

Medizinische Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin  
aus dem Institut für Physiologie

Direktor: Prof. Dr. A. R. Pries

**Die Rolle von TRAF6  
und seines Effektors NF- $\kappa$ B  
bei der Myoblastendifferenzierung**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades

*Doctor rerum medicarum*

Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Tobias Mück  
aus Wiesbaden

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Barbara Munz

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H. Fan

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 01. Juni 2008

...für Petra...

**Die Rolle von TRAF6  
und seines Effektors NF- $\kappa$ B  
bei der Myoblastendifferenzierung**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	<b>Skelettmuskelzellendifferenzierung</b>	<b>10</b>
1.2	<b>Rhabdomyosarkome</b>	<b>12</b>
1.2.1	Carcinogenese	12
1.2.2	Entstehung und Charakteristika von Rhabdomyosarkomen	14
1.3	<b><i>Nuclear factor kappa B (NF-κB)</i></b>	<b>17</b>
1.3.1	Struktureller Aufbau von NF-κB	17
1.4	<b><i>Tumor necrosis factor receptor associated factors (TRAFs)</i></b>	<b>19</b>
1.4.1	Struktureller Aufbau der TRAF-Proteine	19
1.4.2	<i>Tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6)</i>	21
1.4.3	TRAF6-vermittelte Aktivierung von NF-κB	21
1.4.4	Physiologische und pathologische Funktionen von TRAF6 und NF-κB	23
1.4.5	TRAF6, NF-κB und Skelettmuskelzellendifferenzierung	24
1.4.6	TRAF6, NF-κB und Tumorigenese	26
1.5	<b>Fragestellung und Ziele dieser Arbeit</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1	<b>Material</b>	<b>29</b>
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	29
2.1.2	Standardpuffer und Lösungen	31
2.1.3	Enzyme	31
2.1.4	Antikörper	31
2.1.5	Plasmide	31
2.1.6	Kommerzielle Kits	32
2.1.7	Transfektionsreagenzien und siRNAs	32
2.1.8	Bakterienstämme	32
2.1.9	Eukaryontische Zelllinien	32
2.1.10	Mäusestämme	33

<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>33</b>
2.2.1	Zellbiologische Methoden .....	33
2.2.1.1	Kultivierung und Aufbewahrung eukaryontischer Zellen.....	33
2.2.1.2	Induktion der Differenzierung.....	35
2.2.1.3	Transfektion von <i>small interfering</i> RNA (siRNA).....	35
2.2.1.4	Behandlung der Zellen mit Lactacystin.....	36
2.2.1.5	Behandlung der Zellen mit Curcumin .....	37
2.2.2	Mikrobiologische Methoden .....	37
2.2.2.1	Anzucht und Aufbewahrung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	37
2.2.2.2	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Stämme.....	39
2.2.2.3	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA.....	39
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	40
2.2.3.1	Reinigung von Nukleinsäuren über Phenolextraktion und Ethanol-fällung.....	40
2.2.3.2	Plasmid-Präparation .....	40
2.2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	41
2.2.3.4	Analytische Agarose-Gelelektrophorese .....	41
2.2.3.5	<i>In vitro</i> -Reaktionen an DNA .....	42
2.2.3.5.1	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen .....	42
2.2.3.5.2	Herstellung von RNA-Sonden auf der Basis von rekombinanten Plasmiden .....	42
2.2.3.6	RNA-Techniken .....	43
2.2.3.6.1	Allgemeine Richtlinien für das Arbeiten mit RNA .....	43
2.2.3.6.2	Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Zelllysaten .....	43
2.2.3.6.3	Isolierung gesamtzellulärer RNA aus murinen Geweben.....	43
2.2.3.7	<i>Northern Blot</i> -Analyse .....	44
2.2.4	Immunologische Methoden .....	48
2.2.4.1	5-Bromo-2'-desoxy-Uridin Markierung .....	48
2.2.5	Histologische Methoden.....	48
2.2.5.1	Anfertigen von Gefrierschnitten .....	48
2.2.5.2	Hämatoxylin/Eosin-Färbung .....	49
2.2.5.3	Histologische Analyse der Gewebeschnitte.....	50
2.2.5.4	Histologische Analyse der Zelllinien .....	50
2.2.6	Arbeit mit Versuchsmäusen .....	50

## Inhaltsverzeichnis

2.2.6.1	<i>mdx</i> -Mäuse und Kontrolltiere.....	50
2.2.6.2	Coxsackie B3-Virus infizierte Mäuse und Kontrolltiere .....	51
2.2.7	Statistische Methoden.....	51
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1</b>	<b>Expression des <i>traf6</i>-Gens in der Skelett- und Herzmuskulatur .....</b>	<b>52</b>
3.1.1	Expression des <i>traf6</i> -Gens in verschiedenen murinen Muskel- und Nichtmuskelgeweben .....	52
3.1.2	Expression des <i>traf6</i> -Gens unter pathologischen Bedingungen.....	54
3.1.2.1	Expression des <i>traf6</i> -Gens in der dystrophischen <i>mdx</i> -Maus.....	55
3.1.2.2	Expression des <i>traf6</i> -Gens bei der CVB3-induzierten inflammatorischen Kardiomyopathie.....	61
<b>3.2</b>	<b>Expression des <i>traf6</i>-Gens bei der Muskelzellendifferenzierung <i>in vitro</i>.....</b>	<b>63</b>
3.2.1	Expression des <i>traf6</i> -Gens bei der Differenzierung der murinen Myoblasten-Zelllinie C2C12.....	64
3.2.2	Expression des <i>traf6</i> -Gens bei der Differenzierung der murinen Myoblasten-Zelllinie C2F3 .....	69
3.2.3	Expression des <i>traf6</i> -Gens bei der Differenzierung humaner Rhabdomyosarkomzellen .....	70
<b>3.3</b>	<b>Einfluss einer Hemmung der Expression des <i>traf6</i>-Gens und der Aktivität des TRAF6-Effektors NF-<math>\kappa</math>B auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Myoblasten.....</b>	<b>73</b>
3.3.1	Hemmung der <i>traf6</i> -Expression mittels spezifischer siRNAs.....	74
3.3.1.1	Hemmung der <i>traf6</i> -Expression mittels spezifischer siRNAs in der murinen Myoblasten-Zelllinie C2C12.....	74
3.3.1.2	Hemmung der <i>traf6</i> -Expression mittels spezifischer siRNAs in der humanen Rhabdomyosarkom-Zelllinie RD/18 .....	76
3.3.2	Einfluss der Hemmung der <i>traf6</i> -Expression auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von C2C12-Zellen .....	78

## Inhaltsverzeichnis

3.3.3	Einfluss einer Hemmung der <i>traf6</i> -Expression auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von RD/18-Zellen.....	81
<b>3.4</b>	<b>Einfluss einer Hemmung der Aktivität des TRAF6-Effektors NF-<math>\kappa</math>B auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Myoblasten.....</b>	<b>84</b>
3.4.1	Einfluss einer Hemmung des TRAF6-Effektors NF- $\kappa$ B durch Lactacystin und Curcumin auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von C2C12-Zellen .....	84
3.4.2	Einfluss einer Hemmung des TRAF6-Effektors NF- $\kappa$ B durch Lactacystin und Curcumin auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von RD/18-Zellen .....	88
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>92</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchung zur <i>traf6</i>-Genexpression in murinem Skelett- und Herzmuskelgewebe unter physiologischen und pathologischen Bedingungen .....</b>	<b>93</b>
4.1.1	<i>mdx</i> -Mäuse zeigen eine im Vergleich zu Wildtypmäusen schwächere <i>traf6</i> -Expression in der Skelett- und Herzmuskulatur .....	93
4.1.2	Eine Infektion mit Coxsackievirus B3 (CVB3) kann eine starke Induktion der <i>traf6</i> -Expression im Herzmuskelgewebe zur Folge haben .....	96
<b>4.2</b>	<b>Untersuchung zur <i>traf6</i>-Genexpression nach Induktion der Skelettmuskelzellendifferenzierung .....</b>	<b>98</b>
4.2.1	C2C12- und C2F3-Zellen unterscheiden sich bezüglich ihrer <i>traf6</i> -Expression während des Differenzierungsprozesses .....	98
4.2.2	Bei RD/18-Zellen wird <i>traf6</i> nach Induktion der Differenzierung kaum reprimiert .....	99
<b>4.3</b>	<b>Eine Hemmung der <i>traf6</i>-Expression hat Einfluss auf das Proliferations und Differenzierungsverhalten von C2C12- und RD/18-Zellen.....</b>	<b>101</b>

## Inhaltsverzeichnis

4.3.1	Eine Hemmung der <i>traf6</i> -Expression hemmt die Proliferation von C2C12- und RD/18-Zellen .....	101
4.3.2	Eine Hemmung der <i>traf6</i> -Expression beeinflusst die Expression myogener Differenzierungsmarker .....	104
4.3.3	Eine Hemmung des TRAF6-Effektors NF- $\kappa$ B bewirkt in C2C12- und RD/18-Zellen eine Induktion der <i>p21</i> -Expression .....	106
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>132</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>135</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>136</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>137</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Skelettmuskelzellendifferenzierung

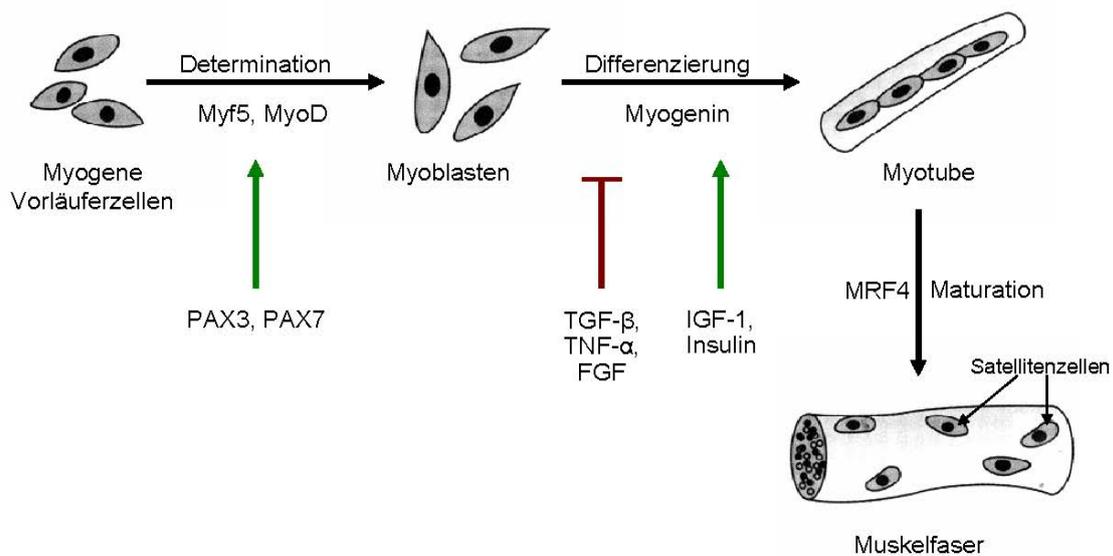
Die Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen zur fertigen Skelettmuskelfaser wird als Skelettmuskelzellendifferenzierung bezeichnet.

Zunächst wird dabei das Entwicklungspotential spezifischer, ursprünglich pluripotenter Stammzellen sukzessive eingeschränkt. Hierdurch entwickeln sich über myogene Vorläuferzellen irreversibel spezifizierte, aber noch nicht differenzierte, proliferierende und migrierende Myoblasten. An diesem als Determinierung bezeichneten Vorgang sind die *paired box*-Transkriptionsfaktoren PAX3 und PAX7 ursächlich beteiligt. Deren Gene werden in myogenen Vorläuferzellen exprimiert und fördern durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Myf5 und MyoD die Determinierung zu Myoblasten (Mansouri et al., 1998; Mansouri et al., 1999).

Unter dem Einfluss von Myogenin, einem weiteren myogenen Regulationsfaktor (MRF), wird dann mit dem Austritt aus dem Zellzyklus und der Expression muskelspezifischer Gene die Differenzierung der Myoblasten zu Myozyten vorangetrieben, die schließlich miteinander zu großen Synzytien fusionieren. Dieser Schritt wird als terminale Differenzierung bezeichnet.

An der Maturation der entstandenen Myotuben zu großen Muskelfasern ist der myogene Regulationsfaktor MRF4 beteiligt (Palmer und Rudnicki, 2002).

## Einleitung



**Abbildung 1: Entwicklung einer Muskelfaser.** Durch Determinierungsvorgänge, die vor allem von den Transkriptionsfaktoren Myf5 und MyoD gesteuert werden, bilden sich aus myogenen Vorläuferzellen Myoblasten, die unter dem Einfluss von Myogenin differenzieren und anschließend zu multinukleären Myotuben verschmelzen. Aus mehreren Myotuben bildet sich unter dem Einfluss von MRF4 schließlich eine reife Muskelfaser. Fördernde (grüne Pfeile) und hemmende Faktoren (roter Balken) sind dargestellt. Satellitenzellen sind für Regenerationsprozesse von Bedeutung (Modifiziert nach Carlson, 2004; Palmer und Rudnicki, 2002).

Neben den erwähnten Transkriptionsfaktoren sind eine Vielzahl weiterer Faktoren an der Regulation der Myogenese beteiligt: So ist bekannt, dass die Transkriptionsfaktoren der *muscle enhancer factor-2*-Familie (MEF2) und die oben erwähnten MRFs sich gegenseitig in ihrer Gen-Expression regulieren und als Komplex die Expression von weiteren Genen kontrollieren, die Einfluss auf die Myogenese haben (Molkentin et al., 1995; Black et al., 1998). Ebenso sind verschiedene Wachstumsfaktoren zu nennen, die regulatorische Aufgaben bei der Skelettmuskeldifferenzierung erfüllen: Die Wachstumsfaktoren *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor-β* (TGF-β) und *tumor necrosis factor-α* (TNF-α) fördern die Myoblastenproliferation und hemmen die Differenzierung der Zellen. Hierbei wird eine Beteiligung des JNK-p38-ERK Signaltransduktionswegs angenommen. Im Gegensatz dazu fördert *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) ebenso wie Insulin die Skelettmuskeldifferenzierung (Langen et al., 2004; Allen und Boxhorn, 1989; Miller et al., 1988; Rosenthal und Cheng, 1995; Kalebic et al., 1994).

## Einleitung

Auf der Oberfläche von Muskelfasern sind schließlich Satellitenzellen zu finden. Diese einkernigen Myoblasten werden bei Regenerationsprozessen aktiviert. Sie proliferieren und verschmelzen mit anderen Satellitenzellen und vorhandenen Muskelfasern. Es entsteht neues Muskelgewebe. Diese Regenerationsprozesse ähneln dabei mechanistisch den oben beschriebenen Vorgängen der Skelettmuskeldifferenzierung (Seale und Rudnicki, 2000; Bischoff und Heintz, 1994).

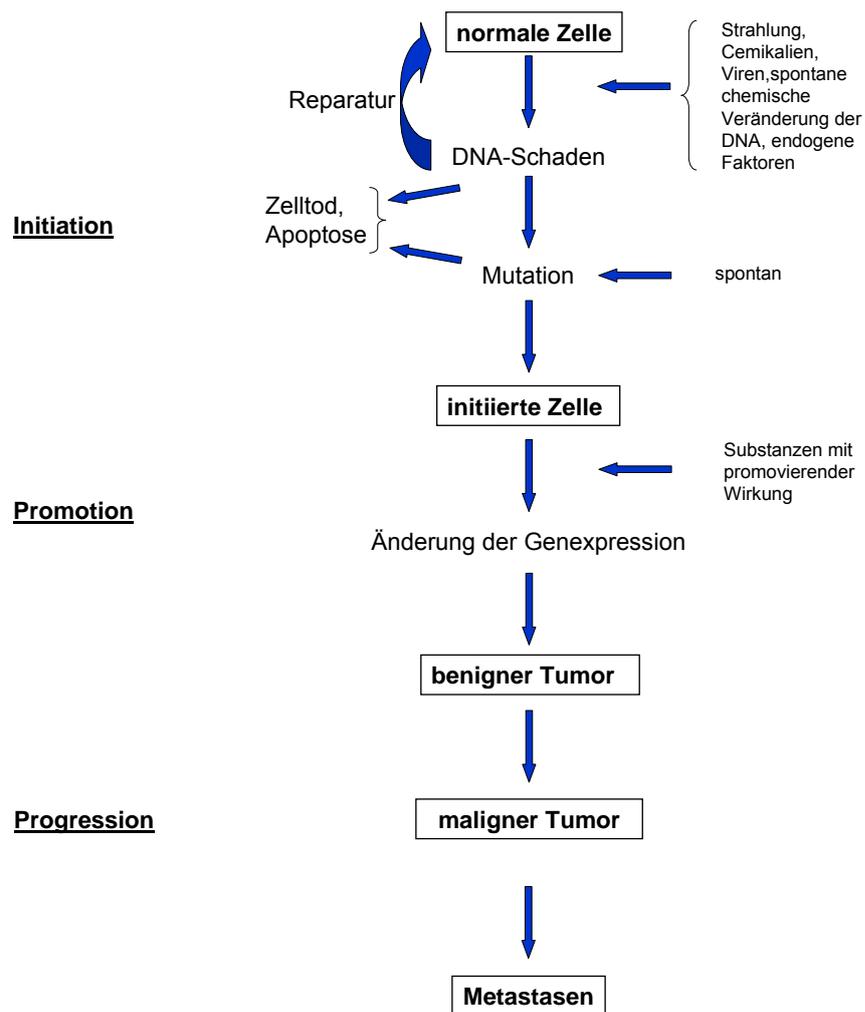
## **1.2 Rhabdomyosarkome**

### **1.2.1 Carcinogenese**

Der mehrstufige Prozess, bei dem aus einer gesunden Zelle ein maligner Tumor entsteht, wird als Carcinogenese bezeichnet. Die Tumorentstehung kann dabei in drei Phasen unterteilt werden: Die Initiation, die Promotion und die Progression. In der Initiations-Phase entsteht durch Strahlung, Chemikalien, Viren oder spontane chemische Veränderungen der DNA zunächst ein DNA-Schaden (Strangbruch, Basenaustausch oder Alkylierung). Die Zelle hat dann die Möglichkeit, den DNA-Schaden zu reparieren (z.B. durch Basenexzisionsreparatur, Nukleotidexzisionsreparatur oder DNA-*mismatch*-Reparatur), oder der DNA-Schaden führt zum apoptotischen Zelltod. Sollten diese Kontrollmechanismen nicht greifen, kann die Mutation an die Tochterzellen weitergegeben werden. Somit wird ersichtlich, dass sowohl die DNA-Reparatur als auch der programmierte Zelltod wichtige Schutzmechanismen für die Zelle darstellen. Ein Ausfall dieser Schutzprogramme begünstigt die Krebsentstehung (Venitt, 1994).

Die Mutation kann dabei als initiirender Schritt der Tumorentstehung gesehen werden. Es schließt sich die Promotionsphase an, in der durch Proliferation aus der einmal initiierten Zelle ein Tumor entsteht. Promotoren sind somit Substanzen, die die Krebsbildung nach Initiation fördern.

## Einleitung



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entstehung eines malignen Tumors.** Die drei Phasen der Carcinogenese sind schematisch dargestellt (Initiation, Promotion und Progression). In der Initiations-Phase können DNA-Schäden noch repariert werden oder ein DNA-Schaden bzw. eine Mutation führen zum Zelltod durch Apoptose. Eine einmal initiierte Zelle kann durch Promotion zum Tumor führen. Die Entstehung eines malignen Tumors oder auch die von Metastasen findet in der Progressionsphase statt (Modifiziert nach Perera, 1996).

In der Progressionsphase entsteht, durch Anhäufung entsprechender genetischer Veränderungen, aus einer benignen Geschwulst ein maligner Tumor. Dabei sind besonders die Mutationen von Protoonkogenen und Antionkogenen (Tumor-Suppressor-Genen) zu erwähnen, da auch diese an einer Tumorentstehung beteiligt sein können. Als Beispiele wären hier das *ras*-Onkogen und eine Mutation des *p53*-Tumor-Suppressor-Gens zu nennen. Die Zelle ist nun potentiell maligne. Sie teilt sich stetig und ist unsterblich. Nach zahlreichen Zellteilungen wird eine Tumormasse

## Einleitung

aufgebaut. Die Zellen entdifferenzieren sich zunehmend, weisen also andere Merkmale als die übrigen Zellen des Zellverbandes auf. In dieser Phase kann der Tumor durch Invasion in umliegendes Gewebe eindringen. Ebenso ist ein Eindringen in Blut- oder Lymphbahn möglich. Man spricht dann von Metastasierung (Perera, 1996; Venitt, 1994).

### **1.2.2 Entstehung und Charakteristika von Rhabdomyosarkomen**

Rhabdomyosarkome sind Weichteiltumore, die hauptsächlich im Kindesalter auftreten. Während sie bei Erwachsenen kaum vorkommen, gehören sie bis zum Jugendalter zu den häufigsten Tumortypen: Fünf Prozent aller kindlichen Tumore sind Rhabdomyosarkome. Jährlich entwickeln zwischen vier und sieben von einer Million Kindern im Alter von 15 Jahren oder jünger ein Rhabdomyosarkom (Dagher und Helman, 1999).

Rhabdomyosarkome finden sich vor allem im Bereich der Extremitäten, im Kopf-Hals-Bereich und im Urogenitaltrakt.

Sie sind wie alle anderen Sarkom-Arten mesenchymalen Ursprungs und gehen auf partiell differenziertes embryonales Skelettmuskelgewebe zurück. Histopathologisch unterscheidet man den embryonalen und den alveolären-Typus (Barr, 1997):

Das embryonale Rhabdomyosarkom tritt meist bis zum zehnten Lebensjahr auf und manifestiert sich häufig an Kopf und Hals (Orbita, Gehörgang, Nasennebenhöhlen), Urogenitaltrakt oder Retroperitoneum (Harnblase, Prostata, Hoden, Vagina). Die Prognose auf Heilung ist günstig (Dagher und Helman, 1999; Xia et al., 2002).

Das alveoläre Rhabdomyosarkom, welches eine schlechte Prognose auf Heilung hat, tritt meist im Jugendalter auf. Bei diesem Typus sind die Tumoren meist an den Extremitäten oder am Rumpf lokalisiert. Prinzipiell kann ein Rhabdomyosarkom jedoch überall dort entstehen wo mesenchymales Gewebe vorhanden ist (Liu et al., 2007; Dagher und Helman, 1999).

Bei Rhabdomyosarkomen vom embryonalen Typ ist meist ein Allelverlust in der chromosomalen Region 11p15.5 für die Tumorigenese verantwortlich. Die Vermutung, dass durch den Allelverlust wichtige Tumor-Suppressor-Gene verloren gehen, wurde

## Einleitung

durch Chromosomen-Transfer-Studien in Rhabdomyosarkom-Zelllinien vom embryonalen Typ untermauert (Loh et al., 1992).

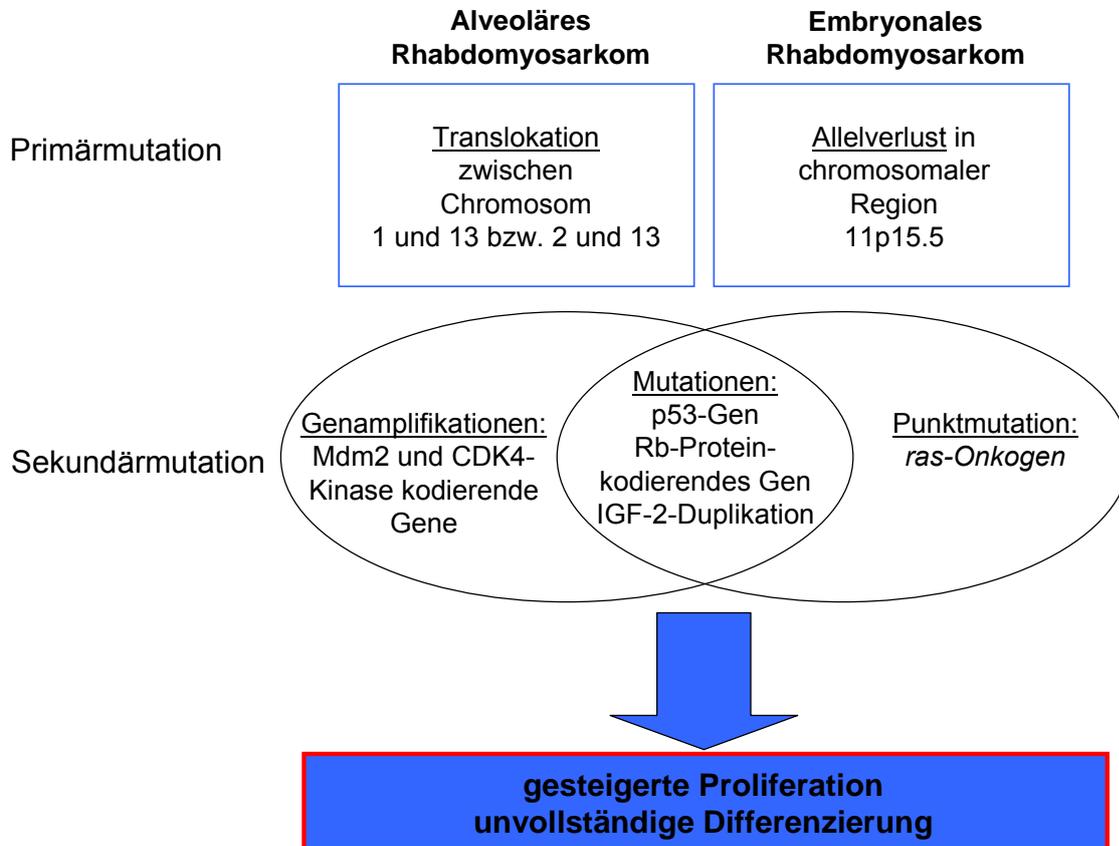
Siebzig Prozent aller Fälle eines alveolären Rhabdomyosarkoms zeigen eine Translokation zwischen den Chromosomen 1 und 13 bzw. 2 und 13 (Xia et al., 2002; Barr et al., 1992). Dies führt zu einer Bildung von Fusionsproteinen aus Transkriptionsfaktoren der *paired box*- und *fork head*-Familien, in erster Linie PAX3-FKHR und PAX7-FKHR (Galili et al., 1993; Fredericks et al., 1995). Diese Proteine unterscheiden sich durch eine veränderte Expression der entsprechenden Gene, ein aberrantes DNA-Bindungs- und Aktivierungsmuster sowie ihre spezifische subzelluläre Lokalisation von den entsprechenden Wildtypproteinen.

Dadurch kommt es zu einem pathologischen Aktivierungsmuster verschiedener Zielgene, woraus letztendlich eine erhöhte Zellproliferationsrate, ein verringertes terminales Differenzierungspotential und eine Blockade apoptotischer Prozesse resultiert (Anderson et al., 1990; Epstein et al., 1995; Margue et al., 2000). Allerdings konnte in Versuchen mit verschiedenen transgenen Mausmodellen gezeigt werden, dass das Fusionprotein PAX3-FKHR alleine keine ausreichende Bedingung für Tumorwachstum ist (Barr, 1997). Vielmehr scheinen noch weitere genetische Faktoren und Sekundärmutationen eine Rolle zu spielen.

Während beim embryonalen Typus als Sekundärmutationen häufig Punktmutationen zu beobachten sind (z.B. Mutationen des *ras*-Onkogens, die eine unkontrollierte Zellvermehrung bewirken), wurden beim alveolären Typus vor allem Amplifikationen bestimmter chromosomaler Regionen gefunden. Betroffen sind davon häufig die für den p53-Inhibitor Mdm2 (*murine double minute2*) sowie für die CDK4-Kinase (*cyclin-dependent kinase4*) kodierenden Gene, was zu einer Fehlregulation des Zellzyklus führt (Xia et al., 2002). Schließlich wurden sowohl beim embryonalen als auch beim alveolären Rhabdomyosarkom weitere Mutationen beschrieben: Zum einen ist hier die häufige Mutation des Tumor-Suppressor-Gens *p53* sowie des für das Retinoblastoma-Protein kodierenden Gens (Fehlregulation des Zellzyklus), zum anderen eine Allelduplikation am IGF-2-Lokus zu nennen. Diese bewirkt dabei eine Überproduktion von IGF-2. Dies ist insbesondere aufgrund der Tatsache interessant, dass nachgewiesen werden konnte, dass IGF-2 das Tumorzellwachstum von Rhabdomyosarkomen stimulieren kann. Die Tatsache, dass durch die Blockade des IGF-2-Rezeptors das Wachstum von Rhabdomyosarkomen gehemmt werden konnte,

## Einleitung

lässt darüber hinaus vermuten, dass IGF-2 eine wichtige Rolle bei der Tumorigenese einnimmt (Dagher und Helman, 1999; El Badry et al., 1990; Kalebic et al., 1994).



**Abbildung 3: Übersicht über häufig auftretende Primär- und Sekundärmutationen beim alveolären und embryonalen Rhabdomyosarkom.** Die durch die Mutationen auftretenden Effekte sind im Text näher beschrieben.

Sowohl beim embryonalen als auch beim alveolären Rhabdomyosarkom zeichnen sich die beteiligten Muskelzellen durch einen geringen Differenzierungsgrad aus. Sie scheinen also auf einer frühen Stufe des Differenzierungsprozesses zu verharren. Daher findet man auch ein niedriges Expressionsniveau von Genen, die für Inhibitoren des Zellzyklus kodieren. Das für eine terminale Differenzierung notwendige Ausschleichen aus dem Zellzyklus bleibt daher aus und es resultiert eine hohe Proliferationsrate der Zellen auch unter differenzierungsförderlichen Bedingungen (Xia et al., 2002).

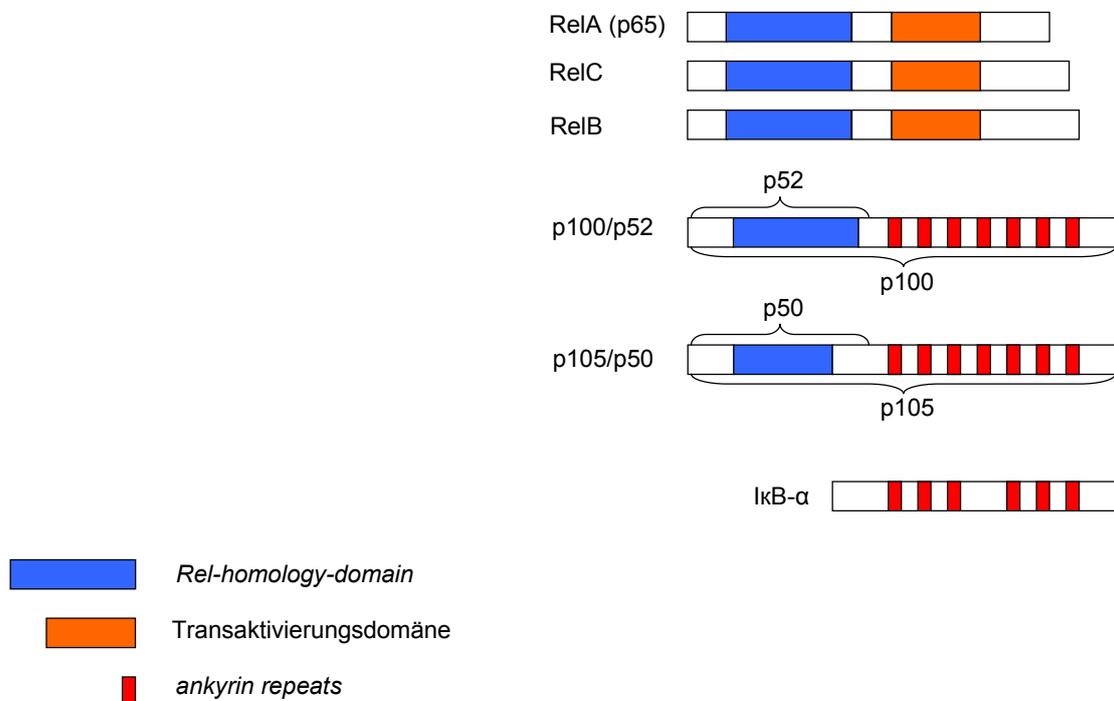
## **1.3 Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B )**

### **1.3.1 Struktureller Aufbau von NF- $\kappa$ B**

*Nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, der erstmals 1986 in murinen B-Lymphozyten entdeckt wurde. Dort übt er starke Aktivität an einem spezifischen Sequenzmotiv aus, welches sich im *Enhancer*-Bereich der Gene für die leichte Kette  $\kappa$  der Immunglobuline befindet (Sen und Baltimore, 1986). NF- $\kappa$ B ist ein homo- oder heterodimerer Faktor, der sich aus folgenden fünf Rel-Untereinheiten zusammensetzen kann: p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B 2), p65 (RelA), RelB und RelC. Alle Untereinheiten zeichnen sich durch die N-terminal gelegene, ca. 300 Aminosäuren lange *Rel-homology-domain* (RHD) aus. Innerhalb dieser Domäne befindet sich die DNA-Bindestelle, das Kernlokalisierungssignal (NLS) sowie die Dimerisierungsregion (Baldwin, 1996). Im Gegensatz zu NF- $\kappa$ B1 und NF- $\kappa$ B2 enthalten die so genannten Rel-Proteine (RelA, RelB und RelC) noch mindestens eine Transaktivierungsdomäne. Obwohl viele verschiedene Dimere möglich wären, beobachtet man am häufigsten die Bildung von Heterodimeren aus einem Rel-Protein und einem Nicht-Rel-Protein. Durch die Transaktivierungsdomäne des Rel-Proteins wirken solche Heterodimere in der Regel aktivierend auf die Expression spezifischer Gene. Als klassisches Beispiel ist das am häufigsten vorkommende p50/p65-Dimer zu nennen (Messer und Rupec, 2001). NF- $\kappa$ B liegt im inaktiven Zustand als zytoplasmatischer Komplex mit dem Inhibitorprotein I $\kappa$ B vor. Bisher sind sieben I $\kappa$ B-Moleküle identifiziert worden (I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ , I $\kappa$ B- $\gamma$ , I $\kappa$ B- $\epsilon$ , Bcl-3 und die Vorläuferproteine p100 und p105), wobei I $\kappa$ B- $\alpha$  das am besten untersuchte I $\kappa$ B-Molekül ist. I $\kappa$ B- $\alpha$  weist wie alle anderen I $\kappa$ B-Moleküle eine ca. 30 bis 33 Aminosäuren lange Region auf, die man *ankyrin repeats domain* nennt. Diese *ankyrin repeats*-Region scheint für die Interaktion mit NF- $\kappa$ B von Bedeutung zu sein (Inoue et al., 1992; Ernst et al., 1995). Folgende Mechanismen sind für die inhibierende Wirkung von I $\kappa$ B auf NF- $\kappa$ B von Bedeutung: Durch Maskierung des Kernlokalisierungssignals (NLS) hemmt I $\kappa$ B- $\alpha$  die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern. Außerdem wird im Kern befindliches NF- $\kappa$ B durch I $\kappa$ B- $\alpha$  ins Zytoplasma ausgeschleust. Anschließend wird der Komplex aus NF- $\kappa$ B und I $\kappa$ B im Zytoplasma

## Einleitung

zurückgehalten und ist somit transkriptionell inaktiv (Arenzana-Seisdedos et al., 1997; Beg et al., 1992; Zabel et al., 1993).



**Abbildung 4: Domänenstrukturen der NF-κB- und IκB-Proteine.** Man erkennt die für die NF-κB-Familie typische *Rel-homology-domain*. Die Rel-Proteine sind zusätzlich mit einer Transaktivierungsdomäne ausgestattet. Diese fehlt den Proteinen p52 (NF-κB1) und p50 (NF-κB2). Als Vorläuferproteine von p52 (NF-κB1) und p50 (NF-κB2) zeigen p100 und p105 die *Rel-homology-domain* und zusätzlich die *ankyrin repeats*-Region, weswegen sie zu den NF-κB-Inhibitoren zählen (Modifiziert nach Baldwin, 1996).

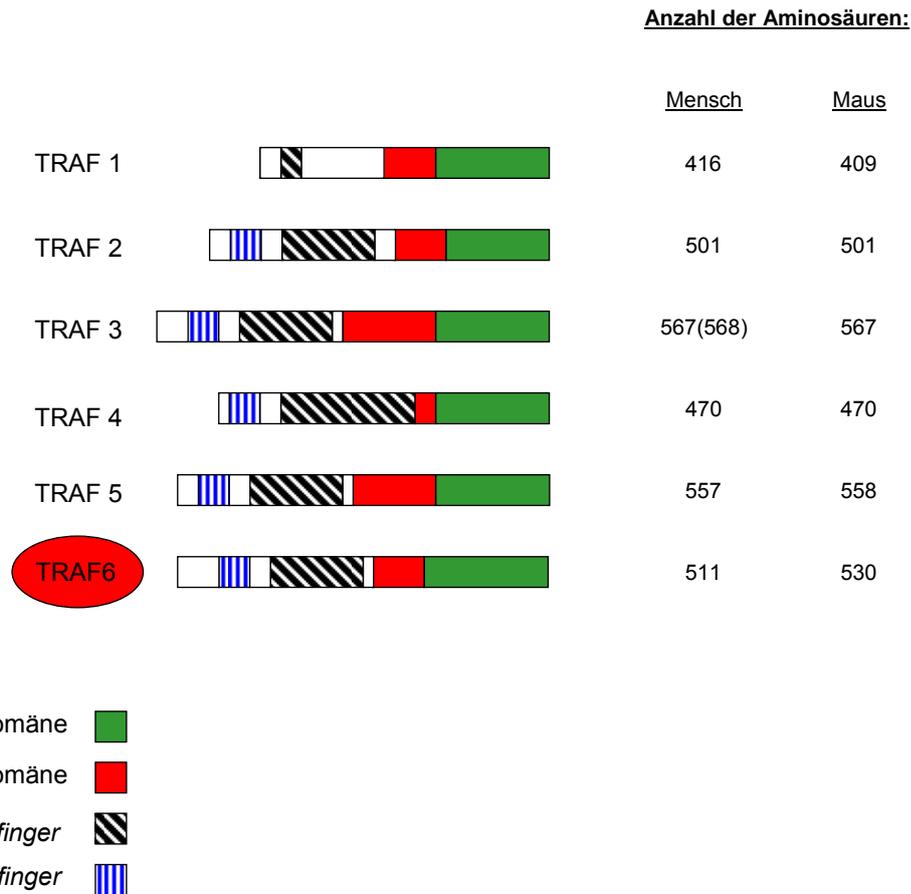
## **1.4 *Tumor necrosis factor receptor associated factors* (TRAFs)**

### **1.4.1 Struktureller Aufbau der TRAF-Proteine**

*Tumor necrosis factor receptor associated factors* (TRAFs) gehören zu einer Familie von Adaptorproteinen, die ursprünglich aufgrund ihrer Beteiligung an der Signaltransduktion durch TNF-Rezeptoren identifiziert wurden. Heute weiß man, dass sie noch an weiteren Rezeptoren der TNFR-Familie bei der Signalweiterleitung eine Rolle spielen (Bradley und Pober, 2001).

Die Familie der TRAFs zählt sechs Mitglieder: TRAF1-6. Strukturell haben alle TRAFs eine *zinc finger domain*, bis auf TRAF1 besitzen sie zusätzlich eine *RING finger domain*. Die mittig gelegene TRAF-N Domäne der TRAFs weist oft *coiled-coil* Strukturen auf, und sie haben eine hochkonservierte carboxyterminale TRAF-C-Domäne. Diese vermittelt Homo- und Hetero-Dimersierung der TRAF-Proteine sowie Interaktionen der Adaptorproteine mit den verschiedenen Transmembranrezeptoren der TNFR-Familie (Arch et al., 1998).

## Einleitung



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Struktur der TRAF-Proteine.** Die für die TRAF-Moleküle charakteristischen N-terminale *zinc finger domain* und die *RING finger domain* sind gezeigt. Die TRAF-C-Domäne ist hochkonserviert und die TRAF-N-Domäne weist oft *coiled coil*-Strukturen auf. Die Größe der einzelnen TRAF-Proteine ist durch die Anzahl der jeweiligen Aminosäuren angegeben (Modifiziert nach Inoue et al., 2000).

Während TRAF4 vorwiegend als Kernprotein vorkommt, sind die restlichen TRAFs cytosolische Proteine. Dabei kommen TRAF2, TRAF3 und TRAF6 ubiquitär vor, das Vorkommen der restlichen TRAFs ist jeweils auf einige wenige Gewebe beschränkt (Arch et al., 1998).

### **1.4.2 Tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6)**

Das in dieser Arbeit untersuchte Adaptorprotein TRAF6 ist in die Signalweiterleitung sowohl am TNF-Rezeptor als auch am *Toll like*-Rezeptor (TLR) und an IL-Rezeptoren (ILR) involviert und vermittelt dabei die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 (siehe Abb.6) (Bradley und Pober, 2001; Medzhitov et al., 1998). TRAF6 nimmt insofern eine Sonderstellung im Vergleich zu den weiteren fünf bekannten TRAFs ein, da es eine separate Bindestelle am TNF-Rezeptor hat. Desweiteren unterscheidet sich die TRAF6-vermittelte Signaltransduktion über den IL-1-Rezeptor von der der übrigen TRAFs, und eine dominant-negative Form von TRAF6 vermag die Signaltransduktion über den Toll-Rezeptor zu hemmen (Inoue et al., 2000; Lee und Lee, 2002).

### **1.4.3 TRAF6-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B**

Verschiedene Stimuli bewirken die Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Zu diesen zählen Noxen, wie z.B. virale RNA oder Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien, UV-Strahlung und freie Radikale, aber auch Zytokine wie *Interleukin-1* (IL-1) oder TNF- $\alpha$ . Weitere physiologische und pathophysiologische Aktivatoren (z.B. DNA-Schäden) werden vermutet.

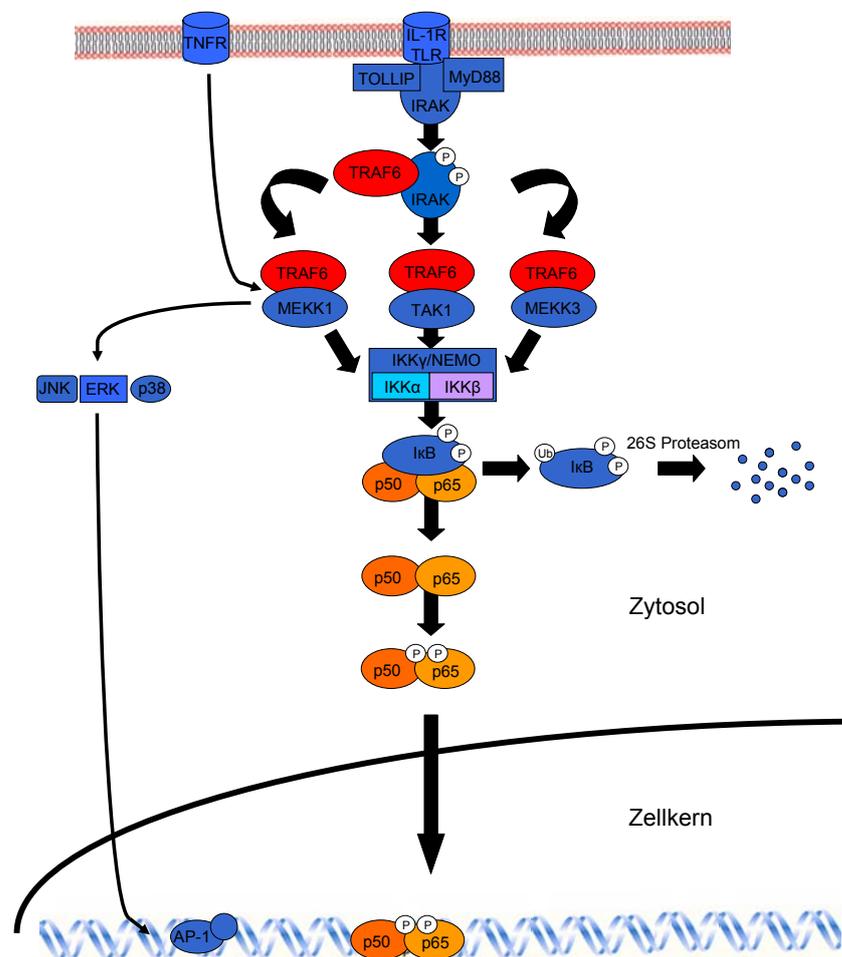
Diese Stimuli können wiederum verschiedene Signaltransduktionswege anstoßen, die letztendlich zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen: Sowohl über die TNF-Rezeptoren als auch über TLR und ILR kann eine Aktivierung vermittelt werden.

Dabei kommt es durch extrazelluläre Bindung des Liganden zunächst zu einer Konformationsänderung des entsprechenden Rezeptors, was zur Autophosphorylierung der *IL-1-receptor-associated kinase* (IRAK) führt. Dann bindet IRAK an das Adaptorprotein TRAF6. TRAF6 aktiviert die *transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase* (TAK1) und noch weitere *mitogen-activated protein kinase kinases* (MAP3Ks) wie MEKK1 und MEKK3, welche wiederum den I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK), bestehend aus IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und IKK $\gamma$ /NEMO (auch *NF- $\kappa$ B essential modulator*), aktivieren. Ebenso ist eine Aktivierung von *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs)

## Einleitung

wie JNK (*c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase*), p38 und ERK (*extracellular related kinase*) möglich.

Da die TRAF6-vermittelte Aktivierung der *mitogen-activated protein kinase kinase kinases* (MAP3Ks) auch über Liganden des TNF-Rezeptors erfolgt, nimmt TRAF6 eine zentrale Stellung bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B über die IL- und TL- aber auch TNF-Rezeptoren ein (Moynagh, 2005). IKK phosphoryliert schließlich den NF- $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B- $\alpha$  und bewirkt somit dessen Ubiquitinierung und letztendlichen Abbau durch das 26S-Proteasom. Dadurch wird NF- $\kappa$ B freigesetzt und sein Kernlokalisierungssignal (NLS) demaskiert, was die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern und die Regulierung spezifischer Zielgene zur Folge hat (Moynagh, 2005; Messer und Rupec, 2001; Inoue et al., 2007).



**Abbildung 6: Die AP-1- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TRAF6:** Der aktivierte Rezeptor bindet MyD88, welches zusammen mit TOLLIP mit der IRAK interagiert und die Aktivierung von TRAF6 bewirkt. TRAF6 bindet wiederum an TAK1, MEKK1 und MEKK3, was die Aktivierung des IKK-Komplexes bewirkt. Daraus resultiert die Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Degradation von I $\kappa$ B und somit die nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B (hier das am häufigsten vorkommende Heterodimer p50/p65). Über TRAF6 wird der JNK-p38-ERK Signaltransduktionsweg aktiviert (Modifiziert nach Moynagh, 2005; Thomas, 2005).

### **1.4.4 Physiologische und pathologische Funktionen von TRAF6 und NF- $\kappa$ B**

Viele physiologische Prozesse werden von TRAF6 reguliert. Dies konnte anhand von Studien mit TRAF6-defizienten Mäusen deutlich gemacht werden: Diese Mäuse zeigen eine ektodermale Dysplasie. Das Fehlen von Schweißdrüsen und weiteren Drüsengeweben und die Fehlbildung von Zähnen und Haaren sind das Resultat von Defekten bei der ektodermalen Differenzierung. Desweiteren bilden die *knockout*-Mäuse eine ausgeprägte Osteoporose aus. Die TRAF6-defizienten Mäuse zeigen zusätzlich eine fehlerhafte B-Zell-Differenzierung und Lymphknotenentwicklung, das IL-1- und Lipopolysaccharid-*signaling* sind gestört. Man fand heraus, dass TRAF6 für die Reifung und Entwicklung von dendritischen Zellen und somit für die Aktivierung naiver T-Zellen notwendig ist. Insgesamt zeigen die TRAF6-*knockout* Tiere solch gravierende Defekte, dass sie nicht länger als 19 Tage lebensfähig sind. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Studien mit TRAF6-defizienten Mäusen zu der Feststellung führten, dass TRAF6 eine wesentliche Rolle bei der Knochenbildung, bei der Entwicklung ektodermaler Anhänge, bei Entzündungs- und Immunreaktionen und bei der Ausbildung des Immunsystems einnimmt. Dabei spielt TRAF6 sowohl bei der angeborenen als auch bei der erworbenen Immunität eine Rolle (Wu und Arron, 2003; Naito et al., 2002; Inoue et al., 2000; Kobayashi et al., 2003).

Eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist essentiell für die Funktionen des Immunsystems. Man weiß heute, dass NF- $\kappa$ B in seiner Rolle als Transkriptionsfaktor wichtig für die Ausbildung von B-Zellen ist. Dabei konnte durch *knockout*-Studien mit Mäusen gezeigt werden, dass die Aktivierung von Proteinen der NF- $\kappa$ B-Familie eng mit dem Reifeprozess der B-Zellen verbunden ist. Desweiteren zeigen die *knockout*-Mäuse eine reduzierte Menge an B-Zellen und die Antikörperproduktion und Funktion der Antikörper ist beeinträchtigt (Kumar et al., 2004).

Auch für die Ausbildung und Proliferation von T-Zellen ist NF- $\kappa$ B wichtig. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Bildung von dendritischen Zellen durch NF- $\kappa$ B reguliert wird. Die für die Erzeugung der T-Zell Antwort erforderliche Ausschüttung einiger Zytokine wird ebenso durch NF- $\kappa$ B kontrolliert.

## Einleitung

Die erwähnten *knockout*-Studien deuten an, dass die NF- $\kappa$ B-Proteine eine wichtige Rolle bei der Bildung und Proliferation von B- und T-Zellen einnehmen. Das ist der Grund, weshalb NF- $\kappa$ B mit einer Reihe von allergischen oder entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht wird. Dies sind Erkrankungen wie Bronchialasthma, rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa aber auch atherosklerotische Erkrankungen (Kumar et al., 2004).

Man nimmt desweiteren an, dass NF- $\kappa$ B eine zentrale Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und bei der Modulation apoptotischer Prozesse einnimmt, wobei sowohl pro- als auch anti-apoptotische Effekte möglich sind (Aggarwal, 2004).

Es ist daher naheliegend, dass eine aberrante Aktivität von NF- $\kappa$ B bereits früh mit der Entstehung von Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht wurde.

### **1.4.5 TRAF6, NF- $\kappa$ B und Skelettmuskelzellendifferenzierung**

Über eine spezifische Rolle von TRAF6 bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung war vor Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Allerdings ist in der Literatur beschrieben, dass über TRAF6 der JNK-p38-ERK Signaltransduktionsweg aktiviert werden kann (Wu und Arron, 2003). Die MAPKs können dabei myogene Differenzierungsprozesse sowohl induzieren als auch inhibieren (Coolican et al., 1997; Milasincic et al., 1996; Weyman und Wolfman, 1998). Bekannt ist, dass eine Überexpression von ERK6 in der murinen Myoblasten-Zelllinie C2C12 deren Differenzierung vorantreibt (Lechner et al., 1996). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der MAPK p38 die Expression von Skelettmuskelgenen und Myoblasten-Fusion verhindert (Olwin et al., 2002), woraus man folgern kann, dass p38 für die Skelettmuskeldifferenzierung notwendig ist. Diese Annahme wird durch die Tatsache, dass p38 die MyoD-Aktivität über einen indirekten Weg stimuliert, noch untermauert (Wu et al., 2000). MyoD ist, wie bereits unter 1.1 erwähnt, sowohl für Muskeldifferenzierungs- als auch Regenerationsprozesse von Bedeutung. Inwieweit TRAF6 für diesen Signalweg notwendig ist, ist bisher jedoch unbekannt.

## Einleitung

Auch in seiner Rolle als Aktivator von NF- $\kappa$ B könnte TRAF6 Einfluss auf myogene Differenzierungsprozesse nehmen. So konnte gezeigt werden, dass das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$ , welches über TRAF6 NF- $\kappa$ B aktivieren kann, die Muskelzellendifferenzierung hemmen kann (Miller et al., 1988; Langen et al., 2001) und umgekehrt eine Inaktivierung von NF- $\kappa$ B den Differenzierungsprozess fördert. Es verwundert daher nicht, dass in proliferierenden Myoblasten im Vergleich zu differenzierenden deutlich höhere NF- $\kappa$ B-Aktivitäten gemessen werden (Guttridge et al., 1999).

Weiterführende Arbeiten zeigten dann, dass die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Muskelzellen auf posttranskriptioneller Ebene die Expression des *MyoD*-Gens hemmt. Während in Myoblasten hierfür die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch TNF- $\alpha$  ausreicht, ist in differenzierten Myotuben zusätzlich das Zytokin *Interferon gamma* (IFN- $\gamma$ ) für die Hemmung von MyoD erforderlich. Da bei chronischen Krankheiten wie Krebs oder Aids oft hohe Zytokinkonzentrationen im Serum zu finden sind, könnte ein Zusammenhang zwischen der bei diesen Krankheiten häufig auftretenden Muskeldegeneration und der Hemmung von MyoD bestehen (Guttridge et al., 2000).

Schließlich ist für einen weiteren Aktivator von NF- $\kappa$ B, nämlich das TNFR-Adaptorprotein *receptor interacting protein 2* (RIP2), bereits eine physiologische Rolle bei der Regulation der Myoblastenproliferation und -differenzierung beschrieben worden: So hat eine Überexpression des *rip2*-Gens in Myoblasten eine starke Hemmung der Differenzierung dieser Zellen zur Folge, während umgekehrt eine Hemmung der *rip2*-Expression mittels spezifischer siRNAs eine verringerte Proliferationsrate und bessere Differenzierung bewirkt (Munz et al., 2002; Ehlers et al., 2007). Diese Ergebnisse zeigen, dass RIP2 in seiner Eigenschaft als NF- $\kappa$ B-Aktivatorprotein eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Proliferations- und Differenzierungsprozessen der Skelettmuskulatur spielt. Dies ist vor dem Hintergrund für diese Arbeit interessant, dass nachgewiesen werden konnte, dass RIP2 in seiner Aufgabe als NF- $\kappa$ B-Aktivator unter anderem mit TRAF-Proteinen interagiert. Hier tritt neben TRAF1 und TRAF5 auch TRAF6 in Erscheinung (McCarthy et al., 1998).

### **1.4.6 TRAF6, NF- $\kappa$ B und Tumorigenese**

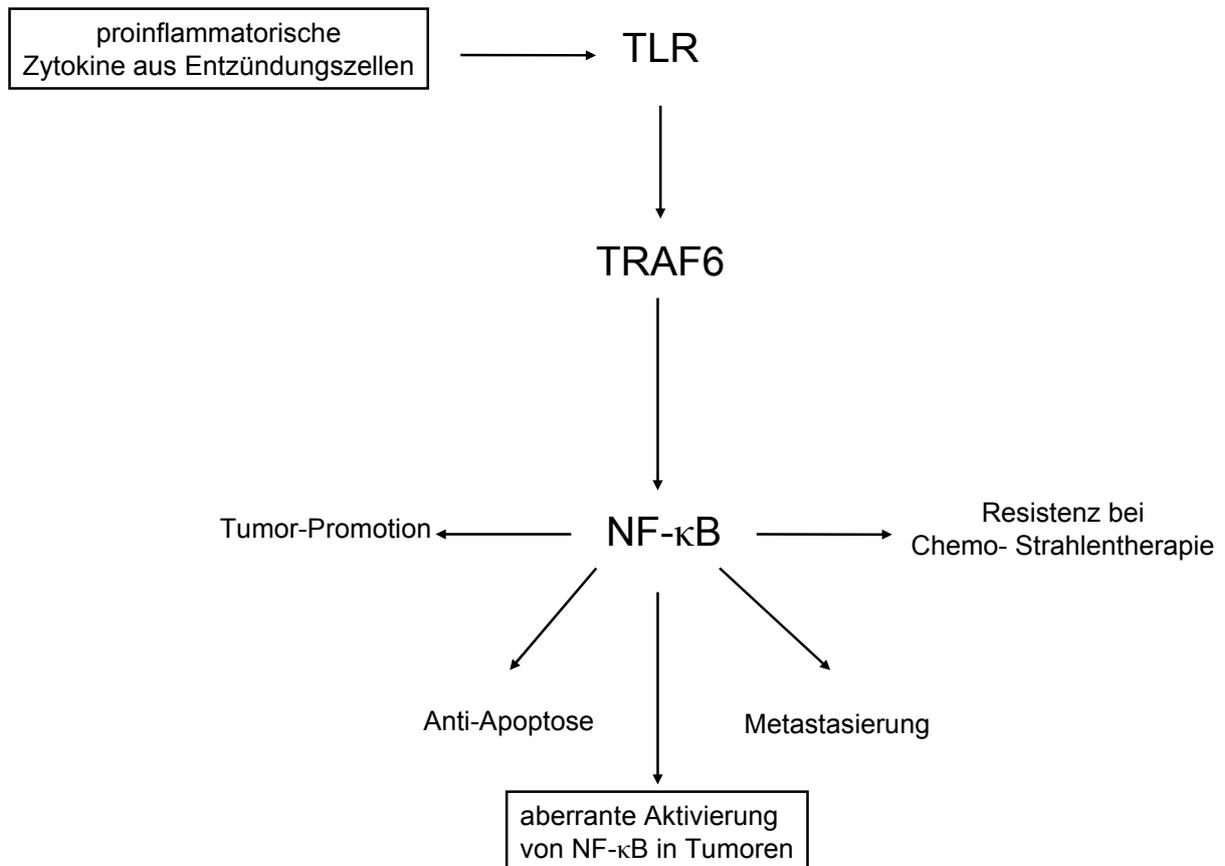
Wie bereits erwähnt, scheint eine aberrante Aktivität von NF- $\kappa$ B bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen von Bedeutung zu sein. Diese Vermutung wurde durch eine Reihe von Studien untermauert, die zeigen konnten, dass die Hemmung von NF- $\kappa$ B in Krebszellen Apoptose bewirkt (Sun und Xiao, 2003). Allerdings konnte für einige Ausnahmen auch bei verminderter Aktivität von NF- $\kappa$ B Tumorwachstum und proapoptotische Prozesse bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B beobachtet werden (Inoue et al., 2007; Kumar et al., 2004).

NF- $\kappa$ B induziert normalerweise die Expression anti-apoptotischer Zielgene (z.B. Bcl2) oder verschiedener Gene, die die Expression des für den Apoptoseinduktors p53 kodierenden Gens hemmen. Dadurch wird auch eine Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie begünstigt. Ebenso aktiviert NF- $\kappa$ B Zielgene, die den Zellzyklus vorantreiben, wie beispielsweise das *cyclin D1*-Gen (Guttridge et al., 1999). Auch Wechselwirkungen von NF- $\kappa$ B mit dem CyclinE/CDK2-Komplex können zu einer Fehlregulation des Zellzyklus führen (Greten und Karin, 2004).

Schließlich bewirkt NF- $\kappa$ B die Bildung vieler Zelladhäsionsmoleküle, wodurch Metastasierung gefördert wird (Sun und Xiao, 2003).

Die in Tumorzellen häufig beobachtete aberrante NF- $\kappa$ B-Aktivierung wird durch Signaltransduktionskaskaden vermittelt, bei denen TRAF6 eine zentrale Rolle einnimmt. So konnte gezeigt werden, dass TRAF6 im engen Zusammenhang mit Wachstum, Progression und Metastasierung von Tumorzellen steht, die durch Zytokine aus Entzündungszellen eine aberrante NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Tumor bewirken. Ebenso vermittelt TRAF6 bei diesen Zellen auch pro- und anti-apoptotische Vorgänge. Sowohl die Bildung der Zytokine als auch die NF- $\kappa$ B-Aktivierung laufen über den TLR und damit zwingend über TRAF6 ab. Somit konnte man zeigen, dass TRAF6 eine Schlüsselrolle bei der über den TLR induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung einnimmt, wodurch Tumorentwicklung und Tumorprogression erleichtert werden (Inoue et al., 2007).

## Einleitung



**Abbildung 7: Aberrante NF-κB-Aktivierung in Tumorzellen und deren Folgen für die Tumorentstehung.** Dieses Schaubild verdeutlicht die Verbindung zwischen Entzündungsreaktion und Tumorentstehung. Proinflammatorische Zytokine aus Entzündungszellen bewirken bei Tumorzellen eine, über den TLR und TRAF6 vermittelte, Aktivierung von NF-κB. Der Transkriptionsfaktor NF-κB kann somit Wachstum und Progression von Tumorzellen fördern.

Die vielseitige Wirkung von TRAF6 als Aktivator des Transkriptionsfaktors NF-κB auf die Entwicklung und Progression von Krebszellen deuten an, dass der TRAF6-NF-κB-Pathway wichtige potentielle Ansatzpunkte für die Tumorthherapie bietet. Dabei ist TRAF6 besonders zu erwähnen, da es im *pathway* eine Schlüsselrolle einnimmt und bereits bekannt ist, dass eine aberrante TRAF6-vermittelte NF-κB-Aktivierung in Osteoklasten die Bildung von Metastasen im Knochen z.B. bei Brustkrebs fördert (Inoue et al., 2007).

## 1.5 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Die erwähnten Forschungsergebnisse deuten an, dass TRAF6 und seinem Effektor NF- $\kappa$ B wichtige Aufgaben bei der Regulation von Proliferations- und Differenzierungsprozessen von Skelettmuskelzellen, möglicherweise auch in Tumoren der Skelettmuskulatur, zukommen könnten. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, sollten im Rahmen dieser Arbeit die folgenden Fragen geklärt werden:

1. **Wie sieht das Expressionsmuster des *traf6*-Gens in intaktem Muskelgewebe sowie bei degenerativ-regenerativen Muskelkrankheiten aus?**

Um diese Frage beantworten zu können, sollten die Expressionsmuster des *traf6*-Gens in Skelett- und Herzmuskelgewebe gesunder und dystrophischer *mdx*-Mäuse analysiert und miteinander verglichen werden.

2. **Ändert sich bei normalen Myoblasten und / oder bei Rhabdomyosarkomzellen das *traf6*-Genexpressionsmuster im Verlauf der Differenzierung im Vergleich zu proliferierenden Zellen?**

Nichttransformierte Myoblasten sowie Rhabdomyosarkomzellen sollten *in vitro* differenziert und die Kinetik der *traf6*-Genexpression analysiert werden.

3. **Welche Auswirkung hat eine Beeinflussung der Genexpression von *traf6* bzw. eine Hemmung der Aktivität des TRAF6-Effektors NF- $\kappa$ B auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von normalen Myoblasten und von Rhabdomyosarkomzellen?**

Mittels spezifischer siRNAs sollte die Expression des *traf6*-Gens in diesen Zellen gehemmt werden, um zu überprüfen, ob die Beeinflussung der Genexpression von *traf6* das Proliferations- und Differenzierungsverhalten normaler Myoblasten und / oder das von Rhabdomyosarkomzellen beeinflusst. Weiterhin sollte die Aktivität des TRAF6-Effektors NF- $\kappa$ B mittels spezifischer Wirkstoffe gehemmt und ebenfalls das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der so behandelten Zellen analysiert werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose MP	Roche, Mannheim
Ampicillin	Sigma, Steinheim
Blocking Reagent	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
CDP-Star	Roche, Mannheim
Chromatographiepapier (3MM)	Whatman, Maidstone, GB
Curcumin	Calbiochem, Darmstadt
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica, Nussloch
Eosin G	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Falcon Einmalpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom, Berlin und Invitrogen, Karlsruhe
wässrige Formaldehyd-Lösung (37%)	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Hybond <sup>®</sup> -N Membran	Amersham, Braunschweig
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe

## Material und Methoden

Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kryo-Röhrchen	TPP, Trasadingen, Schweiz
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Lactacystin	Calbiochem, Darmstadt
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Merck, Darmstadt
( N-Morpholino )-	Roth, Karlsruhe
PropansulfonsäureMOPS	
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
N-Lauroylsarcosine	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel, Braunschweig
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Steinheim
PCR-Puffer, 10x	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenol	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	neoLab, Heidelberg
Polaroid-Filme	Polaroid, St. Albans, UK
Röhrchen, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
SDS/Natriumlaurylsulfat	Roth, Karlsruhe
Trichlormethan (Chloroform)	Roth, Karlsruhe
Tris-Hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween20	Roth, Karlsruhe
Ultra Pure Water	Biochrom, Berlin
5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid (X-Gal)	Roche, Mannheim
Xylol	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	Biochrom, Berlin; Sarstedt, Nümbrecht;
Zellkultur-Testplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz

## Material und Methoden

### 2.1.2 Standardpuffer und Lösungen

<i>Phosphate Buffered Saline (PBS):</i>	140mM NaCl 30mM KCl 6,5mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,4mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
TAE	0,04M Tris-Acetat 0,1mM EDTA
TBS-T	0,15M NaCl 10mM Tris-HCl pH 8,0 0,05M Tween20
20xSSC	3M NaCl 0,3M Natriumcitrat

### 2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme + Puffer	Roche, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Roche, Mannheim

### 2.1.4 Antikörper

anti-Digoxigenin-AP	Roche, Mannheim
---------------------	-----------------

### 2.1.5 Plasmide

pBluescript SKII(-) (Transkriptionsvektor)	Stratagene, Heidelberg
pBluescript SKII(-)-TRAF6	B. Munz und W. Birchmeier, Berlin
pCMV-SPORT6-mRIP2	B. Munz und H. Blau, Stanford University

## Material und Methoden

pBluescript SKII(-)-skNAC	B. Munz und S. Werner, Martinsried
pBluescript LION-p21, EST CLONE	rzpd, Berlin

### **2.1.6 Kommerzielle Kits**

5-Bromo-2`-desoxy-Uridine Labeling and Detection Kit	Roche, Mannheim
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche, Mannheim
Plasmid Maxi/Midi Kits	Qiagen, Hilden
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
TRIzol-Kit	Invitrogen, Karlsruhe

### **2.1.7 Transfektionsreagenzien und siRNAs**

Silencer Pre-designed siRNA :	Ambion Inc., Huntington, UK
<i>traf6</i> spezifische siRNA ID: 65037	
<i>traf6</i> spezifische siRNA ID: 186840	
<i>traf6</i> spezifische siRNA ID: 64942	
siPORT AMINE	Ambion Inc., Huntington, UK
x-treme GENE	Roche, Mannheim

### **2.1.8 Bakterienstämme**

<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue	Stratagene, Heidelberg
----------------------------------	------------------------

### **2.1.9 Eukaryontische Zelllinien**

C2C12	Mäusemyoblasten, Helen Blau, Stanford University
C2F3	Mäusemyoblasten, Helen Blau, Stanford University
RD/18	Humane Rhabdomyosarkomzellen (Lollini et al. 1991)

## 2.1.10 Mäusestämme

C57BL/6	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
A.BY/SnJ	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
C57BL/10ScSnJ	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
C57BL/10ScSn-Dmd <sup>mdx</sup> /J	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung eukaryontischer Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Hierfür wurde *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit Penicillin/Streptomycin (je 100U/ml), L-Glutamin (2mM) sowie Serum vom fötalen Kalb /FKS) als Proliferationsmedium verwendet. Bei C2C12-Zellen und C2F3-Zellen betrug die FKS Konzentration 20%, bei RD/18-Zellen betrug sie 10%. Bei einer für die jeweilige Zelllinie kritischen Konfluenz wurden die Zellen passagiert und ausgedünnt. Das Procedere war hierbei für beide Zelllinien gleich: Das Proliferationsmedium wurde abgenommen, und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch fünfminütigen Inkubation mit Trypsin/EDTA im Brutschrank vom Boden der Kulturflasche gelöst, abzentrifugiert, in frischem Proliferationsmedium aufgenommen und weiter kultiviert.

#### Proliferationsmedium C2C12-und C2F3-Zellen:

DMEM	1x
FKS	20%
Penicillin/Streptomycin	je 100U/ml
L-Glutamin	2mM

## Material und Methoden

### Proliferationsmedium RD/18-Zellen:

DMEM	1x
FKS	10%
Penicillin/Streptomycin	je 100U/ml
L-Glutamin	2mM

### Trypsin/EDTA:

Trypsin (w/v)	0,05%
EDTA	0,02M
PBS	1x

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen nach dem Passagieren in DMSO-haltigem Einfriermedium aufgenommen und zunächst in speziellen Einfriergefäßen (Kryotubes) auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Röhrchen in Styroporboxen über Nacht bei -80°C eingefroren, um sie dann in flüssigem Stickstoff über längere Zeit bei -196°C zu lagern.

### Einfriermedium:

DMEM	1x
FKS	10%
DMSO	10%

## Material und Methoden

### **2.2.1.2 Induktion der Differenzierung**

Um bei Zellen der Linien C2C12, C2F3 und RD/18 die Differenzierung zu induzieren, wurde diesen das fötale Kälberserum entzogen und stattdessen DMEM mit 2% Pferdeserum als Zusatz beigegeben. Dieses Medium wird in dieser Arbeit als Differenzierungsmedium bezeichnet.

#### **Differenzierungsmedium C2C12-, C2F3-, und RD/18-Zellen:**

DMEM	1x
Pferdeserum	2%
Penicillin/Streptomycin	je 100U/ml
L-Glutamin	2mM

### **2.2.1.3 Transfektion von *small interfering* RNA (siRNA)**

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten siRNA-Versuchen wurden die C2C12- und RD/18-Zellen mit kommerziell erhältlicher *traf6*-spezifischer siRNA der Firma Ambion transfiziert. Für die Transfektion der C2C12-Zellen wurde ein Kit derselben Firma entsprechend den Angaben des Herstellers angewendet. Hierzu wurden die Zellen 24 Stunden vor der Transfektion aus einer 75 Quadratcentimeter großen Zellkulturflasche mit etwa 80% Konfluenz auf drei Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen so ausgesät, dass zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von etwa 70% bis 80% gegeben war. Die Transfektion erfolgte durch Zugabe von je 200µl eines Gemisches aus serumfreien Zellkulturmedium (ohne Penicillin/Streptomycin und ohne L-Glutamin), Transfektionsreagenz und *traf6*-siRNA zu den 2,3ml pro Vertiefung vorgelegten Proliferationsmediums. Dabei erwies sich die Zugabe von 10µl des Transfektionsreagenz siPort AMINE und 12,5µl einer 20µM *traf6*-siRNA-Lösung als günstig. Somit ergab sich eine siRNA-Endkonzentration von 100nM. Nach 24 Stunden wurde das Transfektionsmedium durch Proliferations-oder Differenzierungsmedium ersetzt.

## Material und Methoden

Für die Transfektion der RD/18-Zellen wurden die Zellen aus einer 80% konfluenten, 75 Quadratzentimeter großen Zellkulturflasche auf eine Platte mit sechs Vertiefungen ausgesät. Etwa 24 Stunden später konnte die Transfektion der Zellen mit *traf6*-siRNA erfolgen. Auch in diesem Fall wurden 2,3ml Proliferationsmedium vorgelegt, zu welchem 200µl des Gemisches aus serumfreien Zellkulturmedium (ohne Penicillin/Streptomycin und ohne L-Glutamin), Transfektionsreagenz und *traf6*-siRNA hinzupipettiert wurden. Pro Vertiefung stellte sich eine Menge von 8µl X-treme GENE siRNA Transfektionreagenz der Firma Roche als optimal heraus. Von einer 20µM *traf-6*-siRNA-Lösung wurden pro Vertiefung 12,5µl verwendet. Somit ergab sich eine 100nM Transfektionslösung. Alle weiteren Schritte wurden wie bei der C2C12-Zelllinie durchgeführt.

### **2.2.1.4 Behandlung der Zellen mit Lactacystin**

Die in dieser Arbeit durchgeführte Behandlung der C2C12- und RD/18-Zellen mit Lactacystin wurde für beide Zelllinien nach dem gleichem Schema durchgeführt. Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Behandlung aus einer 75 Quadratzentimeter großen Zellkulturflasche mit etwa 80% Konfluenz auf Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen so ausgesät, dass zum Zeitpunkt der Behandlung eine Konfluenz von etwa 70% bis 80% gegeben war. Dann erfolgte die Lactacystin-Behandlung. Hierfür wurden 9,41µl einer vorher angesetzten Lactacystin-Lösung (0,4µg/µl in DMSO) verwendet, die zu den pro Vertiefung vorgelegten 1ml Proliferationsmedium pipettiert wurden. Somit ergab sich eine Lactacystin-Endkonzentration von 10µM. Dieses Medium blieb eine Stunde auf den Zellen, bevor es durch normales Proliferations- bzw. Differenzierungsmedium ersetzt wurde.

## Material und Methoden

### **2.2.1.5 Behandlung der Zellen mit Curcumin**

Die in dieser Arbeit durchgeführte Behandlung der C2C12- und RD/18-Zellen mit Curcumin wurde ebenfalls für beide Zelllinien nach dem gleichem Schema durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen 24 Stunden vor der Behandlung aus einer 75 Quadratzentimeter großen Zellkulturflasche mit etwa 80% Konfluenz auf Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen so ausgesät, dass zum Zeitpunkt der Behandlung eine Konfluenz von etwa 70% bis 80% gegeben war. Dann erfolgte die Behandlung mit Curcumin. Hierfür wurde eine Curcumin-Lösung (in DMSO) so angesetzt, dass sich durch Pipettieren von 10µl zu den pro Vertiefung vorgelegten 2ml Proliferationsmedium eine Curcumin-Endkonzentration von 100µM ergab. Dieses Medium blieb eine Stunde auf den Zellen, bevor es durch normales Proliferations- bzw. Differenzierungsmedium ersetzt wurde.

### **2.2.2 Mikrobiologische Methoden**

#### **2.2.2.1 Anzucht und Aufbewahrung von *E. coli*-Stämmen**

Die *E. coli*-Flüssigkulturen wurden unter Schütteln bei 37°C über Nacht in LB-Medium inkubiert. Gegebenenfalls wurde das LB-Medium mit Ampicillin versetzt. Agarplatten mit *E. coli*-Kulturen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zur Herstellung der Agarplatten wurde LB-Flüssigmedium mit Agar-Agar (1,5% w/v) versetzt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurde nach Bedarf Ampicillin zugesetzt und die Masse in sterile Petrischalen ausgegossen. Nach dem Erkalten wurden die Platten im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Das zur Transformation verwendete Plasmid pBluescript SKII(-) enthält ein Gen, welches den Bakterien nach Aufnahme des Plasmids eine Ampicillin-Resistenz vermittelt. Auf den Agar-Platten wachsen also nur Bakterien die ein Plasmid aufgenommen haben. Um durch ein „Blau/Weiß-Screening“ die Klonierungseffizienz überprüfen zu können, wurden vor dem Ausstreichen der Bakterien 100µl X-Gal-Stammlösung und 40µl IPTG-Lösung (0,1M IPTG in H<sub>2</sub>O) pro LB-Ampicillin-Platte aufgetragen. Bakterienkolonien, die Plasmide ohne *Insert*

## Material und Methoden

enthalten, verfärben sich blau. So lassen sie sich von den Kolonien, die ein Plasmid mit *Insert* enthalten, optisch unterscheiden.

Sollten *E. coli*-Zellen länger gelagert werden, wurden 2,5ml einer frischen Übernachtskultur mit 0,8ml steriler Glycerin-Stammlösung (ca. 87%) versetzt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### LB-Medium:

Bacto Trypton (w/v)	1%
Hefeextrakt (w/v)	0,5%
NaCl (w/v)	1%

### Ampicillin-Stammlösung zur Zugabe zum LB-Medium:

Ampicillin	100 $\mu\text{g/ml}$
------------	----------------------

### X-Gal-Stammlösung:

X-Gal (5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktosid) (w/v)	2%
Dimethylformamid (DMF) (v/v)	98%

### IPTG-Stammlösung:

IPTG in H <sub>2</sub> O	0,1M
--------------------------	------

### **2.2.2.2 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Stämme**

Um bestimmte DNA-Fragmente mittels rekombinanter Plasmide zu vermehren, wurden diese in *E. coli*-Zellen des Stammes XL1 *Blue* eingebracht. Zur Herstellung dieser transformationskompetenten Bakterien wurde eine frische Übernachtskultur 1:100 mit LB-Medium verdünnt und bei 37°C unter Schütteln so lange inkubiert, bis photometrisch eine Absorption von 0,4 bis 0,5 bei 620nm zu messen war. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10min bei 4°C und 2500 Upm) und in einem Viertel des ursprünglichen Volumens an kalter, steriler 0,1M Magnesiumchloridlösung aufgenommen und vorsichtig suspendiert. Nach einer Inkubationszeit von dreißig Minuten wurde erneut zentrifugiert (10min bei 4°C und 2500 Upm) und das Sediment in einem Fünfzigstel des ursprünglichen Volumens an kalter, steriler 0,1M Calciumchloridlösung resuspendiert. Nach drei bis vier Stunden Inkubation auf Eis wurde durch Zugabe von steriler Glycerin-Stammlösung (ca. 87%) eine Bakteriensuspension mit einer Endkonzentration von 30% Glycerin hergestellt. Nach dem Aliquotieren wurden die transformationskompetenten Bakterien bei –80°C gelagert.

### **2.2.2.3 Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA**

200µl transformationskompetenter *E. coli*-Zellen wurden auf Eis langsam aufgetaut, mit einer geringen Menge Plasmid-DNA versetzt, sofort vorsichtig gemischt und dreißig Minuten im Eisbad stehen gelassen, bevor ein Wärmeschock bei 42°C für 90 Sekunden erfolgte. Der Transformationsansatz wurde danach wieder auf Eis gebracht und für weitere fünf Minuten dort belassen, bevor er nach Zugabe von 600µl LB-Medium für dreißig Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert und dann auf mit X-Gal und IPTG behandelten LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen wurde. Die Platten wurden für 16 bis 20 Stunden bei 37°C inkubiert.

## **2.2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.3.1 Reinigung von Nucleinsäuren über Phenolextraktion und Ethanol fällung**

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit einem Phenol/Chloroform-Gemisch versetzt und durch kräftiges Schütteln (Vortex) gemischt. Dann wurde bis zur Phasentrennung zentrifugiert (13.000Upm, 1min, RT). Die in der wässrigen Phase gelösten Nucleinsäuren wurden mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol (99,8%) sowie dem 0,1-fachen Volumen 3M Natriumacetatlösung bei -80°C während 60min gefällt. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert (13.000UpM, 20min, 4°C). Nach einem weiteren Waschgang mit Ethanol (70%) und kurzem Trocknen wurden die Nucleinsäuren in einer entsprechenden Menge DEPC-Wasser aufgenommen.

#### Phenol/Chloroform-Gemisch, pH 7,5:

Phenol	4,5 Volumenanteile
Chloroform	4,5 Volumenanteile
1M Tris-HCl pH 9,5	1 Volumenanteil

### **2.2.3.2 Plasmid-Präparation**

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des Qiagen-Plasmidkit der Firma Qiagen aus 100ml einer frischen *E. coli*-Übernachtskultur isoliert. Es wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

### **2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von DNA und RNA in wässriger Lösung wurde durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Hierfür wurde das Spektralphotometer *Ultrospec*<sup>®</sup> 2100 *pro* der Firma Amersham verwendet. Für die Messung wurden wieder verwendbare Quarzküvetten benutzt. Der Referenzwert wurde gegen DEPC- bzw. Bidest-Wasser gemessen. Das Verhältnis der Absorption bei 260nm zur Absorption bei 280nm wurde als Maßstab für die Reinheit der Nukleinsäuren herangezogen, wobei Werte von 1,7 (RNA) bzw. 2,0 (DNA) als optimal betrachtet wurden.

### **2.2.3.4 Analytische Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten erfolgte mittels Elektrophorese in Gelen aus Agarose und TAE-Puffer. Je nach erwarteter Größe der Fragmente wurden Gele mit einer Agarose-Konzentration von 1%-2,5% hergestellt. Desweiteren wurde den Gelen standardmäßig Ethidiumbromid (1µg/ml Gel) hinzugefügt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit einem Zehntel Volumen Ladepuffer E versetzt. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei 100V. Anschließend wurden die Gele im UV-Durchlicht (256nm) betrachtet und mit einer Polaroidkamera (Blende 16; 0,5s; 3000 ASA; Rotfilter) fotografiert.

#### Ladepuffer E:

Saccharose	40% (w/v)
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylencyanol	0,25% (w/v)
Orange G	0,25% (w/v)

### **2.2.3.5 *In vitro*-Reaktionen an DNA**

#### **2.2.3.5.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen**

Zur Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde den Empfehlungen des Herstellers gefolgt. Üblicherweise wurden 0,5U bis 1 Einheiten Restriktionsenzym pro  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt.

#### **2.2.3.5.2 Herstellung von RNA-Sonden auf der Basis von rekombinanten Plasmiden**

Die in dieser Arbeit verwendeten Digoxigenin-markierten *antisense*-RNA-Sonden wurden mit dem DIG RNA Labeling Kit der Firma Roche (Mannheim) hergestellt. Durch Spaltung mittels geeigneter Restriktionsendonukleasen wurde hierfür ein rekombinantes Plasmid mit dem gewünschten *Insert* linearisiert. Die so entstandene DNA-Matrize wurde über Phenolextraktion und Ethanolfällung gereinigt und in DEPC-Wasser aufgenommen. Für die *in vitro*-Transkription mit dem DIG RNA Labeling Kit wurden 0,5 $\mu\text{g}$  bis 2 $\mu\text{g}$  der DNA-Matrize verwendet. Diese wurde zuvor für zehn Minuten bei 65°C denaturiert. Je nach Orientierung der Sequenz innerhalb des Plasmids wurde eine entsprechende RNA-Polymerase (T7, T3, SP6) für das Umschreiben verwendet. Es wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

### **2.2.3.6 RNA-Techniken**

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

Um beim Arbeiten mit RNA jede Verunreinigung durch RNasen, die zur Degradation der RNA führen würde, möglichst zu vermeiden, wurden ausschließlich sterile Kunststoff- oder gebackene Glasgefäße (200°C, 8h) verwendet. Bei allen Arbeitsschritten wurden Einmalhandschuhe getragen. Lösungen, die für das Arbeiten mit RNA bestimmt waren, wurde Diethylpyrocarbonat (DEPC) zugegeben, um eventuell enthaltene RNasen zu inaktivieren. Die Lösungen wurde hierfür mit 0,1% (v/v) DEPC versetzt, mehrfach stark geschüttelt und mindestens 16h bei RT inkubiert. Durch anschließendes Autoklavieren wurde das vorhandene DEPC inaktiviert. Da Tris-haltige Lösungen nicht mit aktivem DEPC in Berührung kommen dürfen, wurden diese in gebackenen Gefäßen mit autoklavierten DEPC-Wasser angesetzt.

#### **2.2.3.6.2 Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Zelllysaten**

Die Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus Zelllysaten wurde mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Es wurde dem Herstellerprotokoll gefolgt.

#### **2.2.3.6.3 Isolierung gesamtzellulärer RNA aus murinen Geweben**

Die verwendeten Mäuse wurden per Genickbruch getötet. Die gewünschten Organe wurden sofort präpariert und direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Isolierung der RNA wurden die Präparate bei -80°C aufbewahrt. Die Isolierung der gesamtzellulären RNA aus den murinen Geweben wurde mit dem TRIzol<sup>®</sup>-Kit der Firma Invitrogen durchgeführt. Dazu wurden bis zu 100mg gefrorenes Gewebe in 1ml TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz bei RT mit dem Ultra Turrax<sup>®</sup> T8 der Firma IKA zügig homogenisiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll des TRIzol<sup>®</sup>-Kits der Firma Invitrogen.

### **2.2.3.7 Northern Blot-Analyse**

Die einzelnen Proben wurden so aliquotiert, dass in jeder Probe eine einheitliche Menge an in DEPC-Wasser gelöster gesamtzellulärer RNA war (zwischen 2 und 5µg). Anschließend wurden sie mit 10µl Ladepuffer versetzt und bis zu einem einheitlichen Volumen mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Dann wurden die Proben im Heizblock für 1min auf 85°C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA zu zerstören.

Im Anschluss wurden die Proben in die Geltaschen eines horizontalen 1%igen Agarosegels eingebracht. Es wurde 1xMOPS-Puffer als Laufpuffer verwendet. Bei 100V und 40mA wurde die gesamtzelluläre RNA gelelektrophoretisch für 60-90 Minuten aufgetrennt.

Anschließend wurde das Gel mit 20xSSC angefeuchtet und mittels vertikalem Kapillarblotverfahren auf eine Nylonmembran (Hybond®-N) transferiert, die zuerst in DEPC-Wasser und dann in 20xSSC geschwenkt worden war. Als Transferpuffer wurde 20xSSC verwendet. Durch eine geeignete Menge an Chromatographiepapier wurde die nötige Kapillarwirkung erzielt.

Nach dem Transfer über Nacht wurde die Membran kurz mit 2xSSC gewaschen, bevor die RNA durch Bestrahlung mit 120mJ/cm<sup>2</sup> UV-Licht auf der Membran fixiert wurde.

Durch Anfärben der RNA auf der Membran mit Methylenblau-Lösung und anschließendem Waschen mit DEPC-Wasser wurde die RNA sichtbar, was der Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung der einzelnen Spuren und der Überprüfung der Intaktheit der RNA diente. Die 28S-Bande (ca. 4800 bp) und die 18S-Bande (ca. 1900 bp) wurden markiert, um einen späteren Größenvergleich zu ermöglichen. Anschließend wurde eine Kopie der mit Methylenblau gefärbten Membran angefertigt. Die Membran wurde nun entweder direkt weiterverwendet, bei -20°C eingefroren oder trocken bei Raumtemperatur gelagert.

Der darauf folgende Schritt war die Hybridisierung. Dieser ging zunächst eine Prähybridisierung voraus, um unspezifische RNA-Bindungsstellen abzusättigen. Die Membran wurde hierzu in einem mit Hybridisierungslösung befüllten, dichten Hybridisierungsbeutel für 1h bei 68°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurde eine Digoxigenin-markierte, spezifische *antisense*-RNA-Sonde, die bereits in wenig Hybridisierungslösung im Heizblock auf 68°C erwärmt worden war, in den Beutel pipettiert. Gegebenenfalls wurde mit mehreren Sonden gleichzeitig

## Material und Methoden

hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte über einen Zeitraum von mindestens 16 Stunden bei 68°C im Wasserbad unter Schütteln.

Die Membran wurde dann nach dem folgenden Schema weiterbehandelt. Alle Schritte fanden, wenn nicht anders angegeben, unter Schütteln und bei RT statt.

5min	in	Waschlösung Nr.1
5min	in	Waschlösung Nr.1
5min	in	Waschlösung Nr.1
20min	in	Waschlösung Nr.2 bei 68°C im Wasserbad
20min	in	Waschlösung Nr.2 bei 68°C im Wasserbad
5min	in	Puffer 1

Im Anschluss an die Behandlung mit Puffer 1 wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen in 1% *blocking buffer* für eine Stunde inkubiert. Danach wurde ein Anti-Digoxigenin-Antikörper, der mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt war, in 1:15.000-facher Verdünnung zugegeben.

Im Anschluss daran wurden die folgenden Schritte durchgeführt:

5min	in	Puffer 1 + 0,3% Tween 20
15min	in	Puffer 1 + 0,3% Tween 20
15min	in	Puffer 1 + 0,3% Tween 20
5min	in	Puffer 3

## Material und Methoden

Danach wurde die Membran in Folie eingeschlagen und fünf Minuten in Puffer 3 mit einer 1:100-Verdünnung einer CDP-Star-Stocklösung inkubiert. CDP-Star bewirkt als Chemilumineszenzsubstrat für Alkalische Phosphatase eine Lumineszenz der an das nachzuweisende Transkript gebundenen RNA-Sonde. Es konnte nun ein Röntgenfilm durch die Lichtemission belichtet werden. Je nach Signalstärke betrug die Belichtungsdauer 20 Sekunden bis 20 Minuten.

### 1%iges Agarose Gel (100ml):

Agarose	1g
DEPC Wasser	84,6ml
10x MOPS	10ml
wässrige 37%ige Formaldehyd-Lösung	5,4ml

### Ladepuffer (15ml):

Formamid	7,2ml
wässrige 37%ige Formaldehyd-Lösung	2,6ml
DEPC-Wasser	1,8ml
10x MOPS	1,6ml
80% Glycerin	1ml
gesättigte, wässrige Bromphenolblau-Lösung	0,8ml

### RNA-Hybridisierungslösung (50ml):

Formamid	25ml
20x SSC	12,5ml
10% <i>Blocking</i> -Lösung	10ml
20% N-L Sarcosin	0,25ml
10% SDS	0,1ml
DEPC-Wasser	2,15ml

## Material und Methoden

### Waschlösung Nr.1:

20x SSC	10ml
10% SDS	5ml
DEPC-Wasser	445ml

### Waschlösung Nr.2:

20x SSC	2,5ml
10% SDS	5ml
DEPC-Wasser	492,5ml

### Puffer 1 (1l):

Maleinsäure	11,6g
NaCl	8,75g
mit NaOH	auf pH 7,5 einstellen
mit DEPC-Wasser	auf 1 Liter auffüllen

### Puffer 3 (50ml):

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

### **2.2.4 Immunologische Methoden**

#### **2.2.4.1 5-Bromo-2`-desoxy-Uridin Markierung**

Zur Bestimmung der Proliferationsrate kultivierter Zellen wurde ein *Kit* der Firma Roche verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass während der Zellteilung 5-Bromo-2`-desoxy-Uridin (BrdU) anstelle des regulären Nukleosids Thymidin in das zelluläre Genom eingebaut wird. Hierzu wurden C2C12-Zellen (40 Minuten) oder RD/18-Zellen (60 Minuten) für eine bestimmte Zeit der Behandlung mit dem Thymidin-Analogen BrdU ausgesetzt. BrdU befindet sich dann also im Zellkern der Zellen, die sich während des Markierungszeitraums geteilt haben. Um die BrdU-markierten Kerne im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wurden die Zellen zuerst mit einem primären Antikörper gegen BrdU und anschließend mit einem sekundären, Fluorochrom-konjugierten Antikörper behandelt. Alle Zellkerne wurden zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Diamidino-2-phenylindol) gefärbt. BrdU-markierte Zellen konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und in Relation zur Gesamtzellzahl (DAPI-Färbung) gesetzt werden.

### **2.2.5 Histologische Methoden**

#### **2.2.5.1 Anfertigen von Gefrierschnitten**

Es wurden unfixierte Gefrierschnitte muriner Muskelgewebe angefertigt, um sie für die histologische Untersuchung zu verwenden. Nach der Entnahme der Muskelgewebe wurden diese sofort in Einbettmedium für Gefrierschnitte eingebettet und auf Trockeneis gelegt. Anschließend wurden am Gefriermikrotom Schnitte der eingebetteten Gewebe mit einer Dicke von 10µm hergestellt. Hierzu wurde eine Objekttemperatur von -11 bis -13°C und einer Kammertemperatur von -28 bis -30°C gewählt. Nachdem die Schnitte auf adhäsiv beschichtete Objektträger aufgezogen worden waren, konnten sie entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert werden.

## Material und Methoden

### **2.2.5.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung**

Nach folgendem Schema wurden die Muskelgewebeschnitte gefärbt und entwässert. Vorher wurden sie für zehn Minuten bei Raumtemperatur in Paraformaldehyd-Lösung (4% in PBS) fixiert.

PBS	5min
PBS	5min
PBS	5min
Hämatoxylin-Lösung (4g/l)	60s
dest. Wasser	10s
dest. Wasser	10s
dest. Wasser	10s
Leitungswasser	30s
wässrige 0,5%ige	10s
Eosin G-Lösung	
70% Ethanol	10s
80% Ethanol	10s
80% Ethanol	10s
95% Ethanol	10s
95% Ethanol	10s
99,8% Ethanol	10s
99,8% Ethanol	10s
Xylol	10min
Xylol	10min

Mit 10%iger Glycerin-Lösung wurden die getrockneten Gewebeschnitte eingedeckt.

### **2.2.5.3 Histologische Analyse der Gewebeschnitte**

Die histologischen Präparate wurden mit Hilfe des Lichtmikroskops Axioskop 40 der Firma Carl Zeiss analysiert. Die Gesichtsfelder wurden hierfür mit einer Digitalkamera fotografiert und die Bilder anschließend als *Files* der Bildbearbeitungssoftware Photoshop® CS v8.0.1 (Adobe Systems Inc.) gespeichert.

### **2.2.5.4 Histologische Analyse der Zelllinien**

Zellen der Zelllinien C2C12 und RD/18 wurden auf Zellkulturschalen fixiert, um sie später unter dem Lichtmikroskop zu analysieren und zu fotografieren. Hierfür wurde das Medium aus den Zellschalen abgesaugt, mehrfach mit PBS gespült und anschließend mit einem auf -20°C abgekühlten Gemisch aus gleichen Teilen Methanol und Aceton für 20 Minuten inkubiert. Danach wurde das Methanol/Aceton-Gemisch entfernt und die Zellschale an der Luft getrocknet. Anschließend konnten die fixierten Zellen bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Mit 10%iger Glycerin-Lösung wurde das Präparat eingedeckt, und die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet.

## **2.2.6 Arbeit mit Versuchsmäusen**

### **2.2.6.1 *mdx*-Mäuse und Kontrolltiere**

Acht Mäuse des Zuchtstamms C57BL/10ScSn-Dmd<sup>mdx</sup>nJ ("*mdx*-Mäuse") sowie weitere acht Kontrolltieren vom Zuchtstamm C57BL/10SnJ wurden im Alter von vier Wochen geliefert. Die Tiere erhielten eine Standarddiät und Wasser *ad libitum*, und wurden in gesäuberten, desinfizierten Einzelkäfigen gehalten. Die Umgebungstemperatur wurde bei 20°C gehalten. Ebenso wurde alle zwölf Stunden ein automatischer Tag/Nacht-Wechsel durchgeführt.

Alle vier Wochen wurde ein Paar *mdx*-Mäuse und ein Paar Kontrolltiere getötet und die Organe aufbereitet.

## Material und Methoden

### **2.2.6.2 Coxsackie B3-Virus infizierte Mäuse und Kontrolltiere**

Es wurden zwei verschiedene Mäusestämme (A.BY/SnJ und C57BL/6) untersucht. Von jedem Mäusestamm wurden je zehn drei Wochen alte Tiere mit CVB3 infiziert. Weitere zehn Tiere pro Stamm erhielten statt einer Infektion eine Injektion mit Kochsalzlösung und dienten so als Kontrollmäuse. Acht Tage nach erfolgter Infektion wurden alle Mäuse getötet. Ihnen wurden die Herzen entnommen und die gesamtzelluläre RNA isoliert. Die Aufzucht und Infektion der Mäuse wurde im S2-Labor des Arbeitskreises von PD Dr. Karin Klingel (Universität Tübingen) durchgeführt. Dort wurden die Mäuse auch getötet und die Herzen isoliert, die dann in unserer Arbeitsgruppe weiter verarbeitet wurden.

### **2.2.7 Statistische Methoden**

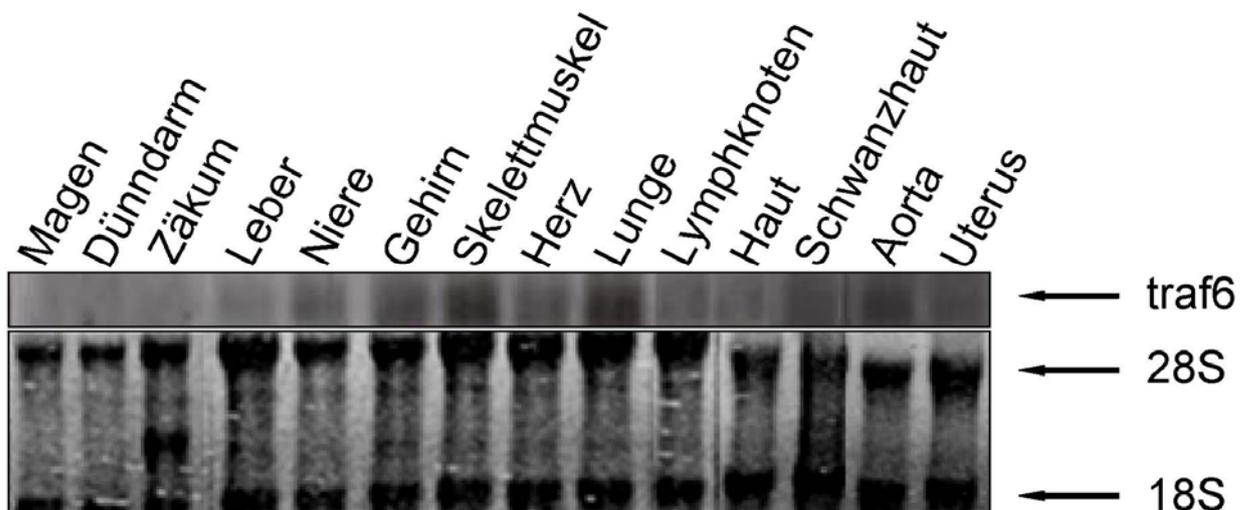
Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 12.0 für Windows. Zur Darstellung der Versuchsergebnisse wurde von den ermittelten Werten der arithmetische Mittelwert bestimmt. Dieser wurde in einem Balkendiagramm zusammen mit seiner Standardabweichung angegeben. Die Auswertung erfolgte mittels einer 1-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und Scheffé-Test. Als signifikant wurden Unterschiede angesehen, die eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  zeigten. Signifikante Unterschiede wurden in den Balkendiagrammen mit einem Stern markiert (\*).

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Expression des *traf6*-Gens in der Skelett- und Herzmuskulatur

##### 3.1.1 Expression des *traf6*-Gens in verschiedenen murinen Muskel- und Nichtmuskelgeweben

Zu Beginn dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster von *traf6* in verschiedenen Geweben untersucht. Zu diesem Zweck wurden Mäuse vom Zuchtstamm C57BL/10SnJ bezogen. Die acht Wochen alten Mäuse wurden getötet, die Organe entnommen, homogenisiert die gesamtzelluläre RNA isoliert und im *Northern Blot*-Verfahren mittels einer spezifischen *traf6*-Sonde analysiert.

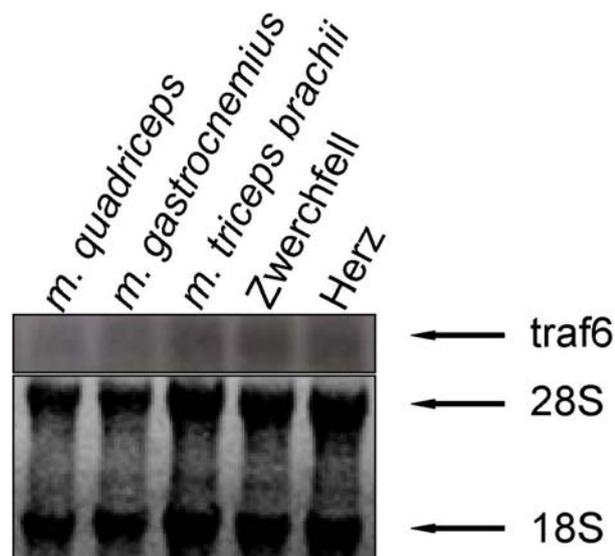


**Abbildung 8: Nachweis der *traf6*-mRNA in verschiedenen murinen Geweben.** Mäusen wurde Gewebe entnommen, die RNA isoliert, 3µg gesamtzelluläre RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit der *Northern Blot*-Methode mit Hilfe spezifischer *traf6*-Sonden analysiert. Das untere Bild zeigt die Methylenblaufärbung des entsprechenden Filters, welche zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung der einzelnen Spuren und zur Überprüfung der Intaktheit der RNA diente. Die der 28S- und der 18S-rRNA entsprechenden Banden sind mit Pfeilen markiert. Man beachte die starke *traf6*-Expression insbesondere im Skelettmuskel und in der Lunge.

Aus Abb.8 geht hervor, dass die *traf6*-mRNA in allen Geweben bis auf Magen, Darm und Zäkum nachweisbar war. Dies könnte allerdings mit der etwas geringeren RNA-Menge zusammenhängen, die – wie aus der Ladekontrolle ersichtlich ist – auf das

## Ergebnisse

Gel aufgetragen worden war. Eine besonders starke Expression konnte im Gehirn, in der Skelettmuskulatur, im Herzen, in der Schwanzhaut und in der Aorta gezeigt werden. Aufgrund der starken Expression in der Skelettmuskulatur (*musculus quadriceps*) wurde eine weitere Expressionsstudie mit verschiedenen Skelettmuskeltypen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine acht Wochen alte weibliche Maus getötet, verschiedene Muskeln (*musculus quadriceps*, *musculus gastrocnemius*, *musculus triceps brachii*, Zwerchfell und – zur Kontrolle - Herz) entnommen, homogenisiert und die RNA isoliert. Die RNA wurde ebenso gelelektrophoretisch aufgetrennt und im *Northern Blot*-Verfahren mittels spezifischer *traf6*-Sonden analysiert.



**Abbildung 9: Gewebeverteilung der *traf6*-mRNA in murinen Muskelgeweben.** Verschiedene murine Skelettmuskeln wurden präpariert, die gesamtzelluläre RNA isoliert, 3µg gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit der *Northern Blot*-Methode mit Hilfe spezifischer *traf6*-Sonden analysiert. Das untere Bild zeigt die Methylenblaufärbung des entsprechenden Filters, welche zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung der einzelnen Spuren und zur Überprüfung der Intaktheit der RNA diente. Die der 28S- und der 18S-rRNA entsprechenden Banden sind mit Pfeilen markiert. Man beachte die starke *traf6*-Expression insbesondere im *musculus triceps brachii*, im Zwerchfell und im Herzen.

Wie Abb.9 zeigt, war die Expression des *traf6*-Gens im Zwerchfell, im Herzen und im *musculus triceps brachii* besonders hoch. Auffallend ist allerdings, dass sich hier im Gegensatz zur Abb.8 eine deutlich schwächere *traf6*-Expression im *musculus quadriceps* im Vergleich zum Herzen zeigte. Der Grund hierfür könnte sein, dass bei den zwei Versuchsansätzen unterschiedliches Tiermaterial verwendet wurde (unterschiedliches Geschlecht der Mäuse).

## Ergebnisse

Insgesamt zeigen diese Daten, dass das *traf6*-Gen in der quergestreiften Muskulatur stark exprimiert ist, wobei deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Muskeltypen vorliegen.

### **3.1.2 Expression des *traf6*-Gens unter pathologischen Bedingungen**

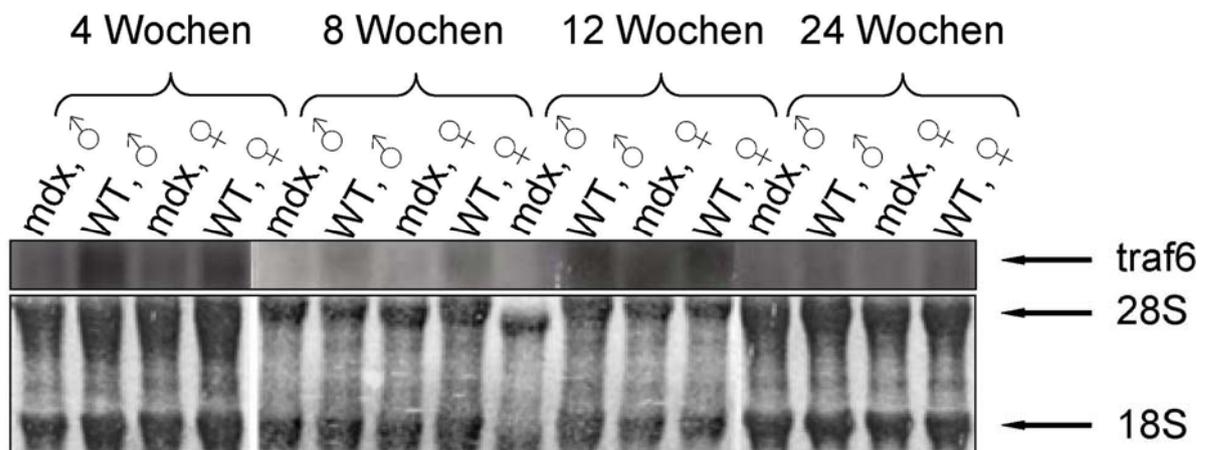
Es ist bekannt, dass der TRAF6-Effektor NF- $\kappa$ B eine wesentliche Rolle bei Entzündungsprozessen spielt. Aus diesem Grund war es von großem Interesse, die Expression des *traf6*-Gens bei entzündlichen Prozessen zu untersuchen. Hierfür eignet sich die *mdx*-Maus. Sie ist ein Tiermodell für die x-chromosomal rezessiv vererbte Duchenne-Muskeldystrophie (DMD). DMD-Patienten weisen eine Mutation im Gen, welches für das Strukturprotein Dystrophin kodiert, auf. Der resultierende Dystrophin-Mangel beeinflusst die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und die Membranstabilität. Ebenso werden diverse Signaltransduktionswege beeinträchtigt. Daraus resultiert eine chronische Degeneration von Muskelgewebe. Das degenerierte Muskelgewebe wird durch Fett- und Bindegewebe ersetzt. Dadurch kommt es früh zur Rollstuhlabhängigkeit. DMD-Patienten sterben schließlich um das 20. Lebensjahr an respiratorischer oder kardialer Insuffizienz (Finsterer und Stollberger, 2003).

Die *mdx*-Maus zeigt den gleichartigen genetischen Defekt bei deutlich abgeschwächtem Phänotyp. Die betroffenen Tiere sind von Wildtyp-Mäusen optisch nicht zu unterscheiden. Dennoch beginnt die Muskeldystrophie im Alter von ca. drei Wochen mit Nekroseherden und massiven entzündlichen Infiltraten im betroffenen Muskelgewebe. Nach dem Höhepunkt um die vierte Lebenswoche geht die Entzündung schrittweise zurück und ist dann um die zwölfte Lebenswoche nur noch schwach ausgeprägt. Es zeigen sich zu diesem Zeitpunkt bis zu 80% regenerierte Muskelfasern, die an ihren zentral gelegenen Zellkernen gut zu erkennen sind. Nach 24 Lebenswochen zeigen einige Extremitätenmuskeln erste Anzeichen von Fibrose (Partridge, 1991, Lagrotta-Candido et al., 2002). Im Zwerchfell wird hingegen ein abweichender Verlauf mit einer fortschreitenden Degeneration des Muskels beobachtet. Eine deutliche Fibrose und zunehmende Funktionseinschränkungen sind die Folge. Die Auswirkungen des Gendefektes auf die menschliche Muskulatur lassen sich daher mit dem erkrankten murinen Zwerchfell am besten vergleichen.

## Ergebnisse

### 3.1.2.1 Expression des *traf6*-Gens in der dystrophischen *mdx*-Maus

Anschließend wurde die *traf6*-Expression in verschiedenen murinen Muskeltypen von Wildtypmäusen mit der von *mdx*-Mäusen verglichen. Hierzu wurden je zwei *mdx*-Mäuse vom Zuchtstamm C57BL/10ScSn-Dmd<sup>mdx</sup>/J im Alter von vier, acht, zwölf und 24 Wochen getötet. Ihnen wurden der *musculus quadriceps*, der *musculus gastrocnemius*, das Zwerchfell und das Herz entnommen. Die zwei peripheren Beinmuskeln (*musculus quadriceps*, *musculus gastrocnemius*) sind dabei die beim DMD-Patienten zuerst befallenen Muskeln. Die vier verschiedenen Muskelgewebe wurden homogenisiert und die RNA isoliert. Genauso wurden RNA-Lysate aus den Muskelgeweben gesunder Kontrolltiere vom Zuchtstamm C57BL/10SnJ gleichen Alters gewonnen. Diese RNA-Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels spezifischer *traf6*-Sonden hybridisiert und analysiert.



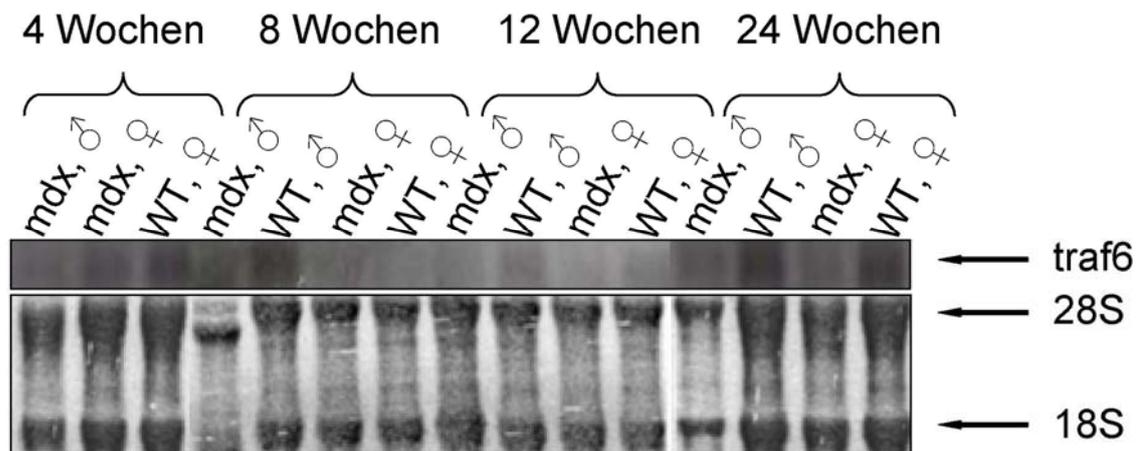
**Abbildung 10: Northern Blot-Analyse der *traf6*-Expression im *musculus quadriceps* bei *mdx*- und Wildtyp-Mäusen.** Es wurden jeweils 3µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit spezifischen *traf6*-Sonden analysiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung.

Abb.10 zeigt, dass bei den *mdx*-Mäusen in diesem peripheren Muskel, *traf6* weniger stark exprimiert war als bei den vergleichbaren Wildtypmäusen. Zum Zeitpunkt 12 Wochen und 24 Wochen war *traf6* tendenziell schwächer exprimiert. Unterschiede

## Ergebnisse

zwischen den Geschlechtern bezüglich der Expression von *traf6* waren nicht festzustellen.

Ein ähnliches Bild wurde auch im zweiten untersuchten peripheren Muskel beobachtet.

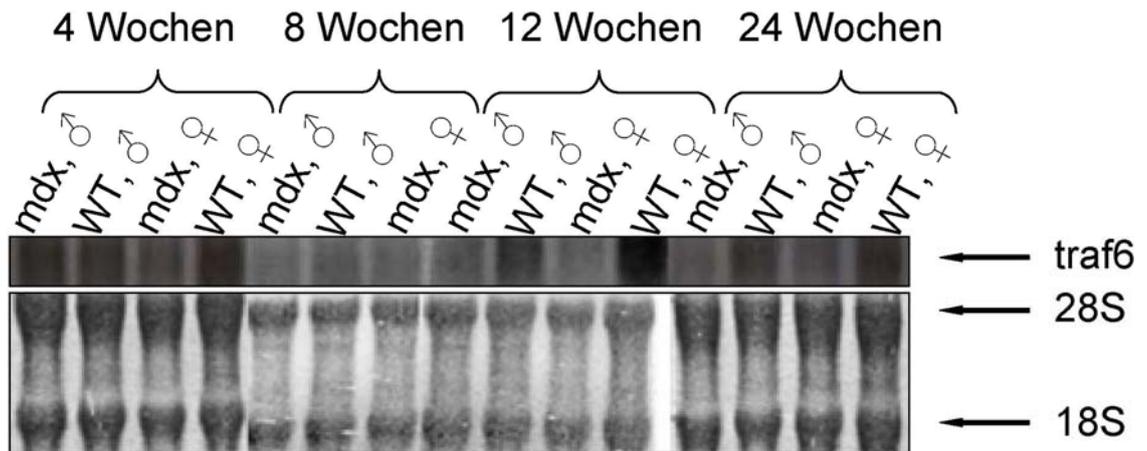


**Abbildung 11: Northern Blot-Analyse der *traf6*-Expression im *musculus gastrocnemius* bei *mdx*- und Wildtyp-Mäusen.** Es wurden jeweils 3µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit spezifischen *traf6*-Sonden analysiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylengrünfärbung.

Auch aus Abb.11 ist ersichtlich, dass bei *mdx*-Mäusen *traf6* weniger stark exprimiert war als bei den vergleichbaren Wildtypmäusen. Zum Zeitpunkt 12 Wochen wurde tendenziell weniger *traf6* exprimiert. Unterschiede zwischen den Geschlechtern bezüglich der Expression des *traf6*-Gens waren nicht festzustellen.

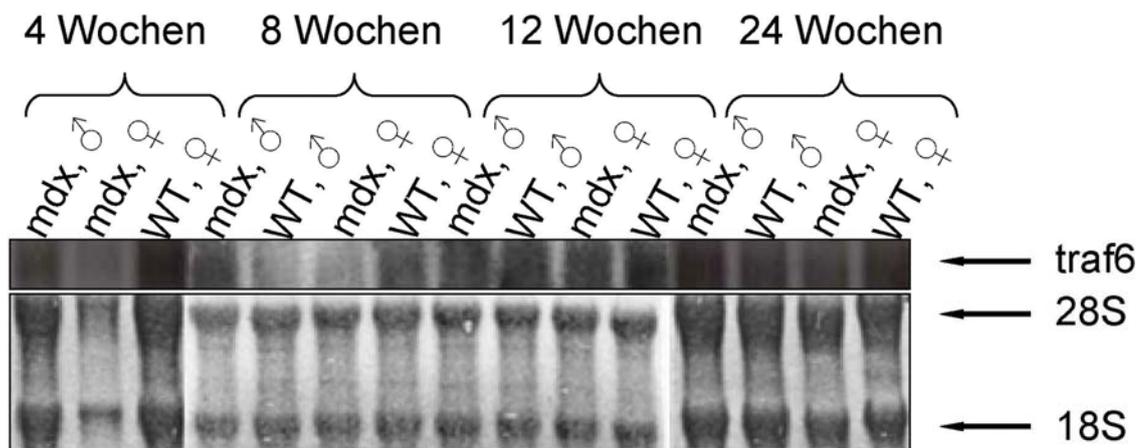
Auch im Zwerchfell ließen sich charakteristische Unterschiede zwischen *mdx*-Mäusen und Wildtypmäusen bezüglich des Expressionsmusters für *traf6* ausmachen. Dies ist besonders interessant, da, wie bereits erwähnt, dieser murine Muskel eine fortschreitende Degeneration im Verlauf der Erkrankung zeigt.

## Ergebnisse



**Abbildung 12: Northern Blot-Analyse der *traf6*-Expression im Zwerchfell bei *mdx*- und Wildtyp-Mäusen.** Es wurden jeweils 3µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit spezifischen *traf6*-Sonden analysiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung.

Wie bei den Extremitätenmuskeln war auch hier die *traf6*-Expression bei den *mdx*-Mäusen geringer als bei den vergleichbaren Kontrolltieren. Dieser Unterschied war zu den späteren Zeitpunkten (12 Wochen und 24 Wochen) maximal. Während wie bei den beiden Extremitätenmuskeln keine Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den Geschlechtern auszumachen waren, zeigte sich insgesamt eine etwas höhere Basalexpression.

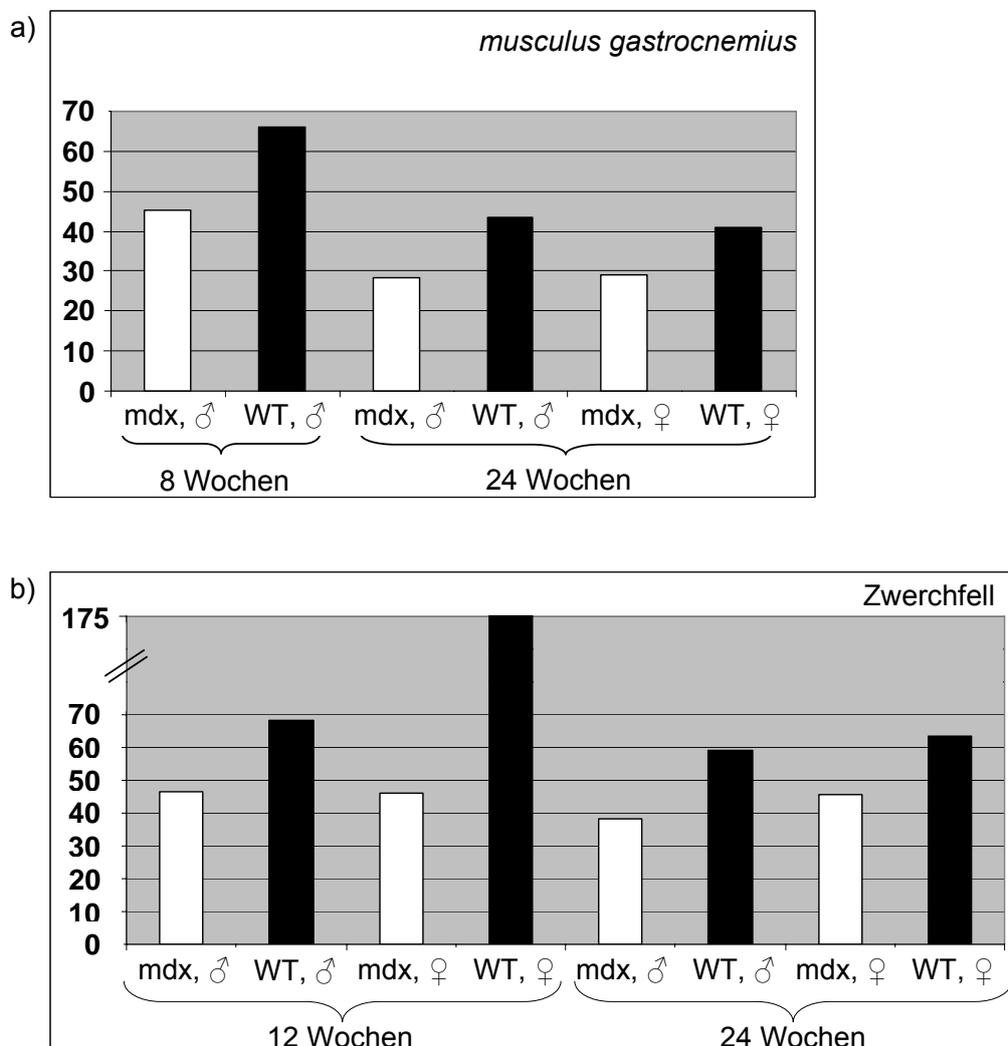


**Abbildung 13: Northern Blot-Analyse der *traf6*-Expression im Herzen bei *mdx*- und Wildtyp-Mäusen.** Es wurden jeweils 3µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit spezifischen *traf6*-Sonden analysiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung.

## Ergebnisse

Auch aus Abb.13 ist ersichtlich, dass unabhängig vom Geschlecht, tendenziell die Expression von *traf6* im Herzmuskel bei Wildtypmäusen höher war als bei *mdx*-Mäusen. Im zeitlichen Verlauf ließ sich dagegen keine Expressions-Tendenz ausmachen.

Zur Auswertung der Daten wurde die Intensität der *traf6*-spezifischen Signale in den verschiedenen Muskeltypen auf die Ladekontrolle normiert und graphisch dargestellt. Exemplarisch sind in der nachfolgenden Abb.14 die für den *musculus gastrocnemius* und das Zwerchfell der *mdx*- und Wildtypmäuse erhaltenen Daten dargestellt.



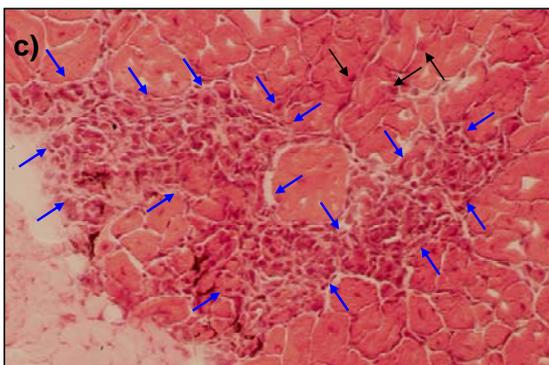
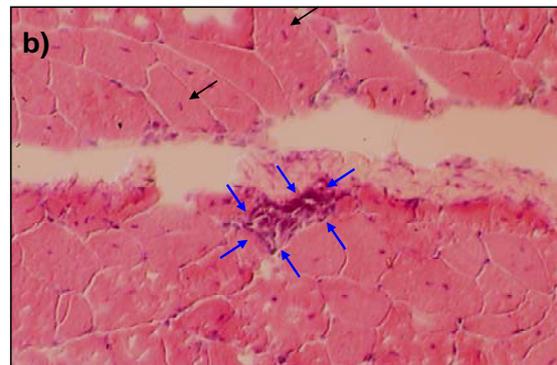
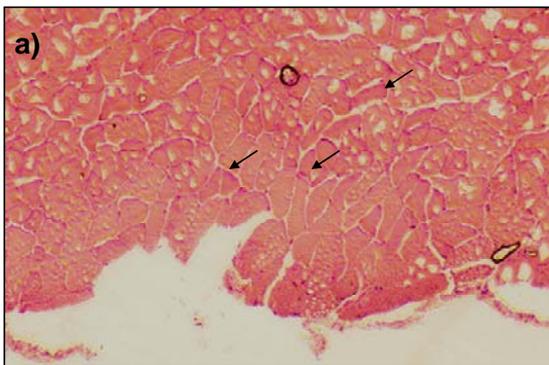
**Abbildung 14:** Auf die 28S-Bande normierte graphische Darstellung der *traf6*-Expression im a) *musculus gastrocnemius* und im b) Zwerchfell bei *mdx*- und Wildtypmäusen. Man beachte die deutlich verstärkte Expression des *traf6*-Gens in den Muskelgeweben der Wildtypmäuse. Auf der y-Achse sind relative Werte gezeigt.

## Ergebnisse

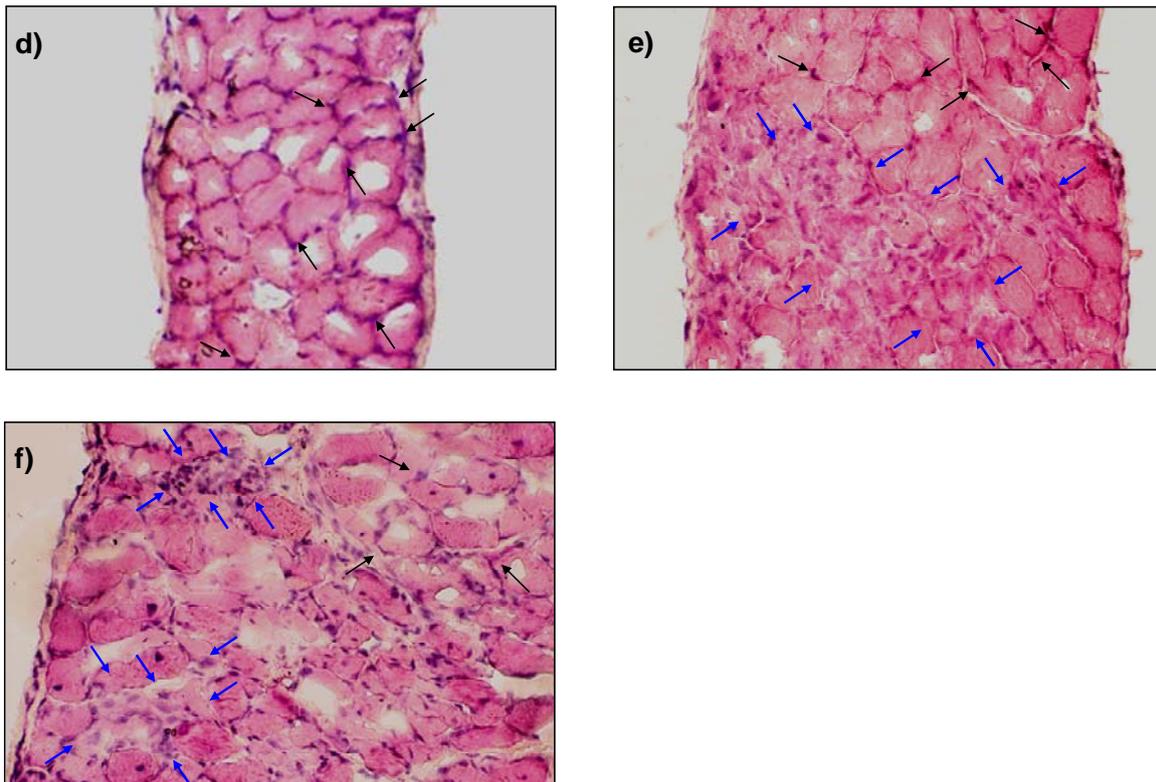
Die graphische Darstellung verdeutlicht das in der *Northern Blot*-Analyse gefundene Expressionsmuster. Insgesamt sprechen die in den Abb.10 bis 14 gezeigten Daten dafür, dass die Expression des *traf6*-Gens in der Muskulatur gesunder Mäuse höher ist als in der von *mdx*-Mäusen. Ein Defekt im *dystrophin*-Gen scheint folglich Auswirkungen auf die Regulation der *traf6*-Expression zu haben.

Anhand entsprechender Gewebeschnitte sollte nun das Ausmaß der Entzündung in den betroffenen Muskeln analysiert und mit dem in dem jeweiligen Gewebe beobachteten *traf6*-Expressionsniveau korreliert werden. Dies ist insbesondere deshalb wichtig, da sich beträchtliche interindividuelle Unterschiede bezüglich des Krankheitsverlaufs bei *mdx*-Mäusen beobachten lassen (Partridge, 1991; Lagrota-Candido et al., 2002; Stedman et al., 1991; Connolly et al., 2001; Finsterer und Stollberger, 2003; Deconinck und Dan, 2007).

Hierfür wurden von gesunden Kontrolltieren und von allen untersuchten *mdx*-Mäusen histologische Präparate vom Herzen, von der Muskulatur der Extremitäten und vom Zwerchfell angefertigt und diese unter einem Lichtmikroskop betrachtet und fotografiert. Nachfolgend werden exemplarisch Schnitte gesunder und erkrankter Extremitätenmuskeln und vom Zwerchfell gezeigt.



## Ergebnisse



**Abbildung 15: HE-Färbung: Gewebeschnitte des *musculus gastrocnemius* von Wildtyp- a) und *mdx*-Mäusen b) und c) und Gewebeschnitte des Zwerchfells von Wildtyp- d) und *mdx*-Mäusen e) und f).** Runde weiße Löcher in den Bildern sind beim Einbetten entstandene Artefakte.

a) Gesundes Skelettmuskelgewebe einer 24 Wochen alten Wildtyp-Maus. Man erkennt große mehrkernige Muskelzellen. Einige randständige Zellkerne sind mit schwarzen Pfeilen markiert

b) Skelettmuskelgewebe einer 24 Wochen alten *mdx*-Maus. Mit blauen Pfeilen ist ein kleines entzündliches Infiltrat gekennzeichnet. In diesem Ausschnitt sind nur wenige randständige Zellkerne zu erkennen, dagegen sind viele regenerierte Zellen mit zentral gelegenem Kern sichtbar (schwarze Pfeile). Der weiße Streifen in der Mitte des Ausschnittes entstand durch Aufreißen des Gewebeschnittes an einer Bindegewebsplatte.

c) Skelettmuskelgewebe einer 24 Wochen alten *mdx*-Maus. Mit blauen Pfeilen ist ein großes entzündliches Infiltrat gekennzeichnet. Um die entzündete Stelle sieht man einige regenerierte Zellen mit zentral gelegenem Zellkern. Man erkennt aber auch gesunde Zellen, die am randständigen Zellkern zu identifizieren sind (schwarze Pfeile).

d) Gewebeschnitt eines gesunden Zwerchfells einer zwölf Wochen alten Wildtyp-Maus. Die Zellen sind von gleicher Größe und die randständigen Zellkerne sind deutlich zu erkennen (schwarze Pfeile).

e) Zwerchfell einer zwölf Wochen alten *mdx*-Maus. Die blauen Pfeile zeigen ein entzündliches Infiltrat. Degenerative Zellen sind in diesem Bereich in der Überzahl. Im angrenzenden Bereich erkennt man gesunde Zellen (schwarze Pfeile).

f) Zwerchfell einer zwölf Wochen alten *mdx*-Maus. Das Bild wird geprägt durch die vielen Entzündungsherde (blaue Pfeile). Einige Zellen mit randständigem Zellkern finden sich in der Peripherie.

## Ergebnisse

Wie erwartet zeigten alle untersuchten Wildtypgewebe ein histologisch unauffälliges Erscheinungsbild. Stellvertretend sind der *musculus gastrocnemius* und das Zwerchfell von zwei Wildtyptieren gezeigt (siehe Abb.15 a) und d)). Auch alle untersuchten Herzen der Wildtypmäuse und *mdx*-Mäuse blieben ohne pathologischen Befund (Bilder nicht gezeigt). In den untersuchten Extremitätenmuskeln aller *mdx*-Mäuse ließen sich allerdings deutliche Entzündungsherde ausmachen. Ebenso konnte man regenerierte Zellen am zentralständigen Zellkern erkennen. Auch bei den Gewebeschnitten der Zwerchfelle erkrankter Mäuse waren große entzündliche Infiltrate auszumachen. Diese waren zumeist von regenerierten oder gesunden Zellen umgrenzt. Da die interindividuellen Unterschiede bei der untersuchten Kohorte von Tieren jeweils gleichen Alters gering ausfiel und die histologischen Befunde sehr eng mit dem für die jeweilige Altersgruppe in der Literatur beschriebenen Erscheinungsbild übereinstimmten, war es folglich nicht notwendig, diese bei der Auswertung der oben gezeigten *traf6*-Expressionsmuster zu berücksichtigen. Allerdings müssen die Ergebnisse noch mit einer unabhängigen Kohorte von Tieren reproduziert werden.

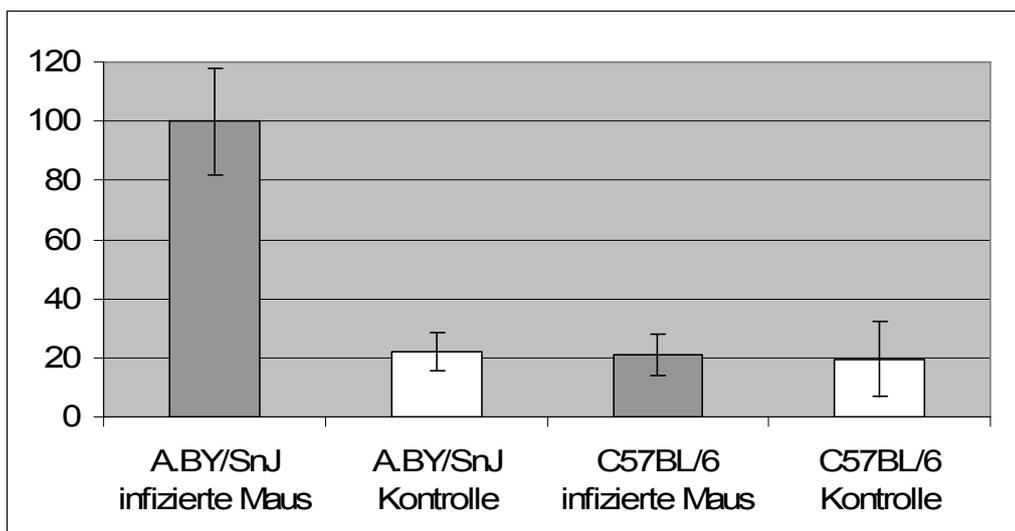
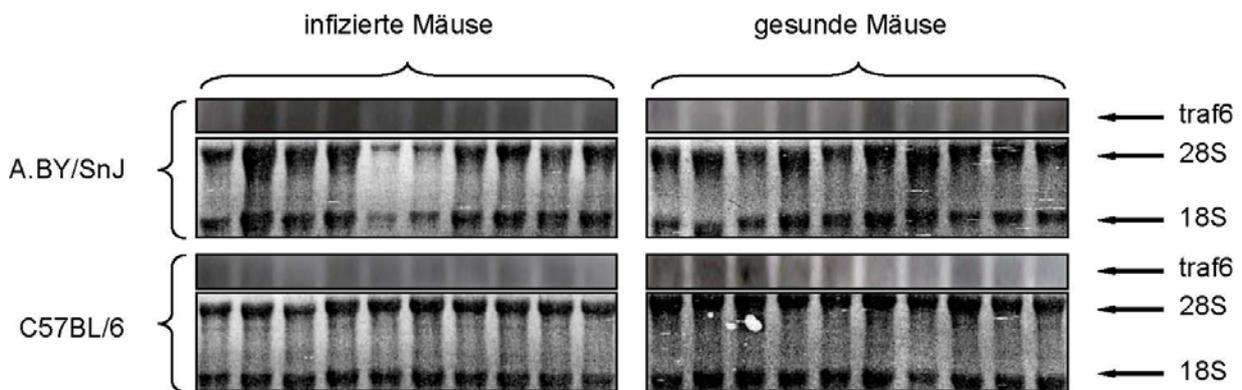
### **3.1.2.2 Expression des *traf6*-Gens bei der CVB3-induzierten inflammatorischen Kardiomyopathie**

Parallel zur Skelettmuskulatur sollte auch die Expression des *traf6*-Gens in der Herzmuskulatur unter pathologischen Bedingungen analysiert werden. Als Modellsystem wurde die Coxsackievirus B3-induzierte inflammatorische Kardiomyopathie gewählt.

Das Coxsackievirus gehört zu den Enteroviren aus der Familie der Picornaviren. Man unterscheidet sechs Serotypen der Coxsackieviren der Gruppe B (CVB1-CVB6). Die größte klinische Bedeutung hat das Coxsackievirus B3 (CVB3). Es ist der häufigste Erreger der viralen Myokarditis (Kandolf und Hofschneider, 1989). Vor allem bei Säuglingen führt die akute Virusmyokarditis bei über der Hälfte aller Erkrankten zum Tode (Woodruff, 1980). Bei 4% der Infizierten löst das Coxsackievirus B3 eine inflammatorische Kardiomyopathie aus und 25% aller inflammatorischen Kardiomyopathien gehen in westlichen Ländern auf eine Infektion mit CVB3 zurück (Kim et al., 2001).

## Ergebnisse

Im hier dargestellten Versuch wurden zwei verschiedene Mäusestämme untersucht. Während der eine Mäusestamm (A.BY/SnJ) wegen einer genetischen Prädisposition auf eine Infektion mit CVB3 fast immer mit einer Myokarditis reagiert, entwickelt der zweite Mäusestamm (C57BL/6) nur bei 1% der Infektionen eine Myokarditis. Von jedem Mäusestamm wurden zehn drei Wochen alte Tiere mit CVB3 infiziert. Weitere zehn Tiere pro Stamm erhielten statt einer Infektion eine Injektion mit Kochsalzlösung und dienten so als Kontrollmäuse. Acht Tage nach erfolgter Infektion wurden alle Mäuse getötet. Ihnen wurden die Herzen entnommen und die gesamtzelluläre RNA isoliert. Die Infektion der Mäuse wurde im S2-Labor von PD Dr. Karin Klingel (Universität Tübingen) durchgeführt. Dort wurden die Mäuse auch getötet und die Herzen aufbereitet. Die isolierte RNA wurde anschließend in unserem Labor weiter aufgearbeitet. Diese wurde dann mittels *Northern Blot*-Verfahren auf ihre *traf6*-Expression hin untersucht.



**Abbildung 16: Northern Blot-Analyse der *traf6*-Expression im Herzen bei CVB3-infizierten und gesunden Mäusen der Stämme A.BY/SnJ und C57BL/6.** Es wurden jeweils 3µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit spezifischen *traf6*-Sonden analysiert. Die Intensität der Expression wurde genormt, gemittelt und graphisch dargestellt. Auf der y-Achse sind relative Werte angegeben.

## Ergebnisse

Aus Abb.16 ist eine deutliche Erhöhung der *traf6*-Expression bei den CVB3-infizierten Mäusen des Stammes A.BY/SnJ im Vergleich zu den Kontrollmäusen ersichtlich. Bei den Mäusen des Stammes C57BL/6 zeigten sich dagegen keine Unterschiede zwischen infizierten Mäusen und Kontrollmäusen. Die *traf6*-Expression entsprach hier der bei nichtinfizierten A.BY/SnJ-Mäusen beobachteten. Trotz dieses eindeutigen Ergebnisses ist anzumerken, dass sich die Intensität der *traf6*-Expression zwischen den einzelnen Individuen derselben Versuchsgruppe teilweise deutlich unterschied. Dies war bei allen vier Versuchsgruppen zu beobachten und beruht vermutlich auf dem auch innerhalb eines Stammes recht heterogenen Krankheitsverlauf, der mit einem unterschiedlichen Schweregrad der Entzündungsreaktion einhergeht. Wenngleich aufgrund der Analyse von 10 Tieren pro Versuchsgruppe eine recht eindeutige Aussage möglich war, ist es in jedem Falle nötig, die Ergebnisse mit einer unabhängigen Kohorte von Tieren zu reproduzieren. Außerdem sollten histologische Studien zeigen, ob das *traf6*-Expressionsmuster bei individuellen Tieren mit der Histologie der entsprechenden Herzmuskelpräparate, aus der sich der Krankheitsverlauf beim jeweiligen Tier abschätzen lässt, korreliert.

### **3.2 Expression des *traf6*-Gens bei der Muskelzellendifferenzierung *in vitro***

Wie bereits in 3.1.2 beschrieben, beobachtet man einen abgemilderten klinischen Verlauf der Muskeldystrophie bei der *mdx*-Maus im Vergleich zu der entsprechenden menschlichen Erkrankung. Dies beruht auf der Fähigkeit, entzündliches Muskelgewebe sehr effektiv zu regenerieren. An dieser Regeneration sind spezifische Myoblasten, die sogenannten Satellitenzellen, beteiligt, die am Ort der Entzündung zu Myozyten und Myotuben differenzieren können. Somit ist die *mdx*-Maus ein geeignetes *in vivo*-Untersuchungsmodell zur Skelettmuskelzellendifferenzierung (Partridge, 1991; Lagrota-Candido et al., 2002; Stedman et al., 1991; Connolly et al., 2001; Finsterer und Stollberger, 2003; Deconinck und Dan, 2007) und es stellte sich die Frage, ob eine differentielle Expression des *traf6*-Gens generell bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung beobachtet werden kann.

## Ergebnisse

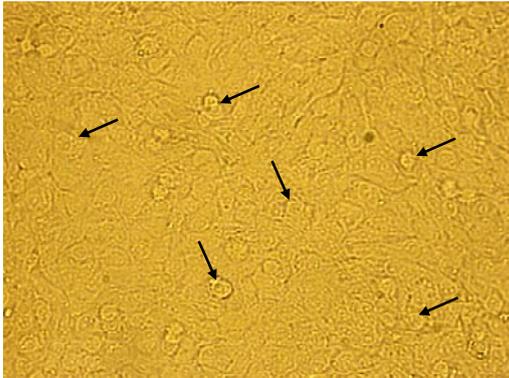
Um diese Hypothese zu prüfen, wurde mit der murinen Myoblasten-Zelllinie C2C12 ein gut charakterisiertes *in vitro*-Untersuchungssystem gewählt. Bei dieser Zelllinie ist der Ablauf des Differenzierungsprozesses mechanistisch dem sehr ähnlich, der *in vivo* bei der Embryonalentwicklung beobachtet wird.

### **3.2.1 Expression des *traf6*-Gens bei der Differenzierung der murinen Myoblasten-Zelllinie C2C12**

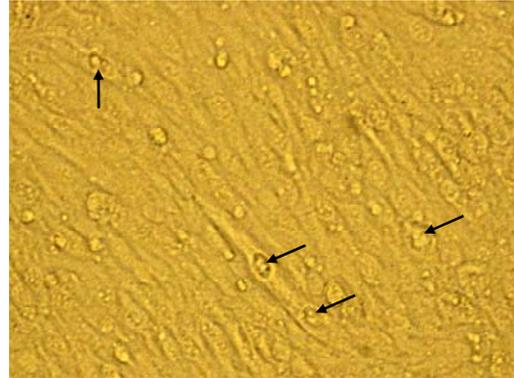
Um die Expression des *traf6*-Gens in proliferierenden und differenzierenden C2C12-Zellen zu untersuchen, wurden diese zunächst in Proliferationsmedium und bei einer Konfluenz von ca. 80% für weitere vier Tage in Differenzierungsmedium kultiviert. Die Veränderung des histologischen Erscheinungsbildes der zunächst runden bis dreieckigen Myoblasten zu spindelförmigen Myozyten und später parallel angeordneten, mehrkernigen Myotuben konnte im Lichtmikroskop beobachtet werden.

## Ergebnisse

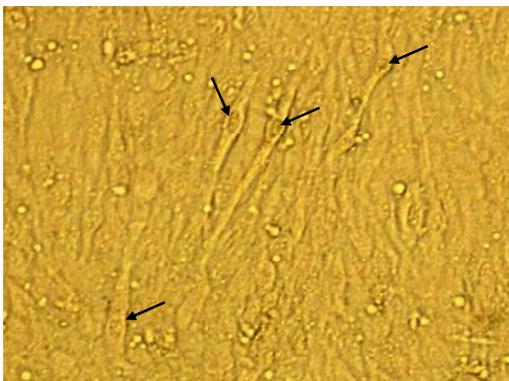
a) C2C12-Zellen 0h



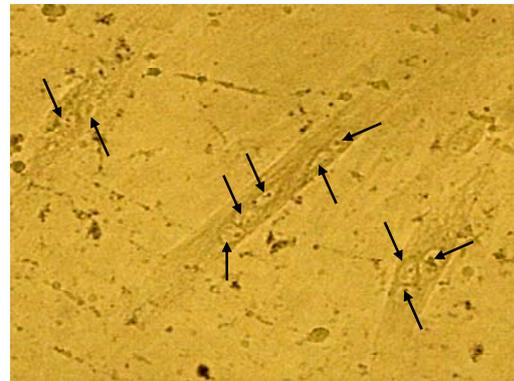
b) C2C12-Zellen 1d DM



c) C2C12-Zellen 2d DM



d) C2C12-Zellen 4d DM



**Abbildung 17: Lichtmikroskopische Aufnahmen von proliferierenden a) und differenzierenden b), c) und d) C2C12-Zellen.** Mit den Pfeilen sind differenzierte Zellen gekennzeichnet. In Bild b) und c) sieht man spindelförmige Myozyten und in Bild d) erkennt man vielkernige Myotuben. Bis zu einer Konfluenz von 80% wuchsen die Zellen in Proliferationsmedium (0h), dann wurden sie für vier Tage in Differenzierungsmedium kultiviert.

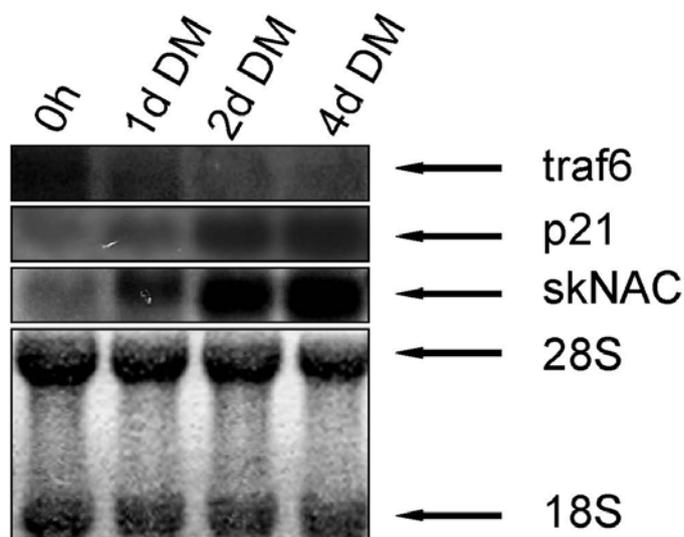
Abb.17 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen, die eine zunehmende Differenzierung der Zellen belegen: Während zum Zeitpunkt 0h nur kugelige Myoblasten sichtbar waren, zeigten sich bereits nach einem Tag die ersten spindelförmigen Myozyten. Nach zwei Tagen nahm ihre Anzahl stark zu. Nach vier Tagen wurden schon zahlreiche Myotuben beobachtet, die sich durch viele randständige Kerne auszeichnen.

Sowohl aus den proliferierenden Zellen als auch aus den Zellen, die einen Tag, zwei Tage und vier Tage in Differenzierungsmedium kultiviert worden waren, wurde gesamtzelluläre RNA isoliert. Diese wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, mittels Kapillarblotverfahren auf eine Membran transferiert und mit verschiedenen spezifischen *antisense* RNA-Sonden hybridisiert. Neben der Expression des *traf6*-Gens wurde hierbei auch die Expression des *p21*- und des

## Ergebnisse

*skeletal muscle nascent polypeptide-associated complex*-Gens (*skNAC*) analysiert. Von diesen beiden Genen ist bekannt, dass ihre Expression im Laufe der Differenzierung zunimmt (Munz et al., 1999; Moran et al., 2002; Halevy et al., 1995; Zhang et al., 1999). Die Expression von *p21* bewirkt dabei einen Austritt aus dem Zellzyklus durch Inhibition von CDK-Komplexen (Xiong et al., 1993). *p21* kann somit als Marker für Proliferation und Differenzierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien dienen.

NAC ist ein Komplex aus zwei Untereinheiten ( $\alpha$ NAC und  $\beta$ NAC), der an neusynthetisierte Polypeptidketten am Ribosom bindet und dort ein *mistargeting* der Proteine ins ER verhindert (Lauring et al., 1995). Im Herzen und der Skelettmuskulatur findet man eine muskelspezifische Variante von  $\alpha$ NAC, die als *skNAC* bezeichnet wird (Yotov und St.-Arnaud, 1996). *skNAC* wird etwa 24 Stunden nach der Induktion der Muskeldifferenzierung exprimiert und kann somit, ebenso wie *p21*, zusätzlich zum lichtmikroskopischen Befund als Marker für die Effizienz des Differenzierungsvorgangs in den verwendeten Zellkultursystemen dienen.



**Abbildung 18: Northern Blot-Analyse der Expression von *traf6* in differenzierenden C2C12-Zellen.** Es wurden jeweils 2 $\mu$ g gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *traf6*, *p21* und *skNAC* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung (unterstes Bild). Bis zu einer Konfluenz von 80% wuchsen die Zellen in Proliferationsmedium (0h), dann wurden sie für vier Tage in Differenzierungsmedium kultiviert.

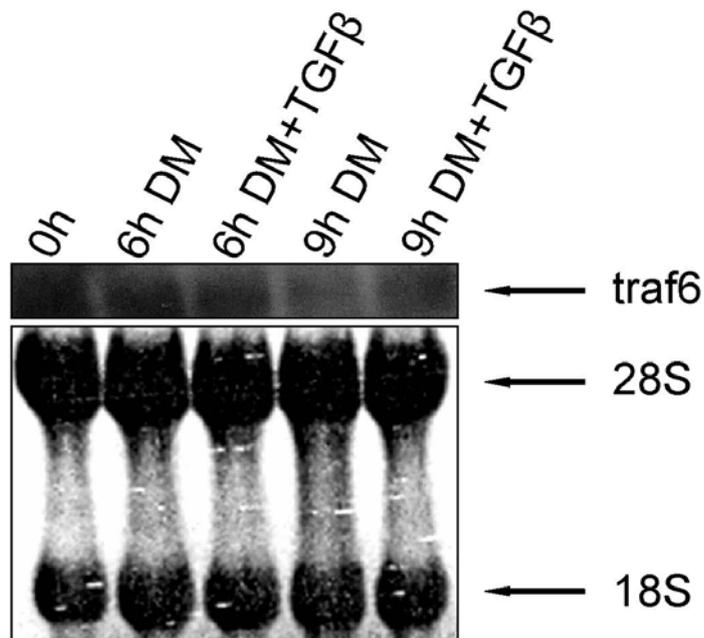
## Ergebnisse

Die proliferierenden C2C12-Zellen (0h) zeigten eine moderate Basalexpression des *traf6*-Gens. Bereits nach einem Tag in Differenzierungsmedium war eine beginnende Repression zu erkennen, die nach zwei Tagen noch stärker war. Im weiteren Verlauf der Differenzierung blieb die *traf6*-Expression auf diesem niedrigen Niveau. Die Expression der verwendeten Differenzierungsmarker-Gene, *p21* und *skNAC*, war dagegen bereits nach einem Tag stark induziert. Die *traf6*-Expression verhielt sich also invers zu der der beiden Differenzierungsmarker.

Somit konnte gezeigt werden, dass während der Differenzierung die *traf6*-Expression rückläufig ist. Im folgenden Versuch sollte nun untersucht werden, ob man einen Einfluss auf die *traf6*-Expression beobachten kann, wenn differenzierende Zellen zusätzlich mit dem differenzierungsinhibierenden TGF- $\beta$  behandelt werden. Dies sollte zeigen, ob die Expression dieses Gens tatsächlich spezifisch mit dem Differenzierungsvorgang assoziiert ist und nicht auf einen unspezifischen Effekt von Komponenten des Differenzierungsmediums, die im Proliferationsmedium nicht enthalten sind, zurückzuführen ist.

Hierfür wurden wiederum C2C12-Zellen zur Differenzierung angeregt. Im Unterschied zum vorherigen Versuch wurden die differenzierenden Zellen zusätzlich mit TGF- $\beta$  behandelt. Vor der Induktion und jeweils 6 Stunden und 9 Stunden nach Induktion der Differenzierung wurde die Expression des *traf6*-Gens analysiert.

## Ergebnisse

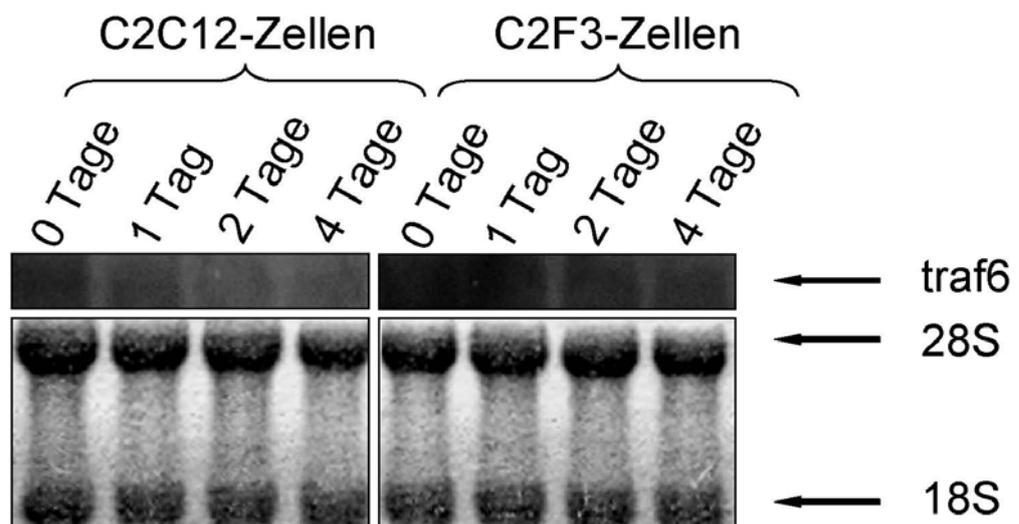


**Abbildung 19: Northern Blot-Analyse der Expression von *traf6* in differenzierenden C2C12-Zellen.** Es wurden jeweils 3µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *traf6* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung.

Dabei zeigte sich eine Repression der *traf6*-Expression bereits 6 Stunden nach Induktion der Differenzierung (6h DM), die nach 9 Stunden noch deutlicher zu erkennen war. Die C2C12-Zellen, die zusätzlich mit TGF-β behandelt worden waren, zeigten dagegen auch weiterhin eine fast ebenso starke Expression von *traf6* wie die Zellen in Proliferationsmedium. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Repression der *traf6*-Expression in Differenzierungsmedium durch das differenzierungsinhibierende TGF-β aufgehoben werden kann und damit nicht auf einem unspezifischen Effekt des Differenzierungsmediums beruht.

### 3.2.2 Expression des *traf6*-Gens bei der Differenzierung der murinen Myoblasten-Zelllinie C2F3

Parallel zu den oben beschriebenen Studien an C2C12-Zellen wurde auch die Expression des *traf6*-Gens in C2F3-Zellen analysiert. Diese murine Zelllinie ist eine klonale Variante der Linie C2C12. Es ist bekannt, dass diese Zellen weniger effizient und langsamer differenzieren (H.M. Blau, Stanford University, persönliche Mitteilung). Aus proliferierenden Zellen sowie einen, zwei und vier Tage nach Induktion der Differenzierung wurde gesamtzelluläre RNA gewonnen. Mittels *Northern Blot*-Verfahren wurden die entsprechenden Lysate auf eine Expression des *traf6*-Gens hin analysiert.



**Abbildung 20: Northern Blot-Analyse der Expression von *traf6* in differenzierenden C2F3-Zellen.** Es wurden jeweils 2µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *traf6* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung. Zum direkten Vergleich ist der in Abb.18 gezeigte *traf6*-Blot auf der linken Seite der Abb. noch einmal dargestellt.

Wie Abb.20 zeigt, war die *traf6*-Basalexpression in proliferierenden C2F3-Zellen mit der in C2C12-Zellen beobachteten vergleichbar. Nach einem Tag in Differenzierungsmedium war aber im Gegensatz zu den C2C12-Zellen noch keine Abnahme der Expression zu verzeichnen. Erst nach zwei Tagen (2d DM) war eine beginnende Repression zu erkennen, die auch nach weiteren zwei Tagen in Differenzierungsmedium nicht stärker wurde. Die Tatsache, dass die *traf6*-Expression

## Ergebnisse

bei der C2F3-Zelllinie im Verlauf der Differenzierung deutlich weniger reprimiert wurde als bei C2C12-Zellen, lässt vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Grad der *traf6*-Repression nach Induktion der Differenzierung und der Differenzierungskompetenz der entsprechenden Zelllinie geben könnte. Vor diesem Hintergrund wurde, wie nachfolgend beschrieben, die *traf6*-Expression in Rhabdomyosarkomzellen, also Myoblasten von geringem Differenzierungspotential untersucht (Merlino und Helman, 1999).

### **3.2.3 Expression des *traf6*-Gens bei der Differenzierung humaner Rhabdomyosarkomzellen**

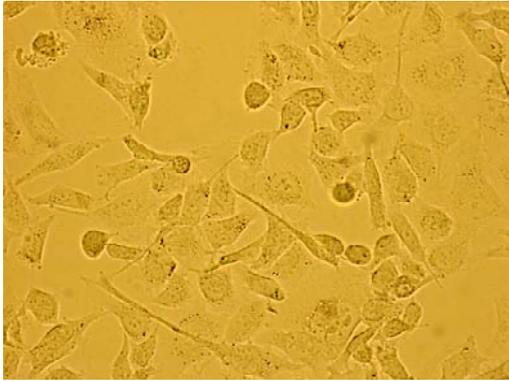
Rhabdomyosarkome sind vornehmlich im Kindesalter auftretende Tumorerkrankungen. Sie gehören bei Kindern und Jugendlichen zu den häufigsten Weichteiltumoren. Rhabdomyosarkome gehen auf partiell differenziertes embryonales Muskelgewebe zurück. Diese Muskelzellen zeichnen sich durch einen geringen Differenzierungsgrad bzw. ein Verharren auf einer frühen Stufe des Differenzierungsprogramms aus. Ebenso beobachtet man eine hohe Proliferationsrate, da keine Induktion von Zellzyklusinhibitoren erfolgt. Ein Ausscheiden aus dem Zellzyklus, wie es normalerweise bei der myogenen Differenzierung erfolgt, bleibt somit aus. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Rhabdomyosarkomzelllinie RD/18 auf ihre *traf6*-Expression während der Muskelzelldifferenzierung hin untersucht. Diese Zelllinie entstammt einem humanen Rhabdomyosarkom vom embryonalen Typus. Sie besitzt noch die Fähigkeit, initiale Schritte des myogenen Differenzierungsprogrammes zu durchlaufen. Allerdings verläuft die Differenzierung unvollständig (Lollini et al., 1991).

Wie bereits für C2C12- und C2F3-Zellen beschrieben, wurden RD/18-Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 80% in Proliferationsmedium kultiviert, um sie dann zur Differenzierung anzuregen. Proliferierende Zellen sowie Zellen zum Zeitpunkt ein Tag, zwei Tage und vier Tage nach Induktion der Differenzierung wurden geerntet. Gesamtzelluläre RNA wurde gewonnen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels *Northern Blot*-Technik analysiert. Mittels spezifischer *traf6*-Sonden wurde dann die *traf6*-Expression während der Differenzierung nachgewiesen. Desweiteren wurde wie

## Ergebnisse

oben beschrieben der Differenzierungsprozess lichtmikroskopisch verfolgt sowie die Expression der Markergene *skNAC* und *p21* analysiert.

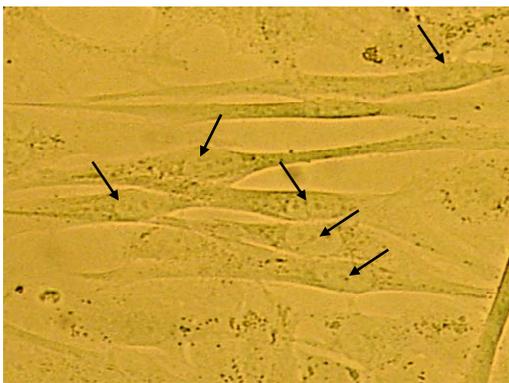
a) RD/18-Zellen 0h



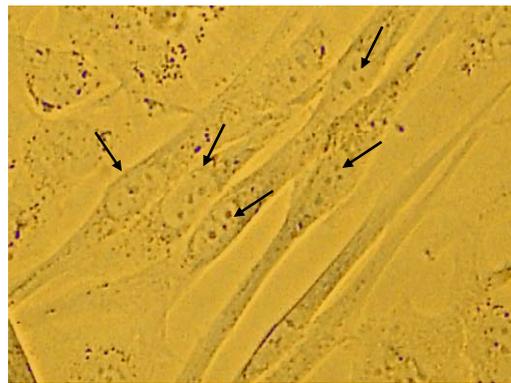
b) RD/18-Zellen 1d DM



c) RD/18-Zellen 2d DM



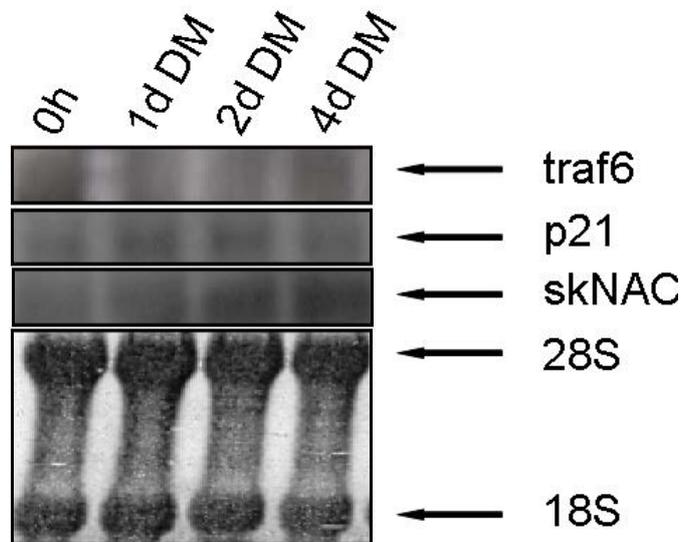
d) RD/18-Zellen 4d DM



**Abbildung 21: Lichtmikroskopische Aufnahmen von proliferierenden a) und differenzierenden b),c) und d) RD/18-Zellen.** Mit den Pfeilen wurden differenzierende bzw. differenzierte Zellen gekennzeichnet.

Abb.21 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen als Nachweis einer zunehmenden Differenzierung der RD/18-Zellen: Während zum Zeitpunkt 0h nur kugelige Myoblasten sichtbar waren, zeigten sich bereits nach einem Tag die ersten spindelförmigen Myozyten. Nach zwei Tagen nahm deren Anzahl stark zu. Nach vier Tagen Kultivierung in Differenzierungsmedium waren kaum noch kugelige Zellen zu erkennen, dagegen hatte die Anzahl der spindelförmigen Myozyten weiter zugenommen.

## Ergebnisse



**Abbildung 22: Northern Blot-Analyse der Expression von *traf6* in differenzierenden RD/18-Zellen.** Es wurden jeweils 3µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *traf6*, *p21* bzw. *skNAC* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung. Bis zu einer Konfluenz von 80% wuchsen die Zellen in Proliferationsmedium (0h), dann wurden sie für vier Tage in Differenzierungsmedium weiterkultiviert.

Es zeigte sich eine *traf6*-Expressionskinetik, die der bei C2F3-Zellen beobachteten ähnelte (vergleiche Abb.20). Zwar war bei den RD/18-Zellen eine Repression der *traf6*-Expression schon am ersten Tag nach Induktion der Differenzierung zu beobachten, sie fiel aber deutlich geringer aus als bei der Zelllinie C2C12. In Bezug auf die *skNAC*-mRNA war bei den RD/18-Zellen erst am zweiten Tag nach Induktion der Differenzierung eine verstärkte Expression zu beobachten, welche im Vergleich zu den C2C12-Zellen deutlich geringer ausfiel. Die schwache Induktion der *p21*-Expression einen Tag nach Induktion der Differenzierung wurde in der Literatur bereits für andere Rhabdomyosarkomzellen beschrieben (Otten et al., 1997) und spricht neben den histologischen Befunden dafür, dass der Differenzierungsprozess unter den von uns gewählten Bedingungen in der für Rhabdomyosarkomzellen charakteristischen Art und Weise ablief.

Da Rhabdomyosarkome zwar denselben Ursprung wie Skelettmuskelzellen haben, sie aber außerhalb der Muskelatur angesiedelt sind, lassen sie sich nur bedingt mit der

## Ergebnisse

murinen Myoblasten-Zelllinie C2C12 vergleichen. Es existiert keine nichttransformierte Kontrolle des gleichen Donors, so dass hier ein Vergleich der RD/18-Zellen mit der klonalen Variante RD/12 sinnvoll wäre.

### **3.3 Einfluss einer Hemmung der Expression des *traf6*-Gens und der Aktivität des TRAF6-Effektors NF- $\kappa$ B auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Myoblasten**

Wie im vorangegangenen Abschnitt dargestellt, konnte gezeigt werden, dass die *traf6*-Expression während der Differenzierung abnimmt. Ebenso konnte beobachtet werden, dass bei weniger differenzierungskompetenten Myoblasten wie C2F3- und RD/18-Zellen, die Repression des *traf6*-Gens geringer ausfiel als bei den C2C12-Zellen. Da TRAF6 ein Aktivator des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B ist, ist es in diesem Zusammenhang interessant, dass proliferierende Myoblasten deutlich höhere NF- $\kappa$ B-Aktivitäten zeigen als differenzierende Zellen (Guttridge et al., 1999). Somit könnte TRAF6 in Zusammenhang mit dem NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle bei der Regulation des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens von Myoblasten übernehmen.

Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass über eine Hemmung der *traf6*-Expression bzw. direkt über eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität eine Verringerung der Proliferationsrate und eine Steigerung des Differenzierungspotentials vergleichsweise differenzierungsinkompetenter Zellen, wie beispielsweise Rhabdomyosarkomzellen, erreicht werden könnte. Dies würde interessante therapeutische Optionen eröffnen.

Somit wurden im Verlauf dieser Arbeit Proliferations- und Differenzierungsstudien an Myoblasten durchgeführt, bei denen die *traf6*-Expression sowie die NF- $\kappa$ B-Aktivität gehemmt worden war, worauf in den nachfolgenden Abschnitten genauer eingegangen werden soll.

### **3.3.1 Hemmung der *traf6*-Expression mittels spezifischer siRNAs**

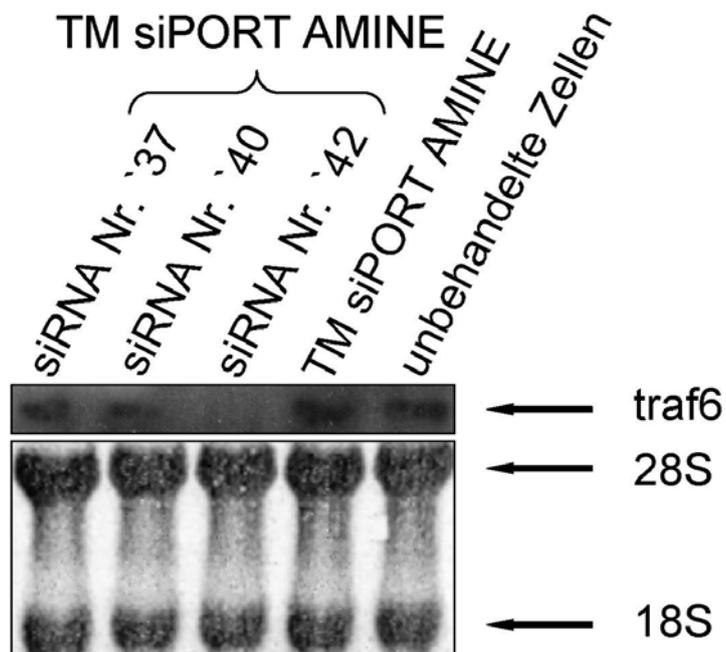
*Small interfering RNAs* (siRNAs) sind 21 bis 28 bp lang und doppelsträngig. In der Natur entstehen sie durch enzymatische Spaltung einer längeren doppelsträngigen RNA. Die fertigen siRNAs werden zunächst in einen Proteinkomplex eingebaut. Dieser Komplex bindet dann an die Ziel-mRNA, welche einen mit der entsprechenden siRNA identischen Sequenzabschnitt aufweist. Durch diesen Prozess wird die Ziel-mRNA entwunden, anschließend gespalten und von Nukleasen abgebaut. Dieser Mechanismus dient der Zelle zum Schutz vor viraler Fremd-RNA, hat aber auch unter physiologischen Bedingungen eine regulatorische Funktion in Bezug auf die Genexpression (Denli und Hannon, 2003).

In dieser Arbeit wurden synthetische siRNAs, die kommerziell erhältlich sind, zur spezifischen Hemmung der *traf6*-Expression in normalen Myoblasten und in Rhabdomyosarkomzellen verwendet. Hierzu wurde die siRNA direkt in die Zielzellen eingebracht (transfiziert). Das Protokoll zur Transfektion wurde im Zuge dieser Arbeit erarbeitet und optimiert, was nachfolgend beschrieben werden soll.

#### **3.3.1.1 Hemmung der *traf6*-Expression mittels spezifischer siRNAs in der murinen Myoblasten-Zelllinie C2C12**

Zur spezifischen Hemmung der *traf6*-Expression in C2C12-Zellen wurden drei verschiedene siRNAs verwendet, deren Funktionalität zunächst überprüft werden musste. Zu diesem Zweck wurden C2C12-Zellen parallel mit allen drei verfügbaren siRNA-Spezies zunächst nach einem Standardprotokoll des Herstellers transfiziert. Die Zellen wurden geerntet, nachfolgend die gesamtzelluläre RNA isoliert und im *Northern Blot*-Verfahren mit Hilfe spezifischer *traf6*-Sonden analysiert.

## Ergebnisse



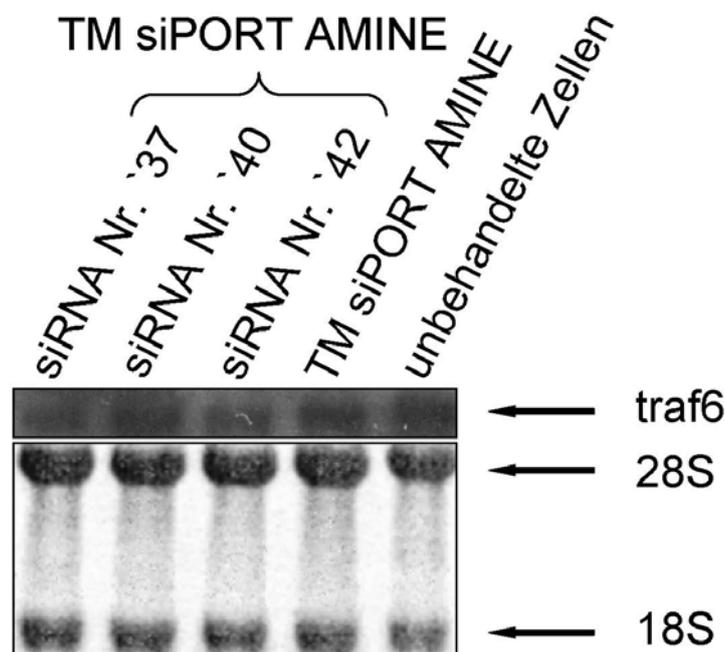
**Abbildung 23: Northern Blot-Analyse der Expression von *traf6* in siRNA behandelten C2C12-Zellen.** Es wurden jeweils 3µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen. Drei verschiedene siRNAs wurden mit dem Transfektionsreagenz siPort AMINE in C2C12-Zellen transfiziert. Zellen, welche nur mit Transfektionsreagenz behandelt worden waren und unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Es wurde mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *traf6* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung.

Wie Abb.23 zeigt, hatten alle drei untersuchten siRNAs eine hemmende Wirkung auf die *traf6*-Expression. Besonders stark war dabei der Effekt von siRNA Nr. '42. Aus diesem Grund wurde in den im Folgenden beschriebenen Versuchen ausschließlich diese siRNA verwendet. Unbehandelte Zellen, Zellen, die nur mit Transfektionsreagenz behandelt worden waren, sowie Zellen, die mit einer unspezifischen („scrambled“) siRNA transfiziert worden waren (Abb. und Daten nicht gezeigt) zeigten dagegen keine Hemmung der *traf6*-Expression.

## Ergebnisse

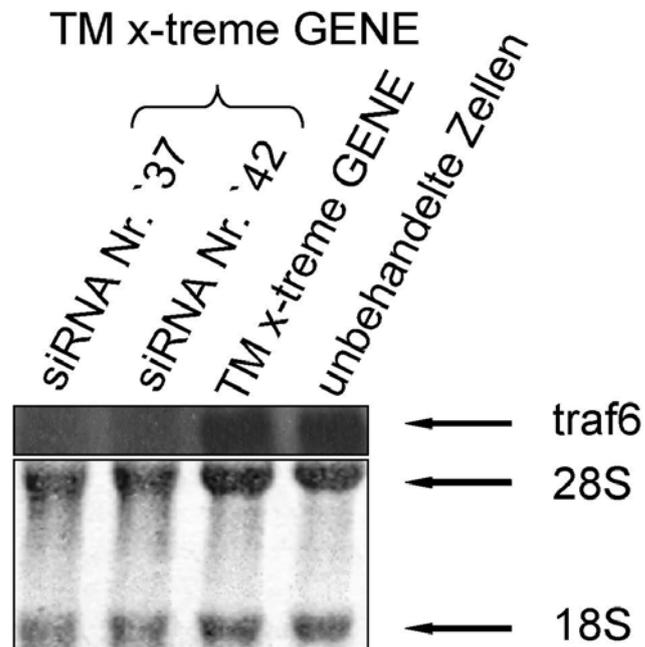
### 3.3.1.2 Hemmung der *traf6*-Expression mittels spezifischer siRNAs in der humanen Rhabdomyosarkom-Zelllinie RD/18

Da die oben erwähnte, für C2C12-Zellen als optimal ermittelte siRNA Nr. `42 zur humanen Sequenz drei mismatches aufweist, wurde das Experiment mit RD/18-Zellen wiederholt, um zu überprüfen, ob sie bei der humanen Zelllinie ebenso effektiv die *traf6*-Expression hemmt.



**Abbildung 24: Northern Blot-Analyse der Expression von *traf6* in siRNA-behandelten RD/18-Zellen.** Drei verschiedene siRNAs wurden mit siPort AMINE in RD/18-Zellen transfiziert. Zellen, die mit Transfektionsreagenz alleine behandelt worden waren und unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Auf das Gel wurden jeweils 3µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen. Es wurde mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *traf6* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung.

Zwar konnte gezeigt werden, dass die siRNAs Nr. `37 und Nr. `42 die *traf6*-Expression in RD/18 Zellen hemmen können (Abb.24), jedoch war diese Hemmung nicht sehr effektiv. Aus diesem Grund wurden diese zwei siRNAs mit einem anderen Transfektionsreagenz in RD/18 transfiziert. Hierfür wurde das Transfektionsreagenz TM x-treme GENE gewählt.

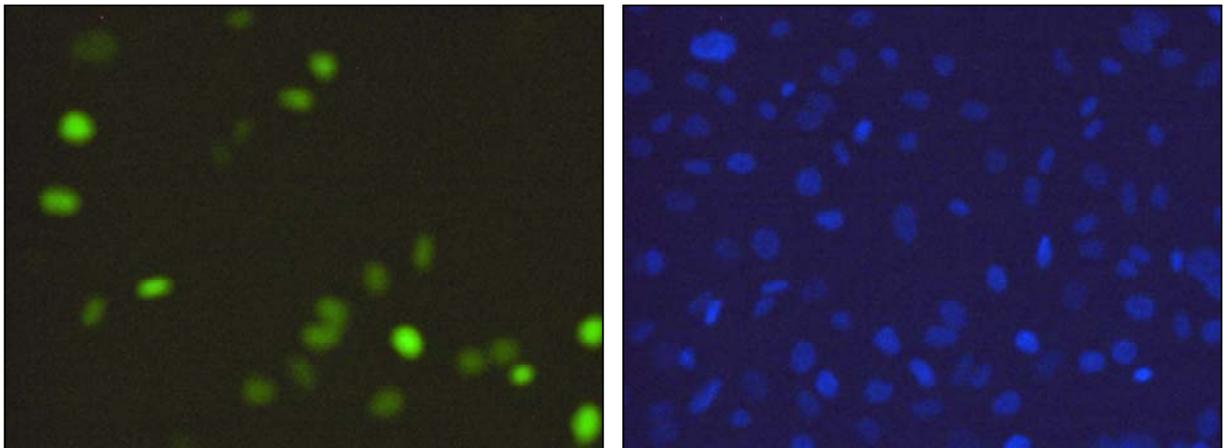


**Abbildung 25: Northern Blot-Analyse der Expression von *traf6* in siRNA-behandelten RD/18-Zellen.** Drei verschiedene siRNAs wurden mit x-treme GENE in RD/18-Zellen transfiziert. Mit Transfektionsreagenz behandelte und unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Auf das Gel wurden jeweils 3µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen. Es wurde mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *traf6* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung.

Tatsächlich konnte mit den siRNAs Nr. `37 und Nr. `42 und dem Transfektionsreagenz xtreme gene eine starke Repression der *traf6*-Genexpression detektiert werden. Unbehandelte Zellen und Zellen, die nur mit Transfektionsreagenz behandelt worden waren, sowie Zellen, die mit einer unspezifischen („scrambled“) siRNA transfiziert worden waren (nicht gezeigt), zeigten keine Hemmung der *traf6*-Expression. In allen weiteren Versuchen mit RD/18-Zellen wurde daher die siRNA Nr. `42 in Kombination mit dem Transfektionsreagenz TM x-treme GENE verwendet. Auf diese Weise konnten die murinen C2C12-Zellen und die humanen RD/18-Zellen mit der gleichen siRNA behandelt werden.

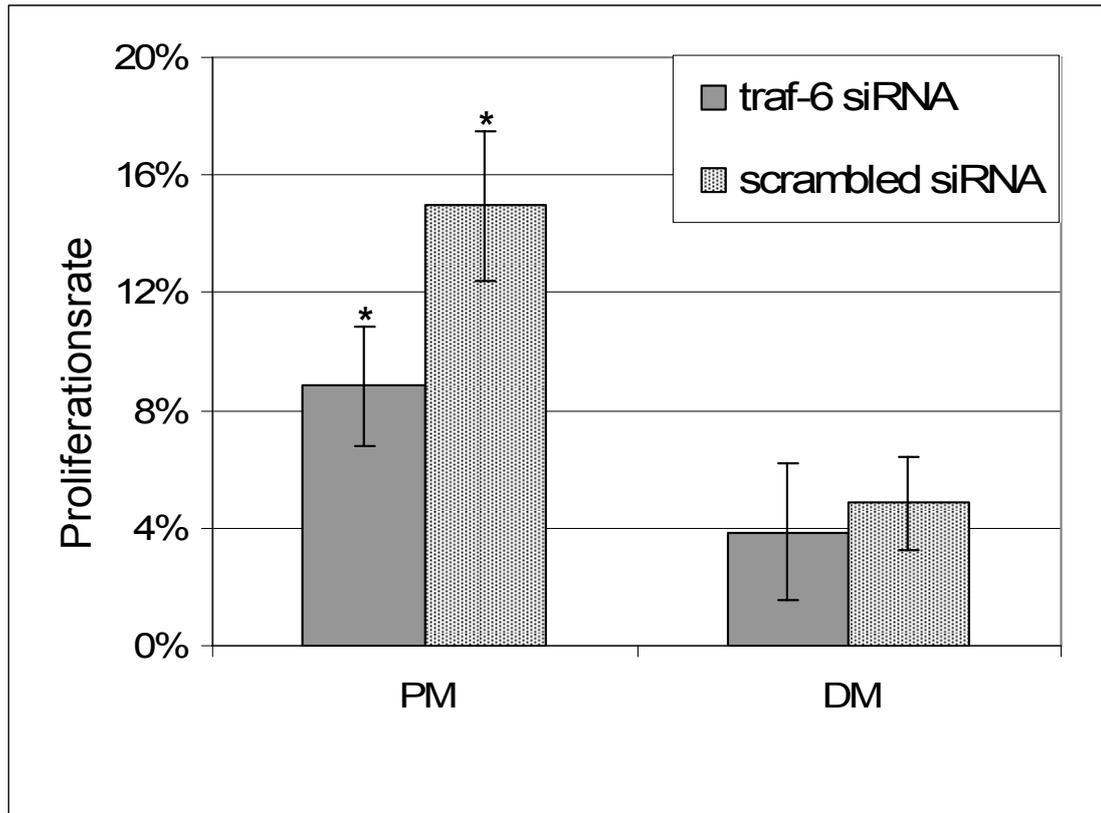
### 3.3.2 Einfluss der Hemmung der *traf6*-Expression auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von C2C12-Zellen

Um den Einfluss einer Hemmung der *traf6*-Genexpression auf die Proliferationsrate von C2C12-Myoblasten zu studieren, wurden Zellen, die mit *traf6*-spezifischer oder „scrambled“-siRNA behandelt worden waren, mit der BrdU-Methode untersucht. Hierzu wurden die Zellen 40 Minuten lang einer Behandlung mit dem Thymidin-Analogon BrdU ausgesetzt. Während der Zellteilung wird dieses dann anstelle des regulären Nukleosids in das zelluläre Genom eingebaut, befindet sich also im Zellkern der Zellen, die sich während des Markierungszeitraums geteilt haben. Um die BrdU-markierten Kerne im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wurden die Zellen zuerst mit einem primären Antikörper gegen BrdU und anschließend mit einem sekundären, Fluorochrom-konjugierten Antikörper behandelt. Alle Zellkerne wurden zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt. BrdU-markierte Zellen wurden gezählt und in Relation zur Gesamtzellzahl (DAPI-Färbung) gesetzt.



**Abbildung 26: Nachweis proliferierender Zellen mit der BrdU-Methode.** Links ist die Anfärbung der Zellen, die sich während des Markierungszeitraums geteilt hatten, durch einen Fluorochrom-konjugierten Antikörper gezeigt. Rechts sieht man die entsprechende DAPI-Färbung aller Zellkerne.

## Ergebnisse



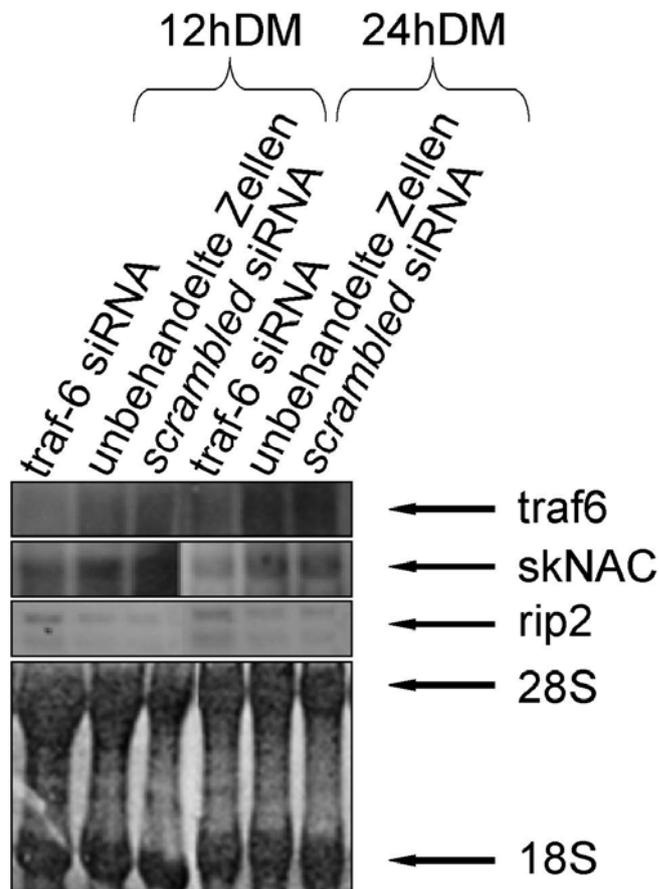
**Abbildung 27: Bestimmung der Proliferationsrate von C2C12-Zellen, die mit traf6-siRNA oder „scrambled“-siRNA behandelt worden waren.** Mittels BrdU-labeling-kit wurde die Proliferationsrate von siRNA-behandelten C2C12-Zellen unter Proliferations (PM) – und Differenzierungsbedingungen (DM) bestimmt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurden je fünf Gesichtsfelder bezüglich der BrdU-markierten und der mit DAPI angefärbten Zellkerne ausgezählt und so die Proliferationsrate bestimmt. Die mit einem Stern markierten Balken unterscheiden sich signifikant.

Wie Abb.27 zeigt, zeigten die mit traf6-siRNA behandelten Zellen, die nach erfolgter Transfektion für 24h in Proliferationsmedium kultiviert worden waren, eine verminderte Proliferationsrate gegenüber den Zellen, die mit „scrambled“-siRNA behandelt worden waren. In Differenzierungsmedium war jedoch kein signifikanter Unterschied zu beobachten (Abb.27). Dennoch ließ sich die gleiche Tendenz wie im Proliferationsmedium erkennen.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass mit traf6-siRNA behandelte C2C12-Myoblasten weniger gut proliferierten als mit „scrambled“-siRNA behandelte Zellen, was dafür spricht, dass über eine Hemmung der *traf6*-Expression tatsächlich eine Verringerung der myoblastären Proliferationsrate erzielt werden kann.

## Ergebnisse

Um zu analysieren, ob eine Hemmung der *traf6*-Expression einen Einfluss auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von C2C12-Myoblasten hat, wurden Zellen, die mit siRNA behandelt worden waren, geerntet, anschließend wurde gesamtzelluläre RNA isoliert und im *Northern Blot*-Verfahren mit Hilfe von spezifischen Sonden die Expression zweier spezifischer Markergene für die myogene Differenzierung analysiert. Es handelte sich hierbei um das bereits oben erwähnte *skNAC*-Gen sowie das *rip2*-Gen, welches für ein Signaltransduktionsprotein kodiert und dessen Expression nach Induktion der Myoblastendifferenzierung stark reprimiert wird (Munz et al., 2002).



**Abbildung 28: Northern Blot-Analyse der Expression der Differenzierungs-Markergene *skNAC* und *rip2* in C2C12 Zellen, die mit *traf6*-spezifischer siRNA behandelt worden waren, in Proliferations- und Differenzierungsmedium.** Es wurden jeweils 3µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen. Anschließend wurde der Filter mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *traf6*, *skNAC* und *rip2* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung.

## Ergebnisse

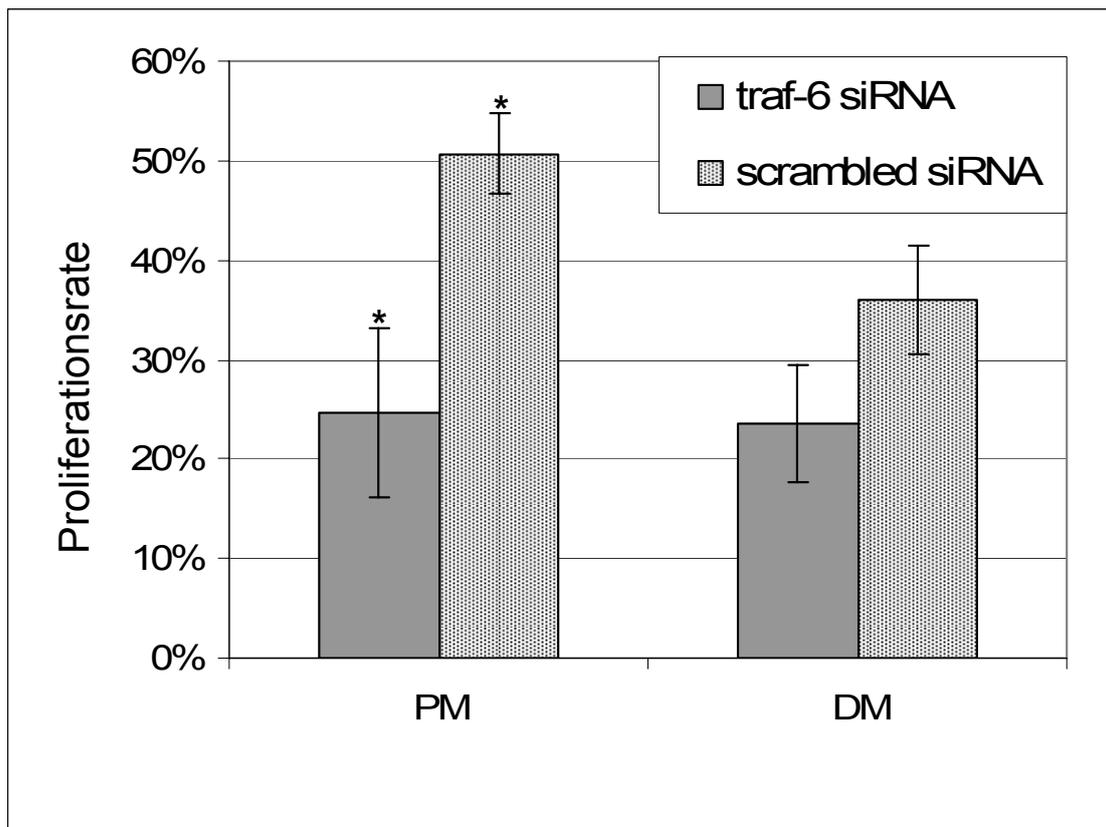
Aus Abb.28 ist ersichtlich, dass die Hemmung der *traf6*-Expression eine Reduktion der Expression des differenzierungsassoziierten *skNAC*-Gens in Differenzierungsmedium zur Folge hatte. Die Expression des proliferationsassoziierten *rip2*-Gens war dagegen nach siRNA-Behandlung erhöht. Beide Befunde sind konsistent, aber erstaunlich, da aufgrund der Repression der endogenen *traf6*-Expression nach Induktion der Differenzierung eher hätte angenommen werden können, dass eine Behandlung mit *traf6*-spezifischer siRNA die Differenzierung der Zellen fördern sollte, also zu einer gesteigerten *skNAC*- und einer verringerten *rip2*-Expression führen sollte.

Momentan werden in unserem Labor daher Expressionsstudien mit weiteren Differenzierungsmarkern durchgeführt, um ein genaueres Bild der Rolle von TRAF6 bei der Expression dieser Gene zu erhalten.

### **3.3.3 Einfluss einer Hemmung der *traf6*-Expression auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von RD/18-Zellen**

Um zu prüfen, ob die unter 3.3.2 beschriebene Effekte auch bei Rhabdomyosarkomzellen zu beobachten sind, was interessante therapeutische Optionen eröffnen würde, wurden RD/18-Zellen, welche mit *traf6*-spezifischer siRNA behandelt worden waren, 24 Stunden in Proliferations- oder Differenzierungsmedium kultiviert. Es wurde die BrdU-Methode wie oben für C2C12-Zellen beschrieben eingesetzt.

## Ergebnisse



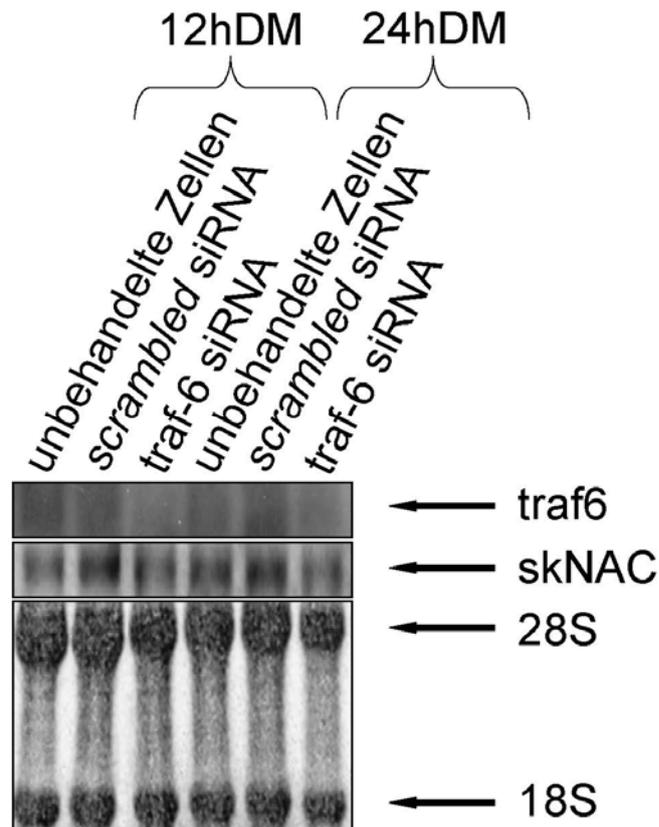
**Abbildung 29: Bestimmung der Proliferationsrate von mit traf6-siRNA und „scrambled“-siRNA behandelten RD/18-Zellen.** Mittels BrdU-labeling-kit wurde die Proliferationsrate von siRNA behandelten RD/18-Zellen unter Proliferations (PM) – und Differenzierungsbedingungen (DM) bestimmt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurden je fünf Gesichtsfelder der BrdU-gelabelten Zellen und der DAPI angefärbten Zellkerne ausgezählt und so die Proliferationsrate der Zellen bestimmt. Die mit einem Stern markierten Balken unterscheiden sich signifikant.

Wie in Abb.29 dargestellt, zeigten die mit traf6-siRNA behandelten RD/18-Zellen unter Proliferationsbedingungen eine signifikant verminderte Proliferationsrate gegenüber den mit „scrambled“-siRNA behandelten Zellen. Auch in Differenzierungsmedium waren die Unterschiede zu erkennen, wenngleich diese nicht signifikant waren. RD/18-Zellen, die mit traf6-spezifischer siRNA behandelt worden waren, proliferierten weniger stark als die entsprechenden Kontrollen.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass eine traf6-siRNA Behandlung sich negativ auf das Proliferationsverhalten von RD/18-Zellen auswirkt. Dies gilt sowohl für Zellen in Proliferations- und vermutlich auch für solche in Differenzierungsmedium. Dies entspricht den bei den C2C12-Studien erhaltenen Ergebnissen und könnte interessante therapeutische Perspektiven eröffnen.

## Ergebnisse

Wie bei den C2C12-Zellen sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Hemmung der *traf6*-Genexpression einen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Rhabdomyosarkomzellen hat. Hierzu wurden RD/18-Zellen entsprechend transfiziert, in Differenzierungsmedium kultiviert und nach sechs, zwölf, 24 und 48 Stunden gesamtzelluläre RNA gewonnen. Mittels *Northern Blot*-Analyse wurde dann die Expression des Differenzierungsmarkers *skNAC* analysiert.



**Abbildung 30: Northern Blot-Analyse der Expression des Differenzierungs-Markers *skNAC* in RD/18-Zellen, die mit *traf6*-spezifischer siRNA behandelt worden waren, in Proliferations- und Differenzierungsmedium.** Es wurden jeweils 3µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen. Anschließend wurde mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *traf6* und *skNAC* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung.

Wie aus Abb.30 hervorgeht, zeigte sich wie bei den C2C12- auch bei den RD/18-Zellen nach einer Behandlung mit *traf6*-spezifischer siRNA eine verminderte Expression des *skNAC*-Gens. Dies war allerdings nicht so deutlich wie bei den C2C12-Zellen. Um ein genaueres Bild der Rolle von TRAF6 bei der Expression von *skNAC* in RD/18-Zellen zu erhalten, werden in unserem Labor Expressionsstudien mit weiteren Differenzierungsmarkern durchgeführt.

### **3.4 Einfluss einer Hemmung der Aktivität des TRAF6-Effektors NF- $\kappa$ B auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Myoblasten**

TRAF6 ist ein bekannter Aktivator des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Deng et al., 2000; Thomas, 2005). Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Hemmung der NF- $\kappa$ B -Aktivität einen vergleichbaren Effekt auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Myoblasten hat wie eine Hemmung der *traf6*-Genexpression. Hierfür wurden C2C12- und RD/18-Zellen mit bekannten Hemmstoffen von NF- $\kappa$ B behandelt. Nachfolgend wurde das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zellen untersucht.

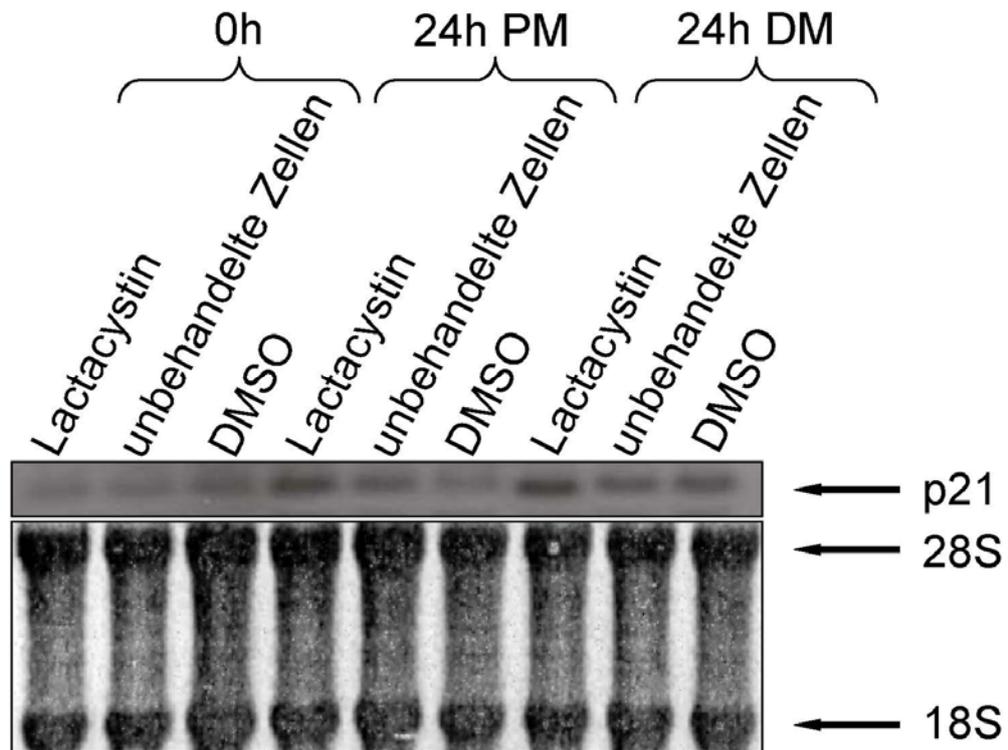
#### **3.4.1 Einfluss einer Hemmung des TRAF6-Effektors NF- $\kappa$ B durch Lactacystin und Curcumin auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von C2C12-Zellen**

Lactacystin ist ein bekannter Proteasom-Inhibitor (Shirley et al., 2005). Dadurch hemmt es die proteolytische Degradation des NF- $\kappa$ B-Inhibitorproteins I $\kappa$ B, die notwendig für die Freisetzung und Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist. Somit ist Lactacystin ein potenter Inhibitor des TRAF6-Effektors NF- $\kappa$ B.

Daher wurde die Substanz in dieser Arbeit verwendet, um zu untersuchen, welche Auswirkungen eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Myoblasten hat.

Hierfür wurden C2C12-Zellen bei 80% Konfluenz eine Stunde lang mit Lactacystin behandelt. Die Endkonzentration in der Zellkulturschale betrug dabei 10 $\mu$ M. Dann wurde das Medium gegen Proliferations- bzw. Differenzierungsmedium ersetzt. Die Zellen wurden geerntet und die gesamtzelluläre RNA isoliert, gelelektrophoretisch getrennt und mittels *Northern Blot*-Verfahren analysiert.

## Ergebnisse



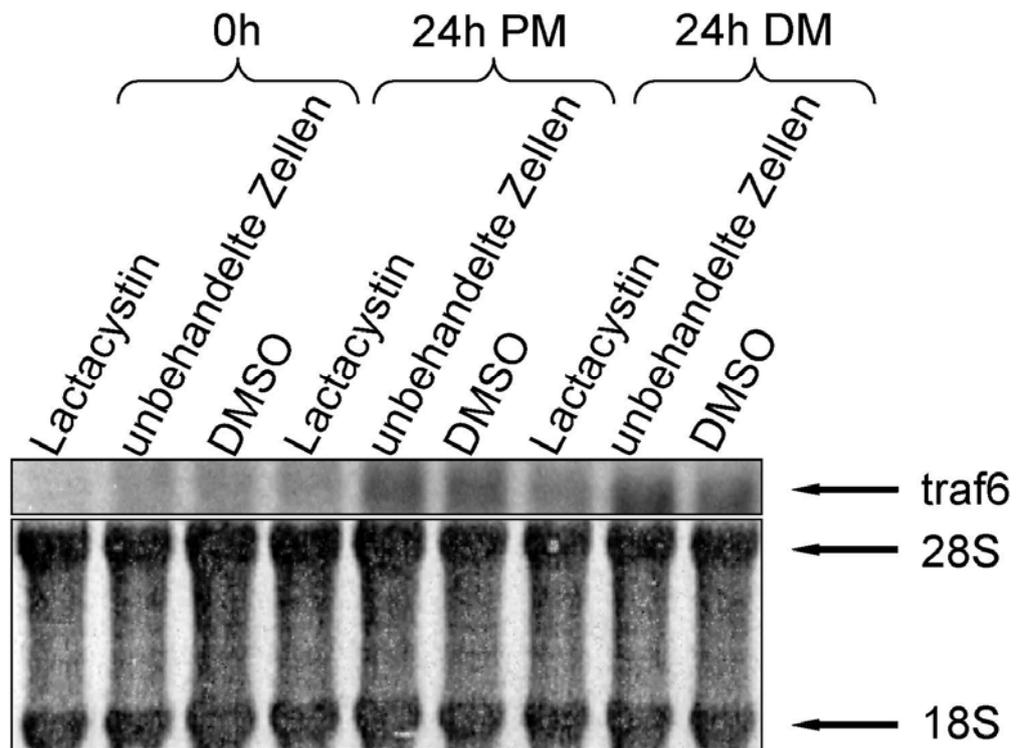
**Abbildung 31: Northern Blot-Analyse der Expression des Proliferations- und Differenzierungs-Markers *p21* in C2C12-Zellen, die mit Lactacystin behandelt worden waren.** Es wurden jeweils 5 $\mu$ g gesamtzelluläre RNA aufgetragen. Anschließend wurde mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *p21* hybridisiert. Da Lactacystin in DMSO gelöst wurde, galten DMSO-behandelte Zellen als Lösungsmittelkontrolle. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung. Man beachte die deutlich stärkere Induktion von *p21* zum Zeitpunkt 24h in den behandelten Zellen, sowohl in PM als auch in DM.

Die Expression des Differenzierungsmarkers *p21* wird, wie in Abschnitt 3.2.1 erläutert, normalerweise während der Differenzierung hochreguliert. Unter Lactacystin-Behandlung fiel diese Induktion jedoch ungleich stärker aus und war auch in Proliferationsmedium zu beobachten.

Diese Daten zeigen, dass eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität die Expression von Genen wie *p21*, die mit einem Ausscheiden aus dem Zellzyklus und mit dem Eintritt in die Differenzierungsphase assoziiert sind, induzieren kann.

## Ergebnisse

Ebenso konnte gezeigt werden, dass die *traf6*-Expression durch Lactacystin gehemmt werden kann (Abb.32).



**Abbildung 32: Northern Blot-Analyse der Expression von *traf6* in C2C12-Zellen, die mit Lactacystin behandelt worden waren.** Es wurden jeweils 5µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen. Anschließend wurde mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *traf6* hybridisiert. Da Lactacystin in DMSO gelöst wurde, galten DMSO behandelte Zellen als Lösungsmittelkontrolle. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung. Man beachte die schwächere Induktion von *traf6* bei den mit Lactacystin behandelten Zellen.

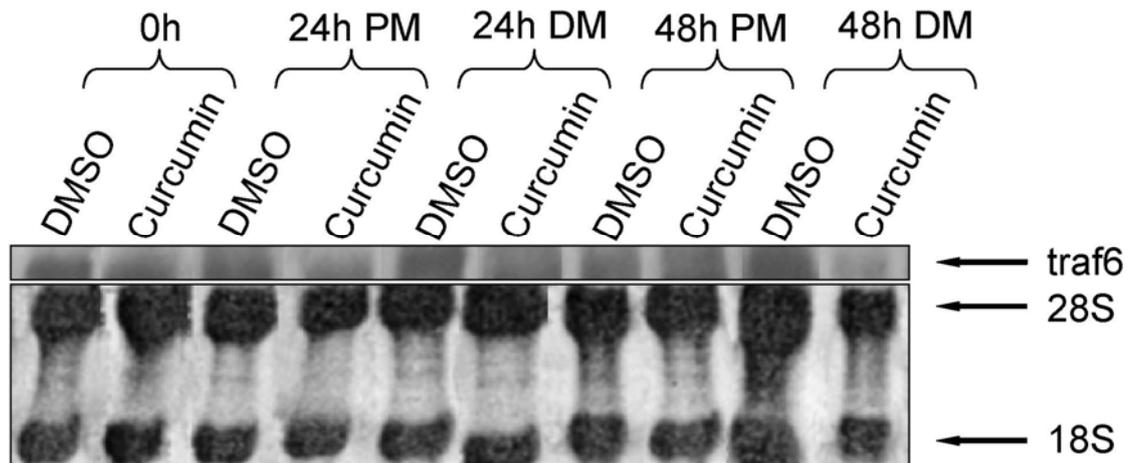
Bei Curcumin handelt es sich um eines der Curcuminoide aus *Curcuma longa* (Gelbwurzel), einer Zingiberaceae (Ingwergewächs). Dieser sekundäre Pflanzeninhaltsstoff hemmt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Hemmung des IKK und die dadurch ausbleibende Phosphorylierung von I $\kappa$ B. I $\kappa$ B wird somit nicht degradiert und gibt kein NF- $\kappa$ B mehr frei (Pan et al., 2000; Aggarwal und Shishodia, 2004; Thaloor et al., 1999).

In dieser Arbeit sollte analog zu den oben beschriebenen Versuchen mit Lactacystin untersucht werden, ob sich durch Curcumin auch die Expression von *traf6* hemmen lässt.

C2C12-Zellen wurden bei 80% Konfluenz mit Curcumin behandelt. Die Endkonzentration in der Zellkulturschale betrug dabei 100µM Curcumin. Nach einer Stunde Curcumin-Behandlung (0h) wurde das Medium gegen Differenzierungs-

## Ergebnisse

bzw. Proliferationsmedium ausgetauscht und die Zellen für weitere 24 bzw. 48 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und im Anschluss daran die gesamtzelluläre RNA isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels *Northern Blot*-Verfahren auf die Expression des *traf6*-Gens hin analysiert.



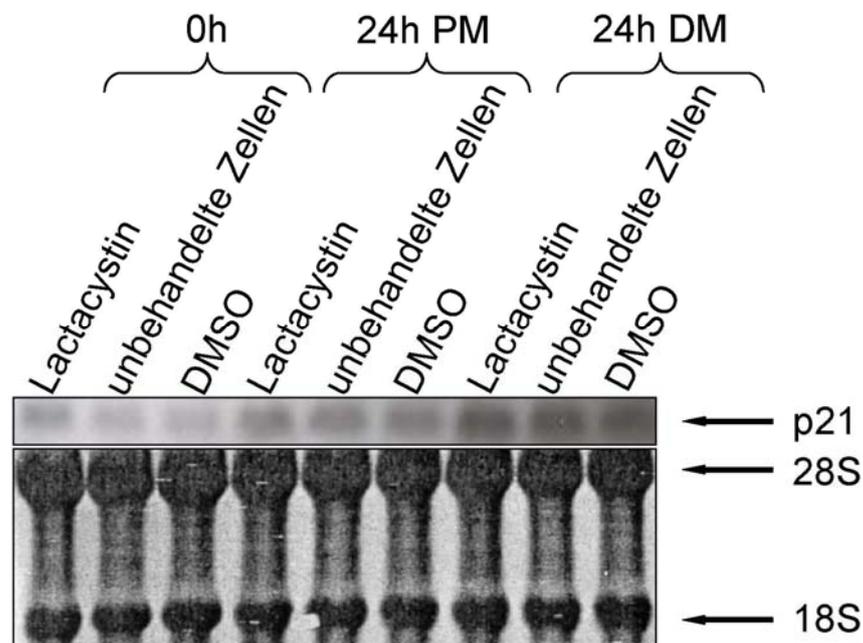
**Abbildung 33: Northern Blot-Analyse der Expression des *traf6*-Gens in Curcumin-behandelten C2C12-Zellen.** Es wurden jeweils 3 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen. Anschließend wurde mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *traf6* hybridisiert. Da Curcumin in DMSO gelöst wurde, galten DMSO-behandelte Zellen als Lösungsmittelkontrolle. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung.

Aus Abb.33 wird deutlich, dass Curcumin eine Repression der *traf6*-Expression bewirkt. Besonders deutlich war dieser Effekt zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Induktion der Differenzierung zu beobachten. Jedoch auch nach 24 Stunden in Proliferationsmedium war die verminderte Expression gut zu erkennen. Nach 48 Stunden in Proliferationsmedium war der hemmende Effekt des Curcumins bereits wieder gänzlich aufgehoben.

Diese Daten weisen darauf hin, dass die *traf6*-Expression selbst in Myoblasten direkt oder indirekt über einen NF-κB-abhängigen Signaltransduktionsweg reguliert werden kann.

### 3.4.2 Einfluss einer Hemmung des TRAF6-Effektors NF- $\kappa$ B durch Lactacystin und Curcumin auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von RD/18-Zellen

Um zu überprüfen, wie sich die Behandlung mit Lactacystin auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von RD/18-Zellen auswirkt, wurden diese bei 80% Konfluenz eine Stunde lang mit Lactacystin behandelt. Die Lactacystin-Endkonzentration in der Zellkulturschale betrug dabei 10 $\mu$ M. Dann wurde das Medium gegen Proliferations- bzw. Differenzierungsmedium ersetzt. Die Zellen wurden geerntet und anschließend die gesamtzelluläre RNA isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels *Northern Blot*-Verfahren analysiert.



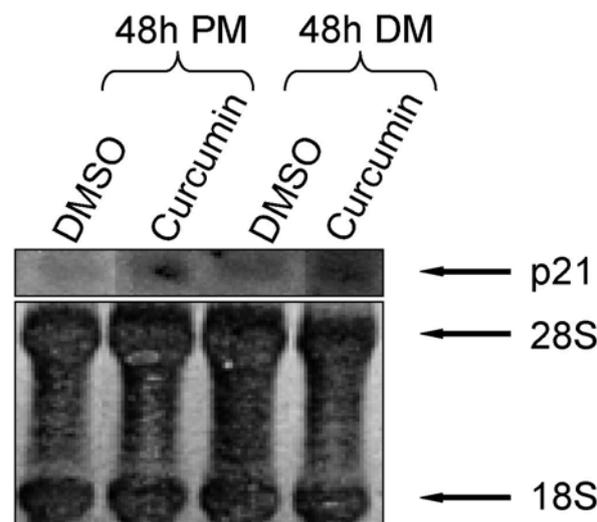
**Abbildung 34:** *Northern Blot*-Analyse der Expression des Proliferations- und Differenzierungs-Markers *p21* in mit Lactacystin behandelten RD/18-Zellen. Es wurden jeweils 5 $\mu$ g gesamtzelluläre RNA aufgetragen. Anschließend wurde mit *antisense*-RNA-Sonden gegen den Proliferations- und Differenzierungsmarker *p21* hybridisiert. Da Lactacystin in DMSO gelöst wurde, galten DMSO behandelte Zellen als Lösungsmittelkontrolle. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung. Man beachte die stärkere *p21*-Expression in den Lactacystin-behandelten Zellen zum Zeitpunkt 0h und 24h sowohl in PM als auch in DM.

## Ergebnisse

Wie aus Abb.34 hervorgeht, zeigten die mit Lactacystin behandelten Zellen unmittelbar nach der Behandlung eine im Vergleich zu unbehandelten und DMSO-behandelten Zellen verstärkte *p21*-Expression.

Diese Daten zeigen, dass auch bei RD/18-Zellen eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität die Expression von *p21* induziert. Auffallend ist jedoch, dass die durch Lactacystin bedingte Induktion von *p21* insbesondere nach 24h in Differenzierungsmedium qualitativ geringer ausfiel als bei den murinen C2C12-Myoblasten: Nach 24 Stunden in Differenzierungsmedium war fast kein Unterschied mehr zu den DMSO-behandelten Zellen und den unbehandelten Zellen zu erkennen. Wie bereits unter 3.2.3 erwähnt, ist hier ein direkter Vergleich der C2C12-Zellen mit den RD/18-Zellen nur bedingt möglich.

Um die Auswirkungen einer Behandlung mit Curcumin bei RD/18-Zellen analysieren zu können, wurden RD/18-Zellen bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Dann wurden sie für eine Stunde einer 100 $\mu$ M Curcumin-Lösung in Zellkulturmedium ausgesetzt (0h). Nach dem Entfernen der Curcumin-Lösung wurden die Zellen für 24 Stunden bzw. 48 Stunden in Proliferations- bzw. Differenzierungsmedium belassen. Dann wurden die Zellen geerntet, die gesamtzelluläre RNA isoliert und mittels *Northern Blot*-Verfahren analysiert.



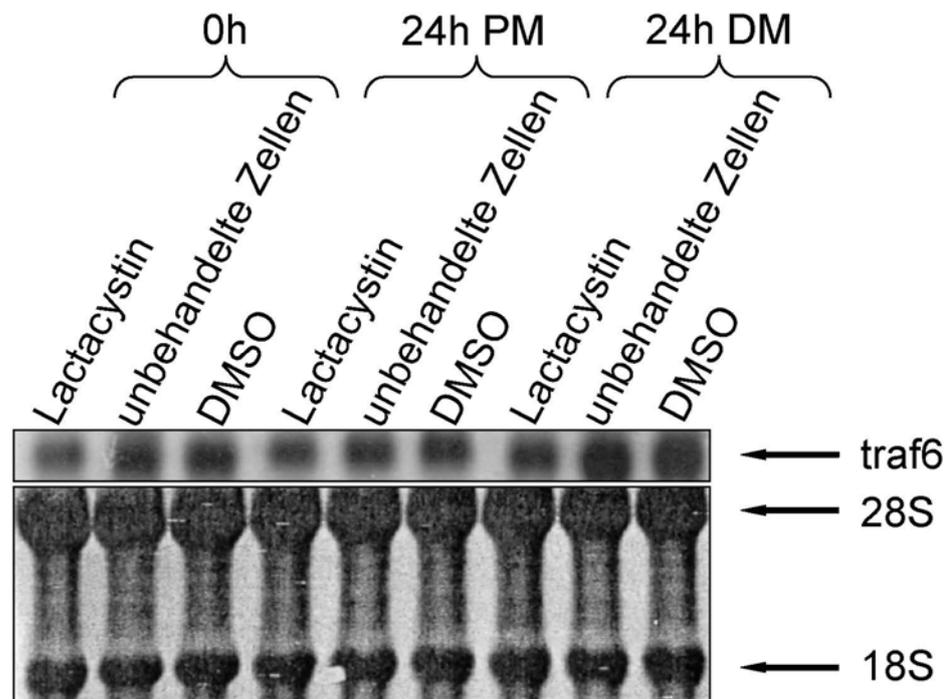
**Abbildung 35: Northern Blot-Analyse der Expression des Proliferations- und Differenzierungsmarkers *p21* in Curcumin-behandelten RD/18-Zellen.** Es wurden jeweils 5 $\mu$ g gesamtzelluläre RNA aufgetragen. Anschließend wurde mit *antisense*-RNA-Sonden gegen den Proliferations- und Differenzierungsmarker *p21* hybridisiert. Da Curcumin in DMSO gelöst wurde, galten DMSO-behandelte Zellen als Lösungsmittelkontrolle. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung.

## Ergebnisse

Auch bei RD/18-Zellen bewirkt eine Curcuminbehandlung, und die damit verbundene Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität, die Expression von *p21*.

Die Daten zeigen, dass sowohl durch Lactacystin, als auch durch Curcumin, eine Induktion der *p21*-Expression ausgelöst werden kann. Wie oben bereits erwähnt, bewirkt eine *p21*-Expression das Ausscheiden aus dem Zellzyklus und den Eintritt in die Differenzierungsphase.

Wie bereits für die C2C12-Zellen gezeigt, wurde auch bei den RD/18-Zellen überprüft, ob eine Behandlung mit Lactacystin und Curcumin mit einer Hemmung der *traf6*-Expression einhergeht.

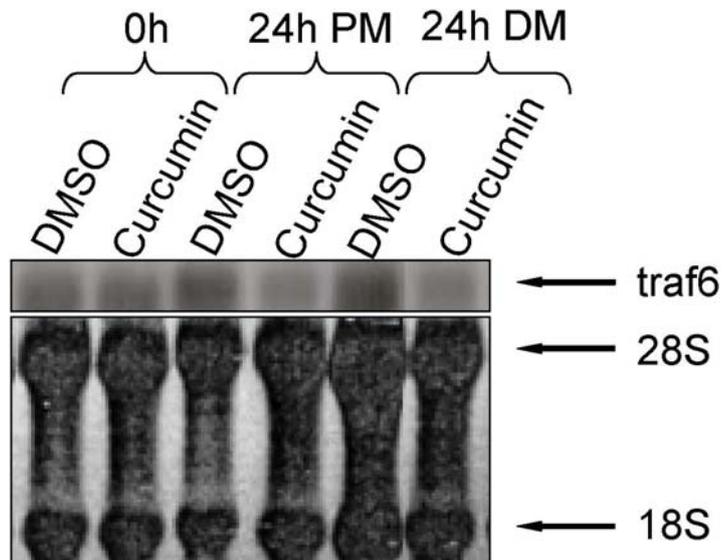


**Abbildung 36: Northern Blot-Analyse der Expression von *traf6* in RD/18-Zellen, die mit Lactacystin behandelt worden waren.** Es wurden jeweils 5 $\mu$ g gesamtzelluläre RNA aufgetragen. Anschließend wurde mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *traf6* hybridisiert. Da Lactacystin in DMSO gelöst wurde, galten DMSO-behandelte Zellen als Lösungsmittelkontrolle. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung. Man beachte die schwächere Induktion von *traf6* bei den mit Lactacystin behandelten Zellen.

In Abb.36 ist deutlich zu erkennen, dass die Lactacystin-behandelten Zellen eine verminderte *traf6*-Expression zeigen. Dieser Effekt lässt sich sowohl bei

## Ergebnisse

differenzierenden, als auch bei proliferierenden Zellen beobachten. Die DMSO-Behandlung hat keinen Effekt auf die *traf6*-Expression.



**Abbildung 37: Northern Blot-Analyse der Expression des *traf6*-Gens in Curcumin-behandelten RD/18-Zellen.** Es wurden jeweils 5µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen. Anschließend wurde mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *traf6* hybridisiert. Da Curcumin in DMSO gelöst wurde, galten DMSO-behandelte Zellen als Lösungsmittelkontrolle. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblaufärbung.

Auch bei der Behandlung mit Curcumin ließ sich der gleiche Effekt wie bei der Lactacystin-Behandlung beobachten. Wie Abb.37 zeigt, bewirkt die Behandlung der RD/18-Zellen mit Curcumin eine deutliche Repression der *traf6*-Expression. Dieser Effekt zeigt sich sowohl bei differenzierenden, als auch bei proliferierenden Zellen. Die DMSO-Behandlung hat keinen Effekt auf die *traf6*-Expression.

Die Daten machen ersichtlich, dass sich, wie bei den C2C12-Zellen, die *traf6*-Expression auch bei den RD/18-Zellen durch Lactacystin und Curcumin hemmen ließ, was darauf hinweist, dass die Expression dieses Gens auch in Rhabdomyosarkomzellen direkt oder indirekt über einen NF-κB-abhängigen Signaltransduktionsweg kontrolliert wird.

## 4 DISKUSSION

Vor Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt gewesen, dass TRAF6 eine zentrale Rolle als Aktivator von NF- $\kappa$ B bei Entzündungsreaktionen, bei der Modulation immunologischer Prozesse sowie in Tumorzellen spielt (Inoue et al., 2000; Kobayashi et al., 2003; Bradley und Pober, 2001). Dabei wirkt TRAF6 vor allem als Aktivator des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, welcher insbesondere an der Regulation der Zellproliferation und an der Modulation apoptotischer Prozesse beteiligt ist (Mercurio und Manning, 1999; Aggarwal, 2004).

Über eine mögliche Rolle von TRAF6 bei Differenzierungsprozessen der Skelettmuskulatur war vor Beginn dieser Arbeit nichts bekannt gewesen. Allerdings ist in der Literatur beschrieben, dass der für die Muskeldifferenzierung essentielle JNK-p38-ERK Signaltransduktionsweg auch durch TRAF6 aktiviert wird (Olwin et al., 2002).

Desweiteren könnte TRAF6 als Aktivator des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in die Skelettmuskeldifferenzierung eingreifen: In Untersuchungen konnte belegt werden, dass das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$ , welches auch TRAF6 aktiviert, die Muskelzellendifferenzierung hemmen kann und umgekehrt eine Inaktivierung von NF- $\kappa$ B den Differenzierungsprozess fördert (Miller et al., 1988; Langen et al., 2001; Langen et al., 2004). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass NF- $\kappa$ B myogene Differenzierungsprozesse hemmt, was zumindest teilweise über eine Hemmung der Expression des *MyoD*-Gens erfolgt (Guttridge et al., 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher eine mögliche Beteiligung von TRAF6 bei der Regulation der Skelettmuskelzellendifferenzierung genauer untersucht werden.

Hierfür sollten zunächst die *traf6*-Genexpressionsmuster in verschiedenen Skelett- und Herzmuskelgeweben unter physiologischen und pathologischen Bedingungen miteinander verglichen werden.

## Diskussion

Anschließend sollte geklärt werden, inwiefern sich die *traf6*-Genexpression nach Induktion der Differenzierung von Myoblasten verändert.

Schließlich sollte analysiert werden, welche Folgen eine Repression der *traf6*-Genexpression auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten verschiedener Myoblasten-Zelllinien hat.

## **4.1 Untersuchung zur *traf6*-Genexpression in murinem Skelett- und Herzmuskelgewebe unter physiologischen und pathologischen Bedingungen**

### **4.1.1 *mdx*-Mäuse zeigen eine im Vergleich zu Wildtypmäusen schwächere *traf6*-Expression in der Skelett- und Herzmuskulatur**

Die in dieser Arbeit untersuchten *mdx*-Mäuse zeigten eine deutliche Repression der *traf6*-Expression im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyptieren. Dieses Ergebnis ließ sich bei allen untersuchten Muskeltypen beobachten, wobei im Herzen die Unterschiede zwischen *mdx*- und den Wildtypmäusen besonders gering ausfielen. Das Geschlecht der Tiere hatte keinen Einfluss auf die Expression des *traf6*-Gens. Abhängig vom Alter der Tiere gab es zwar Unterschiede bezüglich der *traf6*-Expression, doch zeigten diese keinen eindeutigen Trend.

Diese Ergebnisse waren besonders vor dem Hintergrund von Bedeutung, da die *mdx*-Maus ein Tiermodell für die x-chromosomal rezessiv vererbte Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) darstellt. DMD-Patienten weisen eine Mutation im Gen, welches für das Strukturprotein Dystrophin kodiert, auf. Die *mdx*-Maus zeigt den gleichartigen genetischen Defekt, jedoch sind die betroffenen Tiere von Wildtyp-Mäusen makroskopisch nicht zu unterscheiden. Der Mangel an Dystrophin beeinflusst wohl beim Menschen in viel stärkerem Ausmaß als bei der Maus die Membranstabilität, woraus eine chronische Degeneration von Muskelgewebe resultiert. Das degenerierte Muskelgewebe wird durch Fett- und Bindegewebe ersetzt (Finsterer und Stollberger, 2003). Bei der Maus wird ein ähnlicher Verlauf der

## Diskussion

Erkrankung nur im Zwerchfell beobachtet. Dort zeigt sich eine fortschreitende Degeneration des Muskels. Eine deutliche Fibrose und zunehmende Funktionseinschränkungen sind die Folge. Die Auswirkungen des Gendefektes auf die menschliche Muskulatur lassen sich daher mit dem erkrankten murinen Zwerchfell am besten vergleichen (Stedman et al., 1991).

Da die Regeneration der Skelettmuskulatur durch *de novo*-Differenzierung von Satellitenzellen (Myoblasten) bewirkt wird, stellt die *mdx*-Maus ein *in vivo*-Modell der Skelettmuskeldifferenzierung dar.

Die Satellitenzellen befinden sich dabei an der Oberfläche der Muskelfasern. Nach einer Verletzung des Muskels werden diese einkernigen Myoblasten aktiviert. Sie proliferieren und verschmelzen mit anderen Satellitenzellen und vorhandenen Muskelfasern. Dieser Prozess der Entstehung neuen Muskelgewebes ähnelt dabei mechanistisch den Vorgängen der Skelettmuskeldifferenzierung im Embryo (Seale und Rudnicki, 2000; Bischoff und Heintz, 1994). Daher wundert es nicht, dass in Dystrophin-defizientem Muskelgewebe eine deutlich erhöhte *p21*-Expression gemessen werden kann (Endesfelder et al., 2000). Die Induktion des *p21*-Gens hat dabei einen Austritt aus dem Zellzyklus durch Inhibition von CDK-Komplexen zur Folge und ist somit essentiell für den Eintritt in das Differenzierungsprogramm der Muskelzellen (Xiong et al., 1993). Dies erklärt auch, wieso die Expression von *MyoD* sowohl bei der Skelettmuskeldifferenzierung, als auch in Satellitenzellen für die Skelettmuskelregeneration essentiell ist (Palmer und Rudnicki, 2002). Desweiteren ist bekannt, dass eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung die Expression von *MyoD* hemmt und somit Regenerationsprozesse blockiert werden. Umgekehrt bewirkt eine Inaktivierung von NF- $\kappa$ B die Förderung des Differenzierungsprozesses (Guttridge et al., 1999).

Vor diesem Hintergrund verwundert es nicht, dass die *traf6*-Expression während des Regenerationsprozesses reprimiert wird: TRAF6 als Aktivator von NF- $\kappa$ B hätte hier vermutlich eine hemmende Wirkung, indem es die Differenzierung der Satellitenzellen blockiert.

Die Tatsache, dass bezüglich der *traf6*-Expression im Herzmuskelgewebe im Gegensatz zum Skelettmuskelgewebe nur geringe Unterschiede zwischen *mdx*- und

## Diskussion

Wildtypmäusen zu beobachten waren, spricht ebenfalls für die Hypothese, dass die Repression der *traf6*-Expression für den Regenerationsprozess wichtig sein könnte. Aus der Literatur ist bekannt, dass der bei der *mdx*-Maus vorliegende Gendefekt nur geringfügige Auswirkungen auf das Herzmuskelgewebe hat (Lagrota-Candido et al., 2002). Demzufolge blieben auch die histologischen Schnitte aller von uns untersuchten Herzen – sowohl die der Wildtyp- als auch die der *mdx*-Mäuse - ohne pathologischen Befund.

Auffallend war weiterhin, dass die *traf6*-Basalexpression im Zwerchfell besonders hoch war. Ebenso waren in diesem Gewebe besonders große Unterschiede bezüglich der *traf6*-Expression zwischen Wildtyp- und *mdx*-Mäusen zu beobachten. Dies könnte mit der erwähnten Tatsache zusammenhängen, dass das Zwerchfell der *mdx*-Maus eine progressive Degeneration zeigt (Stedman et al., 1991).

Es wurde bereits festgestellt, dass TRAF6 eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B bei Entzündungsreaktionen einnimmt. Dabei stimuliert NF- $\kappa$ B als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen, die für proinflammatorische Zytokine kodieren (Inoue et al., 2007).

Neben der Regulation von Regenerationsprozessen der Muskulatur könnte TRAF6 somit auch die Entzündungsantwort der *mdx*-Mäuse modulieren.

Zumindest im Zwerchfell, in geringerem Ausmaß aber auch in den anderen untersuchten Skelettmuskelgeweben der *mdx*-Maus konnten bei den histologischen Schnitten sehr viele deutliche Entzündungsherde festgestellt werden, was auch durch die Literatur belegt wird (Stedman et al., 1991; Lagrota-Candido et al., 2002; Partridge, 1991).

Da bisher keine Daten vorliegen, die belegen, dass die im Muskelgewebe nachgewiesene *traf6*-Expression primär auf die Muskelzellen selbst zurückzuführen ist, kann daher also nicht ausgeschlossen werden, dass insbesondere einwandernde Entzündungszellen für die *traf6*-Expression verantwortlich sind. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass bei den Wildtypmäusen höhere *traf6*-Expressionen als bei den *mdx*-Mäusen gemessen werden konnten.

## Diskussion

Daher soll durch momentan in unserem Labor geplante *in situ*-Hybridisierungs-Versuche und immunhistochemische Studien untersucht werden, welche Zelltypen im Skelett- und Herzmuskelgewebe *traf6* exprimieren.

Weiterhin werden die Ergebnisse momentan mit einer größeren Kohorte von Tieren reproduziert.

### **4.1.2 Eine Infektion mit Coxsackievirus B3 (CVB3) kann eine starke Induktion der *traf6*-Expression im Herzmuskelgewebe zur Folge haben**

Als *in vivo*-Untersuchungsmodell für eine degenerativ-regenerative Herzmuskelerkrankung wurde im Rahmen dieser Arbeit die CVB3-induzierte inflammatorische Kardiomyopathie untersucht. Diese Untersuchungen könnten von großem klinischem Interesse sein, da CVB3 der häufigste Erreger einer viralen Myokarditis ist. Vor allem bei Säuglingen führt die akute Virusmyokarditis bei über der Hälfte aller Erkrankten zum Tode (Kandolf und Hofschneider, 1989; Woodruff, 1980). Eine inflammatorische Kardiomyopathie kann bei 4% der CVB3-infizierten Patienten beobachtet werden und bei einem Viertel aller Patienten in den westlichen Ländern mit einer inflammatorische Kardiomyopathie geht diese auf eine Infektion mit CVB3 zurück (Kim et al., 2001).

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen zur CVB3-Infektion muriner Herzen wurden zwei verschiedene Mäusestämme untersucht. Während der Stamm A.BY/SnJ auf eine Infektion mit CVB3 fast immer mit einer Myokarditis reagiert, entwickelt der zweite Stamm (C57BL/6) nur bei 1% der Infektionen eine Myokarditis.

Die zehn untersuchten Tiere des Stammes A.BY/SnJ, die mit CVB3 infiziert worden waren, zeigten dabei eine deutlich stärkere *traf6*-Expression als die entsprechenden Kontrolltiere. Bei den Tieren des Stammes C57BL/6 konnte kein Unterschied zwischen infizierten Mäusen und den Kontrolltieren festgestellt werden.

## Diskussion

Vor dem Hintergrund des höheren myokarditischen Potentials von CVB3 bei den Mäusen des Stammes A.BY/SnJ könnte die erhöhte *traf6*-Expression mit dem Auftreten einer Virusmyokarditis assoziiert zu sein.

An Hand der bisher vorliegenden Daten kann jedoch – ähnlich wie bei den im vorangehenden Abschnitt beschriebenen *mdx*-Mäusen - nicht festgestellt werden, welche Zelltypen im Herzmuskelgewebe tatsächlich *traf6* exprimieren. Auch hier könnten primär eingewanderte Entzündungszellen und nicht die Kardiomyozyten selbst für die *traf6*-Expression verantwortlich sein. Auch hier soll mittels *in situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie untersucht werden, welche Zelltypen innerhalb des Herzmuskelgewebes für die bei den infizierten Mäuse des Stammes A.BY/SnJ beobachtete erhöhte *traf6*-Expression verantwortlich sind.

Schließlich könnte TRAF6 im infizierten Herzmuskelgewebe auch als Immunmodulator wirken: Es wurde bereits darauf eingegangen, dass dieser Faktor wesentliche Funktionen der angeborenen und erworbenen Immunität reguliert und TRAF6-defiziente Mäuse eine fehlerhafte B- und T-Zell- sowie Lymphknoten-Entwicklung aufweisen (Naito et al., 2002; Inoue et al., 2000). Auf der anderen Seite bewirkt die durch CVB3 hervorgerufene Entzündung des Myokards eine T- und B-Zell-vermittelte Immunantwort. Da nicht nur der Herzmuskel, sondern auch T- und B-Zellen ein Reservoir für das Virus darstellen, nimmt man an, dass dies zu einer Fehlregulation der Immunantwort führt (Klingel et al., 1996; Kim et al., 2001).

TRAF6 ist außerdem für die Entwicklung dendritischer Zellen und dadurch für die Aktivierung der T-Zellen zuständig, und reguliert somit die Immunantwort (Kobayashi et al., 2003; Inoue et al., 2007; Inoue et al., 2000; Thomas, 2005).

Hinzu kommt, dass schon seit längerem die Frage diskutiert wird, ob eine Autoimmunreaktion, die durch Coxsackieviren im Myokard ausgelöst wird, letztendlich für den Untergang der Muskelzellen mitverantwortlich ist (Dorner et al., 2005; Kallwellis-Opara et al., 2007). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass der TRAF6- NF- $\kappa$ B –*Pathway* nicht nur bei Entzündungsreaktionen, sondern auch bei Autoimmunreaktionen eine Rolle spielt. Dabei wird allerdings angenommen, dass ein Ausfall, nicht eine Aktivierung des TRAF6- NF- $\kappa$ B –*Pathway* Autoimmunreaktionen bedingt (Thomas, 2005).

## Diskussion

Wie häufig in diesem Tiermodell beobachtet, zeigten sich auch bei unserer Studie große interindividuelle Unterschiede. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Intensität der *traf6*-Expression zwischen den einzelnen Individuen derselben Versuchsgruppe zum Teil deutlich unterschied, wird es daher erforderlich sein, die Ergebnisse mit einer unabhängigen und größeren Kohorte von Tieren zu reproduzieren. Ebenso wäre es interessant, histologische Studien durchzuführen, um festzustellen, ob sich das *traf6*-Expressionsmuster mit der Histologie der entsprechenden individuellen Herzmuskelpräparate korrelieren lässt.

## **4.2 Untersuchung zur *traf6*-Genexpression nach Induktion der Skelettmuskelzellendifferenzierung**

### **4.2.1 C2C12- und C2F3-Zellen unterscheiden sich bezüglich ihrer *traf6*-Expression während des Differenzierungsprozesses**

Der deutlich abgemilderte Verlauf der Muskeldystrophie bei der *mdx*-Maus im Vergleich zur entsprechenden Erkrankung des Menschen beruht auf der Fähigkeit, entzündliches Muskelgewebe sehr effektiv zu regenerieren. Wie bereits erwähnt, wird die Regeneration der Muskeln der *mdx*-Maus durch Satellitenzellen (Myoblasten) bewirkt. Somit stellt die *mdx*-Maus ein *in vivo*-Modell der Skelettmuskeldifferenzierung dar (Seale und Rudnicki, 2000; Bischoff und Heintz, 1994).

Um der Frage nachzugehen, ob eine differentielle Expression des *traf6*-Gens generell bei der Skelettmuskeldifferenzierung zu beobachten ist, wurden murine Myoblasten der Zelllinien C2F3 und C2C12 *in vitro* differenziert und die Expression des *traf6*-Gens im Differenzierungsverlauf analysiert.

Die murine Zelllinie C2F3 ist eine klonale Variante der Zelllinie C2C12, die weniger effizient und langsamer als diese differenziert. Die in dieser Arbeit untersuchte Expression des *traf6*-Gens nach Induktion des Differenzierungsprozesses unterschied

## Diskussion

sich bei den beiden Zelllinien deutlich: Während die Basalexpression in Proliferationsmedium noch ungefähr gleich stark ausfiel, beobachtete man bei den C2C12-Zellen bereits einen Tag nach Induktion der Differenzierung eine deutliche Abnahme der *traf6*-Expression. Im Gegensatz dazu nahm die *traf6*-Expression bei den C2F3-Zellen deutlich langsamer ab.

Die Tatsache, dass die *traf6*-Expression bei den C2C12-Zellen nach Induktion der Differenzierung stärker abnahm, lässt vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen *traf6*-Repression nach Induktion der Differenzierung und Differenzierungskompetenz der entsprechenden Myoblasten-Zelllinie geben könnte.

Um diese Vermutung zu untermauern, sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit – wie im nächsten Abschnitt beschrieben - die *traf6*-Expression in Myoblasten mit sehr geringem Differenzierungspotential, den sogenannten Rhabdomyosarkomzellen, analysiert werden.

### **4.2.2 Bei RD/18-Zellen wird *traf6* nach Induktion der Differenzierung kaum reprimiert**

Unter 4.2.1 wurde der vermutete Zusammenhang zwischen *traf6*-Repression und Differenzierungskompetenz entsprechender Myoblasten-Zelllinien erläutert. Im nächsten Abschnitt soll daher das *traf6*-Expressionsmuster von Rhabdomyosarkomzellen, welche sich bekanntermaßen durch ein geringes Differenzierungspotential auszeichnen, diskutiert werden (Merlino und Helman, 1999).

Die hier untersuchte RD/18-Zelllinie entstammt einem humanen Rhabdomyosarkom vom embryonalen Typus. Die Zellen besitzen noch die Fähigkeit, initiale Schritte des myogenen Differenzierungsprogrammes zu durchlaufen. Dabei sind sie noch in der Lage, geringe Mengen an funktionellem MyoD und auch anderen myogenen Transkriptionsfaktoren zu produzieren. Allerdings werden viele Gene, die mit dem myogenen Differenzierungsprozess in Zusammenhang stehen, von diesen Zellen nicht oder in einer von normalen Myoblasten abweichenden Manier exprimiert, was wohl ihr geringeres Differenzierungspotential erklärt und mit ihrer Malignität einhergeht (Astolfi et al., 2001; Lollini et al., 1991).

## Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass bei RD/18-Zellen wie bei nichttransformierten Myoblasten bereits einen Tag nach Induktion der Differenzierung die *traf6*-Expression reprimiert wird. Allerdings konnte – im Gegensatz zu normalen Myoblasten - nach zwei und vier Tagen keine weitere Repression der *traf6*-Expression beobachtet werden.

Die ermittelte geringe Repression des *traf6*-Gens nach Induktion der Differenzierung könnte somit mit dem verringerten Differenzierungspotential der RD/18-Zellen assoziiert sein.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen konnte, dass in differenzierenden Rhabdomyosarkomzellen die Expression eines für ein anderes zytoplasmatisches TNFR-Adaptorprotein kodierenden Gens, nämlich des *rip2*-Gens, induziert und nicht - wie in normalen Myoblasten – reprimiert wird. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund bemerkenswert, dass eine Repression der *rip2*-Expression für die Skelettmuskelzellendifferenzierung unerlässlich ist (Munz et al., 2002). Kürzlich konnten wir darüber hinaus zeigen, dass RD/18-Zellen besser differenzieren, wenn man ihre *rip2*-Genexpression mit spezifischer siRNA hemmt (Ehlers et al., 2007).

Vor diesem Hintergrund und in Anbetracht der im vorangehenden Abschnitt diskutierten Zusammenhänge ist es möglich, dass, wie bereits für *rip2* festgestellt werden konnte, eine Repression der *traf6*-Genexpression für die Skelettmuskeldifferenzierung unerlässlich ist.

Dabei scheinen allerdings die Expressionskinetiken des *rip2*- und des *traf6*-Gens nach Induktion der Differenzierung unterschiedlich zu sein:

Während *rip2* in normalen Myoblasten bereits einen Tag nach Induktion der Differenzierung fast vollständig reprimiert wird (Ehlers et al., 2007), ist die Abnahme der *traf6*-Expression langsamer, aber stetig. Nach ungefähr vier Tagen war eine Expression von *traf6* fast nicht mehr nachweisbar.

In Rhabdomyosarkomzellen waren die Unterschiede bezüglich der Expressionskinetiken von *rip2* und *traf6* noch deutlicher: Wie bereits erwähnt, wird *rip2* interessanterweise hier während des Differenzierungsprozesses sogar induziert (Munz et al., 2002). Eine Repression des *traf6*-Gens war dagegen auch in

## Diskussion

differenzierenden Rhabdomyosarkomzellen bereits am ersten Tage nach Induktion der Differenzierung zu erkennen, wenngleich zu späteren Zeitpunkten – im Gegensatz zu normalen Myoblasten – keine weitere Abnahme der *traf6*-Expression mehr zu verzeichnen war.

An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass sich RD-Zellen trotz desselben Ursprungs mit murinen Myoblasten-Zelllinien nur bedingt vergleichen lassen. Es existiert keine nichttransformierte Kontrolle des gleichen Donors, so dass hier ein Vergleich der RD/18-Zellen mit ihrer klonalen Variante RD/12 sinnvoll wäre. RD/12-Zellen weisen ein noch geringeres Differenzierungspotential als RD/18-Zellen auf. Sie exprimieren in hohem Maße Marker der frühen myogenen Differenzierung, was als Hinweis dafür gilt, dass sie auf einer frühen Stufe des Differenzierungsprozesses verharren. Vor allem die Tatsache, dass RD/12-Zellen im Vergleich zu RD/18-Zellen eine wesentlich geringere Expression des für den essentiellen myogenen Transkriptionsfaktor Myogenin kodierenden Gens zeigen, weisen auf das höhere Differenzierungspotentials der RD/18-Zellen hin (Astolfi et al., 2001).

Vor diesem Hintergrund könnte man, durch in unserem Labor bereits geplante Versuche, weitere Hinweise erlangen, dass bei Rhabdomyosarkomzellen, wie bei normalen Myoblasten, das *traf6*-Expressionsmuster mit dem Differenzierungspotential korreliert.

### **4.3 Eine Hemmung der *traf6*-Expression hat Einfluss auf das Proliferations und Differenzierungsverhalten von C2C12- und RD/18-Zellen**

#### **4.3.1 Eine Hemmung der *traf6*-Expression hemmt die Proliferation von C2C12- und RD/18-Zellen**

Aufgrund der Tatsache, dass Rhabdomyosarkomzellen im Gegensatz zu normalen Myoblasten nur eine geringfügige Hemmung der *traf6*-Expression nach Induktion der Differenzierung zeigten, ergab sich die Vermutung, dass die Repression des *traf6*-Gens

## Diskussion

allgemein mit dem Differenzierungspotential von Myoblasten korreliert sein könnte, möglicherweise im Zusammenhang mit einem proliferationsfördernden Effekt von TRAF6. Diese Frage stellte sich besonders vor dem Hintergrund, dass in unserem Labor bereits gezeigt werden konnte, dass RIP2 eine physiologische Rolle bei der Regulation der Myoblastenproliferation und –differenzierung spielt. So konnten wir zeigen, dass eine Überexpression des *rip2*-Gens in Myoblasten eine starke Hemmung der Differenzierung dieser Zellen zur Folge hatte, während umgekehrt eine Hemmung der *rip2*-Expression mittels spezifischer siRNAs eine verringerte Proliferationsrate und bessere Differenzierung sowohl von C2C12- als auch von RD/18-Zellen bewirkte (Munz et al., 2002; Ehlers et al., 2007).

Um daher zunächst der Frage nachzugehen, welche Wirkung die Beeinflussung der *traf6*-Genexpression auf das Proliferationsverhalten von normalen Myoblasten und von RD-Zellen hat, wurden C2C12- und RD/18-Zellen nach Behandlung mit *traf6*-spezifischer siRNA einer BrdU-Proliferationsanalyse unterzogen. Dabei wird in die Zellen, die sich innerhalb des Beobachtungszeitraums geteilt haben, anstelle des regulären Nukleosids Thymidin BrdU in das zelluläre Genom eingebaut. BrdU-markierten Kerne können dann mittels spezifischer Antikörper markiert und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Um die Proliferationsrate zu bestimmen wird die Zahl der markierten Kerne dann in Relation zur Gesamtzellzahl der Zellkerne (DAPI-Färbung) gesetzt.

Hierbei wurde in Proliferationsmedium sowohl für siRNA-behandelte C2C12- als auch für RD/18-Zellen eine deutliche Reduktion der Proliferationsrate gegenüber den mit *scrambled*-siRNA behandelten Zellen festgestellt. In Differenzierungsmedium ließ sich ebenfalls bei beiden Zelllinien eine Reduktion der Proliferationsrate verzeichnen, jedoch fiel diese bei den C2C12-Zellen geringer aus als bei den RD/18-Zellen. Diese Beobachtung spricht dafür, dass sich durch Hemmung der *traf6*-Expression tatsächlich eine Verringerung der myoblastären Proliferationsrate erzielen lässt.

Ein Grund hierfür könnte die Tatsache sein, dass durch TRAF6 proliferationsfördernde Faktoren aktiviert werden. Hier wäre besonders NF- $\kappa$ B als Aktivator der *cyclinD1*-Expression zu nennen (Guttridge et al., 1999). CyclinD1 bewirkt eine Aktivierung Cyclin-abhängiger Kinasen, was letztendlich den Übergang von der G1-Phase zur S-Phase des Zellzyklus vermittelt. CyclinD1 ist somit ein Stimulator der Zellproliferation (Guttridge et al., 1999).

## Diskussion

Wie bereits erwähnt, konnte unsere Arbeitsgruppe bereits in einer früheren Studie zeigen, dass sich auch durch eine Hemmung der *rip2*-Expression mittels spezifischer siRNAs die Proliferationsrate von C2C12- und RD/18-Zellen deutlich reduzieren lässt (Ehlers et al., 2007). Dabei liegt aufgrund der Tatsache, dass *rip2* in RD-Zellen nach Induktion der Differenzierung nicht reprimiert, sondern sogar induziert wird, die Hypothese nahe, dass die Hemmung der *rip2*-Expression in differenzierenden Zellen zu einer verringerten RIP2-vermittelten Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt. Da auch TRAF6 an der Aktivierung von NF- $\kappa$ B beteiligt ist, könnte auch eine Hemmung der *traf6*-Expression mit einer geringeren NF- $\kappa$ B-Aktivität einhergehen.

Wie oben bereits kurz dargestellt, werden in normalen proliferierenden Myoblasten deutlich höhere NF- $\kappa$ B-Aktivitäten gemessen als in differenzierenden Myoblasten (Guttridge et al., 1999). Durch die Annahme einer TRAF6-vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung lässt sich somit erklären, wieso bei C2C12-Zellen in Proliferationsmedium durch die Behandlung mit *traf6*-spezifischer siRNA deutlichere Effekte zu erzielen waren als in Differenzierungsmedium. Die insgesamt höhere NF- $\kappa$ B-Aktivität in Proliferationsmedium bewirkt in diesen Zellen eine Hemmung differenzierungsassoziierter Gene wie *MyoD*. In Versuchen mit proliferierenden Myoblasten konnte nachgewiesen werden, dass für die Hemmung von *MyoD* die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch das Zytokin TNF- $\alpha$  ausreichend ist (Guttridge et al., 1999). Dieses Zytokin, welches bekanntermaßen die Muskelzellendifferenzierung hemmen kann (Miller et al., 1988; Langen et al., 2001) vermag auch indirekt TRAF6 zu aktivieren (Thomas, 2005).

Es ist daher anzunehmen, dass die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Myoblasten zumindest teilweise über TRAF6 vermittelt wird. Da bereits bekannt ist, dass eine Inaktivierung von NF- $\kappa$ B den Differenzierungsprozess fördert, ist es somit nahe liegend, dass die Repression der *traf6*-Genexpression durch eine siRNA-Behandlung im Zusammenhang mit der Förderung myogener Differenzierungsprozesse steht.

Desweiteren ist bekannt, dass auch RIP2 NF- $\kappa$ B aktivieren kann (Inohara et al., 1998; McCarthy et al., 1998; Thome et al., 1998) Dies ist vor dem Hintergrund interessant, dass nachgewiesen werden konnte, dass RIP2 dabei unter anderem mit dem TRAF6-Protein interagiert (McCarthy et al., 1998). So konnten wir auch bei Versuchen mit *rip2*-spezifischer siRNA zeigen, dass die Hemmung der *rip2*-Genexpression mit der

## Diskussion

Reduzierung der Proliferationsrate und der Förderung von Differenzierungsprozessen assoziiert ist (Ehlers et al., 2007). Darauf aufbauend stellte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Frage, ob auch über eine Hemmung der *traf6*-Expression das Differenzierungsverhalten von Myoblasten moduliert werden kann.

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Experimente durchgeführt, in denen das Differenzierungsverhalten von C2C12- und RD/18-Zellen nach Hemmung der *traf6*-Genexpression näher charakterisiert werden sollte. In *Northern Blot*-Versuchen wurde daher die Expression von Markern der myoblastären Differenzierung analysiert. Hierbei stand der Gedanke im Vordergrund, dass sich - falls sich der Zusammenhang zwischen Repression der *traf6*-Expression und einem besseren Differenzierungsverhalten von Muskelzellen, insbesondere von Rhabdomyosarkomzellen, bestätigen sollte - TRAF6 als bedeutendes Target bei der Therapie von Rhabdomyosarkomen herauskristallisiert.

### **4.3.2 Eine Hemmung der *traf6*-Expression beeinflusst die Expression myogener Differenzierungsmarker**

Um das Differenzierungsverhalten von C2C12- und RD/18-Zellen nach einer Hemmung der *traf6*-Genexpression durch spezifische siRNAs analysieren zu können, wurde das Expressionsmuster des myogenen Differenzierungsmarkers *skNAC* mittels *Northern Blot*-Studien untersucht. *skNAC* ist eine muskelspezifische Variante des Translationsregulators  $\alpha$ NAC, die man im Herzen und der Skelettmuskulatur findet (Yotov und St.-Arnaud, 1996). *skNAC* ist in proliferierenden Myoblasten nicht exprimiert und erreicht sein maximales Expressionsniveau etwa 24 Stunden nach der Induktion der Muskeldifferenzierung. Somit kann dieses Gen als Marker der Differenzierung in den verwendeten Zellkultursystemen dienen (Munz et al., 1999).

In C2C12-Zellen wurde das *rip2*-Gen als weiterer Marker der myoblastären Differenzierung analysiert. RIP2 ist, wie oben bereits kurz dargestellt, wie TRAF6 ein zytoplasmatisches Adaptorprotein von Rezeptoren der TNFR-Familie. RIP2 spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proliferations- und Differenzierungsprozessen in der Skelettmuskulatur: Unsere Arbeitsgruppe konnte

## Diskussion

nachweisen, dass die Expression von *rip2* während der myogenen Differenzierung reprimiert wird. Eine Überexpression des *rip2*-Gens in Myoblasten führt zu einer starken Hemmung der Differenzierung, während umgekehrt eine Hemmung der *rip2*-Expression mittels spezifischer siRNAs eine verringerte Proliferationsrate und eine gesteigerte Differenzierung der Zellen bewirkt (Munz et al., 2002; Ehlers et al., 2007).

Daher bot sich eine Analyse der *rip2*-Expression als Marker für die myogene Differenzierung im Verlauf dieser Arbeit an.

Vor diesem Hintergrund, und im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus der *traf6*-Expressionskinetik und der BrdU-Proliferationsanalyse, war es erstaunlich, dass eine Hemmung der *traf6*-Genexpression durch eine spezifische siRNA eine Repression der *skNAC*-Expression und eine Induktion des *rip2*-Gens zur Folge hatte. Nachdem unter 4.3.1 aufgeführt wurde, dass es einen Zusammenhang zwischen *traf6*-Repression und Verringerung der Proliferationsrate zu geben scheint, und ebenso gezeigt werden konnte, dass in normalen Myoblasten *traf6* während des Differenzierungsprozesses reprimiert wird, hätte man eine gegenläufigen Regulation der Differenzierungsmarker erwartet.

Das RIP2-Protein wird als *cell death-inducing kinase* angesehen. Dabei wird die Beteiligung von RIP2 an apoptotischen Prozessen beschrieben (McCarthy et al., 1998; Meylan et al., 2005). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von TRAF6 – und von TRAF2 und TRAF5 - apoptotische Prozesse auslösen kann (Duckett und Thompson, 1997). Die Behandlung mit einer *traf6*-spezifischen-siRNA könnte nun Apoptose ausgelöst haben, was zu einer Induktion der *rip2*-Expression geführt haben könnte. Dabei könnten Proliferations- aber auch Differenzierungsprozesse inhibiert worden sein. Dies würde die unter 4.3.1 diskutierten Ergebnisse zur Rolle von TRAF6 bei der Regulation der Myoblastenproliferation untermauern. Ebenso könnte nach der siRNA-Behandlung die Differenzierung langsamer oder nicht mehr ablaufen. Somit könnte es – wie oben beschrieben - zu einer Abnahme der *skNAC*-Expression gekommen sein.

Vor diesem Hintergrund ist es interessant, dass Untersuchungen mit siRNAs zeigten, dass diese – unabhängig von ihrer Sequenz - eine Immunantwort über den TLR induzieren können. Dabei kann es auch zu einer Steigerung der IL-8-, IFN- $\alpha$ - und

## Diskussion

TNF- $\alpha$ -Produktion in den behandelten Zellen kommen, was unter anderem zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B-Promotoren führt. Ebenso wird eine sequenzunabhängige allgemeine Unterdrückung der Genexpression beobachtet (Kariko et al., 2004a; Kariko et al., 2004b).

Eventuell könnte also diese Induktion proinflammatorischer Zytokine durch siRNAs über den TLR die Expression von *rip2* induzieren und somit zu der beschriebenen Steigerung der Aktivität von NF- $\kappa$ B führen. Allerdings hätten man dann bei den Zellen, die mit einer *scrambled* siRNA behandelt worden waren, ebenso eine Induktion der *rip2*-Expression beobachten müssen.

Die Untersuchungen von Kariko et al. werden an dieser Stelle deshalb erwähnt, um deutlich zu machen, dass es bis heute noch nicht abzuschätzen ist, welche verschiedenen unspezifischen Wirkungen eine siRNA-Behandlung auf bestimmte Zelllinien ausüben kann.

Dies war auch einer der Gründe, wieso sich – wie nachfolgend beschrieben - Versuche anschlossen, bei denen eine direkte Hemmung des TRAF6-Effektors NF- $\kappa$ B mittels niedermolekularer Substanzen durchgeführt wurde, um dann insbesondere das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Rhabdomyosarkomzellen zu analysieren und mit dem von normalen Myoblasten zu vergleichen.

### **4.3.3 Eine Hemmung des TRAF6-Effektors NF- $\kappa$ B bewirkt in C2C12- und RD/18-Zellen eine Induktion der *p21*-Expression**

TRAF6 ist ein bekannter Aktivator des Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Deng et al., 2000; Thomas, 2005). Es wurde bereits erwähnt, dass höhere NF- $\kappa$ B-Aktivitäten eine Hemmung differenzierungsassoziierter Gene wie *MyoD* bewirken können und in normalen proliferierenden Myoblasten deutlich höhere NF- $\kappa$ B-Aktivitäten gemessen werden als in differenzierenden Myoblasten (Guttridge et al., 1999). Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität einen vergleichbaren Effekt auf das Proliferations- und

## Diskussion

Differenzierungsverhalten von Myoblasten hat wie eine Hemmung der *traf6*-Genexpression.

Als Marker für Proliferation und Differenzierung wurde die Expression des *p21*-Gens analysiert. Die Induktion des *p21*-Gens hat einen Austritt aus dem Zellzyklus durch Inhibition von CDK-Komplexen zur Folge (Xiong et al., 1993). Dies ist beim Übergang von der Proliferations- zur Differenzierungsphase der Skelettmuskelzelle unerlässlich. In Skelettmuskelzellen wird *p21* 24 Stunden nach Induktion der Differenzierung stark induziert und kann somit als Marker für Proliferation und Differenzierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien dienen (Moran et al., 2002; Halevy et al., 1995).

In dieser Arbeit wurden proliferierende und differenzierende C2C12- und RD/18-Zellen mit Lactacystin behandelt. Lactacystin ist ein bekannter Proteasom-Inhibitor. Er entfaltet seine Wirkung durch Hemmung der proteolytischen Degradation des NF- $\kappa$ B-Inhibitorproteins I $\kappa$ B, woraus eine persistierende Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung resultiert. Lactacystin kann daher als potenter Inhibitor des TRAF6-Effektors NF- $\kappa$ B angesehen werden (Shirley et al., 2005).

Sowohl C2C12- als auch RD/18-Zellen zeigten nach einer Behandlung mit Lactacystin eine starke Induktion der *p21*-Expression, also eines Gens, das mit einem Ausscheiden aus dem Zellzyklus und mit dem Eintritt in die Differenzierungsphase assoziiert ist. In der Literatur wurde zudem beschrieben, dass eine Lactacystin-Behandlung auch das für den myogenen Transkriptionsfaktor MyoD kodierende Gen aktiviert. Allerdings wurde beobachtet, dass sowohl C2C12-Zellen, als auch RD/18-Zellen eine veränderte, unvollständige Skelettmuskeldifferenzierung durchlaufen, wenn sie mit Lactacystin behandelt wurden (Mugita et al., 1999).

Trotzdem ist MyoD nachweislich sowohl für Muskeldifferenzierungs- als auch für Regenerationsprozesse von großer Bedeutung (Guttridge et al., 2000). Bekannt ist auch, dass die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Muskelzellen auf posttranskriptioneller Ebene die Expression von *MyoD* hemmt. Wie bereits oben erwähnt, bewirkt die Behandlung mit Lactacystin – und die damit verbundene Hemmung von NF- $\kappa$ B – eine Aktivierung von *MyoD*.

Da eine Lactacystin-Behandlung bei beiden in dieser Arbeit verwendeten Myoblasten-Zelllinien eine Repression der *traf6*-Expression bewirkte, wäre es denkbar,

## Diskussion

dass auch die TRAF6-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B abnehmen könnte. Durch die oben erklärten Zusammenhänge würde daraus eine verringerte hemmende Wirkung auf *MyoD* und somit eine positive Wirkung auf die Skelettmuskeldifferenzierung resultieren. Hierin könnte auch der Grund für den unter 4.2 aufgeführten Zusammenhang zwischen Repression der *traf6*-Expression und Differenzierungskompetenz der untersuchten Zelllinien liegen.

In der Literatur wird Lactacystin als potenter selektiver Proteasominhibitor beschrieben (Pasquini et al., 2000; Kim et al., 1998). Die Tatsache, dass sich durch Lactacystin die proteolytischen Degradation des NF- $\kappa$ B-Inhibitorproteins I $\kappa$ B hemmen lässt und dadurch die Freisetzung und Aktivierung von NF- $\kappa$ B verhindert wird, macht Lactacystin allerdings noch nicht zu einem selektiven NF- $\kappa$ B-Inhibitor. Auch weitere physiologische Vorgänge können durch diesen Proteasominhibitor beeinflusst werden (Li et al., 2006). Desweiteren werden in der Literatur unterschiedliche Wirkungen von Lactacystin beschrieben, sodass man davon ausgehen kann, dass Lactacystin zelltypabhängige Antworten zeigt (Nemeth et al., 2004).

Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität von NF- $\kappa$ B zu beeinflussen, ist die Behandlung der Zellen mit Curcumin. Bei Curcumin handelt es sich um eines der Curcuminoide aus *Curcuma longa* (Gelbwurz), einer Zingiberaceae (Ingwergewächs). Curcumin ist ein sekundärer Pflanzeninhaltsstoff, der die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu hemmen vermag. Dies geschieht durch Hemmung des IKK und die dadurch ausbleibende Phosphorylierung von I $\kappa$ B. I $\kappa$ B wird nicht degradiert und gibt deswegen kein NF- $\kappa$ B mehr frei (Pan et al., 2000; Aggarwal, 2004; Thaloor et al., 1999).

Da in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden konnte, dass durch Curcumin die Expression des *traf6*-Gens in C2C12- und RD/18-Zellen gehemmt werden konnte, wird die Annahme untermauert, dass die Repression der *traf6*-Expression ein entscheidender Schritt für die Skelettmuskelzellendifferenzierung ist:

Somit konnte in C2C12- und RD/18-Zellen sowohl durch die Lactacystin- als auch durch die Curcumin-Behandlung die Expression des *traf6*-Gens gehemmt werden. Dies sind Hinweise dafür, dass die Expression von *traf6* in beiden Zelllinien direkt oder indirekt über einen NF- $\kappa$ B-abhängigen Signaltransduktionsweg kontrolliert wird.

## Diskussion

Ebenso wie die Behandlung mit Lactacystin hatte die Behandlung von proliferierenden und differenzierenden C2C12-Zellen mit Curcumin eine Induktion der *p21*-Expression zur Folge. Die Expression des *p21*-Gens ist mit dem Ausscheiden aus dem Zellzyklus und mit dem Eintritt in die Differenzierungsphase assoziiert. Dies passt zu den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen, dass Curcumin die Regeneration von Skelettmuskelzellen fördert (Thaloor et al., 1999). Die Prozesse bis zum so entstandene neue Muskelgewebe ähneln dabei mechanistisch den Vorgängen der Skelettmuskeldifferenzierung im Embryo. Einkernige Myoblasten (Satellitenzellen) werden aktiviert. Durch Modulation von Proliferations- und Differenzierungsprozessen verschmelzen die Myoblasten mit anderen Satellitenzellen und vorhandenen Muskelfasern (Seale und Rudnicki, 2000; Bischoff und Heintz, 1994). Somit kann vermutet werden, dass durch die Curcumin-Behandlung der Myoblasten und die damit verbundene Repression des *traf6*-Gens und Induktion der *p21*-Expression mit der Förderung von Differenzierungsprozessen assoziiert ist.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass auch die Hemmung der Aktivität von NF- $\kappa$ B einen Effekt auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Myoblasten ausübt. Somit konnte festgestellt werden, dass nicht nur TRAF6, sondern auch sein Effektor NF- $\kappa$ B eine Rolle bei Proliferations- und Differenzierungsprozessen der Skelettmuskulatur spielt.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Regulation der Proliferation und Differenzierung von Muskelzellen ist ein komplexer und hoch organisierter Prozess, durch den während der Embryonalentwicklung die Entwicklung des Muskelgewebes kontrolliert wird. Wachstumsfaktoren, myogene Regulationsfaktoren und andere Faktoren wie Signaltransduktionsproteine nehmen direkt oder indirekt Einfluss auf diese Prozesse und steuern somit die Entwicklung und Regeneration von Muskelzellen.

Über eine mögliche Rolle des Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Adaptorproteins TRAF6 bei Proliferations- und Differenzierungsprozessen der Skelettmuskulatur war vor Beginn dieser Arbeit nichts bekannt gewesen. Die TRAFs gehören zu einer Familie von Adaptorproteinen, die ursprünglich aufgrund ihrer Beteiligung an der Signaltransduktion durch TNF-Rezeptoren identifiziert wurden. Heute weiß man, dass sie auch an weiteren Rezeptoren der TNFR-Familie bei der Signalweiterleitung eine Rolle spielen und sie an vielen physiologischen Prozessen beteiligt sind. So zeigen TRAF6-defiziente Mäuse nicht nur Defekte bei der ektodermalen Differenzierung sondern auch eine stark ausgeprägte Osteoporose durch fehlerhafte Osteoklastendifferenzierung. Desweiteren zeigten diese *knockout* Studien, dass TRAF6 bei Entzündungs- und Immunreaktionen und bei der Ausbildung des Immunsystems essentiell ist.

In dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster des *traf6*-Gens in verschiedenen Muskeltypen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen *in vivo* und *in vitro* untersucht.

Dabei lassen die *in vivo*-Daten einen Zusammenhang zwischen Repression der *traf6*-Expression und der Regeneration der Skelett- und Herzmuskulatur vermuten: Für diese Untersuchungen wurde die *mdx*-Maus als Tiermodell für die x-chromosomal rezessiv vererbte Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) gewählt. Der entsprechende genetische Defekt bewirkt einen Mangel an Dystrophin, woraus eine chronische Degeneration von Muskelgewebe resultiert. Aufgrund der effizienten Regenerationsfähigkeit von Muskelgewebe und der Tatsache, dass die Regeneration der Skelettmuskulatur durch *de novo*-Differenzierung von Satellitenzellen (Myoblasten) bewirkt wird, stellt die *mdx*-Maus ein *in vivo*-Modell der Skelettmuskeldifferenzierung

## Zusammenfassung

dar. Vor diesem Hintergrund scheint die beobachtete Repression des *traf6*-Gens in der Muskulatur der *mdx*-Maus mit dem Regenerationsprozess assoziiert zu sein.

Außerdem konnte bei Mäusen, die eine Prädisposition für eine Kardiomyopathie aufweisen, eine deutlich erhöhte *traf6*-Expression im Herzmuskel gemessen werden.

Weiterhin konnte an normalen Myoblasten gezeigt werden, dass während der Myoblastendifferenzierung eine Repression der *traf6*-Genexpression erfolgt. Durch verschiedene *in vitro*-Untersuchungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass das Differenzierungspotential von Myoblasten mit dem Grad der Repression der *traf6*-Expression nach Induktion der Differenzierung assoziiert ist. In darauf aufbauenden funktionellen Experimenten, in denen durch siRNA-Technik die Expression des *traf6*-Gens reduziert wurde, konnten die zuvor generierten Ergebnisse untermauert werden. So war nach Repression des *traf6*-Gens insbesondere die Proliferationsfähigkeit der untersuchten Myoblasten reduziert.

Die Analyse verschiedener Differenzierungsmarker nach *traf6* siRNA-Behandlung ergab demgegenüber teilweise divergierende Effekte. Daher muss die Rolle von TRAF6 bei der Myoblastendifferenzierung in weiterführenden Studien noch genauer analysiert werden.

Abschließend konnte nachgewiesen werden, dass auch die Hemmung der Aktivität des TRAF6-Effektors NF- $\kappa$ B durch verschiedene Wirkstoffe, das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der untersuchten Myoblasten-Zelllinien beeinflusst.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass TRAF6 eine fördernde Funktion bei der Regulation der Proliferation von Skelettmuskelzellen ausübt. Weitere Untersuchungen zur Rolle von TRAF6 bei Differenzierungsprozessen sollten die Vermutung untermauern, dass eine Repression des *traf6*-Gens für die Muskeldifferenzierung unerlässlich ist. Desweiteren konnten Hinweise erhalten werden, dass TRAF6 mit den komplexen Vorgängen der Skelettmuskelregeneration assoziiert ist.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1) Aggarwal, B. B. (2004):

Nuclear factor-kappaB: the enemy within.  
Cancer Cell 6(3). S. 203-8.

2) Aggarwal, B. B. und Shishodia, S. (2004):

Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning.  
Ann N Y Acad Sci 1030. S. 434-41.

3) Allen, R. E. und Boxhorn, L. K. (1989):

Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor.  
J Cell Physiol 138(2). S. 311-5.

4) Anderson, G. J., Tom, L. W., Womer, R. B., et al. (1990):

Rhabdomyosarcoma of the head and neck in children.  
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 116(4). S. 428-31.

5) Arch, R. H., Gedrich, R. W. und Thompson, C. B. (1998):

Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death.  
Genes Dev 12(18). S. 2821-30.

## Literaturverzeichnis

- 6) Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., et al. (1997):  
Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm.  
J Cell Sci 110 ( Pt 3). S. 369-78.
- 7) Astolfi, A., De Giovanni, C., Landuzzi, L., et al. (2001):  
Identification of new genes related to the myogenic differentiation arrest of human rhabdomyosarcoma cells.  
Gene 274(1-2). S. 139-49.
- 8) Baldwin, A. S., Jr. (1996):  
The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights.  
Annu Rev Immunol 14. S. 649-83.
- 9) Barr, F. G. (1997):  
Chromosomal translocations involving paired box transcription factors in human cancer.  
Int J Biochem Cell Biol 29(12). S. 1449-61.
- 10) Barr, F. G., Holick, J., Nycum, L., Biegel, J. A. und Emanuel, B. S. (1992):  
Localization of the t(2;13) breakpoint of alveolar rhabdomyosarcoma on a physical map of chromosome 2.  
Genomics 13(4). S. 1150-6.
- 11) Beg, A. A., Ruben, S. M., Scheinman, R. I., et al. (1992):  
I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention.  
Genes Dev 6(10). S. 1899-913.

## Literaturverzeichnis

12) Bischoff, R. und Heintz, C. (1994):

Enhancement of skeletal muscle regeneration.

Dev Dyn 201(1). S. 41-54.

13) Black, B. L., Molkentin, J. D. und Olson, E. N. (1998):

Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2.

Mol Cell Biol 18(1). S. 69-77.

14) Bradley, J. R. und Pober, J. S. (2001):

Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs).

Oncogene 20(44). S. 6482-91.

15) Carlson, B. (2004):

Development of the body systems: Skeletal muscle

In: Human embryology and developmental biology. / Mosby (Hrsg.).

Philadelphia: Elsevier. - S. 195-204.

16) Connolly, A. M., Keeling, R. M., Mehta, S., Pestronk, A. und Sanes, J. R. (2001):

Three mouse models of muscular dystrophy: the natural history of strength and fatigue in dystrophin-, dystrophin/utrophin-, and laminin alpha2-deficient mice.

Neuromuscul Disord 11(8). S. 703-12.

## Literaturverzeichnis

17) Coolican, S. A., Samuel, D. S., Ewton, D. Z., McWade, F. J. und Florini, J. R. (1997):

The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways.

J Biol Chem 272(10). S. 6653-62.

18) Dagher, R. und Helman, L. (1999):

Rhabdomyosarcoma: an overview.

Oncologist 4(1). S. 34-44.

19) Deconinck, N. und Dan, B. (2007):

Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses.

Pediatr Neurol 36(1). S. 1-7.

20) Deng, L., Wang, C., Spencer, E., et al. (2000):

Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain.

Cell 103(2). S. 351-61.

21) Denli, A. M. und Hannon, G. J. (2003):

RNAi: an ever-growing puzzle.

Trends Biochem Sci 28(4). S. 196-201.

## Literaturverzeichnis

22) Dorner, A., Kallwellis-Opara, A., Pauschinger, M., Kuhl, U. und Schultheiss, H. P. (2005):

Cardiac autoantibodies in viral myocarditis.  
Heart Fail Clin 1(3). S. 333-43.

23) Duckett, C. S. und Thompson, C. B. (1997):

CD30-dependent degradation of TRAF2: implications for negative regulation of TRAF signaling and the control of cell survival.  
Genes Dev 11(21). S. 2810-21.

24) Ehlers, S., Mueck, T., Adams, S., et al. (2007):

RIP2 regulates growth and differentiation of normal myoblasts and of rhabdomyosarcoma cells.  
Eur J Cell Biol.

25) El-Badry, O. M., Minniti, C., Kohn, E. C., et al. (1990):

Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors.  
Cell Growth Differ 1(7). S. 325-31.

26) Endesfelder, S., Krahn, A., Kreuzer, K. A., et al. (2000):

Elevated p21 mRNA level in skeletal muscle of DMD patients and mdx mice indicates either an exhausted satellite cell pool or a higher p21 expression in dystrophin-deficient cells per se.  
J Mol Med 78(10). S. 569-74.

## Literaturverzeichnis

27) Epstein, J. A., Lam, P., Jepeal, L., Maas, R. L. und Shapiro, D. N. (1995):

Pax3 inhibits myogenic differentiation of cultured myoblast cells.

J Biol Chem 270(20). S. 11719-22.

28) Ernst, M. K., Dunn, L. L. und Rice, N. R. (1995):

The PEST-like sequence of I kappa B alpha is responsible for inhibition of DNA binding but not for cytoplasmic retention of c-Rel or RelA homodimers.

Mol Cell Biol 15(2). S. 872-82.

29) Finsterer, J. und Stollberger, C. (2003):

The heart in human dystrophinopathies.

Cardiology 99(1). S. 1-19.

30) Fredericks, W. J., Galili, N., Mukhopadhyay, S., et al. (1995):

The PAX3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas is a more potent transcriptional activator than PAX3.

Mol Cell Biol 15(3). S. 1522-35.

31) Galili, N., Davis, R. J., Fredericks, W. J., et al. (1993):

Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma.

Nat Genet 5(3). S. 230-5.

32) Greten, F. R. und Karin, M. (2004):

The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer.

Cancer Lett 206(2). S. 193-9.

## Literaturverzeichnis

33) Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G. und Baldwin, A. S., Jr. (1999):

NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1.

Mol Cell Biol 19(8). S. 5785-99.

34) Guttridge, D. C., Mayo, M. W., Madrid, L. V., Wang, C. Y. und Baldwin, A. S., Jr. (2000):

NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia.

Science 289(5488). S. 2363-6.

35) Halevy, O., Novitch, B. G., Spicer, D. B., et al. (1995):

Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD.

Science 267(5200). S. 1018-21.

36) Inohara, N., del Peso, L., Koseki, T., Chen, S. und Nunez, G. (1998):

RICK, a novel protein kinase containing a caspase recruitment domain, interacts with CLARP and regulates CD95-mediated apoptosis.

J Biol Chem 273(20). S. 12296-300.

37) Inoue, J., Gohda, J., Akiyama, T. und Semba, K. (2007):

NF-kappaB activation in development and progression of cancer.

Cancer Sci 98(3). S. 268-74.

## Literaturverzeichnis

- 38) Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., et al. (2000):  
Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling.  
Exp Cell Res 254(1). S. 14-24.
- 39) Inoue, J., Kerr, L. D., Rashid, D., et al. (1992):  
Direct association of pp40/I kappa B beta with rel/NF-kappa B transcription factors: role of ankyrin repeats in the inhibition of DNA binding activity.  
Proc Natl Acad Sci U S A 89(10). S. 4333-7.
- 40) Kalebic, T., Tsokos, M. und Helman, L. J. (1994):  
In vivo treatment with antibody against IGF-1 receptor suppresses growth of human rhabdomyosarcoma and down-regulates p34cdc2.  
Cancer Res 54(21). S. 5531-4.
- 41) Kallwellis-Opara, A., Dorner, A., Poller, W. C., et al. (2007):  
Autoimmunological features in inflammatory cardiomyopathy.  
Clin Res Cardiol 96(7). S. 469-80.
- 42) Kandolf, R. und Hofschneider, P. H. (1989):  
Viral heart disease.  
Springer Semin Immunopathol 11(1). S. 1-13.

## Literaturverzeichnis

- 43) Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J., et al. (2004a):  
Exogenous siRNA mediates sequence-independent gene suppression by signaling through toll-like receptor 3.  
Cells Tissues Organs 177(3). S. 132-8.
- 44) Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J. und Weissman, D. (2004b):  
Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3.  
J Immunol 172(11). S. 6545-9.
- 45) Kim, K. S., Hufnagel, G., Chapman, N. M. und Tracy, S. (2001):  
The group B coxsackieviruses and myocarditis.  
Rev Med Virol 11(6). S. 355-68.
- 46) Kim, S. S., Rhee, S., Lee, K. H., et al. (1998):  
Inhibitors of the proteasome block the myogenic differentiation of rat L6 myoblasts.  
FEBS Lett 433(1-2). S. 47-50.
- 47) Klingel, K., Stephan, S., Sauter, M., et al. (1996):  
Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets.  
J Virol 70(12). S. 8888-95.
- 48) Kobayashi, T., Walsh, P. T., Walsh, M. C., et al. (2003):  
TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development.  
Immunity 19(3). S. 353-63.

## Literaturverzeichnis

49) Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A. M. und Aggarwal, B. B. (2004):

Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease.

J Mol Med 82(7). S. 434-48.

50) Lagrota-Candido, J., Vasconcellos, R., Cavalcanti, M., et al. (2002):

Resolution of skeletal muscle inflammation in mdx dystrophic mouse is accompanied by increased immunoglobulin and interferon-gamma production.

Int J Exp Pathol 83(3). S. 121-32.

51) Langen, R. C., Schols, A. M., Kelders, M. C., Wouters, E. F. und Janssen-Heininger, Y. M. (2001):

Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB.

Faseb J 15(7). S. 1169-80.

52) Langen, R. C., Van Der Velden, J. L., Schols, A. M., et al. (2004):

Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization.

Faseb J 18(2). S. 227-37.

53) Luring, B., Sakai, H., Kreibich, G. und Wiedmann, M. (1995):

Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum.

Proc Natl Acad Sci U S A 92(12). S. 5411-5.

## Literaturverzeichnis

54) Lechner, C., Zahalka, M. A., Giot, J. F., Moller, N. P. und Ullrich, A. (1996):  
ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation.  
Proc Natl Acad Sci U S A 93(9). S. 4355-9.

55) Lee, N. K. und Lee, S. Y. (2002):  
Modulation of life and death by the tumor necrosis factor receptor-associated factors  
(TRAFs).  
J Biochem Mol Biol 35(1). S. 61-6.

56) Li, X., Huang, H. Y., Chen, J. G., et al. (2006):  
Lactacystin inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through induction of CHOP-10  
expression.  
Biochem Biophys Res Commun 350(1). S. 1-6.

57) Liu, A. X., Zhou, J. H., Jin, H. M., Zhu, C. K. und Cheng, X. D. (2007):  
Primary rhabdomyosarcoma of urethra in a 5-year-old girl: case report and literature  
review.  
Urology 69(6). S. 1208 e17-9.

58) Loh, W. E., Jr., Scrabble, H. J., Livanos, E., et al. (1992):  
Human chromosome 11 contains two different growth suppressor genes for embryonal  
rhabdomyosarcoma.  
Proc Natl Acad Sci U S A 89(5). S. 1755-9.

## Literaturverzeichnis

59) Lollini, P. L., De Giovanni, C., Landuzzi, L., et al. (1991):

Reduced metastatic ability of in vitro differentiated human rhabdomyosarcoma cells.

Invasion Metastasis 11(2). S. 116-24.

60) Mansouri, A. (1998):

The role of Pax3 and Pax7 in development and cancer.

Crit Rev Oncog 9(2). S. 141-9.

61) Mansouri, A., Goudreau, G. und Gruss, P. (1999):

Pax genes and their role in organogenesis.

Cancer Res 59(7 Suppl). S. 1707s-1709s; discussion 1709s-1710s.

62) Margue, C. M., Bernasconi, M., Barr, F. G. und Schafer, B. W. (2000):

Transcriptional modulation of the anti-apoptotic protein BCL-XL by the paired box transcription factors PAX3 and PAX3/FKHR.

Oncogene 19(25). S. 2921-9.

63) McCarthy, J. V., Ni, J. und Dixit, V. M. (1998):

RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase.

J Biol Chem 273(27). S. 16968-75.

64) Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., et al. (1998):

MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways.

Mol Cell 2(2). S. 253-8.

## Literaturverzeichnis

65) Mercurio, F. und Manning, A. M. (1999):

Multiple signals converging on NF-kappaB.

Curr Opin Cell Biol 11(2). S. 226-32.

66) Merlino, G. und Helman, L. J. (1999):

Rhabdomyosarcoma--working out the pathways.

Oncogene 18(38). S. 5340-8.

67) Messer, G. und Rupec, R. A. (2001):

[Nuclear factor kappa B (NF-kappa B). I. Function and regulation].

Hautarzt 52(7). S. 677-85.

68) Meylan, E. und Tschopp, J. (2005):

The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress.

Trends Biochem Sci 30(3). S. 151-9.

69) Milasincic, D. J., Calera, M. R., Farmer, S. R. und Pilch, P. F. (1996):

Stimulation of C2C12 myoblast growth by basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor 1 can occur via mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent pathways.

Mol Cell Biol 16(11). S. 5964-73.

## Literaturverzeichnis

70) Miller, S. C., Ito, H., Blau, H. M. und Torti, F. M. (1988):

Tumor necrosis factor inhibits human myogenesis in vitro.

Mol Cell Biol 8(6). S. 2295-301.

71) Molkenin, J. D., Black, B. L., Martin, J. F. und Olson, E. N. (1995):

Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins.

Cell 83(7). S. 1125-36.

72) Moran, J. L., Li, Y., Hill, A. A., Mounts, W. M. und Miller, C. P. (2002):

Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling.

Physiol Genomics 10(2). S. 103-11.

73) Moynagh, P. N. (2005):

The NF-kappaB pathway.

J Cell Sci 118(Pt 20). S. 4589-92.

74) Mugita, N., Honda, Y., Nakamura, H., et al. (1999):

The involvement of proteasome in myogenic differentiation of murine myocytes and human rhabdomyosarcoma cells.

Int J Mol Med 3(2). S. 127-37.

## Literaturverzeichnis

75) Munz, B., Hildt, E., Springer, M. L. und Blau, H. M. (2002):

RIP2, a checkpoint in myogenic differentiation.

Mol Cell Biol 22(16). S. 5879-86.

76) Munz, B., Wiedmann, M., Lochmuller, H. und Werner, S. (1999):

Cloning of novel injury-regulated genes. Implications for an important role of the muscle-specific protein skNAC in muscle repair.

J Biol Chem 274(19). S. 13305-10.

77) Naito, A., Yoshida, H., Nishioka, E., et al. (2002):

TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia.

Proc Natl Acad Sci U S A 99(13). S. 8766-71.

78) Nemeth, Z. H., Wong, H. R., Odoms, K., et al. (2004):

Proteasome inhibitors induce inhibitory kappa B (I kappa B) kinase activation, I kappa B alpha degradation, and nuclear factor kappa B activation in HT-29 cells.

Mol Pharmacol 65(2). S. 342-9.

79) Olwin, B. B., Bren-Mattison, Y., Cornelison, D. D. W., et al. (2002):

Role of cytokines in skeletal muscle growth and differentiation.

In: Stem cells and cell signalling in skeletal myogenesis. / D. A. Sassoon (Hrsg.).

New York: Elsevier. - S. 97-126.

## Literaturverzeichnis

80) Otten, A. D., Firpo, E. J., Gerber, A. N., et al. (1997):

Inactivation of MyoD-mediated expression of p21 in tumor cell lines.

Cell Growth Differ 8(11). S. 1151-60.

81) Palmer, C. M. und Rudnicki, M. A. (2002):

The myogenic regulatory factors.

In: Stem cells and cell signalling in skeletal myogenesis. / D. A. Sassoon (Hrsg.).

New York: Elsevier. - S. 1-32.

82) Pan, M. H., Lin-Shiau, S. Y. und Lin, J. K. (2000):

Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IkappaB kinase and NFkappaB activation in macrophages.

Biochem Pharmacol 60(11). S. 1665-76.

83) Partridge, T. (1991):

Animal models of muscular dystrophy--what can they teach us?

Neuropathol Appl Neurobiol 17(5). S. 353-63.

84) Pasquini, L. A., Besio Moreno, M., Adamo, A. M., Pasquini, J. M. und Soto, E. F. (2000):

Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis and activates caspase-3 in cultured cerebellar granule cells.

J Neurosci Res 59(5). S. 601-11.

## Literaturverzeichnis

85) Perera, F. P. (1996):

Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention.

J Natl Cancer Inst 88(8). S. 496-509.

86) Rosenthal, S. M. und Cheng, Z. Q. (1995):

Opposing early and late effects of insulin-like growth factor I on differentiation and the cell cycle regulatory retinoblastoma protein in skeletal myoblasts.

Proc Natl Acad Sci U S A 92(22). S. 10307-11.

87) Seale, P. und Rudnicki, M. A. (2000):

A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells.

Dev Biol 218(2). S. 115-24.

88) Sen, R. und Baltimore, D. (1986):

Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism.

Cell 47(6). S. 921-8.

89) Shirley, R. B., Kaddour-Djebbar, I., Patel, D. M., et al. (2005):

Combination of proteasomal inhibitors lactacystin and MG132 induced synergistic apoptosis in prostate cancer cells.

Neoplasia 7(12). S. 1104-11.

## Literaturverzeichnis

- 90) Stedman, H. H., Sweeney, H. L., Shrager, J. B., et al. (1991):  
The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy.  
Nature 352(6335). S. 536-9.
- 91) Sun, S. C. und Xiao, G. (2003):  
Deregulation of NF-kappaB and its upstream kinases in cancer.  
Cancer Metastasis Rev 22(4). S. 405-22.
- 92) Thaloor, D., Miller, K. J., Gephart, J., Mitchell, P. O. und Pavlath, G. K. (1999):  
Systemic administration of the NF-kappaB inhibitor curcumin stimulates muscle regeneration after traumatic injury.  
Am J Physiol 277(2 Pt 1). S. C320-9.
- 93) Thomas, R. (2005):  
The TRAF6-NF kappa B signaling pathway in autoimmunity: not just inflammation.  
Arthritis Res Ther 7(4). S. 170-3.
- 94) Thome, M., Hofmann, K., Burns, K., et al. (1998):  
Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1.  
Curr Biol 8(15). S. 885-8.
- 95) Venitt, S. (1994):  
Mechanisms of carcinogenesis and individual susceptibility to cancer.  
Clin Chem 40(7 Pt 2). S. 1421-5.

## Literaturverzeichnis

96) Weyman, C. M. und Wolfman, A. (1998):

Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) activity is required for inhibition of skeletal muscle differentiation by insulin-like growth factor 1 or fibroblast growth factor 2. *Endocrinology* 139(4). S. 1794-800.

97) Woodruff, J. F. (1980):

Viral myocarditis. A review.

*Am J Pathol* 101(2). S. 425-84.

98) Wu, H. und Arron, J. R. (2003):

TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology.

*Bioessays* 25(11). S. 1096-105.

99) Wu, Z., Woodring, P. J., Bhakta, K. S., et al. (2000):

p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps.

*Mol Cell Biol* 20(11). S. 3951-64.

100) Xia, S. J., Pressey, J. G. und Barr, F. G. (2002):

Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma.

*Cancer Biol Ther* 1(2). S. 97-104.

## Literaturverzeichnis

101) Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., et al. (1993):

p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases.

Nature 366(6456). S. 701-4.

102) Yotov, W. V. und St-Arnaud, R. (1996):

Differential splicing-in of a proline-rich exon converts alphaNAC into a muscle-specific transcription factor.

Genes Dev 10(14). S. 1763-72.

103) Zabel, U., Henkel, T., Silva, M. S. und Baeuerle, P. A. (1993):

Nuclear uptake control of NF-kappa B by MAD-3, an I kappa B protein present in the nucleus.

Embo J 12(1). S. 201-11.

104) Zhang, P., Wong, C., Liu, D., et al. (1999):

p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step.

Genes Dev 13(2). S. 213-24.

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , 1-faktorielle Varianzanalyse
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2`-desoxy-Uridin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cm	Zentimeter
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleid acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	<i>extracellular related kinase</i>
et al.	<i>et alii</i> , und andere
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
IFN	<i>Interferon</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IKK	I $\kappa$ B-Kinase-Komplex
IL	<i>Interleukin</i>
ILR	IL-Rezeptor
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IRAK	<i>IL-1-receptor-associated kinase</i>
JNK	<i>c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase</i>
kb	Kilobasen
M	Molar

## Abkürzungsverzeichnis

mA	Milliampere
MEKK	Mitogen aktivierte ERK aktivierende Kinase Kinase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure
MRF	myogenen Regulationsfaktor
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
RIP	<i>receptor interacting protein</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Riconukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i> , ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg (Sedimentationskonstante)
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
skNAC	<i>skeletal muscle nascent polypeptide-associated complex</i>
TAK	<i>transforming growth factor β-activated kinase</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll like-Rezeptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>tumor necrosis factor-Rezeptor</i>
TOLLIP	<i>toll-interacting protein</i>
TRAF	<i>Tumor necrosis factor receptor associated factor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett

## Abkürzungsverzeichnis

Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktosid

## 8 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Barbara Munz für die Überlassung des interessanten Themas und für die außergewöhnlich gute Betreuung bedanken. Ihre Begeisterung wissenschaftliche Forschung zu leben und zu vermitteln motivierte mich jedes Mal wieder aufs Neue. Somit bedanke ich mich für zahlreiche fachlich-kritische Diskussionen und wertvolle Anregungen im Rahmen dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich meinen Laborkollegen für die angenehme Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft danken:

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Felicitas Berger für die hilfreichen Tipps bei der Planung und Durchführung vieler Versuche. Desweiteren möchte ich Frau Dr. Christine Hacker dafür danken, dass sie mir immer hilfreich zur Seite stand, wenn sich kleinere oder auch größere Problemen bei meiner Arbeit auftaten. Ich danke Stephanie Adams für die gute Zusammenarbeit während der Versuche für die Veröffentlichung Ehlers et al., und für ihre unendliche Hilfsbereitschaft. Ebenso danke ich Max Schwarzburger für die Hilfe bei der Aufbereitung der Mausproben und Svenja Ehlers für die Einführung in die Laborarbeit und die Unterstützung am Anfang. Ich danke Frau Dr. Pinar Akman für ihre freundliche, gutgelaunte und hilfsbereite Art. An dieser Stelle möchte ich mich bei Renate Noske-Reimers bedanken, weil sie die gute Seele des Labors ist und soviel ohne sie nicht laufen würde. Außerdem danke ich Gabriela Beyer für die Einführung in die Zellkultur.

Weiterhin möchte ich mich ganz besonders bei Frau PD Dr. Karin Klingel für die Überlassung der Cocksackie-Mäuse, bei Frau Prof. Dr. Petra Knaus für die Unterstützung bei den Myoblasten sowie bei Herrn Prof. Dr. Pier-Luigi Lollini für die RD/18-Zellen bedanken.

Der Kommission zur Vergabe von Promotionsstipendien gemäß Nachwuchsförderungsgesetz der FU-Berlin danke ich für das gewährte Stipendium.

Schließlich danke ich meinen Eltern für die lebenslange, kompromisslose Unterstützung die ich erfahren darf und zu schätzen weiß. Ich danke meinen Geschwistern für viele hilfreiche Gespräche. Und natürlich danke ich Petra Pfiffi, weil sie so viel auf sich genommen hat, um mir Berlin zu ermöglichen. Danke für die Unterstützung.

## 9 ERKLÄRUNG

Ich, Tobias Mück, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Rolle von TRAF6 und seines Effektors NF- $\kappa$ B bei der Myoblastendifferenzierung“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

## **10 LEBENSLAUF**

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

## Lebenslauf

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

