

Aus dem physiologischen Institut, Dahlem  
der Medizinischen Fakultät  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Expressionsmuster der *tis11*-Familie von  
*primary response*-Genen in der  
quergestreiften Muskulatur**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Max Schwarzburger  
aus Krefeld

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. B. Munz

2. Prof. Dr. rer. nat. J. Jankowski

3. Prof. Dr. rer. nat. E. Hildt

Datum der Promotion: 01.06.2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>Muskelzelltypen.....</b>	<b>9</b>
1.1.1	Glatte Muskulatur.....	9
1.1.2	Quergestreifte Muskulatur.....	9
<b>1.2</b>	<b>Entstehung von Muskelgewebe.....</b>	<b>11</b>
1.2.1	Embryologische Aspekte.....	11
1.2.2	Determinierung und Differenzierung von Muskelzellen.....	11
<b>1.3</b>	<b>Die Familie der TIS11-Proteine.....</b>	<b>13</b>
1.3.1	Identifizierung und Charakterisierung.....	13
1.3.2	Regulation der Expression der <i>tis11</i> -Gene.....	15
1.3.3	Funktionen von TIS11-Proteinen.....	17
1.3.4	TIS11-Proteine und Muskeldifferenzierung.....	20
<b>1.4</b>	<b>Fragestellung und Ziele dieser Arbeit.....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>23</b>
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.2	Geräte.....	25
2.1.3	Wasser.....	26
2.1.4	Standardpuffer und Lösungen.....	26
2.1.5	Enzyme.....	27
2.1.6	Antikörper.....	27
2.1.7	Wachstumsfaktoren und Zytokine.....	27
2.1.8	Oligodesoxynukleotide.....	27
2.1.9	Plasmide.....	27
2.1.10	Kommerzielle Kits.....	27

2.1.11	Bakterienstämme .....	28
2.1.12	Eukaryontische Zelllinien .....	28
2.1.13	Tiere .....	28
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.2.1	Zellbiologische Methoden .....	28
2.2.2	Mikrobiologische Methoden .....	32
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	34
2.2.4	Proteinchemische Methoden.....	43
2.2.5	Histologische Methoden.....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Expression von <i>tis11</i>-Genen bei der Myogenese.....</b>	<b>49</b>
3.1.1	Klonierung von Gensonden für <i>tis11</i> und <i>tis11D</i> .....	49
3.1.2	Expression von <i>tis11</i> und <i>tis11D</i> bei der Myogenese.....	50
<b>3.2</b>	<b><i>Tis11B</i>-Expression in Zelllinien mit unterschiedlichem Differenzierungsverhalten .....</b>	<b>51</b>
3.2.1	<i>Tis11B</i> -Expression in C2C12- und C2F3-Zellen .....	51
3.2.2	<i>Tis11B</i> -Expression in RD/18- und RD/12-Zellen .....	53
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen an <i>mdx</i>-Mäusen.....</b>	<b>55</b>
3.3.1	Expression von <i>tis11</i> -Genen in verschiedenen Geweben.....	57
3.3.2	Histologische Analyse der Muskulatur von <i>mdx</i> -Mäusen .....	60
3.3.3	Expression von <i>tis11B</i> in der Muskulatur von <i>mdx</i> -Mäusen .....	66
<b>3.4</b>	<b>Regulation der <i>tis11B</i>-Expression in Kardiomyozyten <i>in vitro</i>.....</b>	<b>67</b>
<b>3.5</b>	<b><i>Tis11B</i>-Expression im Herzmuskelgewebe Coxsackie-Virus B3- infizierter Mäuse.....</b>	<b>73</b>

<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>75</b>
4.1	Die Expression des <i>tis11</i> - und des <i>tis11D</i> -Gens wird bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung <i>in vitro</i> nicht induziert .....	75
4.2	Das <i>tis11B</i> -Transkript stellt sich bei der Analyse von aus kultivierten Zellen gewonnenem Material im <i>Northern Blot</i> als Doppelbande dar .....	76
4.3	Es existieren Hinweise auf eine Korrelation zwischen <i>tis11B</i> -Expression und myogenem Differenzierungspotential .....	76
4.3.1	Differenzierende C2C12- und C2F3-Zellen zeigen ein ähnliches <i>tis11B</i> -Expressionmuster .....	77
4.3.2	Die Expression des <i>tis11B</i> -Gens wird in RD/18- und RD/12-Rhabdomyosarkomzellen während der frühen Phase der Differenzierung nicht induziert .....	77
4.4	Die Gene <i>tis11B</i> und <i>tis11D</i> sind in vielen murinen Geweben exprimiert; das <i>tis11</i> -Gen ist jedoch unter physiologischen Bedingungen in den meisten Geweben nicht oder kaum exprimiert.....	79
4.4.1	Die Gene <i>tis11B</i> und <i>tis11D</i> sind in vielen Geweben von WT- und <i>mdx</i> -Mäusen nachweisbar exprimiert.....	79
4.4.2	Das <i>tis11B</i> -Gen wird in der Muskulatur von <i>mdx</i> -Mäusen differentiell exprimiert .....	81
4.5	Das <i>tis11B</i> -Gen wird in Herzmuskelgewebe <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> differentiell exprimiert .....	83
4.5.1	Die <i>tis11B</i> -Expression in HL-1-Zellen kann durch HGF, TNF- $\alpha$ und TGF- $\beta$ induziert werden.....	83
4.5.2	Im Akutstadium der CVB3-induzierten Myokarditis bei der Maus wird die Expression des <i>tis11B</i> -Gens in der Herzmuskulatur reprimiert.....	85

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>105</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>107</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>109</b>



*„The rabbit-hole went straight on like a tunnel for some way, and then dipped suddenly down, so suddenly that Alice had not a moment to think about stopping herself before she found herself falling down what seemed to be a very deep well. Either the well was very deep, or she fell very slowly, for she had plenty of time as she went down to look about her, and to wonder what was going to happen next.“*

–Lewis Carroll, „*Alice in Wonderland*“

## 5 Zusammenfassung

*Tis11*-Gene kodieren für eine kleine Familie von Proteinen mit einer außergewöhnlichen Tandem-Zinkfingerstruktur. Innerhalb der Familie sind die Gene *tis11*, welches für TTP, den Prototyp der Proteinfamilie, kodiert, sowie *tis11B* und *tis11D*, bisher am besten erforscht.

Diese Gene können durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Hormonen induziert werden. Die durch sie kodierten Proteine binden mRNA und destabilisieren diese. Sie sind damit an der posttranskriptionellen Regulation verschiedener Gene beteiligt. Die Zieltranskripte der TIS11-Proteine kodieren für TNF- $\alpha$ , GM-CSF, VEGF, Cyclin D1 und viele weitere Proteine, die u. a. an der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung beteiligt sind.

Erst kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass zumindest eines der *tis11*-Gene, *tis11B*, bei der Differenzierung von Skelettmuskelzellen induziert wird, wobei dem p38 MAPK-Signaltransduktionsweg eine entscheidende Rolle zukommt. Über die Expressionsmuster der *tis11*-Gene in anderen Muskelzelltypen existierten vor Beginn dieser Arbeit noch keine publizierten Daten.

In dieser Arbeit wurden die Expressionsmuster der *tis11*-Gene in verschiedenen Muskelzelltypen *in vitro* und *in vivo* untersucht. Da bereits zu Beginn der Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Expression des *tis11*- und des *tis11D*-Gens bei der Myogenese zumindest *in vitro* nicht reguliert wird, lag der Schwerpunkt der Arbeit auf dem *tis11B*-Gen.

Dabei fanden sich bei Vergleichsstudien zwischen Zelllinien mit unterschiedlichem Differenzierungsverhalten Hinweise auf eine Korrelation zwischen *tis11B*-Expression und dem myogenen Differenzierungspotential von Skelettmuskelzellen. Darüber hinaus konnte die differentielle Expression von *tis11B* im Skelettmuskelgewebe der *mdx*-Maus, einem *in vivo*-Modell für Muskelzellregeneration und -differenzierung, gezeigt werden. Weiterhin wurde bei Untersuchungen an Kardiomyozyten nachgewiesen, dass *tis11B* auch in diesem Muskelzelltyp differentiiell exprimiert wird. Dabei wird das Gen durch HGF, TGF- $\beta$  sowie TNF- $\alpha$  induziert. Zumindest die Induktion von TNF- $\alpha$  scheint dabei der Regulation weiterer, bisher unbekannter, im Serum vorhandener Faktoren zu unterliegen.

Nicht zuletzt konnte die differentielle Expression von *tis11B* auch in Herzmuskelgewebe *in vivo* gezeigt werden: Bei Mäusen, die an einer akuten, durch Coxsackie-Virus B3 induzierten Myokarditis litten, wurde dabei im Herzmuskelgewebe eine deutlich geringere *tis11B*-Expression als bei gesunden Tieren nachgewiesen.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit dafür, dass dem TIS11B-Protein wichtige, noch näher zu charakterisierende Funktionen sowohl in der Skelett- als auch in der Herzmuskulatur *in vitro* und *in vivo* zukommen könnten.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i> , zweifach destilliertes Wasser
ARE	<i>AU-rich element</i> , adenosin- und uracilreiches Element
AS	Aminosäurerest
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
C	Celsius
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CVB3	Coxsackie-Virus B3
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMD	Duchenne-Muskeldystrophie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DRG	degenerativ-regenerative Gruppe
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i> , extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
et al.	<i>et alii</i> , und andere
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage growth factor</i>
h	<i>hora</i> , Stunde
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
<i>M.</i>	<i>Musculus</i> , Muskel

mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEF	<i>muscle enhancer factor</i>
mg	Milligramm
min	Minute
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
<i>Mm.</i>	<i>Musculi</i> , Muskeln
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure
MW	<i>molecular weight</i> , Molekulargewicht
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
MRF	myogene Regulationsfaktoren
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	<i>nitrogeniummonoxid</i> , Stickstoffmonoxid
NPN	<i>non-peripherally located nuclei</i> ; nicht peripher gelegene Zellkerne
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
<i>p. i.</i>	<i>post infectionem</i> , nach Infektion
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i> , ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSC	<i>saline-sodium citrate</i> , Kochsalzlösung mit Natriumcitrat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i> , trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIS	<i>TPA-induced sequence</i> , TPA-induzierte Sequenz
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TPA	12-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

TTP	Tristetraprolin
TZD	Tandem-Zinkfinger-Domäne
U	<i>Unit</i> , Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
Wo.	Wochen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktosid



## 8 Danksagung

Prof. Dr. Barbara Munz möchte ich für die großartige, vorbildliche Betreuung dieser Arbeit danken. Diese war nicht nur durch große fachliche Kompetenz sondern auch durch immerwährende Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft geprägt.

Große Dankbarkeit gilt auch meiner Partnerin Birgit Wildfeuer fürs Korrekturlesen und dafür, dass sie immer für mich da war und ist.

Besonderer Dank gilt weiterhin meiner Mutter Hildegard Schwarzburger, die schon als Kind meine Begeisterung für die Biologie geweckt hat; ferner meinem Lehrer Bernhard Osterwind, der mir mit viel Witz und Charme die Geheimnisse der Molekularbiologie näherbrachte.

Meiner ganzen Familie möchte ich für die Unterstützung emotionaler und materieller Natur während der Erstellung dieser Arbeit danken.

Für Rat und vor allem Tat bin ich Silvia May mit ihrem großen Engagement zutiefst dankbar.

Gabriela Beyer bin ich für die Einführung in die Geheimnisse der Zellkultur zu Dank verpflichtet.

PD Dr. Karin Klingel möchte ich für die freundliche Bereitstellung der Cocksackie-Mäuse danken.

Luis da Silva danke ich für den Ultra Turrax und viele gute Tipps.

Mein Dank gilt außerdem Nadja Cherradi für die schnelle Bereitstellung des TIS11B-Antikörpers.

Enje Nanninga danke ich für die Zusendung des Bustin-Papers aus der Uni Düsseldorf. Für die Hilfe beim Layout danke ich Jochen Flad.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank natürlich den weiteren Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für die schöne Zeit, die angenehme Atmosphäre, die gegenseitige Hilfe, die lustigen Gespräche und vieles mehr:

Renate Noske-Reimers, Stefanie Adams, Svenja Ehlers, Pinar Akman, Tobias Mück, Felicitas Berger, Christine Hacker, Melanie Busse und Ricarda Neu.



## **9 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.



## 10 Erklärung

„Ich, Max Schwarzburger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: ‚Expressionsmuster der *tis11*-Familie von *primary response*-Genen in der quergestreiften Muskulatur‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“