

3 Ergebnisse

3.1 Expression von *tis11*-Genen bei der Myogenese

Bei einem in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten genetischen *Screen*, bei dem Gene gesucht wurden, die während der Myogenese differentiell exprimiert werden, zeigte u. a. das *tis11B*-Gen eine starke Induktion während der frühen Phase der Differenzierung (14). Deshalb wurde in unserer Arbeitsgruppe begonnen, dieses Gen hinsichtlich seiner Rolle bei der Muskelzellentwicklung genauer zu untersuchen (siehe 1.3.4).

Da TIS11-Proteine viele gemeinsame Funktionen haben, stellte sich dabei zunächst die Frage, ob *tis11* und *tis11D* ebenfalls bei der Myogenese differentiell exprimiert werden.

3.1.1 Klonierung von Gensonden für *tis11* und *tis11D*

Um die Expression von *tis11* und *tis11D* mittels *Northern Blot*-Analyse (siehe 2.2.3.6.4) untersuchen zu können, mussten zunächst für beide Gene geeignete rekombinante Plasmide zur Transkription digoxigeninmarkierter *antisense*-RNA-Sonden hergestellt werden, da diese vor Beginn dieser Arbeit in unserem Labor nicht zu Verfügung standen.

Zur Herstellung dieser Plasmide wurden PCR-Reaktionen mit muriner gesamtzellulärer cDNA und zu diesem Zweck entworfenen *tis11*- und *tis11D*-spezifischen *Primern* (siehe 2.1.8) durchgeführt, um cDNA-Fragmente geeigneter Größe aus den jeweiligen Genen zu amplifizieren. Diese Fragmente wurden mittels Standard-Klonierungstechniken in einen geeigneten Transkriptionsvektor eingefügt, in *E. coli* amplifiziert und aufgereinigt. Die Plasmide dienten dann nach Linearisierung als Matrize für die Transkription durch eine geeignete RNA-Polymerase in *antisense*-Orientierung (siehe 2.2.3.6.5).

Zur Überprüfung der Spezifität der neu generierten Sonden wurden quieszente 3T3-Fibroblasten mit Serum stimuliert. Es ist bekannt, dass dies zu einer Induktion von *tis11* führt (136). Zur Induktion von *tis11D* durch Serumstimulation gibt es bisher keine publizierten Daten. Es ist jedoch bereits in quieszenten Zellen messbar exprimiert und lässt sich durch Behandlung der Zellen mit TPA induzieren (136). Da TPA, wie die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren, den PKC-Signaltransduktionsweg aktiviert, wurde hier eine Induktion von *tis11D* erwartet.

Aus quieszenten Zellen sowie 1h und 3h nach Versuchsbeginn wurde gesamtzelluläre RNA extrahiert. Im Anschluss daran wurde diese mittels *Northern Blot*-Verfahren auf

eine geeignete Membran transferiert und dann mit den zu testenden Sonden hybridisiert. Wie Abb. 4 zeigt, ließen sich mit beiden Sonden Transkripte der erwarteten Größe nachweisen, wobei die *tis11*-mRNA eine Größe von 1765bp und die *tis11D*-mRNA eine Größe von 3537bp aufweist (38).

Weiterhin wurde wie erwartet für *tis11* in quieszenten Fibroblasten eine Basalexpression unterhalb der Nachweisgrenze und 1h nach Serumbehandlung eine starke Induktion

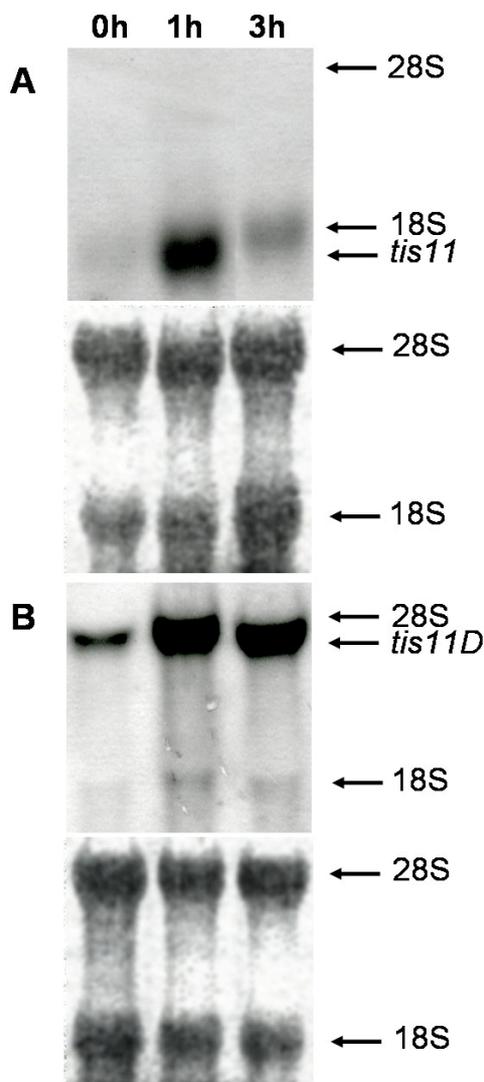


Abbildung 4: Northern Blot-Analyse der *tis11*- (A) und *tis11D*- (B) Expression in Fibroblasten nach Serumstimulation.

Es wurden jeweils 2 µg gesamtzelluläre RNA pro Spur aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit den beiden neu generierten Sonden. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren diente die unter beiden Blots gezeigte Methyleneblau-Färbung. Man beachte die Detektion *tis11*- und *tis11D*-spezifischer Banden in den jeweils charakteristischen Größen, deren Intensität nach Serumstimulation zunahm.

tion der Genexpression beobachten, die bereits nach 3h wieder deutlich schwächer war (Abb. 4A). Ebenfalls erwartungsgemäß zeigte das *tis11D*-Gen in den quieszenten Zellen eine deutlich messbare Basalexpression. Durch Serumbehandlung fand eine starke Induktion statt, die deutlich langsamer zurückging als die von *tis11* (Abb. 4B). Dies entspricht dem für *tis11D* beschriebenen Expressionsmuster in Fibroblasten, die mit TPA behandelt worden waren (136).

Die Funktionalität und Spezifität der beiden neu synthetisierten Sonden konnte damit bestätigt werden.

3.1.2 Expression von *tis11* und *tis11D* bei der Myogenese

C2C12 ist eine murine Myoblasten-Zelllinie, deren Differenzierungszustand und -kapazitäten mit dem der Myoblasten in den Somiten vergleichbar ist. Daher stellt sie ein gutes System zur Untersuchung der Myogenese *in vitro* dar. Bereits die Induktion von *tis11B* während der Myogenese (14) wurde bei Experimenten mit dieser Zelllinie entdeckt. Nun sollte an ihr mit Hilfe der neuen, spezifischen Gensonden auch die Expression von *tis11* und *tis11D* bei der Myogenese genauer untersucht werden.

Hierfür wurden die Zellen in Kultur genommen und bei Erreichen von ca. 90% Konfluenz zur Differenzierung angeregt. Aus proliferierenden Zellen sowie 20h und 57h nach Versuchsbeginn wurde die gesamtzelluläre RNA extrahiert und mittels *Northern Blot*-Verfahren auf eine Expression des *tis11*- und des *tis11D*-Gens hin untersucht (Abb. 5).

Dabei konnte sowohl für *tis11* als auch für *tis11D* eine moderate Basalexpression in proliferierenden Zellen, jedoch im Gegensatz zu *tis11B* keine nennenswerte Veränderung des Expressionsniveaus nach Induktion der Differenzierung festgestellt werden (Abb. 5A).

Für das als Differenzierungsmarker dienende *p21* konnte dagegen im gleichen Versuch eine deutliche Induktion beobachtet werden, was eine effiziente Differenzierung der untersuchten Zellen bestätigt (Abb. 5B).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass speziell TIS11B, wahrscheinlich aber nicht die anderen TIS11-Proteine, eine spezifische Funktion bei der Myogenese haben könnte. Daher lag der Fokus im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf TIS11B.

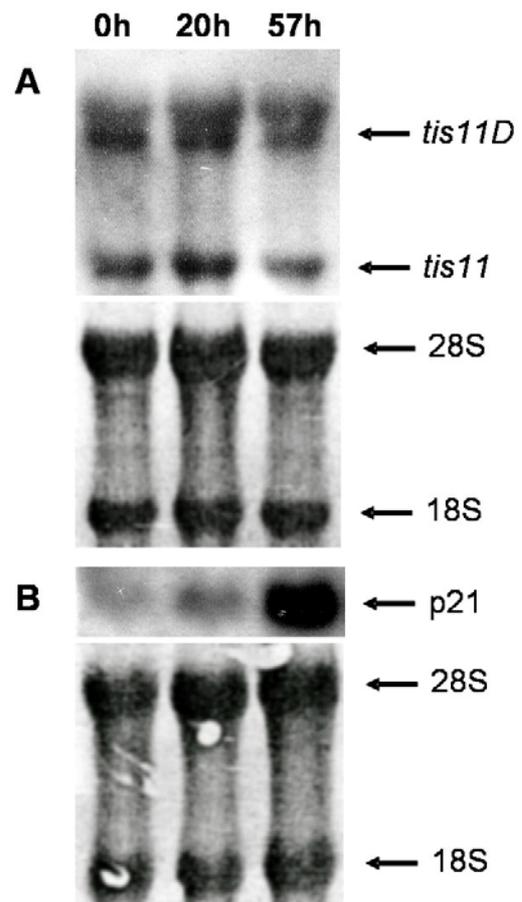


Abbildung 5: Northern Blot-Analyse der Expression von *tis11* und *tis11D* (A) sowie *p21* (B) während der Differenzierung von Myoblasten.

Es wurden jeweils 2 µg (A) bzw. 4 µg (B) gesamtzelluläre RNA pro Spur aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit den Sonden für *tis11* und *tis11D* gleichzeitig (A) und mit einer Sonde für *p21* (B). Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren diente die unter beiden Blots gezeigte Methylenblau-Färbung. Man beachte die unveränderte Expression von *tis11* und *tis11D* gegenüber der massiven Induktion von *p21*.

3.2 *Tis11B*-Expression in Zelllinien mit unterschiedlichem Differenzierungsverhalten

3.2.1 *Tis11B*-Expression in C2C12- und C2F3-Zellen

Die Zelllinie C2F3 stellt eine klonale Variante von C2C12 dar, die aber langsamer und weniger effizient als diese differenziert (10). Daher war es interessant zu untersuchen, ob sich dieses im Vergleich zu C2C12-Zellen niedrigere Differenzierungspotential in einer unterschiedlichen *tis11B*-Expression niederschlägt.

Dafür wurden Zellen beider Linien separat in Kultur genommen und durch Serumentzug zur Differenzierung angeregt. Aus proliferierenden Zellen sowie einen, zwei, drei und vier Tage nach Versuchsbeginn wurde die gesamtzelluläre RNA extrahiert und mittels *Northern Blot*-Verfahren auf die Expression von *tis11B* hin untersucht (Abb. 6).

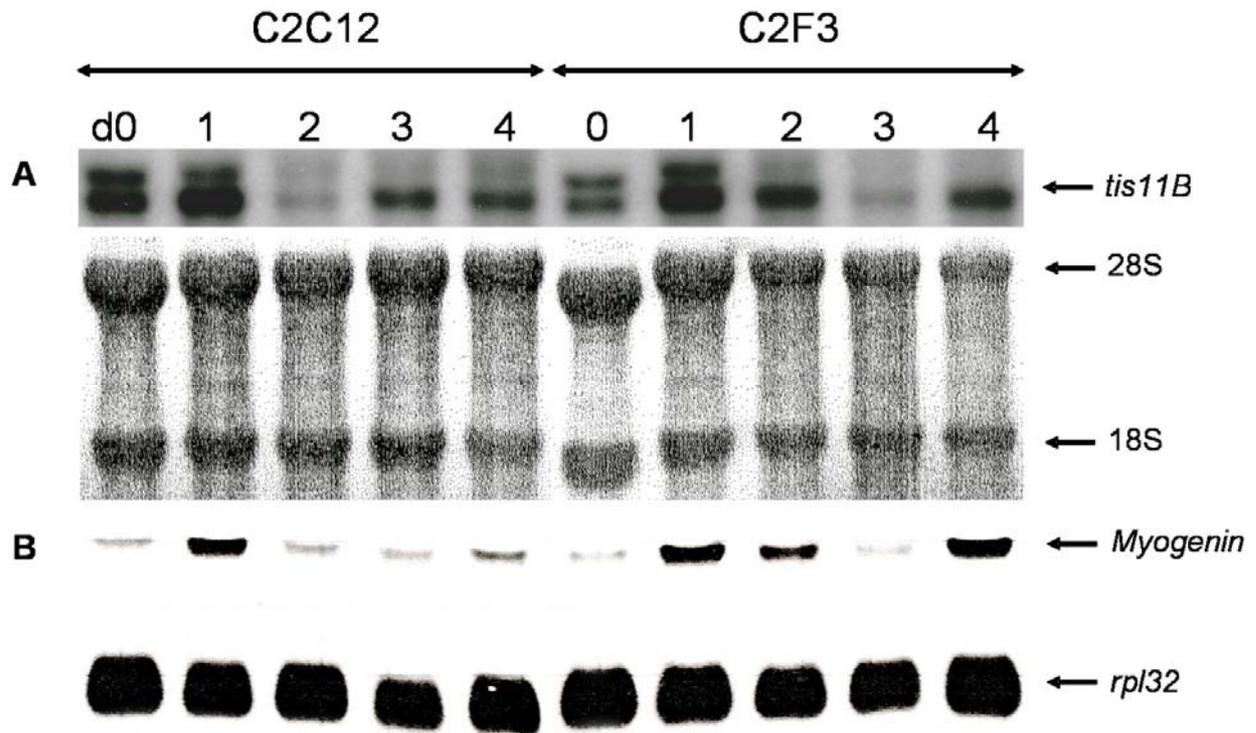


Abbildung 6: Northern Blot-Analyse der *tis11B*-Expression in differenzierenden C2C12- und C2F3-Zellen.

Es wurden jeweils 2µg (A) bzw. 8µg (B) gesamtzelluläre RNA pro Spur aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit den Sonden für *tis11B* (A) und *myogenin* (B). Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren diente die Methylenblau-Färbung (A) bzw. die Bestimmung der Expression von *rpl32*, das für ein ribosomales housekeeping-Protein codiert (B). Die Ladekontrollen werden unter dem jeweiligen Blot gezeigt.

Generell wird das *TIS11B*-Transkript in *Northern Blot*-Analysen als Doppelbande nachgewiesen; die Ursache hierfür ist bisher unbekannt. Man beachte die höhere Basalexpression bei den C2C12-Zellen. Bei beiden Zelllinien findet eine Induktion auf ein etwa gleiches Expressionsniveau statt. Der anschließende Rückgang und Wiederanstieg der *tis11B*-Expression hat bei den beiden Zelllinien einen unterschiedlichen zeitlichen Verlauf (A). Eine starke *myogenin*-Induktion nach 24h bestätigt die effektive Differenzierung der Zellen (B).

Beide Zelllinien zeigten bereits in Proliferationsmedium eine gut detektierbare *tis11B*-Basalexpression, die sich jeweils als zwei etwa gleich große Banden darstellte. Die Darstellung der *tis11B*-mRNA als Doppelbande in der *Northern Blot*-Analyse wurde bereits bei früheren in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studien beobachtet (13), seine Ursache ist jedoch unbekannt.

Die *tis11B*-Basalexpression war bei den C2C12-Zellen deutlich stärker ausgeprägt. Dies könnte mit dem höheren Differenzierungspotential dieser Zelllinie assoziiert sein. Bereits einen Tag nach Beginn der Differenzierung erfolgte wiederum bei beiden Zelllinien eine deutliche Induktion der *tis11B*-Expression, die sich besonders stark in der

Zunahme der unteren Bande äußerte. Danach nahm die Expression in den C2C12-Zellen zunächst rapide ab, um sich ab Tag 3 etwas unterhalb des Ausgangsniveaus einzupendeln.

Eine ähnliche, aber zeitlich etwas nach hinten verschobene Kinetik zeigte sich bei den C2F3-Zellen, wobei die Verzögerung mit dem geringeren Differenzierungspotential dieser Zelllinie assoziiert sein könnte (Abb. 6A).

Als Kontrolle für eine effiziente Induktion des Differenzierungsprozesses wurde dieselbe RNA mittels *Northern Blot*-Verfahren auf die Expression von *myogenin* hin untersucht. Dabei zeigte sich bei beiden Zelllinien nach 24h eine starke Induktion, was die effektive Differenzierung der Zellen bestätigt (Abb. 6B).

Insgesamt weisen diese Daten darauf hin, dass das *tis11B*-Expressionsmuster in proliferierenden und differenzierenden Myoblasten mit dem Differenzierungspotential dieser Zellen assoziiert sein könnte.

3.2.2 *Tis11B*-Expression in RD/18- und RD/12-Zellen

Das Rhabdomyosarkom ist ein hochmaligner Tumor, der aus undifferenzierten Mesenchymzellen hervorgeht, jedoch histologisch, immunhistochemisch oder elektronenmikroskopisch eindeutige Merkmale von Skelettmuskelfasern oder Rhabdomyoblasten zeigt. Es ist das häufigste Malignom der Weichteile beim Kind (über 50% der Fälle), kommt jedoch beim Erwachsenen nur sehr selten vor. Vermutlich entsteht es durch eine Störung der Regulation von Proliferation und Differenzierung myogener Vorläuferzellen. Histologisch lassen sich mehrere Typen abgrenzen, wobei der so genannte embryonale Typ klinisch der häufigste ist. Die Zellen dieses Histotyps weisen relativ undifferenzierte, runde und spindelförmige Zellen auf. Besser differenzierte Formen zeigen Querstreifung und mehrkernige Zellen (6, 120).

Die RD-Zelllinie entstammt einem humanen Rhabdomyosarkom vom embryonalen Histotyp. Ihre klonalen Varianten RD/12 und RD/18 unterscheiden sich vor allem hinsichtlich ihres myogenen Potentials: Während RD/12-Zellen kaum mehr zur Differenzierung befähigt sind, zeigen RD/18-Zellen nach Serumentzug Merkmale einer, wenn auch verlangsamten und unvollständigen, terminalen Differenzierung (78).

Die Untersuchung des *tis11B*-Expressionsmusters dieser Zellen im Verlauf dieser Arbeit erschien insbesondere deshalb interessant, weil damit die Frage beantwortet werden könnte, ob Muskelzellen mit eingeschränktem Differenzierungspotential ein von normalen Muskelzellen abweichendes *tis11B*-Expressionsmuster zeigen. Dies spräche

dafür, dass das *tis11B*-Expressionsmuster von Myoblasten tatsächlich mit deren Differenzierungspotential korreliert.

Problematisch war dabei die Tatsache, dass es zu Rhabdomyosarkomzellen in der Regel keine „gesunde“ Myoblasten-Negativkontrolle vom gleichen Patienten gibt, da die Tumore aufgrund ihres typischen Lokalisationsmusters im menschlichen Körper nur selten von gesundem Muskelgewebe umgeben sind (120). Daher bot sich zusätzlich – entsprechend zu den oben beschriebenen Expressionsstudien an C2C12- und C2F3-Zellen – der direkte Vergleich zweier Tumorzelllinien mit identischem genetischen Hintergrund, aber unterschiedlichem Differenzierungspotential, an.

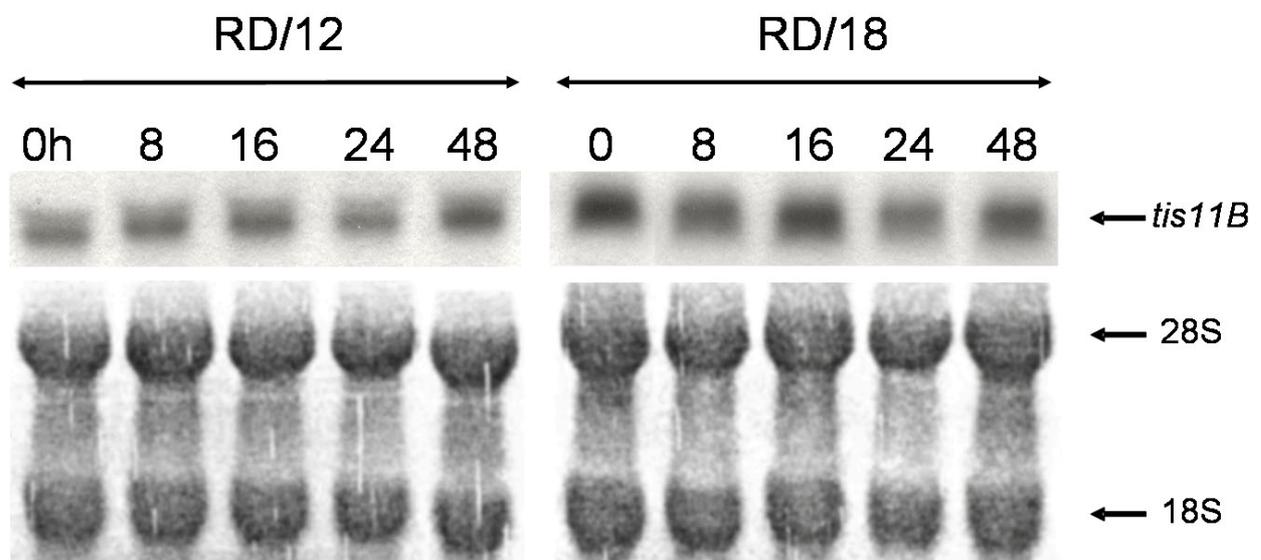


Abbildung 7: Northern Blot-Analyse der *tis11B*-Expression in RD/12- und RD/18-Zellen nach Behandlung mit Differenzierungsmedium.

Es wurden jeweils 2 µg gesamtzelluläre RNA pro Spur aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit der Sonde für *tis11B*. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren diente die unter beiden *Blots* gezeigte Methylenblau-Färbung. Man beachte die etwas höhere Basalexpression bei den RD/18-Zellen. Eine deutliche Induktion findet bei keiner der beiden Zelllinien statt.

Wie Abb. 7 zeigt, war weder bei RD/12- noch bei RD/18-Zellen eine Induktion der *tis11B*-Expression in Differenzierungsmedium zu beobachten. Es ließ sich allenfalls eine etwas höhere Basalexpression von *tis11B* bei RD/18-Zellen erkennen.

Die Effizienz des Differenzierungsprozesses wurde standardmäßig anhand der Expression des Differenzierungsmarkers *p21* nachgewiesen (nicht gezeigt), wobei bekannt ist, dass das *p21*-Gen nach Beginn der Differenzierung sowohl in RD/12- als auch in RD/18-Zellen induziert ist. Des Weiteren war die Proliferationsrate der Zellen nach Behandlung mit Differenzierungsmedium stark reduziert und – zumindest bei den RD/18-Zellen – ihr histologisches Erscheinungsbild verändert, was im Verlauf dieser Arbeit

eine weitere Kontrolle für die Effizienz der Behandlung der Zellen mit Differenzierungsmedium war (36).

Bei einem weiteren Differenzierungsversuch mit RD/18-Zellen kam es auch nach 72h zu keiner Veränderung der *tis11B*-Expression (nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass in Rhabdomyosarkomzellen auch nach längerer Verweildauer in Differenzierungsmedium keine Induktion von *tis11B* stattfindet. Es ist also tatsächlich möglich, dass eine Induktion dieses Gens wichtig für einen normalen Ablauf des Differenzierungsprozesses ist, und dass das geringe Differenzierungspotential von Rhabdomyosarkomzellen mit ihrem aberranten *tis11B*-Expressionsmuster assoziiert sein könnte.

Da es denkbar wäre, dass in diesem Fall ein eng verwandtes Protein die Funktion von TIS11B zumindest teilweise übernehmen könnte, schien es interessant, im Rahmen dieses Experiments auch die Expression von *tis11* und *tis11D* in RD-Zellen mittels *Northern Blot*-Analyse zu untersuchen.

Dabei wurde für beide Gene eine gut nachweisbare Basalexpression beobachtet. Es gab jedoch keinen Unterschied zwischen RD/12- und RD/18-Zellen, und eine Veränderung der Expression konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.3 Untersuchungen an *mdx*-Mäusen

Die *mdx*-Maus (Zuchtstamm C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx}nJ) stellt ein Tiermodell für die X-chromosomal rezessiv vererbte Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (DMD) dar. Sie entwickelt, ähnlich wie der Mensch, eine inflammatorische Myopathie, die zu einer chronischen Degeneration von Muskelgewebe führt.

Sowohl *mdx*-Mäuse als auch DMD-Patienten weisen eine Mutation in dem Gen, das für Dystrophin kodiert, auf. Letzteres ist ein subplasmalemalemales gelegenes, muskelspezifisches Protein, das im Komplex mit bestimmten Zelloberflächenproteinen mit der ECM interagiert. Dystrophinmangel beeinträchtigt die intrazelluläre Ca²⁺-Homöostase und die Membranstabilität; außerdem werden diverse Signaltransduktionswege zwischen ECM und Zellkern beeinträchtigt.

Trotz des gleichartigen genetischen Defekts unterscheidet sich das Krankheitsbild bei Mäusen und Menschen beträchtlich: Das degenerierte Muskelgewebe von DMD-Patienten wird zum größten Teil durch Binde- und Fettgewebe ersetzt. Dies führt zu früher Rollstuhlabhängigkeit und zum Tod durch respiratorische (75%) oder kardiale (20%) Insuffizienz meist vor dem 25. Lebensjahr.

Demgegenüber zeigen *mdx*-Mäuse einen deutlich abgeschwächten Phänotyp. Die homozygoten Weibchen sind lebensfähig und, wie die hemizygoten Männchen, auf den ersten Blick gesund und vom Wildtyp (WT) nicht zu unterscheiden. Kraft- und Ausdauermessungen zeigen eine vorübergehende Phase leichter muskulärer Beeinträchtigung bei jungen Tieren, die jedoch mit zunehmendem Alter wieder verschwindet. Der milde klinische Verlauf bei der *mdx*-Maus beruht auf der außerordentlich effektiven Regeneration der murinen Muskulatur, die den Muskelschwund vollständig auszugleichen vermag (29, 32, 41, 67, 102).

Die Muskeldystrophie der *mdx*-Maus beginnt abrupt im Alter von 2-3 Wochen mit Nekroseherden und massiven entzündlichen Infiltraten im betroffenen Muskelgewebe. Bereits um die 4. Lebenswoche erreicht die Erkrankung ihren Höhepunkt. Mit etwa 12 Wochen lässt die Entzündung langsam nach, und eine effektive Regeneration ist nachweisbar. In diesem Alter findet man in einigen Muskeln bis zu 80% regenerierter Muskelfasern, die an ihren zentral gelegenen Nuklei gut zu erkennen sind. Im Alter von 24 Wochen zeigen einige Extremitätenmuskeln erste Zeichen leichter Fibrose (67, 102). Ein anderer, der DMD ähnlicherer Verlauf zeigt sich interessanterweise im Zwerchfell: Hier findet eine fortschreitende Degeneration des Muskels statt, der mit deutlicher Fibrose und zunehmenden Funktionseinschränkungen einhergeht. Dennoch scheinen die betroffenen Tiere während ihrer (mit dem WT vergleichbaren) Lebensspanne keine nennenswerten Atembeschwerden zu entwickeln (119).

Da die Regenerationsfähigkeit der murinen Muskulatur durch Satellitenzellen, also Myoblasten, vermittelt wird, stellt die *mdx*-Maus ein wertvolles Modell zur Untersuchung der Skelettmuskeldifferenzierung *in vivo* dar. Es schien deshalb interessant, diese Tiere hinsichtlich der Expression von *tis11B* im Vergleich zum Wildtyp zu untersuchen. Da die Muskelerkrankung der *mdx*-Mäuse einem mehr oder weniger festen zeitlichen Verlauf folgt (s. o.), wurden Tiere beider Geschlechter im Alter von 4, 8, 12 und 24 Wochen untersucht.

Die zugehörigen Kontrolltiere hatten, abgesehen von der DMD^{mdx}-Mutation, den gleichen genetischen Hintergrund (C57BL/10SnJ) und waren jeweils hinsichtlich Alter und Geschlecht angeglichen, um einen Einfluss dieser Faktoren auf das Ergebnis ausschalten.

3.3.1 Expression von *tis11*-Genen in verschiedenen Geweben

Vor Beginn dieser Arbeit existierten noch keine umfassenden Daten zur Gewebeverteilung der Expression von *tis11*-Genen – insbesondere *tis11B* und *tis11D*. Speziell interessierte hier die Expression im Skelettmuskel im Vergleich zu anderen Geweben. Des Weiteren schien es interessant, die Expressionsmuster dieser Gene in Muskel- und Nichtmuskelgeweben zwischen WT- und *mdx*-Mäusen zu vergleichen.

Daher wurde zunächst aus verschiedenen Organen von WT- und *mdx*-Mäusen RNA isoliert und mittels *Northern Blot*-Analyse auf die Expression aller *tis11*-Gene hin untersucht. Alle Tiere waren 8 Wochen alt, mit Ausnahme des *mdx*-Männchens, welches 24 Wochen alt war. Die *tis11B*-Expression wurde in einem separaten *Blot* analysiert (Abb. 8), während die von *tis11* und *tis11D* aufgrund der unterschiedlichen Transkriptgröße gleichzeitig untersucht werden konnten (Abb. 9).

In Abb. 8 ist zunächst zu erkennen, dass sich die *tis11B*-mRNA hier als Einzelbande darstellte. Dieses Phänomen war bei allen in dieser Arbeit durchgeführten *Northern Blot*-Analysen an *in vivo*-Material zu beobachten (siehe auch Abb. 12 & 16).

Eine Expression des *tis11B*-Gens konnte in fast allen Organen nachgewiesen werden. Eine Ausnahme schien der Gastrointestinaltrakt, wobei eine Aussage aufgrund der nach der Präparation außerordentlich schnellen Degradierung der RNA in diesen Organen nur begrenzt möglich war. In den lymphatischen Geweben (Milz, Lymphknoten, Thymus) und in der Aorta fiel eine besonders starke Expression auf. In der Lunge und im Hoden war *tis11B* ebenfalls kräftig exprimiert. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit war insbesondere die Expression in denjenigen Geweben interessant, deren Hauptanteil aus Skelett-, Herz- oder glatten Muskelzellen besteht. Hierbei ließen sich folgende Unterschiede feststellen: In Skelettmuskelgewebe, genauer gesagt im Extremitätenmuskel *Musculus (M.) quadriceps* (*mdx*-Männchen: *M. gastrocnemius*), war die *tis11B*-Expression vergleichsweise am schwächsten, im Herz etwas stärker und im Uterus am stärksten. Bei diesen vergleichenden Untersuchungen kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass in einem dieser Gewebe der größte Anteil der *tis11B*-Expression nicht auf die jeweiligen Muskelzellen selbst, sondern auf einen anderen Zelltyp wie Fibroblasten oder Endothelzellen zurückgeht.

Ein Unterschied zwischen WT- und *mdx*-Mäusen bezüglich der *tis11B*-Expression ließ sich lediglich in der Leber feststellen.

Keine eindeutigen Unterschiede zeigten sich in der glatten Muskulatur, der Herzmuskulatur und der Skelettmuskulatur der Extremitäten. Demgegenüber fielen, wie im Folgenden beschrieben, deutliche Expressionsunterschiede zwischen einzelnen, spezifischen Skelettmuskeln von mdx- und WT-Mäusen auf (siehe 3.3.3).

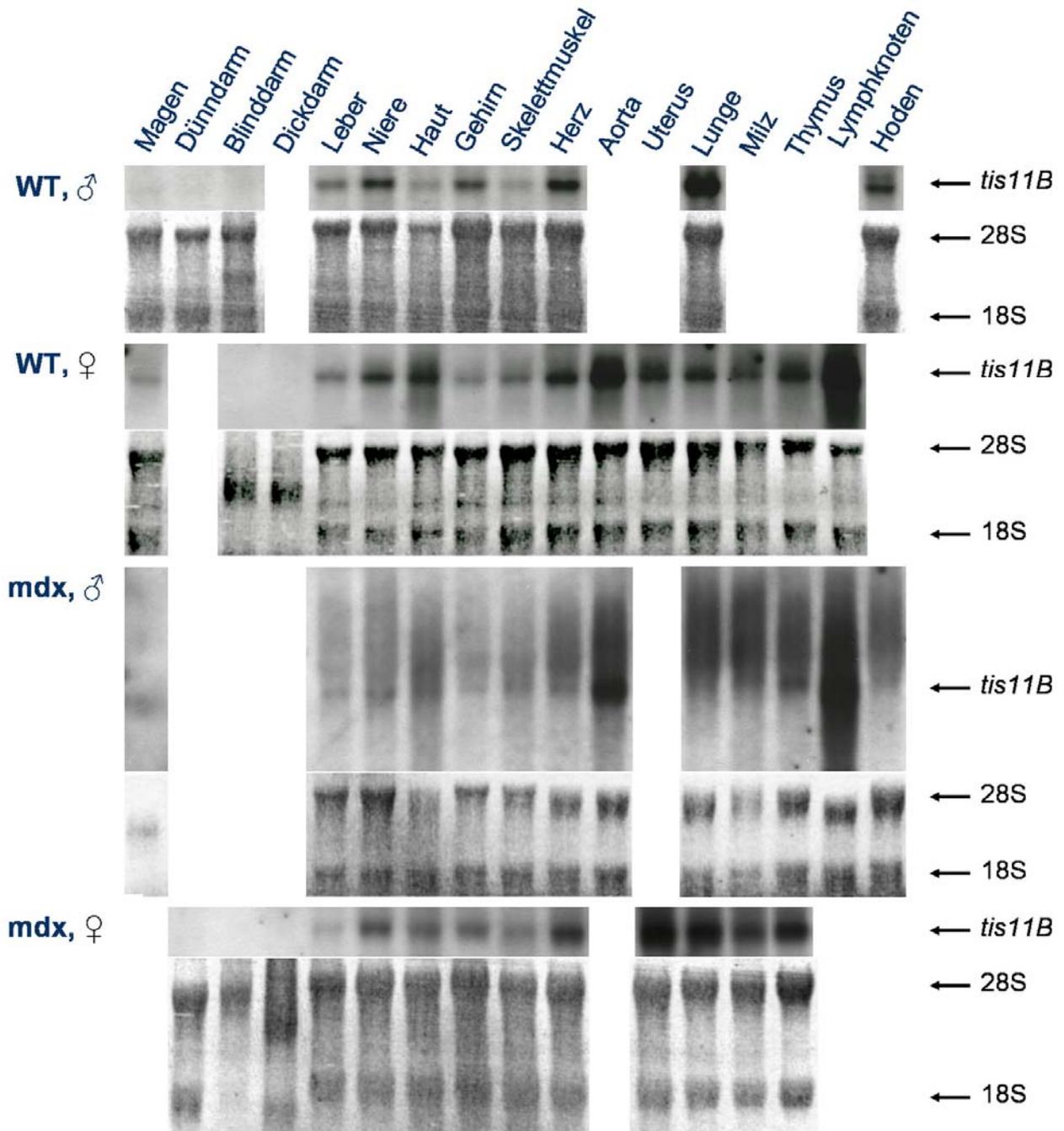


Abbildung 8: Northern Blot-Analyse der *tis11B*-Expression in verschiedenen murinen Gewebetypen.

Es wurden jeweils 2 µg gesamtzelluläre RNA pro Spur aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit der Sonde für *tis11B*. Die unter den Blots gezeigte Methylenblau-Färbung diente als Kontrolle für gleichmäßige Beladung der Spuren. Man beachte die starke *tis11B*-Expression in Aorta, Lunge, Hoden und den lymphatischen Organen.

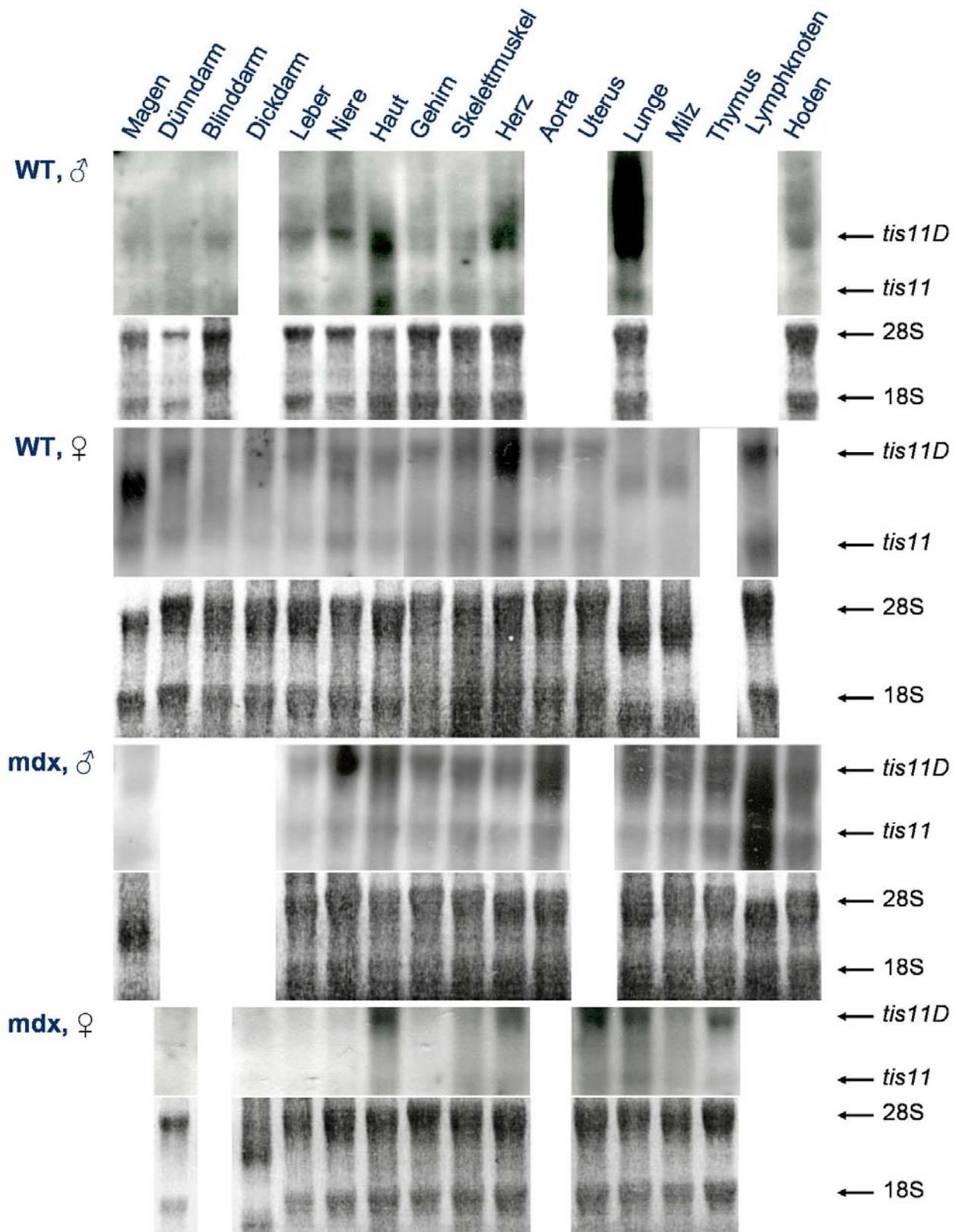


Abbildung 9: Northern Blot-Analyse der *tis11*- und *tis11D*-Expression in verschiedenen murinen Gewebetypen.

Es wurden jeweils 2 µg gesamtzelluläre RNA pro Spur aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit den Sonden für *tis11* und *tis11D* gleichzeitig. Die unter den Blots gezeigte Methylenblau-Färbung diente als Kontrolle für gleichmäßige Beladung der Spuren. *Tis11D* wird in vielen Organen messbar exprimiert, *tis11* dagegen kaum.

Zur *tis11*-Expression in verschiedenen Geweben gab es, im Gegensatz zu der von *tis11B* und *tis11D*, vor Beginn dieser Arbeit bereits einige Publikationen, aus denen hervorging, dass *tis11* in den meisten Geweben nicht messbar exprimiert wird. Die Untersuchungen fanden jedoch ausschließlich auf Proteinebene statt und beinhalteten keine genaue Quantifizierung (16, 79). Die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführte und in Abb. 9 gezeigte *tis11*-Expressionsanalyse auf RNA-Ebene bestätigte prinzipiell die Ergebnisse dieser Publikationen. Zwar ließ sich bei vielen Organen eine minimale Expression erahnen (insbesondere bei WT-Weibchen und *mdx*-Männchen). Eine gut nachweisbare Expression war jedoch lediglich im Lymphknoten und in der Lunge zu erkennen.

Demgegenüber zeigte *tis11D* in vielen Geweben eine deutlich messbare Expression. Diese war in Lymphknoten und Thymus, Lunge, Aorta und Haut besonders stark. Interessanterweise zeigte sich ferner eine sehr hohe *tis11D*-Expression in den Herzen der WT-Mäuse, die bei den *mdx*-Mäusen deutlich niedriger war. Ob dieser Unterschied reproduzierbar ist, müsste durch Analyse einer größeren Zahl von Tieren bestätigt werden. Auch im Uterus war *tis11D* deutlich messbar exprimiert; in der Skelettmuskulatur der Extremitäten war die Expression am schwächsten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *tis11*, übereinstimmend mit den Ergebnissen bisheriger Publikationen, in den meisten Geweben kaum nachweisbar exprimiert wird. Eine Expression von *tis11B* und *tis11D* war demgegenüber in fast allen Geweben, darunter auch alle Muskelgewebstypen, nachweisbar. Darüber hinaus werden alle *tis11*-Gene offenbar in lymphatischen Geweben, insbesondere den Lymphknoten, recht stark exprimiert.

3.3.2 Histologische Analyse der Muskulatur von *mdx*-Mäusen

Um vor der detaillierten Analyse des Expressionsmusters des *tis11B*-Gens in den *mdx*-Mäusen und entsprechenden Kontrollen Einblick in die Aktivität der Erkrankung der zu untersuchenden *mdx*-Mäuse im jeweiligen Lebensalter zu erhalten, und um dies mit den aus der Untersuchung von RNA gewonnenen Daten in Relation setzen zu können, wurden von allen Tieren histologische Präparate vom Herz sowie von den Skelettmuskeln *M. quadriceps* (proximaler Beinmuskel), *M. gastrocnemius* (distaler Beinmuskel) und Zwerchfell angefertigt. Alle Präparate der *mdx*-Mäuse und mehrere Stichproben von WT-Mäusen wurden fotografiert und zunächst einer allgemeinen histopathologischen

Begutachtung unterzogen. Aus dieser großen Menge von Bildern zeigen Abb. 10 & 13 beispielhaft die wichtigsten Befunde.

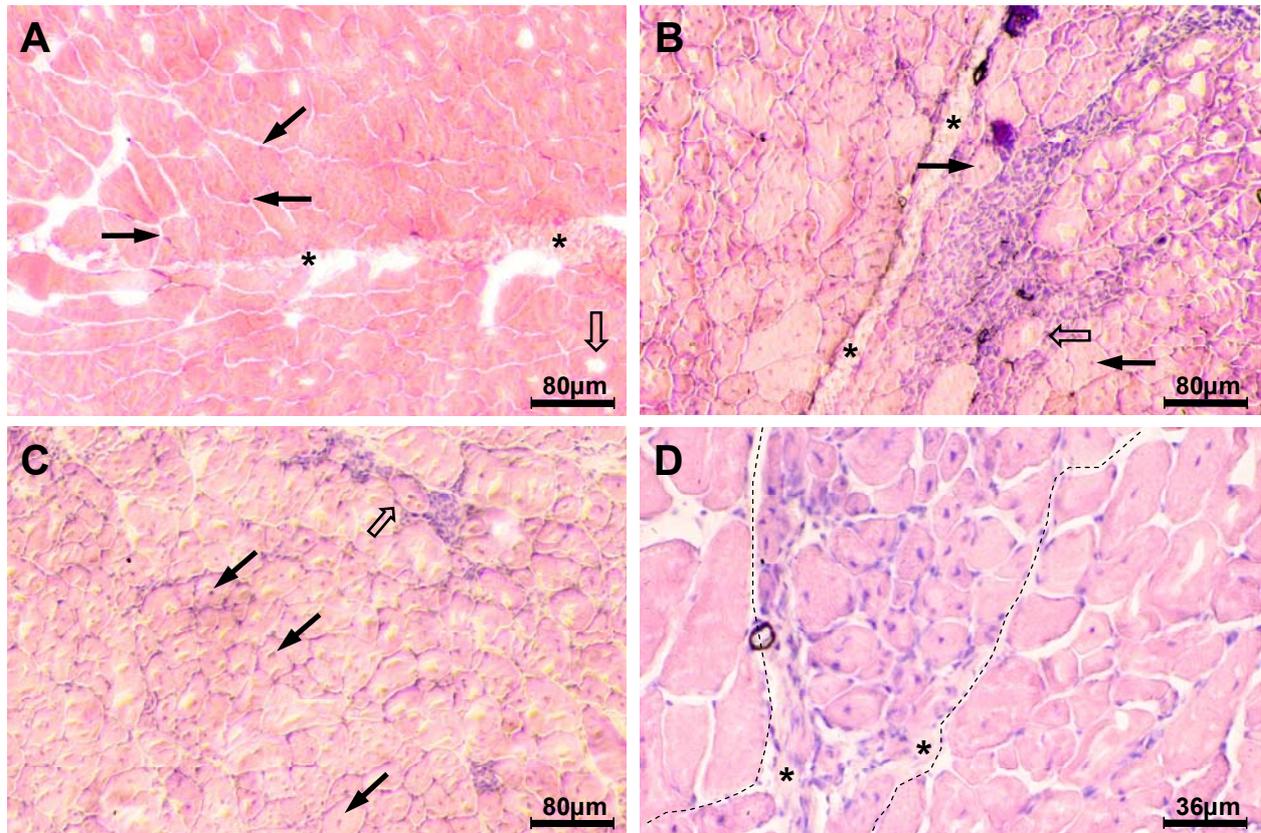


Abbildung 10: Gewebsschnitte des *M. gastrocnemius* von WT- (A) und *mdx*-Mäusen (B-D) im Alter von 12 (A&B) und 24 Wochen (C&D); HE-Färbung.

A – Gesundes Skelettmuskelgewebe einer 12 Wochen alten WT-Maus mit großen, mehrkernigen Muskelzellen. Die Zellkerne liegen randständig (schwarze Pfeile). In der Bildmitte wird das Muskelgewebe durch eine Bindegewebsplatte unterbrochen (Sterne). Die „Löcher“ im Inneren einiger Zellen (leerer Pfeil) finden sich vereinzelt in allen vier Bildern. Es handelt sich dabei um Artefakte, die beim Einbetten der Präparate entstanden sind.

B – Skelettmuskelgewebe einer 12 Wochen alten *mdx*-Maus. In der Bildmitte wird das Muskelgewebe durch eine Bindegewebsplatte unterbrochen (Sterne). Rechts davon ist eine große degenerativ-regenerative Gruppe (DRG) erkennbar; einige Muskelzellen sind dort von Entzündungszellen regelrecht „eingemauert“ (leerer Pfeil). In der Umgebung finden sich viele Zellen mit zentral gelegenen Kernen (schwarze Pfeile). Auch links der Bindegewebsplatte sind größtenteils solche Zellen zu sehen.

C – Skelettmuskelgewebe einer 24 Wochen alten *mdx*-Maus. Es finden sich deutlich weniger und im Schnitt kleinere DRG im Gewebe (leerer Pfeil). Der größte Teil der Muskelzellen hat nicht peripher gelegene Zellkerne (schwarze Pfeile).

D – Skelettmuskelgewebe einer 24 Wochen alten *mdx*-Maus in stärkerer Vergrößerung. Zwischen den gestrichelten Linien ist ein Areal mit regenerierenden Muskelzellen nach Abklingen der Entzündung zu sehen. Die meisten Zellen haben einen zentral gelegenen Kern. Neben Zellen normaler Größe erkennt man viele Zellen kleineren Durchmessers, dazwischen liegen Fibroblasten und Fibrozyten. Im unteren Bereich ist Bindegewebe zu erkennen (Sterne).

Alle begutachteten Muskeln der WT-Mäuse zeigten ein unauffälliges Erscheinungsbild (Abb. 10A & 13A). Auch an den Herzen sämtlicher Tiere, WT wie *mdx*, ließ sich kein pathologischer Befund erheben (nicht gezeigt).

Demgegenüber fanden sich in den Extremitätenmuskeln (*M. quadriceps*, *M. gastrocnemius*) aller *mdx*-Mäuse entzündliche Infiltrate mit degenerierenden und regenerierenden

Muskelzellen, so genannte degenerativ-regenerative Gruppen (DRG). Darüber hinaus fanden sich Areale regenerierter Muskelzellen, die aufgrund des zentral bzw. nicht peripher gelegenen Zellkerns leicht identifiziert werden konnten (Abb. 10B).

Um die Aktivität der Erkrankung bei den einzelnen Tieren hinsichtlich entzündlicher Degeneration sowie Regeneration quantifizieren zu können, wurden die *Mm. gastrocnemii* der *mdx*-Mäuse einer genaueren Analyse unterzogen. Alle DRG in einem Schnitt wurden gezählt und hinsichtlich ihrer Größe eingeordnet; dabei waren die darin enthaltenen Muskelfasern im frühen nekrotischen Stadium das entscheidende Kriterium (109):

Zahl der frühnekrotischen Muskelfasern in der DRG	Klassifizierung der DRG
<6 Fasern	klein
6-15 Fasern	mittel
>15 Fasern	groß

Ferner wurde der Anteil der Muskelfasern mit nicht peripher gelegenen Zellkernen (NPN) in Prozent ermittelt. Dazu wurden aus dem jeweiligen Schnitt mehrere zufällig gewählte Gesichtsfelder mit der *Firewire*-Kamera CC7 (Inteq, Berlin) fotografiert, und die Zellen darin mithilfe des Programms IQ EasyMeasure® (Version 1.4.1 von Inteq, Berlin) ausgezählt (109). Die so ermittelten Daten wurden mit dem Programm Excel von Microsoft (Redmond, USA) grafisch aufgearbeitet und sind Tabelle 2 sowie den Grafiken in den Abb. 11 und 12 zu entnehmen.

Die in Abb. 11 dargestellte Auszählung der DRG zeigte eine noch recht niedrige Krankheitsaktivität bei den 4 Wochen alten Tieren, die jedoch bei den 8 Wochen alten massiv angestiegen war. Dies äußerte sich in einer Zunahme der DRG aller drei Größenordnungen. Während die durchschnittliche Zahl der kleinen und mittleren DRG bei den 12 Wochen alten Tieren bereits deutlich niedriger war, nahm die durchschnittliche Zahl der großen DRG weiterhin zu. Die Krankheitsaktivität nahm insgesamt dennoch leicht ab. Bei den 24 Wochen alten Tieren war sie dagegen noch einmal deutlich niedriger.

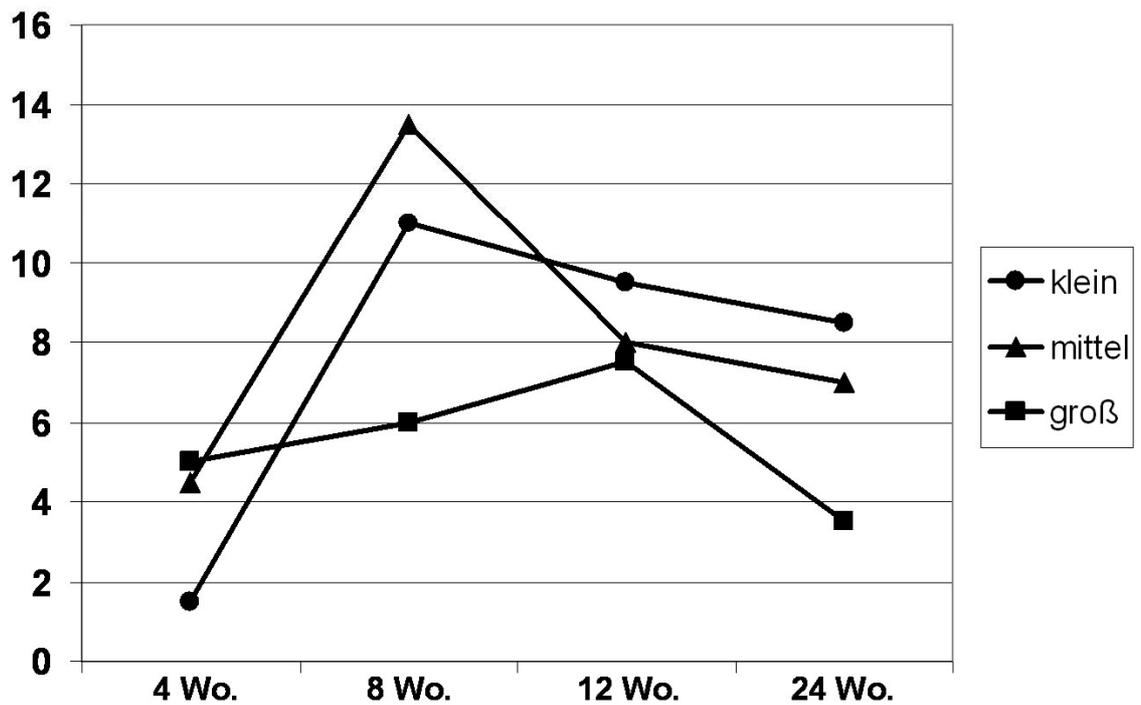
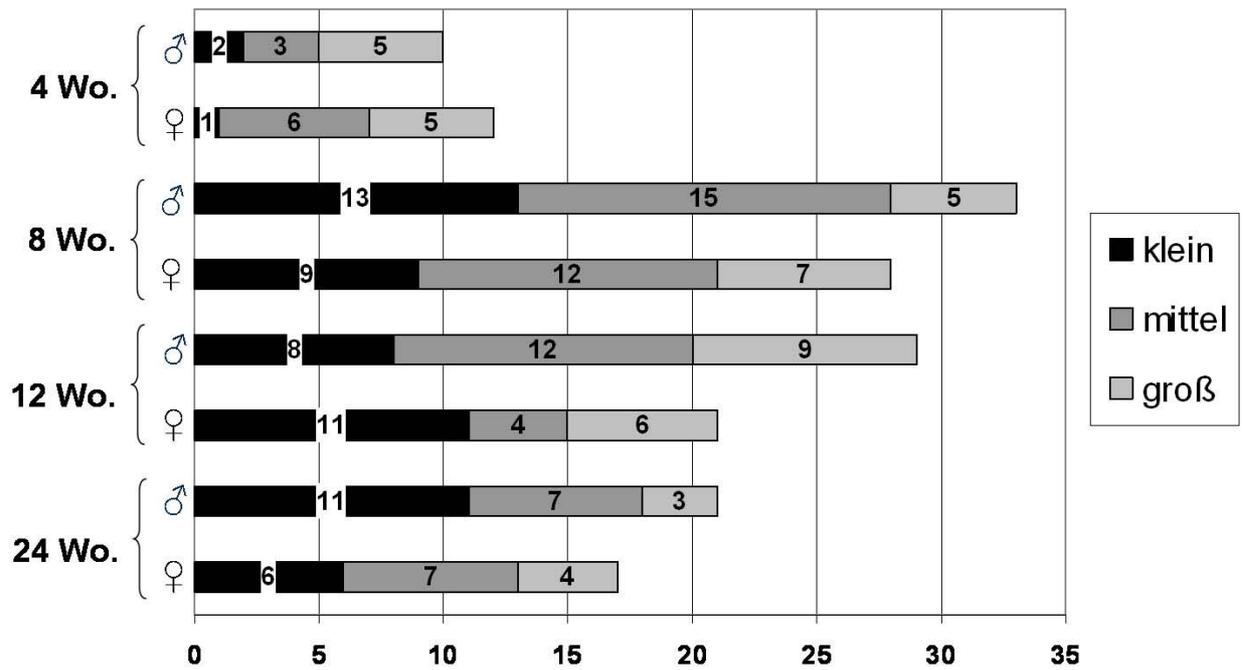


Abbildung 11: Grafische Darstellungen der DRG im *M. gastrocnemius* von *mdx*-Mäusen verschiedenen Alters. Ein HE-gefärbter histologischer Schnitt aus dem mittleren Drittel des *M. gastrocnemius* jeder Maus wurde hinsichtlich der Menge und Größe darin vorhandener DRG untersucht. Die so ermittelten Daten wurden mit dem Programm Excel von Microsoft (Redmond, USA) grafisch aufgearbeitet. Das oben gezeigte Balkendiagramm stellt die absolute Zahl der gefundenen DRG verschiedener Größe (klein, mittel und groß) dar. Im unteren Diagramm sind die durchschnittlichen Zahlen der DRG verschiedener Größe pro Altersgruppe in einzelnen Kurven aufgetragen.

Demgegenüber schien die Regeneration von Muskelzellen mit zunehmendem Alter der Tiere immer effektiver zu werden. Darauf deuten die Daten der Zellzählung hin, bei der die Zahl der Zellen mit nicht peripheren bzw. zentralen Kernen quantifiziert wurde. Sie werden in Tabelle 2 und als Grafik in Abb. 12 gezeigt.

	GF	NPN	PN	ges.	% NPN
4 Wo., ♂	3	18	159	177	10,17
4 Wo., ♀	8	116	466	582	19,93
8 Wo., ♂	7	182	187	369	49,32
8 Wo., ♀	10	291	283	574	50,70
12 Wo., ♂	10	302	259	561	53,83
12 Wo., ♀	10	461	268	729	63,24
24 Wo., ♂	10	426	178	604	70,53
24 Wo., ♀	7	329	131	460	71,52

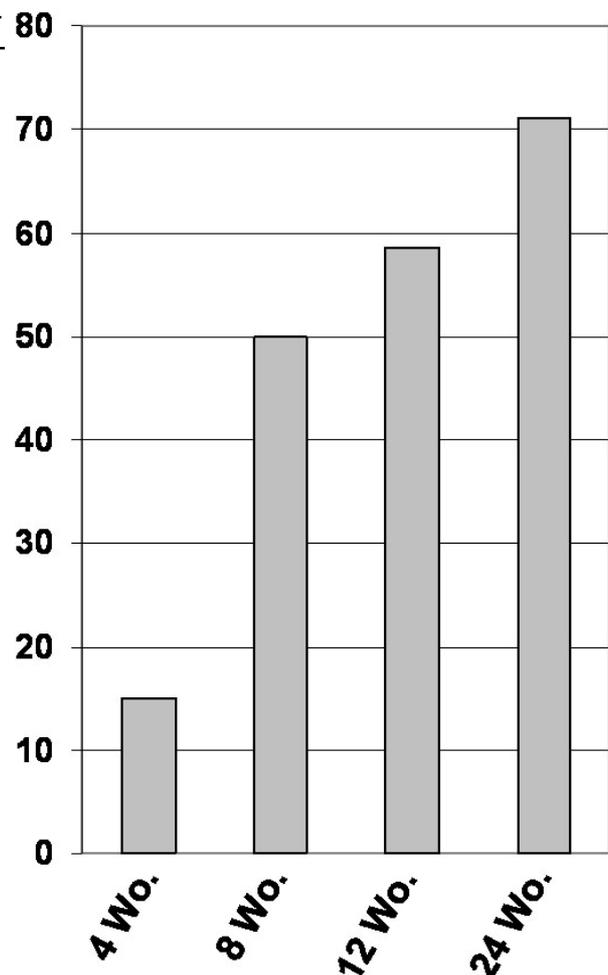
Tabelle 2: Ergebnisse der Auszählung des Anteils von Zellen mit nicht peripher gelegenem Nukleus im *M. gastrocnemius* von *mdx*-Mäusen.

Gezeigt werden für jedes Tier die Anzahl der ausgezählten Gesichtsfelder (GF), die Gesamtzahl der Muskelfasern mit nicht peripher gelegenem Zellkern (NPN), die Zahl der Gesamtzahl der Muskelfasern mit peripher gelegenem Zellkern (PN), die Gesamtzahl aller pro Maus gezählten Zellen (ges.), sowie der Anteil von Zellen mit nicht peripher gelegenem Zellkern an der Gesamtzahl der Muskelfasern in Prozent (% NPN).

Abbildung 12: Grafische Darstellung des durchschnittlichen Anteils von NPN an der Gesamtzahl der Muskelfasern im *M. gastrocnemius* von *mdx*-Mäusen.

Aus den prozentualen Anteilen der Zellen mit nicht peripher gelegenem Zellkern an der Gesamtzahl der Muskelfasern (% NPN in Tab. 2) wurde für jede Altersgruppe der Mittelwert gebildet und mit dem Programm Excel von Microsoft (Redmond, USA) grafisch aufgearbeitet. Man beachte den stetigen Anstieg von NPN mit zunehmendem Alter der Tiere als Hinweis auf zunehmende Regeneration im Muskelgewebe.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass die hier untersuchten Tiere im Alter von 8-12 Wochen die höchste Krankheitsaktivität aufwiesen. In diesem Alter schien auch die regenerative Aktivität der Muskelzellen besonders stark anzusteigen. Somit stellen diese Tiere geeignete Modellsysteme dar – der beobachtete Krankheitsverlauf entspricht weitgehend dem in der Literatur beschriebenen (109).



Einen anderen Verlauf zeigte die Erkrankung wie erwartet im Bereich des Zwerchfells (Abb. 13). Hier wurde eine fortschreitende Degeneration der Muskulatur beobachtet. Das zerstörte Gewebe wurde größtenteils durch Bindegewebe ersetzt, regenerierte Muskelzellen waren nur selten zu sehen (Abb. 13 B-D). Eine genauere histologische Untersuchung des Zwerchfells der Tiere wird zurzeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

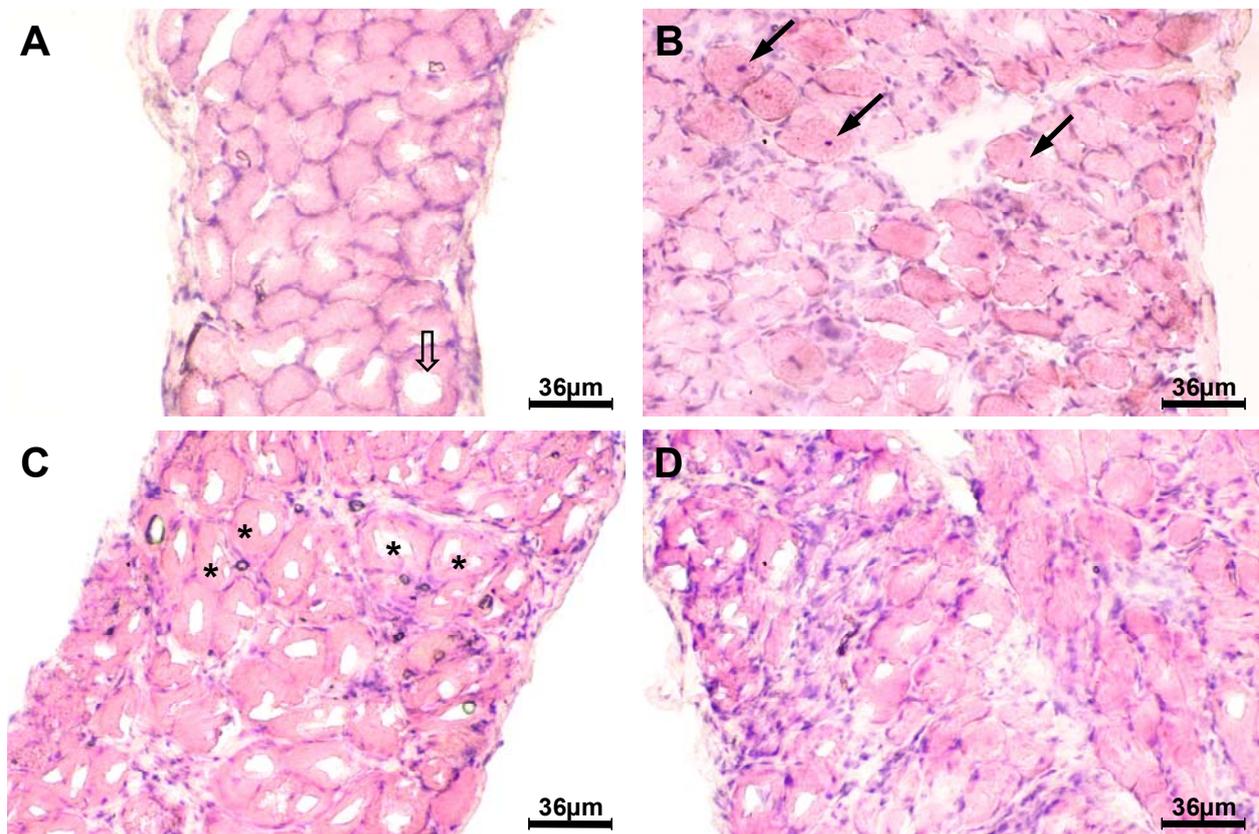


Abbildung 13: Gewebsschnitte des Zwerchfells von WT- (A) und *mdx*-Mäusen (B-D) im Alter von 12 (A&B) und 24 Wochen (C&D); HE-Färbung.

A – Gesundes Skelettmuskelgewebe einer 12 Wochen alten WT-Maus mit großen, mehrkernigen Muskelzellen. Die Zellkerne liegen randständig. Die „Löcher“ im Inneren einiger Zellen (leerer Pfeil) finden sich vereinzelt in allen vier Bildern. Es handelt sich dabei um Artefakte, die beim Einbetten der Präparate entstanden sind.

B – Skelettmuskelgewebe einer 12 Wochen alten *mdx*-Maus. Das Gewebe ist herdförmig bis diffus von Entzündungszellen und Fibroblasten durchsetzt. Klar abgrenzbare DRG sind nicht erkennbar. Nur vereinzelt finden sich Muskelzellen mit nicht peripher gelegenen Zellkern (schwarze Pfeile).

C – Skelettmuskelgewebe einer 24 Wochen alten *mdx*-Maus. Es ist ein diffuser bindegewebiger Umbau des Muskelgewebes zu erkennen. Viele Muskelzellen sind vollständig von Entzündungszellen und Bindegewebe umgeben (Sterne). Klar abgrenzbare DRG oder Muskelzellen mit nicht peripher gelegenen Zellkern sind nicht zu erkennen.

D – Skelettmuskelgewebe einer 24 Wochen alten *mdx*-Maus. Man erkennt eine massive Degeneration von Muskelgewebe mit partiellem Ersatz durch lockeres Bindegewebe. Klar abgrenzbare DRG oder Muskelzellen mit nicht peripher gelegenen Zellkern sind auch hier nicht zu erkennen.

3.3.3 Expression von *tis11B* in der Muskulatur von *mdx*-Mäusen

Alle 16 Mäuse wurden nun hinsichtlich der *tis11B*-Expression in der Muskulatur analysiert. Dazu wurde die gesamtzelluläre RNA aus dem Herz sowie aus den Skelettmuskeln *M. quadriceps*, *M. gastrocnemius* und Zwerchfell isoliert (siehe 2.2.3.6.3) und per *Northern Blot*-Analyse untersucht.

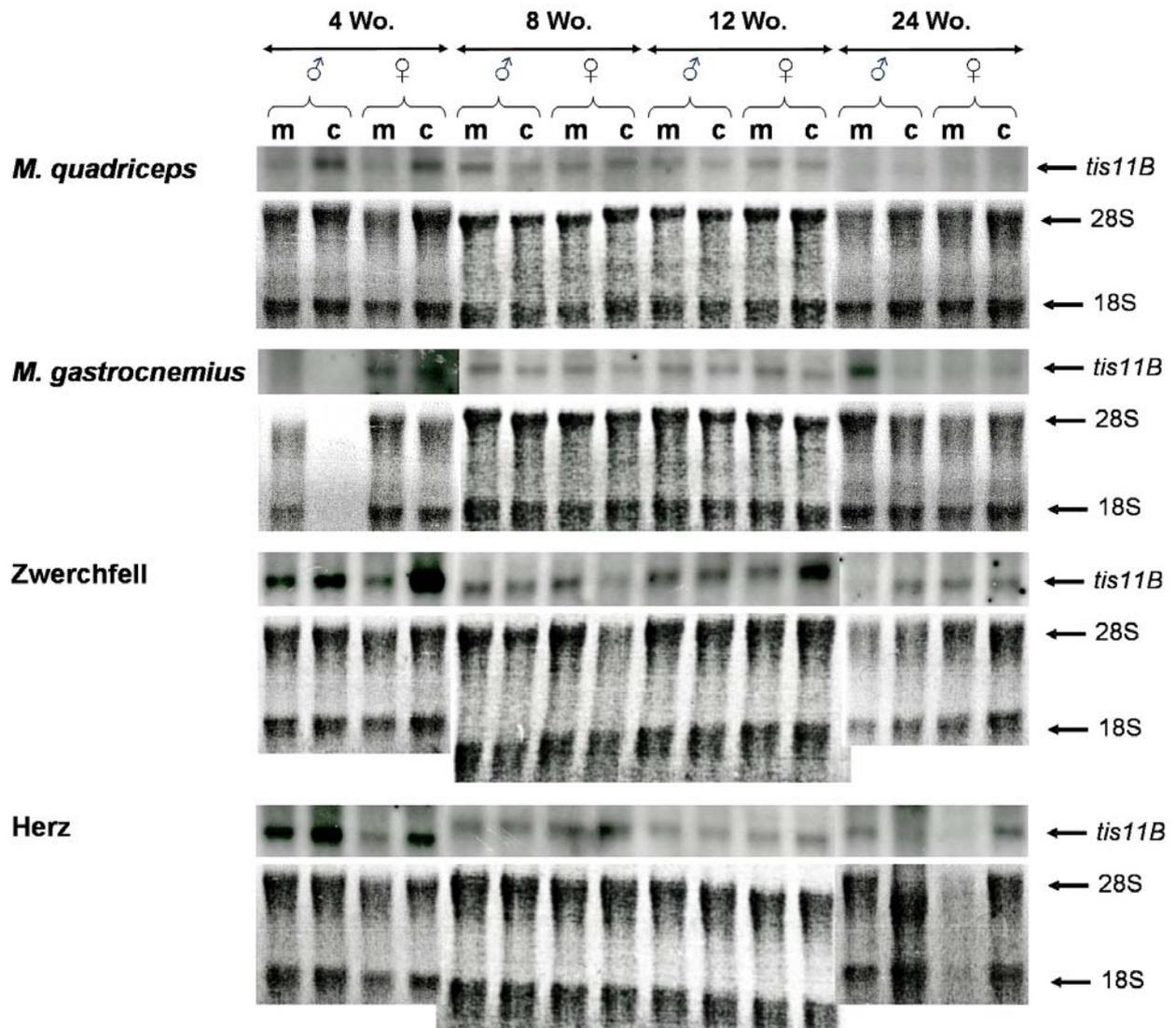


Abbildung 14: Northern Blot-Analyse der *tis11B*-Expression in verschiedenen Muskeln von *mdx*-Mäusen und Kontrolltieren.

Es wurden jeweils 2 µg gesamtzelluläre RNA pro Spur aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit der Sonde für *tis11B*. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren diente die jeweils unter den *Blots* gezeigte Methylenblau-Färbung. Man beachte die Expressionsunterschiede zwischen WT und *mdx* im *M. quadriceps* der 4 Wochen alten Tiere sowie im *M. gastrocnemius* der 8 und 12 Wochen alten Tiere.

Wie Abb. 14 zeigt, war bei vielen Paaren (*mdx* im Vergleich zu alters- und geschlechts-gleicher Kontrolle) ein deutlicher Unterschied in der *tis11B*-Expression zu erkennen.

Bei den 4 Wochen alten Tieren exprimierten die *mdx*-Mäuse in *M. quadriceps*, Zwerch-

fell und Herz weniger *tis11B* als die Kontrolltiere. In geringerem Ausmaß zeigte sich im *M. gastrocnemius* der gleiche Trend.

Bei den 8 Wochen alten Tieren hingegen hatte sich dieses Verhältnis umgedreht: Hier war im *M. gastrocnemius* und Zwerchfell, bei den männlichen Tieren auch im *M. quadriceps*, eine höhere *tis11B*-Expression bei den *mdx*-Mäusen als bei den Kontrolltieren zu erkennen. Auch im Herz ergaben sich Unterschiede im Vergleich zu den jüngeren Tieren: Der Expressionsunterschied, den die 4 Wochen alten Tiere zeigten, war hier nicht mehr erkennbar.

Die 12 Wochen alten Tiere zeigten in den Extremitätenmuskeln (*M. quadriceps* und *M. gastrocnemius*) den gleichen Trend. Der Unterschied im Zwerchfell war hingegen nicht mehr zu sehen. Im Herz war nach wie vor kein Unterschied zwischen WT- und *mdx*-Mäusen erkennbar, hier fiel lediglich eine gegenüber den 8 Wochen alten Tieren insgesamt etwas niedrigere Basalexpression auf.

Bei den 24 Wochen alten Tieren waren die Ergebnisse dagegen heterogen und ließen keinen eindeutigen Trend erkennen. Zumindest im *M. quadriceps* jedoch schien die *tis11B*-Expression bei allen vier Tieren zum Erliegen gekommen zu sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eindeutige Unterschiede zwischen *mdx*- und WT-Mäusen hinsichtlich der *tis11B*-Expression zu beobachten waren: Während die jüngsten *mdx*-Mäuse weniger *tis11B* exprimierten als die WT-Mäuse, war dieses Verhältnis – zumindest in der Extremitätenmuskulatur – bei den 8 und 12 Wochen alten Tieren genau umgekehrt.

Die beschriebenen Untersuchungen werden momentan mit einer größeren Anzahl von Tieren wiederholt.

3.4 Regulation der *tis11B*-Expression in Kardiomyozyten *in vitro*

Zu einer eventuellen differentiellen Expression von *tis11B* in Herzmuskelgewebe existierten vor Beginn dieser Arbeit keine Daten. Die im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Untersuchungen an *mdx*-Mäusen und Kontrolltieren hatten jedoch gezeigt, dass *tis11B* im Herz mindestens genauso stark exprimiert war wie im Extremitätenmuskel. Dies ließ eine Funktion von TIS11B in der Herzmuskulatur vermuten, wobei zunächst unklar war, ob die *tis11B*-Expression im Herz auf die Kardiomyozyten zurückgeführt werden kann.

Um Aufschluss über die mögliche (differentielle) Expression von *tis11B* in Herzmuskelzellen zu gewinnen, sollten im Verlauf dieser Arbeit Studien an HL-1-Zellen durchgeführt werden.

HL-1 ist eine immortalisierte Linie von murinen Kardiomyozyten, die von der Tumorzelllinie AT-1 abstammt. Dennoch weisen die Zellen einen differenzierten Phänotyp auf, und das Genexpressionsmuster entspricht etwa dem von adulten Vorhof-Kardiomyozyten. Charakteristisch für reife Herzmuskelzellen sind auch die pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften der HL-1-Zellen; unter bestimmten Konditionen kommt es sogar zur spontanen rhythmischen Kontraktion. Daher stellt diese Zelllinie ein wertvolles System zur Untersuchung von Herzmuskelzellen *in vitro* dar (28). Wir konnten nachweisen, dass das *tis11B*-Gen in HL-1-Zellen exprimiert ist (nicht gezeigt sowie Abb. 15-17), was nahe legt, dass dieses Gen auch *in vivo* von Kardiomyozyten exprimiert wird. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob die *tis11B*-Expression in diesen Zellen einer spezifischen Regulation – z.B. durch äußere Faktoren wie Zytokine oder Wachstumsfaktoren – unterliegt.

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin, für das eine wichtige Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen, darunter Myokardinfarkt, chronischer Herzinsuffizienz, Atherosklerose, viraler Myokarditis und sepsisassoziierter kardialer Dysfunktion, diskutiert wird (89). TNF- α wirkt über zwei Rezeptoren, die jeweils unterschiedliche Wirkungen zu vermitteln scheinen. In einem murinen Modell für Myokardinfarkt konnte kürzlich gezeigt werden, dass TNF- α nach dem Ereignis über den TNF- α -Rezeptor 1 toxisch auf das Myokard wirkt, während TNF- α -Rezeptor 2 eine protektive Wirkung zu haben scheint (91). Kardiomyozyten sezernieren TNF- α , vor allem unter pathologischen Bedingungen wie Infektion oder Ischämie, sind jedoch auch selbst Zielzellen für dieses Zytokin. Dabei kann TNF- α die Zellen negativ inotrop beeinflussen. Ferner konnte *in vitro* mehrfach gezeigt werden, dass TNF- α die Apoptose von Herzmuskelzellen fördert. (21, 40); die *in vivo*-Datenlage hierzu ist allerdings widersprüchlich (23, 125). Diese Effekte scheinen u. a. über Stickstoffmonoxid- (NO-) abhängige Signaltransduktionswege vermittelt zu werden, bei denen die Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) eine entscheidende Rolle spielt (37).

TNF- α hat demzufolge in der Herzmuskelzelle wichtige wie auch komplexe Funktionen bei vielen pathologischen Prozessen. Da zudem für TIS11B bekannt ist, dass es in die

Kontrolle der *tnf- α* -Expression eingebunden ist (siehe 1.3.3), war die Untersuchung der *tis11B*-Expression in HL-1-Zellen unter Einfluss von TNF- α besonders interessant.

TGF- β ist ein immunmodulatorisches Zytokin mit hauptsächlich antiinflammatorischer Wirkung. Es spielt bereits bei der Entwicklung des Herzens eine wichtige Rolle. Nach einem Myokardinfarkt ist es an der Narbenbildung, der kompensatorischen Hypertrophie der Kardiomyozyten und dem Umbau des Myokardgewebes („*remodeling*“) beteiligt. Bei Letzterem scheint es, wie auch bei der Herzentwicklung, eine proapoptische Funktion zu haben. Darüber hinaus induziert es die Expression fötaler Gene in Kardiomyozyten (88, 106, 116).

Interessanterweise kann TGF- β die negativ inotrope Wirkung von TNF- α auf Herzmuskelzellen blockieren (64). In Makrophagen und diversen Tumorzellen scheint es weiterhin die Produktion von NO inhibieren zu können (66). TGF- β und TNF- α scheinen also beim Entzündungsgeschehen, u. a. im Herz, teilweise antagonistische Funktionen zu haben.

Auch TGF- β wird von Kardiomyozyten gebildet, wobei es die Expression seines eigenen Gens inhibiert (126).

Die *tis11*-Expression kann in humanen T-Zellen durch TGF- β induziert werden (101); ob dies auch für *tis11B* zutrifft, wurde bisher nicht publiziert. Daher war die Untersuchung der *tis11B*-Expression in HL-1-Zellen unter Einfluss von TGF- β im Rahmen dieser Arbeit von großem Interesse.

Hepatocyte growth factor (HGF) wurde ursprünglich als potentes Mitogen für Hepatozyten identifiziert, seither konnten jedoch spezifische Wirkungen dieses Wachstumsfaktors auf eine Vielzahl anderer Zelltypen, unter anderem Kardiomyozyten und Endothelzellen, nachgewiesen werden (51). Daher wird angenommen, dass HGF eine wichtige Rolle innerhalb des kardiovaskulären Systems zukommt. Für Kardiomyozyten wurde dabei insbesondere nachgewiesen, dass HGF die Häufigkeit des Zelltodes durch oxidativen Stress verringert. Außerdem unterstützt es die Expression des antiapoptischen Gens *bcl-x_L*. Ferner gibt es Hinweise darauf, dass die HGF-Spiegel im Serum bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen erhöht sind. An HL-1-Zellen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass HGF den Transkriptionsfaktor GATA-4 aktiviert, der eine wichtige Rolle bei der Herzmuskelzelldifferenzierung spielt (62, 94).

Daher schien es interessant, den Effekt von HGF auf HL-1-Zellen bezüglich der Expression von *tis11B* zu untersuchen.

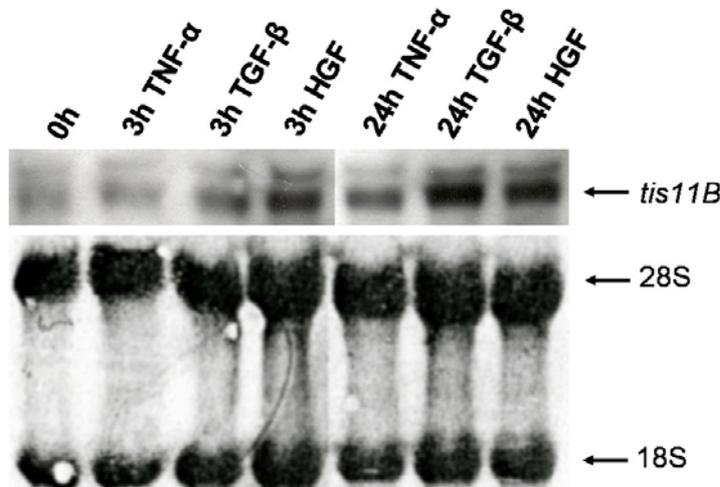


Abbildung 15: Northern Blot-Analyse der *tis11B*-Expression in HL-1-Zellen nach Behandlung mit TNF- α , TGF- β oder HGF.

Es wurden jeweils 2 μ g gesamtzelluläre RNA pro Spur aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit der Sonde für *tis11B*. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren diente die unter dem Blot gezeigte Methylenblau-Färbung.

Für alle Versuche wurden die Zellen bei 100% Konfluenz in HL-1-Hungermedium überführt, welchem 1ng/ml TNF- α oder TGF- β bzw. 5ng/ml HGF, zugegeben wurden. Aus proliferierenden Zellen sowie 3h und 24h nach Beginn der Wachstumsfaktor- bzw. Zytokinbehandlung wurde die gesamtzelluläre RNA isoliert und mittels Northern Blot-Analyse untersucht (Abb. 15).

Dabei konnte bereits nach 3h Inkubation mit TGF- β oder HGF

eine Induktion von *tis11B* nachgewiesen werden. Nach 24h hatten alle drei Zytokine eine Induktion ausgelöst, die im Falle von TGF- β und HGF besonders stark ausfiel. Diese Ergebnisse zeigen, dass *tis11B* in murinen Kardiomyozyten differentiell exprimiert wird, und dass diese Expression durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert werden kann.

Es wurde nun der Versuch unternommen, die Induktion von *tis11B* in Kardiomyozyten mittels Western Blot-Analyse auch auf Proteinebene nachzuweisen. Dabei sollte zunächst der Effekt von HGF untersucht werden. Parallel hierzu wurde mit Serum stimuliert, da dieses eine große Zahl verschiedener Wachstumsfaktoren enthält, die ebenfalls einen Einfluss auf die *tis11B*-Expression haben könnten. Außerdem bot sich dadurch die Möglichkeit, einen eventuellen spezifischeren Effekt von HGF im Vergleich zu Serum nachzuweisen.

Die Zellen wurden nach Erreichen einer Konfluenz von 100% in HL-1-Hungermedium überführt, welchem entweder 5ng/ml HGF oder 10% FCS zugegeben wurden. Aus proliferierenden Zellen sowie 5h und 24h nach Beginn der Inkubation mit HGF oder Serum wurden Proteinlysate hergestellt und mittels *Western Blot*-Analyse auf die Expression von *tis11B* hin untersucht.

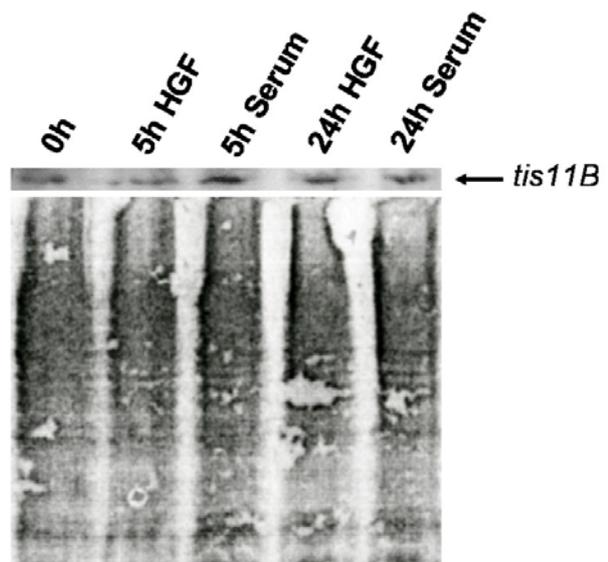


Abbildung 16: Western Blot-Analyse von TIS11B in murinen Kardiomyozyten nach Behandlung mit HGF bzw. Serum.

Es wurden jeweils 40µg Proteinlysate pro Spur sowie 5µl Roti[®]-Mark als Größenmarker aufgetragen. Die Membran wurde zuerst mit Kaninchen-anti-TIS11B-AP (primärer Antikörper) und anschließend mit Peroxidase-gekoppeltem Esel-anti-Kaninchen-IgG (sekundärer Antikörper) inkubiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren diente die unter dem *Blot* gezeigte Ponceau S-Färbung. Eine Induktion von *tis11B* ist nur nach 5h Inkubation mit Serum sicher erkennbar.

Wie Abb. 16 zeigt, ließ sich dabei eine für TIS11B spezifische Bande bei ca. 36 kD nachweisen. Eine Regulation der *tis11B*-Expression durch HGF war jedoch zu keinem Zeitpunkt sicher nachzuweisen. Lediglich nach 5h Inkubation mit Serum ist eine Induktion sicher erkennbar. Dies könnte mit der geringen Spezifität des verwendeten primären Antikörpers zusammenhängen. Da bei einer parallelen *Northern Blot*-Analyse deutliche Effekte der Serum- und HGF-Behandlung auf die *tis11B*-Expression nachgewiesen werden konnten und weiterhin auch die Expression verschiedener anderer Gene in den entsprechenden Zellen reguliert war (99), ist es unwahrscheinlich, dass die verwendete HGF-Charge oder das verwendete Serum unwirksam waren, oder dass die Zellen aus technischen Gründen nicht auf die Stimulation ansprachen.

Aufgrund der besonderen Bedeutung von TNF- α hinsichtlich der *tis11B*-Induktion wurde dieses in einem weiteren Versuch noch einmal genauer untersucht.

Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen in zwei Gruppen geteilt, von denen eine mit TNF- α wie unter 3.4.2 beschrieben behandelt wurde. Die andere Gruppe wurde vor der Zytokinbehandlung durch Inkubation mit HL-1-Hungermedium über Nacht zur Quieszenz gebracht.

Die gesamtzelluläre RNA wurde aus proliferierenden Zellen sowie 3h, 5h und 24h nach Beginn der Zytokinbehandlung isoliert. Außerdem wurden Negativkontrollen aus 24h

nach Versuchsbeginn mit Hungermedium ohne Zytokin inkubierten Zellen gewonnen. Die RNA wurde mittels *Northern Blot*-Analyse untersucht (Abb. 17).

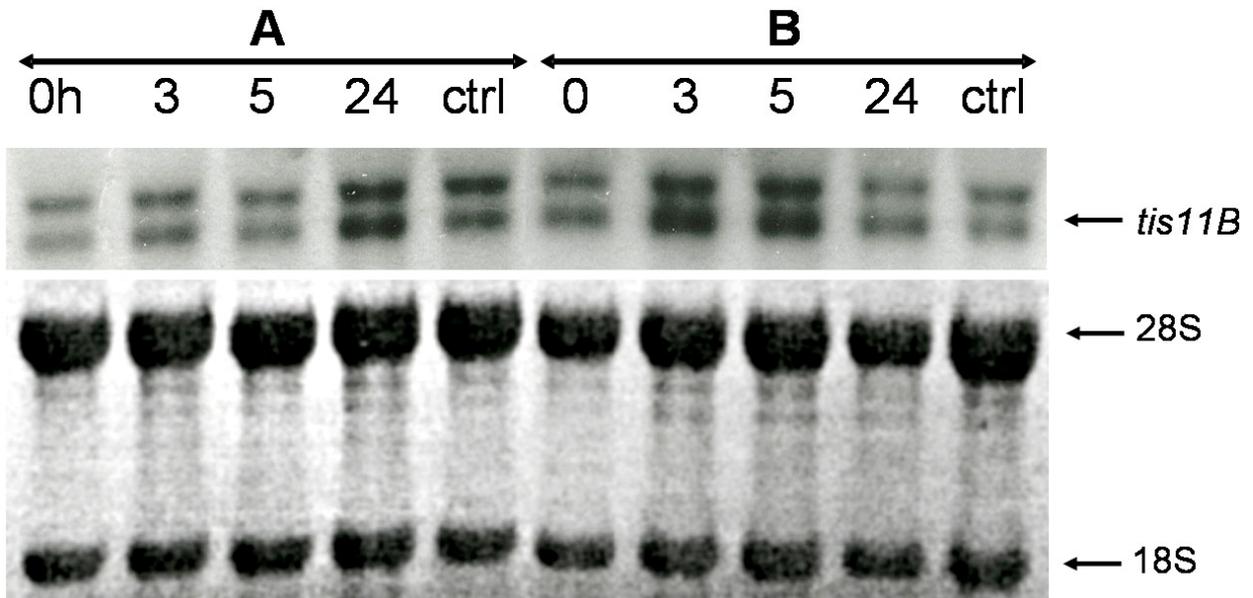


Abbildung 17: Northern Blot-Analyse der *tis11B*-Expression nach Behandlung mit TNF- α in nicht-quieszenten (A) und quieszenten (B) HL-1-Zellen.
 Es wurden jeweils 2 μ g gesamtzelluläre RNA pro Spur aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit der Sonde für *tis11B*. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren diente die unter dem *Blot* gezeigte Methylenblau-Färbung. Man beachte den unterschiedlichen zeitlichen Verlauf der *tis11B*-Induktion bei den verschiedenen vorbehandelten Zellen.

Bei den vor Versuchsbeginn nicht-quieszenten Zellen war nach 3-5h eine schwache *tis11B*-Induktion erkennbar. Nach 24h war dann eine sehr starke Induktion zu beobachten (Abb. 17A). Dies entsprach den Ergebnissen des oben beschriebenen Experiments (Abb. 15). Demgegenüber war die *tis11B*-Expression in den quieszenten Zellen bereits nach 3h massiv induziert. Nach 5h war die Expression unverändert stark, nach 24h jedoch bereits wieder auf das Ausgangsniveau abgefallen (Abb. 17B).

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der zeitliche Verlauf der *tis11B*-Induktion durch TNF- α von anderen im Serum vorhandenen Faktoren moduliert wird.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass *tis11B* in Herzmuskelzellen *in vitro* differentiell exprimiert wird, und dass diese Expression durch eine Vielzahl exogener und endogener Faktoren moduliert werden kann.

3.5 *Tis11B*-Expression im Herzmuskelgewebe Coxsackie-Virus B3-infizierter Mäuse

Coxsackie-Viren sind Enteroviren aus der Familie der Picornaviren, die Menschen und Tiere befallen können. Die Durchseuchung der Bevölkerung weltweit ist hoch, wobei die Mehrzahl der Infektionen asymptomatisch verläuft. Treten Symptome auf, so sind grippeartige oder gastrointestinale Beschwerden häufig.

Bei ca. 1% seiner Wirte lösen Coxsackie-Viren jedoch eine infektiöse Myokarditis aus, Viren des B-Stammes sogar bei bis zu 4%. Man geht jedoch von einer deutlich höheren Dunkelziffer aus, da die Mehrzahl der Fälle vermutlich sehr leicht oder sogar klinisch inapparent verläuft. Nicht selten geht aus der akuten Entzündung eine chronische Myokarditis hervor. Als Ursache hierfür werden sowohl Viruspersistenz als auch ein durch das Virus ausgelöstes Autoimmungeschehen diskutiert. Die Folge kann, besonders im Falle der Chronifizierung, eine inflammatorische dilatative Kardiomyopathie sein (49, 50, 58, 100).

Ähnliches wie für das menschliche Krankheitsbild gilt für die Infektion bei der Maus. Dabei werden bei beiden Spezies Prävalenz und Verlauf der Erkrankung nicht nur durch den Virustyp, sondern auch durch die genetische Disposition und das Immunsystem des Wirts bestimmt (63, 117).

In dem nachfolgend beschriebenen *in vivo*-Experiment wurden daher zwei immunkompetente murine Zuchtstämme mit Coxsackie-Virus B3 (CVB3) infiziert, die typischerweise einen unterschiedlichen Krankheitsverlauf zeigen. Die Tiere beider Stämme entwickeln eine akute Myokarditis unterschiedlicher Stärke. Dabei lässt sich bereits einige Tage *post infectionem* (*p. i.*) eine Induktion von TNF- α , iNOS, Interferonen, IL-10 und IL-18 im Herz nachweisen. Die Erkrankung erreicht 12-15 Tage *p. i.* ihren Höhepunkt. Nach 18-21 Tagen ist sie bei Tieren vom Stamm C57BL/6 für gewöhnlich abgeklungen, während es bei Tieren vom Stamm A.BY/SnJ trotz Immunkompetenz regelmäßig zur Viruspersistenz im Herzmuskel mit chronischer Inflammation kommt (43, 63, 74).

Es sollte nun zum einen untersucht werden, ob eine Infektion mit CVB3 allgemein zu einer Veränderung der *tis11B*-Expression im Herzmuskelgewebe führt, zum anderen, ob die Art des verwendeten Zuchtstammes, und damit der genetische Hintergrund der Tiere, einen Einfluss auf das *tis11B*-Expressionsmuster hat.

Hierfür wurden pro Versuch und Stamm 20 gleichaltrige Tiere untersucht, das Geschlecht war gemischt. Jeweils die Hälfte der Tiere eines Stammes diente als nicht infizierte Kontrolle. Die Infektion der betreffenden Mäuse wurde im Alter von 4 Wochen durchgeführt, 8 Tage später wurden alle 20 Tiere getötet. Die Herzen wurden präpariert, die gesamtzelluläre RNA aus dem Gewebe isoliert und mittels *Northern Blot*-Verfahren auf Expression des *tis11B*-Gens hin untersucht.

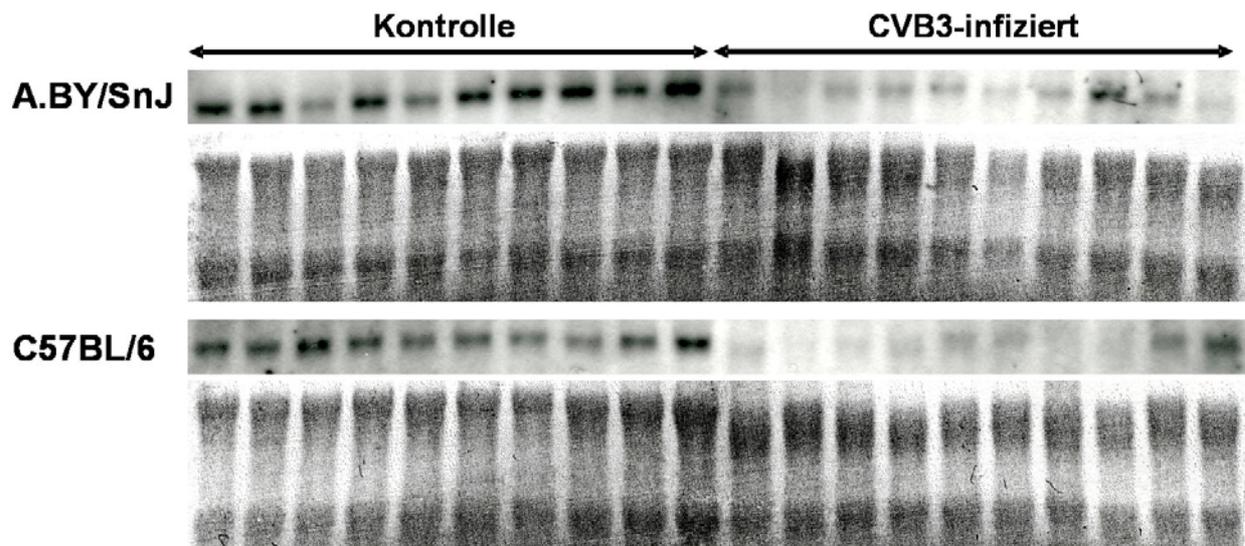


Abbildung 18: Northern Blot-Analyse der *tis11B*-Expression in Mäusen der Stämme A.BY/SnJ und C57BL/6 mit und ohne Infektion mit CVB3.

Es wurden jeweils 2 µg gesamtzelluläre RNA pro Spur aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit der Sonde für *tis11B*. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren diente die jeweils unter dem Blot gezeigte Methyleneblau-Färbung. Man beachte den massiven Rückgang der *tis11B*-Expression nach Infektion mit CVB3 bei beiden Stämmen.

Wie Abb. 18 zeigt, war die *tis11B*-Expression im Herz bei fast allen CVB3-infizierten Tieren 8 Tage *p. i.* deutlich niedriger als bei den Kontrolltieren. Ein Unterschied zwischen den Zuchtstämmen war jedoch nicht erkennbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei CVB3-induzierter, akuter Myokarditis, bei der es zu einer massiven Entzündungsreaktion im Herz mit Induktion von TNF- α und anderen inflammatorischen Zytokinen kommt, zumindest 8 Tage *p. i.* die *tis11B*-Expression inhibiert wird. Dies ist bei Tieren beider Zuchtstämme gleichermaßen der Fall; die genetische Disposition zur Chronifizierung der Krankheit durch Viruspersistenz hat also, zumindest in dieser Phase der Erkrankung, offenbar keinen Einfluss auf die *tis11B*-Expression.