellerprotokoll verwendet. Die im Kit enthaltenen Substanzen iScript™ Reverse Transkriptase und iScript™ 5x Reaction Mix wurden auf Eis aufgetaut, gevortext und durch einmaliges kurzes Starten und Stoppen der Zentrifuge „anzentrifugiert". 1000 ng RNA wurden mit 5 µl Mastermix und einer variablen Menge RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Reaktion gebracht. Der Pipettiervorgang wurde auf Eis durchgeführt. Die Synthese erfolgte im Sensoquest Labcycler ebenfalls nach dem Protokoll von iScript™ (s. Tabelle 15). Die fertige cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Tabelle 15: Protokoll zur Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA)

Schritt	**Dauer**	**Temperatur**	**Anzahl der Durchgänge**	**Bemerkung**
1	5 min	25 °C	1	Anlagerung der Primer
2	20 min	46 °C	1	Reverse Transkription
3	1 min	95 °C	1	Inaktivierung der Reversen Transkriptase
4	∞	4 °C	1	Kühlung bis zur Entnahme der Proben

2.2.4.4 Prinzip und Durchführung der qPCR

Bei der qPCR wird die Amplifikation einer cDNA-Probe in Echtzeit mitverfolgt. Der Farbstoff SYBR Green I im Reaktionsansatz interkaliert mit der sich vermehrenden doppelsträngigen DNA. Seine Fluoreszenz steigt proportional zur Amplikon-Menge und wird im Verlauf der PCR-Zyklen gemessen. Referenzpunkt für die spätere Auswertung der Messung ist der Ct-Wert (*cycle threshold*), der der Anzahl von Zyklen entspricht, nach denen das Fluoreszenzsignal den Hintergrund übersteigt (Mülhardt 2013; BioRad 2018). Zu diesem Zeitpunkt enthalten alle Reaktions-Tubes die gleiche Menge DNA. Ist der Ct-Wert hoch, war eine längere Amplifikation nötig und die Ausgangsmenge entsprechend gering (Pfaffl 2004).

qPCRs wurden für die Gene *Foxo3*, *Atrogin-1*, *Myog* und *MyH4* durchgeführt. Als *housekeeping*-Gen diente die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*). Für jedes Gen wurde eine eigene 96-Well-Platte auf Eis pipettiert und im Thermocycler gemessen. Für jede Probe wurden drei technische Replikate zu Messung aufgetragen, zusätzlich wurden pro Platte zwei Negativkontrollen pipettiert. Diese enthielten ausschließlich den Mastermix bestehend aus SsoAdvanced SYBR-Green, den Primern für das zu untersuchende Gen (vorwärts und rückwärts) und RNase-freiem Wasser, jedoch keine cDNA-Probe. Jedem

anderen Well wurde nach Vorlage des Mastermix 1 µl cDNA zur Vervielfältigung zugesetzt. Bis auf das Wasser wurden alle Bestandteile des Mastermix sowie die cDNA für ihre Verwendung auf Eis aufgetaut, gevortext und durch einmaliges kurzes Starten und Stoppen der Zentrifuge „anzentrifugiert". Das verwendete Temperaturprogramm (CFX 3-Schritt-Amplifikation mit Schmelzkurven-Analyse) ist der folgenden Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Temperaturprogramm für die quantitative *real time*-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Schritt	**Dauer**	**Temperatur**	**Anzahl der Durchgänge**	**Bemerkung**
1	3 min	95,0 °C	1	Denaturierung, initial
2	10 s	95,0 °C	40	Denaturierung
3	10 s	55,0 °C		Anlagerung der Primer
4	30 s	72,0 °C		Elongation
5	10 s	95,0 °C	1	Denaturierung
6	5 s	89,5 °C – 95,0 °C	1	Schmelzkurven-analyse

2.2.4.5 Auswertung der qPCR

Die Rohdaten der qPCR-Ergebnisse wurden aus BioRad CFX Manager zu Microsoft Excel exportiert und dort nach der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode ausgewertet (Livak und Schmittgen 2001). Hierbei wird zunächst der sogenannte ΔCt-Wert ermittelt, indem der Ct-Wert des *housekeeping*-Gens von dem des Zielgens subtrahiert wird:

$$\Delta Ct = Ct\ (\text{Zielgen}) - Ct\ (\textit{housekeeping}\text{-Gen}).$$

In einem nächsten Schritt werden die ΔCt-Werte der Behandlungs- und der Kontrollgruppe voneinander abgezogen:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ (\text{Behandlung}) - \Delta Ct\ (\text{Kontrolle}).$$

Um den relativen Expressionsunterschied des untersuchten Gens zwischen den beiden Gruppen zu errechnen, wird schließlich die folgende Formel verwendet:

$$\text{Effekt} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}\ (\text{Pfaffl 2004}).$$

In der durchgeführten qPCR wurden für jede biologische Probe drei technische Replikate gemessen. In einer ersten Auswertung wurde für jeden Zeitpunkt des Versuchs die behandelte Probe auf ihre Kontrolle normiert. Dies sollte die Effektivität des *Foxo3-knockdown* bzw. seinen Effekt auf die Expression weiterer Gene überprüfen. Für die Kontrollgruppe wurde aus den ΔCt-Werten der drei technischen Replikate der Mittelwert gebildet. Dieser wurde zur Errechnung des ΔΔCt-Wertes vom ΔCt jedes technischen

Replikats der Behandlungsgruppe abgezogen. Mit dem so erhaltenen ΔΔCt-Wert wurde weitergerechnet, wie in der Literatur beschrieben. Dieses Verfahren wurde für jede biologische Probe wiederholt.

In weiteren Auswertungen wurden die Ct-Werte innerhalb einer Gruppe (K bzw. B) auf Versuchstag 0 normiert, um die Genexpression im zeitlichen Verlauf der Differenzierung zu testen. Hierbei wurde aus den ΔCt-Werten der technischen Replikate von Tag 0 der Mittelwert gebildet und dieser zur Berechnung von ΔΔCt von den einzelnen ΔCt Werten der anderen Versuchstage abgezogen. Tag 0 diente also als Kontrolle für die anderen Versuchstage. Die weitere Berechnung erfolgte wie beschrieben.

2.2.4.6 Statistische Auswertung

Alle Effektwerte wurden nach ihrer Berechnung in GraphPad Prism übertragen. Dort wurden sie als Balkendiagramme dargestellt und statistisch ausgewertet. Im Balkendiagramm sind die Daten als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Da bei Stichproben mit n = 3 keine Normalverteilung angenommen werden kann und sich ein Platteneffekt nicht sicher ausschließen ließ, wurden für die interferenzstatistische Auswertung nichtparametrische Tests für verbundene Stichproben angewendet. Für die Gruppenvergleiche (Normierung der Behandlungsgruppe auf die Kontrollgruppe) war dies der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, für die Reihentestung mit Normierung auf 0 der Friedman-Test. Zuletzt wurden die Ergebnisse der Normierung auf 0 auf Unterschiede zwischen den Gruppen getestet. So ließ sich der Verlauf der jeweiligen Genexpression in behandelten Zellen und Kontrollzellen miteinander vergleichen. Hierfür kam erneut der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zum Einsatz. Bei allen Testungen wurde ein Signifikanzniveau von 5 % verwendet.

2.2.5 **Proliferationsassay *Foxo3-knockdown***

2.2.5.1 Versuchsaufbau und Ablauf

Ziel dieses Versuchs war es, die Auswirkung eines *knockdown* von *Foxo3* in C2C12-Zellen auf deren Proliferationsfähigkeit zu testen. Hierfür wurden auf einer 24-Well-Platte sechs Wells zu 20.000 Zellen angesät. Am Folgetag wurde bei ca. 10 % Konfluenz die eine Hälfte der Wells mit siRNA gegen *Foxo3*, die andere Hälfte mit siRNA gegen *Luciferase* transfiziert. Anschließend wurde die Konfluenz der Zellen im Celigo® Imaging Cytometer gemessen. Nach 24 h wurde das GM auf den Zellen gewechselt, um zytotoxische Effekte durch die Transfektions-Substanzen zu reduzieren. Celigo-Messungen erfolgten an insgesamt vier aufeinanderfolgenden Tagen und wurden danach beendet, da die K-Zellen eine Konfluenz von beinahe 100 % erreicht hatten. Nach Ende der Messungen wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt. Hierfür wurden sie einmal mit *phosphate buffered saline* (PBS) aus Tabletten gewaschen und 20 Minuten lang mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach einem weiteren Waschschritt erfolgte die Färbung mit Kristallviolett für erneut 20 Minuten.

Anschließend wurden die Wells mehrfach mit Wasser gespült, um überschüssige Farbe zu entfernen. Die gefärbten Wellplatten wurden mithilfe des Epson V700 Photo Scanners gescannt.

2.2.5.2 Auswertung

Die Ergebnisse der täglichen Konfluenzmessung wurden in Microsoft Excel übertragen. Hier wurden jeweils die Messwerte der drei Wells aus einer Gruppe gemittelt und aus den Mittelwerten Wachstumskurven über vier Tage erstellt. Die Bilder der Kristallviolett Färbung wurden mit ImageJ ausgewertet: Das Programm maß den Prozentsatz der Wellboden-Fläche, welche mit Zellen bedeckt war. Mit diesen Daten wurden Balkendiagramme in Microsoft Excel erstellt.

2.2.5.3 Statistische Auswertung

Die Messwerte aus Celigo® und ImageJ wurden in GraphPad Prism übertragen, um die Unterschiede zwischen den Gruppen auf Signifikanz zu testen. Auch bei diesem Versuch wurde bei n = 3 ein nicht-parametrischer Test zum Gruppenvergleich herangezogen. Da sich alle untersuchten Wells auf einer 24-Well Platte befanden, war ein Platteneffekt nicht zu erwarten. Als nicht-parametrischer Test für unverbundene Stichproben wurde daher der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Auch für diese Auswertung wurde ein Signifikanzniveau von 5 % verwendet.

2.2.6 **Genexpressionsversuch Wildtyp-Zellen und Kontrolltransfektion**

Um einen möglichen Einfluss von Lipofectamine® 2000 auf die *Foxo3*-Expression in den untersuchten Zellen zu überprüfen, wurde der beschriebene Genexpressionsversuch erneut durchgeführt. Eine Versuchsgruppe wurde dabei mit Kontroll-siRNA (Luciferase-siRNA) transfiziert. Auf den Zellen der anderen Gruppe wurde am Tag der Transfektion (Versuchstag 0) lediglich der zum Transfektionsprotokoll gehörige Mediumwechsel mit 500 µl GM durchgeführt. Sie blieben somit Wildtypzellen, die weder von siRNA noch von Transfektionsreagenzien beeinflusst wurden. Der weitere Verlauf des Versuches - Differenzierung ab Tag 1, tägliche Fotodokumentation und RNA-Isolation ab Tag 0 - wurden unverändert beibehalten. Pro Zeitpunkt und Gruppe wurden drei Wells parallel geführt, fotografiert und ihre RNA isoliert. Für jeweils ein Well wurde der komplette Analyseprozess einschließlich qPCR für *GAPDH* und *Foxo3* durchgeführt. Die übrigen RNA-Proben wurden für eventuelle spätere Untersuchungen aufbewahrt. Für die Auswertung mittels $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode (s. 2.2.4.5) wurde die Wildtypgruppe als Kontrollgruppe eingesetzt, auf welche die Messergebnisse der kontroll-transfizierten Zellen normiert wurden. Auf die interferenz-statistische Testung wurde aufgrund fehlender Aussagekraft bei n = 1 verzichtet. Abbildung 6 zeigt den Versuchsaufbau im Überblick.

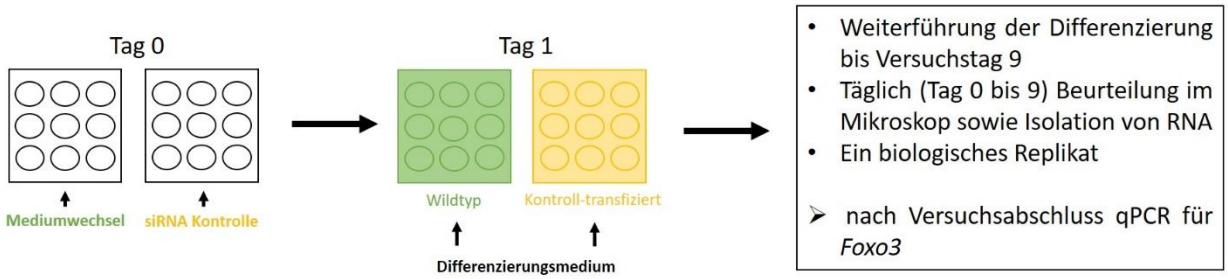


Abbildung 6: Aufbau Wildtyp-Versuch

short interfering Ribonukleinsäure (siRNA), quantitative *real time*-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), *forkhead box O3* (*Foxo3*). Weitere Erläuterung siehe Text.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Zelllinie C2C12

3.1.1 Aussaat- und Konfluenzversuch

Mit dem Aussaat- und Konfluenzversuch sollte das Wachstumsverhalten der C2C12-Zellen ausgehend von verschiedenen Aussaat-Dichten untersucht werden. Zellen wurden daher in ansteigenden Mengen zwischen 20.000 und 240.000 pro Well ausgesät und für drei Tage inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Konfluenz im Lichtmikroskop orientierend beurteilt, abfotografiert und der Schätzwert notiert. Abbildung 7 zeigt exemplarisch die Wells mit 20.000, 60.000, 80.000 und 240.000 Zellen Aussaat zu den genannten Zeitpunkten. Die Dichte der Zellen am Wellgrund stieg im Verlauf der drei Tage an. Während die Zellen aus dem 20.000-Zellen Well auch nach 72 h keine volle Konfluenz erreichten, konfluierten die Zellen aus dem 240.000-Zellen Well bereits bei der ersten Kontrolle nach 24 h. Nach 72 h waren hier zusätzlich abgestorbene, abgekugelte Zellen zu erkennen, welche im Medium aufschwammen. Die Aussaat von 20.000 Zellen pro Well wurde aufgrund des noch großen Vermehrungspotenzials dem Proliferationsassay mit *knockdown* von *Foxo3* zugrunde gelegt. 240.000 Zellen Aussaat wurden für keinen der Folgeversuche verwendet. Die Wells mit 60.000 und 80.000 Zellen zeigten eine moderate Ausbreitung, wobei die Konfluenz im 80.000-Zellen Well etwas schneller voranschritt. Die Zellen beider Wells waren nach 48 h subkonfluent mit ca. 80 % bedeckter Wellfläche. Entsprechend wurden für Versuche, in denen eine Transfektion nach 24 h und die Induktion der Differenzierung nach 48 h erfolgte, Wells mit 60.000 Zellen besät. Sollte bereits nach 24 h mit der Differenzierung begonnen werden, wurden 80.000-Zellen Wells verwendet.

3.1.2 Auswahl des Differenzierungsmediums

In der Literatur werden zur Differenzierung von C2C12-Zellen verschiedene Medien mit geringem Serumanteil verwendet (s. 2.2.1.6). Mit diesem Versuch sollte ein DM ausgewählt werden, welches die Kulturzellen besonders erfolgreich zur Ausbildung von Myotuben anregt. Zu diesem Zweck wurden C2C12-Zellen mit vier verschiedenen DM inkubiert und von Tag vier bis Tag acht der Differenzierung mikroskopisch fotografiert und beurteilt. Wie in Abbildung 8 a) zu erkennen, führte jedes der getesteten Medien zur Ausbildung langgestreckter Myotuben. Diese organisierten sich in Bündeln. Im qualitativen Vergleich entwickelten sich die Fasern unter der Behandlung mit 1 % HS besonders kräftig und weniger dicht. Sie stellten sich daher besonders übersichtlich dar.

Das in GM und DM verwendete DMEM enthält den pH-Indikator Phenolrot. Dieser ist bei pH 7,4 rot und entfärbt sich mit zunehmender Verschiebung ins Saure über orange bis gelb. Proliferierende Zellen produzieren Lactat, und erzeugen so einen Farbumschlag

(Gstraunthaler und Lindl 2013). Differenzierende Zellen hingegen scheiden aus dem Zellzyklus aus, Proliferation und Differenzierung schließen sich gegenseitig aus (Andrés und Walsh 1996). Dementsprechend sollte mit zunehmender Differenzierung die Entfärbung des Mediums langsamer vonstattengehen. Abbildung 8 b) zeigt die Wellplatte, auf welcher der Versuch durchgeführt wurde, kurz vor Mediumwechsel. Je nach angewendetem Serumzusatz entfärbte sich das Medium unterschiedlich stark. Den geringsten Farbumschlag zeigten die Wells mit 1 % HS, entsprechend einer stärkeren Differenzierung bei geringerer Proliferation.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Zellen für die Genexpressionsversuche mit 1 % HS im DM differenziert.

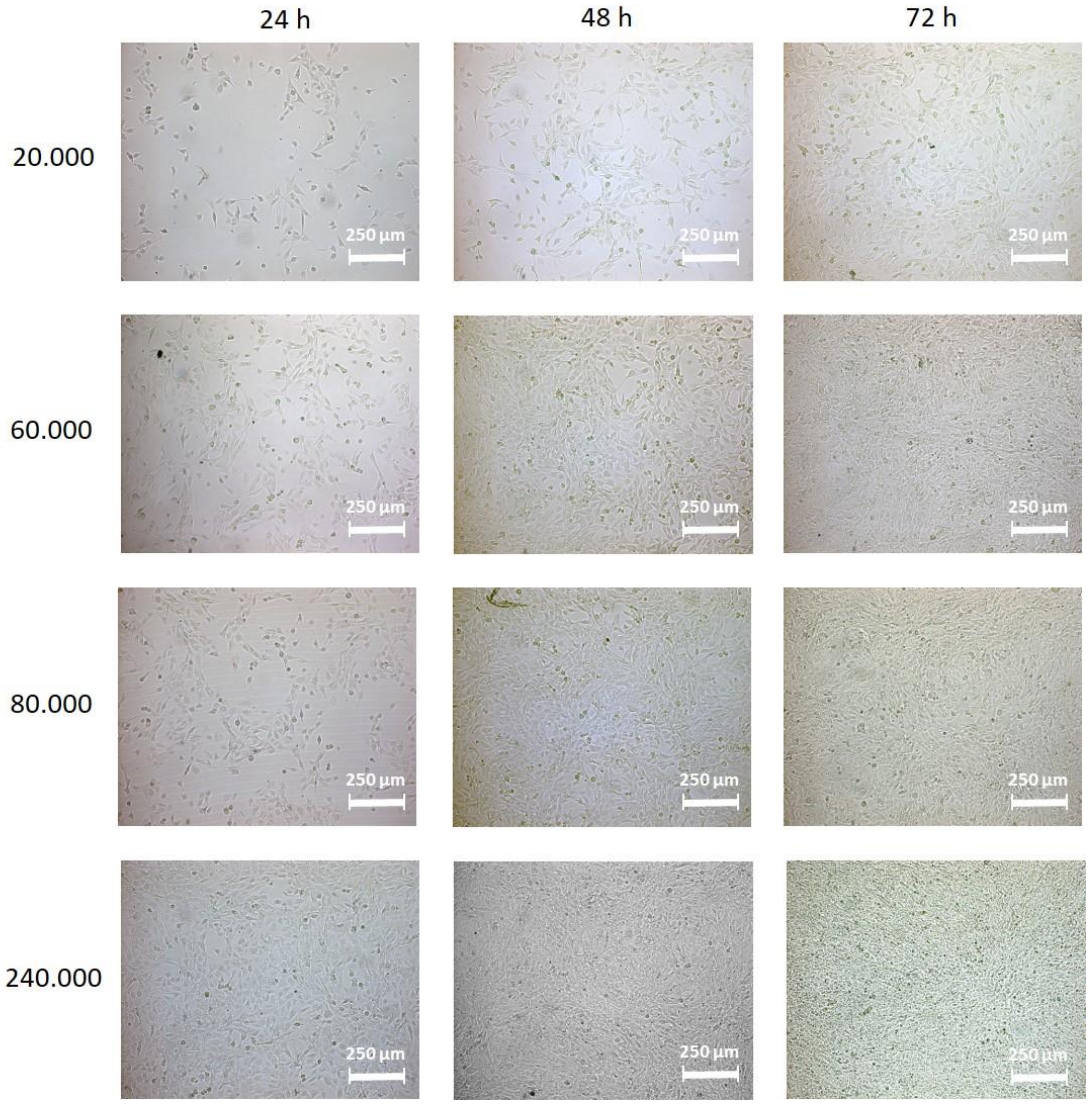


Abbildung 7: Ergebnis Aussaat und Konfluenzversuch

C2C12-Zellen ausgesät mit 20.000, 60.000, 80.000 und 240.000 Zellen pro Well 24, 48 und 72 h nach Aussaat. Lichtmikroskop, Vergrößerung 10x. Es zeigt sich ein Anstieg der Konfluenz im Verlauf des Beobachtungszeitraums in Abhängigkeit von der ursprünglichen Zelldichte.

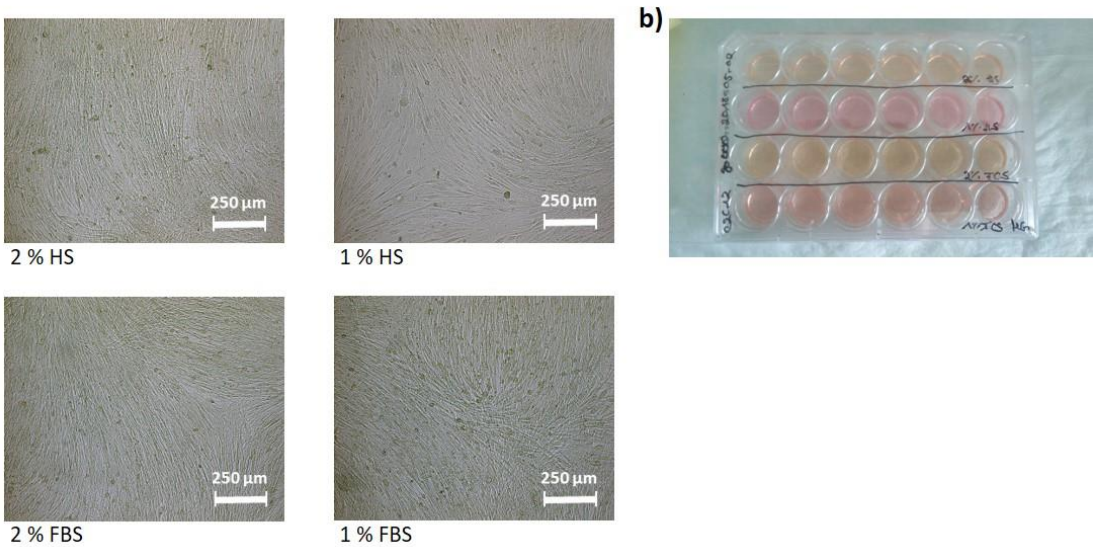


Abbildung 8: Ergebnis Auswahl des Differenzierungsmediums

a) C2C12-Zellen, ausgesät mit 80.000 nach sechs Tagen Differenzierung mit verschiedenen Differenzierungsmedien (DM). Lichtmikroskop, Vergrößerung 10x. Es zeigen sich langgestreckte Myotuben, in Bündeln organisiert. Fasern, die unter Zusatz von 1 % Pferdeserum (HS) im Medium entstanden sind, erscheinen dicker, weniger dicht und leichter zu verfolgen.

b) Übersicht der Wellplatte kurz vor Wechsel des DM. Zu sehen ist jeweils eine Reihe Wells mit dem gleichen DM (von oben nach unten mit 2 % HS, 1 % HS, 2 % fetales Rinderserum (FBS), 1 % FBS). In den Wells, die mit 1 % HS behandelt wurden, ist das Medium am wenigsten entfärbt, entsprechend geringer Stoffwechselaktivität der differenzierten Zellen.

3.1.3 **Färbung differenzierter Zellen**

Um nachzuweisen, dass sich C2C12-Zellen durch DM zu mehrkernigen Myotuben differenzieren lassen, wurden Kernfärbungen angefertigt. Die basischen Farbstoffe Hämalaun und Methylenblau färben Chromatin, aber auch andere saure Zellbestandteile ein (Lang 2013). In Abbildung 9 sind die Färbeergebnisse mit diesen beiden Farbstoffen zu sehen. Eine selektive Anfärbung der Zellkerne war hier nicht erkennbar, entsprechend ließ sich keine Mehrkernigkeit nachweisen. Da DAPI selektiv an DNA bindet (s. 2.2.2.2), wurden anschließend differenzierte Zellen mit DAPI gefärbt. Es wurde angenommen, dass sich so eine eindeutige Darstellung der Zellkerne mit weniger „Hintergrund“ erreichen ließe. Tatsächlich sind im Fluoreszenzbild ausschließlich Zellkerne zu sehen. Das Overlay-Bild zeigt, dass einzelne Myotuben mehrere randständige Kerne enthalten (beides Abbildung 10).

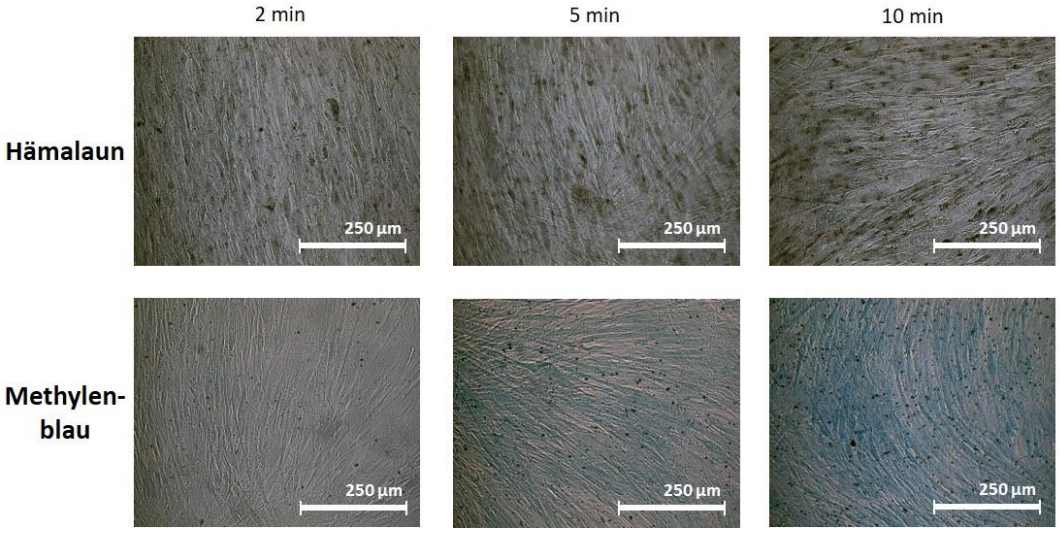


Abbildung 9: Ergebnis Färbung differenzierter Zellen mit Hämalaun und Methylenblau

C2C12-Zellen, ausgesät mit 80.000 Zellen, 6 d Differenzierung mit 2 % Pferdeserum, anschließend Färbung mit Hämalaun oder Methylenblau für 2, 5 oder 10 Minuten. Lichtmikroskop, Vergrößerung 20x. Mit Hämalaun ließ sich eine rot-braune, mit Methylenblau eine blaue Färbung erreichen, allerdings ohne exakte Abgrenzbarkeit der Zellkerne. Somit war kein eindeutiger Nachweis mehrkerniger Myotuben möglich.

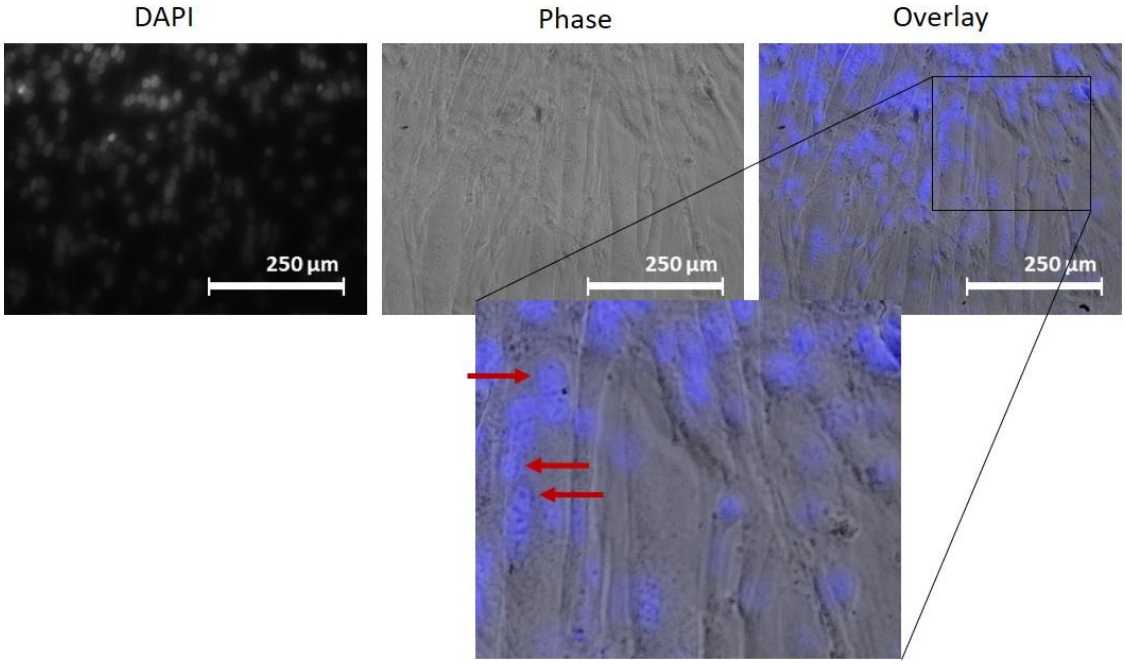


Abbildung 10: Ergebnis Färbung differenzierter Zellen mit DAPI

C2C12-Zellen, ausgesät mit 80.000 Zellen, 6 d Differenzierung mit 1 % Pferdeserum, anschließend Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) für 5 Minuten. Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie (DAPI), sowie Overlay der beiden, Vergrößerung 20x. Das Fluoreszenzbild zeigt die Zellkerne, das Lichtbild die gestreckten Zellen im selben Sichtfeld. Im Overlay lassen sich in einigen Fasern mehrere randständige Kerne erkennen, im vergrößerten Ausschnitt sind einige davon exemplarisch mit Pfeilen markiert.

3.1.4 **Prüfung des Transfektionserfolges**

Für die Transfektion der C2C12-Zellen mittels Lipofectamine® 2000 sollte ein möglichst effizientes Protokoll etabliert werden. Hierzu wurde zunächst das Original-Protokoll des Herstellers (Thermo Fisher Scientific, invitrogen by life technologies 2013) mit einer modifizierten Version dieses Protokolls verglichen. Anschließend wurde das modifizierte Protokoll mit einer reduzierten Anfangs-Zellzahl getestet. Zusätzlich sollte geprüft werden, ob transfizierte Zellen sich differenzieren lassen und ob differenzierte Zellen noch transfizierbar sind. Einen genauen Überblick über die durchgeführten Versuche und die Unterschiede zwischen den Protokollen bietet Tabelle 14 in Kapitel 2.2.3.2.

Abbildung 11 zeigt die Entwicklung des Transfektions-Protokolls: Zu sehen sind jeweils ein Licht- sowie ein Fluoreszenzbild für jedes Protokoll, entstanden 24 und 48 h nach der Transfektion mit pmaxGFP. Tabelle 17 gibt die mittlere Zellzahl pro Bild in zehnfacher Vergrößerung für die verschiedenen Protokolle und Zeitpunkte wieder. Die Verlängerung der Inkubationszeiten (modifiziertes Protokoll) führte zur Transfektion von deutlich mehr Zellen. Im Lichtbild stellten sich Wells mit 60.000 Zellen Aussaat weniger dicht dar, als Wells mit 80.000 Zellen (s. Abb. 12). Das modifizierte Protokoll mit 60.000 Zellen Aussaat wurde den Folgeversuchen mit Transfektion von siRNA zugrunde gelegt. Bereits transfizierte fluoreszierende Zellen veränderten unter Einfluss von DM ihre Form von sternförmig bis rundlich zu schmal und gestreckt, wie in Abbildung 13 a) zu sehen. Zu Ende des Beobachtungszeitraums (8 d nach Transfektion), ließ die Intensität der Fluoreszenz nach, im Lichtbild waren zunehmend abgekugelte Zellen zu sehen. Die Behandlung sechs Tage differenzierter Zellen nach dem optimierten Transfektionsprotokoll führte dagegen nicht zum Nachweis von GFP (Abbildung 13 b)). Die wenigen fluoreszierenden Zellen, die sich hier detektieren ließen, waren der Form nach undifferenziert geblieben.

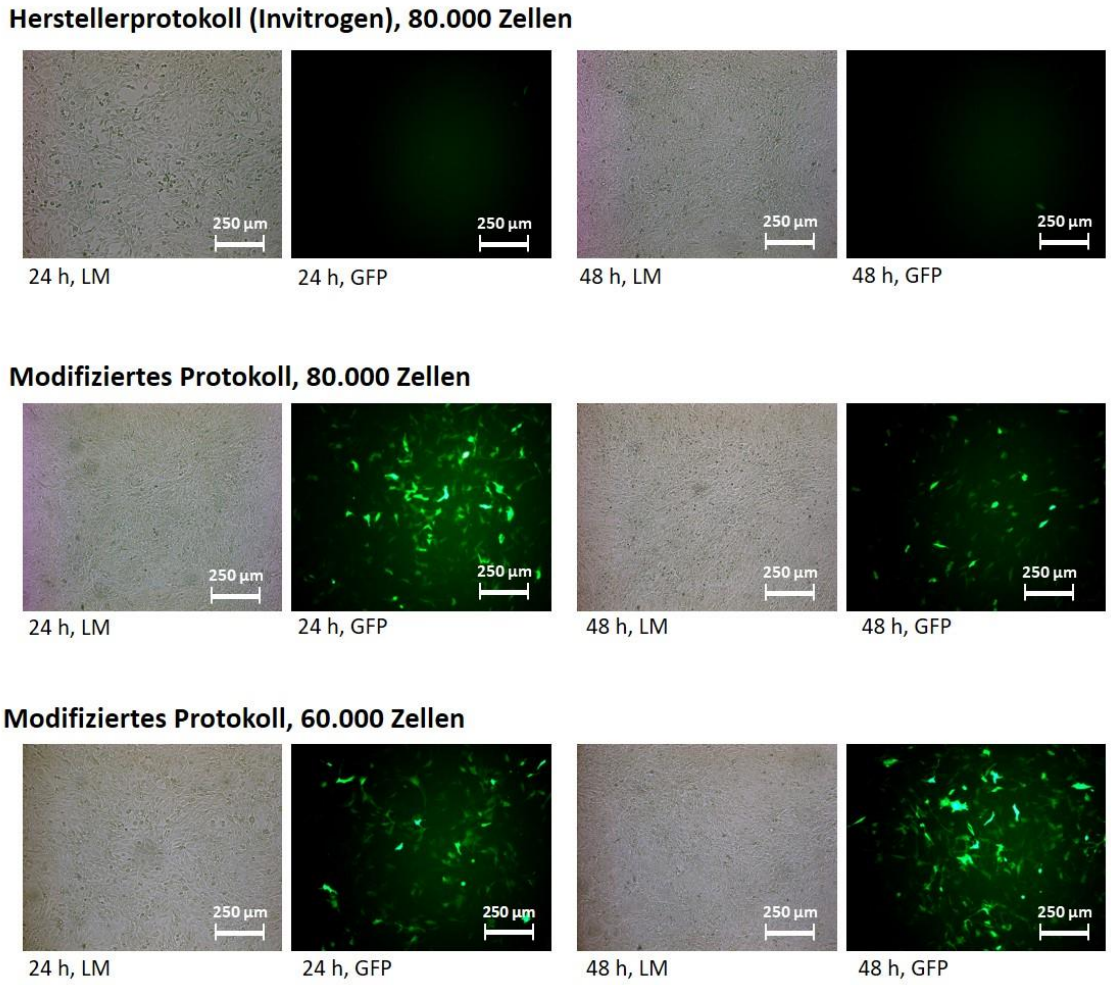


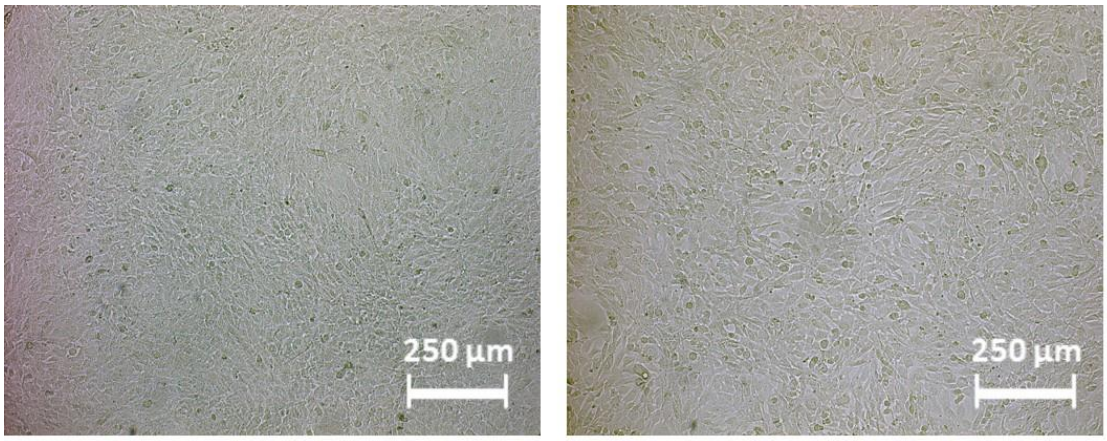
Abbildung 11: Ergebnis Prüfung des Tranfektionserfolges, Etablierung des Protokolls

C2C12-Zellen 24h und 48 h nach Transfektion mit pmaxGFP (*green fluorescent protein*), verschiedene Protokolle und Zellzahlen. Lichtmikroskop (LM) und Fluoreszenz-Mikroskopie (GFP), Vergrößerung 10x. Unter Anwendung des modifizierten Protokolls ist in deutlich mehr Zellen eine Expression von GFP zu erkennen.

Tabelle 17: Mittelwert und Standardabweichung der Zellzahl für verschiedene Transfektionsprotokolle

Herstellerprotokoll (Thermo Fisher Scientific, invitrogen by life technologies 2013)	**24 h**	4,33 ± 1,7
	48 h	5,67 ± 3,77
Modifiziert 80.000 Zellen	**24 h**	153,33 ± 13,02
	48 h	135,67 ± 17,46
Modifiziert 60.000 Zellen	**24 h**	112,33 ± 5,44
	48 h	153,00 ±12,03

Fluoreszenz-Mikroskopie, Vergrößerung 10x. Verschiedene Protokolle, 24 und 48 h nach Transfektion mit pmaxGFP (*green fluorescent protein*).



80.000 Zellen 60.000 Zellen

Abbildung 12: Ergebnis Prüfung des Transfektionserfolges, Zelldichte nach Aussaat

C2C12-Zellen 24 h nach Transfektion mit pmaxGFP (*green fluorescent protein*), modifiziertes Protokoll, 80.000 und 60.000 Zellen Aussaat. Lichtmikroskop, Vergrößerung 10x. Zellen im 60.000-Zellen Well stellen sich weniger dicht dar.

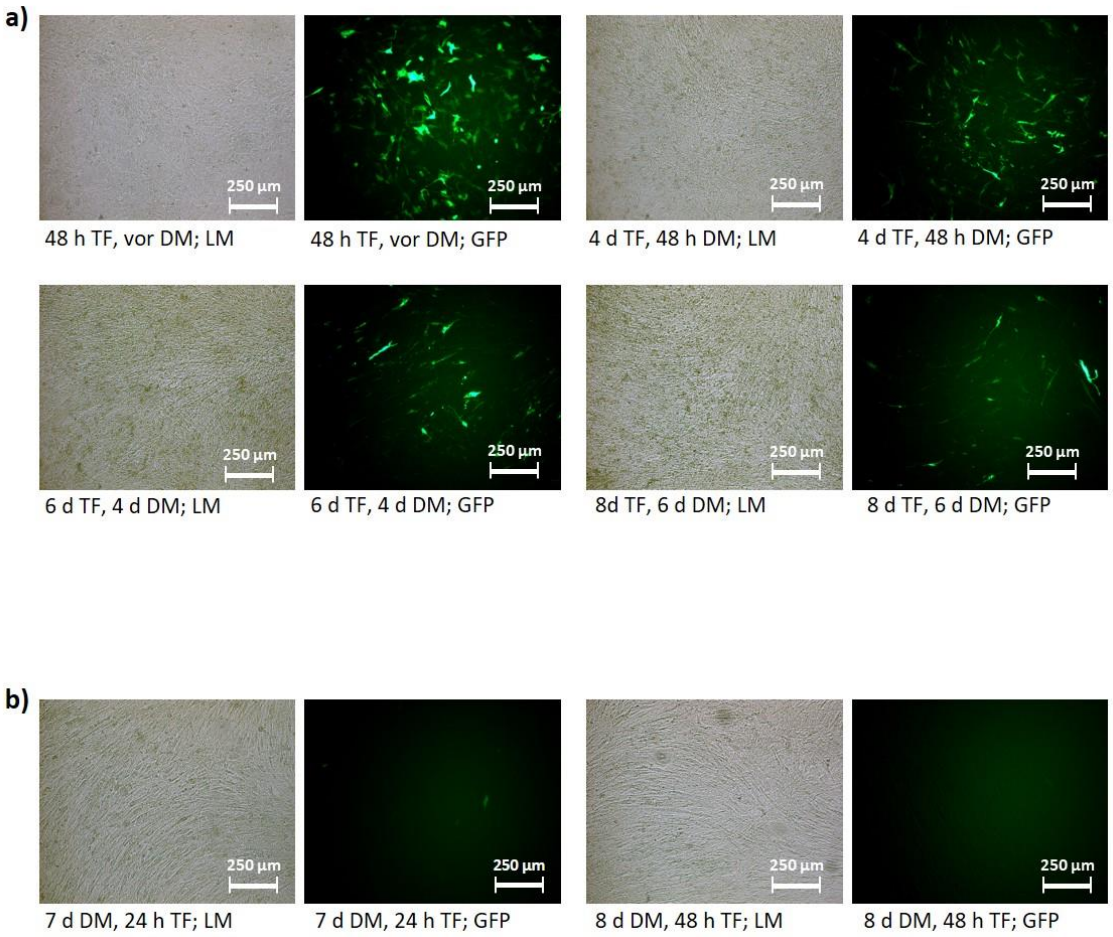


Abbildung 13: Ergebnis Prüfung des Transfektionserfolges, Differenzierung

a) C2C12-Zellen, ausgesät mit 60.000 Zellen nach Transfektion (TF) mit pmaxGFP (*green fluorescent protein*), modifiziertes Protokoll. Nach Aufnahme des ersten Bildpaares wurde durch Wechsel zu Differenzierungsmedium (DM) mit 2 % Pferdeserum (HS) die Differenzierung der Zellen induziert. Lichtmikroskop (LM) und Fluoreszenz-Mikroskopie (GFP), Vergrößerung 10x. Unter Einfluss von DM zeigt sich eine Streckung der initial sternförmigen Zellen. Gegen Ende des Versuchs ist eine Abnahme der Fluoreszenz-Intensität erkennbar, im Lichtbild sind eine Dichtezunahme und zunehmend abgekugelte Zellen zu sehen.
b) C2C12-Zellen, ausgesät mit 80.000 Zellen, 6 d Differenzierung mit 2 % HS, anschließend Transfektion nach modifiziertem Protokoll. Lichtmikroskop (LM) und Fluoreszenz-Mikroskopie (GFP), Vergrößerung 10x. Im Lichtbild sind die Zellen langgestreckt und parallel ausgerichtet, im GFP-Bild lässt sich allenfalls Fluoreszenz nicht-differenzierter Zellen nachweisen, entsprechend eines erfolglosen Transfektionsversuchs für differenzierte Zellen.

3.2 Genexpressionsversuch *Foxo3-knockdown* und Differenzierung

Bei diesem Versuch handelte es sich um den Hauptversuch der vorliegenden Arbeit. Mit ihm sollten mehrere Fragen beantwortet werden: Lässt sich mittels siRNA gegen *Foxo3* ein signifikanter *Foxo3-knockdown* in C2C12-Zellen erzielen, führt dieser *knockdown* zu einer reduzierten Expression von *Atrogin-1* und hat er Auswirkungen auf die Differenzierung?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden C2C12-Zellen mit siRNA gegen *Foxo3* oder Kontroll-siRNA behandelt und für acht Tage differenziert. An insgesamt zehn Versuchstagen (vor Transfektion, vor Induktion der Differenzierung und über acht Tage Differenzierung) wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt und fotografiert sowie RNA daraus isoliert. Nach anschließender Aufarbeitung mittels qPCR wurden für die untersuchten Gene jeweils Behandlungs- (B) und Kontrollgruppe (K) an jedem Versuchstag miteinander verglichen. Zusätzlich wurde durch Normierung auf Tag 0 für jedes Gen und jede Gruppe der Verlauf der jeweiligen Expressionslevel über den Beobachtungszeitraum dargestellt und dieser zwischen den Gruppen wiederum miteinander verglichen. Die Ergebnisse des Versuchs sind im Folgenden nach Teilfragen getrennt aufgeschlüsselt.

3.2.1 ***Knockdown*-Effekt auf *Foxo3***

Die Behandlung von C2C12-Zellen mit siRNA gegen *Foxo3* sollte zu einem *knockdown* von *Foxo3* führen. Abbildung 14 zeigt für Versuchstag 1 bis 9 die relative Expression von *Foxo3* in den *knockdown*-Zellen (B) im Vergleich zu den Zellen im jeweiligen Kontroll-Well (K). 48 h und 72 h nach Transfektion zeigte sich eine statistisch signifikante Senkung der *Foxo3* - Expression um 29,7 % (48 h / Tag 2; $p = 0{,}0039$) und um 10,8 % (72 h / Tag 3; $p = 0{,}0078$), entsprechend eines *knockdown*. An Versuchstag 8 und 9 war *Foxo3* signifikant erhöht, auf das 1,343-fache (Tag 8; $p = 0{,}0273$) und das 1,37-fache (Tag 9; $p = 0{,}0078$) des Vergleichs-Wertes.

Zusätzlich bestand die Frage, wie *Foxo3* sich im Rahmen der Differenzierung verhält und ob der *knockdown* einen Einfluss auf dieses Verhalten hat. Hierzu wurden die Effektwerte für die Versuchstage 1 bis 9 nach ΔΔCt-Methode unter Normierung auf Tag 0 errechnet (s. 2.2.4.5). In Abbildung 15 sind die so ermittelten zeitlichen Verläufe der Genexpression zu sehen, links für die Kontrollgruppe, rechts für die *knockdown*-Zellen. In beiden Gruppen zeigte sich ein Anstieg der *Foxo3*-Expression, der ab Tag 3 Signifikanz erreichte. Tabelle 18 stellt die mittlere relative *Foxo3*-Expression an Versuchstag 1 bis 9 für beide Gruppen gegenüber. Der Verlauf der *Foxo3*-Expression stellte sich in beiden Gruppen ähnlich dar. Tendenziell war die relative Expression (und damit der Anstieg im Vergleich zu Tag 0) in den ersten Versuchstagen (Tag 1 bis 3) in der Kontrollgruppe höher mit einem signifikanten Unterschied an Tag 2. Zu Ende des Versuchs (Tag 8 und 9) war der Anstieg in der Behandlungsgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Die Darstellung in Balkendiagrammen und die zugrunde liegende Berechnung (s. 2.2.4.5 bzw. 2.2.4.6) erfolgte für alle weiteren Gene in analoger Weise wie für *Foxo3*.

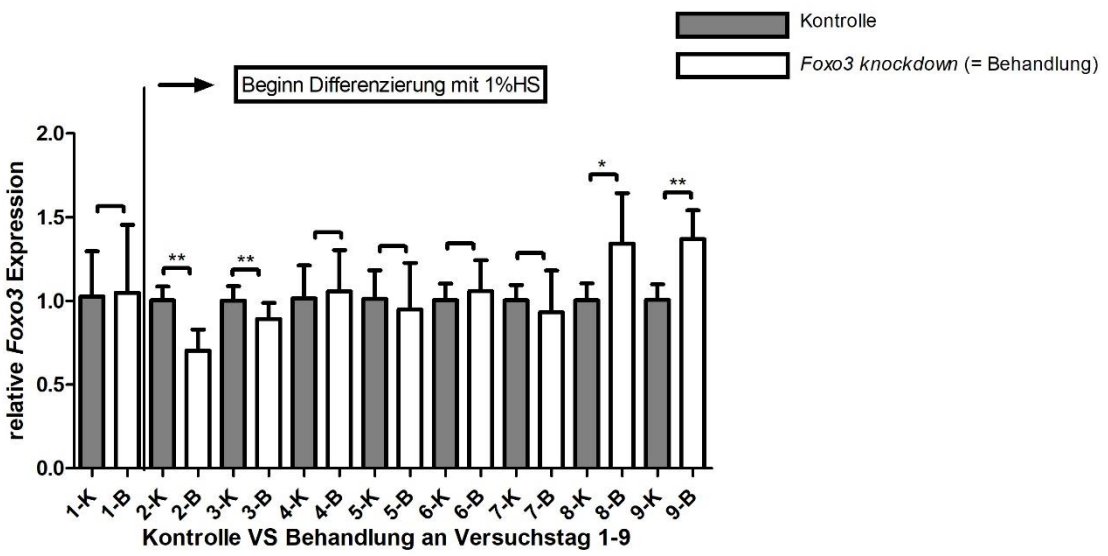


Abbildung 14: Ergebnis *knockdown* von *Foxo3*, Gruppenvergleich

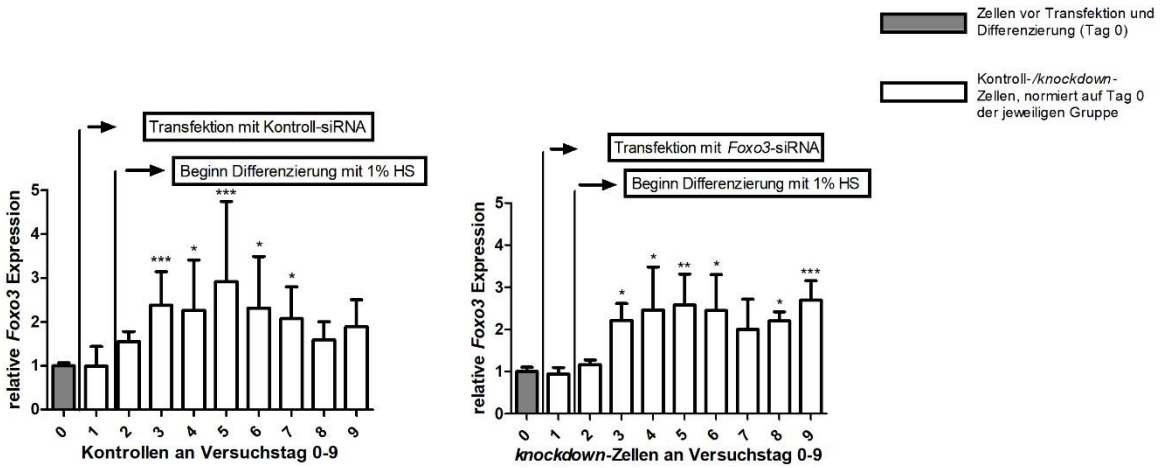


Abbildung 15: Ergebnis *knockdown* von *Foxo3*, zeitlicher Verlauf in jeder Gruppe

Beide Abbildungen: *forkhead box O3* (*Foxo3*), Kontrolle (K), Behandlung (B), Pferdeserum (HS), *short interfering* Ribonukleinsäure (siRNA).

Tabelle 18: Relative *forkhead box O3* (*Foxo3*)-Expression

Tag	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Kontrolle	0,994	1,552	2,384	2,263	2,914	2,311	2,073	1,59	1,89
Behandlung	0,944	1,163	2,218	2,466	2,586	2,449	2,00	2,203	2,696
Signifikanz	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	**	**

Mittelwerte normiert auf Tag 0, Kontrollgruppe und Behandlungsgruppe im Vergleich; signifikante Unterschiede: $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, ns = nicht signifikant.

3.2.2 ***Knockdown*-Effekt auf *Atrogin*-1**

Atrogin-1 ist ein direktes Zielgen von FOXO3 (s. 1.2). Dementsprechend sollte ein *knockdown* von *Foxo3* in C2C12-Zellen auch die Expression von *Atrogin-1* reduzieren. Tatsächlich zeigte *Atrogin-1* 48 h nach Transfektion eine signifikante Verminderung um 15,6 % im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,0391$). An Versuchstag 5 bis 8 war die Expression relativ erhöht, an Tag 8 erreichte die Erhöhung Signifikanz mit einem Anstieg auf das 1,364-fache des Vergleichswertes ($p = 0,0078$; s. Abb. 16).

Da *Foxo3* im Verlauf der Differenzierung anstieg, stellte sich die Frage, ob *Atrogin-1* sich ähnlich verhalten würde. Nach einem initialen Abfall 24 h nach Transfektion stieg die Expression von *Atrogin-1* in beiden Gruppen, wie in Abbildung 17 ersichtlich. Die Erhöhung wurde an Tag 3 (K) bzw. Tag 4 (B) signifikant. Tabelle 19 vergleicht die mittlere relative Expression von *Atrogin-1* an Versuchstag 1 bis 9 für beide Gruppen. Für die Behandlungsgruppe ergab sich durchweg eine höhere relative Expression, entsprechend einem stärkeren Anstieg der Expression im Verlauf der Differenzierung. Signifikante Unterschiede zeigten sich an Tag 5 und 8. Der initiale Abfall der Expression fiel in der Behandlungsgruppe milder aus als in der Kontrollgruppe.

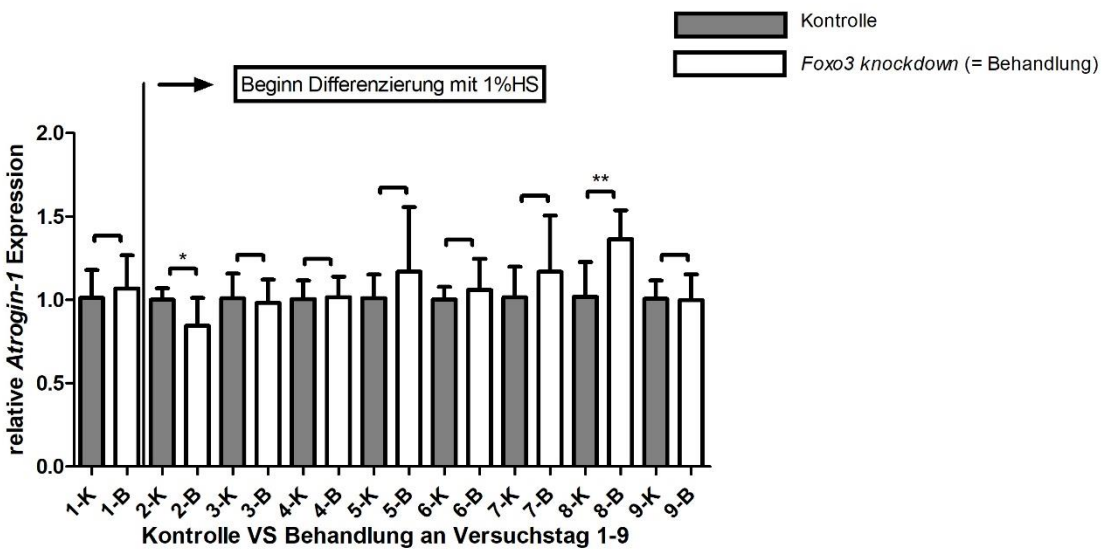


Abbildung 16: Effekt des *Foxo3-knockdown* auf *Atrogin-1,* Gruppenvergleich

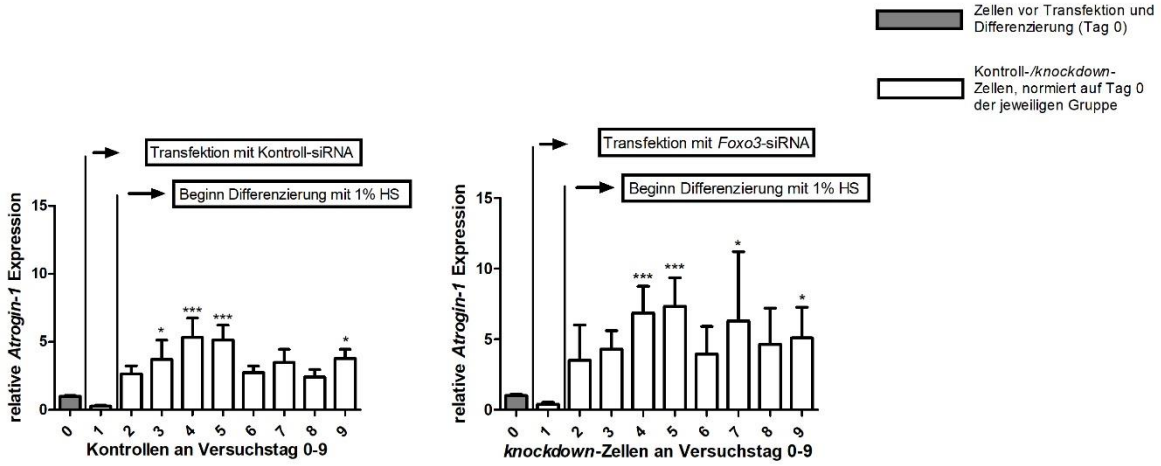


Abbildung 17: Effekt des *Foxo3-knockdown* auf *Atrogin-1*, zeitlicher Verlauf in jeder Gruppe

Beide Abbildungen: *forkhead box O3* (*Foxo3*), Kontrolle (K), Behandlung (B), Pferdeserum (HS), *short interfering* Ribonukleinsäure (siRNA).

Tabelle 19: Relative *Atrogin-1* Expression

Tag	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Kontrolle	0,273	2,654	3,708	5,337	5,149	2,739	3,477	2,424	3,776
Behandlung	0,389	3,507	4,310	6,872	7,344	3,967	6,307	4,652	5,100
Signifikanz	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns

Mittelwerte normiert auf Tag 0, Kontrollgruppe und Behandlungsgruppe im Vergleich; signifikante Unterschiede: $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, ns = nicht signifikant.

3.2.3 Einfluss des *knockdown* auf die Differenzierung

Um den Einfluss des *Foxo3-knockdown* auf die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Myotuben zu untersuchen, wurden zunächst LM-Bilder der Zellen aus beiden Gruppen qualitativ verglichen. Zusätzlich wurde die Expression der Differenzierungsmarker *Myog* und *MyH4* (s. 1.5.1) mittels qPCR analysiert.

3.2.3.1 Zellphänotyp

Abbildung 18 zeigt exemplarisch Zellen aus den Gruppen K und B an den Versuchstagen 1, 3, 6 und 9. Qualitativ ließ sich kein Unterschied in der Entwicklungsgeschwindigkeit oder der phänotypischen Ausprägung der Myotuben erkennen.

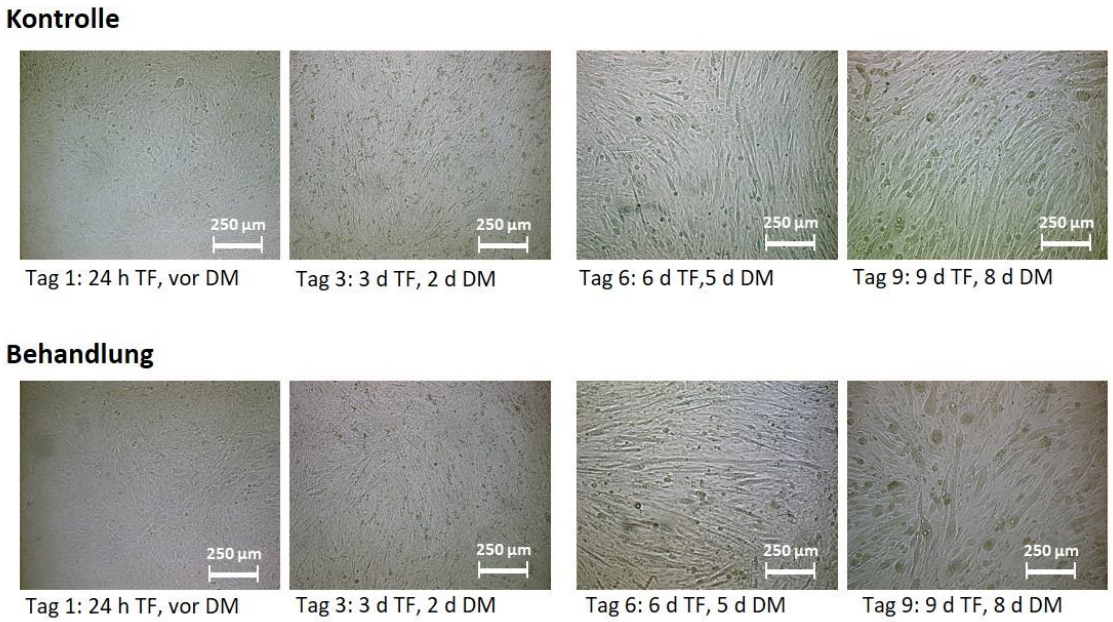


Abbildung 18: Effekt des *Foxo3-knockdown* auf den Zellphänotyp in der Differenzierung

C2C12-Zellen, ausgesät mit 60.000 Zellen, nach Transfektion (TF) mit *short interfering* Ribonukleinsäure (siRNA) gegen *Luciferase* (Kontrolle) oder siRNA gegen *forkhead box O3* (*Foxo3*) (Behandlung), ausgewählte Zeitpunkte des Versuchs. Nach Aufnahme des ersten Bildpaares wurde durch Wechsel zu Differenzierungsmedium (DM) mit 1 % Pferdeserum die Differenzierung der Zellen induziert. Lichtmikroskop, Vergrößerung 10x. Es zeigt sich die Ausbildung von Fasern aus initial rundlichen konfluenten Zellen ab Tag 3, welche zunehmend kräftiger werden. Zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe sind qualitativ keine Unterschiede im entstehenden Phänotyp oder in dessen Entwicklungsgeschwindigkeit zu erkennen.

3.2.3.2 Expression von Differenzierungsmarkern

Ergänzend zur phänotypischen Beurteilung der Zellen wurden qPCRs für *Myog* und *MyH4* durchgeführt.

Myog

Nach einer signifikanten Erhöhung auf das 1,162-fache (p = 0,0078) der Kontrolle an Tag 1 zeigte *Myog* 48 h nach Transfektion einen signifikanten Abfall um 19,9 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (p = 0,0039). An den folgenden Versuchstagen präsentierte sich *Myog* mit schwankenden Expressionsleveln in der Behandlungsgruppe. Signifikante Abweichungen von der Kontrolle bestanden mit einer relativen Expression von 1,253 an Tag 3 (p = 0,0078), von 0,779 an Tag 5 (p = 0,0078) und von 1,291 an Tag 8 (p = 0,0195; alles Abbildung 19).

Im zeitlichen Verlauf zeigten beide Gruppen nach einem initialen Abfall der *Myog*-Expression an Tag 1 eine zügige Erhöhung auf ein 20- bis 40-faches des Ausgangswertes ab Tag 3. Die Erhöhung wurde an Tag 4 (K) bzw. Tag 3 (B) signifikant, wie in Abbildung 20 zu sehen. Tabelle 20 vergleicht die mittlere relative *Myog*-Expression in beiden Gruppen an Versuchstag 1 bis 9. Ab Beginn des Expressionsanstiegs an Tag 2 ergaben sich in der

Kontrollgruppe höhere relative Expressionswerte als in der Behandlungsgruppe, entsprechend eines stärkeren Anstiegs der *Myog*-Expression gemessen am Ausgangswert. Der initiale Abfall der Expression an Tag 1 fiel auch hier in der Behandlungsgruppe geringfügig milder aus als in der Kontrollgruppe. Statistische Signifikanz erreichten die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nicht.

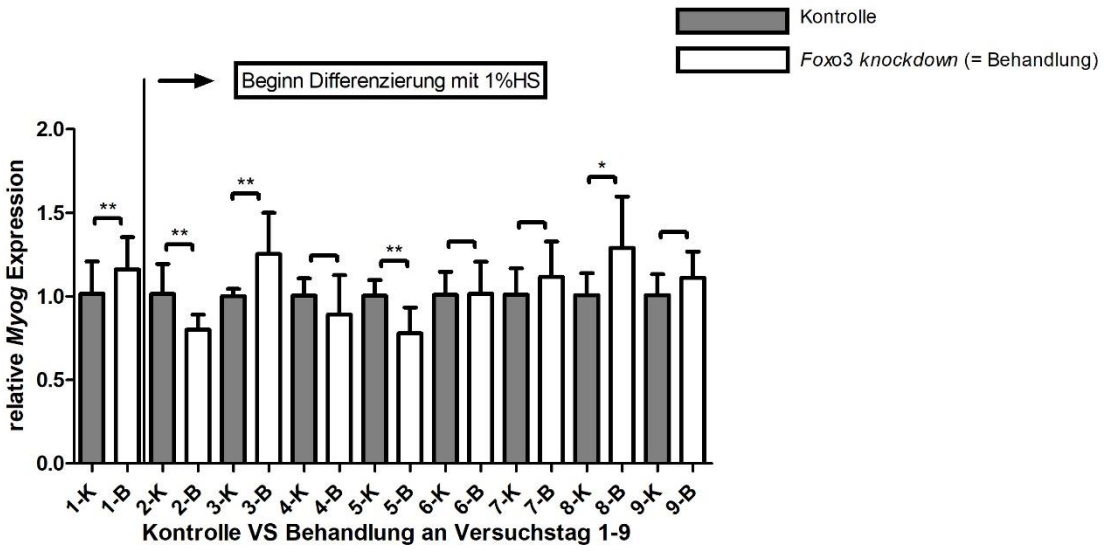


Abbildung 19: Effekt des *Foxo3-knockdown* auf *Myog*, Gruppenvergleich

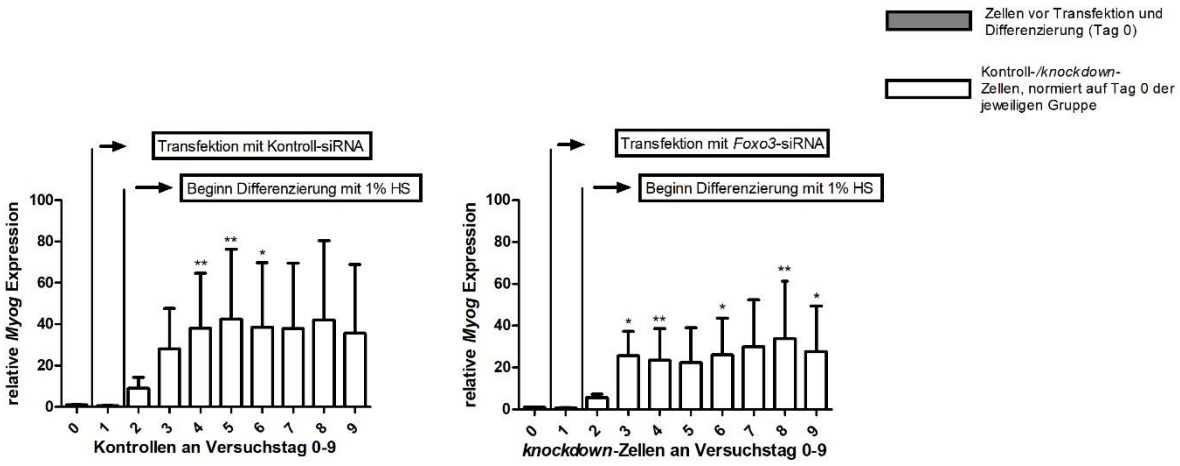


Abbildung 20: Effekt des *Foxo3-knockdown* auf *Myog*, zeitlicher Verlauf in jeder Gruppe

Beide Abbildungen: *forkhead box O3* (*Foxo3*), Kontrolle (K), Behandlung (B), Pferdeserum (HS), *short interfering* Ribonukleinsäure (siRNA).

Tabelle 20: Relative *Myog*-Expression

Tag	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Kontrolle	0,580	8,927	28,1	38,041	42,502	38,648	37,920	42,004	35,626
Behandlung	0,61	5,658	25,579	23,361	22,311	26,07	29,895	33,778	27,615
Signifikanz	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Mittelwerte normiert auf Tag 0, Kontrollgruppe und Behandlungsgruppe im Vergleich; signifikante Unterschiede: $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, ns = nicht signifikant.

MyH4

MyH4 zeigte bereits 24 h nach Transfektion eine signifikante Reduktion um 46,9 % des Vergleichswertes ($p = 0,0039$), zu sehen in Abbildung 21. An Tag 2, 48 h nach Transfektion, war die Expression dagegen deutlich erhöht auf das 1,535-fache des Vergleichswertes, auch wenn die Erhöhung keine Signifikanz erreichte. An den folgenden Versuchstagen blieb die relative *MyH4*-Expression in der Behandlungsgruppe leicht über der Expression in der Kontrollgruppe.

Abbildung 22 zeigt den zeitlichen Verlauf der *MyH4*-Expression in beiden Gruppen: Nach einem initialen Abfall der Expression an Tag 1 und 2 erfolgte ein kontinuierlicher Level-Anstieg sowohl in *knockdown*- als auch in Kontrollzellen, der ab Tag 8 Signifikanz erreichte. Die Behandlungsgruppe zeigte an Tag 4 nochmals einen Abfall der relativen Expression unter den Ausgangswert. In Tabelle 21 sind die Werte der relativen Expression im Verlauf noch einmal gegenübergestellt. In der Kontrollgruppe ergaben sich wie schon für *Myog* höhere Werte der relativen Expression, also ein stärkerer Anstieg der Expression im Vergleich zum Ausgangswert als in der Behandlungsgruppe. Der initiale Abfall der Expression war in der Kontrollgruppe geringer. Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich an Tag 1 und 5.

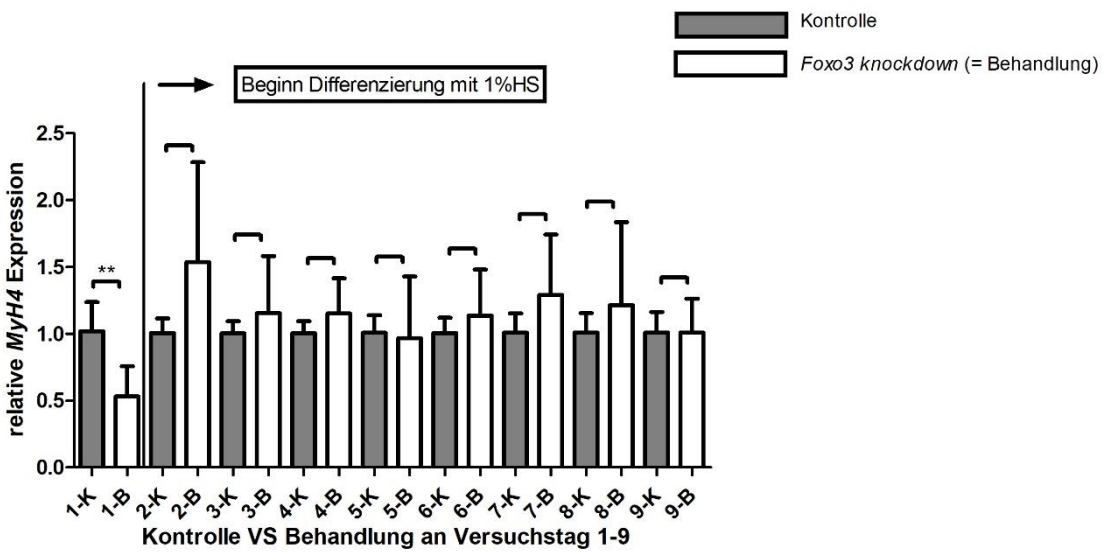


Abbildung 21: Effekt des *Foxo3-knockdown* auf *MyH4,* Gruppenvergleich

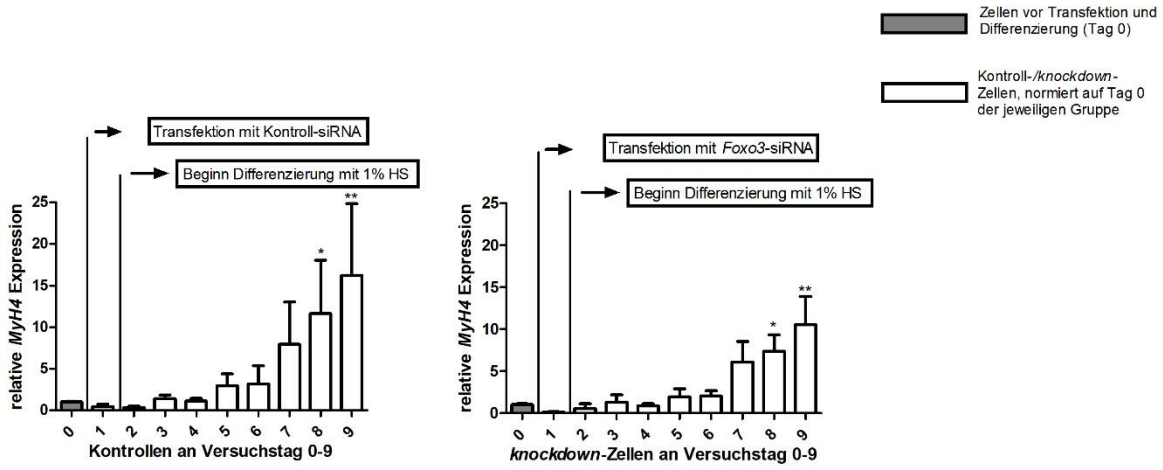


Abbildung 22: Effekt des *Foxo3-knockdown* auf *MyH4*, zeitlicher Verlauf in jeder Gruppe

Beide Abbildungen: *forkhead box O3* (*Foxo3*), Kontrolle (K), Behandlung (B), Pferdeserum (HS), *short interfering* Ribonukleinsäure (siRNA), *myosin heavy chain 4* (*MyH4*).

Tabelle 21: Relative *myosin heavy chain 4* (*MyH4*)-Expression

Tag	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Kontrolle	0,412	0,344	1,384	1,108	2,978	3,189	7,928	11,641	16,224
Behandlung	0,127	0,0539	1,284	0,888	1,936	2,037	6,053	7,363	10,549
Signifikanz	**	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns

Mittelwerte normiert auf Tag 0, Kontrollgruppe und Behandlungsgruppe im Vergleich; signifikante Unterschiede: $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, ns = nicht signifikant.

3.3 Proliferationsassay *Foxo3-knockdown*

Um den Effekt eines *knockdown* von *Foxo3* auf die Proliferationsfähigkeit von C2C12-Zellen zu testen, wurden Zellen mit geringer Konfluenz mit siRNA gegen *Foxo3* oder gegen *Luciferase* transfiziert. Unmittelbar nach der Transfektion sowie an den darauffolgenden drei Tagen wurde die Konfluenz der Zellen im 24-Well mit dem Celigo® Imaging Cytometer gemessen. Abbildung 23 a) zeigt Wachstumskurven für die Konfluenz über die vier Messtage. Ausgehend von einem gemeinsamen Startpunkt an Tag 1, direkt nach Transfektion (mittlere Konfluenz für K 10,277 %, für B 8,887 % der Wellfläche), stieg die Konfluenz in der Kontrollgruppe stärker an. Die größte Differenz bestand an Messtag 3, 48 h nach Transfektion (mittlere Konfluenz für K 76,067 %, für B 50,133 %).

Nach Ende der Celigo-Messungen wurden die Wells mit Kristallviolett gefärbt und die Endkonfluenz (Tag 4) zusätzlich mit ImageJ gemessen. Abbildung 23 b) zeigt die gefärbten Wells sowie das Messergebnis aus ImageJ als Balkendiagramm. Die Zellen in der Behandlungsgruppe erreichten auch makroskopisch sichtbar eine geringere Konfluenz. Beide Messverfahren bestätigten eine geringere Konfluenz für die *knockdown*-Zellen auch an Tag 4 (Celigo®: K 90,207 %, B 83,747 %; Kristallviolett und ImageJ: K 97,774 %, B 73,75 %). Die Unterschiede zwischen den Gruppen erreichten an keinem Versuchstag statistische Signifikanz.

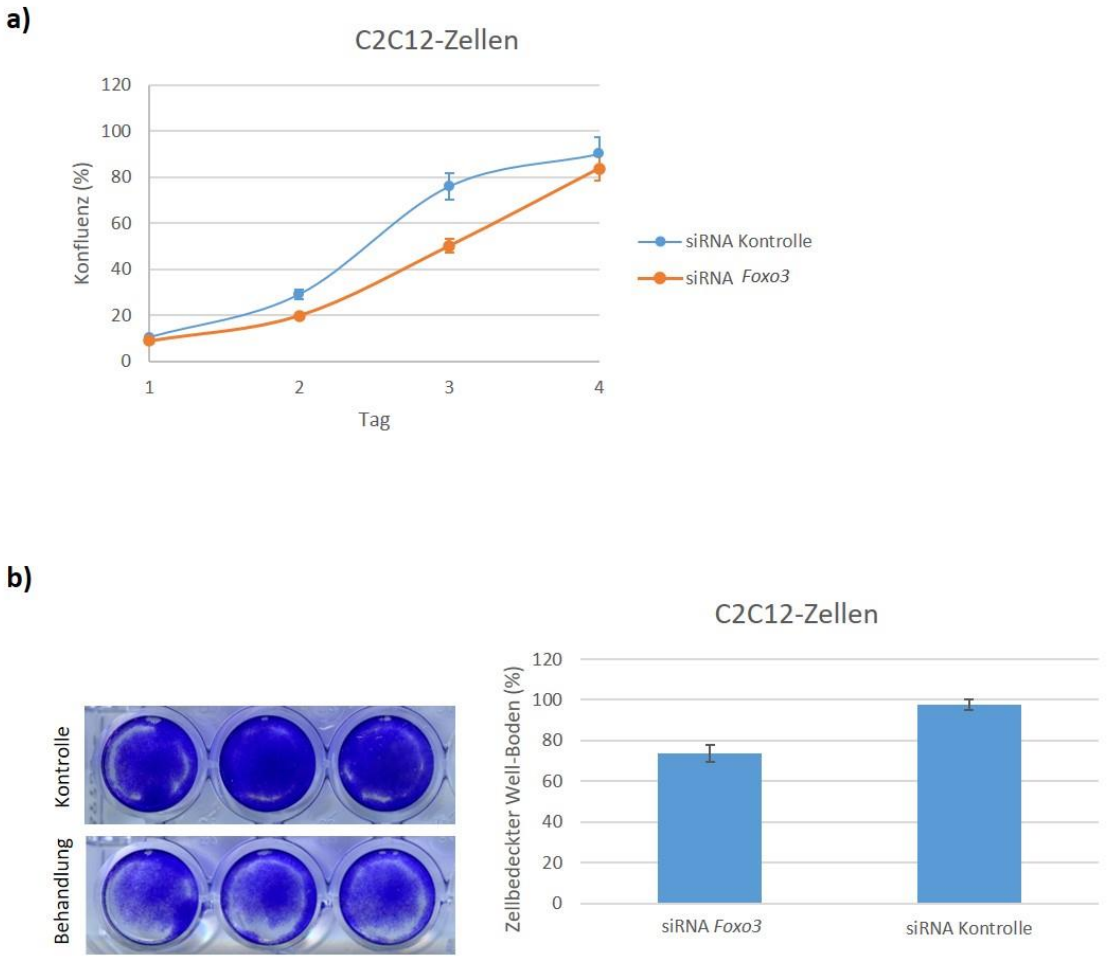


Abbildung 23: Ergebnis Proliferationsassay

C2C12-Zellen, ausgesät mit 20.000 Zellen, transfiziert mit *short interfering* Ribonukleinsäure (siRNA) gegen *Luciferase* (siRNA Kontrolle/Kontrolle) oder siRNA gegen *forkhead box O3* (*Foxo3*) (siRNA *Foxo3*/Behandlung).
a) Wachstumskurven aus der Konfluenzmessung der Wells über vier Tage mit Standardabweichung. In den Wells der Kontrollgruppe zeigt sich ein stärkerer Anstieg der Konfluenz, entsprechend einer höheren Proliferationsrate. Der größte Unterschied zwischen den Gruppen zeigt sich an Tag 3, 48 h nach Transfektion. Konfluenz in %, Standardabweichung an Tag 1: siRNA *Foxo3* 0,973 %, siRNA Kontrolle 0,58 % und an Tag 2: siRNA *Foxo3* 0,864 %, siRNA Kontrolle 2,153 % (graphisch nicht darstellbar).
b) An Tag 4 wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und mit ImageJ quantifiziert. In den Wells der Kontrollgruppe zeigt sich ein größerer Anteil von zellbedecktem Wellboden an der gesamten Wellboden-Fläche (in %) - entsprechend höherer Konfluenz - bestätigt durch die Quanitfizierung mittels ImageJ (mit Standardabweichung).

3.4 Genexpressionsversuch Wildtyp-Zellen und Kontrolltransfektion

Mit diesem zweiten Genexpressionsversuch sollte ein eigener Effekt des Transfektionsreagenz Lipofectamine® 2000 auf die Expression von *Foxo3* in C2C12-Zellen ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurde das Protokoll des Hauptversuches erneut durchgeführt, wobei nur eine Versuchsgruppe mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurde. In

den Wells der Vergleichsgruppe wurde zum Transfektionszeitpunkt lediglich ein Mediumwechsel durchgeführt (Wildtyp-Zellen). Orientierend wurde für je ein Well pro Zeitpunkt und Gruppe die Expression von *Foxo3* mittels qPCR bestimmt, zusätzlich erfolgte eine tägliche mikroskopische Fotodokumentation der Zellen. Interferenzstatistische Analysen wurden für diesen Versuch nicht durchgeführt.

Auch in diesem Versuch waren lichtmikroskopisch keine Unterschiede im entstehenden Zellphänotyp oder der Entwicklungsgeschwindigkeit dieses Phänotyps zwischen den beiden Gruppen zu erkennen (Daten nicht aufgeführt).

In Abbildung 24 ist die Expression von *Foxo3* in den kontroll-transfizierten Zellen (K) relativ zur Expression in den Wildtyp-Zellen (WT) an den verschiedenen Versuchstagen als Balkendiagramm dargestellt. Die Höhe der Balken ergibt sich dabei aus dem arithmetischen Mittel des Effektes ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$) der drei technischen Replikate der gemessenen biologischen Probe. Die Expression in K war teils höher, teils geringer als in WT mit einer deutlichen Reduktion um 59,3 % an Tag 3.

Im zeitlichen Verlauf der Differenzierung zeigt Abbildung 25 für das gemessene Replikat einen Anstieg der Expression von *Foxo3* in beiden Gruppen, so wie im Hauptversuch. Tabelle 22 enthält die jeweilige relative *Foxo3*-Expression für jeden Tag und jede Gruppe, normiert auf Tag 0. Der Verlauf der *Foxo3*-Expression stellte sich bis einschließlich Tag 5 in beiden Gruppen ähnlich dar. An den letzten vier Versuchstagen ist die relative Expression in den kontroll-transfizierten Zellen höher als in den Wildtyp-Zellen.

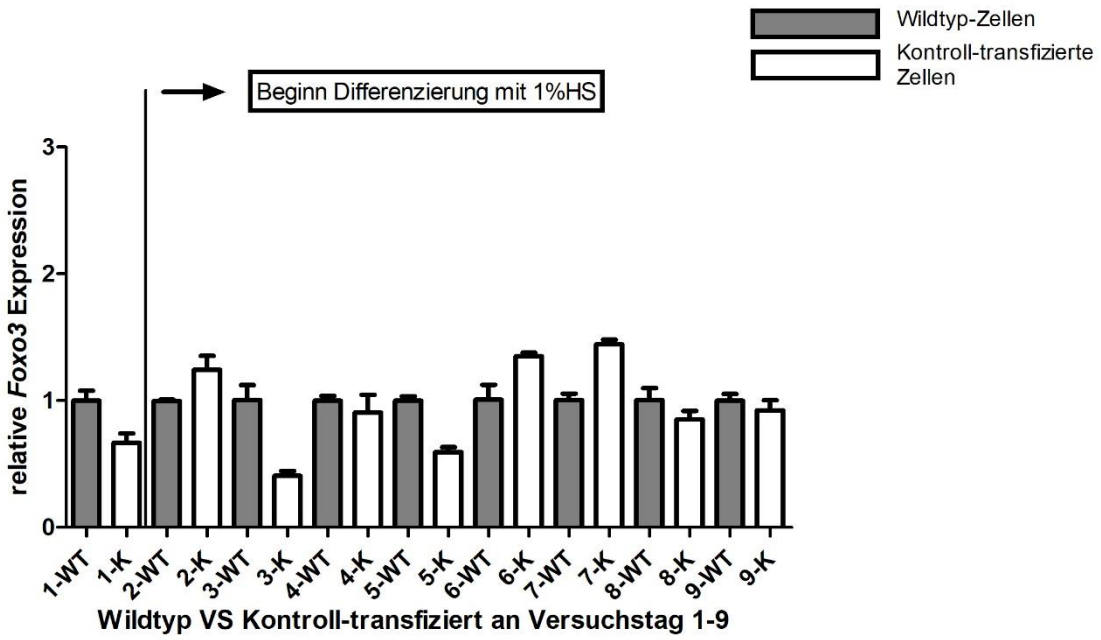


Abbildung 24: *Foxo3*-Expression in Wildtyp- und kontroll-transfizierten Zellen, Gruppenvergleich

forkhead box O3 (*Foxo3*), Wildtyp Zellen (WT), kontroll-transfizierte Zellen (K), Pferdeserum (HS).

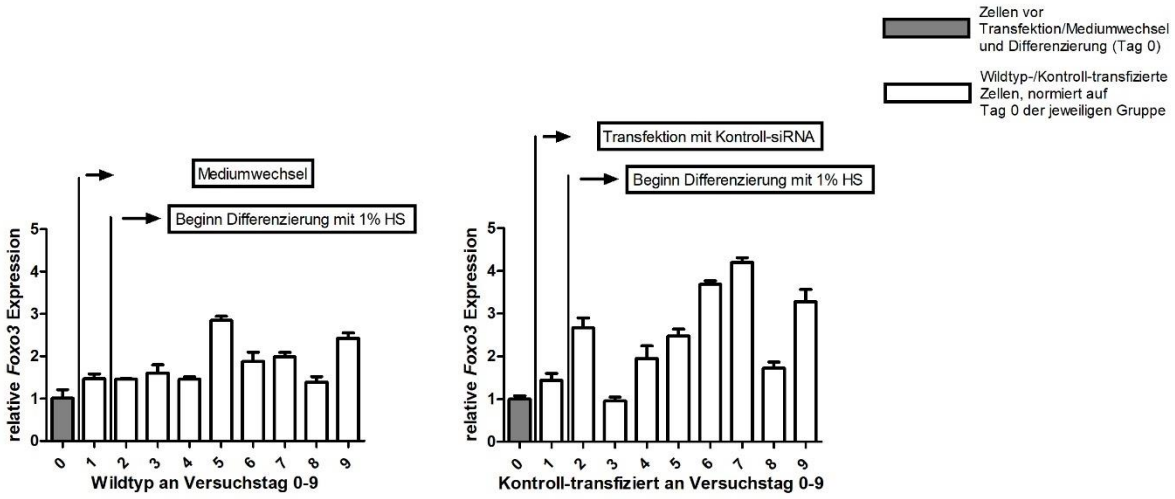


Abbildung 25: *Foxo3*-Expression in Wildtyp- und kontroll-transfizierten Zellen, zeitlicher Verlauf in jeder Gruppe
forkhead box O3 (*Foxo3*), Pferdeserum (HS), *short interfering* Ribonukleinsäure (siRNA).

Tabelle 22: Relative *forkhead box O3* (*Foxo3*)-Expression, Wildtypversuch

Tag	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Wildtyp	1,473	1,46	1,606	1,461	2,848	1,879	1,994	1,389	2,427
Kontroll-transfiziert	1,437	2,666	0,954	1,943	2,478	3,682	4,197	1,727	3,278

Mittelwerte normiert auf Tag 0, Wildtyp- und kontroll-transfizierte Zellen im Vergleich. Verzicht auf Interferenzstatistik.

4 Diskussion

4.1 Etablierung der Zelllinie C2C12

Die vorliegende Arbeit ist in unserer Arbeitsgruppe die erste im Rahmen des Sarkopenie-Projektes und unter Verwendung von C2C12-Zellen. Entsprechend dienten die ersten Versuche dieser Arbeit der Etablierung von grundlegenden Arbeitsmethoden für die Zelllinie in unserem Labor. Die Ergebnisse von zwei dieser Etablierungsversuche sollen hier kurz diskutiert werden: die Auswahl des Differenzierungsmediums und die GFP-Versuche zur Bestimmung des Transfektionserfolges.

4.1.1 Auswahl des Differenzierungsmediums

Für die Genexpressionsversuche sollten die C2C12-Zellen zu Myotuben differenziert werden. Die theoretischen Grundlagen zur Zelllinie und deren Differenzierungspotential sind in den Kapiteln 1.5.2 und 2.2.1.6 beschrieben. Die genaue Zusammensetzung des GM und der verschiedenen DM ist im Kapitel 2.1.3 zu finden. Da in der Literatur verschiedene DM mit unterschiedlichen Serumzusätzen zum Einsatz kommen (s. 2.2.1.6), wurden in diesem Versuch verschiedene Medien miteinander vergleichen. Die qualitativ besten Ergebnisse ließen sich dabei mit dem DM aus DMEM mit 1 % HS erzielen und es wurde entsprechend für die Hauptversuche zur Differenzierung verwendet. Erklären lässt sich dieses Ergebnis durch den Gehalt an Wachstumsfaktoren im Serum:

Alle Seren enthalten neben Albumin (und diversen weiteren Molekülen) auch Wachstumsfaktoren, die für das Wachstum der Zellen essentiell sind (Johnson 2012). Diese Faktoren kontrollieren die Proliferation und Differenzierung von kultivierten Muskelzellen. Einige Faktoren mit besonderer Bedeutung sind *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor β* (TGFβ) und die *insulin like growth factors 1* und 2 (IGF-1 und IGF-2). FGF wirkt mitogen und hemmt gleichzeitig die Differenzierung, TGFβ wirkt dosisabhängig hemmend auf die Einleitung von Differenzierung (Florini und Magri 1989). IGF 1 und 2 wirken biphasisch sowohl mitogen als auch als Induktoren von Differenzierung: In niedrigen Konzentrationen stimulieren sie die Differenzierung der Myoblasten, bei steigender Konzentration fällt diese Stimulation wieder ab (Florini et al. 1986).

In Medium mit geringem Serumanteil (und somit geringerem Anteil an Wachstumsfaktoren) ist der repressive Einfluss von FGF und TGFβ auf die Differenzierung geringer. Zusätzlich können die IGFs in niedriger Konzentration ihre positive Wirkung auf die Differenzierung entfalten. Adultes HS enthält wie auch andere neonatale und adulte Seren *per se* einen geringeren Anteil an Wachstumsfaktoren als fetales Serum (Johnson 2012). Serum mit 1 % HS sollte somit im Vergleich zu 2 % HS und 1% sowie 2 % FBS den geringsten Anteil an Wachstumsfaktoren aufweisen und entsprechend die besten Bedingungen für eine erfolgreiche Differenzierung bieten, so wie in diesem Versuch beobachtet.

4.1.2 Prüfung des Transfektionserfolges

Zur Prüfung des Transfektionserfolges wurden Zellen mit dem Plasmid pmaxGFP transfiziert. Dieses führt zur Expression von GFP, welches unter Anregung grün leuchtet und somit die erfolgreiche Transfektion im Fluoreszenzmikroskop detektierbar macht (s. 2.2.3.2). Einerseits sollte damit ein optimales Setting für die Transfektion von C2C12-Zellen mittels Lipofectamine® 2000 definiert werden. Die Transfektionsbedingungen für eine bestimmte Zellreihe und ein Transfektionsreagenz initial zu optimieren ist gängige Praxis (Mülhardt 2013). Hier wurde ein Protokoll mit verlängerten Inkubationszeiten und 60.000 ausgesäten Zellen festgelegt (s. 2.2.3).

Andererseits wurde die Frage bearbeitet, ob Myoblasten nach Transfektion noch differenzierungsfähig sind und ob differenzierte Myotuben transfizierbar bleiben. Der Wechsel von GM zu DM auf Zellen 48 h nach Transfektion mit pmaxGFP führte zu einer deutlichen Formveränderung im Sinne einer beginnenden Differenzierung, die sowohl im Lichtbild als auch im Fluoreszenzbild sichtbar war. Der Transfektionsvorgang selbst sowie die Expression von GFP scheinen somit keinen negativen Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit der C2C12-Zellen zu haben. Im Rahmen der Genexpressionsversuche wurden Zellen entsprechend zunächst transfiziert und anschließend zur Differenzierung angeregt. Im Gegenversuch wurden Myotuben nach sechs Tagen Differenzierung mit pmaxGFP transfiziert. Hier ließ sich über 48 h Beobachtungszeitraum keine Fluoreszenz detektieren. Um exprimiert zu werden, muss Fremd-DNA wie die eines Plasmides in Kontakt mit der Transkriptionsmaschinerie innerhalb des Zellkerns kommen. Diesen erreicht sie durch die kurzfristige Öffnung des Kerns während der Zellteilung (Dalby et al. 2004). Da Myotuben nicht mehr am Zellzyklus teilnehmen, ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Dennoch scheint Lipofectamine® 2000 in einigen Fällen auch post-mitotische Zellen erfolgreich zu transfizieren (Dalby et al. 2004). Zu bedenken ist in diesem Zusammenhang außerdem, dass siRNA ihre Wirkung im Zytoplasma entfaltet (s. 1.4). Dass GFP in bereits differenzierten C2C12-Zellen nicht zur Expression kommt, bedeutet also nicht automatisch, dass eine Transfektion derselben Zellen mit siRNA ebenfalls erfolglos wäre. Für andere nicht-teilende Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Lipid-vermittelte Transfektion mit mRNA bis zu 5-fach effektiver war, als die mit DNA, da die RNA nicht die Barriere des Kerneintritts überwinden muss (Zou et al. 2010). Dementsprechend ist es denkbar, in Folgeversuchen die siRNA auch in differenzierte Muskelfasern per Lipofektion einzubringen.

4.2 Genexpressionsversuch *Foxo3-knockdown*

4.2.1 *Knockdown*-Erfolg *Foxo3*

Normalerweise führt die Behandlung mit siRNA nach etwa 48 h zu einem relevanten *knockdown* des betrachteten Gens (Kurreck 2009). In Zellen mit einer hohen Teilungsrate hält

der *knockdown*-Effekt ca. eine Woche lang an, während er in sich langsam teilenden Zellen länger als drei Wochen bestehen kann (Bartlett 2006). In allen durchgeführten Versuchen sowie der allgemeinen Handhabung zeigten die C2C12-Zellen eine hohe Teilungsrate und mussten entsprechend häufig in starker Verdünnung gesplittet werden. In der Literatur ist eine Verdoppelungszeit von 12 h unter Medium mit 20 % FBS beschrieben (McMahon et al. 1994). Dementsprechend erwarteten wir einen Effekt von ca. einer Woche, entsprechend der Daten für schnell teilende Zellen.

Die qPCR-Daten für *Foxo3* zeigten einen statistisch signifikanten Effekt 48 h und 72 h nach Transfektion und erfüllten somit die Erwartung eines Effektbeginns nach 48 h. In den folgenden Tagen normalisierte sich die Expression auf das Niveau in der Kontrollgruppe, bis sie an den Tagen 8 und 9 nach Transfektion signifikant anstieg. Dieser Anstieg könnte sich als *rebound*-Effekt nach Ende der *knockdown*-Wirkung nach einer Woche erklären lassen. Mit 29,7 % an Tag 2 und 10,8 % an Tag 3 fiel der *knockdown*, obwohl signifikant, eher moderat aus. Diese schon zu Beginn geringe Ausprägung des Effekts könnte eine weitere Abflachung des Effekts in den folgenden Tagen nach sich ziehen, welche sich in den Werten auf Ausgangsniveau an den Tagen 4 bis 7 zeigte. Zusammenfassend ließ der *knockdown* von *Foxo3* anhand der qPCR-Daten bei einem eher moderaten Effekt einen typischen zeitlichen Verlauf für *knockdown* mit siRNA erahnen.

Verschiedene Faktoren beeinflussen die Effektivität eines *knockdown*. Hierzu gehören die Transfizierbarkeit der Zellen, die Effektivität des Transfektionsreagenz und die Wirksamkeit der individuellen verwendeten siRNA (Dalby et al. 2004). Einen Vergleichswert für den *knockdown* von *Foxo3* in C2C12-Zellen bietet eine Arbeit von Ikeda et al. (2016): Sie transfizierten C2C12-Zellen 48 h nach Induktion der Differenzierung und erzielten nach weiteren 48 h eine Reduktion von *Foxo3*-mRNA sowie FOXO3-Protein um etwa 65 %. Die eingesetzte Menge an siRNA war bei Ikeda et al. geringer (50 nM statt 100 nM) als in der vorliegenden Arbeit. Es scheint somit unwahrscheinlich, dass die vergleichsweise geringe *knockdown*-Ausbeute der vorliegenden Arbeit in einer zu geringen Dosis von siRNA begründet liegt. Mögliche Erklärungsansätze für den geringeren *knockdown*-Erfolg im vorgestellten Versuch liegen in der gewählten siRNA, dem Transfektionsreagenz sowie dem Differenzierungsgrad der untersuchten Zellen. Ambion berichtet als Hersteller der hier eingesetzten siRNA *knockdown*-Effekte von etwa 80 % für siRNAs der gleichen Produktreihe (48 h nach Transfektion mit RNAiMAx in HeLa-Zellen) (Wang et al. 2009). Obwohl hier nicht speziell auf *Foxo3* eingegangen wird und Hersteller-Angaben kritisch zu bewerten sind, lässt sich damit ein größerer Effekt unter Einsatz der siRNA erwarten. Der nächste zu betrachtende Aspekt ist somit die Wahl des Transfektionsreagenz. Eine aktuelle Arbeit vergleicht die Effektivität und Toxizität verschiedener Transfektionsreagenzien in verschiedenen Zellen, unter anderem auch in primären humanen Myoblasten. Lipofectamine® 2000 zeigte in den Myoblasten eine gute Effektivität, schnitt mit 60,01 % transfizierter Zellen aber schlechter ab als die ebenfalls getesteten Lipofectamine® 3000, RNAiMAx und Fugene, die alle höhere Transfektionsraten erreichten (Wang et al. 2018).

Ikeda et al. (2016) setzen in der zitierten Arbeit RNAiMAx ein. Unter Betrachtung dieser Aspekte ist es wahrscheinlich, dass ein anderes Transfektionsreagenz in der vorliegenden Arbeit einen stärkeren *knockdown* ermöglicht hätte. Zuletzt ließe sich ein Einfluss des Differenzierungsgrades auf die Transfektions-Effektivität diskutieren. Direkte Literatur hierzu liegt nicht vor. Angesichts des Transportmechanismus von Lipofectamine® durch Fusion mit der Zellmembran (Gstraunthaler und Lindl 2013) scheint dieser Aspekt allerdings unwahrscheinlich und somit vernachlässigbar. Weitere Versuche unter Modifikation der diskutierten Faktoren sind nötig, um im weiteren Verlauf des Projektes einen größeren und stabilen *knockdown* von *Foxo3* zu erzielen.

Neben Stärke und Dauer des *knockdown* im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen wurde auch der zeitliche Verlauf der *Foxo3*-Expression in beiden Gruppen untersucht und vergleichend betrachtet. Es zeigte sich ein Anstieg der *Foxo3*-Expression in beiden Gruppen im Verlauf des Versuchs und der parallel verlaufenden Differenzierung. Dieser Anstieg war zu Beginn des Versuchs in der Kontrollgruppe höher, zu Ende des Versuchs in der Behandlungsgruppe mit signifikanten Unterschieden an den Tagen 2, 8 und 9. Diese Schwankung entspricht im Wesentlichen dem Verlauf des *knockdown*. Solange die *Foxo3*-Expression in der Behandlungsgruppe signifikant reduziert war, stieg sie in der Kontrollgruppe relativ stärker an. Mit der Erhöhung der Expression an den letzten Versuchstagen im Gruppenvergleich überstieg auch die Erhöhung relativ zum Ausgangswert im zeitlichen Verlauf die in der Kontrollgruppe.

Die Bedeutung des Anstiegs der *Foxo3*-Expression im Verlauf der Differenzierung wird in Kapitel 4.2.3 diskutiert.

4.2.2 ***Knockdown*-Effekt auf *Atrogin-1***

Da Atrogin-1 durch FOXO3 transkriptionell reguliert wird, stellten wir die Hypothese auf, dass der *knockdown* von *Foxo3* auch die Expression von *Atrogin-1* reduzieren würde. Tatsächlich zeigte die qPCR für Versuchstag 2 eine signifikant geringere Expression von *Atrogin-1* in den *knockdown*-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. An Tag 2 zeigte sich auch für *Foxo3* der stärkste *knockdown*-Effekt mit 29,7 % ($p = 0{,}0039$). Diese Kongruenz lässt die Annahme zu, dass die reduzierte Expression von *Atrogin*-1 Folge des *knockdown* von *Foxo3* ist. Im weiteren Verlauf des Versuchs blieb die *Atrogin-1* Expression in den *knockdown*-Zellen etwa auf Kontroll-Niveau. Die einzige Ausnahme bildete Tag 8, an dem *Atrogin-1* signifikant erhöht war. Diese Erhöhung entspricht wiederum der Erhöhung von *Foxo3* an Tag 8, und könnte den Effekt eines möglicherweise bestehenden *rebounds* in der *Foxo3*-Expression widerspiegeln. Die Bedeutung der nicht-signifikanten Expressions-Erhöhung an Tag 5 und 7 lässt sich weniger gut erklären und ist möglicherweise als Artefakt zu werten.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten eine um 15,6 % reduzierte Expression von *Atrogin-1* nach *knockdown* von *Foxo3*. In der bereits zitierten Arbeit von Ikeda et al. (2016) zeigte der *knockdown* von *Foxo3* in C2C12-Zellen *per se* keinen Einfluss auf das mRNA-Level von

Atrogin-1, obwohl der *knockdown*-Effekt mit 65 % mehr als doppelt so stark war, wie der hier erzielte. Wie sich diese Diskrepanz erklären lässt, bleibt unklar. Allerdings verhinderte der *knockdown* bei Ikeda erfolgreich die Induktion der *Atrogin-1* Expression durch Eisen-Überladung. Weitere Arbeitsgruppen berichten, dass die Induktion von *Atrogin-1* in verschiedenen Atrophie-Modellen durch RNAi gegen *Foxo3* gehemmt werden kann (Sandri et al. 2004; Kang et al. 2017), ohne aber einen direkten Effekt des *knockdown* auf *Atrogin-1* in ansonsten unbehandelten Zellen zu untersuchen. Bei Sandri et al. führte der Einsatz einer dauerhaft inaktivierten Form von FOXO3 (d.n. FOXO3) zu einer 30 % - igen Reduktion von *Atrogin-1* mRNA. Inaktiviertes FOXO3 befindet sich außerhalb des Zellkerns und kann somit nicht als Transkriptionsfaktor wirken (s. 1.3). Der Effekt auf die Expression von *Atrogin-1* sollte also ähnlich dem eines *Foxo3-knockdown* sein und Sandri et al. lässt sich heranziehen, um das vorliegende Ergebnis zu stützen.

Während des Differenzierungs-Prozesses zeigte sich zunächst ein Abfall von *Atrogin-1* an Tag 1 in beiden Gruppen. Die Bedeutung dieses Abfalls wird in Kapitel 4.4 diskutiert. An den folgenden Tagen kam es zu einem Anstieg der *Atrogin-1* Expression, kongruent zum Anstieg, der sich für *Foxo3* beobachten ließ. Passend zu dieser Beobachtung zeigte die Arbeitsgruppe von Jiang et al. (2013), dass die Expression von *Atrogin-1* in L6-Zellen – einer gut etablierte Linie von Ratten-Myoblasten – während deren Differenzierung durch Serum-Entzug anstieg und dass umgekehrt die Überexpression von *Atrogin-1* zur Zelldifferenzierung führte. Atrogin-1 scheint also nicht nur mit der Differenzierung zu steigen, sondern auch eine regulatorische Rolle in diesem Prozess zu spielen. Auch für die zweite muskelspezifische E3-Ubiquitinligase, MuRF-1, wurde eine Bedeutung in der Differenzierung beschrieben: Sie beeinflusst sowohl den Beginn der Differenzierung, als auch die Ausbildung von Myotuben (Spencer et al. 2000). Unter Denervierung reguliert Myogenin die Expression von Atrogin-1 und MuRF-1 auf transkriptioneller Ebene und trägt so zur Entwicklung von muskulärer Atrophie bei (Moresi et al. 2010). Diese Entdeckung stellt einerseits eine direkte Verbindung zwischen dem myogenen Regulationsfaktor Myogenin und den beiden wichtigsten E3-Ligasen des UPS her. Andererseits zeigt sie, dass Myogenin in Abhängigkeit vom physiologischen Kontext unterschiedliche Funktionen ausübt: als Regulator der Myogenese in undifferenzierten Zellen, aber auch als Teil des Atrophie-Signalwegs in adultem, denerviertem Muskel (Moresi et al. 2010). Vor diesem Hintergrund ist es nicht unwahrscheinlich, dass auch Atrogin-1, MuRF-1 und FOXO3 solche unterschiedlichen bzw. gegensätzlichen Funktionen erfüllen.

Der Anstieg der *Atrogin-1* Expression während der Differenzierung fiel in der Behandlungsgruppe stärker aus als in der Kontrollgruppe. Da der Effekt insgesamt eher gering war, ist zum einen denkbar, dass der Unterschied zwischen den Gruppen rein artefiziell ist. Alternativ ist es möglich, dass die Expression von *Atrogin-1* im Kontext der myogenen Differenzierung nicht (oder nicht ausschließlich) durch FOXO3 reguliert wird, sondern dass andere Transkriptionsfaktoren hier eine größere Rolle spielen. In diesem Fall

würden sich *Foxo3* und *Atrogin-1* in der Differenzierung ähnlich verhalten, ohne jedoch in einem direkten regulatorischen Zusammenhang zu stehen.

4.2.3 Einfluss des *knockdown* auf die Differenzierung

Die Expression von *Foxo3* zeigte im Verlauf der Differenzierung sowohl in den *knockdown*-Zellen als auch in den Kontrollzellen einen Anstieg. Ähnliche Ergebnisse erzielten Dentice et al. (2010), die in differenzierten C2C12-Zellen eine höhere mRNA-Expression von *Foxo3* messen konnten, als in proliferierenden C2C12-Zellen. Peng et al. (2017) zeigten einen Anstieg von FOXO3-Protein durch die Differenzierung von C2C12-Zellen. Ebenso wie in den genannten Veröffentlichungen wurde auch in der vorliegenden Arbeit die Differenzierung der Zellen durch Serumentzug erzielt. Serum enthält neben unzähligen weiteren Inhaltsstoffen auch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, darunter auch Insulin und IGF-1 (Gstraunthaler und Lindl 2013). Wie in der Einleitung beschrieben, führen Wachstumsfaktoren und Insulin über die PI3K/Akt-Achse zur Inaktivierung und zum proteasomalen Abbau von FOXO-Transkriptionsfaktoren (Greer und Brunet 2005). Zudem konnten Essaghir et al. (2009) zeigen, dass eine 24-stündige Stimulation mit Wachstumsfaktoren die Expression von FOXO1, 3 und 4 in Fibroblasten. Zwar handelt es sich hierbei um ein anderes Zellsystem als C2C12 (oder myogene Zellen im Allgemeinen), das Ergebnis zeigt jedoch, dass Wachstumsfaktoren prinzipiell nicht nur die Aktivität des Proteins FOXO3 regulieren, sondern auch seine Expression direkt beeinflussen können. Vergleichbare Daten aus myogenen Zellen liegen nach aktuellem Recherchestand nicht vor. Vor diesem Hintergrund ist es nicht überraschend, dass eine Reduktion von Wachstumsfaktoren durch einen reduzierten Serumgehalt im Kulturmedium zu einem Anstieg der *Foxo3*-Expression führt. Interessant ist nun die Frage, ob sich aus dem Anstieg von *Foxo3* mit der Differenzierung auch eine regulatorische Rolle von *Foxo3* in diesem Prozess ableiten lässt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die phänotypische Entwicklung sowie das Verhalten der Differenzierungsmarker *Myog* und *MyH4* in Behandlungs- und Kontrollgruppe miteinander verglichen.

4.2.3.1 Lichtmikroskopische Darstellung des Zellphänotyps

Bei der lichtmikroskopischen Beobachtung wurden Bilder im 24 h-Rhythmus aufgenommen und qualitativ miteinander verglichen. Dabei ließen sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachweisen. Hierfür sind mehrere Erklärungsansätze plausibel: Zum einen ist eine zu geringe zeitliche und auch bildtechnische Auflösung denkbar. Mit der automatisierten Aufnahme von Bildern im 20 Min-Takt konnten Lee et al. (2019) an Hühnermyoblasten sowohl einen früheren Beginn der Differenzierung als auch eine klarere Ausprägung derselben in *Foxo3-knockdown*-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen dokumentieren. Hu et al. (2008) zeigen im Phasenkontrast-Bild weniger klar differenzierte C2C12-Zellen nach *Foxo3-knockdown* mit shRNA verglichen mit Kontroll-shRNA und *Foxo1*-shRNA. Die beiden Veröffentlichungen kommen zu gegensätzlichen Ergebnissen

hinsichtlich des Effekts von FOXO3 auf die Differenzierung, zeigen jedoch, dass es grundsätzlich möglich ist, einen optischen Unterschied zwischen *knockdown*-Zellen und Kontroll-Zellen festzustellen. Eine weitere Erklärung ist, dass der vergleichbar geringe *knockdown*-Effekt von 29,7 % und seine kurze Dauer nicht ausreichend waren, um einen sichtbaren Effekt auf die phänotypische Entwicklung der Zellen zu verursachen.

4.2.3.2 Verhalten der Differenzierungsmarker

Für die Differenzierungsmarker *Myog* und *MyH4* wurden sowohl die Gruppen für jeden Tag miteinander verglichen als auch der zeitliche Verlauf innerhalb der Gruppen. Die signifikante Reduktion von *Myog* an Tag 2 überschneidet sich mit dem stärksten *Foxo3-knockdown* und ist als Effekt desselben interpretierbar. Argumente hierfür werden weiter unten im Text dargelegt. *MyH4* zeigte eine signifikante Reduktion an Tag 1, gefolgt von einer deutlichen Erhöhung an Tag 2. Hier erweist sich eine klare Zuordnung zu experimentellen Effekten als schwierig. Denkbar wäre ein früher Effekt des *knockdown*, gefolgt von einem schnellen *rebound*. Insgesamt jedoch bleibt der Gruppenvergleich für die beiden Marker wenig aussagekräftig. Spannender stellen sich hier die zeitlichen Verläufe sowie deren Vergleich zwischen den Versuchsgruppen dar. *Myog* zeigte für beide Gruppen einen frühen Anstieg, entsprechend seiner Funktion als MRF (s. 1.5), während sich für *MyH4* der deutlichste Expressionsanstieg an den Tagen 7 bis 9 verzeichnen ließ. Vergleichbare Ergebnisse liefert eine Arbeit von Brown et al. (2012), in welcher die mRNA verschiedener MRFs und MHC-Isoformen in C2C12-Zellen an acht Tagen Differenzierung gemessen wurden. Brown et al. beschreiben eine Erhöhung von *Myog* ab den Tagen 1 und 2 der Differenzierung, gefolgt von einem Abfall an den Tagen 6 und 8, während *MyH4* ab Tag 4 bis zum Versuchsende ansteigt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten für beide Gene und alle Gruppen einen Abfall der Expression an Tag 1, der sich möglicherweise als toxischer Effekt der Transfektion erklären lässt (s. 4.4). Dieser Abfall könnte auch erklären, warum der Anstieg der Expression insbesondere für *Myog* in dieser Arbeit etwas später begann, als bei Brown et al.. Schließlich zeigte sich, dass der Anstieg der Expression in der jeweiligen Kontrollgruppe höher ausfiel als in der entsprechenden Behandlungsgruppe. Zellen mit intakter FOXO3-Funktion erfuhren also einen deutlicheren Anstieg der Differenzierungsmarker. Betrachtet man dies gemeinsam mit dem Anstieg der *Foxo3*-Expression während der Differenzierung, dann weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass FOXO3 eine positive Rolle in der Differenzierung von myogenen Vorläuferzellen spielt.

4.2.3.3 Rolle von FOXO3

Unter der Annahme, dass FOXO3 die myogene Differenzierung positiv beeinflusst, stellt sich automatisch die Frage nach dem Mechanismus. Hier geben einige Veröffentlichungen aus den letzten Jahren Einblick. In zwei dieser Arbeiten ermöglicht FOXO3 die Transkription des myogenen „Masterregulators“ MyoD – bei Dentice et al. (2010) indirekt über die Induktion von Typ II Deiodinase, bei Hu et al. (2008) direkt durch Bindung und

Aktivierung des *MyoD*-Promoters gemeinsam mit *paired box gene 3/7* (Pax3/7). Peng et al. (2017) zeigten, dass FOXO3 zudem durch Interaktion mit MyoD-Protein die Transkription von Myogenin koordiniert. Geht man von solch einer direkten Regulation von *Myog* durch FOXO3 aus, dann erscheint es plausibel, dass der Abfall der *Myog*-Expression an Versuchstag 2 einen Effekt des *Foxo3-knockdown* darstellt. Die weniger klaren Effekte des *knockdown* auf *MyH4* sind möglicherweise dadurch zu erklären, dass der Zusammenhang zwischen FOXO3 und MHCIIb weniger direkt ist. Einen letzten interessanten Ansatz liefert eine Veröffentlichung von Gómez-Puerto et al. (2016): Sie untersucht die Rolle von FOXO3 in der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten: Durch die Aktivierung von Autophagieprozessen und Transkription entsprechender Gene ermöglicht FOXO3 die Beseitigung von ROS, die in der Differenzierung anfallen, und erhält die Differenzierung damit aufrecht. Auch im adulten Muskelgewebe aktiviert FOXO3 lysosomale Autophagie (s. 1.2). Dementsprechend ist eine ähnliche Funktionsweise wie in der osteogenen Differenzierung auch in der myogenen denkbar.

4.3 Proliferationsassay *Foxo3-knockdown*

Eine Vielzahl von Arbeiten liefert Belege für einen hemmenden Effekt von FOXO-Transkriptionsfaktoren auf das Fortschreiten des Zellzyklus und somit auf die Proliferation teilungsfähiger Zellen. Sie zeigen, dass die Überexpression von FOXO zum Arrest des Zellzyklus am Übergang von G1- zu S-Phase oder von G2- zu M-Phase führt (M-, S-, G1/2/0-Phase: Mitose-, Synthese-, Lücke/*gap* 1/2/0 – Phase des Zellzyklus). Für den G1/S-Übergang sind die Zellzyklus-Inhibitoren p27 und p21, sowie die Cycline D1 und D2 als Zielgene beschrieben. Während FOXOs die Expression von p27 und p21 erhöhen, wird die Expression von Cyclin D1 und D2, welche den Zellzyklus positiv regulieren, von FOXO unterdrückt. Am G2/M-Übergang verlangsamen FOXOs den Zellzyklus über die Regulation von Cyclin G2 und *growth arrest and DNA damage-inducible protein 45* (GADD45). Über die Expression von p130 scheint FOXO zudem den Austritt von Zellen aus dem Zellzyklus und den Übergang in die ruhende G0-Phase zu begünstigen (Tran et al. 2003; Greer und Brunet 2005).

Ausgehend von diesen Publikationen ließe sich im Umkehrschluss erwarten, dass ein *knockdown* von *Foxo3* zu einer gesteigerten Proliferation führt. Tatsächlich jedoch nahm im Proliferationsassay die Konfluenz in den *knockdown*-Zellen im Vergleich zu den kontroll-transfizierten Zellen über den Beobachtungszeitraum weniger stark zu. Die Proliferation schritt also im Vergleich langsamer voran. Die größte Differenz in der Konfluenz zeigte sich an Tag 3, 48 h nach der Transfektion. Interessanterweise entspricht dies dem Zeitpunkt, zu dem sich in der qPCR der größte *knockdown*-Effekt für *Foxo3* nachweisen ließ (s. 3.2.1). Bis zum Ende der Messungen an Tag 4 blieb die Konfluenz in der *knockdown*-Gruppe erniedrigt. Obwohl die Unterschiede zwischen den Gruppen sich nicht als statistisch signifikant zeigten, lässt sich hier ein deutlicher Trend erkennen.

Vor dem Hintergrund der bestehenden Literatur sind diese Ergebnisse überraschend. Doch es finden sich auch Arbeiten, die zu ähnlichen Ergebnissen kommen. Zhang et al. (2012) konnten eine Hemmung der Proliferation in verschiedenen Zelllinien beobachten, nachdem diese mit shRNA gegen *Foxo3* behandelt wurden. Als Mechanismus identifizieren sie den schnelleren Abbau von *Chromatin licensing and DNA replication factor 1* (Cdt1), einem Initiationsfaktor der DNA-Replikation, welcher durch FOXO3 stabilisiert zu werden scheint. Die Hemmung des Zellzyklus erfolgt hier am G1/S-Übergang durch einen Verlust von FOXO3. In der bereits erwähnten Arbeit von Lee et al. (2019) führt der *knockdown* von *Foxo3* durch eine stabil exprimierte Transposon-miRNA neben einer gesteigerten Differenzierung auch zu einer signifikant erniedrigten Proliferationsrate in primären Hühner-Myoblasten. Zhang et al. (2012) erklären ihre Ergebnisse im Vergleich zu vielen vorangegangenen Arbeiten durch unterschiedliches experimentelles Vorgehen: Die eingangs erwähnten Publikationen erzielten ihre Ergebnisse weit überwiegend durch die Überexpression von FOXO-Transkriptionsfaktoren in den zu untersuchenden Zellen, während Zhang et al. die Expression und Aktivität von FOXO per *knockdown* senkten. Gleiches gilt für die Arbeit von Lee et al. sowie für die hier vorgestellten Ergebnisse. Tran et al. (2003) formulieren in einem Review die These, dass FOXO-Transkriptionsfaktoren eine duale Rolle in Bezug auf den Zellzyklus spielen könnten, indem sie unter physiologischen Bedingungen die Progression begünstigen, während ihre ektopische Überexpression zum Arrest führt. Somit ist denkbar, dass das genaue Maß der Aktivität von FOXO-Faktoren für den Einfluss auf Zellzyklus und Proliferation von Bedeutung ist und die unterschiedlichen Arbeiten verschiedene Aktivitätslevel mit den entsprechenden Konsequenzen abbilden.

Eine Arbeit, welche mit einem ganz anderen experimentellen Vorgehen zu Ergebnissen kommt, welche zu den hier vorgestellten kongruent sind, veröffentlichten Quotti Tubi et al. 2017: Sie blockierten die Proteinkinase Casein Kinase 2 (CK2) in Leukämie-Stammzellen und konnten dadurch die Aktivität des Zellzyklus und somit die Sensibilität der Zellen für Chemotherapie erhöhen. Diese Erhöhung schien unter anderem durch eine Inaktivierung von Akt und eine Aktivitätssteigerung von FOXO3 vermittelt zu werden. Die Erhöhung von FOXO3 führte also (ohne direkte Manipulation an FOXO3) zu einem Fortschreiten des Zellzyklus.

In der vorliegenden Arbeit führte der *knockdown* von *Foxo3* per siRNA zu einer reduzierten Proliferation im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen. Der größte Unterschied zeigte sich dabei an dem Versuchstag, an welchem erwartbar der größte *knockdown*-Effekt vorlag. Diese Ergebnisse sind gut mit den Arbeiten von Zhang et al, Lee et al. und Quotti Tubi et al. vereinbar. Gegensätzliche Ergebnisse publizierten unter anderem Yamashita et al. (2016), in deren Studie die Aktivierung von FOXO1 in C2C12-Zellen zu verringerter Proliferations-Kapazität führte und Lee et al. (2007), die mit einer konstitutiven Aktivierung von FOXO3 die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen senken konnten. Diese Gegensätzlichkeit könnte sich über die unterschiedlichen experimentellen Herangehensweisen (*knockdown* versus Überexpression) erklären.

4.4 Genexpressionsversuch Wildtyp-Zellen und Kontrolltransfektion

Normiert auf Tag 0 zeigten *Atrogin-1*, *Myog* und *MyH4* einen Abfall der relativen Genexpression an Tag 1 direkt nach der Transfektion, sowohl für die Behandlungs- als auch für die Kontrollgruppe. Diese Beobachtung führte zu der Frage, ob der Vorgang der Transfektion bzw. das Reagenz Lipofectamine® 2000 einen Einfluss auf die Expression dieser Gene haben könnte. Eine Studie von Martin et al. (2015) zeigte reduzierte Expression fast aller untersuchten Gene infolge von Transfektion mit Lipofectamine-GFP-Komplexen und erklärt dies als *shutdown* der Transkription, möglicherweise als Schutzmechanismus gegen Zytotoxizität infolge der Transfektion. Zytotoxizität ist ein bekanntes Problem bei der Transfektion mit Liposomen-basierten Transfektionsreagenzien, äußert sich auf vielfältige Art und Weise (Dass 2002; Gstraunthaler und Lindl 2013) und ist auch für den Einsatz von Lipofectamine® 2000 in primären Myoblasten belegt (Wang et al. 2018). Ein *shutdown* wie der von Martin et al. postulierte könnte die reduzierte Expression von *Atrogin-1*, *Myog* und *MyH4* an Tag 1 erklären. Gleichzeitig wirft er die Frage auf, ob nicht auch die Expression von *Foxo3* durch den Einsatz von Lipofectamine® 2000 (im Folgenden nur Lipofectamine genannt) beeinflusst ist. Interessant ist in diesem Kontext eine Arbeit von Mo et al. (2012), in der die Transfektion von Huh7.5-Zellen und H4IIE-Zellen mit Lipofectamine und verschiedenen Kontroll-siRNAs zu einer Aktivierung von Autophagie führte, nachgewiesen durch die Konversion des Autophagie-assoziierten Proteins *Microtubule-associated protein 1, light chain 3* (LC3) von LC3-I zur aktiven Form LC3-II sowie durch eine verstärkte Fluoreszenz von GFP-LC3. Die Autophagie ist ein von FOXO3 reguliertes System (s. 1.2), wobei FOXO3 die Konversion von LC3-I zu LC3-II sowie die Genexpression von LC3 zu verstärken scheint (Mammucari et al. 2007). Unter diesen Voraussetzungen ist es denkbar, dass eine gesteigerte Aktivität und/oder Expression von FOXO3 einen Zwischenschritt darstellt, welcher die gesteigerte Autophagie-Aktivität nach Lipofectamine-Einsatz in Zellkultur vermittelt. Somit würde Lipofectamine zu einer gesteigerten Expression von *Foxo3* führen.

Grundsätzlich handelt es sich bei Lipofectamine um ein häufig genutztes und gut etabliertes Transfektionsreagenz (Wang et al. 2018). Cardarelli et al. bezeichnen es als „Goldstandard“, sie verweisen 2016 auf über 50.000 Zitationen und verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits die Funktion von FOXO3 in C2C12-Zellen unter Einsatz von Lipofectamine untersucht (Hu et al. 2008; Kuo et al. 2016; Peng et al. 2017). Auf dieser Basis und angesichts der plausiblen Ergebnisse aus dem Hauptversuch erschien eine starke Beeinflussung ebendieser Ergebnisse durch den Einfluss von Lipofectamine trotz der obigen Überlegungen nicht sehr wahrscheinlich.

Um dennoch eine Verfälschung der qPCR-Ergebnisse durch Eigeneffekte von Lipofectamine zu überprüfen und (idealerweise) auszuschließen, wurde der zweite Genexpressionsversuch durchgeführt. Der Gruppenvergleich von Wildtyp- und kontroll-transfizierten Zellen zeigte keinen eindeutigen Trend, die deutliche Reduktion der Expression in den kontroll-transfizierten Zellen an Tag 3 ist am ehesten als Artefakt zu

werten. Für die Bewertung der Ergebnisse aus dem Hauptversuch spielt der Gruppenvergleich des Wildtypversuches keine Rolle: Da im Hauptversuch sowohl Behandlungs- als auch Kontrollgruppe mit Lipofectamine und siRNA behandelt wurden, lassen sich eigene Effekte der Transfektion im direkten Vergleich von Kontrolle und Behandlung herausrechnen. Relevant ist dagegen der zeitliche Verlauf: für dessen Untersuchung wurden die Ergebnisse auf Tag 0 normiert, an welchem zum Zeitpunkt der RNA-Isolation noch keine Transfektion (weder mit *Foxo3*- noch mit Kontroll-siRNA) erfolgt war. Ein eigener Einfluss von Lipofectamine auf die Expression von *Foxo3* würde entsprechend lediglich bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufes zum Tragen kommen. In der Auswertung für den zeitlichen Verlauf zeigte der Wildtyp-Versuch eine ansteigende Expression von *Foxo3* für kontroll-transfizierte Zellen und für Wildtypzellen über die Versuchstage. Die Größenordnung des Anstiegs war dabei mit einer Erhöhung der Expression auf das Zwei- bis Dreifache des Ursprungswertes vergleichbar mit der Erhöhung im Hauptversuch. Zwischen den Gruppen zeigten sich keine relevanten Unterschiede, insbesondere nicht an Tag 1, an welchem sich im Hauptversuch der Expressionsabfall von *Atrogin-1*, *Myog* und *MyH4* gezeigt hatte. Bei einer Beeinflussung der Expression von *Foxo3* an Tag 1 wäre ein Unterschied zwischen der kontroll-transfizierten Gruppe und den Wildtypzellen zu erwarten gewesen. Ein entsprechender Effekt scheint somit nicht vorhanden zu sein. An den letzten drei Versuchstagen zeigte *Foxo3* in den kontroll-transfizierten Zellen einen stärkeren Anstieg als in den Wildtyp-Zellen. Dieses Ergebnis könnte für eine Erhöhung der *Foxo3*-Expression durch Lipofectamine sprechen, oder aber für einen *rebound*-Effekt nach einer initialen Reduktion. Andererseits kann es sich um ein Artefakt handeln, insbesondere, da es sich um den Vergleich von nur einem biologischen Replikat handelt.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist der *knockdown* von *Foxo3* mit dem langfristigen Ziel, einen solchen *knockdown* als Therapiestrategie gegen Sarkopenie und Kachexie anzuwenden. Der Nachweis des erfolgreichen *knockdowns* im Hauptversuch ist von eigenen Einflüssen durch Lipofectamine unbeeinflusst. Daher wurde der Einfluss mit dem Wildtyp-Versuch nur orientierend anhand eines biologischen Replikates untersucht. Die Aussagekraft des Versuchs und seiner Ergebnisse sollte dementsprechend nicht überbewertet werden. Der beobachtete Anstieg der *Foxo3*-Expression in beiden Gruppen passt jedoch zu den Ergebnissen des Hauptversuches, sowie zur bereits diskutierten Literatur und lässt eine grobe Beeinflussung der Ergebnisse durch Eigeneffekte von Lipofectamine unwahrscheinlich erscheinen.

4.5 Bedeutung von FOXO3 für Sarkopenie

Hintergrund der vorliegenden Arbeit ist die Idee, FOXO3 mittels RNAi im Skelettmuskel auszuschalten und auf diese Weise die muskuläre Atrophie im Rahmen von Sarkopenie und Kachexie abzumildern. Wie in Kapitel 1.2 erwähnt, wird dem UPS eine zentrale

pathogenetische Rolle in der Kachexie zugeschrieben. FOXO3 kontrolliert mit den E3-Ligasen Atrogin-1 und MuRF-1 die Expression zweier bedeutender Elemente dieses Proteolyse-Weges und zeigt bei krankheitsbedingtem Katabolismus eine erhöhte Expression (Stefanetti et al. 2018). Somit erscheint es sinnvoll, Kachexie-bedingter Muskelatrophie mit der Ausschaltung von FOXO3 entgegenzuwirken. Der Anteil des UPS und entsprechend auch von FOXO3 an der Pathogenese von Sarkopenie ist dagegen bisher weniger klar belegt. Im Gegensatz zur Kachexie zeichnet sich Sarkopenie nicht nur durch den Verlust von Muskelmasse und -protein aus, sondern auch durch eine verringerte Muskelqualität, u. a. durch Fetteinlagerung im Muskelgewebe und durch neuromuskuläre Veränderungen (s. 1.1.1 und 1.1.3). Für die Expression und Aktivität von FOXO3, Atrogin-1 und MuRF-1 in diesem Kontext wurden widersprüchliche Ergebnisse publiziert (Sakuma et al. 2017). Whitman et al. (2005) zeigten, dass die Expression von *Atrogin-1* und *MuRF-1* im *M. vastus lateralis* alter Versuchspersonen sich nicht signifikant von der bei jungen Individuen unterscheidet und ein kürzlich erschienener Review zieht das Fazit, Sarkopenie könne nicht auf eine Erhöhung des UPS oder die Induktion von FOXO3 zurückgeführt werden (Stefanetti et al. 2018). Ein gegenteiliges Ergebnis erzielten Giresi et al. (2005), die in einer Microarray Studie eine molekulare Signatur für Sarkopenie identifizierten. Erhöhte Level von FOXO3 gehören hier zu den 45 differenziell exprimierten Genen, die eine Unterscheidung zwischen jungem und altem, sarkopenem Muskel ermöglichen. Trappe et al. (2004) liefern Hinweise für eine erhöhte Proteolyse-Rate von Aktin und Myosin bei alten Männern im Vergleich zu jungen Kontrollpersonen. Verschiedene Proteine der dicken Muskelfilamente (*myosin binding protein C*, *myosin light chain* 1 und 2 und MHC) werden MuRF-1 abhängig abgebaut (Cohen et al. 2009) und weitere myofibrilläre Proteine werden als Substrate von Atrogin-1 und MuRF-1 diskutiert (Bodine und Baehr 2014). Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass die beobachtete erhöhte Proteolyse im Alter auf eine gesteigerte Aktivität des UPS zurückgeht und dass diese durch Aktivität von FOXO3 vermittelt ist. Eine Studie aus dem Jahr 2007 schließlich untersuchte die mRNA-Expression von *Atrogin-1*, *MuRF-1* und *Foxo3* in Muskelbiopsien von alten und jungen Frauen vor und nach Gewichtstraining. In Ruhe zeigten die alten Frauen eine signifikant höhere Expression von *Foxo3* und *MuRF-1*. Das Gewichtstraining führte in beiden Gruppen zu einem vergleichbaren Anstieg von *MuRF-1*, jedoch nur bei den alten Frauen zu einer zusätzlichen Erhöhung von *Atrogin-1*, hinweisend auf eine stärkere Proteolyse in Reaktion auf die Trainingsbelastung (Raue et al. 2007). Wie lassen sich diese gegensätzlichen Ergebnisse unterschiedlicher Studien erklären? Einen möglichen Ansatz formulieren Raue et al. in der eben zitierten Arbeit: Sie postulieren, das UPS werde in Sarkopenie-Modellen weniger stark aktiviert als in Modellen von induzierter Atrophie wie Nahrungsentzug oder Denervierung. Eine nur moderate Induktion des UPS würde der vergleichsweise langsamen Entwicklung von Sarkopenie entsprechen und gleichzeitig erklären, warum der Nachweis von erhöhten UPS-Markern bei Sarkopenie nicht regelhaft gelingt (Raue et al. 2007).

Betrachtet man verschiedene Modelle induzierter Atrophie, so finden sich Parallelen zur Pathogenese von Sarkopenie. Sandri et al. (2004) beispielsweise verwenden zwei unterschiedliche Modelle: die Behandlung von C2C12-Myotuben mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason und den Entzug von Serum, Glukose und Aminosäuren aus dem Kulturmedium der Myotuben. Beide Verfahren resultierten in geringerer Phosphorylierung (Inaktivierung) von FOXO1 und 3, höherer *Atrogin-1* Expression sowie reduziertem Faserdurchmesser. Vergleichbare Ergebnisse ließen sich im Mausmodell reproduzieren (Sandri et al. 2004). Der Entzug von Glukose und Aminosäuren entspricht einem „Aushungern" der Kulturzellen. Klinisch lässt sich hier eine Analogie zum häufig beobachteten Phänomen der Altersanorexie ziehen, welches sich durch reduzierte Aufnahme von Nahrung und insbesondere von Vitaminen und Proteinen auszeichnet (Landi et al. 2016). Während die Menge an anabolen Hormonen bei älteren Menschen abnimmt, zeigen sich im Alter erhöhte Cortisol-Spiegel (Liguori et al. 2018). Da Glukokortikoide durch Aktivierung der Promoterregion die Expression von *Foxo3* stärken (Kang et al. 2017), ist eine Induktion von *Foxo3* durch die erhöhten Cortisol-Spiegel bei älteren Menschen denkbar. Die anabolen Botenstoffe Insulin und IGF-1 wiederum wirken über PI3K und Akt hemmend auf die Aktivität von FOXO3, wie in Kapitel 1.2 ausführlich dargelegt, und sind bei alten Menschen reduziert. Zusammenfassend lassen sich molekulare Mechanismen, welche die Expression und/oder Aktivität von FOXO3 erhöhen, in Phänomenen des Alterungsprozesses wiederfinden (vgl. hierzu auch Kapitel 1.1.3).

Auf Basis all dieser Überlegungen ist die Ausschaltung von FOXO3 als Therapiemodell nicht nur für Kachexie, sondern auch für Sarkopenie ein denkbares Konzept, welches weiter verfolgt werden sollte.

4.6 Limitationen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit weist einige Limitationen auf. Zu diesen gehört der Umstand, dass einige qPCR-Ergebnisse zwar auf Basis der bestehenden Literatur gut erklärbar sind, jedoch keine statistische Signifikanz erreichten, wie der stärkere Anstieg von *Myog* in der Kontrollgruppe verglichen mit der Behandlungsgruppe. Umgekehrt findet sich für einige signifikante Unterschiede keine schlüssige Begründung anhand des aktuellen Wissensstandes um Signalwege und Wechselwirkungen, wie für die relative Erhöhung von *Myog* an den Versuchstagen 3, 5 und 8 (beides s. 3.2.3.2). Dass mehrere erklärbare Ergebnisse keine statistische Signifikanz erreichten, ist vermutlich durch den relativ schwachen und nur kurz andauernden *knockdown*-Effekt auf *Foxo3* zu erklären. Dennoch zeigten die Ergebnisse insgesamt eine Tendenz, die die grundlegende Idee dieses Forschungsprojektes - den *knockdown* von *Foxo3* und konsekutive Reduktion der UPS-Aktivität, gemessen an der Expression von *Atrogin-1* - unterstützt. Die aktuelle Arbeit steht am Beginn des Projektes und ist von explorativem Charakter. In diesem Rahmen sind die Ergebnisse ausreichend, um optimierte Folgeversuche zu begründen. Erste Folgeversuche wurden bereits im Rahmen

einer weiteren, noch laufenden Dissertation durchgeführt und konnten einen *knockdown* von 50 % nach 24 h erzielen[1].

Für den Wildtyp-Versuch wurde nur eines von drei biologischen Replikaten ausgewertet, während die übrigen Proben für eventuelle zukünftige Untersuchungen aufbewahrt wurden. Interferenz-statistische Aussagen sind für diesen Versuch daher nicht möglich. Die deskriptive Statistik verhält sich jedoch kongruent zu den Ergebnissen des Hauptversuches. Die Durchführung des Wildtyp-Versuches erfolgte als zusätzliche interne Qualitätskontrolle des Hauptversuches und sollte orientierend den Eigeneinfluss des Transfektionsreagenz Lipofectamine® 2000 auf die Zeitverlaufsauswertung des Hauptversuches überprüfen. Die bereits erwähnten Folgeversuche wurden unter Anwendung von Lipofectamine® RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt, auf die zeitliche Auswertung wurde dabei verzichtet. Somit wurde eine orientierende Auswertung des Wildtyps-Versuches in der vorliegenden Arbeit für ausreichend befunden.

Zur interferenzstatistischen Auswertung des Hauptversuches und des Proliferationsassays wurden Testverfahren ausgewählt, die möglichen Platteneffekten sowie der Replikate-Anzahl n = 3 Rechnung tragen. Somit wurde auf eine möglichst genaue Modellierung der Versuchsanordnung geachtet. Auf die Anwendung der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen wurde dagegen in dieser explorativen Arbeit verzichtet.

Alle vorgestellten Experimente wurden *in vitro* an C2C12-Zellen durchgeführt. Diese sind (zumindest initial) undifferenziert und zu keinem Zeitpunkt den komplexen Interaktionen innerhalb eines Organismus ausgesetzt. Langfristiges Ziel dagegen ist die Anwendung von RNAi *in vivo* und in voll differenzierten Muskelfasern im erwachsenen Muskel. Im Rahmen der Vorversuche zeigte sich, dass nach Transfektion mit Lipofectamine® 2000 das Plasmid pmaxGFP in differenzierten Zellen nicht exprimiert wurde. Wie in Kapitel 4.1.2 diskutiert, bedeutet dies nicht zwangsläufig, dass die Transfektion von siRNA in differenzierten Zellen ebenfalls erfolglos sein muss. Dennoch wird die Suche nach einem passenden Medium oder Vektor eine wichtige Hürde in der Entwicklung eines entsprechenden Medikamentes darstellen. In letzter Konsequenz muss dabei auch die Frage nach der klinisch-praktischen Applikationsfähigkeit (z. B. über orale Einnahme oder intravenöse Gabe) geklärt werden. Die Versuche zu Differenzierung und Proliferation weisen zudem deutlich darauf hin, dass FOXO3 und Atrogin-1 außerhalb von muskulärer Atrophie weitere Funktionen erfüllen und eine breite Basis an bestehender wissenschaftlicher Literatur stützt diese Annahme (s. 4.2.3 und 4.3). Daher sollte ein zukünftiges Medikament FOXO3 spezifisch in Muskelfasern ausschalten, um unerwünschte Effekte in anderen Zellen und Geweben zu vermeiden.

[1] Persönliche Kommunikation mit Eyck Rodenwaldt, Doktorand, Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie, Universitätsmedizin Göttingen, im Februar 2021.

5 Zusammenfassung

Sarkopenie und Kachexie sind medizinische Phänomene, die in unterschiedlicher Gewichtung mit dem Verlust von Muskelkraft und -masse einhergehen und schwerwiegende Beeinträchtigungen von Gesundheit und Lebensqualität verursachen. Eine Schlüsselrolle in ihrer Pathogenese spielt der Transkriptionsfaktor FOXO3. Er stellt daher eine interessante Zielstruktur für die Entwicklung zukünftiger Medikamente dar, denn bisher existiert keine wirksame Therapie für diese beiden *muscle wasting* Erkrankungen. In der vorliegenden Arbeit wurde modellhaft in C2C12-Mausmyoblasten die Ausschaltung von FOXO3 mittels siRNA untersucht. In verschiedenen Versuchen wurden dabei mehrere Fragestellungen bearbeitet.

Zunächst wurden im Sinne einer Methoden-Etablierung unterschiedliche Medien zur Differenzierung der Myoblasten zu Myotuben sowie verschiedene Protokolle zur Transfektion der Zellen miteinander verglichen. Das Differenzierungsmedium mit dem geringsten Serum- und Wachstumsfaktorgehalt zeigte die besten Differenzierungsergebnisse und wurde den Hauptversuchen zugrunde gelegt. Anhand der Transfektionsversuche mit pmaxGFP-Markierung wurden Inkubationszeiten und Ausgangs-Zellzahl für das Transfektionsprotokoll der Hauptversuche festgelegt. Da sich in diesen Vorversuchen nur undifferenzierte Myoblasten nachweisbar mittels Lipofektion transfizieren ließen, wurde in den Hauptversuchen die Transfektion vor Beginn der Differenzierung durchgeführt. Um die Möglichkeit eines *knockdown* von *Foxo3* in C2C12-Zellen und seine Auswirkungen zu untersuchen, wurden die Zellen mit siRNA gegen *Foxo3* transfiziert, acht Tage lang differenziert, unter dem Lichtmikroskop fotografiert und qPCR für *Foxo3*, sein *downstream target Atrogin-1* sowie für die Differenzierungsmarker *Myog* und *MyH4* durchgeführt. Das Einbringen entsprechender siRNA führte 48 h nach Transfektion zu einem *knockdown* von *Foxo3* um knapp 30 % im Vergleich zur Transfektion mit siRNA gegen *Luciferase*. Der signifikante Effekt hielt zwei Tage lang an. Zudem zeigten die transfizierten Zellen eine reduzierte Expression von *Atrogin-1* ebenfalls 48 h nach Transfektion. Für die Differenzierung zeigten sich optisch keine Unterschiede zwischen *knockdown*-Zellen und kontroll-transfizierten Zellen. Ein nachweisbarer Anstieg der *Foxo3*-Expression in beiden Gruppen, sowie ein geringerer Anstieg der Differenzierungsmarker *Myog* und *MyH4* in der *knockdown*-Gruppe sprechen jedoch für eine positive Rolle von FOXO3 in der myogenen Differenzierung und für eine Beeinträchtigung derselben durch die Ausschaltung von FOXO3 in noch undifferenzierten Muskelvorläufern. Diese Interpretation lässt sich anhand aktueller Literatur stützen.

Um den Effekt des *Foxo3 knockdowns* auf die Proliferationsfähigkeit von C2C12-Zellen zu überprüfen, wurde die Konfluenzentwicklung von C2C12 nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo3* oder gegen *Luciferase* im Celigo® Zyotmeter gemessen. Die *knockdown* Zellen zeigten dabei eine deutlich langsamere Zunahme der Konfluenz, entsprechend einer geringeren Proliferationsrate im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Als ergänzende Qualitätskontrolle der verwendeten Methodik sollte ein Einfluss des Transfektionsreagenz Lipofectamine® 2000 auf die Expression von *Foxo3* ausgeschlossen werden. Hierfür wurde der Genexpressionsversuch wiederholt, jedoch mit kontroll-transfizierten Zellen und Zellen, die überhaupt nicht transfiziert wurden. Hier ließ sich kein Unterschied in der *Foxo3*-Expression zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen nachweisen. Dieses Ergebnis stützt die Ergebnisse aus Genexpressionsversuch und Proliferationsassay.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass ein *knockdown* von *Foxo3* mittels siRNA im Zellkultur-Modell möglich ist und auch Auswirkungen auf zelluläre Funktionen hat, welche von FOXO3 beeinflusst werden. Der *knockdown* stellt also eine Herangehensweise dar, um FOXO3 auszuschalten und somit möglicherweise auch der Atrophie im Rahmen von Sarkopenie und Kachexie entgegenzuwirken.

6 Literaturverzeichnis

Abmayr SM, Pavlath GK (2012): Myoblast fusion: lessons from flies and mice. Development 139, 641–656

Andrés V, Walsh K (1996): Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. J Cell Biol 132, 657–666

Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ (2014): Cancer cachexia: understanding the molecular basis. Nat Rev Cancer 14, 754–762

Barreiro E, Jaitovich A (2018): Muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease: molecular basis and potential therapeutic targets. J Thorac Dis 10, S1415–S1424

Bartlett DW (2006): Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. Nucleic Acids Res 34, 322–333

Beaudart C, Zaaria M, Pasleau F, Reginster JY, Bruyère O (2017a): Health outcomes of sarcopenia: a systematic review and meta-analysis. PLOS ONE 12, e0169548

Beaudart C, Biver E, Reginster JY, Rizzoli R, Rolland Y, Bautmans I, Petermans J, Gillain S, Buckinx F, Dardenne N et al. (2017b): Validation of the SarQoL®, a specific health-related quality of life questionnaire for sarcopenia: validation of the SarQoL® questionnaire. J Cachexia Sarcopenia Muscle 8, 238–244

Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA (2012): Building muscle: molecular regulation of myogenesis. Cold Spring Harb Perspect Biol 4, a008342

Bijlsma AY, Meskers CGM, Ling CHY, Narici M, Kurrle SE, Cameron ID, Westendorp RGJ, Maier AB (2013): Defining sarcopenia: the impact of different diagnostic criteria on the prevalence of sarcopenia in a large middle aged cohort. Age (Dordr) 35, 871–881

BioRad: What is real-time PCR (qPCR)? Website der Bio-Rad Laboratories. http://www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU; abgerufen am 02.04.2018

Blau HM, Chiu CP, Webster C (1983): Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. Cell 32, 1171–1180

Bodine SC, Baehr LM (2014): Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. Am J Physiol Endocrinol Metab 307, E469–E484

Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ et al. (2001): Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. Nat Cell Biol 3, 1014–1019

Bollinger LM, Witczak CA, Houmard JA, Brault JJ (2014): SMAD3 augments FoxO3-induced MuRF-1 promoter activity in a DNA-binding-dependent manner. Am J Physiol Cell Physiol 307, C278–C287

Bowen TS, Schuler G, Adams V (2015): Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training: muscle wasting and exercise training. J Cachexia Sarcopenia Muscle 6, 197–207

Brown DM, Parr T, Brameld JM (2012): Myosin heavy chain mRNA isoforms are expressed in two distinct cohorts during C2C12 myogenesis. J Muscle Res Cell Motil 32, 383–390

Bruyère O, Beaudart C, Ethgen O, Reginster JY, Locquet M (2019): The health economics burden of sarcopenia: a systematic review. Maturitas 119, 61–69

Burattini S, Ferri P, Battistelli M, Curci R, Luchetti F, Falcieri E (2004): C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. Eur J Histochem 48, 223–33

Cardarelli F, Digiacomo L, Marchini C, Amici A, Salomone F, Fiume G, Rossetta A, Gratton E, Pozzi D, Caracciolo G (2016): The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. Sci Rep 6, 25879

Chal J, Pourquié O (2017): Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. Development 144, 2104–2122

Chesnoy S, Huang L (2000): Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. Annu Rev Biophys Biomol Struct 29, 27–47

Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, Latres E, Goldberg AL (2009): During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. J Cell Biol 185, 1083–1095

Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, Cooper C, Landi F, Rolland Y, Sayer AA et al. (2019): Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. Age Ageing 48, 16–31

Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC (2004): Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. Methods 33, 95–103

Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, Mehmandoost N, Moazzen F, Mazraeh A, Marmari V et al. (2017): Molecular mechanisms and biological functions of siRNA. Int J Biomed Sci 13, 48–57

Dass CR (2002): Cytotoxicity issues pertinent to lipoplex-mediated gene therapy in-vivo. J Pharm Pharmacol 54, 593–601

De Arcangelis V, Coletti D, Conti M, Lagarde M, Molinaro M, Adamo S, Nemoz G, Naro F (2003): IGF-I-induced differentiation of L6 myogenic cells requires the activity of cAMP-phosphodiesterase. Mol Biol Cell 14, 1392–1404

DeNovix, Inc. (2014): Technical Note 130-Purity-Ratios DS-11 Spectrophotometer

Dentice M, Marsili A, Ambrosio R, Guardiola O, Sibilio A, Paik JH, Minchiotti G, DePinho RA, Fenzi G, Larsen PR et al. (2010): The FoxO3/type 2 deiodinase pathway is required for normal mouse myogenesis and muscle regeneration. J Clin Invest 120, 4021–4030

Essaghir A, Dif N, Marbehant CY, Coffer PJ, Demoulin JB (2009): The transcription of FOXO genes is stimulated by FOXO3 and repressed by growth factors. J Biol Chem 284, 10334–10342

Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, Jatoi A, Kalantar-Zadeh K, Lochs H, Mantovani G et al. (2008): Cachexia: A new definition. Clin Nutr 27, 793–799

Fanzani A, Conraads VM, Penna F, Martinet W (2012): Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. J Cachexia Sarcopenia Muscle 3, 163–179

Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, Jatoi A, Loprinzi C, MacDonald N, Mantovani G et al. (2011): Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. Lancet Oncol 12, 489–495

Florini JR, Magri KA (1989): Effects of growth factors on myogenic differentiation. Am J Physiol Cell Physiol 256, C701–C711

Florini JR, Ewton DZ, Falen SL, Van Wyk JJ (1986): Biphasic concentration dependency of stimulation of myoblast differentiation by somatomedins. Am J Physiol Cell Physiol 250, C771–C778

Gallardo-Escárate C, Álvarez-Borrego J, Von Brand E, Dupré E, Del Río-Portilla MÁ (2007): Relationship between DAPI-fluorescence fading and nuclear DNA content: An alternative method to DNA quantification? Biol Res 40, 29–40

Giresi PG, Stevenson EJ, Theilhaber J, Koncarevic A, Parkington J, Fielding RA, Kandarian SC (2005): Identification of a molecular signature of sarcopenia. Physiol Genomics 21, 253–263

Gómez-Puerto MC, Verhagen LP, Braat AK, Lam EW-F, Coffer PJ, Lorenowicz MJ (2016): Activation of autophagy by FOXO3 regulates redox homeostasis during osteogenic differentiation. Autophagy 12, 1804–1816

Greer EL, Brunet A (2005): FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. Oncogene 24, 7410–7425

Gstraunthaler G, Lindl T: Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. 7. Auflage; Springer Berlin Heidelberg, Berlin 2013

Hay N (2011): Interplay between FOXO, TOR, and Akt. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1813, 1965–1970

Hossain M, Yu D, Bikdeli B, Yu S (2021): Sarcopenia and adverse post-surgical outcomes in geriatric patients: a scoping review. J Frailty Aging 10, 63–69

Hu P, Geles KG, Paik JH, DePinho RA, Tjian R (2008): Codependent activators direct myoblast-specific MyoD transcription. Dev Cell 15, 534–546

Hudson MB, Rahnert JA, Zheng B, Woodworth-Hobbs ME, Franch HA, Price SR (2014): miR-182 attenuates atrophy-related gene expression by targeting FoxO3 in skeletal muscle. Am J Physiol Cell Physiol 307, C314–C319

Ikeda Y, Imao M, Satoh A, Watanabe H, Hamano H, Horinouchi Y, Izawa-Ishizawa Y, Kihira Y, Miyamoto L, Ishizawa K et al. (2016): Iron-induced skeletal muscle atrophy involves an Akt-forkhead box O3-E3 ubiquitin ligase-dependent pathway. J Trace Elem Med Biol 35, 66–76

Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT, Roubenoff R (2004): The healthcare costs of sarcopenia in the united states. J Am Geriatr Soc 52, 80–85

Jiang Y, Singh P, Yin H, Zhou YX, Gui Y, Wang DZ, Zheng XL (2013): Opposite roles of myocardin and atrogin-1 in L6 myoblast differentiation. J Cell Physiol 228, 1989–1995

Joglekar S, Nau PN, Mezhir JJ (2015): The impact of sarcopenia on survival and complications in surgical oncology: A review of the current literature. J Surg Oncol 112, 503–509

Johnson M (2012): Fetal bovine serum. Mater Methods 2012; 2:117. https://www.labome.com/method/Fetal-Bovine-Serum.html; abgerufen am 30.04.2018

Kang SH, Lee HA, Kim M, Lee E, Sohn UD, Kim I (2017): Forkhead box O3 plays a role in skeletal muscle atrophy through expression of E3 ubiquitin ligases MuRF-1 and atrogin-1 in Cushing's syndrome. Am J Physiol Endocrinol Metab 312, E495–E507

Kemmler W, Jakob F, Sieber CC (2017): Sarkopenie - Pathophysiologie und Therapie. Osteologie 26, 7–12

Koppe L, Fouque D, Kalantar-Zadeh K (2019): Kidney cachexia or protein-energy wasting in chronic kidney disease: facts and numbers. J Cachexia Sarcopenia Muscle 10, 479–484

Kuo T, Liu PH, Chen TC, Lee RA, New J, Zhang D, Lei C, Chau A, Tang Y, Cheung E et al. (2016): Transcriptional regulation of FoxO3 gene by glucocorticoids in murine myotubes. Am J Physiol Endocrinol Metab 310, E572 - E585

Kurreck J (2009): RNA Interference: from basic research to therapeutic applications. Angew Chem Int Ed Engl 48, 1378–1398

Landi F, Calvani R, Tosato M, Martone A, Ortolani E, Savera G, Sisto A, Marzetti E (2016): Anorexia of aging: risk factors, consequences, and potential treatments. Nutrients 8, 69

Lang G: Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. 2. Auflage; Springer, Wien 2013

Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE (2006): Protein degradation by the ubiquitin–proteasome pathway in normal and disease states. J Am Soc Nephrol 17, 1807–1819

Lee HY, Chung JW, Youn SW, Kim JY, Park KW, Koo BK, Oh BH, Park YB, Chaqour B, Walsh K et al. (2007): Forkhead transcription factor FOXO3a is a negative regulator of angiogenic immediate early gene CYR61, leading to inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. Circ Res 100, 372–380

Lee JH, Park JW, Kang KS, Park TS (2019): Forkhead box O3 promotes cell proliferation and inhibits myotube differentiation in chicken myoblast cells. Br Poult Sci 60, 23–30

Liguori I, Russo G, Aran L, Bulli G, Curcio F, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D et al. (2018): Sarcopenia: assessment of disease burden and strategies to improve outcomes. Clin Interv Aging 13, 913–927

Liu Y, Ao X, Ding W, Ponnusamy M, Wu W, Hao X, Yu W, Wang Y, Li P, Wang J (2018): Critical role of FOXO3a in carcinogenesis. Mol Cancer 17, 104

Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25, 402–408

Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J et al. (2007): FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. Cell Metab 6, 458–471

Martin TM, Plautz SA, Pannier AK (2015): Temporal endogenous gene expression profiles in response to lipid-mediated transfection. J Gene Med 17, 14–32

Martins R, Lithgow GJ, Link W (2016): Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. Aging Cell 15, 196–207

McMahon DK, Anderson PA, Nassar R, Bunting JB, Saba Z, Oakeley AE, Malouf NN (1994): C2C12 cells: biophysical, biochemical, and immunocytochemical properties. Am J Physiol Cell Physiol 266, C1795–C1802

Mo RH, Zaro JL, Ou JHJ, Shen WC (2012): Effects of Lipofectamine 2000/siRNA complexes on autophagy in hepatoma cells. Mol Biotechnol 51, 1–8

Moresi V, Williams AH, Meadows E, Flynn JM, Potthoff MJ, McAnally J, Shelton JM, Backs J, Klein WH, Richardson JA et al. (2010): Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. Cell 143, 35–45

Morley JE, Anker SD, von Haehling S (2014): Prevalence, incidence, and clinical impact of sarcopenia: facts, numbers, and epidemiology—update 2014. J Cachexia Sarcopenia Muscle 5, 253–259

Mülhardt C: Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics. 7. Auflage; Springer Berlin Heidelberg, Berlin 2013

Naito T (2019): Emerging treatment options for cancer-associated cachexia: A literature review. Ther Clin Risk Manag 15, 1253–1266

Pahor M, Guralnik JM, Ambrosius WT, Blair S, Bonds DE, Church TS, Espeland MA, Fielding RA, Gill TM, Groessl EJ et al. (2014): Effect of structured physical activity on prevention of major mobility disability in older adults: The LIFE Study Randomized Clinical Trial. JAMA 311, 2387–2396

Peng XL, So KK, He L, Zhao Y, Zhou J, Li Y, Yao M, Xu B, Zhang S, Yao H, et al. (2017): MyoD- and FoxO3-mediated hotspot interaction orchestrates super-enhancer activity during myogenic differentiation. Nucleic Acids Res 45, 8785–8805

Pfaffl MW (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. Biospektrum (Heidelb) 92–95

Quotti Tubi L, Canovas Nunes S, Brancalion A, Doriguzzi Breatta E, Manni S, Mandato E, Zaffino F, Macaccaro P, Carrino M, Gianesin K et al. (2017): Protein kinase CK2 regulates AKT, NF-κB and STAT3 activation, stem cell viability and proliferation in acute myeloid leukemia. Leukemia 31, 292–300

Rahman A, Jafry S, Jeejeebhoy K, Nagpal AD, Pisani B, Agarwala R (2016): Malnutrition and Cachexia in Heart Failure. J Parenter Enter Nutr 40, 475–486

Raue U, Slivka D, Jemiolo B, Hollon C, Trappe S (2007): Proteolytic gene expression differs at rest and after resistance exercise between young and old women. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 62, 1407–1412

Rolland Y, Van Kan GA, Gillette-Guyonnet S, Vellas B (2011): Cachexia versus sarcopenia: Curr Opin Clin Nutr Metab Care 14, 15–21

Sakuma K, Aoi W, Yamaguchi A (2017): Molecular mechanism of sarcopenia and cachexia: recent research advances. Pflugers Arch 469, 573–591

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL (2004): Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase Atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. Cell 117, 399–412

Sartorelli V, Fulco M (2004): Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. Sci Signal 2004, re11–re11

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 9, 671–675

Shafiee G, Keshtkar A, Soltani A, Ahadi Z, Larijani B, Heshmat R (2017): Prevalence of sarcopenia in the world: a systematic review and meta- analysis of general population studies. J Diabetes Metab Disord 16, 21

Singh K, Dilworth FJ (2013): Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. FEBS J 280, 3991–4003

Song YJ, Lee H (2010): YB1/p32, a nuclear Y-box binding protein 1, is a novel regulator of myoblast differentiation that interacts with Msx1 homeoprotein. Exp Cell Res 316, 517–529

Spencer JA, Eliazer S, Ilaria RL, Richardson JA, Olson EN (2000): Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by Murf, a striated muscle ring-finger protein. J Cell Biol 150, 771–784

Statistisches Bundesamt: Ältere Menschen in Deutschland und der EU. Wiesbaden 2016

Statistisches Bundesamt: Bevölkerung im Wandel: Annahmen und Ergebnisse der 14. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung. Wiesbaden 2019

Stefanetti RJ, Voisin S, Russell A, Lamon S (2018): Recent advances in understanding the role of FOXO3. F1000Res 7, 1372

Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ (2004): The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. Mol Cell 14, 395–403

Tan BHL, Fearon KCH (2008): Cachexia: prevalence and impact in medicine. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 11, 400–407

Thermo Fisher Scientific Inc.: How cationic lipid mediated transfection works. Website der Thermo Fisher Scientific Inc. //www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/gene-delivery-technologies/cationic-lipid-mediated-delivery/how-cationic-lipid-mediated-transfection-works.html; abgerufen am 18.10.2020a

Thermo Fisher Scientific Inc.: Neurobiology transfection guide. Website der Thermo Fisher Scientific Inc. http: //www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-culture/cell-culture-learning-center/cell-culture-resource-library/cell-culture-transfection-application-notes/neurobiology-transfection-guide.html; abgerufen am 18.10.2020b

Thermo Fisher Scientific, invitrogen by life technologies (2013): Lipofectamine® 2000 Reagent Protocol 2013; Protocol Pub. No. MAN0007824 Rev. 1.0.

Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME (2003): The many forks in FOXO's road. Sci STKE 2003, RE5

Trappe T, Williams R, Carrithers J, Raue U, Esmarck B, Kjaer M, Hickner R (2004): Influence of age and resistance exercise on human skeletal muscle proteolysis: a microdialysis approach. J Physiol 554, 803–813

Tsukamoto S, Shibasaki A, Naka A, Saito H, Iida K (2018): Lactate promotes myoblast differentiation and myotube hypertrophy via a pathway involving MyoD in vitro and enhances muscle regeneration in vivo. Int J Mol Sci 19, 3649

Vaughan VC, Martin P, Lewandowski PA (2013): Cancer cachexia: impact, mechanisms and emerging treatments. J Cachexia Sarcopenia Muscle 4, 95–109

von Haehling S, Anker SD (2014): Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers—update 2014. J Cachexia Sarcopenia Muscle 5, 261–263

Wang T, Larcher L, Ma L, Veedu R (2018): Systematic screening of commonly used commercial transfection reagents towards efficient transfection of single-stranded oligonucleotides. Molecules 23, 2564

Wang Xiaowei, Wang Xiaohui, Varma RK, Beauchamp L, Magdaleno S, Sendera TJ (2009): Selection of hyperfunctional siRNAs with improved potency and specificity. Nucleic Acids Res 37, e152–e152

White JP, Gao S, Puppa MJ, Sato S, Welle SL, Carson JA (2013): Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. Mol Cell Endocrinol 365, 174–186

Whitman SA, Wacker MJ, Richmond SR, Godard MP (2005): Contributions of the ubiquitin–proteasome pathway and apoptosis to human skeletal muscle wasting with age. Pflugers Arch 450, 437–446

Yaffe D, Saxel O (1977): Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. Nature, 270, 725–7

Yamashita A, Hatazawa Y, Hirose Y, Ono Y, Kamei Y (2016): FOXO1 delays skeletal muscle regeneration and suppresses myoblast proliferation. Biosci Biotechnol Biochem 80, 1531–1535

Zhang Y, Xing Y, Zhang L, Mei Y, Yamamoto K, Mak TW, You H (2012): Regulation of cell cycle progression by forkhead transcription factor FOXO3 through its binding partner DNA replication factor Cdt1. Proc Natl Acad Sci 109, 5717–5722

Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL (2007): FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. Cell Metab 6, 472–483

Zou S, Scarfo K, Nantz MH, Hecker JG (2010): Lipid-mediated delivery of RNA is more efficient than delivery of DNA in non-dividing cells. Int J Pharm 389, 232–243

Danksagung

Ich möchte mich bei all jenen herzlich bedanken, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren und mich auf diesem Weg mit Rat und Tat unterstützt haben.

Mein allererster Dank gilt der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Lehmann für die freundliche Aufnahme, sowie meinem Doktorvater Prof. Dr. Arndt Schilling für die Überlassung dieses spannenden Themas und die gute Betreuung mit stets schneller und unkomplizierter Ansprechbarkeit für alle Anliegen und Fragen. Weiterer Dank geht an Prof. Dr. Heide Siggelkow für die Übernahme der Zweitbetreuung meiner Arbeit, für konstruktive Kritik und wichtige Denkanstöße in meinen Fortschrittsberichten.

Besonders danken möchte ich meinem Betreuer PD Dr. Dominik Saul, der meine Arbeit von der Einarbeitung ins Thema bis zum Schreibprozess begleitet hat, jederzeit für mich erreichbar war und meinen Fragen und Problemen stets mit einem offenen Ohr und konstruktiven Ideen begegnet ist. Dr. Kai Böker danke ich sehr für die Einarbeitung in die Labortätigkeit und für die intensive Betreuung meiner Experimente.

Ebenfalls zu großem Dank verpflichtet bin ich Dr. Marina Komrakova, Ramona Castro-Machgut, Kathrin Hannke und Andrea Koch aus dem Forschungsteam der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie, sowie Dr. Milena Ninkovic und Swetlana Sperling aus der Klinik für Neurochirurgie für die Unterstützung in der täglichen Arbeit im Labor, für viele große und kleine Hilfestellungen, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für schöne Tee-Pausen. Jessica Eggert aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie danke ich für den Zugang zum Fluoreszenzmikroskop der Arbeitsgruppe. PD Dr. Robyn Laura Kosinsky danke ich herzlich für die Möglichkeit, das Celigo-Zytometer zu nutzen, für die Beratung bei der Planung verschiedener Versuche und für das Probelesen meiner allerersten Schreibversuche. Dr. Fabian Kück aus der Abteilung für medizinische Statistik danke ich für die eingehende Beratung zur statistischen Aufarbeitung meiner Ergebnisse trotz der Schwierigkeiten zu Corona-Zeiten.