

1 Einleitung

Ziel dieser Arbeit war es, Wissen über die Funktionen von TIS11-Proteinen, insbesondere TIS11B, in der quergestreiften Muskulatur zu erlangen.

Daher werden in der Einleitung zunächst die verschiedenen Muskelzelltypen vorgestellt. Anschließend wird auf die Entwicklung der Muskulatur und die Differenzierung der Muskelzelle eingegangen.

Der letzte Abschnitt gibt eine Einführung zur Familie der TIS11-Proteine unter besonderer Berücksichtigung von TIS11B.

1.1 Muskelzelltypen

Bei Wirbeltieren unterscheidet man drei Typen von Muskulatur: Die glatte Muskulatur, die Herzmuskulatur und die Skelettmuskulatur. Aufgrund ihres histologischen Erscheinungsbildes werden die beiden zuletzt genannten auch unter dem Begriff „quergestreifte Muskulatur“ zusammengefasst.

Im Folgenden soll kurz auf die einzelnen Muskelzelltypen eingegangen werden.

1.1.1 Glatte Muskulatur

Glatte Muskulatur ist ein Haupteffektor des vegetativen Nervensystems. Da sie nicht ermüdet, kommt sie vor allem dort vor, wo ohne großen Energieaufwand ein mehr oder weniger konstanter Muskeltonus gehalten werden muss, z.B. in der Gefäß- oder Eingeweidemuskulatur.

Glatte Muskelzellen sind meist spindelförmig und haben einen zentral gelegenen Kern. Ihre kontraktile Elemente, die Myofilamente, welche vor allem aus Aktin und Myosin bestehen, liegen geordnet, aber nicht gleichmäßig gebündelt, im Zytoplasma.

In einigen Organen sind die glatten Muskelzellen funktionell durch *gap junctions* verbunden, spezielle Kanalproteine, über die durch Ionenströme die Erregung einer Zelle auf die nachfolgende übertragen wird. So bilden diese Muskelzellen ein geordnet erregbares Netzwerk.

1.1.2 Quergestreifte Muskulatur

Auch in der quergestreiften Muskulatur sind die kontraktile Strukturen in erster Linie aus Aktin und Myosin zusammengesetzt, die Anordnung der Filamente ist jedoch geordneter als bei der glatten Muskulatur: Es lässt sich eine gleichmäßige Abfolge so

genannter Sarkomere beobachten, welche sich lichtmikroskopisch als typische Querstreifung aus helleren und dunkleren Abschnitten darstellt. Dies spiegelt die geordnete Abfolge gebündelter Aktin- und Myosinfilamente wider.

1.1.2.1 Herzmuskulatur

Wie die glatte Muskulatur ist auch die Herzmuskulatur ein wichtiger Effektor des vegetativen Nervensystems. Die einzelnen Zellen sind hier langgestreckt, unregelmäßig verzweigt und haben einen zentralständigen Kern. *In vivo* sind die Zellen in Längsrichtung hintereinander angeordnet und haften über so genannte *Disci intercalares*, Glanzstreifen, aneinander. Hier sind sie durch *gap junctions* verbunden, so dass alle Muskelzellen des Herzens ein geordnet erregbares Netzwerk bilden.

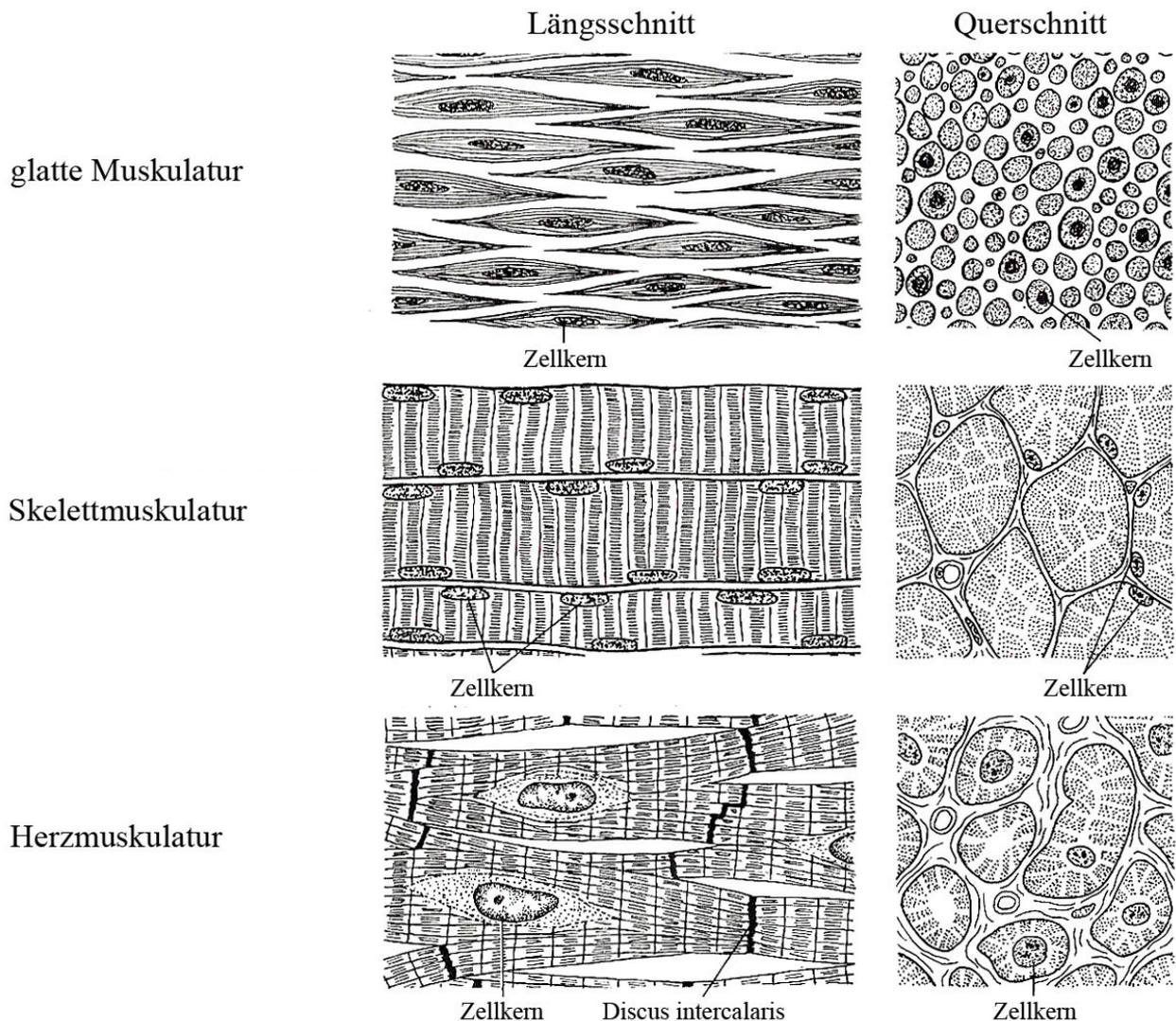


Abbildung 1: Das physiologische Erscheinungsbild der drei Typen von Muskelgewebe in verschiedenen Schnittrichtungen. Man beachte die randständigen Zellkerne bei Skelettmuskelzellen. Aus Schiebler et al. 1997 (4).

1.1.2.2 Skelettmuskulatur

Skelettmuskulatur bildet die Muskeln des Bewegungsapparats und unterliegt größtenteils der Willkürmotorik.

Sie besteht aus bis zu 15 cm langen schlauchförmigen Synzytien, Muskelfasern genannt, welche viele randständige Kerne und die typische Querstreifung aufweisen.

Jede Muskelfaser geht dabei aus der Verschmelzung vieler Myoblasten hervor.

An der Oberfläche der Muskelfasern finden sich Satellitenzellen, bei denen es sich um einkernige, nur teilweise differenzierte Myoblasten handelt. Diese können bei Reparaturvorgängen aktiviert werden, proliferieren, und schließlich mit anderen Satellitenzellen sowie existierenden Muskelfasern verschmelzen und dadurch neues Muskelgewebe ausbilden (4, 93).

Abbildung (Abb.) 1 zeigt das typische histologische Erscheinungsbild der verschiedenen Muskeltypen.

1.2 Entstehung von Muskelgewebe

1.2.1 Embryologische Aspekte

Während der frühen Entwicklung besteht der Säugerembryo aus zwei Keimblättern, Ektoderm und Entoderm. Zwischen diese schiebt sich vom Ektoderm ausgehend eine weitere Zellschicht, die das mittlere Keimblatt, das so genannte Mesoderm, bildet. Aus diesem entwickelt sich ein Großteil der Muskulatur. Eine Ausnahme bildet die innere Augenmuskulatur, die aus dem Neuroektoderm hervorgeht.

Im weiteren Verlauf bildet das Mesoderm verschiedene Abschnitte aus:

Die Somiten, Ursegmente, liegen in enger Nachbarschaft zum Neuralrohr. Ihnen und dem paraxialen Kopfmesoderm entspringt der größere Teil der Skelettmuskulatur. Die ventral davon liegenden Anteile bilden das unsegmentierte viszerale Mesoderm. Aus ihm gehen die glatte Muskulatur und die Herzmuskulatur hervor, außerdem die Skelettmuskulatur des Kopfes, der Kiemenbögen und des Ösophagus (3, 4).

1.2.2 Determinierung und Differenzierung von Muskelzellen

Die Gesamtheit der Vorgänge, durch die die Entwicklungsrichtung einer Zelle festgelegt wird, heißt Determination. Determinationsvorgänge schränken dabei das Entwicklungs-

potential der ursprünglich totipotenten Zelle schrittweise ein. Zuletzt kann sich aus der Zelle nur noch ein Zelltyp entwickeln. Die determinierte Stammzelle zeigt meist noch keine klaren Strukturmerkmale, die auf ihre künftige Entwicklung schließen lassen. Sie unterscheidet sich von anderen Zellen jedoch deutlich bezüglich ihres Genexpressionsmusters.

Beginnt die Zelle, spezifische funktionelle und morphologische Merkmale zu entwickeln, spricht man von Differenzierung. Der terminalen Differenzierung der Muskelzelle geht der Austritt aus dem Zellzyklus voraus, so dass sich die differenzierte Zelle nicht mehr teilen kann. Dementsprechend haben viele Regulatoren der Differenzierung auch eine Funktion bei der Kontrolle des Zellzyklus (11, 20, 44).

Die Determination zukünftiger Skelettmuskelzellen beginnt in der Regel im Somiten. Dabei wird eine Gruppe strukturell und funktionell eng verwandter Transkriptionsfaktoren, MyoD, Myf-5, Myogenin und MRF-4, in hoch geordneter Abfolge aktiviert. Sie werden daher als myogene Regulationsfaktoren (MRF) bezeichnet. Weitere für die Myogenese bedeutsame Transkriptionsfaktoren sind Pax-3 und die *muscle enhancer factor-2*-Gruppe (MEF-2; Isoformen A-D) (11, 20).

Direkte Zellkontakte, meist innerhalb des entstehenden Muskelgewebes, aber auch Substanzen in der extrazellulären Matrix (ECM) benachbarter Gewebe, können Proliferation, Determination und Differenzierung von Muskelzellen und ihren Vorläufern beeinflussen (26).

Auch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine haben eine wichtige regulatorische Funktion. Ihre Wirkung hängt dabei sowohl von Art und Menge spezifischer Rezeptoren auf der Zelloberfläche als auch von den von diesen aktivierten Signaltransduktionswegen ab.

So stellen beispielsweise *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor- β* (TGF- β) und *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) proliferationsfördernde Stimuli dar, die den Austritt aus dem Zellzyklus und somit die Myogenese hemmen (20, 42, 90). Insulin und *insulin-like growth factor-* (IGF-) 1 hingegen sind die einzigen bekannten Wachstumsfaktoren, die die Skelettmuskelzellendifferenzierung fördern (1, 42, 110).

Jeder dieser Faktoren aktiviert nach Bindung an seinen Rezeptor spezifische Signaltransduktionswege, von denen mehrere für die Myogenese bedeutsam sind: So vermittelt beispielsweise die *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK) die zeitlich geordnete Expression von *mrf*, *mef-2* und anderer für die Myogenese bedeut-

samer Gene. Auch der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg ist für die Myogenese essentiell (48, 61).

Eine schematische Übersicht der Vorgänge bei der Entwicklung der murinen Skelettmuskulatur gibt Abb. 2.

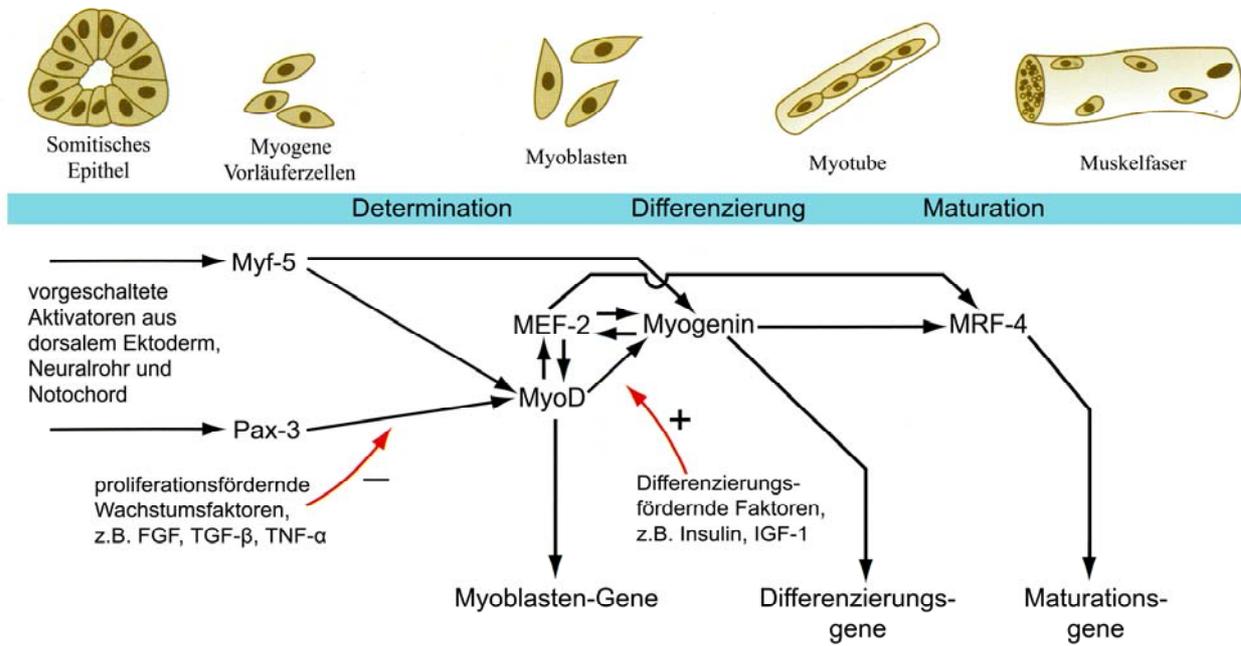


Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung der frühen Skelettmuskelentwicklung. Aus Carlson BM 2004 (20), modifiziert nach Miller et al. 1988, Florini & Magri 1989, Cheng et al. 1993, Kaushal et al. 1994, Naidu et al. 1995, Al-Khalili et al. 2004 (1, 24, 42, 59, 90, 96).

1.3 Die Familie der TIS11-Proteine

1.3.1 Identifizierung und Charakterisierung

Im Jahr 1987 wurden im Rahmen eines genetischen Screens mit murinen Fibroblasten der Zelllinie 3T3 Gene identifiziert, deren Expression durch 12-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) reguliert wird. TPA ist ein Mitogen und Tumorpromotor und aktiviert direkt den Proteinkinase C- (PKC-) Signaltransduktionsweg. Die so identifizierten Gene wurden *TPA-induced sequences* (TIS) genannt (76, 134).

Das *tis11*-Gen kodiert für das Protein Tristetraprolin (TTP; Synonyme: TIS11, Nup475, Zfp36, G0S24). Es ist Prototyp der Cys-Cys-Cys-His- (CCCH-) Tandem-Zinkfinger-Klasse von Proteinen. Diese besitzen zwei ungewöhnliche Zinkfinger motive mit dem Aminosäuremuster $CX_8CX_5CX_3H$, wobei X einen beliebigen Aminosäurerest darstellt. Zwischen den drei Cysteinresten und dem Histidinrest ist ein Zinkion als Komplex

gebunden. Die beiden Zinkfinger liegen genau 18 Aminosäurereste (AS) voneinander entfernt (35, 81, 135, 138).

Bei der systematischen Suche nach *tis11*-verwandten Genen wurden das *tis11B*-Gen, welches für TIS11B (Synonyme: Zfp3611, BRF-1, ERF-1, cMG1, Berg36) und das *tis11D*-Gen, welches für TIS11D (Synonyme: Zfp3612, BRF-2, ERF-2) kodiert, gefunden. Das *tis11C*-Gen kodiert vermutlich nicht für ein funktionelles Protein und stellt somit ein Pseudogen dar.

A		mRNA gesamt (bp)	kodierende Sequenz (bp)	Proteinlänge (AS)	MW kalk. (kD)	MW Elpho (kD)
Maus	TTP	1765	960	319	33,62	34
	TIS11B	2986	1017	338	36,39	38
	TIS11D	3537	1455	484	50,08	—
Mensch	TTP	1746	981	326	34,01	34
	TIS11B	3022	1017	338	36,32	38
	TIS11D	2528	1485	494	51,07	—

B	Maus		C	Mensch		D	ges.	TZD
	TIS11B	TIS11D		TIS11B	TIS11D			
TTP	71%	71%	TTP	72%	72%	TTP	81%	97%
TIS11B	71%	92%	TIS11B	72%	92%	TIS11B	98%	100%
						TIS11D	77%	100%

Tabelle 1: Eigenschaften und Homologie der murinen und humanen TIS11-Proteine sowie zugrunde liegender Transkripte.

A – Biochemische Parameter: Gesamtlänge des Transkripts in Basenpaaren (bp), Länge der kodierenden mRNA-Sequenz in bp, Länge des Proteins in Aminosäureresten (AS), kalkuliertes Molekulargewicht (MW) des Proteins in Kilodalton (kD), elektrophoretisch ermitteltes MW in kD (38).

B & C – Prozent Identität der 67 AS langen Tandem-Zinkfinger-Domäne (TZD) von TIS11-Proteinen untereinander bei Maus bzw. Mensch (38, 127).

D – Prozent Identität von murinen zu humanen TIS11-Proteinen in der gesamten AS-Sequenz (ges.) und innerhalb der TZD (38, 127).

Im Folgenden werden die oben genannten Gene in ihrer Gesamtheit als „*tis11*-Gene“, und die zugehörigen Proteine als „TIS11-Proteine“ zusammengefasst, im Gegensatz zu „*tis11*-Gen“, womit das einzelne Gen gemeint ist, das für das Protein TTP kodiert.

Alle drei TIS11-Proteine haben eine auffallend hoch konservierte Sequenz von 67 AS gemeinsam, in der die Tandem-Zinkfinger liegen. Die Sequenzübereinstimmung von TTP und TIS11B in dieser Tandem-Zinkfinger-Domäne (TZD) liegt bei 71%, die von TIS11B und TIS11D bei 92%. Letztere weisen also untereinander einen höheren Grad

an Homologie auf als jeweils zu TTP. Auch beim Menschen sind drei TIS11-Proteine bekannt, welche den oben beschriebenen murinen Proteinen entsprechen (136). Eine Übersicht über die Eigenschaften der verschiedenen murinen und humanen TIS11-Proteine sowie deren Homologie untereinander gibt Tabelle 1.

Mit Zfp36l3 wurde bei der Maus und bei der Ratte kürzlich ein weiterer Vertreter der TIS11-Familie entdeckt. Es handelt sich dabei um ein plazentaspezifisches Protein. Bisher gibt es jedoch keine Hinweise auf die Existenz dieses Proteins bei anderen Säugern (9).

Sowohl verschiedene TIS11-Isoformen als auch andere Proteine mit dem charakteristischen CCCH-Tandem-Zinkfinger sind in einer Vielzahl unterschiedlicher Spezies gefunden worden. Wie bei der Maus und beim Menschen sind sie u. a. bei der Ratte (30, 45), beim Rind (25), beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* (31), beim Zebraquarienfisch (132), bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* (7), beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (83) und sogar bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (82) nachweisbar. Das Vorkommen bei diversen verschiedenen Spezies, von der Hefe bis zum Menschen, lässt auf eine starke Konservierung der entsprechenden Gene im Evolutionsprozess schließen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass TIS11-Proteine Regulatoren grundlegender zellbiologischer Prozesse bei Eukaryonten sind.

1.3.2 Regulation der Expression der *tis11*-Gene

In Fibroblasten wie auch in Makrophagen, Darmepithelzellen und in einer Vielzahl weiterer Zelltypen kann die Expression von *tis11*-Genen durch TPA und andere Mitogene und Wachstumsfaktoren induziert werden. Beispielsweise seien hier *epidermal growth factor* (EGF), FGF (77), TNF- α (18), *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) (134), Interleukin- (IL-) 6 (97), TGF- β (101), Interferone (112), Insulin und IGFs (30, 73) genannt. Dabei sind die *tis11*-Gene so genannte *primary response genes* (76, 134), was bedeutet, dass für die Induktion ihrer Expression keine Neusynthese weiterer Proteine erforderlich ist (139). Aus diesem Grund geht die Induktion der *tis11*-Gene nach Mitogenstimulation normalerweise ausgesprochen schnell vonstatten, ist jedoch oft relativ kurzlebig (76, 77, 134).

Neben Mitogenen und Wachstumsfaktoren gibt es noch andere Faktoren, welche die Expression von Genen der *tis11*-Familie induzieren können: In Bezug auf das *tis11B*-Gen ist beispielsweise bekannt, dass es in jeweils spezifischen Zelltypen durch die

Hormone Angiotensin II (ATII) (45), Parathyrin (PTH) (108) und Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) (25) induziert wird. ACTH ist ein Hormon, dessen Sekretion einer zirkadianen Rhythmik unterliegt, und das bei Säugern in die Steuerung des Schlaf-Wach-Rhythmus eingebunden ist (104). In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass für *tis11B* bei der Maus *in vivo* eine parallele zirkadiane Regulation der Expression in Leber und Herz nachgewiesen wurde (123).

Auch mechanische Einflüsse können die Expression von *tis11*-Genen regulieren: In Kardiomyozyten der Ratte konnte eine Induktion der *tis11B*-Expression durch mechanische Dehnungsbelastung *in vitro* und akute kardiale Drucküberlastung *in vivo* gezeigt werden (86).

Des Weiteren wird die Expression von *tis11B* und *tis11D* durch Butyrat reguliert, welches ein bedeutender Modulator der Differenzierung vieler Zelltypen ist (84). Für das *tis11*-Gen konnte außerdem eine Induktion durch die Schwermetalle Cadmium und Zink nachgewiesen werden (39).

Auf intrazellulärer Ebene wird die Induktion der *tis11*-Gene vor allem durch PKC- und p38 MAPK-abhängige Signaltransduktionswege vermittelt (14, 45, 77, 85, 141).

Zumindest TTP kann an die eigene *messenger*-Ribonukleinsäure (mRNA) binden und diese destabilisieren (siehe 1.3.3). Somit ist dieses Protein vermutlich über einen *Feedback*-Mechanismus an der Regulation der eigenen Expression beteiligt (131).

Zusätzlich zur Regulation der Expression der *tis11*-Gene können TIS11-Proteine post-translational modifiziert und dadurch möglicherweise in ihrer Aktivität moduliert werden: Es konnte gezeigt werden, dass TTP im Anschluss an die Stimulation mit verschiedenen Mitogenen, darunter TPA, Serum, FGF und *platelet-derived growth factor* (PDGF), an Serinresten phosphoryliert wird (129). Diese Phosphorylierung wird zumindest teilweise durch p38 MAPK und Proteinkinase B vermittelt und wirkt sich u. a. negativ auf die Bindungsfähigkeit von TIS11-Proteinen an RNA und DNA (siehe 1.3.3) aus. Außerdem wird durch Phosphorylierung die Bindung an bestimmte andere Proteine reguliert, die ihrerseits die Aktivität der TIS11-Proteine beeinflussen können (17, 85, 87, 115, 122, 141).

Schließlich gibt es Hinweise darauf, dass die Aktivität der TIS11-Proteine über ihr subzelluläres Verteilungsmuster bzw. ihre intrazelluläre Lokalisation kontrolliert wird: Nach Stimulation mit verschiedenen Mitogenen erfolgt innerhalb weniger Minuten, deutlich vor Beginn der Induktion der *tis11*-Gene, eine Translokation von TIS11-Prote-

inen aus dem Nukleus ins Zytosol (130). An dieser Translokation sind verschiedene Transportmechanismen beteiligt, die teilweise über die TZD vermittelt werden. Somit ist es denkbar, dass TIS11-Proteinen in unterschiedlichen Zellkompartimenten spezifische Funktionen zukommen (56, 105).

1.3.3 Funktionen von TIS11-Proteinen

Aufgrund der in allen TIS11-Proteinen vorkommenden Zinkfinger, welche nukleinsäurebindende Strukturen darstellen, wurde zunächst angenommen, dass TIS11-Proteine als Transkriptionsfaktoren wirken. Tatsächlich konnte eine transkriptionshemmende Aktivität von TTP in Bezug auf die für die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-8 kodierenden Gene nachgewiesen werden (141).

Außerdem konnte für TTP auch eine unspezifische transkriptionsstimulierende Aktivität gezeigt werden. Diese wird jedoch nicht über die TZD, sondern über die N-terminale Region des Proteins vermittelt (95). Gleiches konnte für YTIS11, das TTP-homologe Protein der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden (82).

Darüber hinaus weisen alle TIS11-Proteine neben DNA- auch RNA-Bindungsaktivität auf. Über die TZD binden sie direkt an so genannte *AU-rich elements* (AREs). Dies sind Sequenzregionen mit außergewöhnlich vielen Adenosin- und Uracilresten, die außerhalb des Leserahmens am 3'-Ende vieler kurzlebiger mRNAs liegen. AREs stellen dabei ein wichtiges Signal für den schnellen mRNA-Umsatz in Säugetierzellen dar und sind besonders häufig in mRNAs zu finden, die für Protoonkogene, Interleukine und Zytokine kodieren (18, 69, 70, 118, 137).

Die Bindung von TIS11-Proteinen an ein ARE führt zur Destabilisierung und zum schnellen Abbau der entsprechenden mRNA. Letztlich kommt es dadurch also zu verminderter Expression des zugehörigen Gens. Am Anfang des Abbauprozesses steht dabei in der Regel die Deadenylierung, d. h. der Abbau des Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA (68, 69). Dieser Effekt scheint zumindest teilweise auf einer Stimulierung der Poly(A)-Ribonuklease durch TIS11-Proteine zu beruhen (71).

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass sowohl für die Deadenylierung als auch für den nachfolgenden Abbau der mRNA die Bindung einer zum ursprünglichen Transkript komplementären *small interfering*-RNA (siRNA) notwendig ist, die vermutlich durch TIS11-Proteine vermittelt wird. An diese siRNA bindet dann der Proteinkomplex *RNA-induced silencing complex* (RISC). Für einige der in diesem Komplex enthaltenen

Proteine konnte eine Interaktion mit TTP nachgewiesen werden (54). RISC ist eine Komponente des *RNA interference*- (RNAi-) Mechanismus, der in eukaryontischen Zellen für posttranskriptionelles *gene silencing*, also die negative Regulation von Genen, verantwortlich ist (47). Da es Hinweise gibt, dass zumindest TTP seinerseits eine Rolle beim RNAi-Mechanismus spielt (34), ist denkbar, dass TIS11-Proteine ein Bindeglied zwischen diesem und dem ARE-vermittelten mRNA-Abbau darstellen.

Der eigentliche Abbau der mRNA erfolgt schließlich durch eine Reihe verschiedener Proteine und Proteinkomplexe, darunter das Exosom, die von TIS11-Proteinen, möglicherweise im Komplex mit RISC, rekrutiert und aktiviert werden.

Während die Bindungsdomäne für die RNA-abbauenden Enzyme ausschließlich in der N-terminalen Region der TIS11-Proteine liegt, sind sowohl in der N- als auch in der C-terminalen Region dieser Proteine verschiedene Signale lokalisiert, die für die Regulation der Aktivität der RNA-abbauenden Enzyme wichtig sind (22, 54, 80).

Eine schematische Übersicht der Domänenstruktur von TIS11-Proteinen gibt Abb. 3.

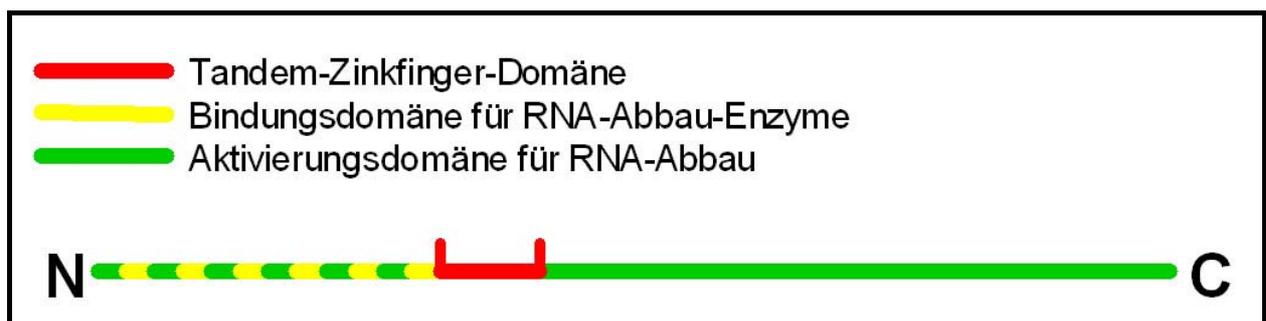


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der TIS11-Proteine. Der TZD kommen vielfältige Funktionen zu, u. a. Bindung von mRNA und von Translokationsproteinen. Grafik: M. Schwarzburger; nach Lai et al. 1999, Lai et al. 2000, Phillips et al. 2002, Lykke-Andersen und Wagner 2006 (69, 70, 80, 105).

Der beschriebene, über TIS11-Proteine vermittelte posttranskriptionelle Regulationsmechanismus ist am besten in Bezug auf die für das proinflammatorische Zytokin TNF- α kodierende mRNA untersucht. Da die Expression der *tis11*-Gene selbst durch TNF- α induziert wird, scheint es sich um einen negativen Rückkopplungsmechanismus zu handeln (18, 69, 70). Weitere Zieltranskripte sind die für GM-CSF und IL-3 kodierenden mRNAs. Diese Faktoren sind ebenfalls Zytokine, die Proliferation und Differenzierung verschiedener Immunzellen regulieren (19, 68, 121).

In Bezug auf TTP wurden inzwischen noch eine Reihe weiterer Ziele für den ARE-vermittelten mRNA-Abbau identifiziert, darunter die Transkripte des *cyclooxygenase-2* (COX-2)-Gens, welches für ein an der Prostaglandinsynthese beteiligtes Enzym kodiert (113), des *plasminogen activator inhibitor 2* (PAI-2)-Gens, welches für einen Regulator

der Blutgerinnung kodiert (140), und des *immediate-early response 3* (*Ier3*)-Gens, das eine Rolle bei der physiologischen Kontrolle des Blutdrucks spielt (72). Außerdem wird die Stabilität der Transkripte des *cyclin D1*- und des *c-myc*-Gens, welche für zwei grundlegende Regulatoren des Zellzyklus kodieren, durch TTP reguliert (87).

Da viele der so identifizierten Faktoren Regulatoren des Zellwachstums und der Zellproliferation sind, liegt nahe, dass auch TIS11-Proteine eine Rolle bei der Regulation dieser Prozesse spielen. Ferner scheinen sie wichtige Funktionen bei der Modulierung apoptotischer Prozesse zu übernehmen (52, 55).

Die Funktion von TIS11-Proteinen als Regulatoren der Synthese von TNF- α scheint auch *in vivo* bedeutsam zu sein: *Tis11*-defiziente Mäuse kommen gesund zur Welt, entwickeln jedoch innerhalb weniger Wochen ein hyperinflammatorisches Syndrom mit myeloider Hyperplasie, Kachexie, erosiver Arthritis, Dermatitis, Konjunktivitis und Glomerulonephritis. Obwohl keine erhöhten TNF- α -Spiegel im Serum gemessen wurden, lässt sich die Symptomatik durch Administration eines neutralisierenden TNF- α -Antikörpers nahezu vollständig revertieren, was darauf hinweist, dass der Phänotyp tatsächlich in erster Linie durch eine erhöhte Produktion dieses proinflammatorischen Zytokins vermittelt wird (128). Untersuchungen an transgenen Mäusen, die ein humanes *tnf- α* -Gen exprimierten, welches im 3'-Bereich so verändert war, dass das Transkript kein ARE enthielt, ergaben nahezu identische Befunde, auch in Hinblick auf die Reversibilität der Symptomatik (60). Dies unterstreicht zusätzlich die Relevanz der ARE-vermittelten posttranskriptionellen Regulation der TNF- α -Synthese durch TIS11-Proteine.

Für TIS11B und TIS11D werden ähnliche *in vivo*-Funktionen wie für TTP vermutet; hierzu existieren jedoch bisher keine Daten:

tis11B-*Knockout*-Mäuse sterben um den 11. Embryonaltag aufgrund eines Plazentadefekts. Bei genauerer Untersuchung der Embryos wurden extra- und intraembryonale Gefäßanomalien und Herzfehler gefunden. Außerdem lag eine Überproduktion des für die Angiogenese bedeutsamen *vascular endothelial growth factor* (VEGF) vor (124). Tatsächlich konnte kürzlich gezeigt werden, dass auch die *vegf*-mRNA eine Zielstruktur für die Bindung und Destabilisierung durch TIS11-Proteine darstellt. TIS11B spielt darüber hinaus eine Rolle bei der translationalen Regulation der *vegf*-Expression (8, 27). Für *tis11D* konnte bisher keine echte *Knockout*-Maus generiert werden, es existiert jedoch ein transgenes Modell, bei dem ein N-terminal inkomplettes TIS11D gebildet wird. Die Tiere unterscheiden sich makroskopisch nicht vom Wildtyp (WT), zeichnen

sich jedoch durch eine Infertilität der Weibchen aus, da sich die Embryos nicht über das Zweizellstadium hinaus entwickeln (107).

Diesen Daten zufolge scheinen zumindest TIS11B und TIS11D eine essentielle Rolle bei der frühen Embryonalentwicklung der Maus zu spielen.

1.3.4 TIS11-Proteine und Muskeldifferenzierung

Wie unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen konnte, wird das *tis11B*-Gen in murinen Myoblasten während der Differenzierung stark induziert. Dabei kommt dem p38 MAPK-Signaltransduktionsweg eine bedeutende Rolle zu. Eine Hemmung dieser Induktion mittels siRNA-Technologie führt dabei zu einer erhöhten Proliferationsrate der Myoblasten und zu verminderter Expression myogener Differenzierungsmarker (14).

Für das mit *tis11*-Genen stark homologe *Drosophila*-Gen *muscleblind* wurde die Beteiligung an der Regulation der Myogenese funktionell nachgewiesen (5, 7). Zu *muscleblind* homologe Gene wurden inzwischen bei vielen Spezies, auch beim Menschen und bei der Maus, gefunden (57, 103).

Über einen möglichen Wirkmechanismus der TIS11-Proteine bei der Myoblastendifferenzierung ist bisher nichts bekannt. Jedoch werden *tis11*-Gene durch TNF- α induziert, TIS11-Proteine inhibieren aber ihrerseits die Expression des *tnf- α* -Gens, scheinen also Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus zu sein (siehe 1.3.3). Während exogenes TNF- α die Myoblastendifferenzierung hemmt, wird in der frühen Myogenese das *tnf- α* -Gen in Myoblasten induziert. Dieses endogen produzierte TNF- α ist notwendig für die normale Differenzierung der Muskelzelle (75). Es ist deshalb denkbar, dass TIS11-Proteine die Myogenese regulieren, indem sie die Stabilität der *tnf- α* -mRNA beeinflussen und so die Menge des von der Zelle produzierten und sezernierten Zytokins modulieren.

1.4 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Die zuletzt erwähnten Forschungsergebnisse zeigen, dass TIS11B mit großer Wahrscheinlichkeit eine wichtige Funktion bei der Myogenese innehat. Vor Beginn dieser Arbeit war jedoch unbekannt gewesen, ob auch in anderen experimentellen Modellen als in dem von unserer Arbeitsgruppe bis dahin verwendeten C2C12-Zellkulturmodell eine differentielle Expression von *tis11B* oder anderen *tis11*-Genen mit Differenzierungs- und Regenerationsprozessen der quergestreiften Muskulatur einhergeht.

Daher sollten in der vorliegenden Arbeit insbesondere folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist die differentielle Expression bei der Myogenese ein spezifisches Merkmal von *tis11B* oder haben auch andere *tis11*-Gene diese Eigenschaft?

Eine Hypothese zur Funktion von TIS11-Proteinen bei der Myogenese ist ihre Regulation über die Destabilisierung von *tnf- α* -mRNA (siehe 1.3.4). Letzteres ist eine von vielen gemeinsamen Funktionen aller TIS11-Proteine. Es war daher denkbar, dass auch an der Regulation der Myogenese neben TIS11B weitere TIS11-Proteine, möglicherweise funktionell redundant, beteiligt sind. Daher sollten auch *tis11* und *tis11D* auf eine eventuelle differentielle Expression in murinen Myoblasten hin untersucht werden.

2. Stehen das Differenzierungspotential einer Skelettmuskelzelle und die Expression von *tis11*-Genen, insbesondere von *tis11B*, generell in einer Relation zueinander?

Eine Möglichkeit, Hinweise auf die Funktion dieser Proteine bei der Entwicklung von Muskulatur zu erhalten, ist die Analyse der Expression ihrer Gene in Muskelzelllinien mit unterschiedlichem, teilweise pathologischem Differenzierungsverhalten. Für diese Arbeit war vor allem der direkte Vergleich von Zelllinien mit gleichem genetischem Hintergrund, aber unterschiedlichem Differenzierungspotential, interessant. Da TIS11-Proteine bei vielen Zell- und Gewebstypen in Prozesse der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose eingebunden sind (siehe 1.3.3), war ferner denkbar, dass sich bei Zelllinien mit gestörtem Wachstumsverhalten auch eine aberrante Expression von für die Myogenese relevanten *tis11*-Genen nachweisen lässt.

3. Lässt sich die differentielle Expression von *tis11B* (und ggf. von *tis11* und *tis11D*) bei der Myogenese auch *in vivo* nachweisen?

Die vor Beginn dieser Arbeit existierenden Daten zu diesem Thema basierten ausschließlich auf *in vitro*-Experimenten. Daher sollte ein geeignetes Modell für die Myogenese *in vivo* gefunden, und die Expression von relevanten *tis11*-Genen daran untersucht werden.

4. Wird *tis11B* (bzw. *tis11* und *tis11D*) auch in anderen Muskelgewebstypen (differentiell) exprimiert?

Vor Beginn dieser Arbeit existierten keine Daten darüber, ob *tis11*-Gene auch in anderen Muskelgewebstypen außer der Skelettmuskulatur exprimiert werden, und welche Funktion ihre Proteine dort haben könnten. Zur Klärung dieser Fragen sollte daher in dieser Arbeit auch Herzmuskelgewebe unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen mittels geeigneter *in vitro*- und *in vivo*-Modelle untersucht werden.