

4 Diskussion

Schon vor Beginn dieser Arbeit gab es Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von TIS11B bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung. Unsere Arbeitsgruppe konnte schließlich zeigen, dass die Expression des *tis11B*-Gens bei der Myogenese *in vitro* induziert wird (14). Deshalb wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit auf der Basis funktioneller *in vitro*-Studien damit begonnen, dieses Gen hinsichtlich seiner Rolle bei der Muskelzellentwicklung genauer zu analysieren (13). An diese Studien schließt sich die hier vorliegende Arbeit, deren Ziel insbesondere die Untersuchung der *tis11B*-Expressionsmuster in der quergestreiften Muskulatur unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen war, unmittelbar an.

Dabei sollte zunächst geklärt werden, ob es Hinweise auf eine Beteiligung weiterer *tis11*-Gene an der Regulation der Myogenese gibt. In diesem Fall hätte meine Arbeit auch diese Gene eingeschlossen.

Im Anschluss daran sollten die Expressionsmuster aller interessant erscheinenden *tis11*-Gene in Muskelzelllinien mit unterschiedlichem, teilweise pathologischem, Differenzierungsverhalten untersucht werden, um zu klären, ob eine Korrelation zwischen der *tis11*-Genexpression und dem Differenzierungspotential einer Muskelzelle besteht. Parallel dazu sollte analysiert werden, ob sich die differentielle Expression von *tis11B* und gegebenenfalls anderen *tis11*-Genen bei der Muskelzellendifferenzierung auch in einem *in vivo*-Modell nachweisen lässt.

Abschließend sollte geklärt werden, ob die betreffenden Gene auch in der Herzmuskulatur differentiell exprimiert werden. Hierfür standen geeignete *in vitro*- und *in vivo*-Modelle zur Verfügung.

4.1 Die Expression des *tis11*- und des *tis11D*-Gens wird bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung *in vitro* nicht induziert

Mit Hilfe von im Rahmen dieser Arbeit neu entworfenen RNA-Sonden konnte gezeigt werden, dass die Expression des *tis11*- und des *tis11D*-Gens bei der Differenzierung muriner Skelettmuskelzellen *in vitro* nicht induziert wird. Dieses Ergebnis weist 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.

4.2 Das *tis11B*-Transkript stellt sich bei der Analyse von aus kultivierten Zellen gewonnenem Material im *Northern Blot* als Doppelbande dar

Bei allen *in vitro*-Experimenten in dieser Arbeit stellte sich das *tis11B*-Transkript im *Northern Blot* als Doppelbande dar. Dieses Phänomen wurde bereits bei früheren in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studien beobachtet (13), seine Ursache ist jedoch unbekannt.

Jedoch kann zumindest der Prototyp der TIS11-Familie, das Protein TTP, an seine eigene mRNA binden und diese destabilisieren (131). Der erste Schritt der ARE-vermittelten Destabilisierung, die Deadenylierung, führt dabei zu Transkripten von etwas unterschiedlicher Größe, was sich in deren Laufgeschwindigkeit im Elektrophoresegel bemerkbar macht (69). Auch das *tis11B*-Transkript besitzt am 3'-Ende ein ARE sowie ein Polyadenylierungssignal (15). Es wäre daher denkbar, dass die *tis11B*-mRNA durch ARE-destabilisierende Proteine, darunter möglicherweise TIS11B selbst oder andere TIS11-Proteine, deadenyliert wird. Die Doppelbande im *Northern Blot* könnte somit Ausdruck einer adenylierten und einer deadenylierten Form der *tis11B*-mRNA sein.

Demgegenüber konnte interessanterweise bei sämtlichen *in vivo*-Experimenten dieser Arbeit nur eine einzelne Bande für *tis11B* nachgewiesen werden. Die Ursache dafür könnte sein, dass die aus Gewebeproben gewonnene RNA in der Regel nicht den gleichen Reinheitsgrad besitzt wie die aus Zellkulturen isolierte und somit das Auflösungsvermögen des verwendeten Elektrophoresegels nicht ausreichte, um eine eventuell vorhandene Doppelbande sichtbar zu machen. Darüber hinaus wurde die RNA-Isolierung aus Gewebe und Zellkultur mittels verschiedener Methoden durchgeführt (siehe 2.2.3.6.2 und 2.2.3.6.3).

4.3 Es existieren Hinweise auf eine Korrelation zwischen *tis11B*-Expression und myogenem Differenzierungspotential

Um zu klären, ob eine Korrelation zwischen der *tis11B*-Expression und dem myogenen Differenzierungspotential von Skelettmuskelzellen besteht, wurden Myoblasten-Zelllinien mit gleichem genetischem Hintergrund, aber unterschiedlichem Differenzierungs-

potential, bezüglich ihres *tis11B*-Expressionsmusters in Proliferations- und Differenzierungsmedium miteinander verglichen.

4.3.1 Differenzierende C2C12- und C2F3-Zellen zeigen ein ähnliches *tis11B*-Expressionmuster

Bei der vergleichenden Untersuchung der *tis11B*-Expression in C2C12- und C2F3-Myoblasten fiel zunächst eine höhere Basalexpression in den C2C12-Zellen auf. Dies könnte mit dem höheren Differenzierungspotential dieser Zelllinie assoziiert sein. Beide Zelllinien zeigten nach einem Tag in Differenzierungsmedium eine starke Induktion der *tis11B*-Expression. Anschließend war ein massiver Abfall der Expression, gefolgt von einem langsamen Wiederanstieg auf ein Niveau unterhalb der Basalexpression, zu beobachten. Insgesamt war also ein bei beiden Zelllinien sehr ähnliches biphasisches Expressionsmuster zu beobachten, der Verlauf war jedoch zeitlich verschoben: Die langsamer und teilweise unvollständig differenzierenden C2F3-Zellen (10) zeigten auch eine langsamere Kinetik. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die bei C2F3-Zellen beobachtete verlangsamte Repression der *tis11B*-Expression nach der anfänglichen Induktion mit dem geringen Differenzierungspotential dieser Zelllinie assoziiert ist. Somit ist möglicherweise nicht nur der anfängliche Anstieg der *tis11B*-Expression, sondern auch die während späterer Stadien zu beobachtende Repression für den regelrechten Ablauf der Skelettmuskelzellendifferenzierung von Bedeutung. Insgesamt weisen diese Daten darauf hin, dass das *tis11B*-Expressionsmuster in proliferierenden und differenzierenden Myoblasten mit dem Differenzierungspotential dieser Zellen assoziiert sein könnte.

4.3.2 Die Expression des *tis11B*-Gens wird in RD/18- und RD/12-Rhabdomyosarkomzellen während der frühen Phase der Differenzierung nicht induziert

Aufbauend auf diese Daten sollte untersucht werden, ob sich bei Myoblasten-Zelllinien mit gestörtem Differenzierungsverhalten auch ein aberrantes Expressionsmuster von *tis11B* nachweisen lässt. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit auch humane Rhabdomyosarkomzellen der Linie RD untersucht. Problematisch war dabei die Tatsache, dass es zu RD-Zellen keine Negativkontrolle „gesunder“ Myoblasten vom gleichen Patienten gibt. Daher wurden zwei unterschiedliche Abkömmlinge der RD-

Zelllinie, RD/12- und RD/18-Zellen, untersucht und miteinander verglichen, wobei RD/12-Zellen kaum mehr zur Differenzierung befähigt sind, wogegen RD/18-Zellen nach Serumentzug Merkmale einer, wenn auch verlangsamten und unvollständigen, terminalen Differenzierung zeigen (78).

Über einen Untersuchungszeitraum von 48h ließ sich jedoch weder bei RD/12- noch bei RD/18-Zellen eine Induktion der *tis11B*-Expression in Differenzierungsmedium beobachten. Eine insgesamt etwas höhere Basalexpression von *tis11B* war bei den RD/18-Zellen zu erkennen, was mit dem höheren Differenzierungspotential dieser Zellen zusammenhängen könnte.

Auch nach 72h kam es zu keiner Veränderung der *tis11B*-Expression in RD/18-Zellen. Demgegenüber erfolgte bei beiden Zelllinien eine Induktion der *p21*-Genexpression. Dieses Gen ist für den Austritt aus dem Zellzyklus von Bedeutung und wird in normalen Myoblasten 24h nach Beginn der Differenzierung induziert (46). Darüber hinaus wurden in meinen Studien – zumindest bei RD/18-Zellen – regelmäßig charakteristische Veränderungen im histologischen Erscheinungsbild beobachtet, was ebenfalls darauf hinweist, dass die Zellen unter den gewählten Versuchsbedingungen tatsächlich mit der Differenzierung beginnen.

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 ist. Der für Muskelzellen spezifische Differenzierungsmarker *myosin heavy chain* wird in RD/18-Zellen erst nach 6-7 Tagen Behandlung mit Differenzierungsmedium induziert, in normalen Myoblasten jedoch bereits nach ca. 48h (78, 92). Daher wird in unserer Arbeitsgruppe zurzeit untersucht, ob die Induktion von *tis11B* möglicherweise später im Verlauf der Differenzierung dieser Zellen stattfindet.

Da aber auch denkbar war, dass bei einer Störung der *tis11B*-Expression ein anderes *tis11*-Gen dessen Funktion zumindest teilweise übernehmen könnte, wurde die Expression von *tis11* und *tis11D* in RD-Zellen ebenfalls analysiert.

Beide Gene zeigten eine gut nachweisbare Basalexpression, die bei beiden Zelllinien etwa gleich stark ausfiel. Es ließ sich jedoch weder bei RD/12- noch bei RD/18-Zellen eine Induktion nach Behandlung mit Differenzierungsmedium beobachten. Dies ist ein

weiterer Hinweis darauf, dass die differentielle Expression im Verlauf der Myogenese eine spezifische Eigenschaft des *tis11B*-Gens sein könnte.

4.4 Die Gene *tis11B* und *tis11D* sind in vielen murinen Geweben exprimiert; das *tis11*-Gen ist jedoch unter physiologischen Bedingungen in den meisten Geweben nicht oder kaum exprimiert

Als Modell für die Differenzierung und Regeneration von Skelettmuskelzellen *in vivo* wurde die *mdx*-Maus gewählt. Diese Tiere entwickeln ab einem Alter von 2-3 Wochen entzündliche Degenerationserscheinungen im Muskelgewebe mit Untergang von Muskelzellen, was jedoch in den darauf folgenden Monaten durch eine zunehmend effektive Regeneration ausgeglichen werden kann (102).

4.4.1 Die Gene *tis11B* und *tis11D* sind in vielen Geweben von WT- und *mdx*-Mäusen nachweisbar exprimiert

Um die Expressionsmuster der *tis11*-Gene in Muskel- und Nichtmuskelgewebe von *mdx*- und Wildtypmäusen miteinander zu vergleichen, wurden zunächst für alle Gene detaillierte Analysen ihrer Expressionsmuster in verschiedenen murinen Geweben vorgenommen. Hierzu lagen vor Beginn dieser Arbeit nur wenige Daten vor.

***Tis11B*:**

Das *tis11B*-Gen war in fast allen Organen messbar exprimiert, besonders stark in lymphatischen Geweben (Milz, Lymphknoten, Thymus), der Aorta, Lunge und Hoden. Eine Ausnahme bildete möglicherweise der Gastrointestinaltrakt.

Für diese Arbeit war insbesondere die Expression in denjenigen Geweben interessant, deren Hauptanteil aus Skelett-, Herz- oder glatten Muskelzellen besteht. Hierbei ließen sich folgende Unterschiede feststellen: Im Skelettmuskel der Extremitäten war die *tis11B*-Expression vergleichsweise am schwächsten, im Herz stärker und im Uterus am stärksten. Es kann jedoch 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. In Hinblick auf die Skelettmuskulatur muss dabei beachtet werden, dass hier nur ein hinsichtlich Alter und Geschlecht korrektes Vergleichspaar aus *mdx*-Maus und Kontrolle

verwendet wurde (die beiden Weibchen), welches darüber hinaus nicht gemeinsam in einer einzelnen *Northern Blot*-Analyse untersucht wurde.

Ein Unterschied zwischen WT- und *mdx*-Mäusen war lediglich in der Leber zu erkennen. Hier war die Expression bei den *mdx*-Mäusen deutlich geringer. Die Gründe hierfür sind unklar, jedoch ist ein Zusammenhang mit dem durch den Dystrophinmangel gestörten Ca^{2+} -Haushalt bei den betroffenen Tieren denkbar, der auch in der Leber spezifische Veränderungen des Stoffwechsels und des Genexpressionsmusters hervorrufen könnte (33).

Tis11D:

Die *tis11D*-Expression war in vielen Geweben deutlich messbar, besonders stark in Lymphknoten und Thymus, Lunge, Aorta und Haut. Es zeigte sich ferner eine sehr hohe *tis11D*-Expression in den Herzen der WT-Mäuse, die bei den *mdx*-Mäusen deutlich niedriger war.

Auch im Uterus war *tis11D* deutlich messbar exprimiert; in der Extremitätenmuskulatur war die Expression im Vergleich der drei untersuchten muskulären Organe am schwächsten.

Tis11:

Die Analyse der *tis11*-Expression in verschiedenen Geweben auf RNA-Ebene bestätigte prinzipiell die Ergebnisse älterer Publikationen, aus denen hervorgeht, dass *tis11* in den meisten Geweben zwar durch Zytokine und andere exogene Faktoren stark induziert wird (siehe 1.3.2), jedoch basal in der Regel nicht messbar exprimiert wird (16, 79). Zwar ließ sich bei einigen Organen eine minimale Expression erahnen, gut nachweisbar war eine Expression des *tis11*-Gens jedoch lediglich im Lymphknoten und in der Lunge. Es gab keine Unterschiede zwischen WT- und *mdx*-Mäusen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *tis11*, übereinstimmend mit den Ergebnissen bisheriger Publikationen, in den meisten Geweben kaum nachweisbar exprimiert wird. Demgegenüber war die Expression von *tis11B* und *tis11D* in fast allen Geweben, darunter alle Muskelgewebstypen, nachweisbar. Diese beiden Gene zeigen also im Vergleich zu *tis11* eine größere Ähnlichkeit bezüglich des Expressionsmusters im Gewebe. Alle untersuchten *tis11*-Gene werden offenbar in lymphatischen Geweben, insbesondere den Lymphknoten, recht stark exprimiert.

Aufgrund der Expressionsunterschiede von *tis11D* zwischen WT- und *mdx*-Mäusen im Herz wäre eine genauere Untersuchung zu den *tis11D*-Expressionsmustern in diesem Organ interessant.

4.4.2 Das *tis11B*-Gen wird in der Muskulatur von *mdx*-Mäusen differentiell exprimiert

Die Analyse der *tis11B*-Expression in der Muskulatur von *mdx*-Mäusen als Modell für die Differenzierung und Regeneration von Skelettmuskelzellen *in vivo* wurde an acht Paaren durchgeführt, die jeweils aus einer *mdx*-Maus im Alter von 4, 8, 12 oder 24 Wochen sowie einem Kontrolltier gleichen Alters und Geschlechts bestand. Von jedem Tier wurden *M. quadriceps*, *M. gastrocnemius*, Zwerchfell und Herz untersucht. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen *mdx*- und Kontrolltieren.

Die 4 Wochen alten *mdx*-Mäuse exprimierten in *M. quadriceps*, Zwerchfell und Herz weniger *tis11B* als die Kontrolltiere. In geringerem Ausmaß zeigte sich im *M. gastrocnemius* der gleiche Trend.

Bei den 8 Wochen alten Tieren war demgegenüber im *M. gastrocnemius* und Zwerchfell, bei den männlichen Tieren auch im *M. quadriceps*, bei den *mdx*-Mäusen eine höhere *tis11B*-Expression als bei den Kontrolltieren zu erkennen.

Der bei den 4 Wochen alten Tieren erkennbare Expressionsunterschied im Herz war in dieser Altersgruppe nicht nachweisbar.

Im Alter von 12 Wochen zeigte sich in den Extremitätenmuskeln, nicht jedoch im Zwerchfell, der gleiche Trend wie bei den 8 Wochen alten Tieren. Im Vergleich zu diesen fiel im Herz weiterhin eine etwas niedrigere Basalexpression auf, ohne dass ein Unterschied zwischen WT- oder *mdx*-Mäusen erkennbar war.

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

Diese Ergebnisse zeigten eindeutige Unterschiede zwischen *mdx*- und WT-Mäusen hinsichtlich der *tis11B*-Expression. Insbesondere in der Extremitätenmuskulatur war bei den 8 und 12 Wochen alten *mdx*-Mäusen eine deutlich höhere *tis11B*-Expression als bei den Kontrollen zu beobachten. Die histopathologische Untersuchung deutete auf eine gegenüber den 4 Wochen alten Tieren massive Zunahme regenerativer Prozesse in den Muskeln dieser Tiere hin. Dies könnte auf die Induktion dieses Gens in den

Satellitenzellen oder Myoblasten im Rahmen der Regeneration von Muskelzellen zurückzuführen sein und deutet auf eine funktionelle Rolle von *tis11B* bei der Regeneration und Differenzierung von Skelettmuskelzellen *in vivo* hin.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse scheint es für die Zukunft sinnvoll, Untersuchungen zur Expression von *tis11B* in den verschiedenen Zelltypen des Muskelgewebes anzustellen. Dabei könnten *in situ*-Hybridisierungs- und Immunfluoreszenzverfahren wichtige Erkenntnisse liefern. Auch die gleichzeitige Visualisierung von Satellitenzellen durch entsprechende Marker wie M-Cadherin, Pax-7 oder CD 34 (93) könnte hier von Bedeutung sein.

Einschränkt wird die Aussagekraft der hier vorliegenden Untersuchung durch die Tatsache, dass sich in der Skelettmuskulatur der *mdx*-Mäuse, besonders bei den Altersgruppen, die die größten Unterschiede hinsichtlich der *tis11B*-Expression zeigen, massive inflammatorische Infiltrate fanden, wie die histopathologische Untersuchung des *M. gastrocnemius* ergab. Der Anteil, den die Entzündungszellen an der Gesamtmenge der RNA haben, die aus dem jeweiligen Muskel isoliert wurde, ist schwer einzuschätzen.

Weiterhin stellt sich die Frage, warum, im Gegensatz zu den älteren Tieren, die 4 Wochen alten *mdx*-Mäuse in allen Skelettmuskeln und sogar im Herz weniger *tis11B* als die Kontrolltiere exprimierten.

Eine Erklärung könnte sein, dass es im Rahmen der in diesem Alter oder kurz davor akut einsetzenden Entzündung in der Muskulatur zu einer generalisierten Entzündungsreaktion im Körper der Tiere kommt. Über noch unbekannte Mechanismen könnte so eine Inhibition der *tis11B*-Expression in verschiedenen Geweben, auch Muskeln und Herz, ausgelöst werden. Auch bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an Herzen Coxsackie-Virus B3-infizierter Mäuse im Akutstadium der Myokarditis (siehe 3.5) wurde eine Inhibition der *tis11B*-Genexpression beobachtet.

Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine wichtige Rolle von *tis11B* bei der Regeneration und Differenzierung von Skelettmuskelzellen *in vivo* hin.

4.5 Das *tis11B*-Gen wird in Herzmuskelgewebe *in vitro* und *in vivo* differentiell exprimiert

Vor Beginn dieser Arbeit existierten keine Daten darüber, ob das *tis11B*-Gen auch in Herzmuskelgewebe exprimiert wird und welche Funktion das entsprechende Protein dort haben könnte. Aus den Untersuchungen an *mdx*-Mäusen ging jedoch hervor, dass dieses Gen im Herz stark exprimiert war. Dies ließ eine Funktion von TIS11B in der Herzmuskulatur vermuten.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Herzmuskelgewebe unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen mittels geeigneter *in vitro*- und *in vivo*-Modelle hinsichtlich der *tis11B*-Expression untersucht.

4.5.1 Die *tis11B*-Expression in HL-1-Zellen kann durch HGF, TNF- α und TGF- β induziert werden

Um Aufschluss darüber zu bekommen, ob die an *mdx*-Mäusen und Kontrolltieren im Herz nachgewiesene *tis11B*-Expression zumindest teilweise auf die Kardiomyozyten zurückgehen könnte, und um Erkenntnisse über eine mögliche differentielle Expression von *tis11B* in diesen Zellen zu gewinnen, wurden im Verlauf dieser Arbeit Studien an HL-1-Zellen durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine immortalisierte Linie von murinen Kardiomyozyten, die einen differenzierten Phänotyp aufweisen und hinsichtlich des Genexpressionsmusters sowie pharmakologischer und elektrophysiologischer Eigenschaften etwa adulten Vorhofkardiomyozyten entsprechen (28).

Wir konnten nachweisen, dass das *tis11B*-Gen in HL-1-Zellen exprimiert ist. 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.

Daher wurde die *tis11B*-Expression in HL-1-Zellen untersucht, die entweder mit HGF, TGF- β oder TNF- α inkubiert worden waren. Diese Faktoren wurden insbesondere deshalb ausgewählt, weil bereits vor Beginn dieser Arbeit bekannt war, dass sie vielfältige Effekte auf Kardiomyozyten haben und eine bedeutende Rolle bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen spielen:

HGF ist ein Wachstumsfaktor, für den u. a. spezifische Wirkungen auf Kardiomyozyten und Endothelzellen gezeigt werden konnten. Darüber hinaus ist der HGF-Spiegel im

Serum bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen erhöht. Daher wird angenommen, dass HGF eine wichtige, möglicherweise protektive Rolle innerhalb des kardiovaskulären Systems zukommt (51). An HL-1-Zellen konnte ferner gezeigt werden, dass HGF den Transkriptionsfaktor GATA-4 aktiviert, der eine wichtige Rolle bei der Herzmuskelzellendifferenzierung spielt (62).

Das immunmodulatorische, hauptsächlich antiinflammatorisch wirkende Zytokin TGF- β scheint bereits bei der Entwicklung des Herzens eine wichtige Rolle zu spielen. Es 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; ob dies auch für *tis11B* zutrifft, wurde bisher nicht publiziert (101).

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin, für das eine wichtige Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen diskutiert wird (89). Kardiomyozyten sezernieren TNF- α , vor allem unter pathologischen Bedingungen wie Infektion oder Ischämie, sind jedoch auch selbst Zielzellen für dieses Zytokin. Dabei hat es eine negativ inotrope Wirkung auf die Herzmuskelzellen, die interessanterweise von TGF- β inhibiert werden kann. TNF- α scheint in der Herzmuskelzelle eine wichtige wie auch komplexe Rolle bei vielen pathologischen Prozessen zu spielen. Darüber hinaus ist bekannt, dass TIS11B und TNF- α die Expression ihrer Gene, vermutlich im Rahmen eines *Feedback*-Mechanismus, gegenseitig beeinflussen (siehe 1.3).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bereits nach 3h Inkubation mit TGF- β oder HGF eine Induktion von *tis11B* nachgewiesen werden; nach 24h hatten alle drei Zytokine eine Induktion dieses Gens ausgelöst. Damit konnte gezeigt werden, dass *tis11B* in murinen Kardiomyozyten differentiell exprimiert wird, und dass diese Expression durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert bzw. reguliert werden kann.

Die Regulation durch TNF- α wurde aufgrund der besonderen Relevanz dieses Zytokins bei kardiovaskulären Erkrankungen in einer weiteren Versuchsreihe noch einmal genauer untersucht. Dabei wurde ein großer zeitlicher Unterschied hinsichtlich des Induktionsbeginns zwischen quieszenten und nicht-quieszenten Zellen beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass der zeitliche Verlauf der *tis11B*-Induktion durch TNF- α durch andere im Serum vorhandene Faktoren moduliert wird.

Auf Proteinebene konnten diese Ergebnisse, zumindest hinsichtlich der *tis11B*-Induktion durch HGF, nicht bestätigt werden, was wahrscheinlich an der mangelnden Spezifität des zum damaligen Zeitpunkt zur Verfügung stehenden Antikörpers lag. Zurzeit werden in unserer Arbeitsgruppe verschiedene kommerzielle Antikörper auf ihre Spezifität getestet, um die entsprechenden Studien baldmöglichst wiederholen zu können. Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Untersuchung darauf hin, dass das *tis11B*-Gen bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen aufgrund der damit verbundenen hohen Spiegel an Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Serum und in der ECM induziert werden könnte.

4.5.2 Im Akutstadium der CVB3-induzierten Myokarditis bei der Maus wird die Expression des *tis11B*-Gens in der Herzmuskulatur reprimiert

Das Coxsackie-Virus B3 ist ein Enterovirus, das bei bis zu 4% seiner Wirte, dies können sowohl Mensch als auch Maus sein, eine infektiöse Myokarditis auslösen kann. Aus der akuten Entzündung geht in einigen Fällen durch Viruspersistenz oder Autoimmunprozesse eine chronische Myokarditis hervor, was häufig zu einer inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie führt (49, 50, 58, 100).

Prävalenz und Verlauf der Erkrankung, insbesondere die Häufigkeit der Viruspersistenz, werden nicht nur durch den Virustyp, sondern auch durch die genetische Disposition und das Immunsystem des Wirts bestimmt. Bei den beiden im Verlauf dieser Arbeit analysierten immunkompetenten Mausstämmen C57BL/6 und A.BY/SnJ äußert sich dies darin, dass nach einer von Tieren beider Stämme gleichermaßen durchgemachten akuten Myokarditis die Entzündung bei C57BL/6-Tieren in der Regel nach 18-21 Tagen abklingt, während A.BY/SnJ-Tiere fast immer eine chronische Myokarditis durch Viruspersistenz entwickeln (43, 63, 117).

Die Untersuchung dieser Tiere sollte daher zum einen klären, ob eine Infektion mit CVB3 allgemein zu einer Veränderung der *tis11B*-Expression im Herzmuskelgewebe führt, zum anderen, ob die Art des untersuchten Mausstamms, und damit der genetische Hintergrund der Tiere, einen Einfluss auf das *tis11B*-Expressionsmuster hat. Es konnte gezeigt werden, dass die *tis11B*-Expression im Herz bei fast allen CVB3-infizierten Tieren 8 Tage *p. i.* deutlich niedriger war als bei den Kontrolltieren. Ein Unterschied zwischen den beiden Stämmen war jedoch nicht erkennbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei CVB3-induzierter, akuter Myokarditis, zumindest 8 Tage *p. i.* die *tis11B*-Expression inhibiert wird. Da dies bei Tieren beider Zuchtstämme gleichermaßen zu beobachten war, scheint die genetische Disposition zur Chronifizierung der Krankheit durch Viruspersistenz, zumindest in dieser Phase der Erkrankung, keinen Einfluss auf die *tis11B*-Expression zu haben.

Diese Daten waren insbesondere deshalb überraschend, weil aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen an HL-1-Zellen erwartet worden war, dass bei einer Myokarditis, die mit einer massiven Entzündungsreaktion im Herz sowie hohen Serumspiegeln von TNF- α und anderen proinflammatorischen Zytokinen einhergeht (43, 63), *tis11B* eher induziert als reprimiert wird. Ein Grund für die beobachtete Repression könnte sein, dass andere Zytokine oder Wachstumsfaktoren, die bei akuter Myokarditis in großen Mengen freigesetzt werden, inhibierende Effekte auf die *tis11B*-Expression haben, welche die induzierende Wirkung von TNF- α , HGF und TGF- β übersteigt oder blockiert. Auch ein spezifischer Effekt, den das Virus selbst hervorruft, ist nicht auszuschließen. Denkbar wäre weiterhin, dass in diesem Fall nicht Kardiomyozyten sondern andere Zelltypen einen vergleichsweise großen Anteil an der Gesamt-RNA im Herzmuskelgewebe hatten. Nicht zuletzt könnte auch der Zeitpunkt der Untersuchung eine Rolle gespielt haben, da möglich wäre, dass die *tis11B*-Expression wie bei der Myogenese auch hier einen multiphasischen Verlauf zeigt.

Momentan werden in unserer Arbeitsgruppe die Expressionsmuster individueller Tiere mit ihrem histologischen Phänotyp korreliert, was insbesondere hinsichtlich der „Ausreißer“ in den einzelnen Gruppen von Interesse ist.

Darüber hinaus könnte es interessant sein, die Expression von *tis11B* (und möglicherweise auch *tis11D*) auch zu anderen, vor allem späteren, Zeitpunkten *p. i.* in den Herzen beider Stämme zu analysieren.