

**Aus dem Institut für Physiologie – Dahlem  
Campus Benjamin Franklin  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
eingereicht über das  
Institut für Tierpathologie  
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin**

**Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B  
bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung:  
physiologische und pathologische Aspekte**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Ingrid Ursula Büchsler  
Tierärztin  
aus Bielefeld**

**Berlin 2011**

**Journal-Nr.: 3469**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Barbara Munz  
Dritter Gutachter: Dr. Christoph Gabler

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

muscles, muscular diseases, tumours, neoplasms, cell differentiation,  
NF-kappa B (MeSH), TNF Receptor-Associated Factor 6 (MeSH)

Tag der Promotion: 05.05.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-972-9

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

...für meine Eltern



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>FRAGESTELLUNG UND ZIELE DIESER ARBEIT</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Myoblastendifferenzierung</b>	<b>3</b>
2.1.1	<i>Physiologische Myoblastendifferenzierung</i>	3
2.1.1.1	Molekulare Mechanismen der Myogenese	3
2.1.1.2	<i>In vitro</i> -Modellsysteme zur Untersuchung der physiologischen Myoblastendifferenzierung	5
2.1.2	<i>Pathologische Myoblastendifferenzierung</i>	5
2.1.2.1	Rhabdomyosarkome	5
2.1.2.2	<i>In vitro</i> -Modellsysteme zur Untersuchung des Rhabdomyosarkoms	7
2.1.3	<i>Zusammenfassung der verwendeten Modellsysteme</i>	8
<b>2.2</b>	<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<b>9</b>
2.2.1	<i>Der NF-<math>\kappa</math>B-Signalweg</i>	9
2.2.2	<i>NF-<math>\kappa</math>B und Skelettmuskelzellendifferenzierung</i>	11
2.2.3	<i>NF-<math>\kappa</math>B und Tumorigenese</i>	13
<b>2.3</b>	<b>TRAF6</b>	<b>14</b>
2.3.1	<i>TRAF6 und Skelettmuskelzellendifferenzierung</i>	14
2.3.2	<i>TRAF6 und Tumorigenese</i>	15
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>16</b>
3.1.1	<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i>	16
3.1.2	<i>Antikörper</i>	19
3.1.3	<i>Sonden</i>	19
3.1.4	<i>Kommerzielle Kits</i>	19
3.1.5	<i>Eukaryontische Zelllinien</i>	19
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>20</b>
3.2.1	<i>Zellbiologische Methoden</i>	20
3.2.1.1	Kultivierung und Aufbewahrung eukaryontischer Zellen	20
3.2.1.2	Induktion der myogenen Differenzierung	21
3.2.1.3	Behandlung der Zellen mit Lactacystin	21
3.2.1.4	Behandlung der Zellen mit Curcumin	21
3.2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	22
3.2.2.1	Allgemeine Richtlinien für das Arbeiten mit RNA	22

3.2.2.2	Isolierung gesamtzellulärer RNA .....	22
3.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	22
3.2.2.4	<i>Northern Blot</i> .....	22
3.2.3	<i>Proteinchemische Methoden</i> .....	25
3.2.3.1	Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Zellen .....	25
3.2.3.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	25
3.2.3.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	25
3.2.3.4	Immunologische Methoden .....	26
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Vergleich der basalen NF-<math>\kappa</math>B-Aktivität sowie der basalen Expression des für den NF-<math>\kappa</math>B-Aktivator TRAF6 kodierenden Gens in nichttransformierten Myoblasten und in Rhabdomyosarkomzellen</b> .....	<b>30</b>
4.1.1	<i>Vergleich der basalen NF-<math>\kappa</math>B-Aktivität der einzelnen Zelllinien</i> .....	30
4.1.2	<i>Vergleich der basalen traf6-Expression der einzelnen Zelllinien</i> .....	32
<b>4.2</b>	<b>NF-<math>\kappa</math>B-Aktivität und Differenzierungsverhalten: Untersuchungen an nichttransformierten Myoblasten und an verschiedenen Rhabdomyosarkomzelllinien</b> .....	<b>34</b>
4.2.1	<i>Untersuchung der nichttransformierten Myoblastenzelllinie C2C12</i> .....	34
4.2.1.1	NF- $\kappa$ B-Aktivität und <i>traf6</i> -Expression bei der Differenzierung .....	34
4.2.1.2	Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität .....	34
4.2.2	<i>Untersuchung der Rhabdomyosarkomzelllinie RD/18</i> .....	48
4.2.2.1	NF- $\kappa$ B-Aktivität und <i>traf6</i> -Expression bei der Differenzierung .....	48
4.2.2.2	Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität .....	54
4.2.3	<i>Untersuchung der Rhabdomyosarkomzelllinie RD/12</i> .....	63
4.2.3.1	NF- $\kappa$ B-Aktivität und <i>traf6</i> -Expression bei der Differenzierung .....	63
4.2.3.2	Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität .....	69
4.2.4	<i>Untersuchung der Rhabdomyosarkomzelllinie CCA</i> .....	75
4.2.4.1	NF- $\kappa$ B-Aktivität und <i>traf6</i> -Expression bei der Differenzierung .....	75
4.2.4.2	Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität .....	81
<b>4.3</b>	<b>Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse</b> .....	<b>85</b>
4.3.1	<i>NF-<math>\kappa</math>B-Aktivität in unbehandelten, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen</i> .....	85
4.3.2	<i>Auswirkung der Hemmung der NF-<math>\kappa</math>B-Aktivität auf die Differenzierung von nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen</i> .....	87
4.3.3	<i>Expression des traf6-Gens in unbehandelten, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen</i> .....	90
4.3.4	<i>Auswirkung der Hemmung der NF-<math>\kappa</math>B-Aktivität auf die traf6-Expression in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen</i> .....	91

<b>5 DISKUSSION</b> .....	92
<b>5.1 Wie verhält sich die NF-κB-Aktivität in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?</b> .....	92
5.1.1 <i>Wie verhält sich die NF-κB-Aktivität in proliferierenden, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?</i> .....	92
5.1.2 <i>Wie verhält sich die NF-κB-Aktivität in differenzierenden, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?</i> .....	93
5.1.2.1 Die NF-κB-Aktivität sinkt im Differenzierungsverlauf von nichttransformierten Myoblasten ab .....	93
5.1.2.2 Die NF-κB-Aktivität bleibt im Differenzierungsverlauf von Rhabdomyosarkomzellen unverändert.....	95
<b>5.2 Welche Auswirkungen hat eine Hemmung der NF-κB-Aktivität auf die Differenzierung von nichttransformierten Muskelzellen und Rhabdomyosarkomzellen?</b> .....	97
5.2.1 <i>Wie wirkt sich die Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Curcumin auf den Differenzierungsprozess von nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen aus?</i> .....	97
5.2.1.1 Die Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Curcumin wirkt in C2C12-Zellen differenzierungshemmend.....	97
5.2.1.2 Die Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Curcumin wirkt in Rhabdomyosarkomzellen differenzierungshemmend .....	99
5.2.2 <i>Wie wirkt sich die Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Lactacystin auf den Differenzierungsprozess von nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen aus?</i> .....	100
5.2.2.1 Die Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Lactacystin wirkt in C2C12-Zellen differenzierungshemmend.....	100
5.2.2.2 Die Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Lactacystin wirkt in Rhabdomyosarkomzellen differenzierungshemmend .....	102
<b>5.3 Findet in nichttransformierten Myoblasten eine Repression der <i>traf6</i>-Expression nach Induktion der Differenzierung statt? Verhält sich die <i>traf6</i>-Expression in Rhabdomyosarkomzellen abweichend davon?.....</b>	103
5.3.1 <i>Wie verhält sich die <i>traf6</i>-Expression in proliferierenden, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?</i> .....	103
5.3.2 <i>Wie verhält sich die <i>traf6</i>-Expression in differenzierenden, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?</i> .....	104
5.3.2.1 Die <i>traf6</i> -Expression steigt im Differenzierungsverlauf von Rhabdomyosarkomzellen an .....	104

<b>5.4</b>	<b>Unterliegt die Expression des <i>traf6</i>-Gens der Regulation durch NF-<math>\kappa</math>B? Gibt es Unterschiede bezüglich dieser Regulation zwischen nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen? .....</b>	<b>105</b>
5.4.1	<i>Welche Auswirkung hat die Hemmung der NF-<math>\kappa</math>B-Aktivität durch Curcumin auf die <i>traf6</i>-Expression in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen? .....</i>	<b>105</b>
5.4.1.1	Die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin hat in Rhabdomyosarkomzellen keine Auswirkungen auf die <i>traf6</i> -Expression ....	<b>105</b>
5.4.2	<i>Welche Auswirkung hat die Hemmung der NF-<math>\kappa</math>B-Aktivität durch Lactacystin auf die <i>traf6</i>-Expression in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen? .....</i>	<b>106</b>
5.4.2.1	Die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Lactacystin hat in Rhabdomyosarkomzellen keine Auswirkungen auf die <i>traf6</i> -Expression ....	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>118</b>
	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>120</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>121</b>
	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>122</b>

# 1 FRAGESTELLUNG UND ZIELE DIESER ARBEIT

*Nuclear factor-κB* (NF-κB) ist ein Oberbegriff für eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt sind. Über die Funktion des NF-κB während der Skelettmuskelzellendifferenzierung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Autoren konnten eine differenzierungsfördernde Funktion, andere Autoren eine differenzierungshemmende Funktion und wieder andere Autoren eine sowohl fördernde als auch hemmende Funktion des NF-κB bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung nachweisen.

Rhabdomyosarkome sind eine Gruppe von Weichgewebstumoren, die Anzeichen von Skelettmuskelzellendifferenzierung zeigen. Bei ihnen kann jedoch nur selten eine terminale Differenzierung beobachtet werden. Über eine mögliche Rolle des NF-κB bei der Pathogenese des Rhabdomyosarkoms ist bisher nichts bekannt. Es besteht jedoch ein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungspotential der Rhabdomyosarkomzellen und ihrer Malignität – ein höherer Differenzierungsstatus führt zu einem Verlust der Metastasierungsfähigkeit. Aufgrund des regulatorischen Einflusses von NF-κB auf die Muskelzellendifferenzierung könnte daher ein Zusammenhang zwischen der unvollständigen Differenzierung von Rhabdomyosarkomen und einer Fehlregulation der NF-κB-Aktivität bestehen.

Weiterhin konnte in einer Vielzahl von Tumoren eine im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe abweichende NF-κB-Aktivität festgestellt werden: In einigen Tumoren ist die NF-κB-Aktivität erhöht, wodurch die Chemo- und Bestrahlungsresistenz erhöht sind. Im Gegensatz hierzu hat NF-κB in anderen Tumoren eine proapoptotische Wirkung und wirkt somit tumorigenesehemmend. Auch diese allgemeinen Befunde zu NF-κB und Tumorigenese sprechen dafür, dass NF-κB auch für die Pathogenese des Rhabdomyosarkoms relevant sein könnte.

*Tumor necrosis factor receptor associated factor 6* (TRAF6) ist ein zytoplasmatisches Adaptorprotein, das an der Aktivierung des NF-κB in vielen Zellen beteiligt ist. Weiterhin ist TRAF6 an der Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen JNK (*c-Jun N-terminale Kinase*) und p38 beteiligt.

Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe deuteten an, dass eine Repression der *traf6*-Expression während der Skelettmuskelzellendifferenzierung in nichttransformierten Myoblasten stattfinden könnte. Zusätzlich gab es Hinweise darauf, dass ein Zusammenhang zwischen der NF-κB-Aktivität und der *traf6*-Expression bestehen könnte, also dass das *traf6*-Gen der Regulation durch NF-κB unterliegt. Da TRAF6 die NF-κB-Aktivierung vermitteln kann, könnte eine differentielle Expression des *traf6*-Gens letztendlich zu einer differentiellen Aktivierung von NF-κB führen. Hierbei ist anzumerken, dass hohe Mengen von TNFR (*Tumor necrosis factor receptor*)-assoziierten zytoplasmatischen Adaptorproteinen auch unabhängig von aktivierten TNFR-Komplexen die entsprechenden nachgeschalteten Effekte, wie die Aktivierung von NF-κB oder die Modulation apoptotischer Prozesse, vermitteln können.

Es ist jedoch denkbar, dass TRAF6 auch Effekte auf die Myogenese hat, welche NF-κB-unabhängig sind.

Weiterhin gab es aus vorausgegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe Hinweise darauf, dass in Rhabdomyosarkomzellen (im Gegensatz zu nichttransformierten Myoblasten) die *traf6*-Expression nach Induktion der Differenzierung nicht reprimiert wird. Dies könnte ein bedeutender Unterschied zwischen nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen sein, der zumindest zum Teil für die Hemmung des Differenzierungsprozesses in Rhabdomyosarkomzellen verantwortlich sein könnte.

Für diese Arbeit ergaben sich daher folgende Fragen:

1. Wie verhält sich die NF- $\kappa$ B-Aktivität während der Differenzierung in nichttransformierten Muskelzellen und Rhabdomyosarkomzellen?
2. Welche Auswirkungen hat eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf die Differenzierung von nichttransformierten Muskelzellen und Rhabdomyosarkomzellen?
3. Kann die Repression der *traf6*-Expression während der Differenzierung in nichttransformierten Myoblasten bestätigt werden? Verhält sich die *traf6*-Expression in Rhabdomyosarkomzellen tatsächlich davon abweichend?
4. Unterliegt die Expression des *traf6*-Gens der Regulation durch NF- $\kappa$ B?  
Falls ja, gibt es Unterschiede bezüglich dieser Regulation zwischen nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde zunächst die NF- $\kappa$ B-Aktivität während der Differenzierung von nichttransformierten Myoblasten und drei verschiedenen Rhabdomyosarkomzelllinien mit Hilfe des *Western Blot*-, ELISA- und Immunfluoreszenz-Verfahrens untersucht. Anschließend wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivität in den gleichen Zelllinien durch zwei unterschiedlich wirkende NF- $\kappa$ B-Inhibitoren gehemmt. Die Auswirkungen dieser Hemmung auf den Differenzierungsprozess wurden lichtmikroskopisch und anhand der Expression verschiedener Differenzierungsmarker analysiert. Die Untersuchung der Differenzierungsmarker erfolgte mit Hilfe des *Western Blot*- und des *Northern Blot*-Verfahrens.

Die Expression des *traf6*-Gens während der Differenzierung wurde in nichttransformierten Myoblasten und drei Rhabdomyosarkomzelllinien mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens analysiert. Um zu untersuchen, ob das *traf6*-Gen der Regulation durch NF- $\kappa$ B unterliegt, wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivität durch NF- $\kappa$ B-Inhibitoren gehemmt und anschließend die *traf6*-Expression auf Proteinebene unter Verwendung des *Western Blot*-Verfahrens untersucht.

Insgesamt war das übergeordnete Ziel dieser Arbeit, mögliche Unterschiede bezüglich der NF- $\kappa$ B-Aktivität und der *traf6*-Expression zwischen nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen – insbesondere im Verlauf der Differenzierung – zu finden. Darauf aufbauend sollte festgestellt werden, ob sich über eine Beeinflussung dieser Faktoren das Differenzierungspotential von Rhabdomyosarkomzellen verändern lässt.

Aufgrund des engen inversen Zusammenhangs zwischen Differenzierungspotential und Malignität bei Rhabdomyosarkomzellen war unsere Vision zu Beginn der Arbeit, hier möglicherweise neue therapeutische Ansatzpunkte zu finden.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Myoblastendifferenzierung

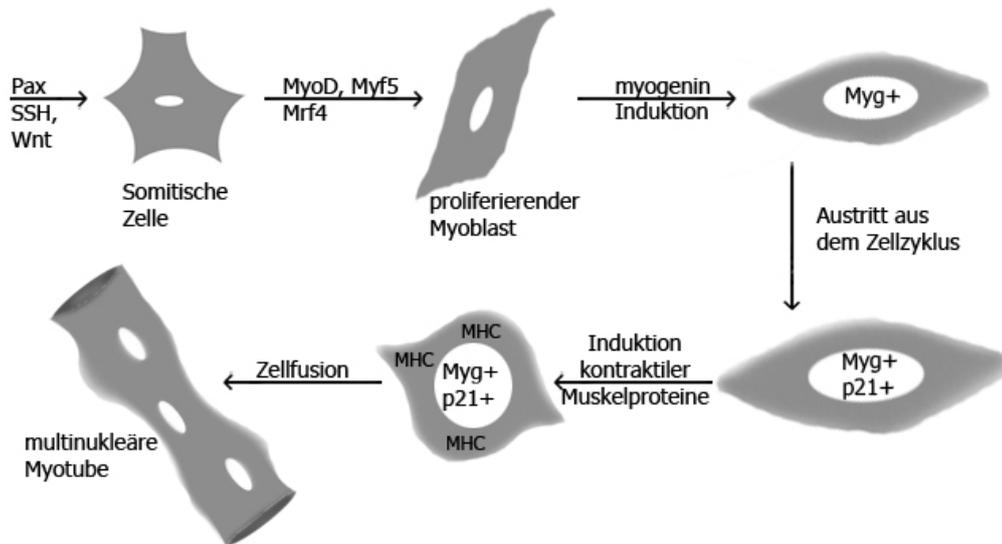
#### 2.1.1 Physiologische Myoblastendifferenzierung

##### 2.1.1.1 Molekulare Mechanismen der Myogenese

Die Myogenese ist die Formierung der Skelettmuskulatur während der embryonalen Entwicklung. Sie läuft in zwei Schritten ab: zunächst erfolgt die myogene Determinierung multipotenter Stammzellen, anschließend erfolgt die Differenzierung zu mehrkernigen Myotuben.

Die Skelettmuskulatur der Säugetiere kann in Körper- und Kopfmuskeln unterteilt werden, wobei die Myogenese an den Körpermuskeln am ausführlichsten untersucht worden ist. Alle Skelettmuskeln des Körpers stammen aus Stammzellen, die in den Somiten liegen. Dies sind temporäre mesodermale Strukturen, die sich paarig auf beiden Seiten des Neuralrohrs befinden. Während der Somitenreifung entsteht das Dermomyotom, welches multipotente Zellen enthält, die diverse Zelltypen, inklusive aller Skelettmuskeln des Stammes, bilden können (Tajbakhsh, 2009). Bei diesen Zellen erfolgt die Regulierung der Zellreifung durch eine Reihe von Signalen, die schließlich zur Expression der myogenen Regulationsfaktoren (MRFs) führen (Bryson-Richardson und Currie, 2008). Hierzu gehören auch die *paired box* Transkriptionsfaktoren Pax3 und Pax7, die den Eintritt von myogenen Vorläuferzellen in die Skelettmuskelzellendifferenzierung regulieren (Buckingham und Relaix, 2007). So reguliert z.B. Pax3 die MRFs MyoD und Myf5. Weiterhin gehören die sezernierten Proteine *Sonic hedgehog* (SHH) und die verschiedenen Wnt-Faktoren zu diesen Signalen. Sie werden von den umgebenden Geweben, wie der Chorda dorsalis, dem Neuralrohr und dem darüber liegenden Ektoderm freigesetzt. SHH erhält z.B. die Expression des MRFs Myf5 aufrecht. Weiterhin induziert Wnt1 die Myogenese durch die Aktivierung des MRFs Myf5 und Wnt7A durch die Aktivierung des MRFs MyoD (Bryson-Richardson und Currie, 2008).

Die MRFs selbst sind zusammen mit einer Vielzahl von Kofaktoren für die Steuerung der Expression von Genen, die für die Bildung von kontraktile Skelettmuskeln benötigt werden, verantwortlich (Bryson-Richardson und Currie, 2008). Zu den MRFs gehören Myf5, Mrf4, MyoD und Myogenin. Myf5, Mrf4 und MyoD sind für die Determinierung der Skelettmuskelidentität notwendig (Tajbakhsh, 2009), während Myogenin und auch Mrf4 für die terminale Differenzierung der Myoblasten essentiell sind (siehe hierzu Abb. 1) (Bryson-Richardson und Currie, 2008). Determinierte, proliferierende Myoblasten exprimieren kein *myogenin*. Nach Entzug von Wachstumsfaktoren beginnen die Myoblasten jedoch schnell *myogenin* zu exprimieren. Hierauf erfolgt die Induktion des Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitors *p21*, der den Austritt der Zellen aus dem Zellzyklus verursacht. Dieser postmitotische Status der Zellen wird für die Induktion der Synthese von kontraktile Proteinen, wie z.B. *Myosin heavy chain* (MHC), benötigt. Hieran schließt sich die Fusion der Zellen zu multinukleären Myotuben an (Walsh und Perlman, 1997).



**Abb. 1: Prozess der Myogenese auf zellulärer Ebene (Modifiziert nach Walsh und Perlman, 1997; Perry und Rudnicki, 2000)**

Faktoren wie Pax, SHH und Wnt sind an der Regulation der MRFs MyoD, Myf5 und Mrf4 beteiligt. Diese drei MRFs sind für die Determinierung somitischer Zellen notwendig. Für die Differenzierung der Myoblasten ist die Induktion des MRFs Myogenin essentiell. In Myogenin-positiven Zellen kommt es zur Expression des Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitors p21, der den Austritt der Myoblasten aus dem Zellzyklus verursacht. Hierauf folgt die Induktion kontraktiler Muskelproteine wie MHC und schließlich die Zellfusion zu mehrkernigen Myotuben.

Während des myogenen Differenzierungsprozesses verändert somit eine Vielzahl von Genen ihr Expressionsmuster, diese können folglich als Marker zur Kontrolle des ordnungsgemäßen Ablaufs der Differenzierung herangezogen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten „Differenzierungsmarker“ sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Differenzierungsmarker, die Transkriptionsfaktoren sind
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Myogenin</li> </ul>
Differenzierungsmarker, die mit dem Zellzyklus in Zusammenhang stehen
<ul style="list-style-type: none"> <li>• p21</li> </ul>
Differenzierungsmarker, die am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desmin</li> <li>• Vimentin</li> <li>• Caveolin-3</li> </ul>

**Tab. 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Differenzierungsmarker**

Mit dem Begriff „Differenzierungsmarker“ sind Gene, die im Verlauf der myogenen Differenzierung ihr Expressionsmuster ändern, gemeint. In der Tabelle sind diese Marker nach ihrer Funktion in der Zelle eingeordnet.

### **2.1.1.2 In vitro-Modellsysteme zur Untersuchung der physiologischen Myoblastendifferenzierung**

Viele Myoblastenzelllinien und auch primäre Myoblasten können *in vitro* differenziert werden. Die in diesen Zellen ablaufenden Mechanismen spiegeln die *in vivo* ablaufenden Prozesse gut wider.

Als *in vitro*-Modellsystem zur Untersuchung der Myoblastendifferenzierung wurde in dieser Arbeit die skelettale Myoblastenzelllinie C2C12, die murinen Ursprungs ist, verwendet. Während der myogenen Differenzierung fusionieren C2C12-Zellen und bilden kontraktile Myotuben ([www.stanford.edu/group/blau](http://www.stanford.edu/group/blau)). Zur Überwachung des Differenzierungserfolges der C2C12-Zellen wurden die Expressionsmuster von *myogenin*, *p21*, *desmin* und *caveolin-3* untersucht.

## **2.1.2 Pathologische Myoblastendifferenzierung**

### **2.1.2.1 Rhabdomyosarkome**

Rhabdomyosarkome sind eine Gruppe von Weichgewebstumoren, die Anzeichen von Skelettmuskelzellendifferenzierung zeigen. Bei ihnen kann jedoch nur selten eine terminale Differenzierung beobachtet werden und die Hinweise auf eine rhabdomyogene Differenzierung sind meist nur auf eine kleine Anzahl von Zellen beschränkt. Jedoch kann bei allen Rhabdomyosarkomen die Expression von muskelspezifischen Markern nachgewiesen werden.

Bei Kindern unter 15 Jahren sind Rhabdomyosarkome die am häufigsten auftretenden Weichgewebstumoren, wobei sie etwas zahlreicher in männlichen als in weiblichen Kindern auftreten (Verhältnis: 1,4:1) (De Giovanni *et al.*, 2009). Der genaue Ursprung der Rhabdomyosarkome ist bisher nicht geklärt. Einerseits sind spezifische und charakteristische genetische Veränderungen dieser Zellen bekannt (s.u.), andererseits könnte aber auch eine aberrante Lokalisation von Muskelvorläuferzellen an der Entstehung der Rhabdomyosarkome beteiligt sein (Parham und Ellison, 2006). Histologisch können Rhabdomyosarkome in zwei Hauptformen (embryonales und alveoläres Rhabdomyosarkom) unterteilt werden. Weiterhin gibt es die weniger häufig vorkommenden botryoiden Rhabdomyosarkome (die auch als Untergruppe der embryonalen Rhabdomyosarkome betrachtet werden können) und die pleomorphen Rhabdomyosarkome.

Embryonale Rhabdomyosarkomzellen ähneln histologisch unreifen Muskelzellen. Sie treten überwiegend bei Kindern auf und machen mit etwa 60-70% einen Großteil aller Rhabdomyosarkome aus. Sie treten vor allem im Kopf- und Halsbereich sowie im Urogenitaltrakt auf.

Alveoläre Rhabdomyosarkome sind mit einer Häufigkeit von ca. 20% seltener als embryonale Rhabdomyosarkome. Sie erinnern histologisch an Lungenalveolen, wobei es jedoch auch Varianten ohne die Ausbildung von alveolenartigen Hohlräumen gibt. In erster Linie treten alveoläre Rhabdomyosarkome bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen auf und sind hauptsächlich am Stamm und an den Extremitäten lokalisiert (Xia *et al.*, 2002; De Giovanni *et al.*, 2009).

Embryonale Rhabdomyosarkome zeigen als häufigste genetische Veränderung den Verlust eines Allels auf Chromosom 11 in der Region 11p15.5. Eine derartig charakteristische

chromosomale Deletion weist in vielen Fällen darauf hin, dass in der entsprechenden Region Tumorsuppressorgene inaktiviert wurden. In der Tat befinden sich in der 11p15.5-Region z.B. das H19- und CDKN1C-Gen, die in Zusammenhang mit der Zelldifferenzierung und dem Zellzyklus stehen (Xia *et al.*, 2002). Im Gegensatz hierzu zeigen 70-80% der alveolären Rhabdomyosarkome eine spezielle Translokation zwischen Chromosom 1 oder 2 und Chromosom 13. Dies führt zur Expression von zwei chimären Transkriptionsfaktoren, Pax3-FKHR oder Pax7-FKHR. FKHR (*Forkhead related transcription factor*) ist ein Mitglied der *Forkhead*-Transkriptionsfaktorfamilie. Die Pax-FKHR-Fusionsprodukte sind tumorspezifische Transkriptionsfaktoren, die stärker wirksam (10-100fach) und in höherer Menge exprimiert werden als die endogenen Pax-Transkriptionsfaktoren, wodurch die onkogene Transformation induziert wird (De Giovanni *et al.*, 2009). Zusätzlich zu diesen primären Mutationen wurden in beiden Rhabdomyosarkomtypen genetische Veränderungen in anderen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen beobachtet (Xia *et al.*, 2002).

Da die histologischen Hinweise auf eine rhabdomyogene Differenzierung häufig nur bei wenigen Zellen innerhalb eines Rhabdomyosarkoms zu finden sind, können zur Diagnosestellung immunhistochemische Methoden hilfreich sein. Hierdurch können mit der Myogenese assoziierte Proteine wie Desmin, Myogenin und MyoD nachgewiesen werden (Davicioni *et al.*, 2009). Weiterhin tragen der Nachweis von rhabdomyosarkomspezifischen Genfusionen und chromosomalen Veränderungen sowie die Analyse von Genexpressionsprofilen zur Diagnose bei.

Alveoläre Rhabdomyosarkome zeigen generell ein aggressiveres Verhalten. Sie sind bei Diagnosestellung oft schon metastatisch. Somit beträgt die 5-Jahresüberlebensrate lediglich 48%, während sie bei embryonalen Rhabdomyosarkomen bei ca. 73% liegt (De Giovanni *et al.*, 2009). Generell werden bei allen Patienten bei Diagnosestellung Mikrometastasen vermutet, daher besteht die Behandlung der Rhabdomyosarkome aus einer Kombination von Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie (Breitfeld und Meyer, 2005).

### **Rhabdomyosarkome in der Tiermedizin**

Rhabdomyosarkome sind in der Tiermedizin eher selten, sie machen in domestizierten Tieren weniger als ein Prozent aller Tumore aus. Wie im Mensch werden sie in Tieren histopathologisch in alveoläres, embryonales (inklusive botryoides Rhabdomyosarkom) und pleomorphes Rhabdomyosarkom unterteilt. Am häufigsten kommen Rhabdomyosarkome bei Hunden vor, das Geschlechterverhältnis der betroffenen Hunde ist im Gegensatz zum Mensch ausgeglichen. Auch Rasse- oder regionale Prädispositionen sind nicht bekannt (Bae *et al.*, 2007; Yhee *et al.*, 2008). Bei Hunden sind botryoide Rhabdomyosarkome der Harnblase am häufigsten. Sie wurden beim Golden Retriever (Bae *et al.*, 2007), Labradormischling (Gerber *et al.*, 2009), Rottweiler (Kim *et al.*, 1996), St. Bernards (Kelly *et al.*, 1973), Malteser (Takiguchi *et al.*, 2002) und Neufundländer (Kuwamura *et al.*, 1998) diagnostiziert. Weiterhin wurden Rhabdomyosarkome im Oropharynx (Kim *et al.*, 1996; Brockus und Myers, 2004), im Larynx (Madewell *et al.*, 1988; Block *et al.*, 1995), vaginal (Suzuki *et al.*, 2006), parameningeal (Illanes, 2002) und im Herzen (Krotje *et al.*, 1990) bei verschiedenen Hunderassen nachgewiesen.

Rhabdomyosarkome konnten auch als Einzelfälle bei Katze (Moon *et al.*, 1990; Simon *et al.*, 2000; Venco *et al.*, 2001), Pferd (Clegg und Coumbe, 1993; Turnquist *et al.*, 1993; Aupperle *et al.*, 2004), Rind (Yohei *et al.*, 1998; Jimma *et al.*, 1999; Aoyagi *et al.*, 2001), Schwein (Vos *et al.*, 1993), Schaf (Tanaka und Stromberg, 1993) und Tapir (Bonar *et al.*, 2007) nachgewiesen werden.

### **2.1.2.2 In vitro-Modellsysteme zur Untersuchung des Rhabdomyosarkoms**

Wie nichttransformierte Myoblasten können auch Rhabdomyosarkomzellen *in vitro* vermehrt und differenziert werden. Auch hier spiegeln die in diesen Zellen ablaufenden Mechanismen die *in vivo* ablaufenden Prozesse mechanistisch recht genau wider.

Als *in vitro*-Modellsysteme wurden in dieser Arbeit die embryonalen Rhabdomyosarkomzelllinien RD/18, RD/12 und CCA untersucht.

**RD/18- und RD/12-Zellen** sind embryonale Rhabdomyosarkomzellen humanen Ursprungs. Es handelt sich um Subklone der gleichen Zelllinie, die ein unterschiedliches Differenzierungsverhalten aufweisen. Während RD/18-Zellen fusionieren und mehrkernige, myotubenähnliche Strukturen bilden, zeigen RD/12-Zellen keine derartigen Differenzierungsanzeichen. Das unterschiedliche morphologische Differenzierungsverhalten der beiden Subklone spiegelt sich auch im Expressionsmuster der während der Differenzierung induzierten Gene wider. Bei Zellen des RD/18-Subklons werden während des Differenzierungsprozesses sowohl Gene induziert, die mit der myogenen Differenzierung in Zusammenhang stehen, als auch Gene, die nicht mit dem Differenzierungsprozess assoziiert sind (Astolfi *et al.*, 2001). Zur Kontrolle des Differenzierungserfolges wurden bei diesem Subklon im Rahmen der vorliegenden Arbeit Myogenin, p21 und Desmin als Differenzierungsmarker untersucht. Im Gegensatz dazu werden bei RD/12-Zellen während des Differenzierungsprozesses nur Gene induziert, die generell für mesenchymale Zellen typisch sind oder die mit der frühen myogenen Determinierung assoziiert sind, aber nicht diejenigen, die mit der myogenen Differenzierung in Zusammenhang stehen (Astolfi *et al.*, 2001). Ein Differenzierungsprozess im eigentlichen Sinne findet hier also nicht statt. Um daher den Erfolg der „Differenzierung“ bei den RD/12-Zellen zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit Vimentin und Desmin als Marker untersucht. Von besonderer Bedeutung ist, dass das unterschiedliche Differenzierungspotential der beiden Zelllinien Einfluss auf ihre Malignität hat. Ein höherer Differenzierungsstatus führt dabei zu einem Verlust der Metastasierungsfähigkeit (Astolfi *et al.*, 2001). So verlieren die RD/18-Zellen im Zuge der Differenzierung ihre Fähigkeit, Metastasen zu bilden, während sie bei RD/12-Zellen auch nach Induktion der „Differenzierung“ erhalten bleibt (Lollini *et al.*, 1991).

**CCA-Zellen** sind humane embryonale Rhabdomyosarkomzellen. Sie besitzen nicht die Fähigkeit, während des Differenzierungsprozesses mehrkernige myotubenähnliche Strukturen zu bilden und exprimieren nur sehr frühe myogene Differenzierungsmarker. Wie bei den RD12-Zellen wurden daher in dieser Arbeit Desmin und Vimentin zur Kontrolle einer erfolgreichen Induktion der „Differenzierung“ untersucht. Die ebenfalls nur in sehr geringem Ausmaß differenzierenden CCA-Zellen besitzen wie RD/12- und mit Einschränkungen auch RD/18-Zellen die Fähigkeit, Metastasen zu bilden (De Giovanni *et al.*, 1989).

### 2.1.3 Zusammenfassung der verwendeten Modellsysteme

Zelllinie	Zellart	Herkunft	Differenzierungsverhalten		Metastasierungsverhalten	Quelle
			Licht- mikroskopisch	Differenzierungs- marker		
C2C12	nichttransformierte Myoblasten	Maus	fusionieren und bilden Myotuben (mehrkernige Muskelfasern)	- Myogenin <sup>1</sup> - Caveolin-3 <sup>2</sup> - p21 <sup>1</sup> - Desmin <sup>3</sup>	mögliches Metastasierungspotential wird kontrovers diskutiert; exprimieren kein bekanntes Onkogen	www.stanford.edu/gro up/blau <sup>1</sup> Andres, Walsh, 1996 <sup>2</sup> Galbiati et al., 1999 <sup>3</sup> Li et al., 1994
RD/18	embryonale Rhabdomyosarkomzellen	Mensch	fusionieren und bilden mehrkernige, myotubenähnliche Strukturen	- Myogenin <sup>1</sup> - p21 <sup>2</sup> - Desmin <sup>1</sup>	reduziertes Metastasierungsverhalten	Lollini et al., 1991 <sup>1</sup> Astolfi et al., 2001 <sup>2</sup> Otten et al., 1997
RD/12	embryonale Rhabdomyosarkomzellen	Mensch	bilden keine myotubenähnlichen Strukturen	- Vimentin <sup>1</sup> - Desmin <sup>1</sup>	bilden Metastasen	
CCA	embryonale Rhabdomyosarkomzellen	Mensch	bilden keine myotubenähnlichen Strukturen	- Vimentin - Desmin	bilden Metastasen	De Giovanni et al., 1989

**Tab. 2: Übersicht über die wichtigsten zellbiologischen Eigenschaften der untersuchten Zelllinien**

In dieser Tabelle sind die für diese Arbeit wichtigen Eigenschaften der verwendeten Zelllinien aufgeführt. Von besonderer Bedeutung ist dabei der Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsverhalten und der Metastasierungsfähigkeit. So führt ein höherer Differenzierungsstatus (RD/18) zu einem reduzierten Metastasierungsverhalten. RD/12- und CCA-Zellen weisen ein niedrigeres Differenzierungspotential auf – sie bilden Metastasen. Hinweis: In der Spalte „Differenzierungsmarker“ sind Gene angegeben, die im Verlauf der Differenzierung bei der jeweiligen Zelllinie ihr Expressionsmuster verändern und somit als Kontrolle für den erfolgreichen Ablauf der Differenzierung dienen. Es sind lediglich die Differenzierungsmarker aufgeführt, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

## 2.2 NF- $\kappa$ B

### 2.2.1 Der NF- $\kappa$ B-Signalweg

*Nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) ist ein Transkriptionsfaktor, der vor mehr als 20 Jahren als Regulator der Immunglobulin- $\kappa$ B-leichten Kette in B-Zellen entdeckt wurde. Heute ist bekannt, dass NF- $\kappa$ B bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt. So reguliert NF- $\kappa$ B unter anderem die Expression von vielen Komponenten des Immunsystems und ist an der Modulation apoptosehemmender und zellproliferationsfördernder Proteine beteiligt. NF- $\kappa$ B ist ein Oberbegriff für eine Gruppe, die aus fünf Mitgliedern besteht: p50, p52, p65 (RelA), cRel und RelB. Sie bilden Homo- oder Heterodimere, bei denen p50/p65 die häufigste Kombination ist. Allen Mitgliedern dieser NF- $\kappa$ B-Familie ist gemeinsam, dass sie eine *Rel homology domain* (RHD) besitzen, die für die Homo- und Heterodimerisierung, die nukleäre Translokation und die DNA-Bindung der Dimere verantwortlich ist. Im inaktiven Zustand sind die NF- $\kappa$ B-Dimere an eines der drei inhibitorischen-NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)-Proteine (I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$  oder I $\kappa$ B- $\epsilon$ ) gebunden. Möglich ist auch, dass die NF- $\kappa$ B-Untereinheiten p50 oder p52 noch in ihrer Vorläuferform (p105 oder p100) vorliegen und damit inaktiv sind. Inaktive NF- $\kappa$ B-Dimere sind fast ausschließlich im Zytoplasma der Zellen lokalisiert.

I $\kappa$ B- $\alpha$  ist das am umfangreichsten untersuchte inhibitorische Protein. Es bindet an p65/p50-Dimere und maskiert hierdurch die Kernlokalisierungssequenz (*Nuclear localization sequence*, NLS) der p65-Untereinheit. Die NLS der p50-Untereinheit wird durch I $\kappa$ B- $\alpha$  jedoch nicht blockiert – hierdurch kann der p65/p50-I $\kappa$ B- $\alpha$ -Komplex in den Zellkern gelangen. Da aber I $\kappa$ B- $\alpha$  eine zusätzliche Kernexportsequenz (*Nuclear export sequence*, NES) besitzt, gelangt der Komplex zurück ins Zytoplasma – somit wird die Akkumulation des p65/p50-I $\kappa$ B- $\alpha$ -Komplexes im Zellkern verhindert.

Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B erfolgt durch eine Vielzahl von Stimuli, so z.B. durch Stress, Wachstumsfaktoren, inflammatorische Zytokine, Mitogene, virale oder bakterielle Produkte und viele mehr. Diese Stimuli führen zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B über zwei unterschiedliche Signalwege: zum einen über den sogenannten klassischen und zum anderen über den alternativen Signalweg.

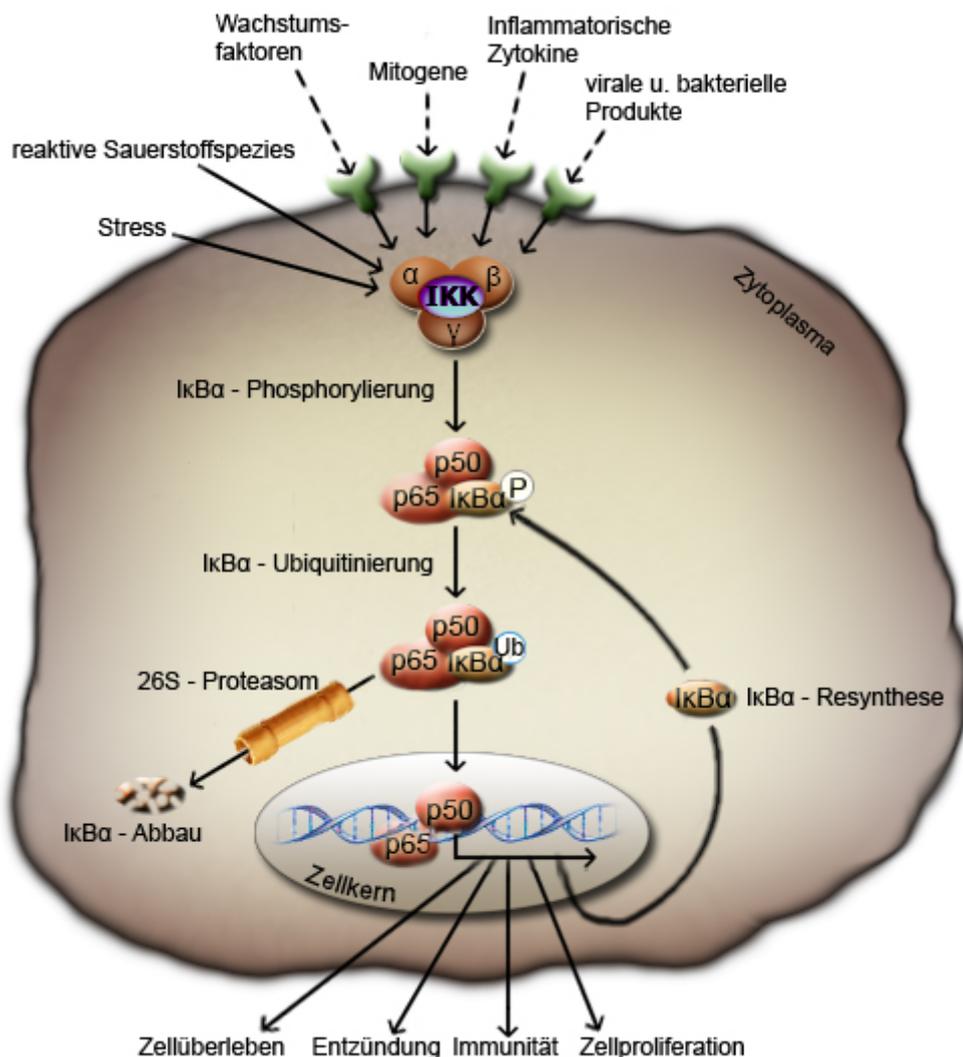
#### Klassischer Signalweg (siehe Abb. 2):

Die Bindung von Liganden an *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs), an Interleukin-1 (IL-1)- und IL-18-Rezeptoren, an Rezeptoren der TNF (*Tumor necrosis factor*)-Superfamilie und an T- und B-Zell-Rezeptoren führt zur Aktivierung des klassischen Signalweges. Hierbei wird I $\kappa$ B letztendlich mit Hilfe der I $\kappa$ B-Kinase (IKK) und des Proteasoms abgebaut. Die IKK ist ein Proteinkomplex, der aus zwei katalytischen Untereinheiten (IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ ) und einer regulierenden Untereinheit (IKK $\gamma$ ) aufgebaut ist. Die IKK führt zur Phosphorylierung des I $\kappa$ Bs. Diese Phosphorylierung ist notwendig, damit ein Ligase-Komplex I $\kappa$ B polyubiquitiniert. Hierdurch wird I $\kappa$ B zum Ziel des 26S-Proteasoms, welches ein Enzymkomplex ist, der mit Ubiquitin konjugierte Proteine abbaut. Durch den Abbau des I $\kappa$ Bs wird NF- $\kappa$ B freigesetzt, gelangt in den Zellkern und bindet an die Promotorregion seiner Zielgene.

#### Alternativer Signalweg:

Der alternative Signalweg wird durch die Bindung von Liganden an eine Untergruppe der

TNF-Rezeptor-Superfamilie (CD40 (*Cluster of differentiation* 40)-Rezeptor, LT $\beta$  (*Lymphotoxin*  $\beta$ )-Rezeptor, BAFF (*B-cell activating factor*)-Rezeptor) ausgelöst. Die Bindung führt zur Aktivierung der NF- $\kappa$ B-induzierenden Kinase (NIK), die die Homodimerisierung von IKK $\alpha$  bewirkt. IKK $\alpha$ -Homodimere phosphorylieren p100-NF- $\kappa$ B-Untereinheiten. Dies sind inaktive Vorläuferproteine der aktiven NF- $\kappa$ B-Untereinheit p52. p100 fungiert somit als I $\kappa$ B-Protein und NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktor in einem. Die Phosphorylierung der p100-Untereinheit durch das IKK $\alpha$ -Homodimer leitet die Proteolyse von p100 zu p52 durch das Proteasom ein. Die freigesetzten, p52-Protein enthaltenden NF- $\kappa$ B-Dimere gelangen in den Zellkern und führen zu einer Transkriptionsantwort, die sich von der des klassischen Signalweges unterscheidet (Moynagh, 2005; Hayden und Ghosh, 2008; Mourkioti und Rosenthal, 2008).



**Abb. 2: Der klassische NF- $\kappa$ B-Signalweg (modifiziert nach Kumar *et al.*, 2004)**

Das NF- $\kappa$ B-Heterodimer p65/p50 ist im inaktiven Zustand an I $\kappa$ B- $\alpha$  gebunden. Die durch diese Bindung inaktivierten Komplexe sind fast ausschließlich im Zytoplasma der Zellen lokalisiert. Die Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweges durch eine Vielzahl von Stimuli führt zur Aktivierung der IKK. Diese phosphoryliert I $\kappa$ B- $\alpha$ , worauf die Ubiquitinierung von I $\kappa$ B- $\alpha$  erfolgt. Hierdurch wird I $\kappa$ B- $\alpha$

abbaut und das p65/p50-NF-κB-Dimer freisetzt, verschoben. Dies hat die unmittelbare Translokation des NF-κB in den Zellkern und die Bindung an die Promotorregion seiner Zielgene zur Folge.

### 2.2.2 NF-κB und Skelettmuskelzellendifferenzierung

Die Funktion des NF-κB bei der Muskelzellendifferenzierung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während einige Arbeitsgruppen einen Anstieg der NF-κB-Aktivität im Verlauf der Myoblastendifferenzierung nachweisen konnten, sprechen andere Arbeiten für ein Absinken der NF-κB-Aktivität im Laufe der Myogenese. Weiterhin konnten einige Forscher zeigen, dass die NF-κB-Aktivität während der Muskelzellendifferenzierung nur vorübergehend ansteigt. Möglicherweise ist die Ursache für diese heterogenen Ergebnisse in der unterschiedlichen Versuchsanordnung zu suchen: Es wurde mit unterschiedlichen Myoblastenzelllinien, mit verschiedenen Differenzierungssystemen und mit unterschiedlichen Analysemethoden gearbeitet.

Eine Zusammenfassung dieser teilweise widersprüchlichen Ergebnisse ist in Tabelle 3 dargestellt.

Arbeiten, die dafür sprechen, dass die NF-κB-Aktivität während der Muskelzellendifferenzierung abnimmt bzw. NF-κB die Myogenese hemmt			
Autoren	untersuchte Zellen	untersuchter Signalweg	Forschungsergebnis
Lehtinen <i>et al.</i> , 1996	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C2C12 (Maus)</li> <li>• L6 (Ratte)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• keine Angabe</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absinken der NF-κB-Aktivität nach Differenzierungseinleitung</li> </ul>
Mac Lachlan und Giordano, 1998	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C2C12 (Maus)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• klassisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absinken der gesamten NF-κB-Aktivität</li> <li>• Ansteigen der durch TNF-α-induzierten NF-κB-Aktivität während der Muskelzellendifferenzierung</li> </ul>
Guttridge <i>et al.</i> , 1999	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C2C12 (Maus)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• klassisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absinken der NF-κB-Aktivität; NF-κB ist ein Inhibitor der myogenen Differenzierung</li> </ul>
Guttridge <i>et al.</i> , 2000	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C2C12 (Maus)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• klassisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Durch TNF-α aktiviertes NF-κB hemmt die Muskelzellendifferenzierung</li> </ul>
Langen <i>et al.</i> , 2001	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C2C12 (Maus)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• klassisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Durch TNF-α aktiviertes NF-κB hemmt die Muskelzellendifferenzierung</li> </ul>

**Tab. 3 (Teil1): Übersicht über die kontroversen Forschungsergebnisse zur NF-κB-Aktivität während der Skelettmuskelzellendifferenzierung**

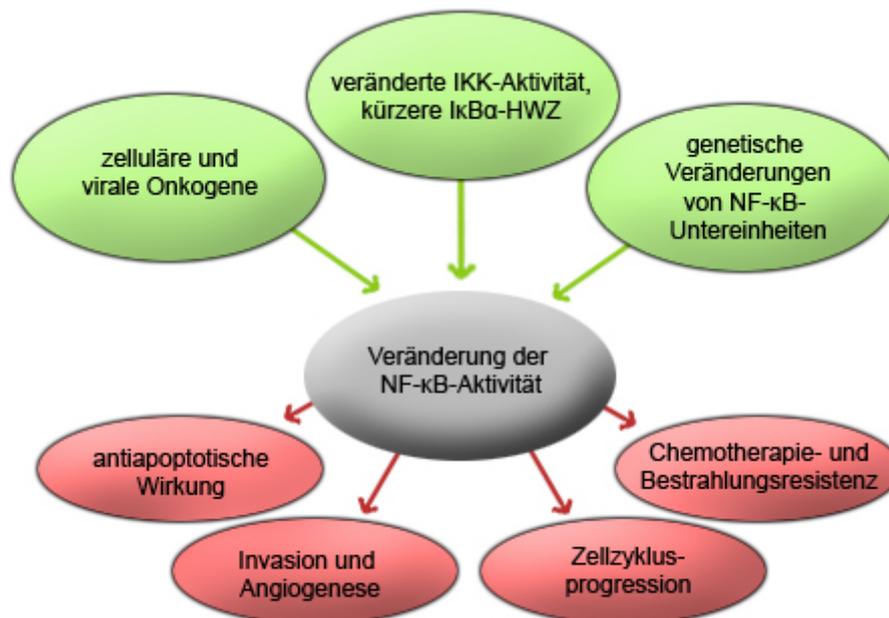
Munz <i>et al.</i> , 2002	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C2C12 (Maus)</li> <li>• C57,C3H (primäre Myoblasten, Maus)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• klassisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absinken des für RIP2 (<i>Receptor interacting protein 2</i>) kodierenden Gens</li> <li>• Eine <i>rip2</i>-Überexpression ist mit einer gesteigerten NF-κB-Aktivität assoziiert und verhindert die Myogenese</li> </ul>
Bakkar <i>et al.</i> , 2008	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C2C12 (Maus)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• klassisch</li> <li>• alternativ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absinken der klassischen NF-κB-Signalaktivierung</li> <li>• Ansteigen der alternativen NF-κB-Signalaktivierung</li> </ul>
Arbeiten, die dafür sprechen, dass die NF-κB-Aktivität während der Muskelzellendifferenzierung vorübergehend ansteigt			
Autor	untersuchte Zellen	untersuchter Signalweg	Forschungsergebnis
Kaliman <i>et al.</i> , 1999	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L6E9 (Ratte)</li> <li>• Myoblasten aus Biopsie (Mensch)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• klassisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorübergehendes Ansteigen der NF-κB-Aktivität bei der durch IGF-II (<i>Insulin-like growth factor-II</i>) induzierten Differenzierung</li> <li>• Hemmung der IGF-II induzierten Muskelzellendifferenzierung durch Blockierung der NF-κB-Aktivität</li> </ul>
Li und Schwartz, 2001	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C2C12 (Maus)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• klassisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorübergehendes Ansteigen der NF-κB-Aktivität (zw. 10 und 24-48 Stunden nach Differenzierungseinleitung)</li> </ul>
Arbeiten, die dafür sprechen, dass die NF-κB-Aktivität während der Muskelzellendifferenzierung kontinuierlich ansteigt			
Autor	untersuchte Zellen	untersuchter Signalweg	Forschungsergebnis
Lee <i>et al.</i> , 1997	<ul style="list-style-type: none"> <li>• embryonale Myoblasten (Huhn)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• keine Angabe</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ansteigen der NF-κB-Aktivität</li> </ul>
Canicio <i>et al.</i> , 2001	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L6E9 (Ratte)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• klassisch</li> <li>• alternativ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ansteigen der NF-κB-Aktivität bei der durch IGF-II stimulierten Myogenese</li> </ul>
Conejo <i>et al.</i> , 2002	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C2C12 (Maus)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• klassisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ansteigen der NF-κB-Aktivität bei der durch Insulin stimulierten Myogenese</li> </ul>

**Tab. 3 (Teil 2): Übersicht über die kontroversen Forschungsergebnisse zur NF-κB-Aktivität während der Skelettmuskelzellendifferenzierung**

Die Tabelle gibt einen Überblick über die teilweise widersprüchlichen Forschungsergebnisse zur NF-κB-Aktivität während der Myogenese.

### 2.2.3 NF- $\kappa$ B und Tumorigenese

NF- $\kappa$ B reguliert eine Vielzahl von Genen, die mit der Tumorigenese in Verbindung stehen. So steuert dieser Transkriptionsfaktor die Expression zahlreicher antiapoptotischer Gene sowie von Genen, die die Invasion und die Angiogenese von Tumorzellen fördern. Weiterhin fördert NF- $\kappa$ B die Zellzyklusprogression durch die Regulation von Genen, die in den Zellzyklus involviert sind.



**Abb. 3: Die mögliche Beteiligung des NF- $\kappa$ B an der Tumorentstehung**

Dieses Schaubild soll die mögliche Beteiligung des NF- $\kappa$ B an der Tumorentstehung verdeutlichen. Grün dargestellt sind die bereits in Tumoren nachgewiesenen Ursachen für eine veränderte NF- $\kappa$ B-Aktivität. In Rot sind die möglichen Einflüsse des NF- $\kappa$ B auf die Tumorentstehung dargestellt.

NF- $\kappa$ B ist weiterhin in einer Vielzahl von Tumoren konstitutiv aktiviert. So führen mehrere zelluläre und virale Onkogene zu einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B. Auch eine veränderte IKK-Aktivität und eine kürzere I $\kappa$ B- $\alpha$ -Halbwertszeit, wie sie z.B. beim B-Zell-Lymphom nachgewiesen wurde, führen zu einer erhöhten NF- $\kappa$ B-Aktivität. Weiterhin konnten in vielen Tumoren chromosomale Amplifikationen, Neuaneordnungen und andere genetische Veränderungen von Genen, die für NF- $\kappa$ B-Untereinheiten kodieren, nachgewiesen werden. Tumore mit einer konstitutiven NF- $\kappa$ B-Aktivität zeigen eine erhöhte Resistenz gegen Chemotherapeutika und Bestrahlung. Weiterhin induzieren einige Chemotherapeutika in manchen Tumoren einen Anstieg der NF- $\kappa$ B-Aktivität, was eine erhöhte Chemotherapie-resistenz zur Folge hat (Garg und Aggarwal, 2002; Greten und Karin, 2004; Lee *et al.*, 2007). Einige mögliche Ursachen für eine abweichende NF- $\kappa$ B-Aktivität in Tumoren und ihre potentiellen tumorinduzierenden und -promovierenden Folgen sind in Abbildung 3 dargestellt.

Andererseits konnten aber auch eine Vielzahl von Studien zeigen, dass in einigen Tumoren NF- $\kappa$ B proapoptotisch wirkt (Pikarsky und Ben-Neriah, 2006; Lee *et al.*, 2007).

Um NF- $\kappa$ B als möglichen Ansatzpunkt für eine Therapie bzw. Therapieverbesserung nutzen zu können, ist es daher wichtig, Kenntnisse über die NF- $\kappa$ B-Aktivität in dem jeweiligen Tumortyp und über die Wirkung dieses Transkriptionsfaktors auf den jeweiligen Tumortyp zu gewinnen.

Über eine mögliche Rolle des NF- $\kappa$ B beim Rhabdomyosarkom war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Lollini *et al.* konnten jedoch bereits 1991 zeigen, dass der Differenzierungsstatus die Malignität von Rhabdomyosarkomen beeinflussen kann. So führt ein höherer Differenzierungsstatus zu einer Abnahme der Malignität. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund interessant, dass die NF- $\kappa$ B-Aktivität Einfluss auf die Muskelzelldifferenzierung hat. NF- $\kappa$ B könnte somit auch beim Rhabdomyosarkom ein möglicher Ansatzpunkt für eine Therapie sein.

## 2.3 TRAF6

*Tumor necrosis factor receptor associated factor* (TRAF)- Proteine sind zytoplasmatische Adaptorproteine, die direkt mit der intrazellulären Domäne von Zelloberflächenrezeptoren vom TNFR-Typ interagieren und die Signalweiterleitung in die Zelle vermitteln können. TRAF-vermittelte Signale spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellüberlebens, der Zellproliferation und der Stressantwort. Zurzeit sind sechs verschiedene TRAF-Proteine (TRAF1-TRAF6) bekannt. Alle Mitglieder der TRAF-Familie besitzen eine TRAF-Domäne, die in eine carboxyterminale TRAF-C- und aminoternale TRAF-N-Region unterteilt ist. Alle TRAF-Proteine, außer TRAF4, sind im Zytoplasma der Zellen lokalisiert.

Das TRAF6-Protein vermittelt Signale von Mitgliedern der TNF-Rezeptorsuperfamilie (CD40, RANK (*Receptor activator of NF- $\kappa$ B*)) und von Mitgliedern der *Toll*/IL-1-Rezeptorfamilie (IL-1-Rezeptor, TLR2, TLR4).

TRAF6 unterscheidet sich von den anderen TRAF-Proteinen: zum einen strukturell in der TRAF-C-Region, zum anderen besitzt TRAF6 eine eigene Bindungsstelle innerhalb des CD40-Rezeptors (Inoue *et al.*, 2000; Lee und Lee, 2002). Weiterhin ist TRAF6 in vielen Zelltypen an der Aktivierung des NF- $\kappa$ B über die TL-, IL-1- sowie über die TNF-Rezeptoren beteiligt. Außerdem spielt TRAF6 eine Rolle bei der Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen JNK und p38 (Arch *et al.*, 1998; Bradley und Pober, 2001; Moynagh, 2005).

### 2.3.1 TRAF6 und Skelettmuskelzelldifferenzierung

Das *Receptor interacting protein 2* (RIP2) ist wie TRAF6 ein zytoplasmatisches Rezeptor-Adaptorprotein. Dieses Rezeptor-Adaptorprotein ist wie TRAF6 an der Aktivierung des NF- $\kappa$ B an TNF-Rezeptoren beteiligt. Munz *et al.* (2002) konnten zeigen, dass zum einen die *rip2*-Expression während der myogenen Differenzierung reprimiert wird, zum anderen, dass eine kontinuierliche *rip2*-Expression die Differenzierung nichttransformierter Myoblasten verhindert – zusammengefasst also eine Repression der *rip2*-Genexpression für die myogene Differenzierung notwendig ist. Unsere Arbeitsgruppe konnte zumindest auf mRNA-Ebene auch für *traf6* eine Repression der Genexpression während der Myogenese nachweisen. Weiterhin konnte hier gezeigt werden, dass die *traf6*-Expression in Abhängigkeit vom NF- $\kappa$ B-Signalweg reguliert wird (Mueck *et al.*, 2011).

Vor Beginn dieser Arbeit waren dies die einzigen Daten, die zur Rolle des TRAF6-Proteins bei der Myogenese vorlagen. Da TRAF6 aber auch an der Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen JNK und p38, die beide eine wichtige Rolle bei der myogenen Differenzierung spielen, beteiligt ist, sind hier weitere Zusammenhänge zu vermuten (Keren *et al.*, 2006; Perdiguero *et al.*, 2007).

### **2.3.2 TRAF6 und Tumorigenese**

Da TRAF6 die NF- $\kappa$ B-Aktivierung vermitteln kann, könnte eine differentielle Expression des *traf6*-Gens letztendlich zu einer differentiellen Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen. Hierbei ist anzumerken, dass hohe Mengen von TNFR-assoziierten zytoplasmatischen Adaptorproteinen auch unabhängig von aktivierten TNFR-Komplexen die entsprechenden nachgeschalteten Effekte, wie die Aktivierung von NF- $\kappa$ B oder die Modulation apoptotischer Prozesse, vermitteln können.

So kann z.B. eine gesteigerte NF- $\kappa$ B-Aktivierung, die durch eine im Vergleich zum Normalgewebe erhöhte *traf6*-Expression vermittelt wird, die Bildung von Knochenmetastasen bei Brustkrebs begünstigen (Inoue *et al.*, 2007).

Weiterhin ist, wie im vorangehenden Abschnitt für die Myogenese dargestellt, auch denkbar, dass TRAF6 auch Effekte auf die Tumorigenese hat, welche NF- $\kappa$ B-unabhängig sind.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid (29:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose MP	Roche, Mannheim
6-Aminocaprinsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Blockierungsreagenz	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Chemilumineszenz-Substrat CDP-Star	Roche, Mannheim
Chemilumineszenz-Film	GE Healthcare, Freiburg
Chromatographiepapier	Whatman International, Maidstone, GB
<i>Complete</i> ( <i>Protease inhibitor cocktail tablets</i> )	Roche, Mannheim
Curcumin, <i>Curcuma longa</i> L.	Calbiochem, Darmstadt
4,6-Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Roche, Mannheim
Deckgläser (18mm)	Menzel, Braunschweig
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim
<i>Dulbecco`s modified eagle`s medium</i> (DMEM)	Biochrom, Berlin
<i>Dulbecco`s PBS (1x)</i>	PAA Laboratories, Cölbe
ECL-Detektionsreagenz	GE Healthcare, Freiburg
Einmalpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Corning Incorporated, Corning, USA
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, reinst	Roth, Karlsruhe
Ethanol, vergällt	Roth, Karlsruhe

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
<i>Fetal bovine serum</i>	Biochrom, Berlin
Formaldehyd-Lösung (37%)	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roche, Mannheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
<i>Horse serum</i>	Sigma Aldrich, Steinheim
Hybond-N-Membran	GE-Healthcare, Freiburg
Hybond-ECL-Membran	GE Healthcare, Freiburg
Hybridisierungsbeutel	Roche, Mannheim
Kodak-Entwickler	Sigma Aldrich, Steinheim
Kodak-Fixierer	Sigma Aldrich, Steinheim
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Lactacystin	Calbiochem, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
N-Lauroylsarcosin	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Fagron, Barsbüttel
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe

## Material und Methoden

---

Natriumlaurylsulfat (SDS) (20%)	Roth, Karlsruhe
Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	Sigma Aldrich, Steinheim
<i>PBS Dulbecco`s (Pulver)</i>	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
<i>Precision plus protein<sup>TM</sup> standards Dual color-marker</i>	Bio-Rad, München
<i>Precision plus protein<sup>TM</sup> standards Kaleidoscope-marker</i>	Bio-Rad, München
Probenröhrchen (1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Sulfosalicylsäure	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma Aldrich, Steinheim
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris-Hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (10x)	Biochrom, Berlin
Tween-20	Roth, Karlsruhe
<i>Ultra pure water</i>	Biochrom, Berlin
<i>Vectashield mounting medium</i>	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Zentrifugenröhrchen (12,5ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zelleinfriermedium	Sigma Aldrich, Steinheim
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen, Schweiz Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur-Testplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz

### 3.1.2 Antikörper

Anti-Digoxigenin-AP <i>Fab fragments</i>	Roche, Mannheim
Anti-Caveolin-3, Maus	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Desmin, Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
Anti-I $\kappa$ B- $\alpha$ , Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-NF- $\kappa$ B (p65), Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-p21, Maus	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-TRAF6, Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
Anti- $\alpha$ -Tubulin, Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Vimentin, Maus	Abcam, Cambridge, UK
Maus-Anti-Kaninchen IgG, FITC-gekoppelt	Sigma Aldrich, Steinheim
Esel-Anti-Kaninchen IgG, Meerrettichperoxidase-gekoppelt (ECL)	GE Healthcare, Freiburg
Schaf-Anti-Maus IgG, Meerrettichperoxidase-gekoppelt (ECL)	GE Healthcare, Freiburg

### 3.1.3 Sonden

Myogenin-Sonde (Digoxigenin-markierte <i>antisense</i> RNA-Sonde)	Felicitas Berger, Charité Berlin
--	----------------------------------

### 3.1.4 Kommerzielle Kits

<i>Amersham ECL<sup>TM</sup> advance western blotting detection kit</i>	GE Healthcare, Freiburg
<i>BCA<sup>TM</sup> protein assay kit</i>	Pierce, Rockford, USA
<i>Nuclear extract kit</i>	Active Motif, Rixensart, Belgien
<i>RNeasy kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>TransAM<sup>TM</sup> NF-<math>\kappa</math>B p65 kit</i>	Active Motif, Rixensart, Belgien

### 3.1.5 Eukaryontische Zelllinien

C2C12	nichttransformierte Mäusemyoblasten, Helen Blau, Stanford University
-------	--

RD/18	Humane Rhabdomyosarkomzellen, Pier-Luigi Lollini, Bologna University
RD/12	Humane Rhabdomyosarkomzellen, Pier-Luigi Lollini, Bologna University
CCA	Humane Rhabdomyosarkomzellen, Pier-Luigi Lollini, Bologna University

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung eukaryontischer Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 95% relativer Luftfeuchtigkeit, 5% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert. Zur Anzucht wurde *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) mit dem Zusatz von Penicillin/Streptomycin (je 100U/ml) und Serum vom fötalen Kalb (FKS) als Proliferationsmedium verwendet. Bei der nichttransformierten Myoblastenzelllinie C2C12 enthielt das Medium 1,0g/l Glucose und bei den Rhabdomyosarkomzelllinien RD/18, RD/12 und CCA 4,5g/l Glucose. Bei C2C12-Zellen betrug die FKS-Konzentration 20%. Dem Proliferationsmedium der Rhabdomyosarkomzelllinien wurden 10% FKS zugesetzt.

Bei einer für die jeweilige Zelllinie kritischen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Proliferationsmedium entfernt und die Zellen wurden mit steriler Phosphatpufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Die adhärenen Zellen wurden durch fünfminütiges Einwirken von Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe von Proliferationsmedium beendet. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Zellsediment wurde in Proliferationsmedium resuspendiert und anschließend weiterkultiviert.

#### Proliferationsmedium C2C12-Zellen

DMEM (1g/l Glucose)	1x
FKS	20%
Penicillin/Streptomycin	Je 100U/ml

#### Proliferationsmedium RD/12-, RD/18- und CCA-Zellen

DMEM (4,5g/l Glucose)	1x
FKS	10%
Penicillin/Streptomycin	Je 100U/ml

#### Trypsin/EDTA

Ultra Pure Water	1x
Trypsin/EDTA	0,05%

Die langfristige Aufbewahrung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 C. Hierfür wurden die Zellen nach dem Passagieren in DMSO-haltiges Einfriermedium aufgenommen und in spezielle Einfriergefäßen (*Kryotubes*) überführt. Um eine langsame Abkühlung von ca. 1 C pro Stunde zu gewährleisten, wurden die Zellen zunächst auf Eis inkubiert. Nach

einer sich daran anschließenden mindestens 24-stündigen Abkühlphase bei -80 C folgte die Einlagerung in flüssigen Stickstoff.

Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen zügig im 37 C warmen Wasserbad aufgetaut, mit Proliferationsmedium gewaschen und in geeignete Zellkulturflaschen eingefüllt.

### **3.2.1.2 Induktion der myogenen Differenzierung**

Die Zellen der C2C12-, RD/18- und RD/12-Zelllinien wurden bis zu einer ca. 80-90%igen Konfluenz in Proliferationsmedium gehalten. Die Zellen der CCA-Zelllinie wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 90-100% in Proliferationsmedium gehalten. Zur Induktion der Differenzierung wurde das FKS-haltige Proliferationsmedium durch ein Differenzierungsmedium ersetzt. Die Zusammensetzung des Differenzierungsmediums entsprach dabei bezüglich der Zusammensetzung dem Proliferationsmedium, wobei jedoch statt FKS 2% Pferdeserum verwendet wurde.

Der Differenzierungsprozess wurde fotografisch festgehalten und durch die Expressionsmuster der für die Zelllinien spezifischen Differenzierungsmarker überprüft.

### **3.2.1.3 Behandlung der Zellen mit Lactacystin**

Im Verlaufe dieser Arbeit wurden die Zellen mit dem Proteasominhibitor Lactacystin behandelt. Durch die Hemmung des Proteasoms wird der Abbau von I $\kappa$ B- $\alpha$  und somit die Aktivierung von NF- $\kappa$ B verhindert (Shirley *et al.*, 2005).

Für die Behandlung wurden die Zellen auf Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen ausgesät. Beim Erreichen einer Konfluenz von ca. 80-90% erfolgte die Behandlung mit Lactacystin. Zu den vorgelegten 1ml Proliferationsmedium wurden 9,41 $\mu$ l einer 1,0627mM Lactacystin-Lösung gegeben, so dass die vom Hersteller empfohlene Endkonzentration von 10 $\mu$ M erreicht wurde. Nach einer Stunde wurde das lactacystinhaltige Proliferationsmedium durch Differenzierungsmedium ersetzt.

Für die Herstellung der Lactacystin-Lösung wurde Lactacystin in DMSO gelöst. Da DMSO das Differenzierungsverhalten der Zellen beeinflussen kann (Orzechowski *et al.*, 2001), wurde parallel eine Kontrollbehandlung der Zellen mit der äquivalenten Menge DMSO durchgeführt.

### **3.2.1.4 Behandlung der Zellen mit Curcumin**

Curcumin ist die hauptaktive Komponente der Gelbwurzel (*Curcuma longa*) (Singh und Aggarwal, 1995). Curcumin inhibiert den NF- $\kappa$ B-Signalweg durch die Hemmung der IKK. Curcumin hemmt aber auch andere Signalwege wie z.B. den Akt-, den JNK- und den MAPK-Signalweg (Aggarwal und Shishodia, 2006).

Zur Behandlung der Zellen mit Curcumin wurden diese auf Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen ausgesät. Der Curcuminzusatz erfolgte, nachdem die Zellen eine Konfluenz von ca. 80-90% erreicht hatten. Hierzu wurden zu den bereits vorgelegten 2ml Proliferationsmedium 10 $\mu$ l einer 20mM Curcumin-Lösung pipettiert, so dass eine Endkonzentration von 100 $\mu$ M pro Vertiefung erreicht wurde. Nach einstündiger Behandlungsdauer wurde das curcuminhaltige Proliferationsmedium gegen Differenzierungsmedium ausgetauscht.

Die Curcumin-Lösung bestand aus in DMSO gelöstem Curcumin. Aus diesem Grund wurde, wie bei der Behandlung mit Lactacystin, eine Kontrollbehandlung mit DMSO durchgeführt.

### **3.2.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.2.1 Allgemeine Richtlinien für das Arbeiten mit RNA**

Während der Arbeit mit RNA können Kontaminationen mit RNAsen zur Degradation der RNA führen. Um diese zu vermeiden wurden die folgenden Maßnahmen ergriffen.

Es wurden während der gesamten Arbeit Einmalhandschuhe getragen und es wurden nur sterile Plastik- oder gebackene Glasgefäße (200°C, 8 Stunden) verwendet. Um die Gebrauchslösungen von RNAsen zu befreien, wurden diese mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Zu diesem Zweck wurde den Lösungen 0,1% DEPC zugesetzt und anschließend wurden sie für mindestens 16 Stunden bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Zur Inaktivierung des DEPC wurden die Lösungen nachfolgend autoklaviert. Da Tris-haltige Lösungen nicht mit aktivem DEPC in Berührung kommen dürfen, wurden diese in gebackenen Gefäßen mit bereits autoklaviertem DEPC-Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O) angesetzt.

#### **3.2.2.2 Isolierung gesamtzellulärer RNA**

Zur Isolierung von gesamtzellulärer RNA wurde das *RNeasy kit* der Firma Qiagen verwendet. Die Konzentration der RNA wurde anschließend photometrisch bestimmt.

#### **3.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Zur Konzentrationsbestimmung der RNA (in wässriger Lösung) wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen. Die Messungen wurden in wiederverwendbaren Quarzküvetten durchgeführt. Als Referenzwert wurde doppelt destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) bzw. DEPC-H<sub>2</sub>O verwendet. Als Maßstab für die Reinheit der Nukleinsäuren wurde das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260nm zu denen bei 280nm verwendet.

#### **3.2.2.4 Northern Blot**

Die *Northern Blot*-Analyse dient dem Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen. Hierfür wird die RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und dann auf eine Membran transferiert. Auf dieser Membran lassen sich die spezifischen RNA-Sequenzen mittels komplementärer Gensonden markieren.

Für die Gelelektrophorese wurde pro Probe je ein Volumen, das einer Menge von 0,5µg RNA entsprach, aliquotiert. Dieses Volumen wurde mit DEPC-Wasser auf 13µl aufgefüllt und 10µl RNA-Ladepuffer hinzugegeben. Um die RNA zu denaturieren, wurden die aliquotierten Proben für eine Minute auf 85°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf ein formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS-Puffer. Die Dauer der Elektrophorese war ca. eine Stunde bei 100V (40mA). Nachfolgend wurden die Proben mittels Kapillarblotverfahren auf eine Nylonmembran (Hybond-N) transferiert. Hierzu wurde eine ca. 15x25cm große Schale mit 20x SSC gefüllt. Auf der Schale wurde eine Glasplatte befestigt. Auf diese Platte wurde eine ca. 12x25cm große Brücke aus mit 20x SSC befeuchtetem Elektrophoresepapier gelegt. Darauf wurden drei in 20x SSC getauchte Elektrophoresepapiere, das ebenfalls in 20x SSC angefeuchtete Gel, die Nylonmembran

(zuerst in DEPC-Wasser und dann in 20x SSC getaucht), drei weitere trockene Elektrophoresepapiere und darauf eine große Menge saugfähigen Materials gelegt. Der Transfer erfolgte über Nacht. Nach dem Transfer wurde die Membran für einige Minuten in 2x SSC gewaschen. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte durch dreiminütige UV-Bestrahlung mit 120mJ. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Auftragsmenge wurde die Membran zuerst mit Methylenblau-Lösung gefärbt und dann mit DEPC-Wasser entfärbt. Anschließend wurde die Membran in einen wasserdichten Hybridisierungsbeutel inklusive Hybridisierungslösung eingeschweißt. Die Vorhybridisierung erfolgte für eine Stunde im 68°C warmen Wasserbad unter leichtem Schwenken. Für die folgende Hybridisierung wurde die zu verwendende Digoxigenin-markierte RNA-Sonde in 500µl Hybridisierungslösung verdünnt und für zehn Minuten auf 68°C erhitzt. Nach Zugabe der Sonde in den Hybridisierungsbeutel (Endkonzentration der Myogenin-Sonde: 1:5000) erfolgte die Hybridisierung über Nacht. Diese fand ebenfalls im 68°C warmen Wasserbad unter leichtem Schwenken statt.

Nach der Hybridisierung wurden die folgenden Wasch- und Inkubationsschritte durchgeführt:

Waschlösung 1	2x 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT)
Waschlösung 2	2x 20 Minuten bei 68°C
Puffer 1	5 Minuten bei RT
1% Blockierungslösung	1 Stunde bei RT
Anti-Digoxigenin-AP (1:15000 in 1% Blockierungslösung)	30 Minuten bei RT
Puffer 1 mit 0,3% Tween 20	5 Minuten bei RT 2x 20 Minuten bei RT
Puffer 2	5 Minuten bei RT

Anschließend wurde die Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen und für fünf Minuten mit in Puffer 2 verdünntem Chemilumineszenz-Substrat inkubiert. Nachfolgend wurde die Nylonmembran in eine neue Haushaltsfolie eingeschlagen und ein Chemilumineszenzfilm zum Belichten aufgelegt. Die Belichtungsdauer betrug ca. 20 Minuten.

#### Agarosegel (100ml)

Agarose MP	1g
DEPC-H <sub>2</sub> O	84,6ml
10x MOPS-Puffer	10ml
Formaldehyd 37%	5,4ml

#### RNA-Ladepuffer (15ml)

Formamid 100%	7,2ml
Formaldehyd 37%	2,6ml
DEPC-H <sub>2</sub> O	1,8ml
10x MOPS-Puffer	1,6ml
Glycerin 80%	1ml
gesättigtes Bromphenolblau	0,8ml

Der RNA-Ladepuffer wurde in 1ml-Portionen aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

### 20x SSC

NaCl	3M
Na-Citrat	300mM
In DEPC-H <sub>2</sub> O	

### 10x MOPS-Puffer

MOPS	200mM
Na-Acetat	50mM
EDTA	0,01N
In DEPC-H <sub>2</sub> O	

Der 10x MOPS-Puffer wurde in einer lichtundurchlässigen Flasche aufbewahrt.

### RNA-Hybridisationslösung (50ml)

Formamid 100%	25ml
20x SSC	12,5ml
10% Blockierungslösung	10ml
20% N-Lauroylsarcosine	0,25ml
10% SDS	0,1ml
DEPC-H <sub>2</sub> O	2,15ml

Die RNA-Hybridisationslösung wurde in 25ml-Portionen aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

### Waschlösung Nr.1

20x SSC	10ml
10% SDS	5ml
DEPC-H <sub>2</sub> O	445ml

Es wurde zuerst das 20x SSC mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt. Erst anschließend wurde SDS hinzugefügt, um ein Ausfallen von SSC und SDS zu vermeiden.

### Waschlösung Nr.2

20x SSC	2,5ml
10% SDS	5ml
DEPC-H <sub>2</sub> O	492,5ml

### Puffer 1 (1l)

Maleinsäure	11,6g
NaCl	8,75g
NaOH	bis zum Erreichen von pH 7,5
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 1l

### Puffer 2 (50ml)

1M Tris-HCl pH 9,5	5ml
5M NaCl	1ml
5M MgCl	0,5ml
DEPC-H <sub>2</sub> O	43,5ml

Puffer 2 wurde vor jedem Gebrauch frisch angesetzt.

### 3.2.3 Proteinchemische Methoden

#### 3.2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Zellen

##### 3.2.3.1.1 Herstellung von zytosolischen Proteinlysaten

Für die Gewinnung zytosolischer Proteinlysate wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums zweimal mit PBS gewaschen. Zum Aufschluss der Zellmembranen wurden die Zellen mit einem proteaseinhibitorhaltigem Zelllysispuffer inkubiert. Die Inkubation erfolgte für zehn Minuten unter leichtem Schwenken bei 4°C. Das zytosolische Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß pipettiert und zur Entfernung von Zelltrümmern für fünf Minuten zentrifugiert (4°C, 19800\*g). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

##### Zelllysispuffer

Triton X-100	1%
Glycerin	10%
Tris-HCl pH 8,0	20mM
NaCl	137mM
EDTA	2mM

##### 3.2.3.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte unter Verwendung des *BCA™ protein assay kit* der Firma Pierce entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Absorption wurde photometrisch bei 562nm bestimmt.

##### 3.2.3.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse wurden die jeweiligen zytosolischen Proteinlysate zuerst denaturiert und anschließend mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurde mit dem Puffersystem nach Laemmli (1970; Glycin als Zwitterion) gearbeitet, wobei die Elektrophorese in vertikaler Richtung in Gelen erfolgte. Die Gele bestanden jeweils aus einem ca. 2cm breiten Sammelgel, sowie einem sich daran anschließenden ca. 5cm breiten Trenngel. Die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels variierte in Abhängigkeit zur Größe des zu untersuchenden Proteins zwischen 10% und 15%.

In Abhängigkeit vom nachzuweisenden Protein wurden Mengen von 5-40µg Protein mit PBS-Lösung auf ein geeignetes Volumen aufgefüllt und mit Proben-Auftragspuffer (5x konzentriert) versetzt. Diese Proben wurden zur Denaturierung für fünf Minuten im Heizblock auf 95°C erhitzt und unmittelbar danach auf das Gel aufgetragen. Es wurde ein gefärbter Protein-Marker (Molekulargewichts-Marker) eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100V (50mA), bis die Lauffront das Gelende erreicht hatte (ca. 1,5 bis 2 Stunden).

### Zusammensetzung des Trenngels

Acrylamid Konzentration	10%	12,5%	15%
Rotiphorese Gel 40 (29:1)	2ml	2,5ml	3ml
1M Tris-HCl pH 8,8	1,5ml	1,5ml	1,5ml
10% SDS	80µl	80µl	80µl
87% Glycerin	900µl	900µl	900µl
H <sub>2</sub> O	3,4ml	2,9ml	2,4ml
10% APS	80µl	80µl	80µl
TEMED	4µl	4µl	4µl

### Zusammensetzung des Sammelgels

Rotiphorese Gel 40 (29:1)	750µl
1M Tris-HCl pH 6,8	750µl
10% SDS	60µl
H <sub>2</sub> O	4,4ml
10% APS	60µl
TEMED	4µl

### Proben-Auftragspuffer (5x konzentriert)

Glycerin	50%
2-Mercaptoethanol	12,5%
SDS	7,5g/l
Tris-HCl pH 8,0	250mM
Bromphenolblau	0,5mg/ml

### SDS-PAGE-Laufpuffer

Tris	25mM
Glycerin	192mM
SDS	0,1%

## 3.2.3.4 Immunologische Methoden

### 3.2.3.4.1 Western Blot

Diese Methode dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern. Zunächst erfolgte der Transfer der Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran. Dieser Transfer erfolgte elektrisch unter Verwendung einer halbtrockenen Blotapparatur. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nachfolgend zunächst mit einer hochprozentigen Proteinlösung und anschließend mit dem in geeigneter Weise verdünnten ersten, proteinspezifischen Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines enzymgekoppelten zweiten Antikörpers, wobei das Enzym eine geeignete Nachweisreaktion katalysierte.

**Transfer:**

Zunächst wurde die Anode der Blotapparatur mit Wasser benetzt. Auf die Anode wurden die folgenden Komponenten in der angegebenen Reihenfolge aufgeschichtet:

6 Chromatographiepapiere	in Anodenpuffer 1 getränkt
4 Chromatographiepapiere	in Anodenpuffer 2 getränkt
Nitrocellulose-Membran	in Anodenpuffer 2 getränkt
Trenngel	in Kathodenpuffer getränkt
6 Chromatographiepapiere	in Kathodenpuffer getränkt

Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 1-2 mA/cm<sup>2</sup> innerhalb von 60 Minuten. Zur Beurteilung der Transfereffizienz wurde die Membran anschließend mit Ponceau S gefärbt und mit 0,1%iger Essigsäure entfärbt.

**Anodenpuffer1**

Tris	300mM
Methanol	20%

**Anodenpuffer2**

Tris	25mM
Methanol	20%

**Kathodenpuffer**

Tris	25mM
Methanol	20%
6-Aminocaprinsäure	40mM

**Antikörper-Inkubation:**

Sämtliche Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur, lediglich Inkubationen über Nacht bei +4°C.

Absättigung	3% Milchpulver in TBS-T oder Blockierungslösung	60 Minuten
1. Antikörper	geeignete Verdünnung in TBS-T	mindestens 60 Minuten
Waschen	TBS-T	3x 5 Minuten
2. Antikörper	geeignete Verdünnung in TBS-T	30-60 Minuten
Waschen	TBS-T	3x 5 Minuten

### Antikörper-Konzentrationen:

Anti-Caveolin-3, Maus	1:200
Anti-Desmin, Kaninchen	1:1000
Anti-IkB- $\alpha$ , Kaninchen	1:500
Anti-p21, Maus	1:500
Anti-TRAF6, Kaninchen	1:2000
Anti- $\alpha$ -Tubulin, Kaninchen	1:500
Anti-Vimentin, Maus	1:1000
Esel-Anti-Kaninchen IgG, Meerrettichperoxidase-gekoppelt	1:20000
Schaf-Anti-Maus IgG, Meerrettichperoxidase-gekoppelt	1:20000

### TBS-T

Tris-HCl pH 8,0	10mM
NaCl	0,15M
Tween-20	0,05%

### Detektion:

Prinzip: Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol (3-Aminophthalhydrazid) durch Wasserstoffperoxid, wodurch 3-Aminophthalsäure und Stickstoff entstehen. Bei dieser Reaktion wird Energie in Form von Licht freigesetzt, wodurch eine Detektion anhand der Schwarzfärbung eines Röntgenfilms möglich ist. Es wurde mit dem *Amersham ECL<sup>TM</sup> Advance Western Blotting Detection Kit* der Firma GE Healthcare nach Angaben des Herstellers gearbeitet.

### Densitometrische Quantifizierung

Um die Intensität verschiedener, im *Western Blot* nachgewiesener Banden zu bestimmen, wurde eine densitometrische Quantifizierung mithilfe des Adobe Photoshop-Programms durchgeführt. Die entsprechende Bande wurde hierfür zuerst in Graustufen dargestellt und daran anschließend eine Bildumkehr durchgeführt (d.h. weiße Farben als schwarze Farben und schwarze Farben als weiße Farben dargestellt). Mithilfe des Lassowerkzeuges (Auswahlwerkzeuges) wurden die Banden jeweils gleichmäßig eng umfahren (hierzu war eine starke Vergrößerung des Bildes hilfreich). Mit Hilfe der Histogramm-Funktion des Adobe Photoshop-Programms konnte nun der Mittelwert der Helligkeit und die Pixelzahl der umrandeten Fläche abgelesen werden. Diese beiden Werte wurden miteinander multipliziert und waren proportional zur Intensität der entsprechenden Bande. Das gleiche Prozedere wurde nun auch mit der Ladekontrolle, also der Ponceau S-Färbung durchgeführt, wobei ein repräsentatives Areal im mittleren Bereich der entsprechenden Blots ausgewählt wurde. Anschließend wurde der für die Intensität der Bande erhaltene Wert durch den für die Ladekontrolle erhaltenen dividiert. Der erhaltene Quotient konnte nun mit Quotienten anderer Banden, die auf dem gleichen Film entwickelt wurden, verglichen werden.

#### 3.2.3.4.2 Immunzytochemie

Um die intrazelluläre Lokalisation eines Proteins zu bestimmen, wurde eine Immunzytochemie durchgeführt. Bei dieser Methode erfolgt zu Beginn die Fixierung der Zellen. Anschließend wird das nachzuweisende Protein durch einen Antikörper markiert. Durch einen zweiten Antikörper, an den ein fluoreszierender Farbstoff gekoppelt ist, wird der erste Antikörper und somit das Protein detektierbar.

Für den Nachweis in kultivierten Zellen wurden diese zunächst auf geeigneten Zellkulturschalen, in die jeweils ein Deckglas gelegt wurde, ausgesät. Zum gewünschten Zeitpunkt wurde das Medium entfernt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen zur Fixierung mit reichlich Methanol bedeckt und für 20-30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Es folgte ein erneutes zweimaliges Waschen mit PBS. Nach diesem Schritt konnten die fixierten Zellen bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert oder direkt weiter bearbeitet werden. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde für ca. 20 Minuten eine 10%ige FKS-Lösung (in PBS) in die Schalen gegeben. Der erste Antikörper wurde in geeigneter Weise in 10%iger FKS-Lösung verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 20-30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper in gleicher Weise. An den sekundären Antikörper war der fluoreszierende Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gebunden. Anschließend wurde der Fluoreszenz-Farbstoff 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) zur Markierung der DNA zum zweiten Antikörper hinzugefügt. Nach fünf Minuten Inkubation erfolgte ein weiteres zweimaliges Waschen mit PBS. Zum Erhalt eines über längere Zeit konservierbaren Präparates wurden auf einen Objektträger ein Tropfen *Mounting medium* gegeben und das Deckglas mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf den Objektträger gelegt. Die Lagerung der Präparate erfolgte unter Ausschluss von Licht. Die Betrachtung der Präparate erfolgte in einem Fluoreszenzmikroskop mit einer für den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff geeigneten Anregungswellenlänge.

#### 3.2.3.4.3 ELISA

Beim *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) werden Proteine mit Hilfe von Antikörpern spezifisch nachgewiesen. Das nachzuweisende Protein wird durch eine Konsensussequenz an eine Mikrotiterplatte gebunden. Ein primärer, spezifisch gegen Antigene des Proteins gerichteter Antikörper, führt zur Markierung des Proteins. Durch einen sekundären, Meerrettichperoxidase-gekoppelten, Antikörper, erhält man ein photometrisch bestimmbares Ergebnis.

Zur Gewinnung von Kernextrakten wurde das *Nuclear extract kit* der Firma Active Motif verwendet. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

Die ELISA-Methode wurde mit Hilfe des *TransAM™ NF- $\kappa$ B p65 kit* der Firma Active Motif durchgeführt. Es wurden je Vertiefung  $10\mu\text{g}$  Kernextrakt aufgetragen. Die Absorption wurde photometrisch bei  $450\text{nm}$  bestimmt. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Leerwert korrigiert.

## 4 ERGEBNISSE

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, die Aktivität des NF- $\kappa$ B in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen zu untersuchen.

Hierfür wurden die NF- $\kappa$ B-Basalaktivität (also in proliferierenden Zellen) und die NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf analysiert. Daran anschließend wurden die Auswirkungen der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf den Differenzierungsprozess untersucht.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die *traf6*-Expression in proliferierenden und differenzierenden, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen zu analysieren. In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss der Blockierung des NF- $\kappa$ B auf die *traf6*-Expression überprüft.

### 4.1 Vergleich der basalen NF- $\kappa$ B-Aktivität sowie der basalen Expression des für den NF- $\kappa$ B-Aktivator TRAF6 kodierenden Gens in nichttransformierten Myoblasten und in Rhabdomyosarkomzellen

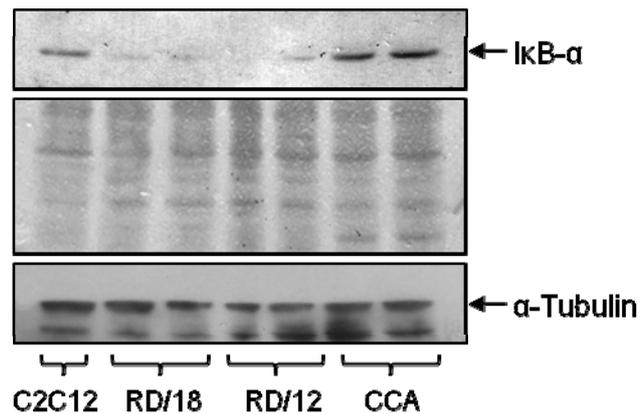
Zu Beginn dieser Arbeit sollten die basale NF- $\kappa$ B-Aktivität und die basale *traf6*-Expression in der nichttransformierten murinen Myoblastenzelllinie C2C12 und den drei humanen Rhabdomyosarkomzelllinien RD/18, RD/12 und CCA verglichen werden.

#### 4.1.1 Vergleich der basalen NF- $\kappa$ B-Aktivität der einzelnen Zelllinien

Um Rückschlüsse auf die NF- $\kappa$ B-Aktivität in nichttransformierten Myoblasten sowie in Rhabdomyosarkomen ziehen zu können, wurde zunächst die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Basalkonzentration der einzelnen Zelllinien untersucht.

NF- $\kappa$ B ist im inaktiven Zustand an I $\kappa$ B- $\alpha$  gebunden. Hierdurch wird seine nukleäre Akkumulation und somit seine DNA-Bindung verhindert. Nach Aktivierung des NF- $\kappa$ B kommt es zur Degradation von I $\kappa$ B- $\alpha$  (Hayden und Ghosh, 2008), so dass eine direkte inverse Korrelation zwischen der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration in einer Zelle und der entsprechenden NF- $\kappa$ B-Aktivität besteht. Somit kann mittels Bestimmung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration in einfacher Weise eine qualitative Bestimmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität erfolgen.

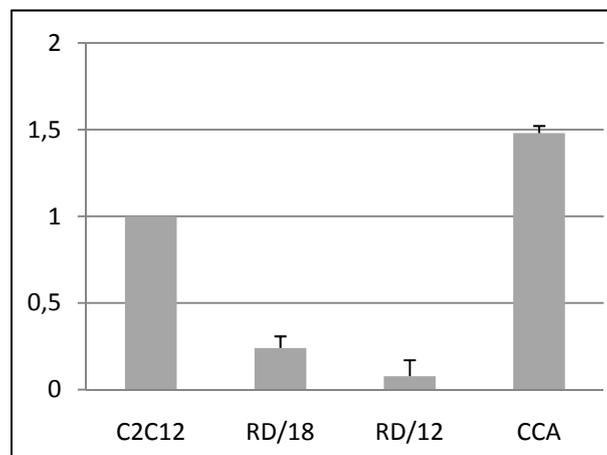
Für die Analyse der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Basalkonzentration wurden aus proliferierenden Zellen zytosolische Proteinlysate gewonnen und mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens untersucht. Wie in Abbildung 4 gezeigt, konnte dabei bei RD/18- und RD/12-Zellen eine deutlich niedrigere I $\kappa$ B- $\alpha$ -Basalkonzentration als bei C2C12- und CCA-Zellen beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass erstere eine höhere und letztere eine geringere NF- $\kappa$ B-Basalaktivität aufweisen. Wird die Intensität der I $\kappa$ B- $\alpha$ -spezifische Bande auf die Intensität der Ponceau S-Färbung normiert, werden die großen Unterschiede der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Basalkonzentrationen der einzelnen Zelllinien besonders gut sichtbar (Abb. 5).



**Abb. 4: Western Blot-Analyse der IκB-α-Proteinkonzentrationen in proliferierenden C2C12-, RD/18-, RD/12- und CCA-Zellen.**

Aus proliferierenden Zellen wurden zytosolische Proteinlysate gewonnen. Je Spur wurden 40µg Protein aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Nach Inkubation mit einem IκB-α-Antikörper konnte eine für IκB-α spezifische Bande bei 37kDa detektiert werden (oben). Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren dienten eine Ponceau S-Färbung (Mitte) und der Nachweis des *Housekeeping*-Proteins α-Tubulin (unten).

Deutlich zu sehen sind die geringere Stärke der IκB-α-spezifischen Banden bei den RD/18- und RD/12-Zellen im Vergleich zu den C2C12- und CCA-Zellen.



**Abb. 5: Schematische Darstellung der basalen Konzentration des IκB-α-Proteins in den einzelnen Zelllinien.**

Die Intensität der IκB-α-spezifischen Bande (Abb. 4) wurde densitometrisch quantifiziert und in Relation zur Intensität der entsprechenden Ponceau S-Färbung gesetzt. Im Säulendiagramm sind die errechneten Mittelwerte der einzelnen Zelllinien dargestellt. Der Mittelwert der C2C12-Basalexpression wurde mit eins festgelegt und die Mittelwerte der Rhabdomyosarkomzellen entsprechend umgerechnet.

Man beachte die deutlich niedrigeren Werte der RD/18- und RD/12-Zellen im Vergleich zu denen der C2C12- und CCA-Zellen, was für eine erhöhte NF-κB-Basalaktivität in den zuerst genannten Zelllinien spricht.

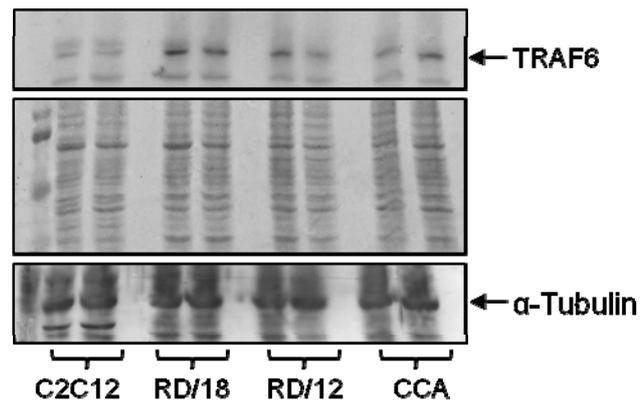
Insbesondere wurde deutlich, dass CCA-Zellen die höchste I $\kappa$ B- $\alpha$ -Basalkonzentration besitzen – sie war 1,5-mal höher als die der C2C12-Zellen. Im Gegensatz dazu war die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Basalkonzentration der RD-Zellen deutlich niedriger als die der C2C12-Zellen. So war sie bei RD/18-Zellen viermal und bei RD/12-Zellen zehnmal niedriger als die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Basalkonzentration der C2C12-Zellen. Dabei ist aber zu betonen, dass ein direkter Vergleich zwischen Zellen, die keine klonalen Varianten voneinander sind (wie es bei C2C12-, RD- und CCA-Zellen der Fall ist), nur eingeschränkt möglich ist. Lediglich RD/12- und RD/18-Zellen entstammen aus demselben Klon und können somit direkt miteinander verglichen werden.

### 4.1.2 Vergleich der basalen *traf6*-Expression der einzelnen Zelllinien

In vielen Zelltypen ist TRAF6 an der Aktivierung des NF- $\kappa$ B über die TL- und IL-1-Rezeptoren sowie über die TNF-Rezeptoren beteiligt. Außerdem ist TRAF6 an der Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen JNK und p38 beteiligt (Bradley und Pober, 2001; Moynagh, 2005).

Munz *et al.* (2002) konnten zeigen, dass eine Repression der *rip2*-Genexpression für die myogene Differenzierung notwendig ist. RIP2 ist wie TRAF6 ein zytoplasmatisches Rezeptor-Adaptorprotein, das an der Signalweiterleitung an TNF-Rezeptoren beteiligt ist. Aus früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe gab es Hinweise darauf, dass bei TRAF6 ein ähnlicher Zusammenhang bestehen könnte (Mueck *et al.*, 2011), dass also die Expression des entsprechenden Gens ebenfalls nach Induktion der myogenen Differenzierung reprimiert wird. Deshalb wurde in dieser Arbeit zusätzlich die *traf6*-Genexpression auf Proteinebene untersucht.

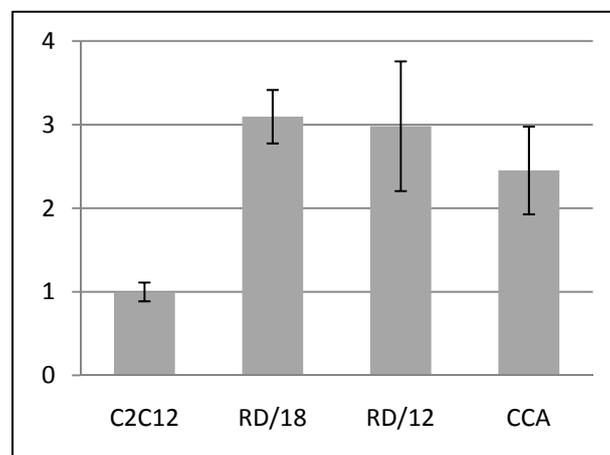
Hierfür wurden zytosolische Proteinlysate aus proliferierenden Zellen gewonnen. Diese wurden elektrophoretisch aufgetrennt, per *Western Blot*-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und anschließend mit einem TRAF6-Antikörper inkubiert. Es wurden pro Zelllinie jeweils zwei Proteinlysate aufgetragen, die aus unabhängigen Versuchen stammten. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, war die *traf6*-Basalexpression in den Rhabdomyosarkomzellen RD/18, RD/12 und CCA im Vergleich zur Basalexpression in den C2C12-Zellen deutlich höher. Indem man die Intensität der TRAF6-spezifischen Bande auf die Intensität der Ponceau S-Färbung normiert, wird ein Vergleich der *traf6*-Basalexpressionen erleichtert (Abb. 7). Es zeigte sich, dass die *traf6*-Basalexpression in RD-Zellen ca. 3-mal höher und die in CCA-Zellen ca. 2,5-mal höher als die Basalexpression in C2C12-Zellen war. Wie bei dem Vergleich der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Basalkonzentrationen ist dieser Vergleich, aufgrund der unterschiedlichen Herkunft der Zellen, jedoch nur eingeschränkt möglich.



**Abb. 6: Western Blot-Analyse der *traf6*-Expression proliferierender C2C12-, RD/18-, RD/12- und CCA-Zellen**

Pro Zelllinie wurden zwei aus unabhängigen Versuchen stammende Proteinlysatsproben aus proliferierenden Zellen gewonnen. Pro Spur wurden 20µg Protein auf ein Acrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine geeignete Membran erfolgte die Inkubation mit einem TRAF6-Antikörper. Oben zu sehen ist die für TRAF6 charakteristische Bande bei 58kDa. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung wurden eine Ponceau S-Färbung (Mitte) und der Nachweis des *Housekeeping*-Proteins  $\alpha$ -Tubulin (unten) durchgeführt.

Man beachte die geringere Intensität der Schwärzung der in den C2C12-Lysaten nachgewiesenen Banden.



**Abb. 7: Schematische Darstellung der Basalexpression des *traf6*-Gens**

Die in Abbildung 6 gezeigten TRAF6-spezifischen Banden wurden densitometrisch quantifiziert und in Bezug zur Intensität der entsprechenden Ponceau S-Färbung gesetzt. Die errechneten Mittelwerte sind zur Veranschaulichung in einem Säulendiagramm dargestellt. Der Mittelwert der C2C12-Zellen wurde mit eins festgelegt und die Mittelwerte der Rhabdomyosarkomzellen entsprechend umgerechnet.

Deutlich zu sehen ist der niedrigere Wert der C2C12-Zellen im Vergleich zu den Rhabdomyosarkomzellen RD/18, RD/12 und CCA.

## **4.2 NF- $\kappa$ B-Aktivität und Differenzierungsverhalten: Untersuchungen an nichttransformierten Myoblasten und an verschiedenen Rhabdomyosarkomzelllinien**

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte bei der nichttransformierten Myoblastenzelllinie C2C12 sowie bei den verschiedenen Rhabdomyosarkomzelllinien der Verlauf der NF- $\kappa$ B-Aktivität nach Induktion der myogenen Differenzierung analysiert werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität einen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Zellen hat.

Die entsprechenden Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt.

### **4.2.1 Untersuchung der nichttransformierten Myoblastenzelllinie C2C12**

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurden C2C12-Zellen jeweils für 96 Stunden nach Differenzierungseinleitung kultiviert. Die zu analysierenden Proben wurden von Zellen in Proliferationsmedium (0 Stunden) und nach 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden in Differenzierungsmedium geerntet.

#### **4.2.1.1 NF- $\kappa$ B-Aktivität und *traf6*-Expression bei der Differenzierung**

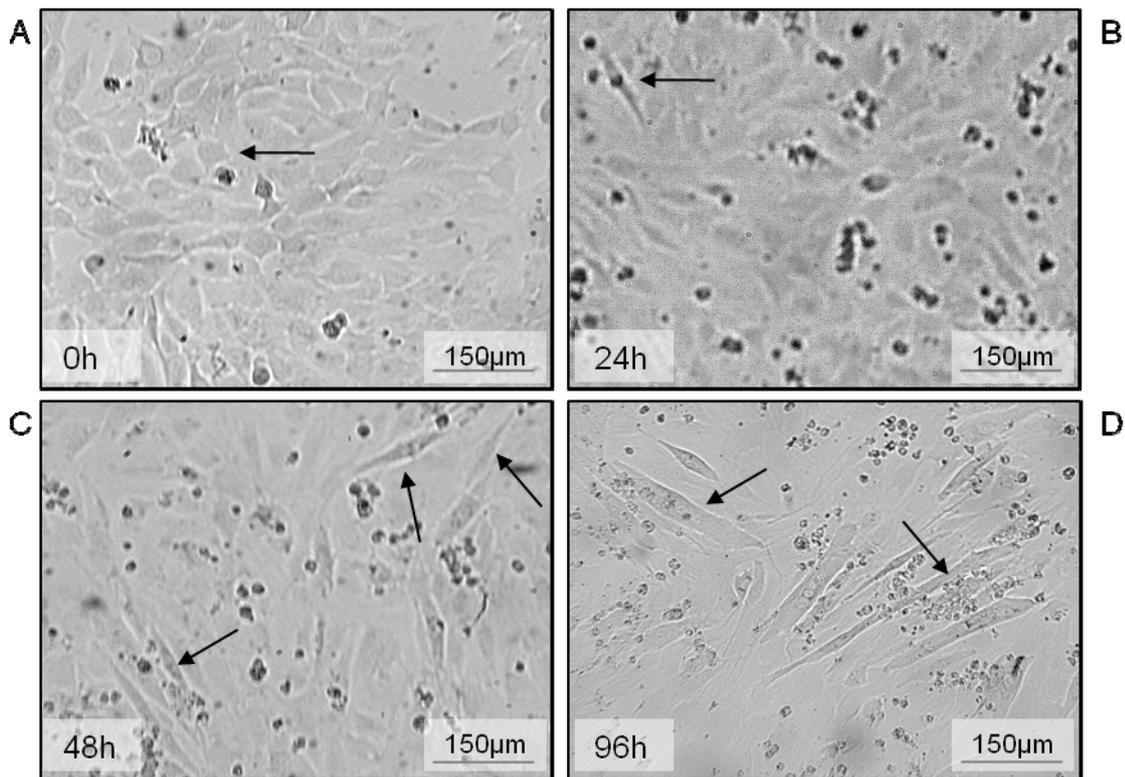
Um den ordnungsgemäßen Ablauf des Differenzierungsprozesses zu überprüfen, wurde dieser zunächst fotografisch festgehalten und anhand spezifischer Differenzierungsmarker kontrolliert. Daran anschließend erfolgten die Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Aktivität und des *traf6*-Expressionsmusters.

##### **4.2.1.1.1 Differenzierungsprozess der C2C12-Zellen**

###### Lichtmikroskopische Untersuchung:

Der Ablauf der Differenzierung der C2C12-Zellen ist vergleichbar mit dem der embryonalen Muskelzellendifferenzierung. Zu Beginn der Differenzierung sind die Myoblasten einkernig. Im weiteren Differenzierungsverlauf entwickeln sich diese zu einkernigen spindelförmigen Myozyten, welche später zu mehrkernigen Myotuben fusionieren.

Die morphologischen Veränderungen der in dieser Arbeit untersuchten C2C12-Zellen im Laufe der Myogenese wurden fotografisch festgehalten. Vor Beginn der Differenzierung waren nur rundliche, polygonale Myoblasten vorhanden (Abb. 8: A, Pfeil). 24 Stunden nachdem die Differenzierung eingeleitet wurde, waren vereinzelt spindelförmige Myozyten sichtbar (Abb. 8: B, Pfeil), deren Anzahl nach weiteren 24 Stunden deutlich anstieg (Abb. 8: C, Pfeile). Schließlich konnten nach 96-stündigem Differenzierungsprozess deutlich die länglichen, mehrkernigen und parallel angeordneten Myotuben beobachtet werden (Abb. 8: D, Pfeile).



**Abb. 8: Lichtmikroskopische Aufnahmen nativer C2C12-Zellen**

Die Bilder zeigen proliferierende (A) und differenzierende (B, C, D) C2C12-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Einleitung der Differenzierung. Die Pfeile zeigen auf die für den entsprechenden Differenzierungsgrad typischen Zellformen.

#### Analyse der Differenzierungsmarker Caveolin-3, Desmin, p21 und Myogenin

Während der Differenzierung wird die Expression einer Vielzahl von Genen induziert. Solche Gene können als Marker dienen, um den Verlauf der Differenzierung zu überprüfen. In dieser Arbeit wurden für C2C12-Zellen das *caveolin-3*-, das *desmin*-, das *p21*- sowie das *myogenin*-Gen als Marker verwendet.

Caveolin-3 ist ein muskelspezifisches Strukturprotein, das am Sarkolemm der Myotuben lokalisiert ist. Während der normalen Muskelzelldifferenzierung steigt die *caveolin-3*-Expression parallel zur Myotubenbildung an (Galbiati *et al.*, 1999). Bei den in dieser Arbeit untersuchten C2C12-Zellen wurde ein Anstieg der Caveolin-3-Proteinkonzentration bereits 24 Stunden nach Einleitung der Differenzierung sichtbar. In den folgenden 72 Stunden nahm die Konzentration dieses Proteins kontinuierlich zu (Abb. 9: A).

Das muskelspezifische Intermediärfilament Desmin ist in proliferierenden nicht-transformierten Myoblasten nur in geringer Konzentration vorhanden. Im Gegensatz dazu ist seine Konzentration in differenzierten Myotuben hoch (Paulin und Li, 2004). In den hier untersuchten C2C12-Zellen war das Desminprotein ab 24 Stunden nach Differenzierungseinleitung nachweisbar und seine Konzentration stieg im Verlauf der Differenzierung weiter an (Abb. 9: B).

P21 ist ein Zyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor, der während der normalen Skelettmuskelzelldifferenzierung am Ausscheiden der Zellen aus dem Zellzyklus beteiligt ist (Halevy *et al.*, 1995). In proliferierenden Myoblasten ist p21 nicht oder nur in sehr geringen Mengen

nachweisbar. Seine Expression steigt während der Muskelzellendifferenzierung deutlich an (Walsh und Perlman, 1997). Bei unseren Versuchen war eine Erhöhung der *p21*-Genexpression bereits sechs Stunden nach Differenzierungseinleitung sichtbar. In den folgenden Stunden erfolgte jedoch nur noch ein leichter Anstieg (Abb. 9: B).

Die Konzentration des muskelspezifischen Transkriptionsfaktors Myogenin ist während der Myotubenbildung erhöht (Rudnicki und Jaenisch, 1995). In unseren Versuchen war ab 24 Stunden nach Differenzierungseinleitung ein kontinuierlicher Anstieg der Myogenin-mRNA-Konzentration zu beobachten (Abb. 9: C).

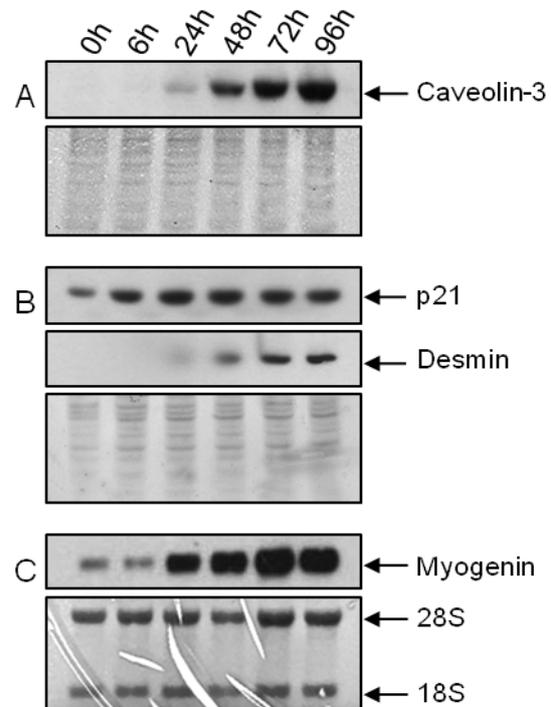
Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass in unseren Händen der Differenzierungsprozess der C2C12-Zellen ordnungsgemäß verlief und dass diese daher ein geeignetes Modellsystem für weitere Untersuchungen darstellten.

**Abb. 9: Untersuchung der Differenzierungsmarker Caveolin-3, p21, Desmin und Myogenin in C2C12-Zellen**

Nach 0, 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden Protein- und RNA-Proben aus proliferierenden bzw. differenzierenden C2C12-Zellen gewonnen. Diese wurden per *Western Blot*- bzw. *Northern Blot*-Verfahren analysiert. Die Proben wurden jeweils von links nach rechts auf die Gele aufgetragen, wobei mit dem 0-Stundenwert begonnen wurde.

A und B: *Western Blot*-Analysen, bei denen 10µg zytosolisches Protein pro Spur aufgetragen wurden. Es konnten die spezifischen Banden für Caveolin-3 bei 25kDa (A: oben), p21 bei 21kDa (B: oben) und Desmin bei 54kDa (B: Mitte) detektiert werden. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Spuren wurden Ponceau S-Färbungen durchgeführt (A und B: unten).

C: *Northern Blot*-Analyse der *myogenin*-Expression. Pro Spur wurden 0,5µg RNA aufgetragen und mit einer Myogenin-Sonde hybridisiert. Oben sichtbar sind die Myogenin-Gentranskripte (1,9kB). Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Spuren wurde eine Methylenblaufärbung durchgeführt (unten).



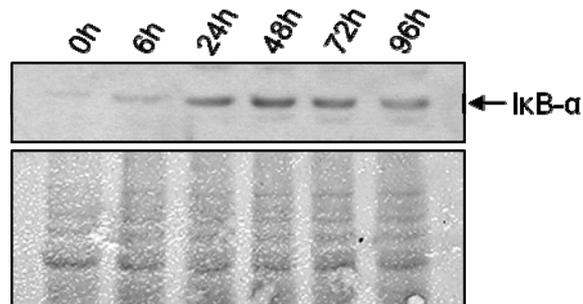
**4.2.1.1.2 NF-κB-Aktivität in C2C12-Zellen**

In dieser Arbeit wurde die NF-κB-Aktivität in den Zellen auf drei unterschiedliche Weisen bestimmt.

1. Indirekt über die Untersuchung der IκB-α-Konzentration
2. Direkt über die Untersuchung der Bindung von aktivem NF-κB an die entsprechende DNA-Konsensussequenz
3. Direkt über die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des NF-κB

### Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration im Differenzierungsverlauf

Hierfür wurden zytosolische Proteinproben aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens untersucht. Abbildung 10 zeigt ein für diese Versuche repräsentatives Ergebnis: Etwa 24 Stunden nach Differenzierungseinleitung konnte ein deutlicher Anstieg der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Proteinkonzentration beobachtet werden.



**Abb. 10: *Western Blot*-Analyse der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration in C2C12-Zellen**

Nach 0, 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden zytosolische Proteinproben aus proliferierenden (0 Stunden) bzw. differenzierenden C2C12-Zellen gewonnen. Pro Spur wurden 40 $\mu$ g Protein aufgetragen. Nach Inkubation mit einem I $\kappa$ B- $\alpha$ -Antikörper konnte eine für I $\kappa$ B- $\alpha$  spezifische Bande bei 37kDa detektiert werden (oben). Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurde eine Ponceau S-Färbung durchgeführt (unten).

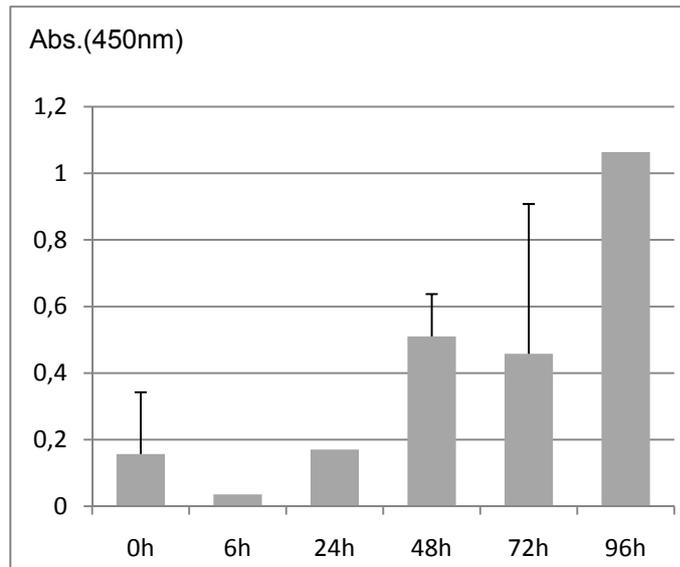
Deutlich zu sehen ist ein Anstieg der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration im Verlauf der Differenzierung.

### Untersuchung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung im Differenzierungsverlauf

Hierfür wurden nukleäre Proteinproben gewonnen und diese mittels ELISA-Verfahren analysiert. Zunächst wurden Proben aus einem einzelnen Versuch verwendet. Zusätzlich wurden nach 0, 48 und 72 Stunden Proben aus einem weiteren, unabhängigen Versuch gewonnen.

Bei dem von uns verwendeten ELISA-Verfahren können p65-NF- $\kappa$ B-Epitope nachgewiesen werden, die nur zugänglich sind, wenn NF- $\kappa$ B aktiviert und an seine Ziel-DNA gebunden ist ([www.activemotif.com](http://www.activemotif.com)).

Aus Abbildung 11 wird ersichtlich, dass die NF- $\kappa$ B-Aktivität, trotz großer Schwankungen, im Laufe der Differenzierung tendenziell zunahm. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den im vorangehenden Abschnitt gezeigten I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentrationsanalysen, die eine Abnahme der NF- $\kappa$ B-Aktivität im Verlauf der Differenzierung zeigten. Aufgrund der großen Schwankungen innerhalb der einzelnen Versuchskinetiken und der großen Unterschiede der Versuche untereinander (man beachte die hohe Standardabweichung des 72 Stundenwertes (Abb. 11)), sollten diese Ergebnisse jedoch durch weiterführende Versuche untermauert werden.



**Abb. 11: ELISA-Analyse der NF-κB-Aktivität in C2C12-Zellen**

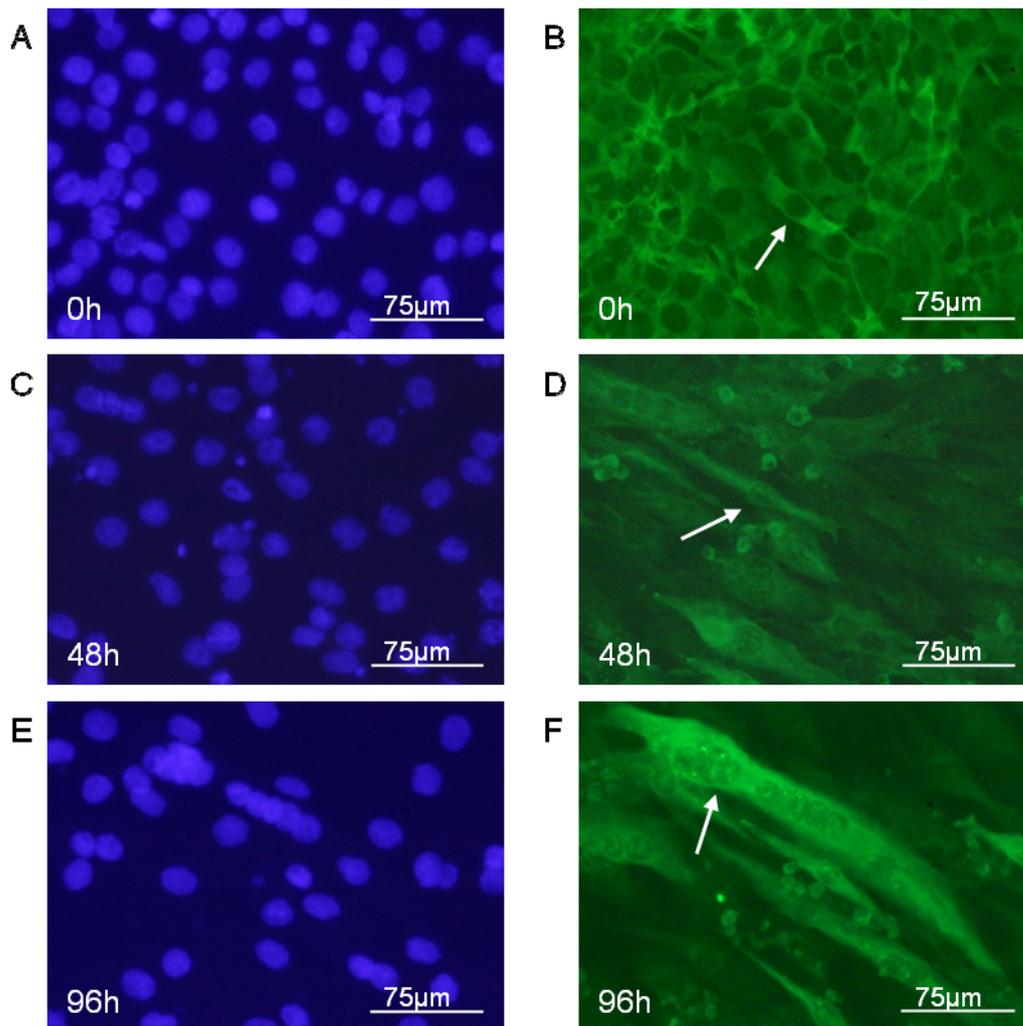
Es wurden nukleäre Proteinproben aus proliferierenden (0 Stunden) bzw. differenzierenden (nach 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden) C2C12-Zellen gewonnen. Nach 0, 48 und 72 Stunden wurden zusätzliche Proben aus einem unabhängigen Versuch gewonnen. Die Proben wurden mittels ELISA-Verfahren analysiert und die Absorption bei 450nm bestimmt.

### Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des NF-κB im Differenzierungsverlauf

NF-κB ist im inaktiven Zustand fast ausschließlich im Zytoplasma der Zellen lokalisiert. Nach seiner Aktivierung steigt seine Konzentration im Zellkern drastisch an (Hayden und Gosh, 2008). Somit können aus der intrazellulären Lokalisation des NF-κB Rückschlüsse auf die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors gezogen werden.

Um die intrazelluläre Lokalisation des NF-κB zu bestimmen, wurden proliferierende und differenzierende C2C12-Zellen fixiert und immunzytochemisch untersucht. Hierfür wurde ein gegen die p65-Untereinheit des NF-κB gerichteter primärer Antikörper verwendet. In Abbildung 12 sind p65-Immunfluoreszenz-Fotografien zu unterschiedlichen Differenzierungszeitpunkten abgebildet. In proliferierenden Zellen (Abb. 12: B) war NF-κB ausschließlich im Zytoplasma nachweisbar, während 48 Stunden nach Differenzierungseinleitung (Abb. 12: D) die spezifische NF-κB-Färbung sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellkernen der Myozyten beobachtet werden konnte. Die Färbung der Zellkerne fiel hier jedoch geringer aus als die des Zytoplasmas. In Myotuben (Abb. 12: F) fiel das stark fluoreszierende Zytoplasma auf. Weiterhin war in den Zellkernen die NF-κB-spezifische Färbung zu beobachten, sie war aber von wesentlich geringerer Intensität.

Der Anstieg der NF-κB-spezifischen Fluoreszenz im Zellkern spricht dabei eher für eine NF-κB-Aktivierung nach Induktion der Differenzierung, steht also im Einklang mit den ELISA-Ergebnissen und ist widersprüchlich zu den IκB-α-Western Blot-Analysen.



**Abb. 12: NF- $\kappa$ B-Immunfluoreszenz von C2C12-Zellen**

Es wurden proliferierende (0 Stunden) und differenzierende C2C12-Zellen (48 und 96 Stunden nach Differenzierungseinleitung) fixiert. Diese wurden mit einem primären, gegen die p65-Unterheit des NF- $\kappa$ B gerichteten Antikörper inkubiert. Durch einen zweiten, mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelten Antikörper, konnte die Lokalisation des NF- $\kappa$ B sichtbar gemacht werden. Auf der linken Seite sind zur Orientierung die durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI sichtbar gemachten Zellkerne abgebildet. Auf der rechten Seite sind die entsprechenden Immunfluoreszenzfärbungen zu sehen. Die Pfeile zeigen auf die für den entsprechenden Differenzierungsgrad typischen Zellformen.

Man beachte die unterschiedliche Färbung der Zellkerne im Differenzierungsverlauf, sowie die starke Färbung des Zytoplasmas der Myotuben.

#### 4.2.1.1.3 Expression des *traf6*-Gens in C2C12-Zellen

Um die Expression des *traf6*-Gens auf Proteinebene zu untersuchen, wurden zytosolische Proteinlysate aus drei voneinander unabhängigen Versuchen gewonnen und mittels *Western Blot*-Verfahren analysiert. In allen drei Versuchen gab es Schwankungen der TRAF6-Konzentrationen im Differenzierungsverlauf, es zeichnete sich aber keine klare Tendenz ab (Daten nicht gezeigt).

### **4.2.1.2 Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität**

Um den Einfluss einer Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf den Differenzierungsprozess und die *traf6*-Expression zu untersuchen, wurden C2C12-Zellen mit zwei unterschiedlich wirkenden NF- $\kappa$ B-Inhibitoren behandelt. Zum einen erfolgte eine Behandlung mit der hauptaktiven Komponente der Gelbwurzel, dem Curcumin, zum anderen mit dem synthetisch hergestellten Proteasominhibitor Lactacystin.

#### **4.2.1.2.1 Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin**

Curcumin inhibiert den NF- $\kappa$ B-Signalweg durch die Hemmung der IKK. Curcumin hemmt aber auch andere Signalwege wie z.B. den Akt-, den JNK- und den MAPK-Signalweg (Aggarwal *et al.*, 2006; Aggarwal und Shishodia, 2006).

Vor Differenzierungseinleitung wurden die C2C12-Zellen für eine Stunde mit einer Curcumin-Lösung behandelt. Diese Lösung bestand aus in DMSO gelöstem Curcumin. Da DMSO das Differenzierungsverhalten der Zellen beeinflussen kann (Orzechowski *et al.*, 2001), wurde parallel eine Kontrollbehandlung der Zellen mit DMSO durchgeführt.

Um die Wirksamkeit der Curcumin-Behandlung zu überprüfen, wurde zunächst die NF- $\kappa$ B-Aktivität analysiert. Daran anschließend wurden die Auswirkungen des Curcumins auf den Differenzierungsprozess und die *traf6*-Expression überprüft.

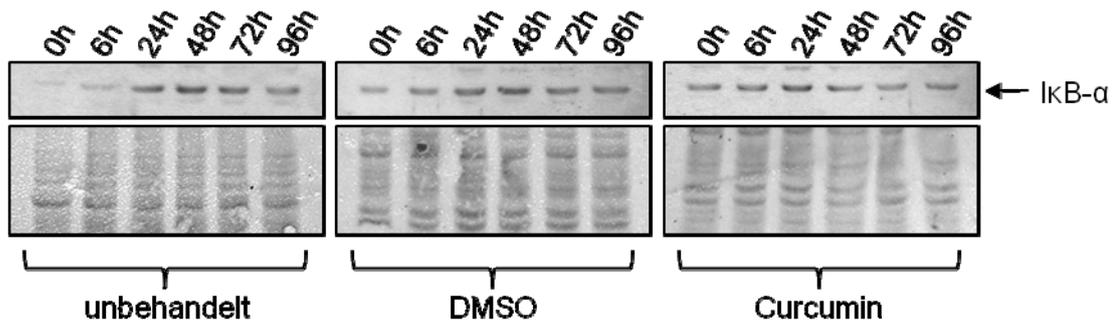
##### *4.2.1.2.1.1 NF- $\kappa$ B-Aktivität in mit Curcumin behandelten C2C12-Zellen*

###### Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration im Differenzierungsverlauf

Zur Überprüfung der erfolgreichen Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität anhand der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration wurden zunächst zytosolische Proteinproben gewonnen. Daran anschließend erfolgte die Analyse der Proben mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahren.

Wie in Abbildung 13 gezeigt, stieg die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Proteinkonzentration bei unbehandelten und bei mit DMSO behandelten Zellen im Differenzierungsverlauf an. Im Gegensatz dazu war bei mit Curcumin behandelten C2C12-Zellen die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Proteinkonzentration schon direkt nach der Behandlung, also in proliferierenden Zellen, im Vergleich zu den Kontrollen erhöht (Abb. 13). Bis 24 Stunden nach Differenzierungseinleitung konnte hier ein weiterer Anstieg beobachtet werden. Anschließend sank die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration wieder leicht ab.

Daraus lässt sich schließen, dass durch die Curcumin-Behandlung eine wirksame Blockierung des NF- $\kappa$ B – zumindest in proliferierenden Zellen und während der ersten 24 Stunden nach Induktion der Differenzierung – erreicht worden war.



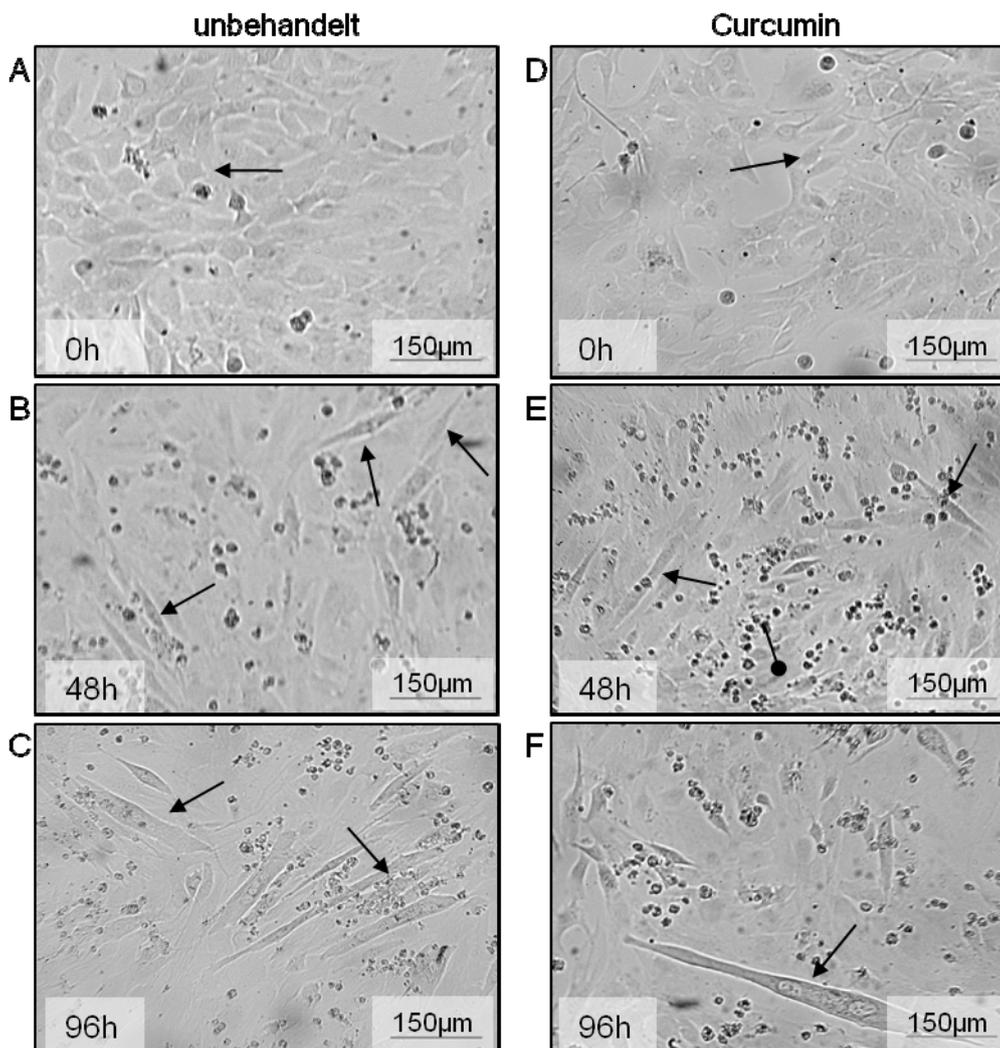
**Abb. 13: Western Blot-Analyse der IκB-α-Konzentration in unbehandelten, in DMSO-behandelten und in Curcumin-behandelten C2C12-Zellen**

Es wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten zytosolische Proteinproben aus unbehandelten, aus mit DMSO behandelten und aus mit Curcumin behandelten C2C12-Zellen gewonnen und mittels *Western Blot*-Verfahren untersucht. Pro Spur wurden 40μg Protein aufgetragen. Nach Inkubation mit einem IκB-α-Antikörper konnte die für IκB-α spezifische Bande bei 37kDa detektiert werden (jeweils oben). Die gleichmäßige Beladung der Spuren wurde jeweils durch eine Ponceau S-Färbung überprüft (jeweils unten).

#### 4.2.1.2.1.2 Differenzierungsprozess in mit Curcumin behandelten C2C12-Zellen

##### Lichtmikroskopische Untersuchung

Wie in Abbildung 14 zu sehen, verursachte die Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Curcumin keine lichtmikroskopisch erkennbaren morphologischen Veränderungen der Zellen im Differenzierungsverlauf. Lediglich 48 Stunden nach Differenzierungseinleitung konnten bei mit Curcumin behandelten Zellen vermehrt Zellen mit apoptotischer oder nekrotischer Morphologie (Abb. 14: E, Stecknadel) beobachtet werden. Der Differenzierungsstatus der verbleibenden Zellen entsprach aber dem der unbehandelten Zellen: Sowohl bei mit Curcumin behandelten als auch bei unbehandelten bzw. DMSO-behandelten Kulturen konnten 48 Stunden nach Differenzierungsinduktion spindelförmige Myozyten beobachtet werden (Abb. 14: B, Pfeile; E, Pfeile). Weiterhin waren 96 Stunden nach Differenzierungseinleitung bei unbehandelten C2C12-Zellen (Abb. 14: C, Pfeile) und bei Curcumin-behandelten Zellen (Abb. 14: F, Pfeil) mehrkernige Myotuben sichtbar.



**Abb. 14: Lichtmikroskopische Aufnahmen unbehandelter und Curcumin-behandelter C2C12-Zellen**

Auf der linken Seite sind unbehandelte und auf der rechten Seite mit Curcumin behandelte C2C12-Zellen abgebildet. Die Bilder zeigen jeweils proliferierende (A bzw. D) und differenzierende (B und C bzw. E und F) Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Einleitung der Differenzierung. Die Pfeile zeigen auf die für den entsprechenden Differenzierungsgrad typischen Zellformen. Die Stecknadel weist auf apoptotische bzw. nekrotische Zellen hin.

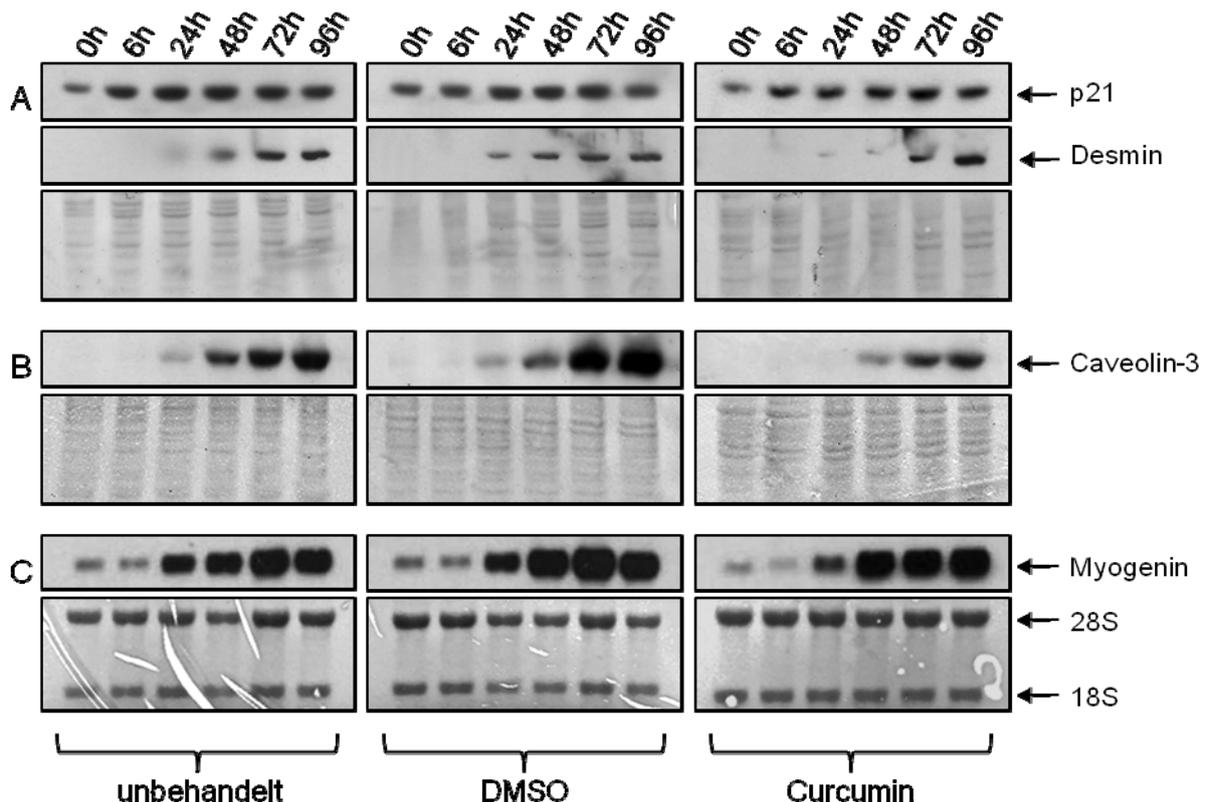
#### Analyse der Differenzierungsmarker Caveolin-3, Desmin, p21 und Myogenin

Aus unbehandelten, aus mit DMSO behandelten und aus mit Curcumin behandelten C2C12-Zellen wurden Protein- und RNA-Proben gewonnen und mit Hilfe des *Western Blot*- bzw. *Northern Blot*-Verfahrens auf die Expression von myogenen Differenzierungsmarkern hin untersucht. Spezifisch wurde die Expression der Marker *caveolin-3*, *desmin* und *p21* auf Protein-, die des *myogenins* auf mRNA-Ebene analysiert.

Wie in Abbildung 15 gezeigt, ergaben sich dabei zwischen den unbehandelten Zellen und den mit DMSO behandelten Zellen keine gravierenden Unterschiede, was zeigt, dass die von uns verwendete DMSO-Konzentration den Differenzierungsprozess nicht beeinflusste. Die

detektierten Veränderungen, welche bei den mit der Curcumin-DMSO-Lösung behandelten C2C12-Zellen beobachtet wurden, waren folglich allein auf die Curcumin-Wirkung zuzuführen. Weiterhin unterschieden sich die *p21*- und *myogenin*-Expressionsmuster der mit Curcumin behandelten Zellen nur wenig von denen der Kontrollzellen (Abb. 15: A und C), lediglich die *myogenin*-Induktion war eventuell leicht verzögert.

Der Anstieg der Desmin- und Caveolin-3-Proteinkonzentration erfolgte im Differenzierungsverlauf bei mit Curcumin behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen dagegen deutlich verzögert, eventuell auch generell abgeschwächt (Abb. 15: A und B).



**Abb. 15: Untersuchung der Differenzierungsmarker p21, Desmin, Caveolin-3 und Myogenin in unbehandelten, in DMSO-behandelten und in Curcumin-behandelten C2C12-Zellen**

Nach 0, 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden Protein- und RNA-Proben aus proliferierenden bzw. differenzierenden C2C12-Zellen gewonnen. Diese wurden per *Western Blot*- bzw. *Northern Blot*-Verfahren analysiert. Die Autoradiogramme in der linken Spalte zeigen Lysate aus unbehandelten Zellen. In der Mitte sind die Autoradiogramme der mit DMSO behandelten Zellen und rechts die der mit Curcumin behandelten Zellen zu sehen.

A und B: *Western Blot*-Analysen, bei denen 10µg zytosolisches Protein pro Spur aufgetragen wurden. Es konnten die spezifischen Banden für p21 bei 21kDa (A: jeweils oben), Desmin bei 54kDa (A: jeweils Mitte) und Caveolin-3 bei 25kDa (B: jeweils oben) detektiert werden. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Spuren wurden Ponceau S-Färbungen durchgeführt (A und B: jeweils unten).

C: Northern Blot-Analyse der *myogenin*-Expression. Pro Spur wurden 0,5µg RNA aufgetragen und mit einer Myogenin-Sonde hybridisiert. Oben sichtbar sind die Myogenin-Gentranskripte (1,9kB). Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Spuren wurde eine Methylenblaufärbung durchgeführt (jeweils unten).

Man beachte, dass die *desmin*- und *caveolin-3*-Expression im Differenzierungsverlauf bei mit Curcumin behandelten Zellen verzögert einsetzte.

### 4.2.1.2.1.3 *traf6*-Expression in mit Curcumin behandelten C2C12-Zellen

Da es aus früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe Hinweise darauf gab, dass ein Zusammenhang zwischen der NF-κB-Aktivität und der *traf6*-Expression bestehen könnte (Mueck *et al.*, 2011) – also dass das *traf6*-Gen der Regulation durch NF-κB unterliegt – wurde die *traf6*-Expression nach Hemmung der NF-κB-Aktivität durch die NF-κB-Inhibitoren Lactacystin und Curcumin untersucht.

Für die Analyse der *traf6*-Expression in mit Curcumin behandelten Zellen wurden zytosolische Proteinlysate geerntet und mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens untersucht. In unseren Händen waren dabei sowohl bei unbehandelten C2C12-Zellen als auch bei DMSO- oder Curcumin-behandelten Myoblasten zwischen einzelnen Experimenten große Schwankungen der *traf6*-Expression auf Proteinebene zu beobachten (siehe 4.2.1.1.3). Daher war es hier nicht möglich, eine Aussage zum Einfluss von Curcumin auf die *traf6*-Expression zu machen.

### 4.2.1.2.2 Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Lactacystin

Lactacystin ist ein Proteasominhibitor, der durch die Hemmung des Proteasoms den Abbau von IκB-α und somit die Aktivierung des NF-κB verhindert (Shirley *et al.*, 2005).

Im Rahmen der nachfolgend beschriebenen Versuche wurden C2C12-Zellen zunächst für eine Stunde mit einer Lactacystin-Lösung behandelt. Anschließend wurde die Differenzierung eingeleitet. Da Lactacystin in DMSO gelöst vorlag, wurde wie bei der Behandlung mit Curcumin eine Kontrollbehandlung der Zellen mit der entsprechenden Menge DMSO durchgeführt. Wie im vorangehenden Abschnitt für Curcumin beschrieben, wurde die Wirksamkeit des Lactacystins anhand der NF-κB-Aktivität überprüft. Die Auswirkungen des Lactacystins auf den Differenzierungsprozess wurden lichtmikroskopisch und anhand der Expression verschiedener Differenzierungsmarker analysiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung des Lactacystin-Einflusses auf die *traf6*-Expression.

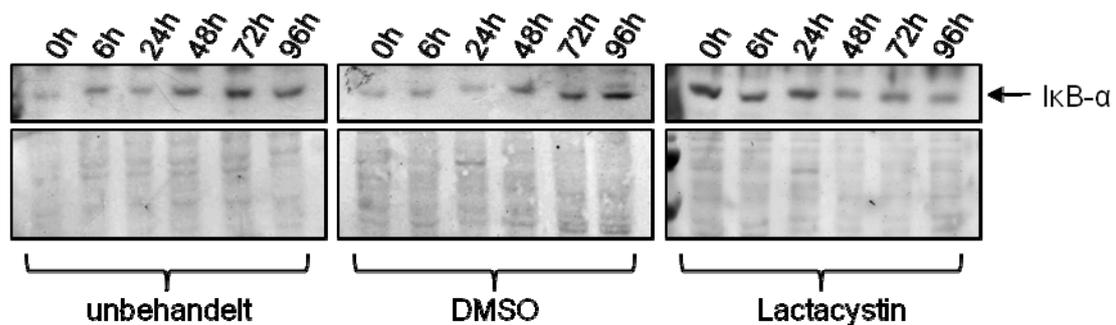
#### 4.2.1.2.2.1 NF-κB-Aktivität in mit Lactacystin behandelten C2C12-Zellen

##### Untersuchung der IκB-α-Konzentration im Differenzierungsverlauf

Wie für Curcumin beschrieben, wurden zur Untersuchung der IκB-α-Konzentration zytosolische Proteinproben gewonnen und diese mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens analysiert.

In Abbildung 16 ist zu sehen, dass die IκB-α-Konzentrationen bei den unbehandelten und bei den mit DMSO behandelten C2C12-Zellen im Differenzierungsverlauf anstiegen, was eine abnehmende NF-κB-Aktivität reflektiert.

Bei den Lactacystin-behandelten Zellen war dagegen bereits direkt nach der Behandlung die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration erhöht und sank erst zu späteren Zeitpunkten wieder ab. Dies zeigt, dass eine Blockierung der NF- $\kappa$ B-Aktivität – zumindest in proliferierenden Zellen und während der ersten 24-48 Stunden nach Induktion der Differenzierung – in der Tat erfolgte und die Behandlung somit wirksam war (Abb. 16).



**Abb. 16: Western Blot-Analyse der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration in unbehandelten, in DMSO-behandelten und in Lactacystin-behandelten C2C12-Zellen**

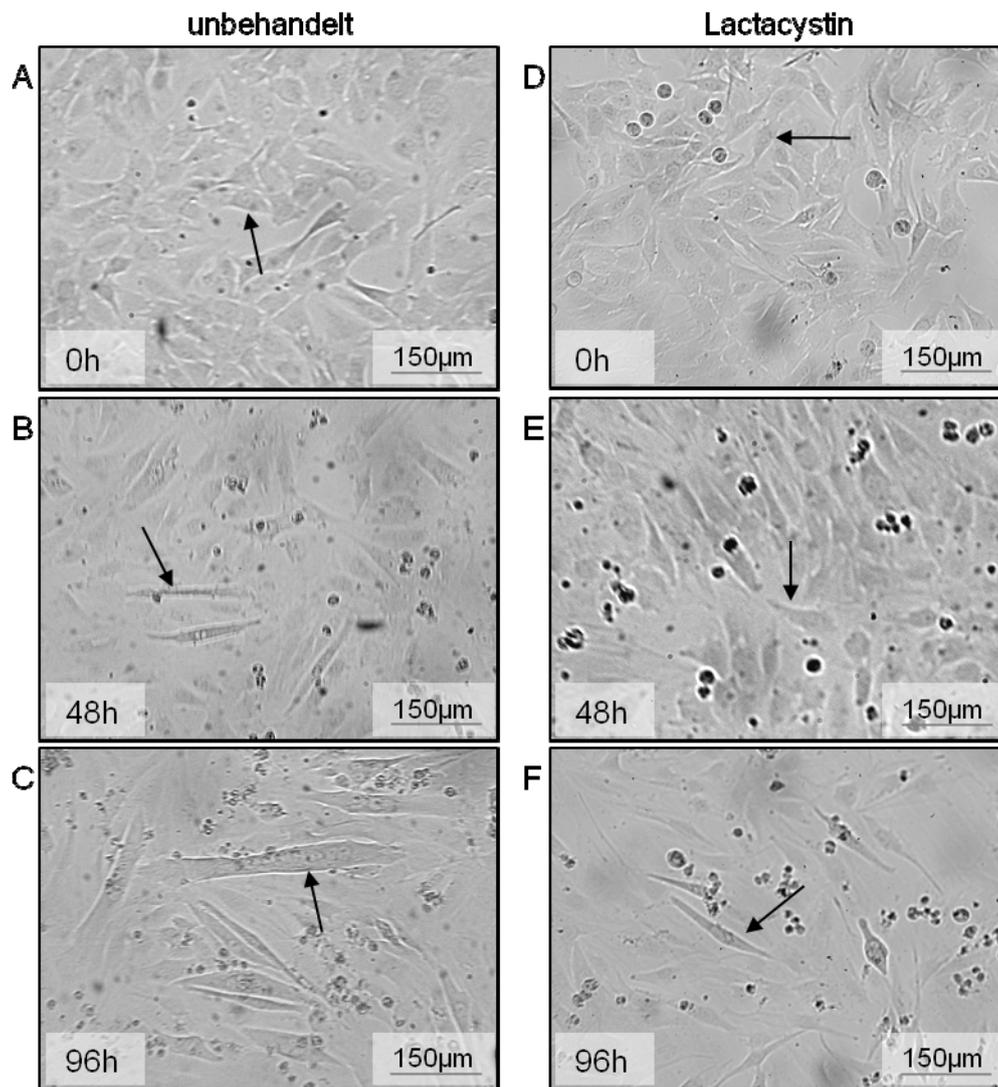
Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden zytosolische Proteinproben aus unbehandelten, aus mit DMSO behandelten und aus mit Lactacystin behandelten C2C12-Zellen gewonnen. Die Analyse der Proben erfolgte mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens. Pro Spur wurden 40 $\mu$ g Protein aufgetragen. Nach Inkubation mit einem I $\kappa$ B- $\alpha$ -Antikörper konnte die für I $\kappa$ B- $\alpha$  spezifische Bande bei 37kDa detektiert werden (jeweils oben). Die gleichmäßige Beladung der Spuren wurde jeweils durch eine Ponceau S-Färbung überprüft (jeweils unten).

Man beachte die hohe I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration bei den mit Lactacystin behandelten C2C12-Zellen zu Versuchsbeginn, also unmittelbar nach der Lactacystin-Behandlung.

#### 4.2.1.2.2 Differenzierungsprozess der mit Lactacystin behandelten C2C12-Zellen

##### Lichtmikroskopische Untersuchung

Nach der Behandlung mit Lactacystin ließ sich lichtmikroskopisch ein verzögerter Differenzierungsablauf der C2C12-Zellen beobachten (Abb. 17). So waren 48 Stunden nach Differenzierungseinleitung bei mit Lactacystin behandelten Zellen noch keine Myozyten, sondern ausschließlich Zellen mit myoblastentypischer Morphologie sichtbar (Abb. 17: E, Pfeil). Zu diesem Zeitpunkt waren bei unbehandelten Zellen bereits Myozyten zu erkennen (Abb. 17: B, Pfeil). Weitere 48 Stunden später konnten dann zwar auch bei mit Lactacystin behandelten Zellen Myozyten beobachtet werden (Abb. 17: F, Pfeil), bei den unbehandelten C2C12-Zellen dominierten jedoch zu diesem Zeitpunkt bereits Myotuben das Bild (Abb. 17: C, Pfeil).



**Abb. 17: Lichtmikroskopische Aufnahmen unbehandelte und mit Lactacystin behandelte C2C12-Zellen**

In der linken Spalte sind unbehandelte und in der rechten Spalte mit Lactacystin behandelte C2C12-Zellen abgebildet. Die Bilder zeigen jeweils proliferierende (A bzw. D) und differenzierende Zellen (B und C bzw. E und F) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Einleitung der Differenzierung. Die Pfeile weisen auf die Zellformen hin, die zu dem Zeitpunkt für den entsprechenden Differenzierungsgrad charakteristisch waren.

Man beachte, dass bei mit Lactacystin behandelten C2C12-Zellen 96 Stunden nach Differenzierungseinleitung lediglich spindelförmige Myozyten, aber keine mehrkernigen Myotuben sichtbar waren.

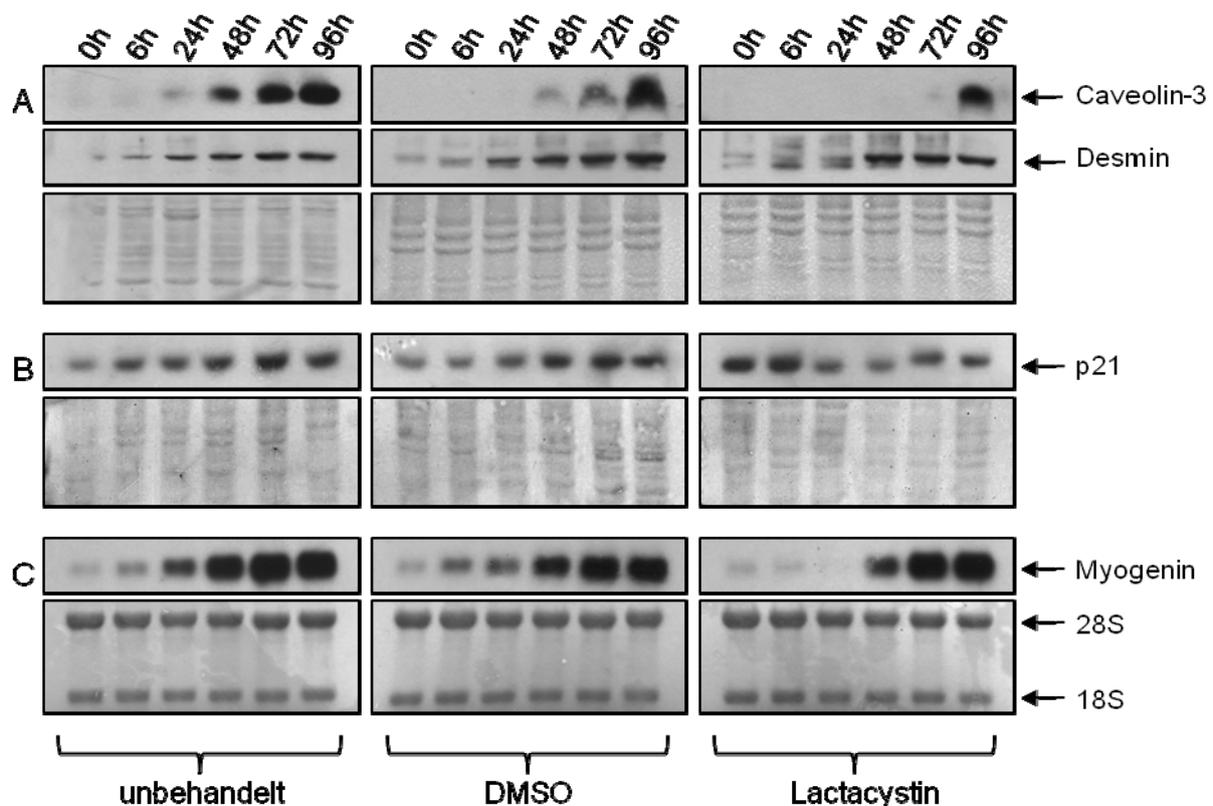
#### Analyse der Differenzierungsmarker Caveolin-3, Desmin, p21 und Myogenin

Aus unbehandelten, aus mit DMSO behandelten und aus mit Lactacystin behandelten C2C12-Zellen wurden Protein- und RNA-Proben gewonnen und mit Hilfe des *Western Blot*- bzw. *Northern Blot*-Verfahrens untersucht.

Die Behandlung der C2C12-Zellen mit Lactacystin führte dabei zu einer Veränderung der Expressionsmuster von *caveolin-3*, *p21* und *myogenin*.

Spezifisch war zu beobachten, dass die Induktion der *caveolin-3*-Expression bei mit Lactacystin behandelten Zellen erst 48 Stunden später als bei den Kontrollzellen detektiert werden konnte (Abb. 18: A). Dagegen war die *p21*-Expression der mit Lactacystin behandelten Zellen bereits nach der Lactacystin-Vorbehandlung, also vor Differenzierungseinleitung, im Vergleich zu den Kontrollen erhöht (Abb. 18: B). 24 Stunden später erfolgte ein Abfall der *p21*-Proteinkonzentration. Die *myogenin*-Induktion in den mit Lactacystin behandelten Zellen war wie die *caveolin-3*-Induktion im Vergleich zu den Kontrollen verzögert (Abb. 18: C, 3. Spalte).

Interessanterweise zeigten sich jedoch im Differenzierungsverlauf keine Unterschiede zwischen den Desmin-Proteinkonzentrationen Lactacystin-behandelter Zellen und denen der Kontrollzellen (Abb. 18: A).



**Abb. 18: Untersuchung der Differenzierungsmarker Caveolin-3, Desmin, p21 und Myogenin in unbehandelten, in DMSO-behandelten und in Lactacystin-behandelten C2C12-Zellen**

Es wurden Protein- und RNA-Proben aus proliferierenden bzw. differenzierenden C2C12-Zellen gewonnen. Diese wurden per *Western Blot*- bzw. *Northern Blot*-Verfahren analysiert. Die Autoradiogramme in der linken Spalte zeigen Lysate aus unbehandelten Zellen. In der Mitte sind DMSO-behandelte Zellen und rechts Lactacystin-behandelte Zellen zu sehen.

A und B: *Western Blot*-Analysen, bei denen 10µg zytosolisches Protein pro Spur aufgetragen wurden. Es konnten die spezifischen Banden für Caveolin-3 bei 25kDa (A: jeweils oben), Desmin bei 54kDa (A: jeweils Mitte) und p21 bei 21kDa (B: jeweils oben)

detektiert werden. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Spuren wurden Ponceau S-Färbungen durchgeführt (A und B: jeweils unten).

C: Northern Blot-Analyse der *myogenin*-Expression. Pro Spur wurden 0,5µg RNA aufgetragen und mit einer Myogenin-Sonde hybridisiert. Oben sichtbar sind die Myogenin-Gentranskripte (1,9kB). Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Spuren wurde eine Methylenblaufärbung durchgeführt (jeweils unten).

Man beachte das verzögerte Einsetzen der *caveolin-3*- und *myogenin*-Expression in den mit Lactacystin behandelten Zellen. Weiterhin auffällig war die hohe *p21*-Basalexpression der mit Lactacystin behandelten Zellen.

#### 4.2.1.2.2.3 *traf6*-Expression in mit Lactacystin behandelten C2C12-Zellen

Wie für Curcumin beschrieben, wurde auch die *traf6*-Expression untersucht. Die Behandlung mit Lactacystin verursachte ebenfalls keine Veränderungen, die nicht im Bereich der Schwankungen des *traf6*-Expressionsmusters von unbehandelten C2C12-Zellen lagen (Daten nicht gezeigt).

### 4.2.2 Untersuchung der Rhabdomyosarkomzelllinie RD/18

Die Untersuchung der Rhabdomyosarkomzelllinie RD/18 erfolgte nach dem gleichen Schema wie die Untersuchung der C2C12-Zelllinie.

Zur Einleitung der Differenzierung wurden die RD/18-Zellen bis zu einer Konfluenz von 80-90% in serumreichem Proliferationsmedium kultiviert und dann das Proliferationsmedium durch serumarmes Differenzierungsmedium ersetzt. Die zu analysierenden Proben wurden von Zellen in Proliferationsmedium (0 Stunden) und nach 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden in Differenzierungsmedium geerntet.

#### 4.2.2.1 *NF-κB*-Aktivität und *traf6*-Expression bei der Differenzierung

Wie bei der Untersuchung der C2C12-Zellen wurde zuerst der ordnungsgemäße Ablauf des Differenzierungsprozesses lichtmikroskopisch und anhand spezifischer Differenzierungsmarker untersucht. Daran anschließend erfolgten die Untersuchung der *NF-κB*-Aktivität und die Untersuchung des *traf6*-Expressionsmusters.

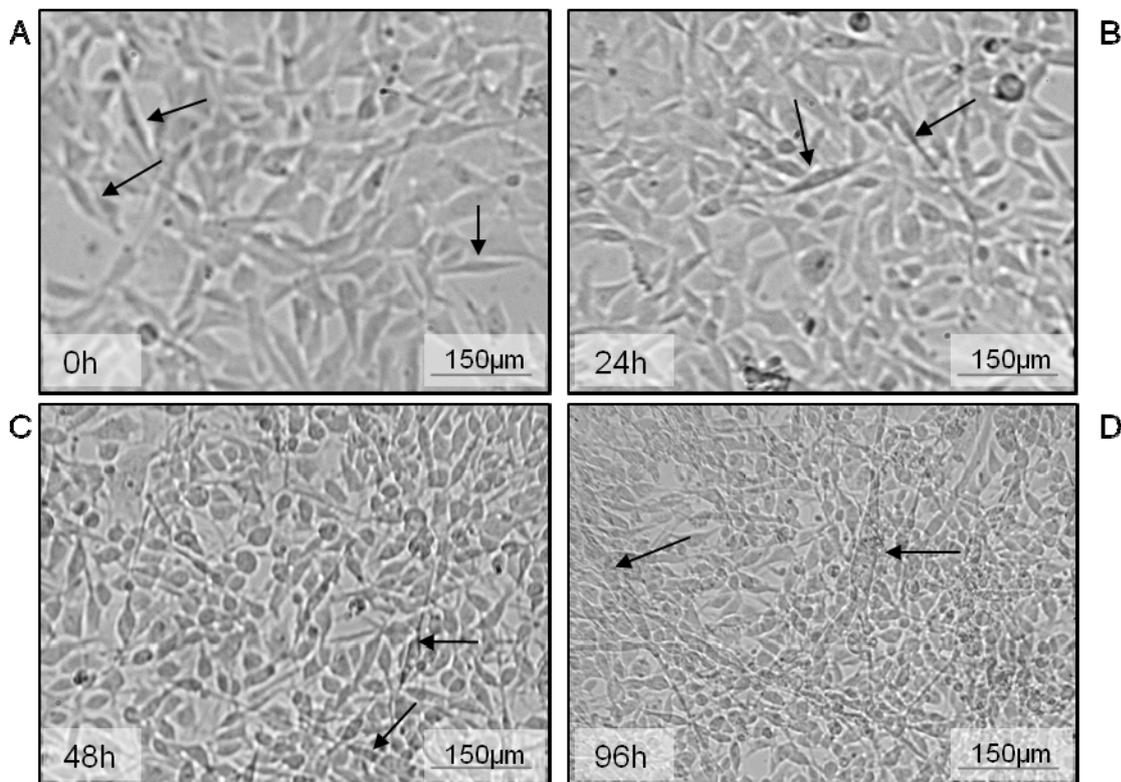
##### 4.2.2.1.1 Differenzierungsprozess der RD/18-Zellen

###### Lichtmikroskopische Untersuchung

Astolfi *et al.* (2001) konnten zeigen, dass die Zellen der embryonalen Rhabdomyosarkomzelllinie RD/18 im Differenzierungsverlauf fusionieren und mehrkernige, myotubenähnliche Strukturen bilden.

In unseren Händen wies die überwiegende Anzahl der RD/18-Zellen vor Differenzierungseinleitung eine längliche, aber dennoch uneinheitliche Gestalt auf (Abb. 19: A, Pfeile). 24 Stunden nach Induktion der Differenzierung konnten vereinzelte, weitere 24 Stunden später schon zahlreiche spindelförmige, teils mehrkernige Zellen mit langen Ausläufern beobachtet werden (Abb. 19: B und C, Pfeile). Schließlich wurden 96 Stunden nach Einleitung der Differenzierung die von Astolfi *et al.* (2001) beschriebenen multinukleären, myotubenähnlichen Strukturen sichtbar (Abb. 19: D, Pfeile).

Insgesamt ließ sich die morphologische Struktur der RD/18-Zellen im Differenzierungsverlauf erschwert fotografisch festhalten, da die Zellen nach Differenzierungseinleitung vermehrt übereinander wachsen (Lollini, persönliche Mitteilung).



**Abb. 19: Lichtmikroskopische Aufnahmen nativer RD/18-Zellen**

Die Bilder zeigen proliferierende (A) und differenzierende (B, C, D) RD/18-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Differenzierungseinleitung. Die Pfeile zeigen auf die für den entsprechenden Differenzierungsgrad typischen Zellformen.

#### Analyse der Differenzierungsmarker Desmin, p21 und Myogenin

Um die für RD/18-Zellen spezifischen Differenzierungsmarker zu untersuchen, wurden zytosolische Protein- und gesamtzelluläre RNA-Proben gewonnen und mit Hilfe des *Western Blot*- bzw. *Northern Blot*-Verfahrens analysiert.

Für diese Arbeit von Bedeutung war, dass das Intermediärfilament Desmin bei einem Großteil der Rhabdomyosarkome ein zuverlässiger Marker für die Rhabdomyoblasten-Differenzierung ist (Carter *et al.*, 1989). So konnten Astolfi *et al.* (2001), auch für RD/18-Zellen einen Anstieg der *desmin*-Expression innerhalb der ersten Tage nach Differenzierungseinleitung nachweisen. In unseren Händen konnte bei RD/18-Zellen ein Anstieg der Desmin-Proteinkonzentration 24 Stunden nach Differenzierungseinleitung beobachtet werden (Abb. 20: A).

Als weitere Marker für den Differenzierungserfolg wurden p21 und Myogenin verwendet.

Hier konnten Astolfi *et al.* (2001), zeigen, dass in RD/18-Zellen der myogene Transkriptionsfaktor Myogenin im Differenzierungsverlauf ansteigt. In unseren Versuchen war ab 24 Stunden nach Differenzierungsinduktion ein kontinuierlicher Anstieg der Myogenin-mRNA-Konzentration zu sehen (Abb. 20: C).

In Bezug auf p21 konnten frühere Versuche unserer Arbeitsgruppe bei RD/18-Zellen einen Anstieg der p21-mRNA-Konzentration im Differenzierungsverlauf nachweisen (Mueck *et al.*, 2011). Wie in Abbildung 20 (B) gezeigt, war auch bei den in dieser Arbeit analysierten RD/18-Zellen ein kontinuierlicher Anstieg der p21-Proteinkonzentration sichtbar.

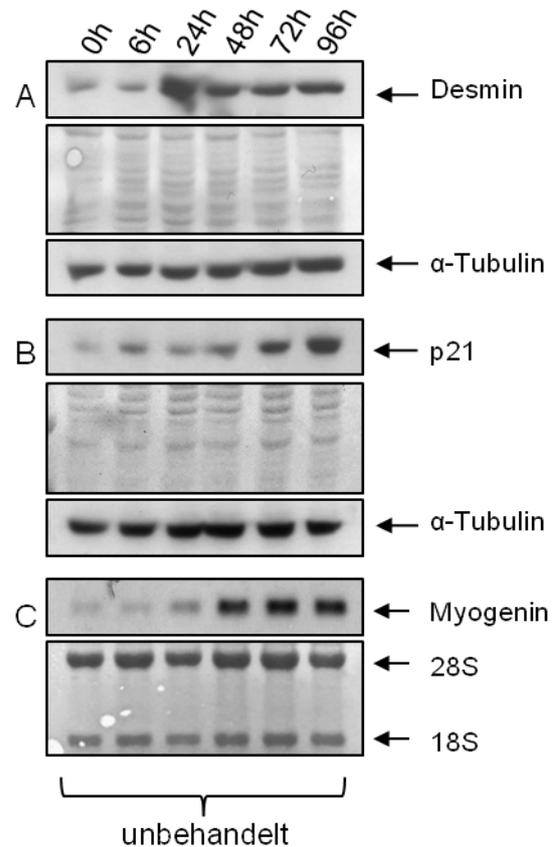
Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung und der Analyse der Differenzierungsmarker zeigten somit, dass der Differenzierungsprozess der RD/18-Zellen in unseren Händen ordnungsgemäß verlief, was die Grundvoraussetzung für die nachfolgend gezeigten deskriptiven und funktionellen Studien darstellte.

**Abb. 20: Untersuchung der Differenzierungsmarker Desmin, p21 und Myogenin in RD/18-Zellen**

Es wurden Protein- und RNA-Proben aus proliferierenden bzw. differenzierenden RD/18-Zellen mit Hilfe des *Western Blot*- bzw. *Northern Blot*-Verfahrens analysiert.

A und B: *Western Blot*-Analysen, bei denen je 10µg Protein aufgetragen wurden. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper konnte die für Desmin charakteristische Bande bei 54kDa (A: oben) und die für p21 charakteristische Bande bei 21kDa (B: oben) detektiert werden. Die Kontrolle der gleichmäßigen Spurbeladung erfolgte durch eine Ponceau S-Färbung (jeweils Mitte) und durch den Nachweis des *Housekeeping*-Proteins α-Tubulin (jeweils unten).

C: *Northern Blot*-Analyse der *myogenin*-Expression. Es wurden pro Spur 0,5µg RNA aufgetragen und mit einer Myogenin-Sonde hybridisiert. Oben zu sehen sind die Myogenin-Gentranskripte (1,9kB). Zur Kontrolle der einheitlichen Beladung der Spuren wurde eine Methylenblaufärbung durchgeführt (unten).



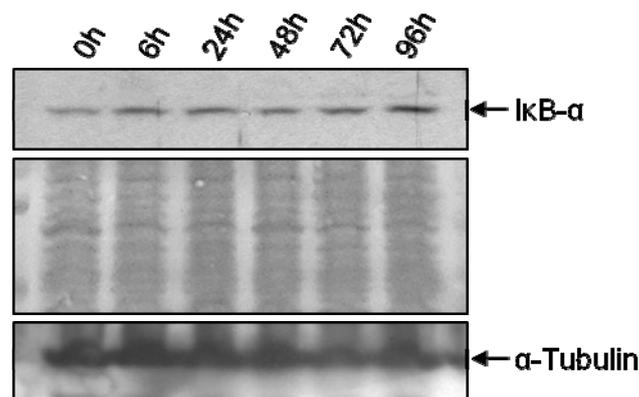
#### 4.2.2.1.2 NF- $\kappa$ B-Aktivität in RD/18-Zellen

Die Analyse der NF- $\kappa$ B-Aktivität in RD/18-Zellen erfolgte analog zur Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Aktivität in C2C12-Zellen, das heißt durch die Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration, durch die Analyse der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung und durch die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des NF- $\kappa$ B.

##### Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration im Differenzierungsverlauf

Aus drei voneinander unabhängigen Versuchen wurden zytosolische Proteinproben gewonnen und unter Verwendung des *Western Blot*-Verfahrens untersucht.

Abbildung 21 zeigt ein für diese Versuche repräsentatives Ergebnis. Es konnte ein minimaler Anstieg der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration im Differenzierungsverlauf beobachtet werden, der jedoch wesentlich geringer ausfiel als der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentrationsanstieg bei den C2C12-Zellen (siehe 4.2.1.1.2).



**Abb. 21: *Western Blot*-Analyse der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration in RD/18-Zellen**

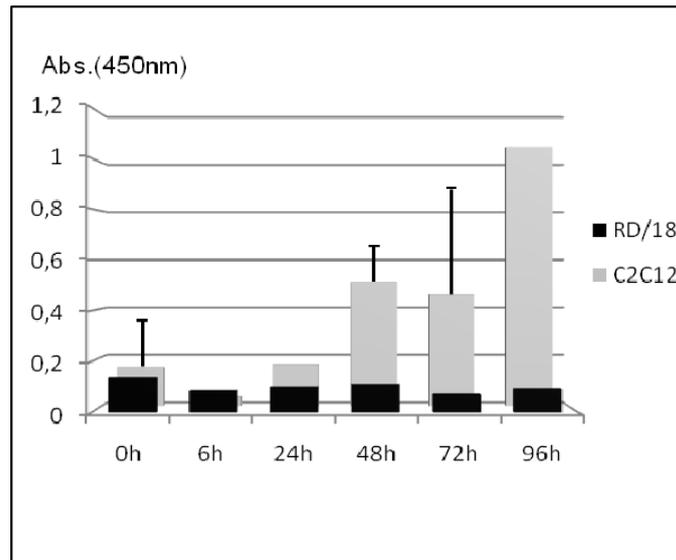
Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden zytosolische Proteinproben aus proliferierenden bzw. differenzierenden RD/18-Zellen gewonnen.

Es wurden pro Spur 40 $\mu$ g Protein aufgetragen. Durch Inkubation mit einem I $\kappa$ B- $\alpha$ -Antikörper konnte eine für I $\kappa$ B- $\alpha$  spezifische Bande bei 37kDa detektiert werden (oben). Zur Kontrolle der einheitlichen Beladung der Spuren wurde eine Ponceau S-Färbung durchgeführt (Mitte) und das *Housekeeping*-Protein  $\alpha$ -Tubulin (unten) nachgewiesen.

##### Untersuchung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung im Differenzierungsverlauf

Hierfür wurden nukleäre Proteinproben gewonnen und mit dem bereits für C2C12-Zellen beschriebenen ELISA-Verfahren untersucht (siehe 4.2.1.1.2).

Wie in Abbildung 22 gezeigt, schwankte die NF- $\kappa$ B-Aktivität der RD/18-Zellen im Differenzierungsverlauf nur geringfügig im Bereich der Basalaktivität. Eine kontinuierliche Aktivitätszunahme oder -abnahme war im Verlauf der Differenzierung nicht zu beobachten.



**Abb. 22: ELISA-Analyse der NF-κB-Aktivität in RD/18-Zellen**

Es wurden nukleäre Proteinproben aus proliferierenden (0 Stunden) und differenzierenden (nach 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden) RD/18-Zellen gewonnen. Die Analyse der Proben erfolgte mit Hilfe des ELISA-Verfahrens. Die Absorption wurde bei 450nm gemessen. Im Hintergrund ist zum Vergleich die ELISA-Analyse der NF-κB-Aktivität der C2C12-Zellen zu sehen.

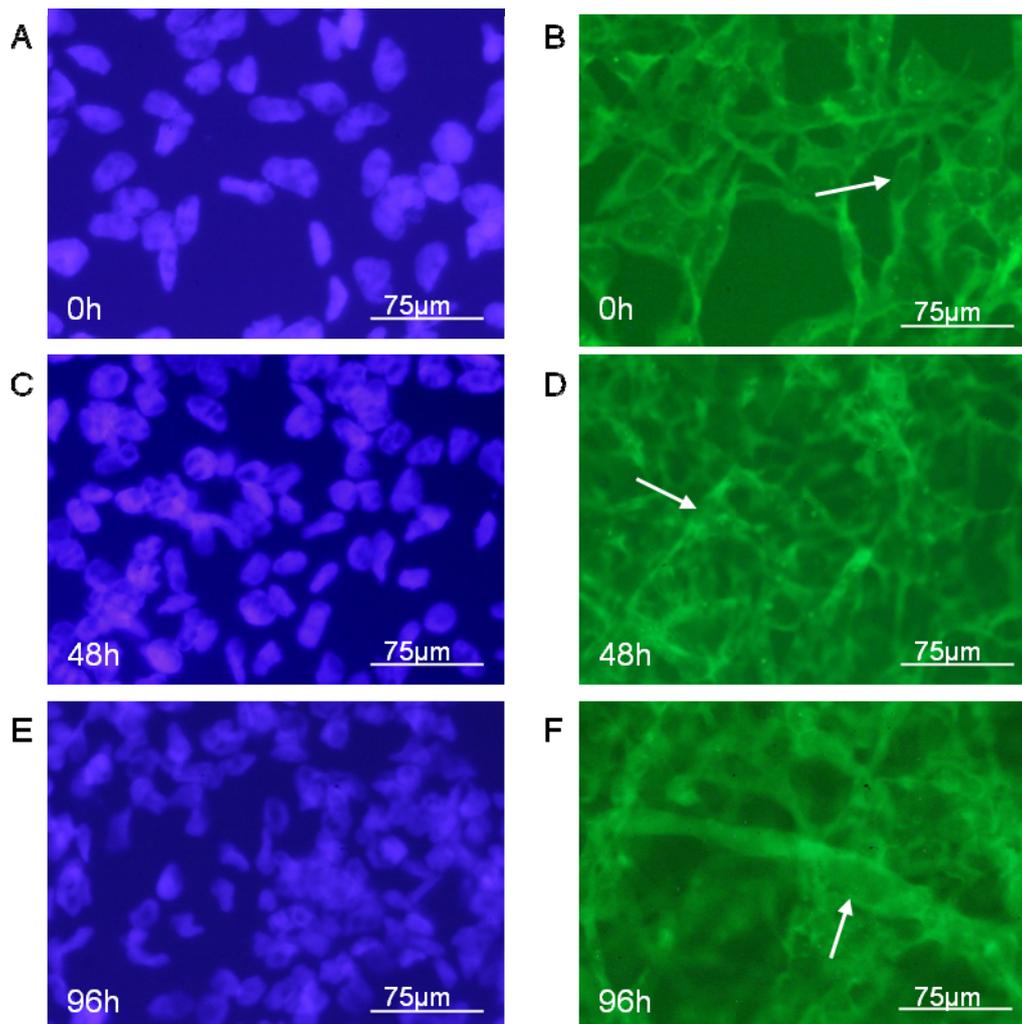
#### Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des NF-κB im Differenzierungsverlauf

Die Bestimmung der intrazellulären Lokalisation des NF-κB wurde wie für C2C12-Zellen beschrieben durchgeführt (siehe 4.2.1.1.2).

Vor Beginn der Differenzierung (Abb. 23: B) und 48 Stunden nach Differenzierungsinduktion (Abb. 23: D) war das Zytoplasma der Zellen stark, aber die Zellkerne nur sehr gering angefärbt. Auch 96 Stunden nach Differenzierungseinleitung (Abb. 23: F) konnte keine stärkere Kernfärbung beobachtet werden. Die Färbung des Zytoplasmas fiel jedoch etwas geringer aus.

Die annähernd gleichbleibende NF-κB-spezifische Fluoreszenz im Zellkern stimmt mit den Ergebnissen der ELISA-Analyse überein. Beide Ergebnisse sprechen für eine annähernd gleichbleibende NF-κB-Aktivität im Differenzierungsverlauf der RD/18-Zellen.

Wie bei der Untersuchung der NF-κB-Aktivität der C2C12-Zellen stimmten die Ergebnisse der ELISA- und Immunfluoreszenz-Analysen nicht völlig mit den *Western Blot*-Analysen der IκB-α-Konzentration überein. Die *Western Blot*-Analysen der IκB-α-Konzentration zeigten in RD/18-Zellen jedoch nur einen minimalen Abfall der NF-κB-Aktivität im Differenzierungsverlauf.



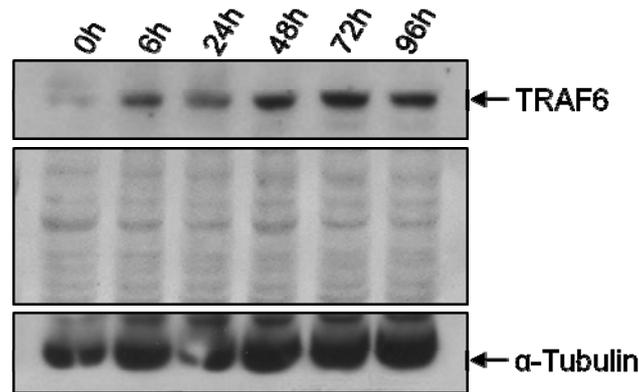
**Abb. 23: NF- $\kappa$ B-Immunfluoreszenz von RD/18-Zellen**

Es wurden proliferierende (0 Stunden) und differenzierende (48 und 96 Stunden nach Differenzierungseinleitung) RD/18-Zellen fixiert. Nach der Inkubation mit einem primären, gegen die p65-Untereinheit des NF- $\kappa$ B gerichteten Antikörper, konnte durch einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper die Lokalisation des NF- $\kappa$ B sichtbar gemacht werden. Auf der linken Seite sind zur Orientierung die durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI sichtbar gemachten Zellkerne abgebildet. Auf der rechten Seite sind die entsprechenden Immunfluoreszenzen zu sehen. Die Pfeile zeigen auf die für den entsprechenden Differenzierungsgrad typischen Zellformen.

#### 4.2.2.1.3 Expression des *traf6*-Gens in RD/18-Zellen

Zur Untersuchung der *traf6*-Expression auf Proteinebene wurden zytosolische Proteinlysate aus zwei unabhängigen Versuchen mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens untersucht. Die *traf6*-Expression zeigte in beiden Versuchen einen Anstieg. Einer dieser Versuche ist in Abbildung 24 dargestellt.

Insgesamt konnte mit diesen Versuchen nachgewiesen werden, dass während der Differenzierung der RD/18-Zellen ein Anstieg der TRAF6-Proteinkonzentration stattfand.



**Abb. 24: Western Blot-Analyse der *traf6*-Expression**

Proteinproben aus proliferierenden bzw. differenzierenden RD/18-Zellen wurden per *Western Blot*-Verfahren untersucht. Es wurden pro Spur 20µg Protein aufgetragen. Mit Hilfe eines TRAF6-Antikörpers konnte eine für TRAF6 spezifische Bande bei 58kDa detektiert werden (oben). Die gleichmäßige Beladung der Spuren wurde durch eine Ponceau S-Färbung (Mitte) und anhand des *Housekeeping*-Proteins  $\alpha$ -Tubulin (unten) überprüft.

#### 4.2.2.2 Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität

Wie bei der Untersuchung der C2C12-Zellen wurde der Einfluss der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf den Differenzierungsprozess mit Hilfe der NF- $\kappa$ B-Inhibitoren Curcumin und Lactacystin untersucht.

##### 4.2.2.2.1 Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin

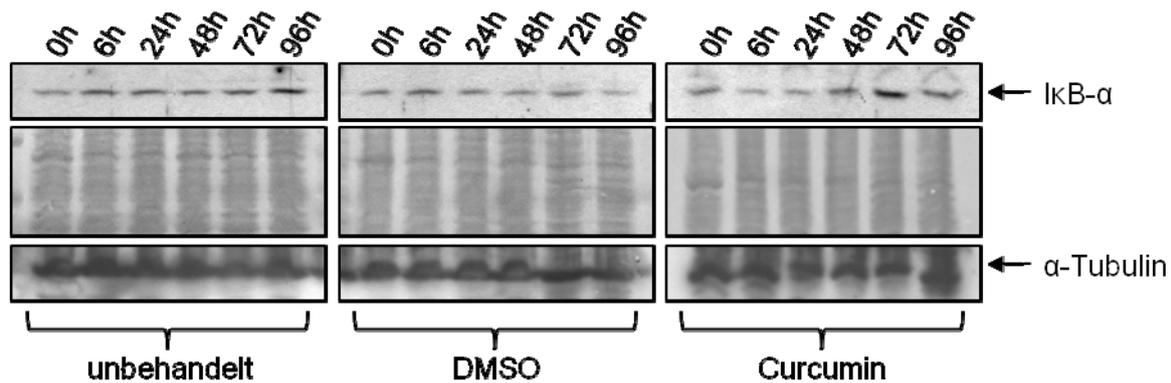
Die Behandlung der RD/18-Zellen mit Curcumin wurde wie für die C2C12-Zellen beschrieben durchgeführt (siehe 4.2.1.2.1). Der Erfolg dieser Behandlung wurde anhand der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration überprüft. Daran anschließend wurde die Auswirkungen der Blockierung des NF- $\kappa$ B durch Curcumin auf den Differenzierungsprozess und die *traf6*-Expression überprüft.

###### 4.2.2.2.1.1 NF- $\kappa$ B-Aktivität in mit Curcumin behandelten RD/18-Zellen

###### Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration im Differenzierungsverlauf

Für die Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration wurden zytosolische Proteinlysate mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens analysiert.

Wie in Abbildung 25 zu sehen, war bei den mit Curcumin behandelten RD/18-Zellen nach Einleitung der Differenzierung überraschenderweise erst eine Abnahme und darauffolgend ein Anstieg der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration sichtbar. Als Folge dieses Anstiegs war dann auch erst nach 72 Stunden die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration in den mit Curcumin behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Somit muss, zumindest aufgrund der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Analyse, davon ausgegangen werden, dass die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität in RD/18-Zellen nur eingeschränkt erfolgreich war, was bei den nachfolgend beschriebenen Analysen beachtet werden sollte.



**Abb. 25: Western Blot-Analyse der IκB-α-Konzentration in unbehandelten, in DMSO-behandelten und in Curcumin-behandelten RD/18-Zellen**

Es wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten zytosolische Proteinlysate gewonnen und unter Anwendung des *Western Blot*-Verfahrens untersucht. Pro Spur wurden 40µg Protein aufgetragen. Nach Inkubation mit einem IκB-α-Antikörper konnte die für IκB-α spezifische Bande bei 37kDa detektiert werden (jeweils oben). Die gleichmäßige Beladung der Spuren wurde jeweils durch eine Ponceau S-Färbung (jeweils Mitte) und anhand des *Housekeeping*-Proteins α-Tubulin überprüft (jeweils unten).

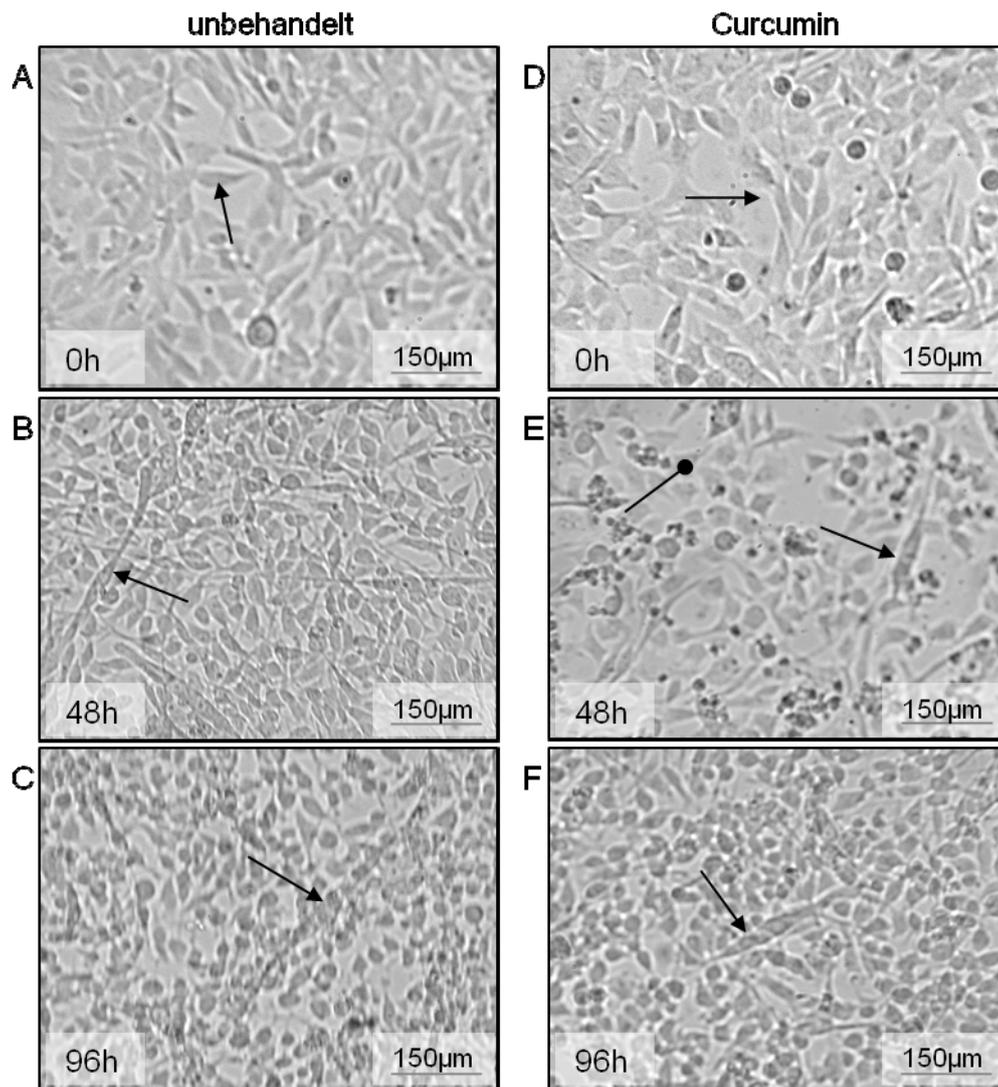
#### 4.2.2.2.1.2 Differenzierungsprozess der mit Curcumin behandelten RD/18-Zellen

Die Effekte der Curcumin-Behandlung auf den Differenzierungsprozess der RD/18-Zellen wurden wiederum lichtmikroskopisch und anhand der Expression spezifischer Differenzierungsmarker untersucht.

##### Lichtmikroskopische Untersuchung

Wie in Abbildung 26 erkennbar, war der einzige durch Curcumin verursachte lichtmikroskopisch sichtbare Effekt eine erhöhte Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen 48 Stunden nach Differenzierungseinleitung (Abb. 26: E, Stecknadel). Der Differenzierungsstatus der verbleibenden Zellen entsprach dem der unbehandelten Zellen.

Dieses Bild stimmt mit den bei C2C12-Zellen beobachteten Veränderungen, bei denen die Curcumin-Behandlung ebenfalls keinen Einfluss auf die Morphologie der überlebenden Zellen hatte, überein.

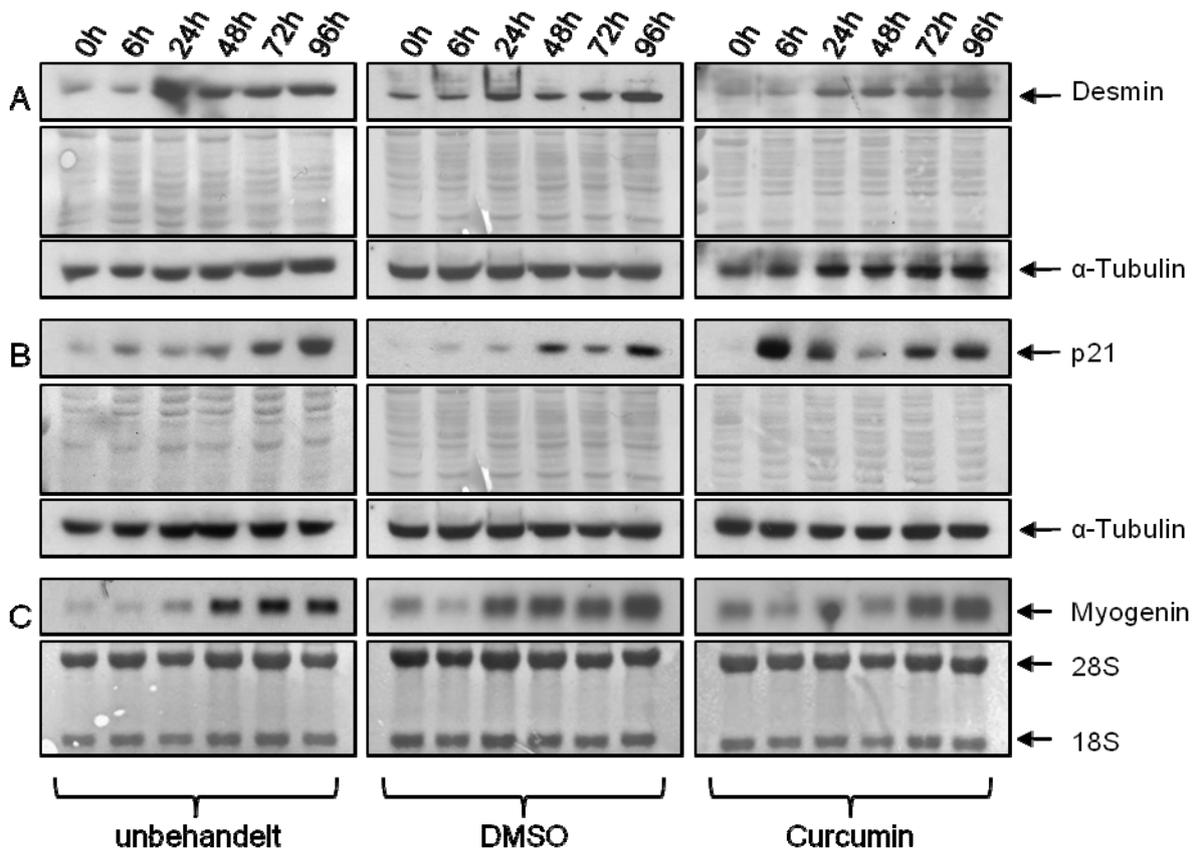


**Abb. 26: Lichtmikroskopische Aufnahmen unbehandelter und Curcumin-behandelter RD/18-Zellen**

Auf der linken Seite sind unbehandelte und auf der rechten Seite mit Curcumin behandelte RD/18-Zellen abgebildet. Es sind jeweils proliferierende (A bzw. D) und differenzierende (B und C bzw. E und F) Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Differenzierung zu sehen. Die für den jeweiligen Differenzierungsgrad typischen Zellformen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Stecknadel weist auf apoptotische bzw. nekrotische Zellen hin.

#### Analyse der Differenzierungsmarker Desmin, p21 und Myogenin

Aus unbehandelten, aus mit DMSO behandelten und aus mit Curcumin behandelten RD/18-Zellen wurden Protein- und RNA-Proben gewonnen und unter Zuhilfenahme des *Western Blot*- bzw. *Northern Blot*-Verfahrens auf die Expression der myogenen Differenzierungsmarker Desmin, p21 und Myogenin hin untersucht.



**Abb. 27: Untersuchung der Differenzierungsmarker Desmin, p21 und Myogenin in unbehandelten, in DMSO-behandelten und in Curcumin-behandelten RD/18-Zellen**

Aus proliferierenden bzw. differenzierenden RD/18-Zellen wurden Protein- und RNA-Proben gewonnen. Diese wurden per *Western Blot*- bzw. *Northern Blot*-Verfahren analysiert.

Die Autoradiogramme in der linken Spalte zeigen Lysate aus unbehandelten Zellen. In der Mitte sind die Autoradiogramme der mit DMSO behandelten und rechts die der mit Curcumin behandelten Zellen zu sehen.

**A und B:** *Western Blot*-Analysen, bei denen 10 $\mu$ g zytosolisches Protein aufgetragen wurden. Für Desmin konnte eine spezifische Bande bei 53kDa (A: jeweils oben) und für p21 bei 21kDa (B: jeweils oben) detektiert werden. Die Überprüfung der einheitlichen Beladung der Spuren erfolgte durch Ponceau S-Färbungen (A und B: jeweils Mitte) und durch den Nachweis des *Housekeeping*-Proteins  $\alpha$ -Tubulin (A und B: jeweils unten).

**C:** *Northern Blot*-Analysen der *myogenin*-Expression. Pro Spur wurden 0,5 $\mu$ g RNA aufgetragen und mit einer Myogenin-Sonde hybridisiert. Oben sichtbar sind die Myogenin-Gentranskripte (1,9kB). Es wurde eine Methylenblaufärbung zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Spuren durchgeführt (jeweils unten).

Man beachte den starken p21-Konzentrationsanstieg sechs Stunden nach Induktion der Differenzierung und das verzögerte Ansteigen der Myogenin-mRNA-Konzentration in den mit Curcumin behandelten Zellen.

Wie in Abbildung 27 B und C zu sehen ist, führte die Behandlung mit Curcumin im Vergleich zu unbehandelten oder DMSO-behandelten Zellen zu Veränderungen der *p21*- und *myogenin*-Expression. So konnte sechs Stunden nach Differenzierungseinleitung eine stark erhöhte p21-Proteinkonzentration beobachtet werden (Abb. 27: B). Im weiteren Differenzierungsverlauf kam es bis 48 Stunden nach Induktion der Differenzierung zu einem Absinken der p21-Konzentration, woran sich ein erneuter Anstieg anschloss.

Unmittelbar nach der Behandlung war die Myogenin-mRNA-Konzentration bei mit DMSO behandelten und bei mit Curcumin behandelten RD/18-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen leicht erhöht (Abb. 27: C). Im weiteren Differenzierungsprozess waren aber die Myogenin-Konzentrationen bei den mit DMSO behandelten Zellen wieder mit denen bei unbehandelten Zellen vergleichbar. Bei Curcumin-behandelten Zellen war jedoch die Induktion der *myogenin*-Expression auf mRNA-Ebene im Gegensatz zu den Kontrollzellen leicht verzögert (Abb. 27: C).

Die Behandlung der RD/18-Zellen mit Curcumin verursachte demgegenüber keine Veränderung der *desmin*-Expression (Abb. 27: A).

Diese Ergebnisse sind erstaunlich, da die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin bei C2C12-Zellen im Laufe der Myogenese keine Veränderung der *myogenin*- und *p21*-Expression, wohl aber eine Veränderung der *desmin*-Expression verursachte (siehe 4.2.1.2.1.2).

#### 4.2.2.2.1.3 *traf6*-Expression in mit Curcumin behandelten RD/18-Zellen

Zur Untersuchung der *traf6*-Expression wurden zytosolische Proteinproben gewonnen und mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens auf die Expression des *traf6*-Gens hin analysiert. Auf Proteinebene ließ sich keine auffallende Veränderung des *traf6*-Expressionsusters feststellen (Daten nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin keinen Einfluss auf die *traf6*-Expression hatte.

#### 4.2.2.2.2 Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Lactacystin

Die Behandlung der RD/18-Zellen mit Lactacystin erfolgte wie die Lactacystin-Behandlung der C2C12-Zellen (siehe 4.2.1.2.2). Wie im vorherigen Abschnitt für Curcumin beschrieben, wurde die Wirksamkeit des Lactacystins anhand der NF- $\kappa$ B-Aktivität überprüft. Daran anschließend wurden die Auswirkungen Lactacystins auf den Differenzierungsprozess und die *traf6*-Expression analysiert.

##### 4.2.2.2.2.1 NF- $\kappa$ B-Aktivität in mit Lactacystin behandelten RD/18-Zellen

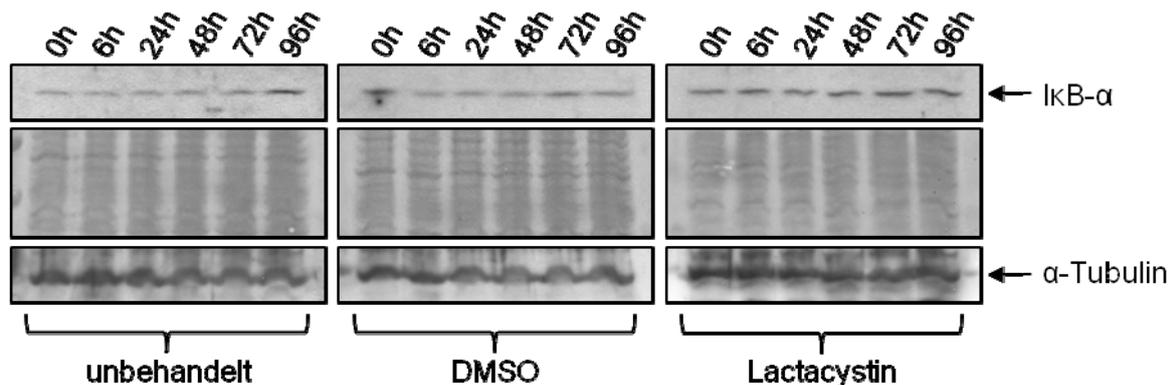
###### Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration im Differenzierungsverlauf

Die Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration erfolgte, wie bereits für Curcumin beschrieben, unter Anwendung des *Western Blot*-Verfahrens.

Wie aus Abbildung 28 ersichtlich ist, war die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Proteinkonzentration bei Lactacystin-behandelten RD/18-Zellen unmittelbar nach der Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen erhöht und blieb für den weiteren Differenzierungsverlauf auf einem hohen Niveau. Im Gegensatz dazu zeigte die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration der unbehandelten RD/18-Zellen nur einen minimalen Anstieg im Verlauf der Differenzierung.

Ein Anstieg der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration unmittelbar nach der Behandlung konnte auch bei mit DMSO behandelten RD/18-Zellen detektiert werden. Im weiteren Differenzierungsverlauf ähnelte der Verlauf der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration aber dem der unbehandelten Zellen.

Der unmittelbar nach der Behandlung eintretende und länger andauernde Anstieg der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration bei den mit Lactacystin behandelten RD/18-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen spricht somit insgesamt dafür, dass die Behandlung mit Lactacystin zu einer erfolgreichen Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität führte.



**Abb. 28: Western Blot-Analyse der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration in unbehandelten, in DMSO-behandelten und in Lactacystin-behandelten RD/18-Zellen**

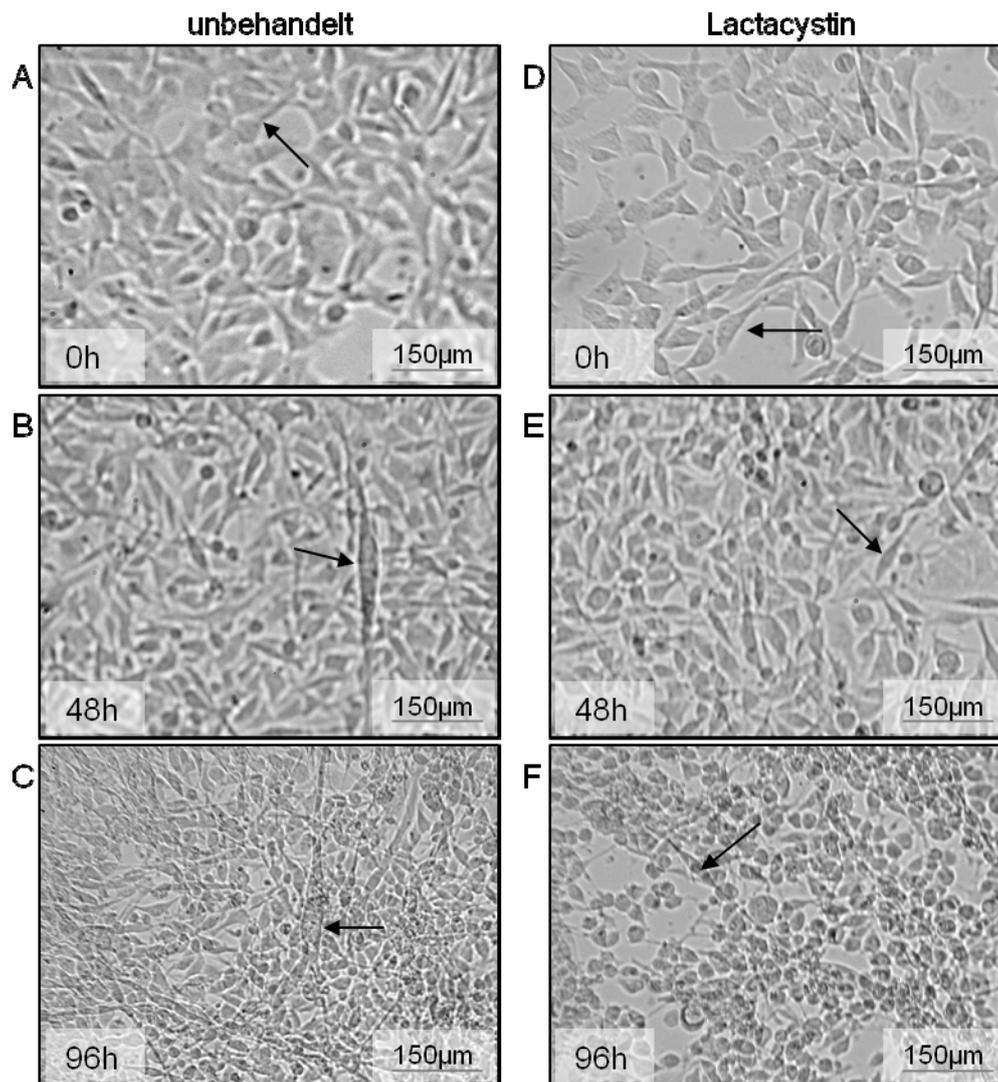
Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden zytosolische Proteinproben gewonnen und mit Hilfe der *Western Blot*-Analyse untersucht. Pro Spur wurden 40 $\mu$ g Protein aufgetragen. Nach Inkubation mit einem I $\kappa$ B- $\alpha$ -Antikörper konnte die für I $\kappa$ B- $\alpha$  spezifische Bande bei 37kDa detektiert werden (jeweils oben). Die gleichmäßige Beladung der Spuren wurde jeweils durch eine Ponceau S-Färbung (Mitte) und anhand des *Housekeeping*-Proteins  $\alpha$ -Tubulin (unten) überprüft.

#### 4.2.2.2.2 Differenzierungsprozess der mit Lactacystin behandelten RD/18-Zellen

Der Einfluss des Lactacystins auf den Differenzierungsprozess wurde wiederum lichtmikroskopisch und anhand der Differenzierungsmarker untersucht.

##### Lichtmikroskopische Untersuchung

In Abbildung 29 sind lichtmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten und von mit Lactacystin behandelten RD/18-Zellen abgebildet. Gut zu sehen ist hier, dass die Lactacystin-Behandlung der RD/18-Zellen zu einer lichtmikroskopisch sichtbaren Verzögerung des Differenzierungsprozesses führte. So konnten 48 Stunden nach Differenzierungseinleitung bei mit Lactacystin behandelten RD/18-Zellen (Abb. 29: E), im Gegensatz zu den unbehandelten RD/18-Zellen (Abb. 29: B), noch keine Zellen mit einer spindelförmigen Morphologie und langen Ausläufern beobachtet werden. Weitere 48 Stunden später konnten diese dann auch bei mit Lactacystin behandelten RD/18-Zellen beobachtet werden (Abb. 29: F). Zu diesem Zeitpunkt beherrschten jedoch bei den unbehandelten RD/18-Zellen bereits Zellen von myotubenähnlicher Morphologie das Bild (Abb. 29: C).



**Abb. 29: Lichtmikroskopische Aufnahmen unbehandelter und mit Lactacystin behandelter RD/18-Zellen**

In der linken Spalte sind unbehandelte und in der rechten Spalte mit Lactacystin behandelte RD/18-Zellen abgebildet. Die Bilder zeigen jeweils proliferierende (A bzw. D) und differenzierende Zellen (B und C bzw. E und F) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Einleitung der Differenzierung. Die Pfeile weisen auf die Zellformen hin, die zu dem Zeitpunkt für den entsprechenden Differenzierungsgrad charakteristisch waren.

Man beachte, dass bei mit Lactacystin behandelten RD/18-Zellen 96 Stunden (F) nach Differenzierungseinleitung lediglich spindelförmige Zellen, aber keine mehrkernigen, myotubenähnlichen Strukturen sichtbar waren.

### Analyse der Differenzierungsmarker Desmin, p21 und Myogenin

Die Analyse der Differenzierungsmarker erfolgte wie bereits für Curcumin im vorherigen Abschnitt beschrieben.

Aus Abbildung 30 geht hervor, dass die Behandlung der RD/18-Zellen mit Lactacystin eine Veränderung der Expressionsmuster aller drei Differenzierungsmarker verursachte.

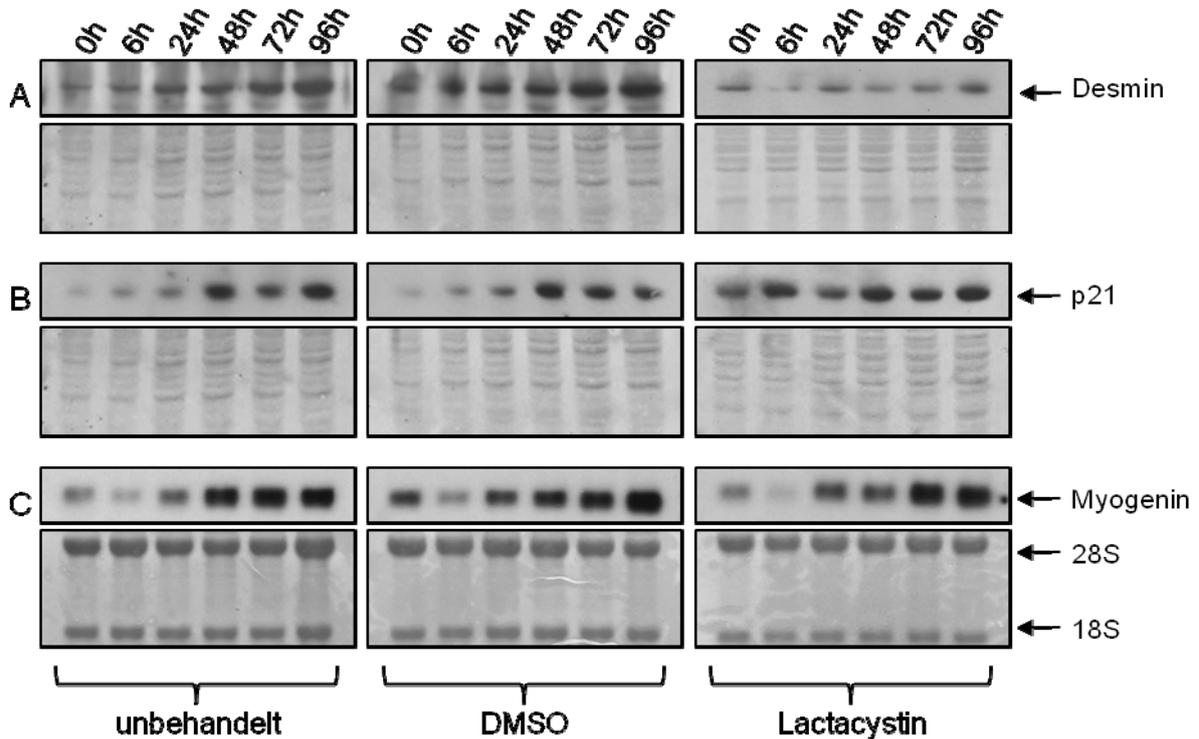
Spezifisch war bei Lactacystin-behandelten Zellen das *desmin*-Expressionsmuster auf Proteinebene sehr unregelmäßig (Abb. 30: A). So konnte unmittelbar nach der Behandlung eine hohe Desmin-Konzentration beobachtet werden, die sechs Stunden später abfiel und im weiteren Differenzierungsverlauf wieder anstieg.

Die p21-Proteinkonzentration in den mit Lactacystin behandelten Zellen war demgegenüber bereits nach der Lactacystin-Behandlung, also schon vor der Differenzierungseinleitung, stark erhöht (Abb. 30: B). 24 Stunden später erfolgte ein Abfall der p21-Proteinkonzentration, auf den weitere 24 Stunden später ein erneuter Anstieg folgte.

Die Myogenin-mRNA-Konzentration der mit Lactacystin behandelten Zellen schließlich war im Vergleich zu den Kontrollzellen eventuell leicht herabgesetzt (Abb. 30: C).

Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung und die Analyse der Differenzierungsmarker zeigten somit, dass die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Lactacystin ähnliche Auswirkungen auf RD/18-Zellen wie auf C2C12-Zellen hatte.

Bei beiden Zelllinien führte die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Lactacystin zu einer lichtmikroskopisch sichtbaren Verzögerung des Differenzierungsablaufes. Weiterhin konnte sowohl bei C2C12- als auch bei RD/18-Zellen nach der Lactacystin-Behandlung ein unmittelbarer Anstieg der p21-Proteinkonzentration und eine abgeschwächte bzw. verzögerte *myogenin*-Induktion im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen beobachtet werden. Lediglich bezüglich des *desmin*-Expressionsmusters traten nach der Lactacystin-Behandlung signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien auf.



**Abb. 30: Untersuchung der Differenzierungsmarker Desmin, p21 und Myogenin in unbehandelten, in DMSO-behandelten und in Lactacystin-behandelten RD/18-Zellen**  
 Es wurden Protein- und RNA-Proben aus proliferierenden bzw. differenzierenden RD/18-Zellen gewonnen. Diese wurden per *Western Blot*- bzw. *Northern Blot*-Verfahren analysiert. Die Autoradiogramme in der linken Spalte zeigen Lysate aus unbehandelten Zellen. In der Mitte sind die Autoradiogramme der mit DMSO behandelten Zellen und rechts die der mit Lactacystin behandelten Zellen zu sehen.

**A und B:** *Western Blot*-Analysen, bei denen 10µg zytosolisches Protein pro Spur aufgetragen wurden. Es konnten die spezifischen Banden für Desmin bei 54kDa (A: jeweils oben) und p21 bei 21kDa (B: jeweils oben) detektiert werden. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Spuren wurden Ponceau S-Färbungen durchgeführt (A und B: jeweils unten).

**C:** *Northern Blot*-Analyse der *myogenin*-Expression. Pro Spur wurden 0,5µg RNA aufgetragen und mit einer Myogenin-Sonde hybridisiert. Oben sichtbar sind die Myogenin-Gentranskripte (1,9kB). Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Spuren wurde eine Methylenblaufärbung durchgeführt (jeweils unten).

Man beachte die hohe *p21*-Basalexpression der mit Lactacystin behandelten Zellen. Weiterhin auffällig ist die leicht abgeschwächte *myogenin*-Induktion.

#### 4.2.2.2.2.3 traf6-Expression in mit Lactacystin behandelten RD/18-Zellen

Wie für Curcumin beschrieben, wurde die Untersuchung der *traf6*-Expression auf Proteinebene mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens durchgeführt.

Analog zur Curcumin-Behandlung führte jedoch auch die Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Lactacystin zu keiner auffälligen Veränderung des *traf6*-Expressionsmusters (Daten nicht gezeigt).

Dies untermauert die Vermutung, die bereits nach der Hemmung NF- $\kappa$ Bs durch Curcumin angestellt wurde, dass die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität bei RD/18-Zellen keinen Einfluss auf die *traf6*-Expression hat.

### **4.2.3 Untersuchung der Rhabdomyosarkomzelllinie RD/12**

Die Untersuchung der Rhabdomyosarkomzelllinie RD/12 erfolgte, wie schon die Untersuchung der RD/18-Zelllinie, nach dem gleichen Schema wie die Untersuchung der C2C12-Zelllinie.

Die RD/12-Zellen durchlaufen keine Differenzierung im eigentlichen Sinne. Trotzdem wird in den nachfolgenden Ausführungen der Einfachheit halber der Begriff „Differenzierung“ verwendet. Es soll dabei aber betont werden, dass hiermit lediglich die in den Zellen ablaufenden Prozesse nach Entzug des serumreichen Mediums gemeint sind und nicht eine myogene Differenzierung im eigentlichen Sinne gemeint ist.

Zu diesem Zweck wurden die RD/12-Zellen bis zu einer Konfluenz von 80-90% in serumreichem Proliferationsmedium kultiviert und dann die Differenzierung durch einen Wechsel des serumreichen Mediums zu serumarmem Differenzierungsmedium eingeleitet. Die jeweiligen Proben wurden von Zellen in Proliferationsmedium (0 Stunden) und nach 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden in Differenzierungsmedium geerntet.

#### **4.2.3.1 NF- $\kappa$ B-Aktivität und *traf6*-Expression bei der Differenzierung**

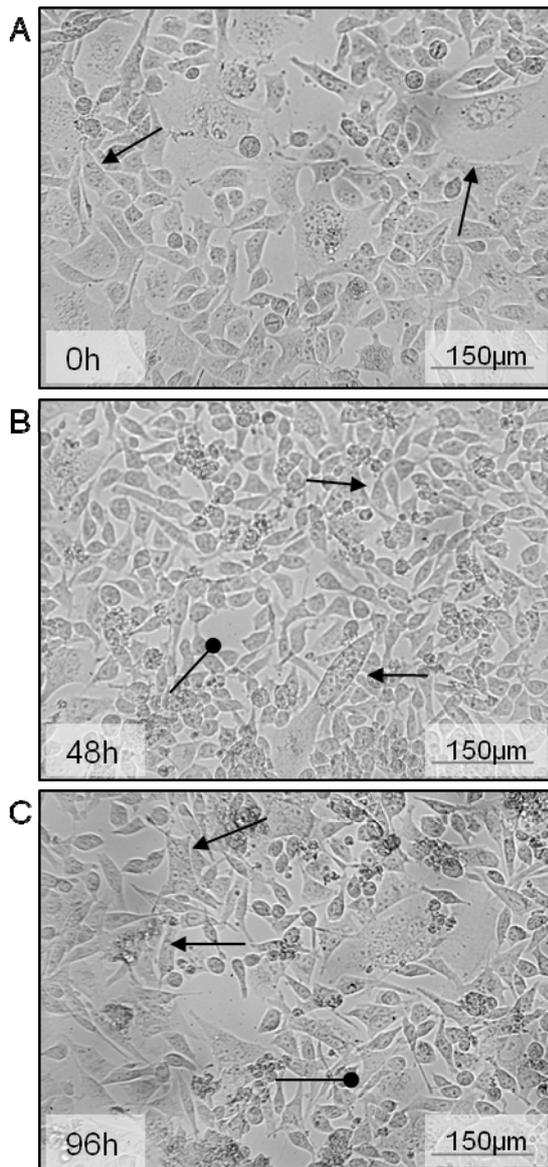
Wie bei der Untersuchung der C2C12- und RD/18-Zellen wurde zuerst der ordnungsgemäße Ablauf des Differenzierungsprozesses lichtmikroskopisch und anhand spezifischer Differenzierungsmarker untersucht. Daran anschließend erfolgten die Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Aktivität und die Untersuchung des *traf6*-Expressionsmusters.

##### **4.2.3.1.1 Differenzierungsprozess der RD/12-Zellen**

###### Lichtmikroskopische Untersuchung

Wie erwähnt durchlaufen die Zellen der Rhabdomyosarkomzelllinie RD/12 keinen Differenzierungsprozess im eigentlichen Sinne.

So blieb auch bei den in dieser Arbeit untersuchten RD/12-Zellen das morphologische Erscheinungsbild der Zellen innerhalb des gesamten Differenzierungsprozesses nahezu unverändert. Wie in Abbildung 31 zu sehen, zeigten die RD/12-Zellen vor Differenzierungseinleitung (Abb. 31: A, Pfeile), sowie 48 (Abb. 31: B, Pfeile) und 96 Stunden (Abb. 31: C, Pfeile) nach Differenzierungseinleitung eine pleomorphe Gestalt und das Auftreten von mehrkernigen Riesenzellen. Als einzige morphologische Veränderungen fielen im Differenzierungsverlauf eine leichte Abnahme der Zellgröße und eine gewisse Zunahme apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen (Abb. 31: B und C, Stecknadeln) sowie die daraus resultierende Abnahme der Zelldichte auf.



**Abb. 31: Lichtmikroskopische Aufnahmen nativer RD/12-Zellen**

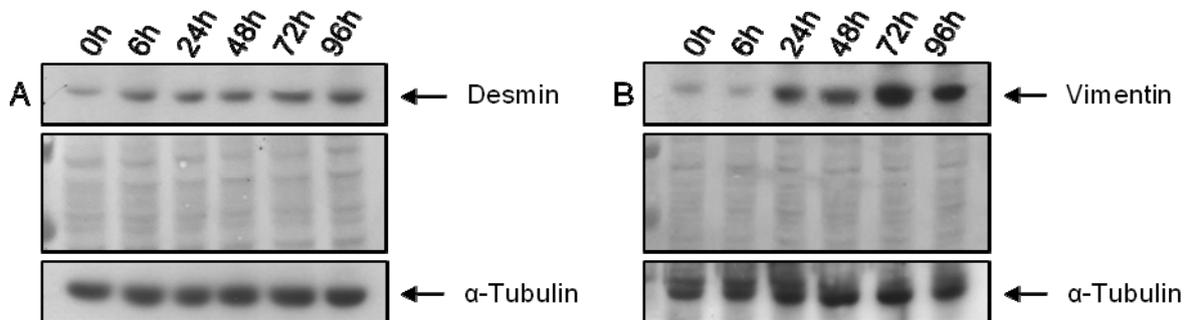
Die Bilder zeigen RD/12-Zellen kurz vor der Differenzierungseinleitung (A) und 48 Stunden (B) bzw. 96 Stunden (C) nach Induktion der Differenzierung. Die Pfeile zeigen auf die für den entsprechenden Differenzierungsgrad typischen Zellformen. Die Stecknadeln weisen auf apoptotische bzw. nekrotische Zellen hin.

#### Analyse der Differenzierungsmarker Desmin und Vimentin

Zur Untersuchung der für RD/12-Zellen spezifischen Differenzierungsmarker Desmin und Vimentin wurden zytosolische Proteinproben gewonnen und mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens analysiert. Da Desmin, wie schon bei der Untersuchung der RD/18-Zellen erwähnt, bei einem Großteil der Rhabdomyosarkome ein zuverlässiger Marker für die Rhabdomyoblasten-Differenzierung ist (Carter *et al.*, 1989), wurde auch in RD/12-Zellen die *desmin*-Expression untersucht. Wie in Abbildung 32 (A) zu sehen, konnte in den hier untersuchten RD/12-Zellen ab sechs Stunden nach Differenzierungseinleitung ein Anstieg der Desmin-Proteinkonzentration beobachtet werden.

Weiterhin wurde bei RD/12-Zellen das Intermediärfilament Vimentin untersucht. Die Expression des für dieses Intermediärfilament kodierenden Gens verhält sich innerhalb des Differenzierungsverlaufes in RD/12-Zellen invers zu der in nichttransformierten Muskelzellen. Während es innerhalb des Differenzierungsprozesses nichttransformierter Muskelzellen zu einer Repression des *vimentin*-Gens kommt (Sax *et al.*, 1989), steigt die *vimentin*-Expression

während der Differenzierung bei RD/12-Zellen an (Astolfi *et al.*, 2001). In Einklang mit diesen Daten war auch in unseren Händen 24 Stunden nach Differenzierungseinleitung bei RD/12-Zellen ein Anstieg der Vimentin-Proteinkonzentration zu beobachten (Abb. 32: B). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass der Differenzierungsprozess der RD/12-Zellen in unseren Händen ordnungsgemäß verlief und dass diese daher ein geeignetes Modellsystem für weitere Untersuchungen darstellten.



**Abb. 32: Untersuchung der Differenzierungsmarker Desmin und Vimentin in RD/12-Zellen**

Es wurden Proteinproben aus proliferierenden bzw. differenzierenden RD/12-Zellen mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens analysiert. Pro Spur wurden je 10 $\mu$ g Protein aufgetragen. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper konnte die für Desmin charakteristische Bande bei 54kDa (A: oben) und die für Vimentin charakteristische Bande bei 53kDa (B: oben) detektiert werden. Die gleichmäßige Beladung der Spuren wurde jeweils durch eine Ponceau S-Färbung (jeweils Mitte) und anhand des *Housekeeping*-Proteins  $\alpha$ -Tubulin überprüft.

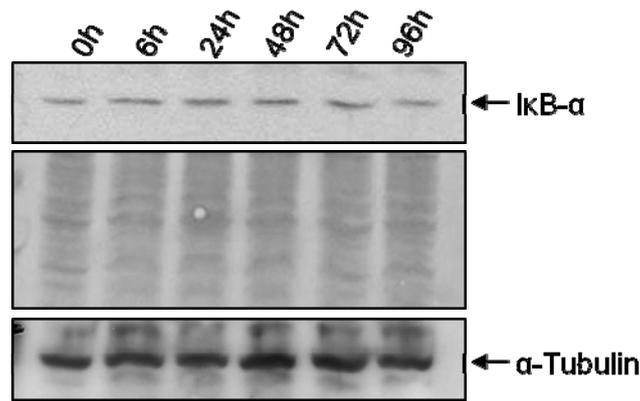
#### 4.2.3.1.2 NF- $\kappa$ B-Aktivität in RD/12-Zellen

Die Analyse der NF- $\kappa$ B-Aktivität in den RD/12-Zellen erfolgte analog zur Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Aktivität in den C2C12- und RD/18-Zellen, das heißt durch die Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration, durch die Untersuchung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung und durch die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des NF- $\kappa$ B.

##### Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration im Differenzierungsverlauf

Aus drei voneinander unabhängigen Versuchen wurden zytosolische Proteinproben gewonnen und die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration in den RD/12-Zellen unter Verwendung des *Western Blot*-Verfahrens untersucht.

Ein für diese Versuche repräsentatives Ergebnis ist in Abbildung 33 dargestellt. Insgesamt zeigte sich, dass die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Proteinkonzentration im Verlauf des Differenzierungsprozesses nahezu unverändert blieb.

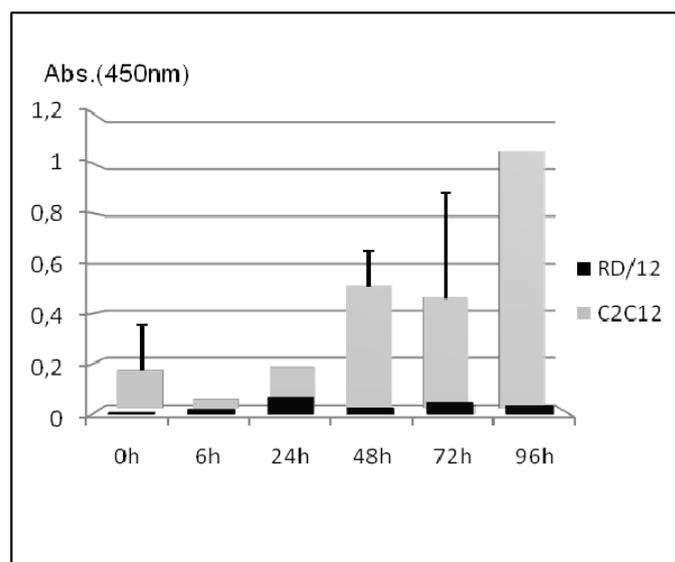


**Abb. 33: Western Blot-Analyse der IκB-α-Konzentration in RD/12-Zellen**

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden zytosolische Proteinproben aus proliferierenden bzw. differenzierenden RD/12-Zellen gewonnen und mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens untersucht. Es wurden pro Spur 40µg Protein aufgetragen. Durch Inkubation mit einem IκB-α-Antikörper konnte eine für IκB-α spezifische Bande bei 37kDa detektiert werden (oben). Zur Kontrolle der einheitlichen Beladung der Spuren wurde eine Ponceau S-Färbung durchgeführt (Mitte) und das *Housekeeping*-Protein α-Tubulin nachgewiesen (unten).

Untersuchung der NF-κB-DNA-Bindung im Differenzierungsverlauf

Für die Analyse der NF-κB-DNA-Bindung wurden nukleäre Proteinproben gewonnen und mit dem bereits für C2C12-Zellen beschriebenen ELISA-Verfahren untersucht (siehe 4.2.1.1.2). Wie in Abbildung 34 zu sehen, war die NF-κB-Aktivität bei RD/12-Zellen (schwarz) im Vergleich zur NF-κB-Aktivität bei C2C12-Zellen im gesamten Differenzierungsverlauf sehr niedrig und schwankte nur minimal.



**Abb. 34: ELISA-Analyse der NF-κB-Aktivität in RD/12-Zellen**

Es wurden nukleäre Proteinproben aus proliferierenden (0 Stunden) und differenzierenden (nach 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden) RD/12-Zellen gewonnen. Die Analyse der Proben erfolgte mit Hilfe des ELISA-Verfahrens. Die Absorption wurde bei

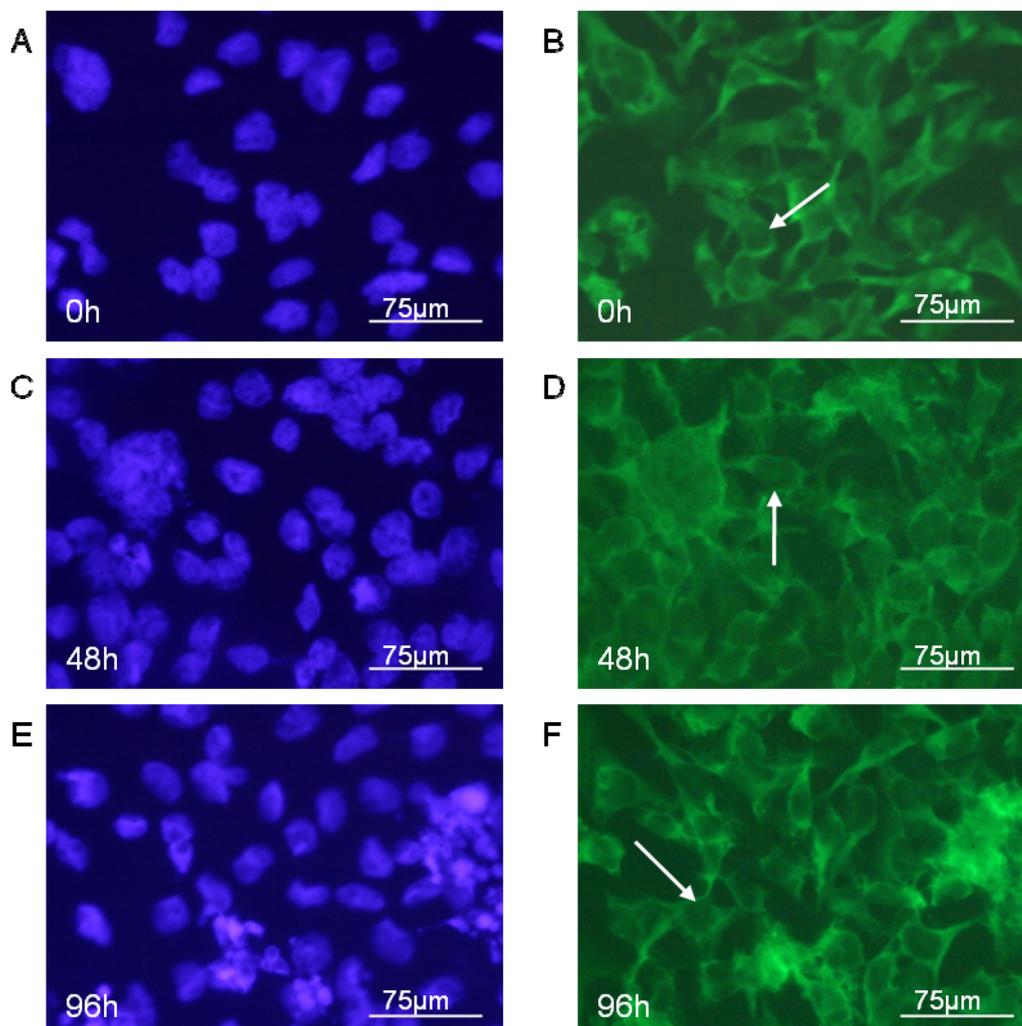
450nm gemessen. Im Hintergrund ist zum Vergleich die ELISA-Analyse der NF- $\kappa$ B-Aktivität der C2C12-Zellen zu sehen.

#### Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des NF- $\kappa$ B im Differenzierungsverlauf

Die Bestimmung der intrazellulären Lokalisation des NF- $\kappa$ B wurde wie für C2C12-Zellen beschrieben durchgeführt (siehe 4.2.1.1.2).

Vor Differenzierungseinleitung (Abb. 35: B), sowie 48 (Abb. 35: D) und 96 (Abb. 35: F) Stunden nach Differenzierungseinleitung war eine geringe, annähernd gleichbleibende NF- $\kappa$ B-spezifische Fluoreszenz der Zellkerne sichtbar. Auch die Färbung des Zytoplasmas, die stärker war als die der Zellkerne, blieb im Differenzierungsverlauf nahezu gleich.

Sowohl die Ergebnisse der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Western Blot-Analyse als auch der ELISA- und Immunfluoreszenz-Untersuchung wiesen somit darauf hin, dass die NF- $\kappa$ B-Aktivität während des Differenzierungsprozesses in RD/12-Zellen annähernd gleich bleibt.



**Abb. 35: NF- $\kappa$ B-Immunfluoreszenz von RD/12-Zellen**

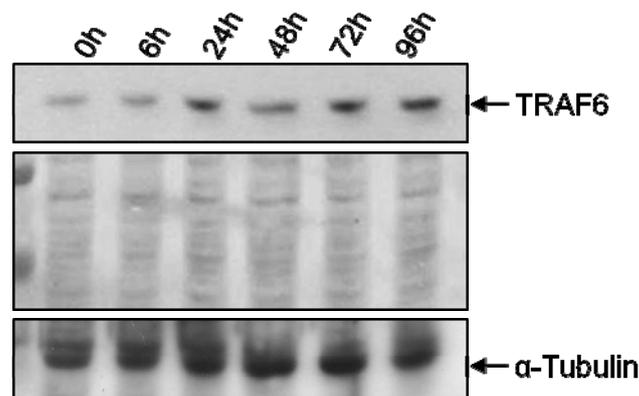
Es wurden proliferierende (0 Stunden) und differenzierende (48 und 96 Stunden nach Differenzierungseinleitung) RD/12-Zellen fixiert. Nach der Inkubation mit einem primären, gegen die p65-Untereinheit des NF- $\kappa$ B gerichteten Antikörper, konnte durch einen zweiten, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper die Lokalisation des NF- $\kappa$ B sichtbar

gemacht werden. Auf der linken Seite sind zur Orientierung die durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI sichtbar gemachten Zellkerne abgebildet. Auf der rechten Seite sind die entsprechenden Immunfluoreszenzen zu sehen. Die Pfeile zeigen auf die für den entsprechenden Differenzierungsgrad typischen Zellformen.

### 4.2.3.1.3 Expression des *traf6*-Gens in RD/12-Zellen

Zur Untersuchung der *traf6*-Expression auf Proteinebene wurden zytosolische Proteinlysate aus drei unabhängigen Versuchen mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens untersucht. Ein für diese Versuche repräsentatives Ergebnis ist in Abbildung 36 dargestellt. Gut zu erkennen ist der Anstieg der TRAF6-Proteinkonzentration im Differenzierungsverlauf.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es bei RD/12-Zellen zu einer Induktion der *traf6*-Expression im Verlauf der Differenzierung kommt. In Bezug hierauf ist interessant, dass bereits für RD/18-Zellen ein ähnlicher Zusammenhang festgestellt werden konnte (siehe 4.2.2.1.3).



**Abb. 36: Western Blot-Analyse der *traf6*-Expression**

Proteinproben aus proliferierenden bzw. differenzierenden RD/12-Zellen wurden per *Western Blot*-Verfahren untersucht. Es wurden pro Spur 10 $\mu$ g Protein aufgetragen. Mit Hilfe eines TRAF6-Antikörpers konnte eine für TRAF6 spezifische Bande bei 58kDa detektiert werden (oben). Die gleichmäßige Beladung der Spuren wurde durch eine Ponceau S-Färbung (Mitte) und anhand des *Housekeeping*-Proteins  $\alpha$ -Tubulin überprüft (unten).

Man beachte den Anstieg der TRAF6-Proteinkonzentration im Differenzierungsverlauf.

#### **4.2.3.2 Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität**

Wie bei der Untersuchung der C2C12- und RD/18-Zellen wurde auch bei RD/12-Zellen der Einfluss der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf den Differenzierungsprozess mit Hilfe der NF- $\kappa$ B-Inhibitoren Curcumin und Lactacystin untersucht.

##### **4.2.3.2.1 Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin**

Die Behandlung der RD/12-Zellen mit Curcumin wurde wie für die C2C12-Zellen beschrieben durchgeführt (siehe 4.2.1.2.1). Die erfolgreiche Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität wurde wieder anhand der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration überprüft. Darauf folgend wurde die Auswirkung des Curcumins auf den Differenzierungsprozess und die *traf6*-Expression untersucht.

###### *4.2.3.2.1.1 NF- $\kappa$ B-Aktivität in mit Curcumin behandelten RD/12-Zellen*

###### Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration im Differenzierungsverlauf

Um die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration zu untersuchen, wurden zytosolische Proteinlysate gewonnen und unter Verwendung des *Western Blot*-Verfahrens analysiert.

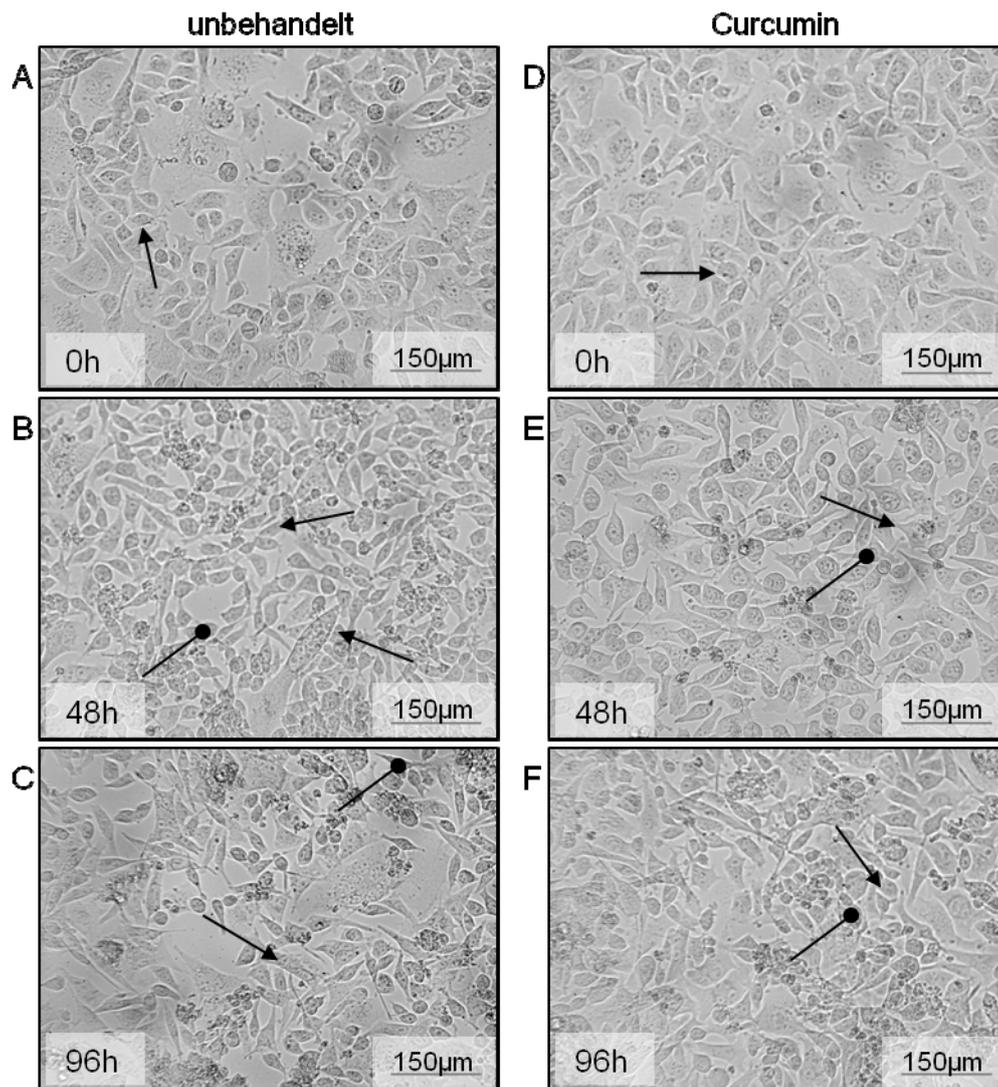
Die Ergebnisse dieser Untersuchung waren jedoch nicht eindeutig, so dass die nachfolgenden Ergebnisse nur unter Vorbehalt einer eindeutigen Hemmung bewertet werden können. Um ein eindeutigeres Ergebnis zu erhalten, sollten diese Versuche in einer größeren Anzahl wiederholt werden.

###### *4.2.3.2.1.2 Differenzierungsprozess der mit Curcumin behandelten RD/12-Zellen*

Der Einfluss der Curcumin-Behandlung auf den Differenzierungsprozess wurde lichtmikroskopisch und anhand der Expression spezifischer Differenzierungsmarker untersucht.

###### Lichtmikroskopische Untersuchung

In Abbildung 37 ist zu sehen, dass die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin keine lichtmikroskopisch erkennbaren morphologischen Veränderungen der RD/12-Zellen verursachte. Sowohl 48 Stunden als auch 96 Stunden nach Differenzierungseinleitung waren bei unbehandelten und bei mit Curcumin behandelten RD/12-Zellen apoptotische bzw. nekrotische Zellen sichtbar (Abb. 37: B und C bzw. E und F, Stecknadeln). Auch das morphologische Erscheinungsbild der mit Curcumin behandelten RD/12-Zellen unterschied sich nicht von dem der unbehandelten RD/12-Zellen.



**Abb. 37: Lichtmikroskopische Aufnahmen unbehandelter und Curcumin-behandelter RD/12-Zellen**

Auf der linken Seite sind unbehandelte und auf der rechten Seite mit Curcumin behandelte RD/12-Zellen abgebildet. Auf den Bildern sind jeweils proliferierende (A bzw. D) und differenzierende Zellen (B und C bzw. E und F) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Differenzierung zu sehen. Die Pfeile zeigen auf die für den entsprechenden Differenzierungsgrad typischen Zellformen. Die Stecknadeln weisen auf apoptotische bzw. nekrotische Zellen hin.

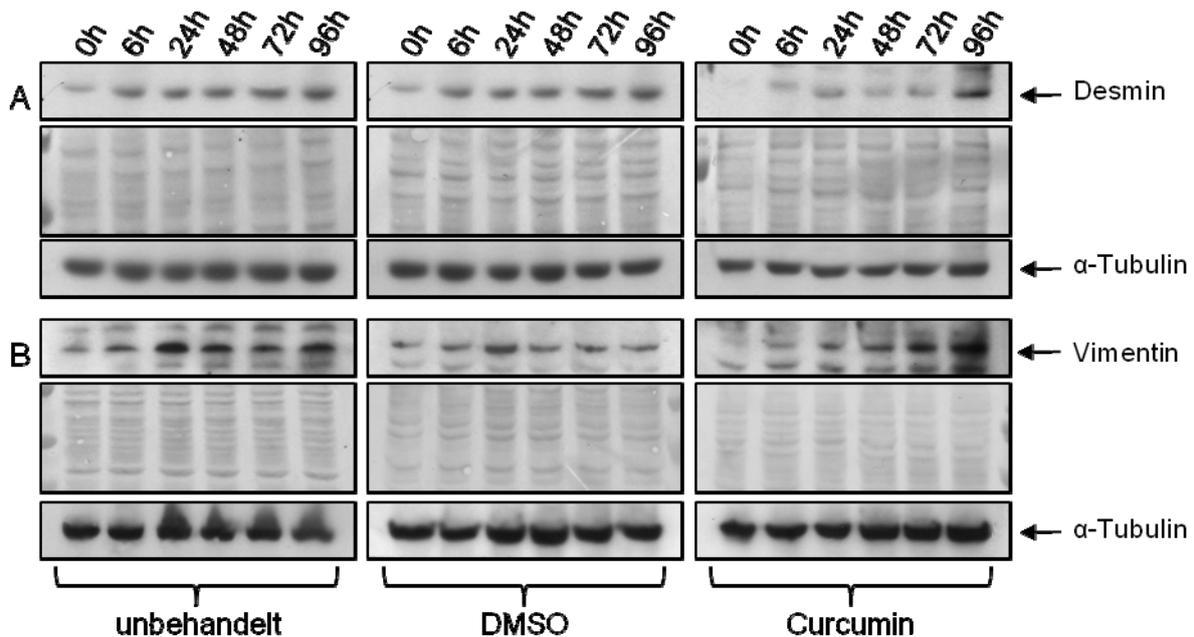
#### Analyse der Differenzierungsmarker Desmin und Vimentin

Für die Untersuchung der Differenzierungsmarker Desmin und Vimentin wurden zytosolische Proteinproben gewonnen. Diese wurden unter Zuhilfenahme des *Western Blot*-Verfahrens analysiert.

Spezifisch war bei mit Curcumin behandelten RD/12-Zellen ein verzögerter Anstieg der Desmin-Proteinkonzentration im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen zu beobachten (Abb. 38: A). Dagegen führte die Curcumin-Behandlung zu keiner Veränderung der *vimentin*-Expression (Abb. 38: B).

Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung und der Analyse der Differenzierungsmarker zeigen, dass die Blockierung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin außer einer Verzögerung der *desmin*-Induktion scheinbar keinen Einfluss auf den Differenzierungsprozess der RD/12-Zellen hatte.

Es ist dabei allerdings zu erwähnen, dass die erfolgreiche Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität anhand der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 38: Untersuchung der Differenzierungsmarker Desmin und Vimentin in unbehandelten, in DMSO-behandelten und in Curcumin-behandelten RD/12-Zellen**

Aus proliferierenden bzw. differenzierenden RD/12-Zellen wurden zytosolische Proteinproben gewonnen. Pro Spur wurden 10 $\mu$ g Protein aufgetragen und mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens untersucht.

Die Autoradiogramme in der linken Spalte zeigen Lysate aus unbehandelten Zellen. In der Mitte sind die Autoradiogramme der mit DMSO behandelten und rechts die der mit Curcumin behandelten Zellen zu sehen. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper konnte die für Desmin charakteristische Bande bei 54kDa (A: jeweils oben) und die für Vimentin charakteristische Bande bei 53kDa (B: jeweils oben) detektiert werden. Die Überprüfung der einheitlichen Beladung der Spuren erfolgte durch Ponceau S-Färbungen (A und B: jeweils Mitte) und durch den Nachweis des *Housekeeping*-Proteins  $\alpha$ -Tubulin (A und B: jeweils unten).

#### 4.2.3.2.1.3 Expression des *traf6*-Gens in mit Curcumin behandelten RD/12-Zellen

Um die Auswirkungen der Curcumin-Behandlung auf die *traf6*-Expression zu untersuchen, wurden zytosolische Proteinlysate geerntet und mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens analysiert. Die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin führte bei RD/12-Zellen zu keiner Veränderung der *traf6*-Expression (Daten nicht gezeigt).

Dies entspricht den für RD/18-Zellen erhaltenen Ergebnissen, bei denen die Blockierung der NF- $\kappa$ B-Aktivität ebenfalls keinen Einfluss auf die *traf6*-Expression hatte.

#### 4.2.3.2.2 Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Lactacystin

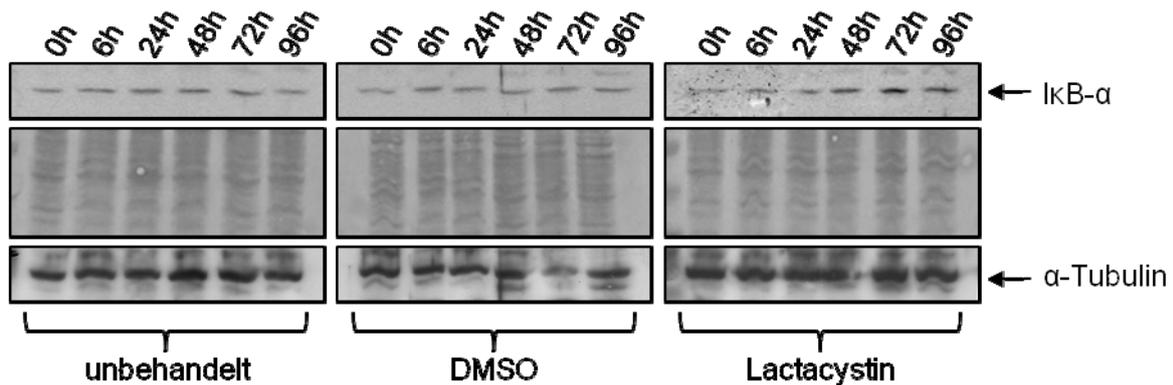
Die Behandlung der RD/12-Zellen mit Lactacystin erfolgte wie die Lactacystin-Behandlung der C2C12-Zellen (siehe 4.2.1.2.2). Wie im vorherigen Abschnitt für Curcumin beschrieben, wurde die Wirksamkeit des Lactacystins anhand der NF- $\kappa$ B-Aktivität analysiert. Daran anschließend wurden die Auswirkungen des Lactacystins auf den Differenzierungsprozess und die *traf6*-Expression untersucht.

##### 4.2.3.2.2.1 NF- $\kappa$ B-Aktivität in mit Lactacystin behandelten RD/12-Zellen

###### Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration im Differenzierungsverlauf

Die Analyse der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration erfolgte, wie bereits für Curcumin beschrieben, unter Anwendung des *Western Blot*-Verfahrens.

Wie in Abbildung 39 zu sehen, verursachte die Lactacystin-Behandlung bei RD/12-Zellen einen Anstieg der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Proteinkonzentration im Zeitraum zwischen 48 und 96 Stunden nach Induktion der Differenzierung. Im Gegensatz dazu blieben die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Proteinkonzentrationen bei den Kontrollzellen während des Differenzierungsprozesses unverändert. Hieraus lässt sich folgern, dass die Lactacystin-Behandlung den Anstieg der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration verursachte, also zu einem Absinken der NF- $\kappa$ B-Aktivität führte, und somit erfolgreich war.



**Abb. 39: Western Blot-Analyse der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration in unbehandelten, in DMSO-behandelten und in Lactacystin-behandelten RD/12-Zellen**

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden zytosolische Proteinproben gewonnen und mit Hilfe der *Western Blot*-Analyse untersucht. Pro Spur wurden 40 $\mu$ g Protein aufgetragen. Nach Inkubation mit einem I $\kappa$ B- $\alpha$ -Antikörper konnte die für I $\kappa$ B- $\alpha$  spezifische Bande bei 37kDa detektiert werden (jeweils oben). Die gleichmäßige Beladung der Spuren wurde jeweils durch eine Ponceau S-Färbung (Mitte) und durch Nachweis des *Housekeeping*-Proteins  $\alpha$ -Tubulin (unten) überprüft.

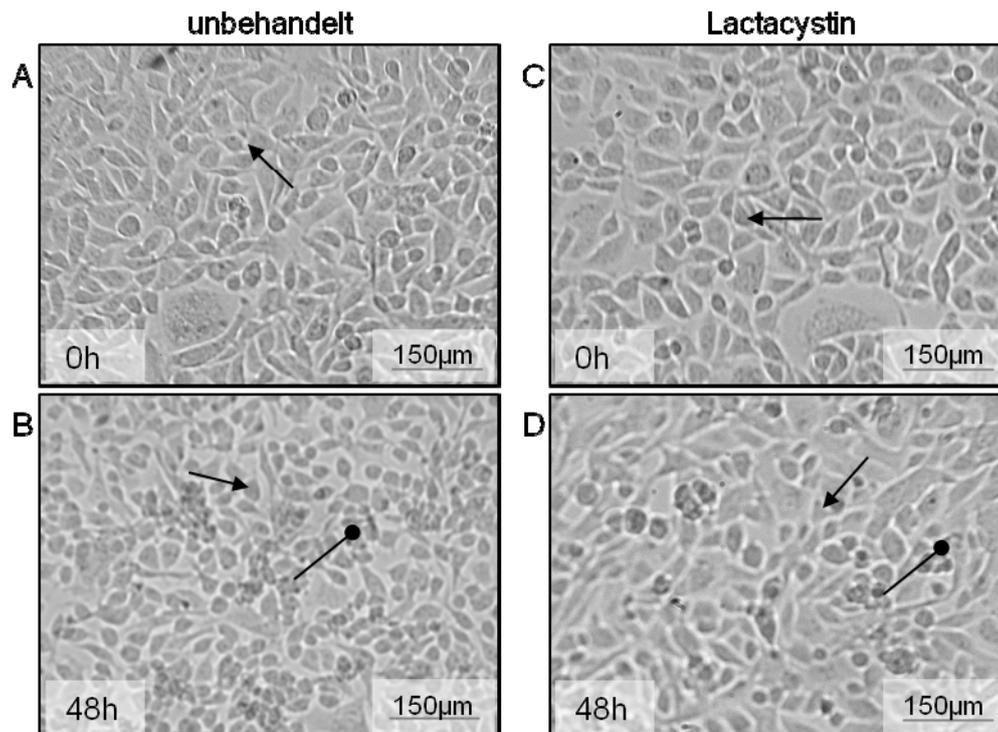
##### 4.2.3.2.2.2 Differenzierungsprozess der mit Lactacystin behandelten RD/12-Zellen

Der Einfluss des Lactacystins auf den Differenzierungsprozess wurde ebenfalls lichtmikroskopisch und anhand der Differenzierungsmarker untersucht.

###### Lichtmikroskopische Untersuchung

In Abbildung 40 sind lichtmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten und von mit Lactacystin behandelten RD/12-Zellen abgebildet.

Unmittelbar nach der Behandlung mit Lactacystin, also noch vor der Differenzierungseinleitung, war kein Unterschied zwischen unbehandelten (Abb. 40: A) und Lactacystin-behandelten RD/12-Zellen (Abb. 40: C) sichtbar. 48 Stunden später waren bei mit Lactacystin behandelten Zellen (Abb. 40: D, Stecknadel) im Vergleich zu den unbehandelten (Abb. 40: B, Stecknadel) weniger Zellen von apoptotischer und nekrotischer Morphologie sichtbar. Weitere 48 Stunden später konnte auch bei mit Lactacystin behandelten Zellen eine größere Anzahl apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen beobachtet werden.



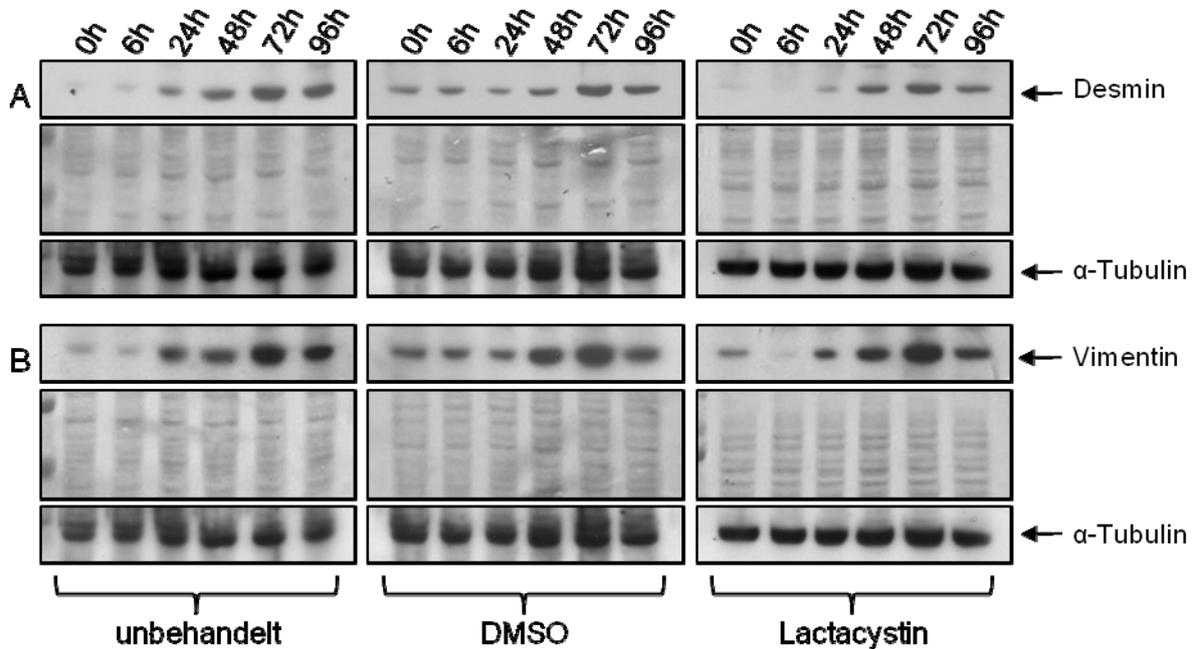
**Abb. 40: Lichtmikroskopische Aufnahmen unbehandelter und mit Lactacystin behandelter RD/12-Zellen**

In der linken Spalte sind unbehandelte und in der rechten Spalte mit Lactacystin behandelte RD/12-Zellen abgebildet. Die Bilder zeigen jeweils proliferierende (A bzw. C) und differenzierende (B und D) Zellen 48 Stunden nach Einleitung der Differenzierung. Die Pfeile weisen auf die Zellformen hin, die zu dem Zeitpunkt für den entsprechenden Differenzierungsgrad charakteristisch waren. Die Stecknadeln weisen auf apoptotische bzw. nekrotische Zellen hin.

#### Analyse der Differenzierungsmarker Desmin und Vimentin

Die Analyse der Differenzierungsmarker bei mit Lactacystin behandelten RD/12-Zellen erfolgte wie bereits für Curcumin im vorherigen Abschnitt beschrieben. Als Folge der Lactacystin-Behandlung kam es, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, zu einem verzögerten Anstieg der Desmin- und Vimentin-Proteinkonzentration während der Differenzierung (Abb. 41: A und B).

Zusammenfassend konnte mit diesen Versuchen nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit Lactacystin hinsichtlich der Differenzierungsmarker zu einer Verzögerung des Differenzierungsprozesses und weiterhin zu einer lichtmikroskopisch sichtbaren Verzögerung des Auftretens apoptotischer und nekrotischer Zellen führte.



**Abb. 41: Untersuchung der Differenzierungsmarker Desmin und Vimentin in unbehandelten, in DMSO-behandelten und in Lactacystin-behandelten RD/12-Zellen**  
 Es wurden zytosolische Proteinproben aus proliferierenden bzw. differenzierenden RD/12-Zellen gewonnen. Hiervon wurden 10µg Protein pro Spur aufgetragen und unter Verwendung des *Western Blot*-Verfahren analysiert. Die Autoradiogramme in der linken Spalte zeigen Lysate aus unbehandelten Zellen. In der Mitte sind die Autoradiogramme der mit DMSO behandelten Zellen und rechts die der mit Lactacystin behandelten Zellen zu sehen. Es konnten die spezifischen Banden für Desmin bei 54kDa (A: jeweils oben) und Vimentin bei 53kDa (B: jeweils oben) detektiert werden. Die gleichmäßige Beladung der Spuren wurde jeweils durch eine Ponceau S-Färbung (A und B: Mitte) und anhand des *Housekeeping*-Proteins α-Tubulin (A und B: unten) überprüft.

#### 4.2.3.2.2.3 Expression des *traf6*-Gens in mit Lactacystin behandelten RD/12-Zellen

Die Untersuchung der *traf6*-Expression wurde auf Proteinebene mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens durchgeführt.

Wie bereits für RD/18-Zellen beschrieben, bewirkte auch in RD/12-Zellen die Lactacystin-Behandlung keine Veränderung der intrazellulären TRAF6-Proteinkonzentration (Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.4 Untersuchung der Rhabdomyosarkomzelllinie CCA

Die Untersuchung der Rhabdomyosarkomzelllinie CCA erfolgte, wie schon die Untersuchung der RD/18- und RD/12-Zelllinie, nach dem gleichen Schema wie die Untersuchung der C2C12-Zelllinie. Zu diesem Zweck wurden die CCA-Zellen bis zu einer Konfluenz von 90-100% in serumreichem Proliferationsmedium kultiviert und dann die Differenzierung durch einen Wechsel des serumreichen Mediums zu serumarmem Differenzierungsmedium eingeleitet. Wie zuvor bei den anderen Zelllinien, wurde kurz vor Einleitung der Differenzierung die erste zu analysierende Probe gewonnen (0 Stunden). Die nachfolgenden Proben wurden ebenfalls nach 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden in Differenzierungsmedium geerntet.

Wie RD/12-Zellen durchlaufen auch CCA-Zellen keine Differenzierung im eigentlichen Sinne. Trotzdem wird in den nachfolgenden Ausführungen wie bei den RD/12-Zellen der Einfachheit halber der Begriff „Differenzierung“ verwendet. Es soll dabei aber nochmals betont werden, dass hiermit lediglich die in den Zellen ablaufenden Prozesse nach Entzug des serumreichen Mediums und nicht eine myogene Differenzierung im eigentlichen Sinne gemeint sind.

##### 4.2.4.1 *NF-κB*-Aktivität und *traf6*-Expression bei der Differenzierung

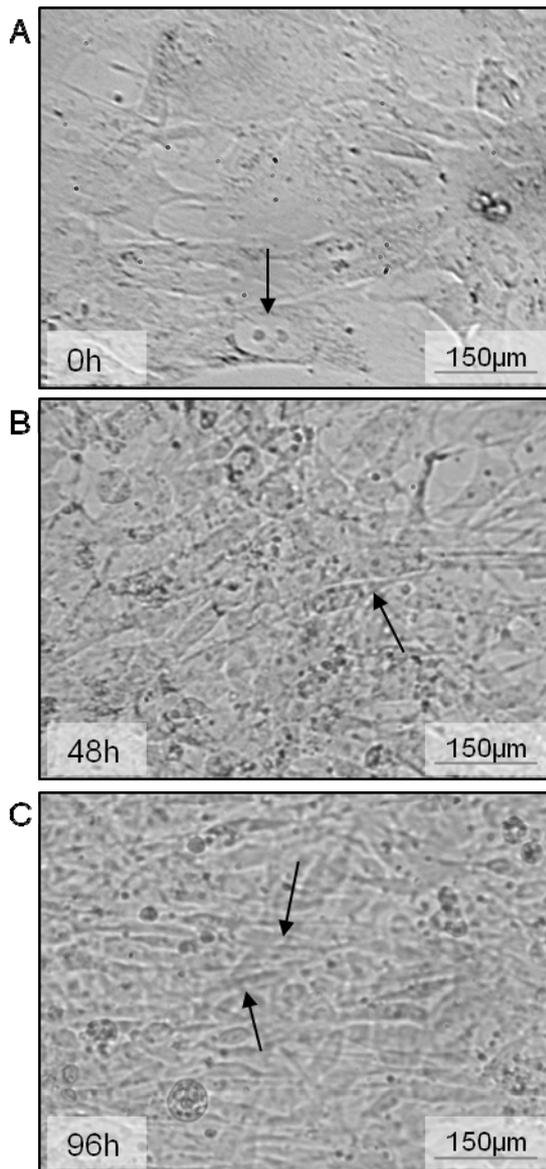
Wie bei der Untersuchung der C2C12-Zellen und der Zellen der Rhabdomyosarkomzelllinien RD/18 und RD/12 wurde zuerst der ordnungsgemäße Ablauf des Differenzierungsprozesses lichtmikroskopisch und anhand der Expression spezifischer Differenzierungsmarker untersucht. Daran anschließend erfolgten die Untersuchung der *NF-κB*-Aktivität und die Untersuchung des *traf6*-Expressionsmusters.

###### 4.2.4.1.1 Differenzierungsprozess der CCA-Zellen

###### Lichtmikroskopische Untersuchung

Das morphologische Erscheinungsbild der CCA-Zellen wurde von De Giovanni *et al.* (1989) folgendermaßen beschrieben: „sie haben ein heterogenes, fibroblastenähnliches Aussehen, sind oft granuliert, sind teilweise zweikernig und sind zum Teil von langer und dünner Gestalt“. Weiterhin konnten De Giovanni *et al.* (1989) nachweisen, dass bei CCA-Zellen keine Fusion der Zellen zu mehrkernigen, myotubenähnlichen Strukturen stattfindet.

Wie in Abbildung 42 (A) zu sehen, hatten auch die hier untersuchten CCA-Zellen vor Einleitung der Differenzierung eine uneinheitliche Gestalt, bei einem Großteil der Zellen war ein granuliertes Zytoplasma zu beobachten und zum Teil waren zwei Zellkerne in einer Zelle sichtbar (Abb. 42: A, Pfeil). Außerdem waren auch einige längliche Zellen zu beobachten. 48 Stunden nach Differenzierungseinleitung war die Gestalt der CCA-Zellen nach wie vor uneinheitlich. Allerdings konnten vermehrt längliche Zellen (Abb. 42: B, Pfeil) sowie die Zunahme der Zelldichte und eine Größenabnahme der CCA-Zellen beobachtet werden. Weitere 48 Stunden später war eine größere Anzahl länglicher Zellen erkennbar (Abb. 42: C, Pfeile), die scheinbar parallel angeordnet waren. Zusätzlich hatte die Zelldichte weiter zugenommen.



**Abb. 42: Lichtmikroskopische Aufnahmen nativer CCA-Zellen**

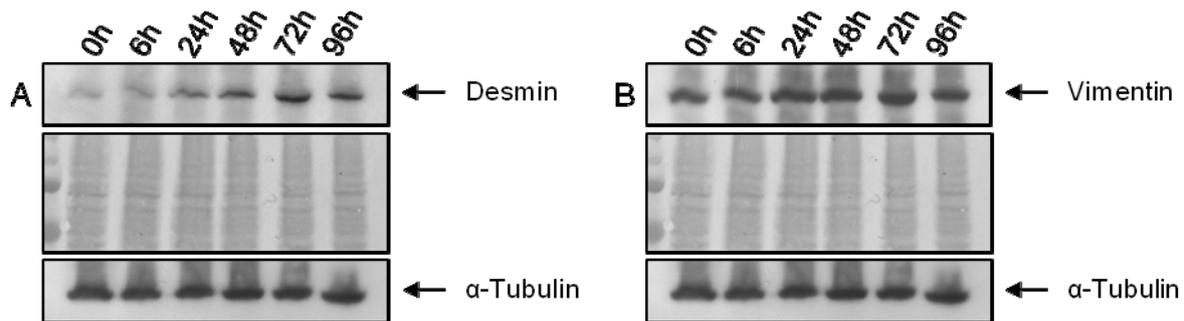
Die Bilder zeigen CCA-Zellen kurz vor der Differenzierungseinleitung (A) und 48 Stunden (B) bzw. 96 Stunden (C) nach Induktion der Differenzierung. Die Pfeile zeigen auf die für den entsprechenden Differenzierungsgrad typischen Zellformen.

### Analyse der Differenzierungsmarker Desmin und Vimentin

De Giovanni *et al.* (1989) konnten einen Anstieg der *desmin*- und *vimentin*-Expression im Differenzierungsverlauf der CCA-Zellen nachweisen.

Um diese für CCA-Zellen spezifischen Differenzierungsmarker zu untersuchen, wurden zytosolische Proteinproben gewonnen und mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens analysiert. In Abbildung 43 (A) ist deutlich erkennbar, dass auch in den hier untersuchten CCA-Zellen ein Anstieg der Desmin-Proteinkonzentration ab etwa 24 Stunden nach Einleitung der Differenzierung erfolgte. Des Weiteren ist in Abbildung 43 (B) zu sehen, dass auch die Vimentin-Proteinkonzentration nach Differenzierungseinleitung anstieg.

Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung und der Analyse der Differenzierungsmarker zeigten somit, dass der Differenzierungsprozess der CCA-Zellen in unseren Händen ordnungsgemäß verlief.



**Abb. 43: Untersuchung der Differenzierungsmarker Desmin und Vimentin in CCA-Zellen**

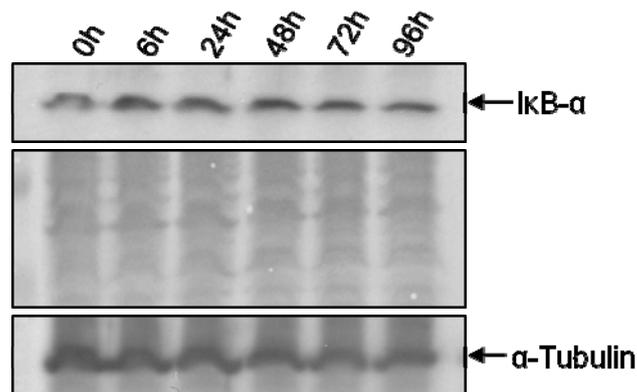
Es wurden Proteinproben aus proliferierenden bzw. differenzierenden CCA-Zellen mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens analysiert. Pro Spur wurden je 10 $\mu$ g Protein aufgetragen. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper konnte die für Desmin charakteristische Bande bei 54kDa (A: oben) und die für Vimentin charakteristische Bande bei 53kDa (B: oben) detektiert werden. Die Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Spuren erfolgte durch eine Ponceau S-Färbung (jeweils Mitte) und anhand des *Housekeeping*-Proteins  $\alpha$ -Tubulin (jeweils unten).

#### 4.2.4.1.2 NF- $\kappa$ B-Aktivität in CCA-Zellen

Die Analyse der NF- $\kappa$ B-Aktivität in den CCA-Zellen erfolgte analog zur Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Aktivität in den C2C12-, RD/18- und RD/12-Zellen, also durch die Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration, durch die Untersuchung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung und durch die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des NF- $\kappa$ B.

##### Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration im Differenzierungsverlauf

Für die Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Proteinkonzentration in CCA-Zellen wurden zytosolische Proteinproben aus drei voneinander unabhängigen Versuchen gewonnen und unter Zuhilfenahme des *Western Blot*-Verfahrens analysiert. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden verglichen und ein repräsentatives Beispiel in Abbildung 44 dargestellt. Zusammenfassend zeigte sich, dass die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Proteinkonzentration im Differenzierungsverlauf in CCA-Zellen annähernd unverändert blieb.

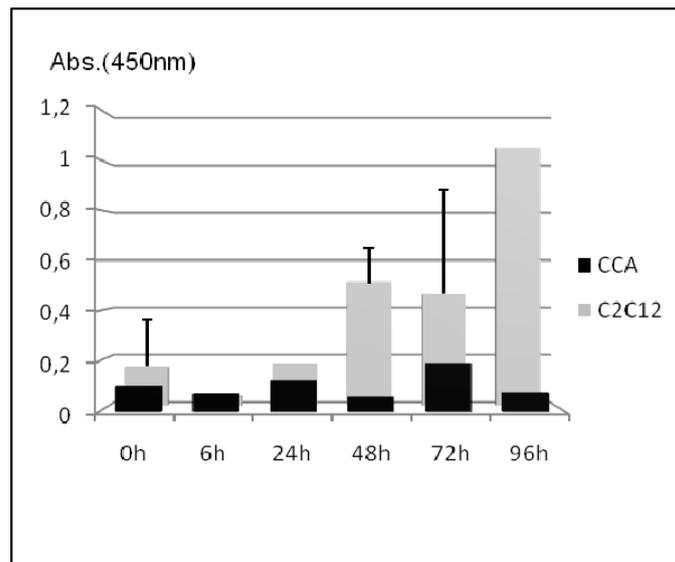


**Abb. 44: Western Blot-Analyse der IκB-α-Konzentration in CCA-Zellen**

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden zytosolische Proteinproben aus proliferierenden bzw. differenzierenden CCA-Zellen gewonnen und mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens untersucht. Es wurden pro Spur 40µg Protein aufgetragen. Durch Inkubation mit einem IκB-α-Antikörper konnte eine für IκB-α spezifische Bande bei 37kDa detektiert werden (oben). Zur Kontrolle der einheitlichen Beladung der Spuren wurde eine Ponceau S-Färbung durchgeführt (Mitte) und das *Housekeeping*-Protein α-Tubulin herangezogen (unten).

#### Untersuchung der NF-κB-DNA-Bindung im Differenzierungsverlauf

Zur Analyse der NF-κB-DNA-Bindung wurden nukleäre Proteinproben gewonnen und mit dem bereits für C2C12-Zellen beschriebenen ELISA-Verfahren untersucht (siehe 4.2.1.1.2). Während des Differenzierungsverlaufes der CCA-Zellen waren gewisse Schwankungen der NF-κB-Aktivität zu beobachten (Abb. 45: schwarz). Im Vergleich zum Anstieg der NF-κB-Aktivität im Differenzierungsverlauf der C2C12-Zellen (grau) waren diese Schwankungen jedoch sehr gering und hatten keine eindeutige Tendenz im Verlauf der Differenzierung. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die NF-κB-Aktivität während der Differenzierung in CCA-Zellen nahezu gleich und im Vergleich zu den C2C12-Zellen auf einem niedrigen Niveau blieb.



**Abb. 45: ELISA-Analyse der NF-κB-Aktivität in CCA-Zellen**

Es wurden nukleäre Proteinproben aus proliferierenden (0 Stunden) und differenzierenden (nach 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden) CCA-Zellen gewonnen. Die Analyse der Proben erfolgte mit Hilfe des ELISA-Verfahrens. Die Absorption wurde bei 450nm gemessen.

Im Hintergrund ist zum Vergleich die ELISA-Analyse der NF-κB-Aktivität der C2C12-Zellen zu sehen.

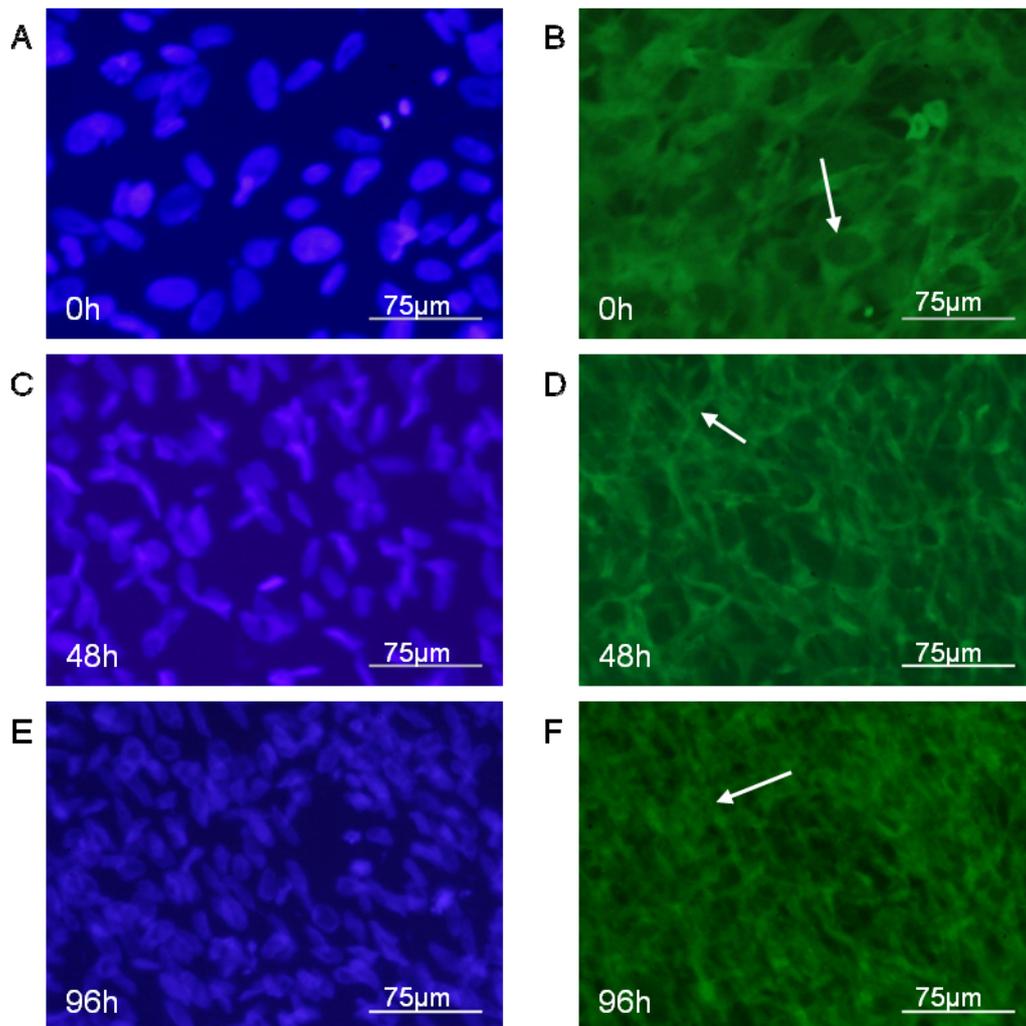
#### Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des NF-κB im Differenzierungsverlauf

Die Bestimmung der intrazellulären Lokalisation des NF-κB wurde wie für C2C12-Zellen beschrieben durchgeführt (siehe 4.2.1.1.2).

Vor Einleitung der Differenzierung (Abb. 46: B) war im Zytoplasma der CCA-Zellen eine starke, in den Zellkernen jedoch nur eine sehr schwache NF-κB-spezifische Fluoreszenz sichtbar. Hierdurch ließen sich die Zellkerne gut vom Zytoplasma der Zellen abgrenzen. 48 Stunden nach Differenzierungseinleitung war eine Abnahme der Zellgröße sowie eine Zunahme der Zelldichte zu beobachten. Wie in Abbildung 46 (D) zu erkennen, lagen die Zellen zusätzlich geschichtet übereinander, wodurch eine intrazelluläre Zuordnung der NF-κB-spezifischen Fluoreszenz sehr schwierig wurde. An einigen Zellen konnte jedoch ein stärker gefärbtes Zytoplasma von einem sehr gering gefärbten Zellkern abgegrenzt werden (Pfeil). Nach weiteren 48 Stunden in Differenzierungsmedium war ein noch stärkerer Anstieg der Zelldichte sichtbar (Abb. 46: F). Zu diesem Zeitpunkt war es daher unmöglich, eine Aussage bezüglich der Lokalisation der NF-κB-spezifischen Fluoreszenz zu treffen.

Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass zumindest bis 48 Stunden nach Differenzierungseinleitung die NF-κB-Aktivität unverändert blieb.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse der Untersuchung der IκB-α-Konzentration, der Untersuchung der NF-κB-DNA-Bindung und der Analyse der intrazellulären Lokalisation des NF-κB somit eine unveränderte NF-κB-Aktivität innerhalb des Differenzierungsprozesses der CCA-Zellen.



**Abb. 46: NF-κB-Immunfluoreszenz von CCA-Zellen**

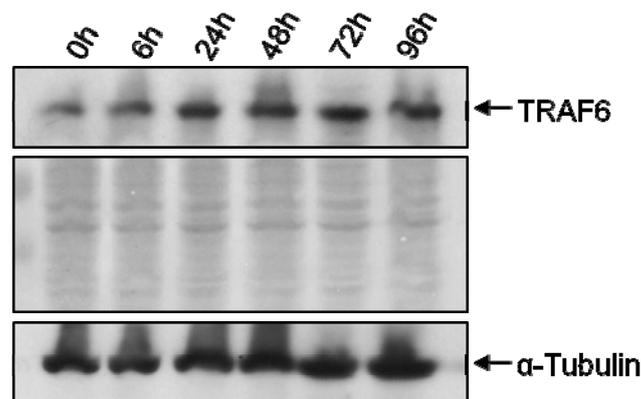
Es wurden proliferierende (0 Stunden) und differenzierende (48 und 96 Stunden nach Differenzierungseinleitung) CCA-Zellen fixiert. Nach der Inkubation mit einem primären, gegen die p65-Untereinheit des NF-κB gerichteten Antikörper, konnte durch einen zweiten, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper die Lokalisation des NF-κB sichtbar gemacht werden. Auf der linken Seite sind zur Orientierung die durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI sichtbar gemachten Zellkerne abgebildet. Auf der rechten Seite sind die entsprechenden Immunfluoreszenzen zu sehen.

#### 4.2.4.1.3 Expression des *traf6*-Gens in CCA-Zellen

Die Untersuchung der Expression des *traf6*-Gens wurde auf Proteinebene durchgeführt. Hierfür wurden zytosolische Proteinproben aus drei voneinander unabhängigen Versuchen gewonnen und unter Zuhilfenahme des *Western Blot*-Verfahrens analysiert.

In allen drei Versuchen wurde ein Anstieg der TRAF6-Proteinkonzentration im Zuge der Differenzierung sichtbar. Ein für diese Versuche charakteristisches Ergebnis ist in Abbildung 47 abgebildet – es ist ein deutlicher Anstieg der TRAF6-Proteinkonzentration etwa 24 Stunden nach Differenzierungseinleitung sichtbar.

Somit konnte auch für die letzte der drei in dieser Arbeit untersuchten Rhabdomyosarkomzelllinien ein Anstieg der TRAF6-Proteinkonzentration im Differenzierungsverlauf nachgewiesen werden.



**Abb. 47: Western Blot-Analyse der *traf6*-Expression**

Proteinproben aus proliferierenden bzw. differenzierenden CCA-Zellen wurden per *Western Blot*-Verfahren untersucht. Es wurden pro Spur 10µg Protein aufgetragen. Mit Hilfe eines TRAF6-Antikörpers konnte eine für TRAF6 spezifische Bande bei 58kDa detektiert werden (oben). Die gleichmäßige Beladung der Spuren wurde durch eine Ponceau S-Färbung (Mitte) und anhand des *Housekeeping*-Proteins  $\alpha$ -Tubulin (unten) überprüft.

Man beachte den Anstieg der TRAF6-Proteinkonzentration im Differenzierungsverlauf.

#### 4.2.4.2 Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität

Wie zuvor bei der Untersuchung der C2C12-, RD/18- und RD/12-Zellen wurde auch bei CCA-Zellen der Einfluss der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf den Differenzierungsprozess mit Hilfe der NF- $\kappa$ B-Inhibitoren Curcumin und Lactacystin untersucht.

##### 4.2.4.2.1 Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin

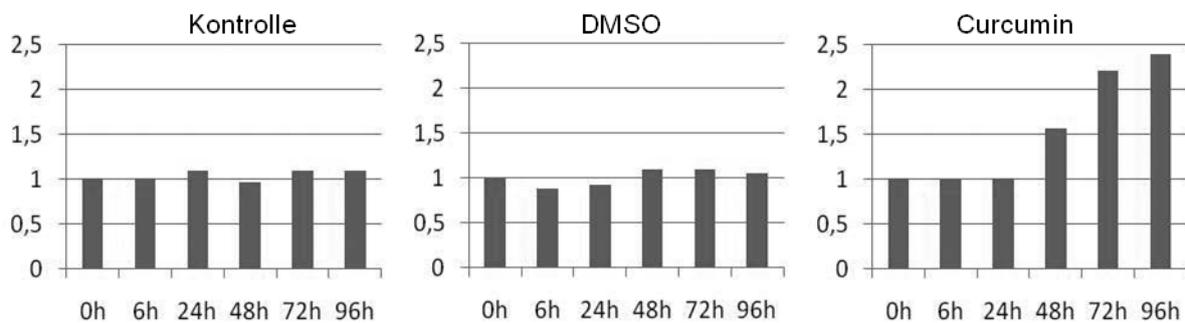
Die Behandlung der CCA-Zellen mit Curcumin wurde wie für die C2C12-Zellen beschrieben durchgeführt (siehe 4.2.1.2.1). Die erfolgreiche Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität wurde anhand der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration überprüft. Darauf folgend wurde die Auswirkung von Curcumin auf den Differenzierungsprozess und die *traf6*-Expression untersucht.

###### 4.2.4.2.1.1 NF- $\kappa$ B-Aktivität in mit Curcumin behandelten CCA-Zellen

###### Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration im Differenzierungsverlauf

Für die Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration in CCA-Zellen wurden zytosolische Proteinlysate gewonnen und unter Verwendung des *Western Blot*-Verfahrens analysiert. Anschließend wurde die Intensität der I $\kappa$ B- $\alpha$ -spezifischen Banden in Relation zu der entsprechenden Ladekontrolle gesetzt (Abb. 48). Hierdurch wurde deutlich, dass die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration bei den unbehandelten CCA-Zellen im Differenzierungsverlauf nahezu unverändert blieb und im Gegensatz hierzu die I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration in den mit Curcumin behandelten Zellen ab 48 Stunden nach Behandlung kontinuierlich anstieg. Hieraus lässt

sich folgern, dass der Anstieg der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration ein Resultat der Behandlung mit Curcumin war und dass diese somit erfolgreich war.



**Abb. 48: Schematische Darstellung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration in unbehandelten, in mit DMSO behandelten und in mit Curcumin behandelten CCA-Zellen**

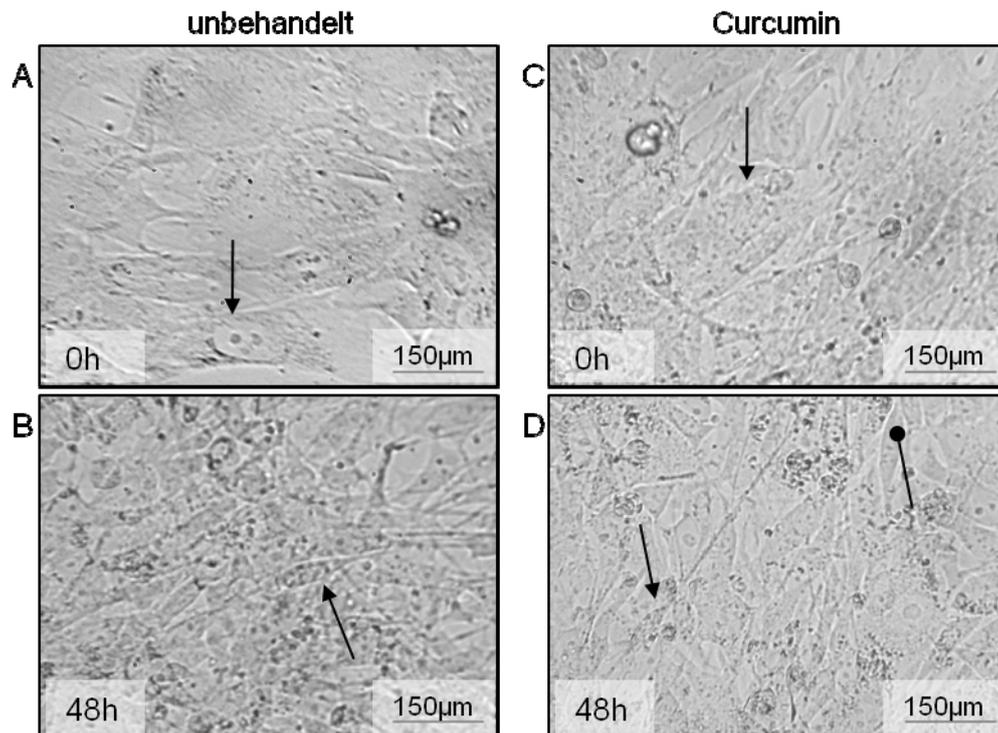
Die Intensität der I $\kappa$ B- $\alpha$ -spezifischen Banden wurde densitometrisch quantifiziert und in Relation zur Intensität der Ponceau S-Färbungen gesetzt. Die Ergebnisse für die unterschiedlichen Zeitwerte wurden im Säulendiagramm dargestellt. Hierbei wurde der 0-Stundenwert mit eins festgelegt und die anderen Werte entsprechend umgerechnet.

#### 4.2.4.2.1.2 Differenzierungsprozess der mit Curcumin behandelten CCA-Zellen

Der Einfluss der Curcumin-Behandlung auf den Differenzierungsprozess wurde wiederum lichtmikroskopisch und anhand der Expression spezifischer Differenzierungsmarker untersucht.

##### Lichtmikroskopische Untersuchung

Die Behandlung mit Curcumin verursachte eine Zunahme apoptotischer bzw. nekrotischer CCA-Zellen 48 Stunden nach Differenzierungseinleitung (Abb. 49: D, Stecknadel). Dies war jedoch die einzige lichtmikroskopisch sichtbare Veränderung, die durch die Behandlung mit Curcumin hervorgerufen wurde. Unmittelbar nach der Behandlung (also noch vor Differenzierungseinleitung), sowie 48 und 96 Stunden nach Einleitung der Differenzierung waren keine morphologischen Unterschiede zwischen den unbehandelten und den mit Curcumin behandelten CCA-Zellen sichtbar.



**Abb. 49: Lichtmikroskopische Aufnahmen unbehandelter und Curcumin-behandelter CCA-Zellen**

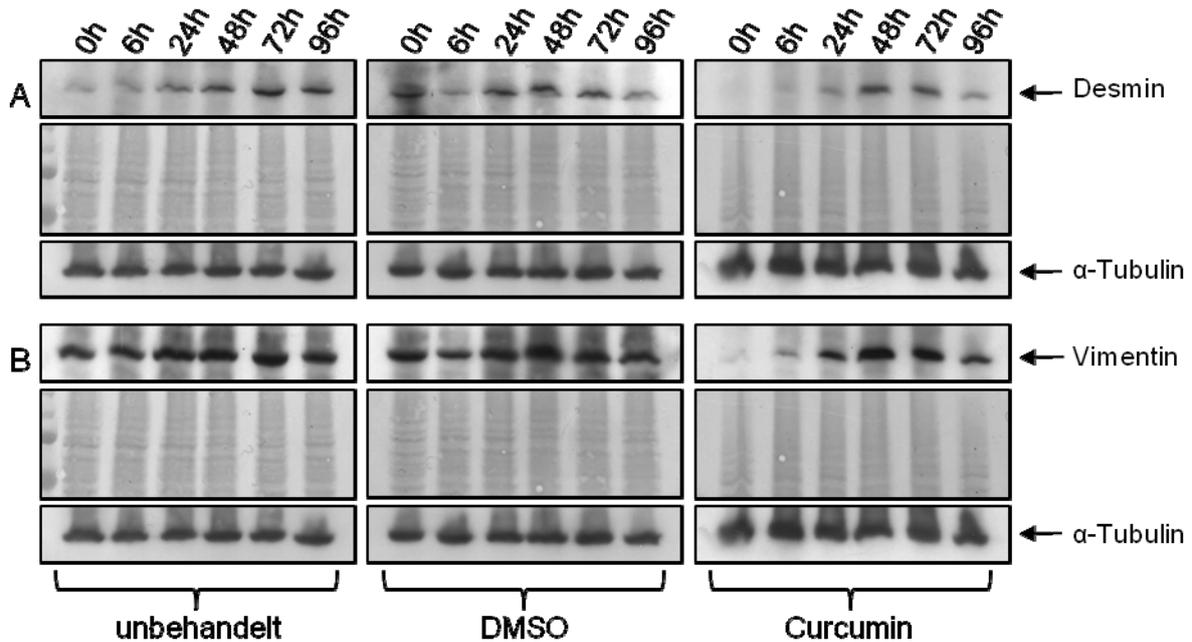
Auf der linken Seite sind unbehandelte und auf der rechten Seite mit Curcumin behandelte CCA-Zellen abgebildet. Auf den Bildern sind jeweils proliferierende (A bzw. C) und differenzierende (B bzw. D) Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Differenzierung zu sehen. Die Pfeile zeigen auf die für den entsprechenden Differenzierungsgrad typischen Zellformen. Die Stecknadel weist auf apoptotische bzw. nekrotische Zellen hin.

#### Analyse der Differenzierungsmarker Desmin und Vimentin

Um die Auswirkungen der Curcumin-Behandlung auf die Expression der für Desmin und Vimentin kodierenden Gene auf Proteinebene zu untersuchen, wurden zytosolische Proteinlysate geerntet und mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens analysiert.

In Abbildung 50 ist gut zu sehen, dass in den mit Curcumin behandelten Zellen erst 24 Stunden nach Induktion der Differenzierung ein langsamer Anstieg der Desmin- und Vimentin-Proteinkonzentration erfolgte, während bei den Kontrollzellen unmittelbar nach Einleitung der Differenzierung ein kontinuierlicher Anstieg der Desmin- und Vimentin-Proteinkonzentration sichtbar war. Weiterhin konnte in den mit Curcumin behandelten Zellen eine deutlich verringerte Desmin- und Vimentin-Basalkonzentration (Abb. 50: 0h) im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Curcumin-Behandlung hinsichtlich der Differenzierungsmarker zu einer Verzögerung der Differenzierung führte.



**Abb. 50: Untersuchung der Differenzierungsmarker Desmin und Vimentin in unbehandelten, in DMSO-behandelten und in Curcumin-behandelten CCA-Zellen**

Aus proliferierenden bzw. differenzierenden CCA-Zellen wurden zytosolische Proteinproben gewonnen. Pro Spur wurden 10µg Protein aufgetragen und mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens untersucht. Die Autoradiogramme in der linken Spalte zeigen Lysate aus unbehandelten Zellen. In der Mitte sind die Autoradiogramme der mit DMSO behandelten und rechts die der mit Curcumin behandelten Zellen zu sehen. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper konnte die für Desmin charakteristische Bande bei 54kDa (A: jeweils oben) und die für Vimentin charakteristische Bande bei 53kDa (B: jeweils oben) detektiert werden. Die Überprüfung der einheitlichen Beladung der Spuren erfolgte durch Ponceau S-Färbungen (A und B: jeweils Mitte) und anhand des *Housekeeping*-Proteins α-Tubulin (A und B: jeweils unten).

#### 4.2.4.2.1.3 Expression des *traf6*-Gens in mit Curcumin behandelten CCA-Zellen

Die Analyse der *traf6*-Expression erfolgte auf Proteinebene. Wie auch bei den zuvor untersuchten Zelllinien erzeugte bei CCA-Zellen die Blockierung des NF-κB durch Curcumin keine auf Proteinebene nachweisbare Veränderung der *traf6*-Expression (Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.4.2.2 Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Lactacystin

Die Behandlung der CCA-Zellen mit Lactacystin wurde wie die Lactacystin-Behandlung der C2C12-Zellen durchgeführt (siehe 4.2.1.2.2). Die Ergebnisse dieser Versuche waren jedoch zu heterogen, um zum jetzigen Zeitpunkt eine Aussage über mögliche Effekte machen zu können.

### 4.3 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Nachfolgend sind die Ergebnisse aus den in den vorangehenden Abschnitten beschriebenen Untersuchungen (4.1-4.2) tabellarisch zusammengefasst. Der Schwerpunkt soll dabei auf dem Vergleich der vier in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien, deren Eigenschaften in den vorangegangenen Abschnitten separat dargestellt wurden, liegen. Im Folgenden soll zunächst auf die Untersuchungen zur NF- $\kappa$ B-Aktivität in proliferierenden und differenzierenden Zellen eingegangen werden. Im Anschluss daran werden die Studien zur Regulation der *traf6*-Genexpression vergleichend dargestellt.

#### 4.3.1 NF- $\kappa$ B-Aktivität in unbehandelten, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, die Aktivität des NF- $\kappa$ B in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen zu untersuchen. Hierfür wurden die NF- $\kappa$ B-Basalaktivität (also in proliferierenden Zellen) und die NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf bestimmt. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse zur Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Basalaktivität, wie sie mit Hilfe der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration bestimmt wurde, dargestellt (die NF- $\kappa$ B-Aktivität verhält sich invers zur I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration). Die Ergebnisse zeigen, dass die Höhe der NF- $\kappa$ B-Basalaktivität der C2C12-Zellen in der Mitte, zwischen der Basalaktivität der RD- und CCA-Zellen lag. In RD-Zellen war die NF- $\kappa$ B-Aktivität deutlich höher als in den C2C12-Zellen und in CCA-Zellen war die NF- $\kappa$ B-Aktivität etwas niedriger als in den C2C12-Zellen.

Es ist aber noch einmal darauf hinzuweisen, dass ein Vergleich zwischen den untersuchten Zelllinien nur eingeschränkt möglich ist, da sie keine klonalen Varianten voneinander sind und teilweise aus verschiedenen Spezies stammen (Maus bzw. Mensch). Lediglich RD/12- und RD/18-Zellen entstammen aus demselben Klon und können somit direkt miteinander verglichen werden.

#### NF- $\kappa$ B-Basalaktivität:

	C2C12	RD/18	RD/12	CCA
<ul style="list-style-type: none"> <li>I<math>\kappa</math>B-<math>\alpha</math>-Konzentration (im Vergleich zur basalen Konzentration in C2C12-Zellen, die mit 1 festgelegt wurde)</li> </ul>	1	0,25	0,1	1,5

**Tab. 4: Übersicht über die Untersuchungsergebnisse zur NF- $\kappa$ B-Basalaktivität in den einzelnen Zelllinien.**

Die NF- $\kappa$ B-Basalaktivität der Zellen wurde durch die Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration bestimmt. Da sich die NF- $\kappa$ B-Aktivität invers zur I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration verhält, ist die NF- $\kappa$ B-Aktivität in den Zellen mit den niedrigsten I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentrationen (RD/12 und RD/18) am höchsten.

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Methoden zur Analyse der NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf herangezogen. Die qualitative Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 5 abgebildet. Wie in der ersten Spalte zu sehen, waren die Ergebnisse der NF- $\kappa$ B-Aktivitätsuntersuchung bei den C2C12-Zellen im Differenzierungsverlauf widersprüchlich. Während die Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration auf ein Absinken der NF- $\kappa$ B-Aktivität hinwies, zeigten die Untersuchung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung und der intrazellulären Lokalisation des NF- $\kappa$ B einen Anstieg der NF- $\kappa$ B-Aktivität nach Induktion der Differenzierung.

Im Gegensatz dazu konnte bei den Rhabdomyosarkomzelllinien RD/18, RD/12 und CCA durch alle drei Methoden eine annähernd gleichbleibende NF- $\kappa$ B-Aktivität nachgewiesen werden. Lediglich bei RD/18-Zellen deutete die Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration einen leichten Abfall der NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf an.

### NF- $\kappa$ B-Aktivität während der Differenzierung:

	C2C12	RD/18	RD/12	CCA
• I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration	↓↓↓	↓	↔	↔
• NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung	↑↑↑	↔	↔	↔
• Intrazelluläre Lokalisation des NF- $\kappa$ B	↑↑	↔	↔	↔

**Tab. 5: Übersicht über die Untersuchungsergebnisse zur Regulation der NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf**

Die Ergebnisse zur Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Aktivität aus den vorangehenden Abschnitten wurden tabellarisch zusammengefasst. In der ersten Spalte ist die jeweilige Untersuchungsmethode aufgeführt. In den vier folgenden Spalten sind die entsprechenden Ergebnisse für die jeweiligen Zelllinien in qualitativer Bewertung dargestellt. Hierzu wurden die Untersuchungsergebnisse jeweils mit Pfeilen bewertet, wobei eine starke Zu- oder Abnahme mit drei Pfeilen und eine schwache Zu- oder Abnahme nur mit einem Pfeil bewertet wurde. Die Pfeile in dieser Tabelle beziehen sich auf die Zu- oder Abnahme der NF- $\kappa$ B-Aktivität. So war z.B. bei C2C12-Zellen ein deutlicher Anstieg der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Konzentration zu sehen, da dieser aber mit der entsprechenden Abnahme der NF- $\kappa$ B-Aktivität gleichzusetzen ist, wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivität in der Tabelle mit drei abwärtsgerichtete Pfeilen bewertet. Der waagerechte Pfeil steht für eine unveränderte NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf.

Besonders auffällige oder widersprüchliche Ergebnisse wurden grau unterlegt.

### 4.3.2 Auswirkung der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf die Differenzierung von nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen

Nach der Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Basalaktivität und der Analyse der NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf wurden die Auswirkungen der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf den Differenzierungsprozess lichtmikroskopisch und anhand der Analyse der Expression ausgewählter, für die jeweiligen Zelllinien geeigneter Differenzierungsmarker, untersucht.

Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, führte die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin häufig zu einem Anstieg apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen (nicht bei RD/12-Zellen) und bei allen Zelllinien mit Ausnahme der RD/18-Zellen zu einem verzögerten Einsetzen der *desmin*-Expression. Weiterhin konnte bei C2C12-Zellen eine leichte und bei RD/18-Zellen eine deutlichere Verzögerung der *myogenin*-Induktion beobachtet werden. In C2C12-Zellen setzte die *caveolin-3*-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen stark verzögert ein. Bei RD/18-Zellen war unmittelbar nach der Behandlung ein starker Anstieg der *p21*-Expression sichtbar. Unmittelbar nach der Behandlung mit Curcumin, also bereits vor Differenzierungseinleitung, konnte bei RD/12- und CCA-Zellen ein Abfall der *desmin*- und *vimentin*-Expression unter die Basalexpression der unbehandelten Zellen beobachtet werden (nicht in der Tabelle gezeigt). Weiterhin führte bei CCA-Zellen die Curcumin-Behandlung zu einem stark verzögerten Einsetzen der *vimentin*-Expression.

Die Blockierung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Lactacystin (Tab. 7) verursachte bei C2C12- und RD/18-Zellen eine lichtmikroskopisch sichtbare Verzögerung des Differenzierungsprozesses. Des Weiteren erfolgte bei C2C12-Zellen die *myogenin*-Induktion stark und bei RD/18-Zellen leicht verzögert. Zusätzlich war bei beiden Zelllinien die *p21*-Expression unmittelbar nach der Lactacystin-Behandlung stark erhöht. Als einzige Unterschiede zwischen diesen beiden Zelllinien waren bei C2C12-Zellen eine verzögerte *caveolin-3*-Induktion (dieser Marker wurde jedoch für RD/18-Zellen nicht untersucht) und bei RD/18-Zellen eine unregelmäßige *desmin*-Expression sichtbar.

Bei RD/12-Zellen führte die Lactacystin-Behandlung zu einem stark verzögerten Einsetzen der *desmin*- und *vimentin*-Expression. Zusätzlich sank in den mit Lactacystin behandelten RD/12-Zellen die *desmin*-Expression schon unmittelbar nach der Behandlung unter die *desmin*-Basalexpression der unbehandelten RD/12-Zellen (nicht in der Tabelle gezeigt).

**Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Curcumin:**

		C2C12	RD/18	RD/12	CCA
<b>Lichtmikroskopisch sichtbare Veränderungen:</b>					
• apoptotische bzw. nekrotische Zellen		↑↑	↑↑	↔	↑↑
• verzögerte Differenzierung		↔	↔	↔	↔
<b>Veränderung in der Expression der Differenzierungsmarker: (für jede Zelllinie wurden nur die jeweils charakteristischen Marker untersucht)</b>					
• Desmin	Induktionszeitpunkt	↓↓↓	↔	↓↓↓	↓↓↓
	Expressionsstärke	↓	↔	↓	↔
• Myogenin	Induktionszeitpunkt	↓	↓↓		
	Expressionsstärke	↔	↔		
• p21	Induktionszeitpunkt	↔	↑↑↑		
	Expressionsstärke	↔	↑↑↑		
• Caveolin-3	Induktionszeitpunkt	↓↓↓			
	Expressionsstärke	↓			
• Vimentin	Induktionszeitpunkt			↔	↓↓↓
	Expressionsstärke			↔	↔

**Tab. 6: Übersicht über die Auswirkungen der Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Curcumin auf den Differenzierungsprozess**

Die Auswirkungen der Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Curcumin auf den Differenzierungsprozess der untersuchten Zelllinien sind in der Tabelle zusammengefasst. In der ersten Spalte sind die untersuchten Eigenschaften aufgeführt. In den folgenden vier Spalten sind die entsprechenden Ergebnisse für die jeweiligen Zelllinien in qualitativer Bewertung dargestellt. Hierzu wurden die Untersuchungsergebnisse jeweils mit Pfeilen bewertet, wobei eine starke Zu- oder Abnahme mit drei Pfeilen und eine schwache Zu- oder Abnahme nur mit einem Pfeil bewertet wurde. Der waagerechte Pfeil steht für eine unveränderte Induktion bzw. Expression im Differenzierungsverlauf.

Besonders auffällige oder widersprüchliche Ergebnisse wurden dabei grau unterlegt.

**Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Lactacystin:**

		C2C12	RD/18	RD/12	CCA
<b>Lichtmikroskopisch sichtbare Veränderungen:</b>					
• apoptotische bzw. nekrotische Zellen		↔	↔	↔	N/V
• verzögerte Differenzierung		↑↑	↑↑	↔	N/V
<b>Veränderung in der Expression der Differenzierungsmarker: (für jede Zelllinie wurden nur die jeweils charakteristischen Marker untersucht)</b>					
• Desmin	Induktionszeitpunkt	↔	↔	↓↓↓	N/V
	Expressionsstärke	↔	↓↑	↔	N/V
• Myogenin	Induktionszeitpunkt	↓↓↓	↓		
	Expressionsstärke	↔	↓		
• p21	Induktionszeitpunkt	↑↑↑	↑↑↑		
	Expressionsstärke	↑↑	↑↑		
• Caveolin-3	Induktionszeitpunkt	↓↓↓			
	Expressionsstärke	↔			
• Vimentin	Induktionszeitpunkt			↓↓↓	N/V
	Expressionsstärke			↔	N/V

**Tab. 7: Übersicht über die Auswirkungen der Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Lactacystin auf den Differenzierungsprozess**

Die Auswirkungen der Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Lactacystin auf den Differenzierungsprozess der untersuchten Zelllinien sind in der Tabelle zusammengefasst. In der ersten Spalte sind die untersuchten Eigenschaften aufgeführt. In den folgenden vier Spalten sind die entsprechenden Ergebnisse für die jeweiligen Zelllinien in qualitativer Bewertung dargestellt. Hierzu wurden die Untersuchungsergebnisse jeweils mit Pfeilen bewertet, wobei eine starke Zu- oder Abnahme mit drei Pfeilen und eine schwache Zu- oder Abnahme nur mit einem Pfeil bewertet wurde. Der waagerechte Pfeil steht für eine unveränderte Induktion bzw. Expression im Differenzierungsverlauf. N/V bedeutet „nicht verfügbar“.

Besonders auffällige oder widersprüchliche Ergebnisse wurden dabei grau unterlegt.

### 4.3.3 Expression des *traf6*-Gens in unbehandelten, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die *traf6*-Expression in proliferierenden und differenzierenden, nichttransformierten Myoblasten bzw. Rhabdosarkomzellen zu analysieren. Wie in Tabelle 8 zu sehen, war insgesamt die *traf6*-Basalexpression der Rhabdomyosarkomzelllinien deutlich höher als die der C2C12-Zellen. Es wird jedoch erneut darauf hingewiesen, dass ein Vergleich zwischen den untersuchten Zelllinien nur eingeschränkt möglich ist.

Weiterhin konnte bei allen drei Rhabdomyosarkomzelllinien ein Anstieg der *traf6*-Expression im Differenzierungsverlauf beobachtet werden, während bei C2C12-Zellen keine klare Tendenz bezüglich der *traf6*-Expression nach Induktion der Differenzierung sichtbar war.

	C2C12	RD/18	RD/12	CCA
<i>traf6</i> -Basalexpression (im Vergleich zur C2C12-Basalexpression, die mit 1 festgelegt wurde)	1	~3	~3	~2,5
<i>traf6</i> -Expression während der Differenzierung	↓↑	↑↑	↑↑	↑↑

**Tab. 8: Übersicht über Untersuchungsergebnisse zur *traf6*-Basalexpression und der *traf6*-Expression im Differenzierungsverlauf**

Die *traf6*-Basalexpression der einzelnen Zelllinien ist in der oberen Tabellenhälfte dargestellt. Hierbei ist das jeweilige Ergebnis in Relation zur Basalexpression der C2C12-Zellen (die gleich eins gesetzt wurde), zu sehen. Die Veränderungen der *traf6*-Expression im Differenzierungsverlauf sind in der unteren Tabellenhälfte zusammengefasst. Die Untersuchungsergebnisse wurden jeweils mit Pfeilen bewertet, wobei eine starke Zu- oder Abnahme mit drei Pfeilen und eine schwache Zu- oder Abnahme nur mit einem Pfeil bewertet wurde.

#### 4.3.4 Auswirkung der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf die *traf6*-Expression in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen

Da es aufgrund früherer Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe Hinweise darauf gab, dass ein Zusammenhang zwischen der NF- $\kappa$ B-Aktivität und der *traf6*-Expression bestehen könnte (Mueck *et al.*, 2011), wurde die *traf6*-Expression nach Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität in allen vier Zelllinien analysiert. Tabelle 9 zeigt jedoch, dass bei keiner der untersuchten Zelllinien die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität einen Einfluss auf die *traf6*-Expression hatte.

	C2C12	RD/18	RD/12	CCA
Unterschiede der <i>traf6</i> -Expression in mit Curcumin behandelten Zellen	↔	↔	↔	↔
Unterschiede der <i>traf6</i> -Expression in mit Lactacystin behandelten Zellen	↔	↔	↔	N/V

**Tab. 9: Übersicht über die Auswirkungen der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf die *traf6*-Expression**

Die Unterschiede bezüglich der *traf6*-Expression, welche durch die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin hervorgerufen wurden, sind in der oberen Tabellenhälfte zu sehen. In der unteren Hälfte sind die Veränderungen, die durch die Lactacystin-Behandlung verursacht wurden, zusammengefasst. Die Untersuchungsergebnisse wurden mit Pfeilen bewertet, wobei eine starke Zu- oder Abnahme mit drei Pfeilen und eine schwache Zu- oder Abnahme nur mit einem Pfeil bewertet wurde. Der waagerechte Pfeil steht für eine unveränderte Expression im Differenzierungsverlauf. N/V bedeutet „nicht verfügbar“.

## 5 DISKUSSION

Aufgrund kontroverser Untersuchungsergebnisse zur NF- $\kappa$ B-Aktivität während der normalen Myoblastendifferenzierung und des gänzlichen Fehlens von Untersuchungsergebnissen zur NF- $\kappa$ B-Aktivität während der Differenzierung von Rhabdomyosarkomzellen, wurde in dieser Arbeit zunächst die NF- $\kappa$ B-Aktivität in proliferierenden und differenzierenden nicht-transformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen untersucht. Daran anschließend erfolgte die Untersuchung der Auswirkungen der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf den Differenzierungsprozess von nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen.

Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe gaben Grund zu der Annahme, dass sich die *traf6*-Expression in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen unterscheidet. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die *traf6*-Expression während des Differenzierungsprozesses in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen analysiert. Zusätzlich deuteten diese vorangegangenen Untersuchungen an, dass das *traf6*-Gen der Regulation durch NF- $\kappa$ B unterliegen könnte. In diesem Zusammenhang wurde dann der Einfluss der Blockierung des NF- $\kappa$ B auf die *traf6*-Expression während des Differenzierungsprozesses in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen analysiert.

### 5.1 Wie verhält sich die NF- $\kappa$ B-Aktivität in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?

In dieser Arbeit wurde mit der murinen nichttransformierten Myoblastenzelllinie C2C12 und den humanen Rhabdomyosarkomzelllinien RD/18, RD/12 und CCA gearbeitet. Die beiden RD-Zelllinien entstammen aus dem gleichen Klon, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials: RD/18-Zellen besitzen ein hohes Differenzierungspotential, während RD/12-Zellen kaum mehr differenzierungskompetent sind (Astolfi *et al.*, 2001). Auch CCA-Zellen besitzen nur ein geringes Differenzierungspotential (De Giovanni *et al.*, 1989). Die NF- $\kappa$ B-Aktivität wurde anhand der NF- $\kappa$ B-Basalaktivität und der NF- $\kappa$ B-Aktivität während des Differenzierungsprozesses der einzelnen Zellen untersucht.

#### 5.1.1 Wie verhält sich die NF- $\kappa$ B-Aktivität in proliferierenden, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?

Die Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Basalaktivität offenbarte starke Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. So war die NF- $\kappa$ B-Basalaktivität in den beiden RD-Zelllinien deutlich höher als in den C2C12-Zellen. Im Gegensatz hierzu war die NF- $\kappa$ B-Basalaktivität in den CCA-Zellen geringer als in den C2C12-Zellen. Aber auch zwischen den beiden RD-Zelllinien gab es starke Unterschiede bezüglich der NF- $\kappa$ B-Aktivität. In RD/12-Zellen war sie beträchtlich höher als in RD/18-Zellen.

Auf den ersten Blick scheint somit kein Zusammenhang zwischen der NF- $\kappa$ B-Basalaktivität und dem Differenzierungsverhalten zu bestehen. RD/12- und CCA-Zellen verfügen beide über ein sehr niedriges Differenzierungspotential, RD/12-Zellen besitzen aber die höchste und CCA-Zellen die niedrigste NF- $\kappa$ B-Basalaktivität.

An diesem Punkt ist jedoch erneut darauf hinzuweisen, dass ein direkter Vergleich zwischen Zellen, die keine klonalen Varianten voneinander sind, wie es bei C2C12-, RD- und CCA-Zellen der Fall ist, nur eingeschränkt möglich ist. Lediglich RD/12- und RD/18-Zellen entstammen aus demselben Klon und können somit direkt miteinander verglichen werden.

Die starken Unterschiede bezüglich der NF- $\kappa$ B-Basalaktivität lassen sich also möglicherweise mit der unterschiedlichen Herkunft der Zellen erklären.

Betrachtet man jedoch nur die NF- $\kappa$ B-Basalaktivität in den RD-Zellen, könnte ein Zusammenhang zwischen der NF- $\kappa$ B-Aktivität und dem Differenzierungspotential der Zellen angenommen werden. So besitzen die RD/12-Zellen mit einem geringen Differenzierungspotential eine hohe NF- $\kappa$ B-Basalaktivität und RD/18-Zellen mit einem höheren Differenzierungspotential eine vergleichsweise deutlich niedrigere NF- $\kappa$ B-Basalaktivität. Einen ähnlichen Zusammenhang konnten Ehlers *et al.* (2008) für das an der Aktivierung des NF- $\kappa$ B beteiligte RIP2-Protein nachweisen. So war die *rip2*-Basalexpression in RD/12-Zellen im Vergleich zu der in RD/18-Zellen deutlich höher.

### **5.1.2 Wie verhält sich die NF- $\kappa$ B-Aktivität in differenzierenden, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?**

Aufgrund der kontroversen Untersuchungsergebnisse zur NF- $\kappa$ B-Aktivität während der normalen Muskelzelldifferenzierung, die in der Literatur beschrieben sind, wurde zu Beginn dieser Arbeit die NF- $\kappa$ B-Aktivität nach Induktion der Differenzierung in der nichttransformierten Myoblastenzelllinie C2C12 mit drei unterschiedlichen Methoden (*Western Blot*, ELISA und Immunfluoreszenz) bestimmt. Im Anschluss wurde auf gleiche Weise die NF- $\kappa$ B-Aktivität in den Rhabdomyosarkomzellen RD/18, RD/12 und CCA untersucht.

#### **5.1.2.1 Die NF- $\kappa$ B-Aktivität sinkt im Differenzierungsverlauf von nichttransformierten Myoblasten ab**

In C2C12-Zellen zeigten die Ergebnisse der I $\kappa$ B- $\alpha$ -*Western Blot*-Untersuchung einen klaren Rückgang der NF- $\kappa$ B-Aktivität während des Differenzierungsprozesses.

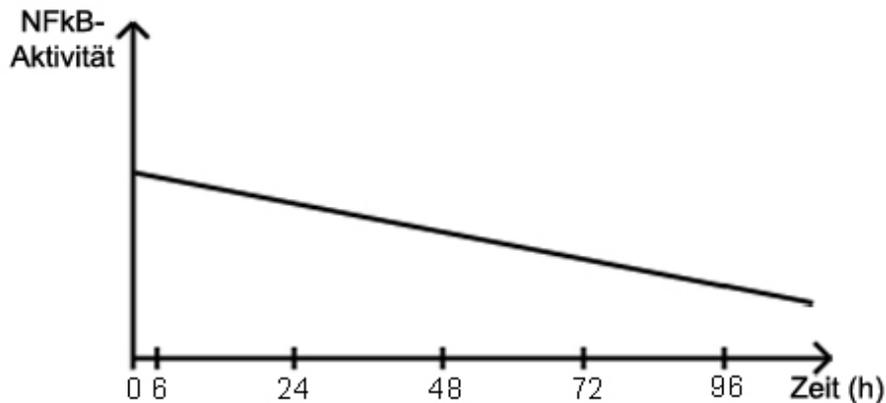
Im ELISA- und Immunfluoreszenz-Verfahren wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivität anhand der p65-Untereinheit, die in Muskelzellen am häufigsten auftritt (Mourkioti und Rosenthal, 2008), direkt bestimmt. Diese Methoden offenbarten im Gegensatz zu den Ergebnissen der I $\kappa$ B- $\alpha$ -*Western Blot*-Untersuchung ein gegensätzliches Ergebnis. Es wurde ein Anstieg der NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf beobachtet. Jedoch wiesen die Ergebnisse der NF- $\kappa$ B-ELISA-Untersuchung intra- und interexperimentell erhebliche Schwankungen auf, welche vermutlich auf technische Aspekte zurückzuführen sind.

Auch mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Methode konnte ein Anstieg der NF- $\kappa$ B-Aktivität nachgewiesen werden. Es konnte dabei jedoch sowohl eine zunehmende NF- $\kappa$ B-spezifische Färbung des Zellkerns als auch des Zytoplasmas im Differenzierungsverlauf beobachtet werden. Die stärker erscheinende Färbung des Zytoplasmas ist wahrscheinlich auf den zunehmenden Durchmesser der Zellen im Differenzierungsverlauf zurückzuführen. Möglicherweise könnte es sich also lediglich um eine stärkere Färbung des Zytoplasmas handeln, die scheinbar auf den vom Zytoplasma umgebenen Zellkern „abstrahlt“.

Um einen solchen Artefakt auszuschließen, wäre es möglich, die exakte Lokalisierung der NF- $\kappa$ B-spezifischen Färbung mit Hilfe eines Konfokalmikroskopes zu bestimmen.

Weiterhin besitzt die von uns durchgeführte Immunfluoreszenz-Methode nur eine geringe Sensitivität. Sie ist gut geeignet für den Nachweis von starken NF- $\kappa$ B-Aktivierungen und von ausgeprägten Unterschieden, jedoch weniger gut für die Differenzierung zwischen geringen Unterschieden bezüglich der NF- $\kappa$ B-Aktivität.

Im Moment sind daher die Ergebnisse der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Western Blot-Untersuchung, die auf ein Absinken der NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf hindeuten, am verlässlichsten.



**Abb. 51: Schematische Darstellung unserer Ergebnisse zur NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf in nichttransformierten Myoblasten**

C2C12-Zellen wurden für einen Zeitraum von 96 Stunden in Differenzierungsmedium kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die NF- $\kappa$ B-Aktivität bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse deuten auf ein Absinken der NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf hin. Dies wurde in dieser Abbildung schematisch dargestellt.

Dies stimmt mit den Forschungsergebnissen von Lehtinen *et al.* (1996); Guttridge *et al.* (1999) und Bakkar *et al.* (2008) überein, die ebenfalls ein Absinken der NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf nachweisen konnten.

Lehtinen *et al.* (1996) konnten 12-24 Stunden nach Differenzierungsinduktion einen Rückgang der NF- $\kappa$ B-Aktivität mittels EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*) in C2C12-Zellen nachweisen. Mit diesem Verfahren konnten auch Guttridge *et al.* (1999) ein Absinken der NF- $\kappa$ B-Aktivität 24 Stunden nach Differenzierungseinleitung in C2C12-Zellen zeigen. Weiterhin konnten Guttridge *et al.* dieses Ergebnis zusätzlich mit I $\kappa$ B- $\alpha$ -Northern Blots und Reporter assays untermauern. Bakkar *et al.* (2008) konnten zudem mit Hilfe der Western Blot-Methode zeigen, dass es während der Differenzierung zu einem Anstieg des phosphorylierten I $\kappa$ B- $\alpha$  und p65 kommt.

Hingegen konnten Li und Schwartz (2001) einen vorübergehenden Anstieg der NF- $\kappa$ B-Aktivität 24 Stunden nach Differenzierungsinduktion in C2C12-Zellen mit Hilfe des EMSA-Verfahrens zeigen. Ebenfalls mit diesem Verfahren wiesen Kaliman *et al.* (1999) in nichttransformierten L6E9-Myoblasten (Ratte) und in nichttransformierten humanen Myoblasten (Biopsie) einen vorübergehenden Anstieg der NF- $\kappa$ B-Aktivität zehn Stunden nach Einleitung der IGF-II-induzierten Differenzierung nach. Auch diese Ergebnisse stehen

nicht im direkten Widerspruch zu dem in dieser Arbeit per *Western Blot*-Methode nachgewiesenen Absinken der NF- $\kappa$ B-Aktivität. So wäre es denkbar, dass ein vorübergehender Anstieg der NF- $\kappa$ B-Aktivität außerhalb des von uns untersuchten Zeitrahmens, zwischen sechs und 24 Stunden, erfolgte.

Im direkten Widerspruch zu unseren und verschiedenen Literaturdaten steht jedoch der von Lee *et al.* (1997) per EMSA-Methode nachgewiesene Anstieg der NF- $\kappa$ B-Aktivität während des Differenzierungsprozesses in nichttransformierten embryonalen Hühnermyoblasten. Auch die Ergebnisse von Canicio *et al.* (2001) und Conejo *et al.* (2002) widersprechen dem in dieser Arbeit mittels *Western Blot* nachgewiesenen Absinken der NF- $\kappa$ B-Aktivität. Canicio *et al.* (2001) konnten zeigen, dass die Stimulierung der Myogenese durch IGF-II in nichttransformierten L6E9-Myoblasten (Ratte) zu einem Anstieg der NF- $\kappa$ B-Aktivität führt, während Conejo *et al.* (2002) ähnliches für die Stimulierung der Myogenese durch Insulin in C2C12-Zellen beschrieben. Sowohl Canicio *et al.* (2001) als auch Conejo *et al.* (2002) untersuchten dabei die NF- $\kappa$ B-Aktivität unter Verwendung des EMSA-Verfahrens.

Möglicherweise lassen sich diese abweichenden Ergebnisse durch die Verwendung von unterschiedlichen Myoblastenzelllinien, abweichenden Untersuchungsmethoden oder durch einen unterschiedlichen Versuchsaufbau (wie z.B. die Stimulierung der Myogenese durch IGF-II oder Insulin) erklären.

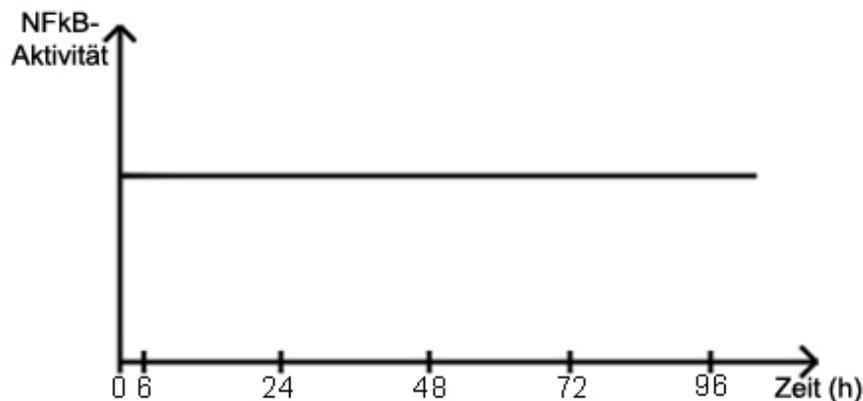
#### **5.1.2.2 Die NF- $\kappa$ B-Aktivität bleibt im Differenzierungsverlauf von Rhabdomyosarkomzellen unverändert**

Die NF- $\kappa$ B-Aktivität während der Differenzierung wurde in den Rhabdomyosarkomzelllinien RD/18, RD/12 und CCA ebenfalls mit Hilfe des *Western Blot*-, des ELISA- und des Immunfluoreszenz-Verfahrens bestimmt.

In RD/18-Zellen konnte mittels I $\kappa$ B- $\alpha$ -*Western Blot*-Analyse ein minimaler Abfall der NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf festgestellt werden. Die Ergebnisse der ELISA- und Immunfluoreszenz-Versuche zeigten eine nahezu unveränderte NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf. Somit ergaben hier alle drei Methoden zur Bestimmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität ein ähnliches Ergebnis. Da die drei Methoden jedoch bei der Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Aktivität in C2C12-Zellen inkonsistente Ergebnisse ergeben hatten, sollten diese Resultate in weiteren Experimenten reproduziert werden.

In RD/12-Zellen wiesen sowohl die Ergebnisse der I $\kappa$ B- $\alpha$ -*Western Blot*-Untersuchung als auch die der ELISA- und Immunfluoreszenz-Methode auf eine gleichbleibende NF- $\kappa$ B-Aktivität während der Differenzierung hin. Auch in den CCA-Zellen zeigten die drei Methoden eine unveränderte NF- $\kappa$ B-Aktivität innerhalb des gesamten Differenzierungsverlaufes.

Diese Ergebnisse deuten an, dass ein genereller Unterschied bezüglich der NF- $\kappa$ B-Aktivität zwischen nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen bestehen könnte. Während die NF- $\kappa$ B-Aktivität in den nichttransformierten C2C12-Zellen innerhalb des Differenzierungsverlaufes abnimmt, bleibt sie in Rhabdomyosarkomzellen unverändert. Diese Unterschiede könnten Ursache oder Folge des unterschiedlichen Differenzierungspotentials der einzelnen Zelllinien sein.



**Abb. 52: Schematische Darstellung unserer Ergebnisse zur NF-κB-Aktivität im Differenzierungsverlauf in Rhabdomyosarkomzellen**

Die Rhabdomyosarkomzelllinien RD/18, RD/12 und CCA wurden für einen Zeitraum von 96 Stunden in Differenzierungsmedium kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die NF-κB-Aktivität bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse deuten bei allen drei Zelllinien auf eine konstant bleibende NF-κB-Aktivität im Differenzierungsverlauf hin. Dies wurde in dieser Abbildung schematisch dargestellt.

Guttridge *et al.* (1999, 2000) und Langen *et al.* (2001) konnten zeigen, dass eine erhöhte NF-κB-Aktivität in C2C12-Zellen differenzierungshemmend wirkt. Auch Munz *et al.* (2002) konnten nachweisen, dass die Expression des NF-κB-Aktivators *rip2* während der Muskelzellendifferenzierung in C2C12-Zellen reprimiert wird und eine Überexpression von *rip2* differenzierungshemmend wirkt. In diesem Zusammenhang konnten Ehlers *et al.* (2008) weiterhin nachweisen, dass die Expression des NF-κB-Aktivators *rip2* in Rhabdomyosarkomen, im Gegensatz zu nichttransformierten Muskelzellen, im Differenzierungsverlauf unverändert bleibt. Diese Ergebnisse harmonisieren mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen gleichbleibenden NF-κB-Aktivität im Differenzierungsverlauf von Rhabdomyosarkomzellen. Auch in anderen Tumorzellen konnte bereits eine abberante NF-κB-Aktivität im Vergleich zu nichttransformierten Zellen beobachtet werden. So konnte z.B. beim B-Zell- und T-Zell-Lymphom, bei Eierstockkrebs, bei Blasenkrebs, bei Lungenkrebs, bei Brustkrebs und vielen anderen Krebsarten eine konstitutive NF-κB-Aktivität nachgewiesen werden (Garg und Aggarwal, 2002). Bei einem Teil dieser Tumore gibt es dabei bereits erfolgversprechende Ansätze, NF-κB als Ziel in die Therapie bzw. Therapieunterstützung (z.B. Verminderung der Chemotherapieresistenz) dieser Tumore einzubeziehen (Lee *et al.*, 2007).

Möglicherweise eröffnen sich auch für Rhabdomyosarkome ähnliche Ansatzpunkte zur Behandlung oder Therapieunterstützung.

## **5.2 Welche Auswirkungen hat eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf die Differenzierung von nichttransformierten Muskelzellen und Rhabdomyosarkomzellen?**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich die NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf in nichttransformierten Myoblasten und in Rhabdomyosarkomzellen unterscheidet, wurden die Auswirkungen der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf den Differenzierungsprozess untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit zwei unterschiedlich wirksamen NF- $\kappa$ B-Inhibitoren behandelt. Zum einen erfolgte eine Behandlung mit der hauptaktiven Komponente der Gelbwurzel, dem Curcumin, zum anderen mit dem synthetisch hergestellten Proteasominhibitor Lactacystin.

### **5.2.1 Wie wirkt sich die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin auf den Differenzierungsprozess von nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen aus?**

Curcumin (Diferulomethane) ist eine weitreichend erforschte Komponente der Gelbwurzel mit antiinflammatorischen, antioxidativen und antikarzinogenen Eigenschaften. Alle bisherigen Studien weisen darauf hin, dass Curcumin ein großes Potential bei der Krebsprävention und -behandlung haben könnte.

Die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin erfolgt durch die Blockierung der IKK, hierdurch wird der Abbau des I $\kappa$ B- $\alpha$ s verhindert und somit die Aktivierung des NF- $\kappa$ B gehemmt. Curcumin blockiert jedoch auch andere Signalwege wie z.B. den Akt-, den JNK- und den MAPK-Signalweg (Aggarwal *et al.*, 2006; Aggarwal und Shishodia, 2006).

Die Auswirkungen der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin wurden lichtmikroskopisch und anhand der Analyse der Expression ausgewählter, für die jeweilige Zelllinie geeigneter, Differenzierungsmarker untersucht.

#### **5.2.1.1 Die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin wirkt in C2C12-Zellen differenzierungshemmend**

Lichtmikroskopisch konnte nach der Behandlung mit Curcumin bei C2C12-Zellen ein Anstieg des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen beobachtet werden. Dies lässt sich wahrscheinlich durch die zytotoxische Wirkung des Curcumins erklären, die bereits für eine Vielzahl von Zellen nachgewiesen wurde (Chen und Huang, 1998; Woo *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2006).

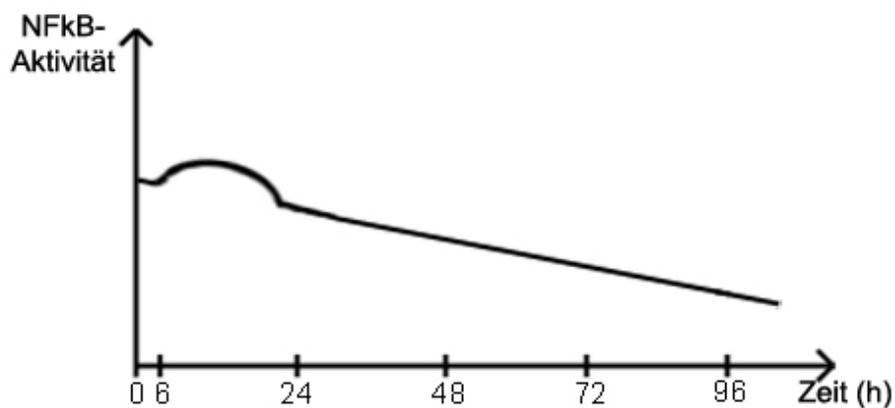
Als Markergene für den Verlauf der myogenen Differenzierung wurden bei C2C12-Zellen *caveolin-3*, *desmin*, *myogenin* und *p21* ausgewählt. Dabei sind Caveolin-3, Desmin und Myogenin muskelspezifische Differenzierungsmarker, während p21 ein Marker für die Hemmung der Proliferation und damit ein indirekter Differenzierungsmarker ist.

Die Curcumin-Behandlung führte zu einer deutlich verzögerten Induktion und zusätzlich zu einer abgeschwächten Expression von *caveolin-3* und *desmin*. Weiterhin war eine leicht verzögerte *myogenin*-Induktion zu beobachten. Dies lässt vermuten, dass NF- $\kappa$ B für die Induktion dieser Marker benötigt wird. Somit kann man schlussfolgern, dass NF- $\kappa$ B in Bezug auf diese Differenzierungsmarker eine differenzierungsfördernde Funktion besitzt.

Dies widerspricht den Ergebnissen unserer Experimente zur NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf, in denen ein Absinken der NF- $\kappa$ B-Aktivität nachgewiesen worden war.

Es wäre jedoch denkbar, dass tatsächlich ein initialer Anstieg der NF- $\kappa$ B-Aktivität für die Differenzierung notwendig ist, wie er von Kaliman *et al.* (1999) und Li und Schwartz (2001) nachgewiesen wurde. Möglicherweise wurde dieser initiale Anstieg durch die Curcumin-Behandlung unmittelbar vor Differenzierungseinleitung verhindert und erklärt somit den verzögerten Anstieg dieser Differenzierungsmarker.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wäre es interessant, die Zellen erst einige Stunden nach Differenzierungseinleitung mit dem NF- $\kappa$ B-Inhibitor Curcumin zu behandeln und die Auswirkungen dieser Hemmung auf den Differenzierungsprozess zu untersuchen.



**Abb. 53: Schematische Darstellung unserer Hypothese zur NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf in nichttransformierten Myoblasten**

Die Ergebnisse zur Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf wiesen in C2C12-Zellen auf ein Absinken der NF- $\kappa$ B-Aktivität während der Differenzierung hin. Jedoch wirkte sich die Blockierung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin hemmend auf den Differenzierungsprozess aus. Hieraus ergab sich die Hypothese eines initialen Anstiegs der NF- $\kappa$ B-Aktivität. Dies wurde in dieser Abbildung schematisch dargestellt.

Wie bereits erwähnt, sind die bisher publizierten Daten nicht nur zum Verlauf der NF- $\kappa$ B-Aktivität während des Differenzierungsprozesses, sondern auch zu den Auswirkungen einer Hemmung dieses Transkriptionsfaktors auf die myogene Differenzierung kontrovers. So konnten z.B. Guttridge *et al.* (1999) und Langen *et al.* (2001) zeigen, dass eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität differenzierungsfördernd wirkt. Im Gegensatz dazu konnten Kim *et al.* (1998) und Kaliman *et al.* (1999) nachweisen, dass NF- $\kappa$ B für die IGF-II-induzierte Expression von muskelspezifischen Genen wie *myosin heavy chain* und *caveolin-3* essentiell ist und somit die Blockierung des NF- $\kappa$ B differenzierungshemmend wirkt.

Spezifisch für die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin konnten Thaloor *et al.* (1999) zeigen, dass nach Muskelverletzungen diese Hemmung differenzierungsfördernd wirkt. Dies bezieht sich jedoch auf die Differenzierung von adulten Zellen und nicht wie bei C2C12-Zellen auf eine embryonale Differenzierung.

### **5.2.1.2 Die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin wirkt in Rhabdomyosarkomzellen differenzierungshemmend**

Nach der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin in nichttransformierten Muskelzellen wurde auch in den Rhabdomyosarkomzellen die NF- $\kappa$ B-Aktivität auf die gleiche Weise blockiert. Die Auswirkungen dieser Hemmung wurden ebenfalls lichtmikroskopisch und anhand ausgewählter Differenzierungsmarker untersucht. Hierbei wurden bei RD/18-Zellen mit Ausnahme von Caveolin-3 die gleichen Differenzierungsmarker wie bei C2C12-Zellen verwendet, nämlich Desmin, Myogenin und p21. Im Gegensatz hierzu wurden bei RD/12- und CCA-Zellen, die wie bereits zuvor erwähnt, keine Differenzierung im eigentlichen Sinn durchlaufen, Desmin und Vimentin untersucht.

Lichtmikroskopisch konnte nach der Behandlung mit Curcumin bei RD/18- und CCA-Zellen ein Anstieg des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen beobachtet werden. Dieser Anstieg ist vermutlich genau wie bei C2C12-Zellen auf die Zytotoxizität des Curcumins zurückzuführen. Bei RD/12-Zellen war ein solcher Anstieg nicht zu beobachten, jedoch zeigen diese Zellen generell, also auch schon ohne die Curcumin-Behandlung, etwa 24 Stunden nach der Differenzierungseinleitung eine erhöhte Anzahl apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen. Hier konnte daher nicht genau unterschieden werden, ob die Curcumin-Behandlung tatsächlich keine Apoptose oder Nekrose der Zellen auslöste oder ob diese nur wegen der generell erhöhten Anzahl solcher Zellen nicht deutlich abgrenzbar war.

Wie schon zuvor bei C2C12-Zellen beobachtet, war auch bei RD/18-Zellen eine verzögerte *myogenin*-Induktion zu beobachten. Vermutlich führte also auch in RD/18-Zellen die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin zu einer verzögerten Induktion dieses Differenzierungsmarkers. Dies lässt wie zuvor bei den C2C12-Zellen darauf schließen, dass NF- $\kappa$ B für die Induktion dieses Differenzierungsmarkers benötigt wird und die Blockierung des NF- $\kappa$ B auch in RD/18-Zellen in Bezug auf diesen Differenzierungsmarker differenzierungshemmend wirkt.

Des Weiteren konnte in RD/18-Zellen sechs Stunden nach der Curcumin-Behandlung ein Expressionsanstieg des muskelunspezifischen Differenzierungsmarkers *p21* beobachtet werden. P21 ist am Ausscheiden der Zellen aus dem Zellzyklus beteiligt (Halevy *et al.*, 1995). Die erhöhte *p21*-Expression lässt daher vermuten, dass die Curcumin-Behandlung zu einem Austritt der Zellen aus dem Zellzyklus führte. Dies bedeutet jedoch nicht zwangsläufig eine beschleunigte Differenzierung, es bedeutet lediglich, dass die Zellen nicht weiter proliferieren, also scheint die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität in RD/18-Zellen differenzierungshemmend und zusätzlich auch proliferationshemmend zu wirken.

Interessanterweise wurde in RD/18-Zellen die *desmin*-Induktion durch Curcumin nicht verzögert, während dieser Inhibitor sowohl in C2C12 als auch in RD/12 und CCA-Zellen (s.u.) zu einer stark verzögerten Induktion dieses Differenzierungsmarkers führte. Weshalb Curcumin nur in RD/18-Zellen keine Auswirkung auf die *desmin*-Expression hatte, können wir zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht schlüssig erklären.

In RD/12-Zellen konnte keine eindeutige Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin nachgewiesen werden. Da jedoch auch in diesen Zellen nach der Behandlung, wie in C2C12- und CCA-Zellen, eine verzögerte *desmin*-Induktion zu beobachten war, ist davon

auszugehen, dass die Behandlung mit Curcumin zwar in Bezug auf die Hemmung bestimmter anderer Signalwege, jedoch nicht in Bezug auf die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität erfolgreich war.

Auch in CCA-Zellen verursachte die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin eine verzögerte *desmin*-Induktion und zusätzlich eine verzögerte *vimentin*-Expression.

Der zuvor in C2C12-Zellen und RD/18-Zellen beobachtete differenzierungshemmende Effekt des Curcumins war also auch bei RD/12- und CCA-Zellen, die kaum mehr differenzierungskompetent sind, zu beobachten.

Die an den drei Rhabdomyosarkomzelllinien gewonnenen Ergebnisse unterstützen somit die Annahme, dass eine gewisse NF- $\kappa$ B-Aktivität für die initialen myogenen Differenzierungsschritte essentiell ist. Dies geht aus der verzögerten Induktion der Differenzierungsmarker sowohl in RD/18-Zellen als auch in den nur wenig differenzierungskompetenten RD/12- und CCA-Zellen hervor. Einschränkend muss jedoch nochmals erwähnt werden, dass bei RD/12-Zellen eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Wie bereits in Bezug auf die C2C12-Zellen erwähnt, wäre es interessant, in den Rhabdomyosarkomzellen die NF- $\kappa$ B-Aktivität erst einige Stunden nach Differenzierungseinleitung zu hemmen. Hierdurch würde eine initiale NF- $\kappa$ B-Aktivierung „erlaubt“ werden und eine spätere differenzierungshemmende Wirkung des NF- $\kappa$ B verhindert werden.

Ein Schwachpunkt bei der Behandlung mit Curcumin ist jedoch generell die nicht selektive Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität. Durch Curcumin wird zusätzlich der Akt-, der JNK- und der MAPK-Signalweg gehemmt, welche ebenfalls die Muskelzellendifferenzierung beeinflussen können. Um auszuschließen, dass die von uns festgestellten Effekte durch die Hemmung dieser Signalwege verursacht wurden, sollte versucht werden eine selektivere Hemmung des NF- $\kappa$ B-Signalweges, wie z.B. durch NF- $\kappa$ B-hemmende zellpermeable Peptide (Lin *et al.*, 1995) oder durch die Verwendung von I $\kappa$ B- $\alpha$ -SR (*Superrepressor*) (Brockman *et al.*, 1995), zu erreichen.

### **5.2.2 Wie wirkt sich die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Lactacystin auf den Differenzierungsprozess von nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen aus?**

Zusätzlich wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivität mit Hilfe des Proteasominhibitors Lactacystin gehemmt. Lactacystin unterbindet den Abbau von I $\kappa$ B- $\alpha$  durch das Proteasom und verhindert somit die Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Shirley *et al.*, 2005). Wie bei der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin wurden die Auswirkungen der Lactacystin-Behandlung lichtmikroskopisch und mit Hilfe der zellspezifischen Differenzierungsmarker untersucht.

#### **5.2.2.1 Die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Lactacystin wirkt in C2C12-Zellen differenzierungshemmend**

Nach der Behandlung mit Lactacystin war bei C2C12-Zellen lichtmikroskopisch ein um etwa 48 Stunden verzögertes Einsetzen des Differenzierungsprozesses zu beobachten. Auch die Induktion der Differenzierungsmarker Caveolin-3 und Myogenin erfolgte um etwa 48 Stunden später als bei den unbehandelten C2C12-Zellen. Diese deutliche Verzögerung des

Differenzierungsprozesses deutet darauf hin, dass eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B für die Differenzierung wichtig ist. Da aus der Literatur bekannt ist, dass nach einer Lactacystin-Behandlung die durch Lactacystin hervorgerufenen Effekte für maximal 48 Stunden anhalten (Fenteany *et al.*, 1995), verwundert es nicht, dass zu späteren Zeitpunkten ein normaler Ablauf des myogenen Differenzierungsprogramms zu beobachten war.

Im Zusammenhang mit den zuvor diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit, im Besonderen den Daten zur Curcumin-Behandlung, weisen diese Ergebnisse erneut darauf hin, dass eine gewisse NF- $\kappa$ B-Aktivität für den myogenen Differenzierungsprozess notwendig sein könnte. Allerdings stehen hierzu wieder unsere Ergebnisse, die auf eine Deaktivierung des NF- $\kappa$ B im Verlauf des Differenzierungsprozesses hindeuten, im Widerspruch.

Wie im vorangehenden Abschnitt bereits diskutiert, könnten sich alle Befunde dahingehend erklären lassen, dass eine initiale, frühe Aktivierung des NF- $\kappa$ B nach Induktion der Differenzierung und anschließend eine Repression der NF- $\kappa$ B-Aktivität erfolgt. Wie bereits im Zusammenhang mit der Curcumin-Behandlung diskutiert, könnte auch hier zur Überprüfung dieser Hypothese versucht werden, die Zellen erst einige Stunden nach Differenzierungseinleitung mit dem NF- $\kappa$ B-Inhibitor Lactacystin zu behandeln und die Auswirkungen dieser Hemmung auf den Differenzierungsprozess zu untersuchen.

Auch Mugita *et al.* (1999) konnten bei C2C12-Zellen, die nach der Differenzierungseinleitung kontinuierlich mit Lactacystin behandelt wurden, keine Fusion der Myoblasten zu mehrkernigen Myotuben beobachten. Nach der Entfernung des Lactacystins durchliefen diese Zellen jedoch einen normalen Differenzierungsprozess. Diese Ergebnisse bestätigen unsere Ergebnisse und unterstützen die Annahme, dass ohne die Aktivierung des NF- $\kappa$ B eine Differenzierungseinleitung nicht oder nur noch eingeschränkt möglich ist. Des Weiteren konnten Mugita *et al.* (1999) lichtmikroskopisch zeigen, dass eine Lactacystin-Behandlung, die zu einem späteren Differenzierungszeitpunkt eingeleitet wurde, keinen Einfluss auf bereits gebildete Myotuben hat. Hieraus ergibt sich ein erneuter Hinweis, dass NF- $\kappa$ B für initiale Differenzierungsschritte essentiell sein könnte.

Weiterhin führte die Behandlung mit Lactacystin in unseren Händen in C2C12-Zellen zu einem unmittelbar einsetzenden und für etwa 24 Stunden anhaltenden Anstieg der *p21*-Expression. Wie schon erwähnt, ist *p21* ein Marker für die Hemmung der Proliferation. Somit scheint die Lactacystin-Behandlung in C2C12-Zellen zusätzlich auch proliferationshemmend zu wirken. Eine solche proliferationshemmende Wirkung des Lactacystins konnte bereits in vielen unterschiedlichen Zelltypen nachgewiesen werden (Fenteany *et al.*, 1995).

Dies ist überraschend, da die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Lactacystin somit proliferations- und differenzierungshemmend wirkte. In der Regel geht die Hemmung der normalen Myoblastenproliferation mit der Induktion der Differenzierung einher. Eine ähnliche, sowohl proliferations- als auch differenzierungsfördernde Funktion wurde bereits bei den IGFs (*Insulin-like growth factors*) und ihren Rezeptoren beschrieben. Bei ihnen bildet ein zeitlich strikt kontrolliertes Zusammenspiel aus Expressionsaktivierung und nachfolgender Rezeptoraktivierung die molekulare Basis für diese Effekte (Florini *et al.*, 1996).

Die zeitlich unterschiedliche Aktivierung von differenzierungsfördernden und -hemmenden Effekten könnte auch beim NF- $\kappa$ B diese gegensätzlichen Ergebnisse erklären.

### **5.2.2.2 Die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Lactacystin wirkt in Rhabdomyosarkomzellen differenzierungshemmend**

Die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Lactacystin führte bei RD/18-Zellen zu ähnlichen Veränderungen wie bei C2C12-Zellen. So konnte bei RD/18-Zellen auch eine lichtmikroskopisch sichtbare Verzögerung des Differenzierungsprozesses, eine herabgesetzte *myogenin*-Expression und ein unmittelbar nach der Behandlung stattfindender Anstieg der *p21*-Expression beobachtet werden.

Die beiden zuerst erwähnten Befunde sprechen dabei dafür, dass die Blockierung des NF- $\kappa$ B auch bei RD/18-Zellen hemmend auf den Differenzierungsprozess wirkte und dass dieser Transkriptionsfaktor somit vermutlich auch in diesen Zellen zumindest für die Differenzierungseinleitung benötigt wird. Auch Mugita *et al.* (1999) konnten bei mit Lactacystin behandelten RD-Zellen lichtmikroskopisch eine Hemmung des Differenzierungsprozesses beobachten. Dies bestätigt unsere Ergebnisse und unterstützt unsere Annahme, dass NF- $\kappa$ B für den Differenzierungsprozess von essentieller Bedeutung sein könnte.

Der unmittelbar nach der Behandlung stattfindende Anstieg der *p21*-Expression, ist wie zuvor in C2C12-Zellen vermutlich der proliferationshemmenden Wirkung des Lactacystins zuzuschreiben.

Bei den nur noch wenig differenzierungskompetenten RD/12-Zellen waren in unseren Versuchen während ihres normalen Differenzierungsprozesses keine lichtmikroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen zu beobachten. Dies war auch nach der Lactacystin-Behandlung der Fall. In diesen Zellen führte die Lactacystin-Behandlung jedoch zu einer verzögerten Induktion der Differenzierungsmarker Desmin und Vimentin, also scheint sich die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auch in RD/12-Zellen negativ auf den myogenen Differenzierungsprozess auszuwirken.

Die Ergebnisse der Behandlung der CCA-Zellen mit Lactacystin waren zu heterogen, um zum jetzigen Zeitpunkt eine Aussage über mögliche Effekte machen zu können.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass sich die Lactacystin-Behandlung, wie bei C2C12-Zellen, auch bei den Rhabdomyosarkomzelllinien RD/18 und RD/12 negativ auf deren Differenzierungsprozess auswirkte. Auch hier wäre es daher interessant, die Lactacystin-Behandlung erst einige Stunden nach der Einleitung der Differenzierung durchzuführen und zu überprüfen, ob dies möglicherweise einen differenzierungsfördernden Effekt auf die RD/18- und RD/12-Zellen hat.

Wie zuvor für die Curcumin-Behandlung beschrieben, ist der Schwachpunkt bei der Lactacystin-Behandlung die nicht selektive Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität. Nicht nur I $\kappa$ B- $\alpha$ , sondern auch verschiedene andere Proteine werden durch das Proteasom abgebaut (Olivier *et al.*, 2006) und können somit durch den Proteasominhibitor Lactacystin beeinflusst werden. Deshalb sollte auch hier versucht werden, eine spezifischere Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität, wie z.B. durch NF- $\kappa$ B-hemmende zellpermeable Peptide oder I $\kappa$ B- $\alpha$ -SR, zu erreichen.

Abschließend kann gesagt werden, dass sich sowohl die Behandlung mit Curcumin als auch die Behandlung mit Lactacystin hemmend auf den Differenzierungsprozess auswirkte. Jedoch unterschieden sich diese differenzierungshemmenden Auswirkungen in Abhängigkeit vom verwendeten NF- $\kappa$ B-Inhibitor. Da beide Inhibitoren NF- $\kappa$ B auf unterschiedliche Weise hemmen, jedoch bei beiden Inhibitoren eine spezifische Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität nicht gegeben ist, besteht die Möglichkeit, dass andere differenzierungshemmende oder -fördernde Signalwege durch die Behandlung beeinflusst wurden. Daher sollten, um eine endgültige Aussage zur NF- $\kappa$ B-Aktivität im Differenzierungsverlauf treffen zu können, weitere Experimente mit selektiveren NF- $\kappa$ B-Inhibitoren folgen.

### **5.3 Findet in nichttransformierten Myoblasten eine Repression der *traf6*-Expression nach Induktion der Differenzierung statt? Verhält sich die *traf6*-Expression in Rhabdomyosarkomzellen abweichend davon?**

TRAF6 ist ein zytoplasmatisches Adaptorprotein, das in die Aktivierung des NF- $\kappa$ B in vielen Zellarten involviert ist. Des Weiteren ist TRAF6 auch an der Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen JNK und p38 beteiligt (Arch *et al.*, 1998; Bradley und Pober, 2001; Moynagh, 2005). Unsere Arbeitsgruppe konnte auf mRNA-Ebene für *traf6* eine Repression der Genexpression während der Myogenese nachweisen. Auf der anderen Seite gab es Hinweise darauf, dass in der Rhabdomyosarkomzelllinie RD/18 die *traf6*-Expression nach Induktion der Differenzierung induziert wird (Mueck *et al.*, 2011). Dies könnte ein bedeutender Unterschied zwischen nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen sein, der zumindest zum Teil für die Hemmung des Differenzierungsprozesses in Rhabdomyosarkomzellen verantwortlich sein könnte.

In dieser Arbeit wurde nun die *traf6*-Expression in der nichttransformierten Myoblastenzelllinie C2C12 und in den Rhabdomyosarkomzelllinien RD/18, RD/12 und CCA auf Proteinebene untersucht. Hierfür wurde zunächst die *traf6*-Basalexpression dieser Zellen miteinander verglichen und daran anschließend die *traf6*-Expression im Differenzierungsverlauf für die jeweilige Zelllinie untersucht.

#### **5.3.1 Wie verhält sich die *traf6*-Expression in proliferierenden, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?**

Die Untersuchung der *traf6*-Basalexpression in nichttransformierten Myoblasten und in Rhabdomyosarkomzellen offenbarte deutliche Unterschiede zwischen diesen Zellen.

In den Rhabdomyosarkomzellen war die *traf6*-Basalexpression deutlich höher als in den C2C12-Zellen. So war die *traf6*-Basalexpression in den RD-Zellen (RD/18 und RD/12) dreimal höher und in den CCA-Zellen 2,5-mal höher als in den C2C12-Zellen. Diese Unterschiede könnten auf die geringere Differenzierungsfähigkeit der Rhabdomyosarkomzellen zurückzuführen sein. So ist TRAF6 unter anderem an der Aktivierung des NF- $\kappa$ B beteiligt (Arch *et al.*, 1998; Bradley und Pober, 2001; Moynagh, 2005), welches nach Ansicht einiger Autoren eine differenzierungshemmende Funktion besitzt (Lehtinen *et al.*, 1996;

Guttridge *et al.*, 1999; Guttridge *et al.*, 2000; Langen *et al.*, 2001; Munz *et al.*, 2002; Bakkar *et al.*, 2008).

Für RIP2, das wie TRAF6 ein zytoplasmatisches Adaptorprotein ist und ebenfalls an der Aktivierung des NF- $\kappa$ B beteiligt ist, konnten Munz *et al.* (2002) zeigen, dass eine konstitutiv erhöhte *rip2*-Expression differenzierungshemmend wirkt und dass verschiedene Rhabdomyosarkomzelllinien hohe *rip2*-Basalexpressionen zeigen (Ehlers *et al.*, 2008). Möglicherweise gilt für TRAF6 ein ähnlicher Zusammenhang.

Die Unterschiede bezüglich der *traf6*-Basalexpression könnten jedoch auch lediglich auf die unterschiedliche Herkunft der Zellen zurückzuführen sein: Wie schon beim Vergleich der NF- $\kappa$ B-Basalaktivität erwähnt, sind C2C12-, RD- und CCA-Zellen unterschiedlichen klonalen Ursprungs und können folglich nur eingeschränkt miteinander verglichen werden.

### **5.3.2 Wie verhält sich die *traf6*-Expression in differenzierenden, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?**

Nachdem in Rhabdomyosarkomzellen eine höhere *traf6*-Basalexpression nachgewiesen werden konnte, wurden die *traf6*-Expressionsmuster der verschiedenen Zelllinien im Verlauf der Differenzierung miteinander verglichen.

#### **5.3.2.1 Die *traf6*-Expression steigt im Differenzierungsverlauf von Rhabdomyosarkomzellen an**

In C2C12-Zellen waren die Untersuchungsergebnisse der *traf6*-Expression auf Proteinebene widersprüchlich, so dass zum jetzigen Zeitpunkt keine eindeutige Aussage über die *traf6*-Expression während der Differenzierung in C2C12-Zellen erfolgen kann.

Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, sollten weitere Expressionsanalysen folgen.

In RD/18-, RD/12- und CCA-Zellen war auf Proteinebene jeweils ein eindeutiger Anstieg der *traf6*-Expression im Differenzierungsverlauf nachweisbar.

Im Zusammenhang mit den früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (Mueck *et al.*, 2011), liegt also die Annahme nahe, dass die *traf6*-Expression in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen unterschiedlich reguliert wird. Während in nichttransformierten Myoblasten zumindest auf mRNA-Ebene eine Repression der *traf6*-Expression im Differenzierungsverlauf zu beobachten war, war dieses Gen bei allen Rhabdomyosarkomzellen deutlich induziert.

Die erhöhte *traf6*-Expression in Rhabdomyosarkomzellen könnte möglicherweise also einer der Gründe sein, weshalb diese Zellen nicht in der Lage sind, eine vollständige Differenzierung zu durchlaufen oder aber eine Folge des geringen Differenzierungspotentials sein. Wie schon erwähnt, konnte auch für RIP2, ein anderes zytoplasmatisches TNFR-Familie-Adaptorprotein, das genau wie TRAF6 an der Aktivierung des NF- $\kappa$ B beteiligt ist, ein ähnlicher Zusammenhang nachgewiesen werden. Die Expression des *rip2*-Gens wird bei der Differenzierung von nichttransformierten Myoblasten reprimiert (Munz *et al.*, 2002), während für Rhabdomyosarkomzellen eine erhöhte Basalexpression dieses Gens und keine oder nur eine geringe Repression der Expression im Differenzierungsverlauf nachgewiesen werden konnte (Ehlers *et al.*, 2008). Zusätzlich konnten Munz *et al.* (2002) zeigen, dass eine konstitutiv erhöhte *rip2*-Expression in nichttransformierten Myoblasten differenzierungs-

hemmend wirkt. Ähnliches könnte auch für das *traf6*-Gen zutreffen. In Hinblick darauf, dass bei Rhabdomyosarkomzellen das jeweilige Differenzierungspotential Einfluss auf die Malignität der Zellen hat, also ein höherer Differenzierungsstatus zu einem Verlust der Metastasierungsfähigkeit führt (Astolfi *et al.*, 2001), könnte sich hieraus möglicherweise ein therapeutischer Ansatzpunkt ergeben.

Abschließend kann nach der Untersuchung der *traf6*-Basalexpression und der *traf6*-Expression im Differenzierungsverlauf gesagt werden, dass die *traf6*-Expression in Rhabdomyosarkomzellen im Vergleich zu nichttransformierten Myoblasten sowohl in proliferierenden als auch in differenzierenden Zellen erhöht ist, wobei nochmals angemerkt werden muss, dass ein Vergleich aufgrund der unterschiedlichen klonalen Herkunft der Zellen nur eingeschränkt möglich ist.

## **5.4 Unterliegt die Expression des *traf6*-Gens der Regulation durch NF- $\kappa$ B? Gibt es Unterschiede bezüglich dieser Regulation zwischen nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?**

Aus vorausgegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gab es Hinweise darauf, dass ein Zusammenhang zwischen der NF- $\kappa$ B-Aktivität und der *traf6*-Expression bestehen könnte, also das *traf6*-Gen der Regulation durch NF- $\kappa$ B unterliegt (Mueck *et al.*, 2011).

Um dies zu überprüfen, wurden nichttransformierte Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen mit zwei unterschiedlich wirksamen NF- $\kappa$ B-Inhibitoren behandelt und nach dieser Behandlung die *traf6*-Expression untersucht. Wie zuvor bei der Untersuchung der Auswirkungen der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf den Differenzierungsprozess, wurden die NF- $\kappa$ B-Inhibitoren Curcumin und Lactacystin verwendet.

### **5.4.1 Welche Auswirkung hat die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin auf die *traf6*-Expression in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?**

#### **5.4.1.1 Die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin hat in Rhabdomyosarkomzellen keine Auswirkungen auf die *traf6*-Expression**

In unseren Händen waren bei der Analyse der *traf6*-Expression, sowohl bei unbehandelten C2C12-Zellen als auch bei Curcumin-behandelten C2C12-Zellen, zwischen den einzelnen Experimenten große Schwankungen der *traf6*-Expression auf Proteinebene zu beobachten. Daher war es hier nicht möglich, eine Aussage zum Einfluss der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin auf die *traf6*-Expression zu machen.

Bei den Rhabdomyosarkomzelllinien RD/18, RD/12 und CCA erzeugte die Blockierung des NF- $\kappa$ B durch Curcumin keine auf Proteinebene nachweisbare Veränderung der *traf6*-Expression.

Demzufolge hat die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin zumindest in Rhabdomyosarkomzellen keinen Einfluss auf die *traf6*-Expression. Das *traf6*-Gen unterliegt somit vermutlich nicht der Regulation durch NF- $\kappa$ B. Hiermit konnten die Hinweise aus

vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, dass ein Zusammenhang zwischen der NF- $\kappa$ B-Aktivität und der *traf6*-Expression besteht (Mueck *et al.*, 2011), auf Proteinebene nicht bestätigt werden.

### **5.4.2 Welche Auswirkung hat die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Lactacystin auf die *traf6*-Expression in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?**

#### **5.4.2.1 Die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Lactacystin hat in Rhabdomyosarkomzellen keine Auswirkungen auf die *traf6*-Expression**

Die Analyse der *traf6*-Expression nach der Behandlung mit Lactacystin ergab in C2C12-Zellen ebenfalls stark schwankende Ergebnisse. Daher war es auch hier nicht möglich, eine Aussage zum Einfluss der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Lactacystin auf die *traf6*-Expression in C2C12-Zellen zu machen.

Analog zur Curcumin-Behandlung führte auch die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Lactacystin auf Proteinebene zu keiner auffälligen Veränderung des *traf6*-Expressionsmusters in RD/18- und RD/12-Zellen. Dies untermauert die Vermutung, die bereits nach der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Curcumin angestellt wurde: Eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität hat keinen Einfluss auf die *traf6*-Expression auf Proteinebene.

Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass eine Regulation des *traf6*-Gens durch NF- $\kappa$ B auf Proteinebene nicht nachweisbar war.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

### **Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung: physiologische und pathologische Aspekte**

Die Funktion des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor- $\kappa$ B*) während der normalen Muskelzellendifferenzierung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Autoren konnten einen differenzierungsfördernden, andere Autoren einen differenzierungshemmenden und wieder andere Autoren einen sowohl fördernden als auch hemmenden Effekt von NF- $\kappa$ B auf den Differenzierungsprozess nachweisen. Über eine mögliche Rolle des NF- $\kappa$ B bei der Pathogenese des Rhabdomyosarkoms war vor Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Von diesem Tumortyp ist jedoch bekannt, dass ein höherer Differenzierungsstatus zu einem Verlust der Metastasierungsfähigkeit der entsprechenden Zellen führt. Es könnte daher ein Zusammenhang zwischen der unvollständigen Differenzierung von Rhabdomyosarkomen und einer Fehlregulation der NF- $\kappa$ B-Aktivität bestehen. Für diese Hypothese spricht auch, dass bereits in einer Vielzahl von anderen Tumortypen eine vom entsprechenden Normalgewebe abweichende NF- $\kappa$ B-Aktivität nachgewiesen werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die NF- $\kappa$ B-Aktivität in der nichttransformierten Myoblastenzelllinie C2C12 und den Rhabdomyosarkomzelllinien RD/18, RD/12 und CCA nach Induktion der myogenen Differenzierung *in vitro* analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten in C2C12-Zellen eine absinkende NF- $\kappa$ B-Aktivität nach Induktion der Differenzierung. Im Gegensatz dazu konnte in den Rhabdomyosarkomzellen eine gleichbleibend hohe NF- $\kappa$ B-Aktivität während des gesamten Differenzierungsprozesses beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Repression der NF- $\kappa$ B-Aktivität für eine normale myogene Differenzierung notwendig sein könnte. Die von nichttransformierten Myoblasten abweichende Regulation der NF- $\kappa$ B-Aktivität in Rhabdomyosarkomzellen könnte also die Ursache für das geringe Differenzierungspotential oder aber die Folge des geringeren Differenzierungspotentials dieser Zellen sein.

Als nächster Schritt wurden die Auswirkungen einer Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf den Differenzierungsprozess der verschiedenen Zelllinien analysiert. Erstaunlicherweise wirkte sich diese Hemmung sowohl bei den C2C12-Zellen als auch bei den RD/18-, RD/12- und CCA-Zellen hemmend auf den Differenzierungsprozess aus. Diese Ergebnisse sprechen somit eher für eine differenzierungsfördernde Funktion des NF- $\kappa$ B.

Eine mögliche Erklärung für diese gegensätzlichen Ergebnisse bietet die Hypothese, dass NF- $\kappa$ B initial eine differenzierungsfördernde und im weiteren Differenzierungsverlauf eine differenzierungshemmende Funktion besitzt.

*Tumor necrosis factor receptor associated factor 6* (TRAF6) ist ein zytoplasmatisches Adaptorprotein, das an der Aktivierung des NF- $\kappa$ B in vielen Zelltypen beteiligt ist.

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte unsere Arbeitsgruppe auf mRNA-Ebene eine Repression der *traf6*-Expression während der Muskelzellendifferenzierung in nichttransformierten Myoblasten zeigen. Im Gegensatz dazu konnte in Rhabdomyosarkomzellen keine Repression der *traf6*-Expression nach Induktion der Differenzierung festgestellt werden.

In dieser Arbeit wurde die Expression des für TRAF6 kodierenden Gens auf Proteinebene in der nichttransformierten Myoblastenzelllinie C2C12 und den Rhabdomyosarkomzelllinien RD/18, RD/12 und CCA untersucht. Dabei zeigte sich, dass in proliferierenden Zellen die *traf6*-Expression in den Rhabdomyosarkomzellen deutlich höher war als in den C2C12-Zellen.

Aus der Untersuchung der *traf6*-Expression im Differenzierungsverlauf der C2C12-Zellen ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse, so dass die auf mRNA-Ebene erhaltenen Ergebnisse weder bestätigt noch widerlegt werden konnten. In allen drei Rhabdomyosarkomzelllinien zeigte sich hingegen eine eindeutige Induktion der *traf6*-Expression während der Differenzierung. Somit konnten die Ergebnisse dieser Arbeit die zuvor erhaltenen Ergebnisse zum Teil bestätigen. Demnach könnte ein bedeutender Unterschied in der *traf6*-Expression zwischen nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen bestehen, der zumindest zum Teil für die unterschiedliche Regulation der NF- $\kappa$ B-Aktivität in diesen Zelltypen verantwortlich sein könnte.

Weiterhin gab es aufgrund früherer Daten unserer Arbeitsgruppe Anzeichen dafür, dass ein Zusammenhang zwischen der NF- $\kappa$ B-Aktivität und der *traf6*-Expression bestehen könnte, also dass die Expression des *traf6*-Gens selbst der Regulation durch NF- $\kappa$ B unterliegen könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde in dieser Arbeit die NF- $\kappa$ B-Aktivität gehemmt und anschließend die *traf6*-Expression auf Proteinebene untersucht. Dabei war jedoch kein Effekt auf die *traf6*-Expression zu beobachten. Die Regulation des *traf6*-Gens durch NF- $\kappa$ B konnte somit in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in nichttransformierten Myoblasten und in Rhabdomyosarkomzellen unterschiedlich reguliert wird, was zumindest zum Teil in einer differentiellen Expression des für den NF- $\kappa$ B-Aktivator TRAF6 kodierenden Gens begründet sein könnte.

## 7 SUMMARY

### **The role of the transcription factor NF- $\kappa$ B in skeletal muscle cell differentiation: physiological and pathological aspects**

The function of the transcription factor NF- $\kappa$ B (Nuclear factor- $\kappa$ B) in normal muscle cell differentiation has been discussed controversially in the literature. Various authors could demonstrate a differentiation-promoting, others found a differentiation-inhibiting effect and yet others show evidence for both differentiation-promoting and -inhibiting effects of NF- $\kappa$ B in myogenic differentiation. Prior to this work, nothing was known on a potential role of NF- $\kappa$ B in rhabdomyosarcoma pathogenesis. However, it has been known for quite a while that in rhabdomyosarcoma cells, a higher state of differentiation leads to a loss of the metastatic potential of the respective cells. Therefore, a relation between the incomplete differentiation of rhabdomyosarcomas and a dysregulation of NF- $\kappa$ B-activity could exist. This hypothesis is supported by experimental data from a variety of other types of tumors, in which an abnormal NF- $\kappa$ B-activity could be found.

In the present work, the NF- $\kappa$ B-activity in the normal myoblast cell line C2C12 and the rhabdomyosarcoma cell lines RD/18, RD/12, and CCA after the induction of differentiation *in vitro* was analyzed first. The results of this examination showed a decreasing NF- $\kappa$ B-activity in C2C12 cells after the induction of differentiation. On the contrary, the analyzed rhabdomyosarcoma cells showed steady NF- $\kappa$ B-activity during the whole process of differentiation. These results support the hypothesis that a certain repression of NF- $\kappa$ B-activity is necessary for normal myogenic differentiation. Furthermore, the different regulation of NF- $\kappa$ B activity in rhabdomyosarcoma cells when compared to normal myoblasts might be the cause or a result of the diminished differentiation potential of the former.

In a next step, the effects of an inhibition of NF- $\kappa$ B-activity on the process of differentiation in the different cell lines were analyzed. Surprisingly, blocking NF- $\kappa$ B-activity had an inhibiting effect on the differentiation process of C2C12, RD/18, RD/12, and CCA cells. These results rather argue for a differentiation-promoting effect of NF- $\kappa$ B.

A possible explanation for these controversial results is provided by the hypothesis that NF- $\kappa$ B might be differentiation-promoting at early, and differentiation-inhibiting at later stages of the differentiation process.

Tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6) is a cytoplasmic adaptor protein that is involved in the activation of NF- $\kappa$ B in many cell types. Prior to this work, our laboratory could demonstrate a repression of *traf6* expression at the mRNA level in normal muscle cell differentiation. On the contrary, in rhabdomyosarcoma cells, no repression of *traf6* expression after the induction of differentiation was observed.

In this work, we analyzed the expression of the *traf6* gene at the protein level both in the normal myoblast cell line C2C12 and in the rhabdomyosarcoma cell lines RD/18, RD/12, and CCA. The results showed a higher *traf6* expression in proliferating rhabdomyosarcoma cells than in proliferating normal myoblasts.

The examination of *traf6* expression in C2C12 differentiation showed controversial results, thus the abovementioned mRNA results could neither be proved nor disproved at the protein level. By contrast, in all rhabdomyosarcoma cell lines, a clear induction of *traf6* expression in differentiation was observed. Consequently, these results could partially confirm the prior results. Specifically, the data indicate that there could be an important difference between the *traf6* expression of normal myoblasts and rhabdomyosarcoma cells. This difference could be a reason for the differential regulation of the NF- $\kappa$ B-activity in the various cell types.

Finally, prior results of our laboratory had indicated that there could be a link between NF- $\kappa$ B-activity and the expression of the *traf6* gene. To test this hypothesis, we first inhibited NF- $\kappa$ B-activity and subsequently, we analyzed *traf6* expression at the protein level. However, no effect of this treatment on *traf6* expression could be observed. Consequently, regulation of the *traf6* gene by NF- $\kappa$ B couldn't be confirmed.

Taken together, the results of this work show differences in the regulation of NF- $\kappa$ B activity in normal myoblasts and rhabdomyosarcoma cells. This could at least in part be the result of differential expression of the gene encoding the NF- $\kappa$ B activator TRAF6.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Aggarwal S, Ichikawa H, Takada Y, Sandur SK, Shishodia S, Aggarwal BB (2006) Curcumin (Diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I $\kappa$ B- $\alpha$  Kinase and Akt activation. *Mol Pharmacol* 69, 195-206.
- Aggarwal BB, Shishodia S (2006) Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 71, 1397-1421.
- Andres V, Walsh K (1996) Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J Cell Biol* 132, 657-666.
- Aoyagi T, Saruta K, Asahi I, Hojo H, Shibahara T, Kadota K (2001) Pleomorphic rhabdomyosarcoma in a cow. *J Vet Med Sci* 63, 107-110.
- Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB (1998) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) – a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* 12, 2821-2830.
- Astolfi A, De Giovanni C, Landuzzi L, Nicoletti G, Ricci C, Croci S, Scopece L, Nanni P, Lollini P (2001) Identification of new genes related to the myogenic differentiation arrest of human rhabdomyosarcoma cells. *Gene* 274, 139-149.
- Aupperle H, Borgel C, Raila G, Schoon HA (2004) Morphological, immunohistochemical, and ultrastructural findings in an embryonal rhabdomyosarcoma of a newborn thoroughbred foal. *J Eq Vet Sci* 24, 159-164.
- Bae I, Kim Y, Pakhrin B, You M, Hwang C, Kim J, Kim D (2007) Genitourinary rhabdomyosarcoma with systemic metastasis in a young dog. *Vet Pathol* 44, 518-520.
- Bakkar N, Wang J, Ladner KJ, Wang H, Dahlman JM, Carathers M, Acharyya S, Rudnicki MA, Hollenbach AD, Guttridge DC (2008) IKK/NF- $\kappa$ B regulates skeletal myogenesis via a signaling switch to inhibit differentiation and promote mitochondrial biogenesis. *J Cell Biol* 180, 787-802.
- Block G, Clarke K, Salisbury SK, DeNicola DB (1995) Total laryngectomy and permanent tracheostomy for treatment of laryngeal rhabdomyosarcoma in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 31, 510-513.
- Bonar CJ, Lewandowski AH, Skowronek AJ (2007) Embryonal rhabdomyosarcoma in an immature baird's Tapir (*Tapirus Bairdii*). *J Zoo Wildlife Med* 38, 121-124.
- Bradley JR, Pober JS (2001) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20, 6482-6491.
- Breitfeld PP, Meyer WH (2005) Rhabdomyosarcoma: new windows of opportunity. *Oncologist* 10, 518-527.

- Brockman J, Scherer D, McKinsey T, Hall S, Qi X, Lee W, Ballard D (1995) Coupling of a signal response domain in I $\kappa$ B- $\alpha$  to multiple pathways for NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell Biol* 15, 2809-2818.
- Brockus CW, Myers RK (2004) Multifocal rhabdomyosarcomas within the tongue and oral cavity of a dog. *Vet Pathol* 41, 273-274.
- Bryson-Richardson RJ, Currie PD (2008) The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat Rev Genet* 9, 632-646.
- Buckingham M, Relaix F (2007) The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 645-673.
- Canicio J, Ruiz-Lozano P, Carrasco M, Palacin M, Chien K, Zorzano A, Kaliman P (2001) Nuclear factor  $\kappa$ B-inducing kinase and I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  signal skeletal muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 276, 20228-20233.
- Carter RL, McCarthy KP, Machin LG, Jameson CF, Philp ER, Pinkerton CR (1989) Expression of desmin and myoglobin in rhabdomyosarcomas and in developing skeletal muscle. *Histopathology* 15, 585-595.
- Chan W, Wu H, Chang WH (2006) Dosage effects of curcumin on cell death types in a human osteoblast cell line. *Food Chem Toxicol* 44, 1362-1371.
- Chen H, Huang H (1998) Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 124, 1029-1040.
- Clegg PD, Coumbe A (1993) Alveolar rhabdomyosarcoma: an unusual cause of lameness in a pony. *Eq Vet J* 25, 547-549.
- Conejo R, de Alvaro C, Benito M, Cuadrado A, Lorenzo M (2002) Insulin restores differentiation of Ras-transformed C2C12 myoblasts by inducing NF- $\kappa$ B through an AKT/P70S6K/p38-MAPK pathway. *Oncogene* 21, 3739-3753.
- Davicioni E, Anderson MJ, Finckenstein FG, Lynch JC, Qualman SJ, Shimada H, Schofield DE, Buckley JD, Meyer WH, Sorensen PH, Triche TJ (2009) Molecular classification of rhabdomyosarcoma – genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: A report from the Children's Oncology Group. *Am J Pathol* 174, 550-564.
- De Giovanni C, Nanni P, Nicoletti G, Ceccarelli C, Scotlandi K, Landuzzi L, Lollini PL (1989) Metastatic ability and differentiative properties of a new cell line of human embryonal rhabdomyosarcoma (CCA). *Anticancer Res* 9, 1943-1949.
- De Giovanni C, Landuzzi L, Nicoletti G, Lollini PL, Nanni P (2009) Molecular and cellular biology of rhabdomyosarcoma. *Fut Oncol* 5, 1449-1475.
- Ehlers S, Mueck T, Adams S, Landuzzi L, Lollini P, Munz B (2008) RIP2 regulates growth and differentiation of normal myoblasts and of rhabdomyosarcoma cells. *Eur J Cell Biol* 87, 163-172.

- Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL (1995) Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268, 726-731.
- Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA (1996) Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 17, 481-517.
- Galbiati F, Volonté D, Engelman JA, Scherer PE, Lisanti MP (1999) Targeted down-regulation of caveolin-3 is sufficient to inhibit myotube formation in differentiating C2C12 myoblasts. *J Biol Chem* 274, 30315-30321.
- Garg A, Aggarwal BB (2002) Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia* 16, 1053-1068.
- Gerber K, Rees P (2009) Urinary bladder botryoid rhabdomyosarcoma with widespread metastases in an 8-month-old Labrador cross dog. *J S Afr Vet Assoc* 80, 199-203.
- Greten F, Karin M (2004) The IKK/NF- $\kappa$ B activation pathway – a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Letters* 206, 193-199.
- Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS (1999) NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of Cyclin D1. *Mol Cell Biol* 19, 5785-5799.
- Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY, Baldwin Jr AS (2000) NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* 289, 2363-2366.
- Halevy O, Novitch B, Spicer D, Skapek S, Rhee J, Hannon G, Beach D, Lassar A (1995) Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 267, 1018-1021.
- Hayden M, Ghosh S (2008) Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell* 132, 344-362.
- Illanes OG (2002) Juvenile parameningeal rhabdomyosarcoma in a dog causing unilateral denervation atrophy of masticatory muscles. *J Comp Pathol* 126, 303-307.
- Inoue JI, Ishida T, Tsukamoto N, Kobayashi N, Naito A, Azuma S, Yamamoto T (2000) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res* 254, 14-24.
- Inoue J, Gohda J, Akiyama T, Semba K (2007) NF- $\kappa$ B activation in development and progression of cancer. *Cancer Sci* 98, 268-274.
- Jimma K, Wada Y, Ishikawa Y, Kadota K (1999) Differentiated embryonal rhabdomyosarcoma in a cow. *J Vet Med Sci* 61, 577-580.
- Kaliman P, Canicio J, Testar X, Palacín M, Zorzano A (1999) Insulin-like growth factor-II, phosphatidylinositol 3-Kinase, nuclear factor- $\kappa$ B and inducible nitric-oxide synthase define a common myogenic signaling pathway. *J Biol Chem* 274, 17437-17444.
- Kelly DF (1973) Rhabdomyosarcoma of the urinary bladder in dogs. *Vet Pathol* 10, 375-384.

- Keren A, Tamir Y, Bengal E (2006) The p38 MAPK signaling pathway: A major regulator of skeletal muscle development. *Mol Cell Endocrinol* 252, 224-230.
- Kim DY, Hodgins EC, Cho DY, Varnado JE (1996) Juvenile rhabdomyosarcomas in two dogs. *Vet Pathol* 33, 447-450.
- Kim SS, Rhee S, Lee KH, Kim JH, Kim HS, Kang MS, Chung CH (1998) Inhibitors of the proteasome block the myogenic differentiation of rat L6 myoblasts. *FEBS Lett* 433, 47-50.
- Krotje LJ, Ware WA, Niyo Y (1990) Intracardiac rhabdomyosarcoma in a dog. *J Am Vet Med Assoc (USA)* 197, 368-371.
- Kumar A, Takada Y, Boriek A, Aggarwal B (2004) Nuclear factor- $\kappa$ B: its role in health and disease. *J Mol Med* 82, 434-448.
- Kuwamura M, Yoshida H, Yamate J, Kotani T, Ohashi F, Sakuma S (1998) Urinary bladder rhabdomyosarcoma (sarcoma botryoides) in a young Newfoundland dog. *J Vet Med Sci/ Jpn Soc Vet Sci* 60, 619-621.
- Langen RCJ, Schols AMWJ, Kelders MCJM, Wouters EFM, Janssen-Heininger YMW (2001) Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor- $\kappa$ B. *FASEB J* 15, 1169-1180.
- Lee KH, Kim DG, Shin NY, Song WK, Kwon H, Chung CH, Kang MS (1997) NF- $\kappa$ B-dependent expression of nitric oxide synthase is required for membrane fusion of chick embryonic myoblasts. *Biochem J* 324, 237-242.
- Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS (2007) NF- $\kappa$ B as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* 29, 19-35.
- Lee NK, Lee SY (2002) Modulation of life and death by the tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *J Biochem Mol Biol* 35, 61-66.
- Lehtinen SK, Rahkila P, Helenius M, Korhonen P, Salminen A (1996) Down-regulation of transcription factors AP-1, Sp-1, and NF- $\kappa$ B precedes myocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 229, 36-43.
- Li H, Choudhary S, Milner D, Munir M, Kuisk I, Capetanaki Y (1994) Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators MyoD and myogenin. *J. Cell Biol* 124, 827-841.
- Li Y, Schwartz RJ (2001) TNF- $\alpha$  regulates early differentiation of C2C12 myoblasts in an autocrine fashion. *FASEB J* 15, 1413-1415.
- Lin Y, Yao S, Veach RA, Torgerson TR, Hawiger J (1995) Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- $\kappa$ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 270, 14255-14258.
- Lollini PL, De Giovanni C, Landuzzi L, Nicoletti G, Scotlandi K, Nanni P (1991) Reduced metastatic ability of in vitro differentiated human rhabdomyosarcoma cells. *Invasion metastasis* 11, 116-124.

- Mac Lachlan TK, Giordano A (1998) TRAF2 expression in differentiated muscle. *J Cell Biochem* 71, 461-466.
- Madewell B, Lund J, Munn R, others (1988) Canine laryngeal rhabdomyosarcoma: an immunohistochemical and electron microscopic study. *Jpn J Vet Sci* 50, 1077-1084.
- Moon ML, Saunders GK, Martin RA (1990) Vertebral osteosclerosis in a cat secondary to rhabdomyosarcoma. *Vet Radiol, Ultrasound* 31, 39-41.
- Mourkioti F, Rosenthal N (2008) NF- $\kappa$ B signaling in skeletal muscle: prospects for intervention in muscle diseases. *J Mol Med* 86, 747-759.
- Moynagh PN (2005) The NF- $\kappa$ B pathway. *J Cell Sci* 118, 4589-4592.
- Mueck T, Berger F, Buechsler I, Valchanova RS, Landuzzi L, Lollini P, Klingel K, Munz B (2011) TRAF6 regulates proliferation and differentiation of skeletal myoblasts. *Differentiation* 81, 99-106.
- Mugita N, Honda Y, Nakamura H, Fujiwara T, Tanaka K, Omura S, Shimbara N, Ogawa M, Saya H, Nakao M (1999) The involvement of proteasome in myogenic differentiation of murine myocytes and human rhabdomyosarcoma cells. *Int J Mol Med* 3, 127-137.
- Munz B, Hildt E, Springer ML, Blau HM (2002) RIP2, a checkpoint in myogenic differentiation. *Mol Cell Biol* 22, 5879-5886.
- Olivier S, Robe P, Bours V (2006) Can NF- $\kappa$ B be a target for novel and efficient anti-cancer agents? *Biochem Pharmacol* 72, 1054-1068.
- Orzechowski A, Grzelkowska K, Karlik W, Motyl T (2001) Effect of quercetin and DMSO on skeletal myogenesis from C2C12 skeletal muscle cells with special reference to PKB/Akt activity, myogenin and Bcl-2 expression. *Basic Appl Myol* 11, 31-44.
- Otten A, Firpo E, Gerber A, Brody L, Roberts J, Tapscott S (1997) Inactivation of MyoD-mediated expression of p21 in tumor cell lines. *Cell Growth Differ* 8, 1151-1160.
- Parham DM, Ellison DA (2006) Rhabdomyosarcomas in adults and children: an update. *Arch Pathol Lab Med* 130, 1454-1465.
- Paulin D, Li Z (2004) Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res* 301, 1-7.
- Perdiguero E, Ruiz-Bonilla V, Gresh L, Hui L, Ballestar E, Sousa-Victor P, Baeza-Raja B, Jardí M, Bosch-Comas A, Esteller M, Caelles C, Serrano AL, Wagner EF, Muñoz-Cánoves P (2007) Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38 $\alpha$  in abrogating myoblast proliferation. *EMBO J* 26, 1245-1256.
- Perry RL, Rudnick MA (2000) Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci* 5, D750-D767.
- Pikarsky E, Ben-Neriah Y (2006) NF- $\kappa$ B inhibition: a double-edged sword in cancer? *Eur J Cancer* 42, 779-784.

- Rudnicki MA, Jaenisch R (1995) The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *BioEssays* 17, 203-209.
- Sax CM, Farrell FX, Zehner ZE (1989) Down-regulation of vimentin gene expression during myogenesis is controlled by a 5'-flanking sequence. *Gene* 78, 235-242.
- Shirley RB, Kaddour-Djebbar I, Patel DM, Lakshmikanthan V, Lewis RW, Kumar MV (2005) Combination of proteasomal inhibitors lactacystin and MG132 induced synergistic apoptosis in prostate cancer cells. *Neoplasia* 7, 1104-1111.
- Simon D, Gruber AD, Hewicker-Trautwein M, Nolte I (2000) Pathological femoral fracture due to rhabdomyosarcoma in a cat. *J Small Anim Pract* 41, 566-570.
- Singh S, Aggarwal BB (1995) Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B is suppressed by Curcumin (Diferuloylmethane). *J Biol Chem* 270, 24995-25000.
- Suzuki K, Nakatani K, Shibuya H, Sato T (2006) Vaginal rhabdomyosarcoma in a dog. *Vet Pathol* 43, 186-188.
- Tajbakhsh S (2009) Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J Intern Med* 266, 372-389.
- Takiguchi M, Watanabe T, Okada H, Kudo T, Yamada K, Yasuda J, Hashimoto A (2002) Rhabdomyosarcoma (botryoid sarcoma) of the urinary bladder in a Maltese. *J Small Anim Pract* 43, 269-271.
- Tanaka K, Stromberg PC (1993) Embryonal rhabdomyosarcoma in a sheep. *Vet Pathol* 30, 396-399.
- Turnquist SE, Pace LW, Keegan K, Andrews-Jones L, Kreeger JM, Bailey KL, Stogsdill PL, Wilson HA (1993) Botryoid rhabdomyosarcoma of the urinary bladder in a filly. *J Vet Diagn Invest* 5, 451-453.
- Venco L, Kramer L, Sola L, Moccia A (2001) Primary cardiac rhabdomyosarcoma in a cat. *J Am Anim Hosp Assoc* 37, 159-163.
- Vos JH, Borst GHA, de las Mulas JM, Ramaekers FCS, van Mil FN, Molenbeek RF, Ivanyi D, van den Ingh TSGAM (1993) Rhabdomyosarcomas in young pigs in a swine breeding farm: A morphologic and immunohistochemical study. *Vet Pathol* 30, 271-279.
- Walsh K, Perlman H (1997) Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Current opinion in genetics, Development* 7, 597-602.
- Woo J, Kim Y, Choi Y, Kim D, Lee K, Bae JH, Min DS, Chang J, Jeong Y, Lee YH, Park J, Kwon TK (2003) Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Carcinogenesis* 24, 1199-1208.
- Xia SJ, Pressey JG, Barr FG (2002) Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Biol Ther* 1, 97-104.

- Yhee J, Kim D, Hwang D, Moon C, Yu C, Kim H, Doster AR, Sur J (2008) Hematogenous metastasis of embryonal rhabdomyosarcoma originating from skeletal muscle in a young dog. *J Vet Diagn Invest* 20, 243-246.
- Yohei M, Masanori M, Junji M, Ichiro I, Yasunori K (1998) A cow with orbital rhabdomyosarcoma. *Hiroshima J Vet Med* 13, 48-50.

## 9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APS	Ammoniumperoxodisulfat
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle`s medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunsorbent assay</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKHR	<i>Forkhead related transcription factor</i>
FKS	Fötales Kälberserum, <i>Fetal bovine serum</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
I $\kappa$ B	Inhibitorische-NF- $\kappa$ B-Proteine
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
MOPS	(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MRF	Myogene Regulationsfaktoren
N/V	Nicht verfügbar
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
NLS	<i>Nuclear localization sequence</i>
Pax	<i>Paired box</i> Transkriptionsfaktoren
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RIP2	<i>Receptor interacting protein 2</i>
RT	Raumtemperatur

SDS	Natriumlaurylsulfat
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SR	<i>Superrepressor</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
TRAF	<i>Tumor necrosis factor receptor associated factor</i>
Tris	Tris-Hydroxymethyl-aminomethan

## PUBLIKATIONEN

Mueck\* T, Berger\* F, Buechsler\* I, Valchanova RS, Landuzzi L, Lollini P, Klingel K, Munz B  
(2011) TRAF6 regulates proliferation and differentiation of skeletal myoblasts.  
Differentiation 81, 99-106. \*geteilte Erstautorenschaft

## **DANKSAGUNG**

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an Frau Prof. Dr. Barbara Munz richten. Sie war jederzeit bereit, mich mit hilfreicher Kritik und wertvollen Ratschlägen zu unterstützen. Ihre Geduld und Hilfsbereitschaft waren mir für das Gelingen dieser Arbeit unverzichtbar.

Ganz herzlich danke ich auch Herrn Prof. Dr. Gruber für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin.

Den Mitgliedern der AG Munz möchte ich für die schöne Zeit und die nette Zusammenarbeit danken. Insbesondere danke ich Theresia Breustedt für die aufmunternden Spaziergänge zum Schokoladenautomaten und die langen telefonischen Krisensitzungen.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie diese Arbeit ermöglicht haben und dass sie immer an mich glauben und mir stets den Rücken stärken.

Meinem Freund möchte ich dafür danken, dass er immer für mich da ist und mir bei Problemen jeglicher Art helfend zur Seite steht.

Für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich meiner Tante Ursula Büchsler.

## **SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Lage, den 06.01.2011

Ingrid Büchsler