

**Aus dem Institut für Physiologie der Charité-
Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin**

**Eingereicht über das Institut für Veterinär-Biochemie des Fachbereichs
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin**

**Die Rolle des herz- und skelettmuskelspezifischen
Transkriptionsfaktors *skNAC* bei der
Muskeldifferenzierung
und bei entzündlichen Kardiomyopathien**

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

vorgelegt von
Theresia Breustedt
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2014
Journal-Nr.: 3644

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.- Prof. Dr. rer. nat. Ralf Einspanier
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Barbara Munz
Dritter Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Ph. D. Achim Gruber

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

tissue protein, transcription factors, alternative splicing, myocardium, cardiomyopathy, coxsackieviruses, myosins, polypeptides, skeletal muscle, gene silencing, northern blotting, western blotting, RNA, DNA, cell cultures, differentiation

Tag der Promotion: 22.09.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-544-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2014

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

INHALT

I	ABKÜRZUNGEN	I
1	EINLEITUNG	1
1.1	Myogenese	1
1.2	Nascent polypeptide associated complex (NAC)	5
1.2.1	α/β Nac-Komplex	7
1.2.2	skNAC	9
1.3	In dieser Arbeit verwendete myogene Differenzierungsmarker	13
1.3.1	Myogenin	14
1.3.2	p21	14
1.3.3	Myosin-Heavy-Chain	14
1.3.4	Desmin	16
1.3.5	Caveolin-3	17
1.3.6	Entactin-1	17
1.3.7	α -Actinin	17
1.4	Coxsackieviren- induzierte inflammatorische Kardiomyopathie	18
1.5	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Material	22
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	22
2.1.2	Enzyme.....	25
2.1.3	Antikörper	25
2.1.3.1	<i>Primäre Antikörper</i>	25
2.1.3.2	<i>Sekundäre Antikörper</i>	25
2.1.4	Oligodesoxynukleotide.....	25
2.1.5	Accession number der MyHC-Sequenz	26
2.1.6	Oligonukleotide (siRNAs).....	26

2.1.7	Vektor.....	26
2.1.8	Kommerzielle „Kits“.....	26
2.1.9	Histologische Schnitte.....	27
2.1.10	Bakterienstämme.....	27
2.1.11	Eukaryontische Zelllinien.....	27
2.1.12	RNA.....	27
2.1.13	Wasser.....	27
2.1.14	Standardpuffer und Lösungen.....	28
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	28
2.2.1.1	<i>Kultivierung und Kryokonservierung eukaryontischer Zellen.....</i>	<i>28</i>
2.2.1.2	<i>Induktion der Differenzierung der C2C12-Zellen.....</i>	<i>30</i>
2.2.1.3	<i>Induktion der Differenzierung der H9c2-Zellen.....</i>	<i>30</i>
2.2.1.4	<i>Transfektion der C2C12-Zellen mit siRNA.....</i>	<i>31</i>
2.2.2	Mikrobiologische Methoden.....	31
2.2.2.1	<i>Anzucht und Aufbewahrung von E.coli-Stämmen.....</i>	<i>31</i>
2.2.2.2	<i>Herstellung transformationskompetenter E.coli-Bakterien.....</i>	<i>32</i>
2.2.2.3	<i>Transformation von E.coli-Zellen mit Plasmid-DNA.....</i>	<i>32</i>
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.3.1	<i>DNA-Isolierung aus transformierten E.coli-Bakterien.....</i>	<i>33</i>
2.2.3.2	<i>In vitro-Reaktionen an DNA.....</i>	<i>33</i>
2.2.3.3	<i>Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....</i>	<i>35</i>
2.2.3.4	<i>Spaltung und Reinigung von DNA und Vektor.....</i>	<i>36</i>
2.2.3.5	<i>Ligation.....</i>	<i>36</i>
2.2.3.6	<i>Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren.....</i>	<i>37</i>
2.2.3.7	<i>RNA-Techniken.....</i>	<i>37</i>
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	41
2.2.4.1	<i>Herstellung von Proteinlysaten.....</i>	<i>41</i>
2.2.4.2	<i>Proteinkonzentrationsbestimmung.....</i>	<i>41</i>
2.2.4.3	<i>Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....</i>	<i>41</i>
2.2.4.4	<i>Immunologische Methoden.....</i>	<i>43</i>

3	ERGEBNISSE	48
3.1	Immunhistochemische Lokalisation des skNAC-Proteins im murinen Herzen unter physiologischen Bedingungen und bei der CVB3-induzierten inflammatorischen Kardiomyopathie	48
3.1.1	Optimierung der Antikörperkonzentration.....	48
3.1.2	Färbung der infizierten Mäuseherzen.....	52
3.2	Hemmung der <i>skNAC</i>-Expression in Skelettmuskelzellen mittels spezifischer siRNAs und Untersuchung des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens der transfizierten Zellen	61
3.2.1	Transfektion von C2C12-Zellen mit <i>skNAC</i> -spezifischer siRNA.....	61
3.2.1.1	<i>Optimierung der Transfektionsbedingungen</i>	61
3.2.1.2	<i>Untersuchung des Transfektionserfolgs auf RNA-Ebene im zeitlichen Verlauf</i>	64
3.2.1.3	<i>Untersuchung des Transfektionserfolgs auf Proteinebene</i>	67
3.2.1.4	<i>Histologische Untersuchung der <i>skNAC</i>-siRNA-transfizierten Zellen</i>	68
3.2.1.5	<i>Analyse des Proliferationsverhaltens der transfizierten Zellen in Proliferationsmedium</i>	68
3.2.1.6	<i>Analyse des Proliferationsverhaltens der transfizierten Zellen in Differenzierungsmedium</i>	70
3.2.2	Analyse des Differenzierungsverhaltens der transfizierten Zellen	71
3.2.2.1	<i>Untersuchung des Einflusses der Hemmung der <i>skNAC</i>-Expression auf die <i>MyHC-1</i>-Expression auf RNA-Ebene</i>	71
3.2.3	Untersuchung weiterer Differenzierungsmarker	76
3.2.3.1	<i>Untersuchung des Einflusses der Hemmung der <i>skNAC</i>-Expression auf die <i>MyHC</i>-Expression auf Protein-Ebene</i>	76
3.2.3.2	<i>Untersuchung des Einflusses der Hemmung der <i>skNAC</i>-Expression auf die <i>Myogenin</i>-Expression auf RNA-Ebene</i>	78
3.2.4	Untersuchung weiterer Differenzierungsmarker auf Proteinebene	79
3.2.4.1	<i>Desmin</i>	79
3.2.4.2	<i>P21</i>	80
3.2.4.3	<i>Caveolin-3</i>	82
3.2.4.4	<i>α-Actinin</i>	83

3.2.4.5	<i>Entactin-1</i>	84
3.2.4.6	<i>Untersuchung des housekeeping-Proteins α-Tubulin</i>	86
3.2.5	Immunzytochemische Untersuchungen der <i>MyHC</i> -Expression von mit <i>skNAC</i> -spezifischer siRNA transfizierten C2C12-Zellen.....	88
3.2.5.1	<i>Immunhistochemie</i>	88
3.2.5.2	<i>Bestimmung des Differenzierungsindex</i>	89
3.2.5.3	<i>Bestimmung des Fusionsindex</i>	90
3.3	Untersuchung der Expression von <i>skNAC</i> in H9c2-Zellen	92
4	DISKUSSION	95
4.1	Coxsackievirus-B3-Infektion und Verteilungsmuster von <i>skNAC</i> in der Herzmuskulatur	95
4.1.1	Es lassen sich immunhistochemisch keine deutlichen Unterschiede zwischen den Mäusestämmen ausmachen	96
4.2	Welche Auswirkungen hat eine <i>skNAC</i>-Repression in C2C12-Zellen auf deren Proliferations- und Differenzierungsverhalten?	97
4.2.1	Die <i>skNAC</i> -Expression in C2C12-Zellen lässt sich durch siRNA-Transfektion hemmen	97
4.2.2	Eine Hemmung der <i>skNAC</i> -Expression führt nicht zu einer veränderten Morphologie der C2C12-Zellen	98
4.2.3	Eine Hemmung der <i>skNAC</i> -Expression führt zu keiner signifikant veränderten Proliferationsrate der C2C12-Zellen	98
4.2.4	Eine Hemmung der <i>skNAC</i> -Expression führt nicht zu einer Verminderung der <i>MyHC</i> -Expression	99
4.2.5	Eine Repression der <i>skNAC</i> -Expression hat keinen Einfluss auf die Expression von für verschiedene myogene Differenzierungsmarker kodierende Gene	100
4.2.6	<i>skNAC</i> könnte bei der Myofibrillogenese und der Sarkomerbildung eine Rolle spielen.....	102
4.3	<i>skNAC</i> wird auch in differenzierenden H9c2-Kardiomyozyten induziert	103

5	ZUSAMMENFASSUNG	105
6	SUMMARY	107
7	ANHANG.....	109
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	110
	PUBLIKATIONEN.....	117
	DANKSAGUNG.....	118
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	119

I Abkürzungen

Aqua dest.	Destilliertes Wasser
as	<i>antisense</i> , Gegensinn-Orientierung
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-desoxy-Uridin
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary</i> DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DM	Differenzierungsmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	Fötales Kälberserum
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Ktr	Kontrolle
Kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
mRNA	<i>messenger</i> (Boten) – Ribonukleinsäure

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD ₆₂₀	optische Dichte, gemessen bei 620 nm
p.c.	<i>post coitum</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
p.f.	<i>post fertilisationem</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	<i>sense</i> , Sinn-Orientierung
<i>scr</i>	<i>scrambled siRNA</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>siRNA</i>	<i>small interfering RNA</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktosid

1 Einleitung

1.1 Myogenese

Unter Myogenese versteht man die Anlage und die Entwicklung der Skelettmuskulatur. Die Skelettmuskulatur der Säugetiere entstammt den Somiten. Dies sind epitheliale Strukturen aus mesenchymalen Zellen seitlich des Neuralrohrs (Christ und Ordahl, 1995). Ausgehend von mesodermalen Stammzellen, den somitischen Vorläuferzellen aus dem ventrolateralen Rand des Dermomyotoms, migrieren diese Epithelzellen und formen dabei das Myotom (Cossu *et al.*, 1996). Anschließend wandern diese Vorläuferzellen zu den Gliedmaßenknospen und entwickeln sich über Myoblasten und Myotuben zu ausgereiften Myozyten (Molkentin und Olson, 1996). Die mesenchymalen Zellen sind zu Anfang der Entwicklung pluripotent, daher müssen sie erst durch verschiedene Faktoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren determiniert werden, um sich in die jeweiligen Zelltypen entwickeln zu können. An die Determinierung schließt sich die Differenzierung zur endgültigen Zellform an.

Es entwickelt sich aus dem ventrolateralen Rand des Myotoms die Extremitätenmuskulatur und aus dem ventralen Myotom die Stammmuskulatur. Die Mesenchymzellen der Gliedmaßen leiten hierbei die Muskelvorläuferzellen und bringen sie damit in die richtige Position (Christ und Ordahl, 1995). Einige der Muskelvorläuferzellen, die sog. Satellitenzellen, bleiben als Stammzellreservoir der Skelettmuskulatur unter der Basallamina der Myozyten (Mauro 1961). Sie sind undifferenziert und solange mitotisch inaktiv, bis sie aufgrund von Stress oder Traumata reaktiviert werden und wieder in den Zellzyklus eintreten (Buckingham *et al.*, 2003). Sie spielen daher beim Muskelwachstum und bei der Muskelregeneration eine Rolle.

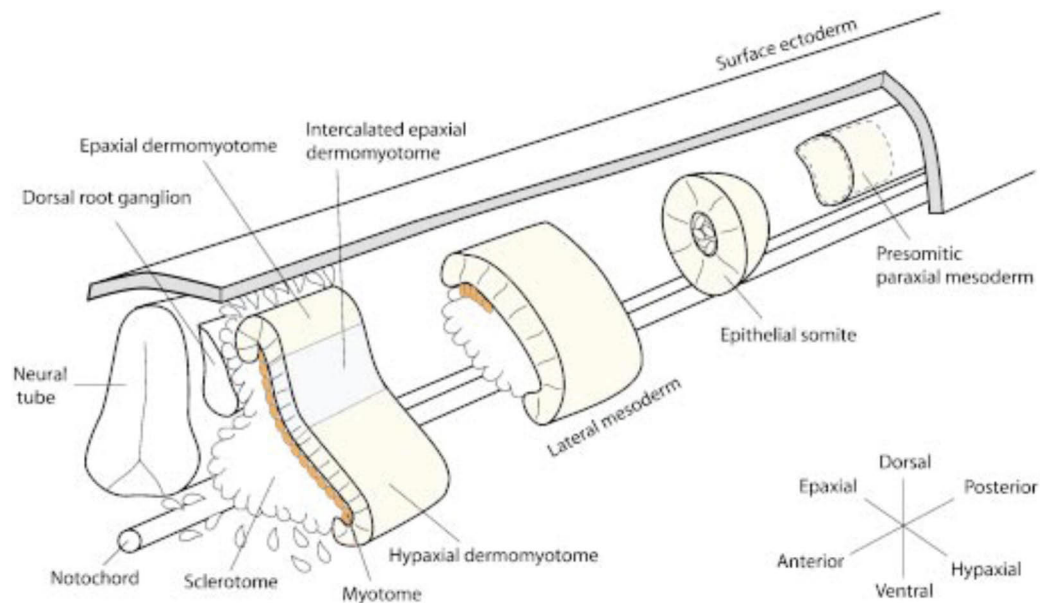


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Somitogenese (aus Buckingham *et al.*, 2003)

Da sich die Myozyten aus multipotenten Vorläuferzellen entwickeln, müssen diese zunächst als Myoblasten determiniert werden. Für diese Entwicklungsschritte bedarf es vieler verschiedener Faktoren bzw. Signalmoleküle unterschiedlicher Herkunft, welche zeitlich und räumlich genau koordiniert werden müssen (Ludolph und Konieczny, 1995). Zu den wichtigsten Regulatoren zählen die vier myogenen *basic helix-loop-helix (bHLH)-factors* MyoD, Myf5, MRF4 und Myogenin (Molkentin und Olson, 1996, Delgado *et al.*, 2003) sowie die *paired box-* Transkriptionsfaktoren Pax3 und Pax7 (Mansouri und Gruss, 1998). Die Expression der entsprechenden Gene wird durch die Bildung bestimmter Signalmoleküle aus dem umliegenden Gewebe induziert. Hier sind vor allem *Sonic hedgehog (Shh)* sowie *Wnt* zu nennen (Buckingham *et al.*, 2003). Bei der Muskelzelldeterminierung spielen besonders Myf5 sowie MyoD aus der Gruppe der Muskelregulationsfaktoren (MRFs) eine große Rolle (siehe Abb.2) (Tajbakhsh und Buckingham, 2000).

Die Differenzierung der Skelettmuskelzellen geht mit dem Ende ihrer Proliferation einher. Daher muss die Zellteilung, also der Zellzyklus, gestoppt werden. Jedoch darf die Differenzierung nicht zu früh einsetzen. Die genau determinierte Expression der für die zuständigen Regulatoren kodierenden Gene wird durch deren gegenseitige Interaktion geregelt (Ludolph und Konieczny, 1995, Cossu *et al.*, 1996). Für den Ausstieg der Zellen aus dem Zellzyklus sind unter anderem die verminderte Expression einiger Wachstumsfaktoren (Molkentin und Olson, 1996) sowie die Expression des *p21*-Gens verantwortlich. *P21* ist ein

cyclin dependent kinases (CDKs)-Inhibitor und stoppt dadurch die weitere Zellteilung der Myoblasten. Anschließend wird die Differenzierung sowie die Reifung dieser Myoblasten zu multinukleären Myotuben und schließlich zum fertigen Myozyten durch Myogenin und MRF4 gefördert (Tajbakhsh und Buckingham, 2000).

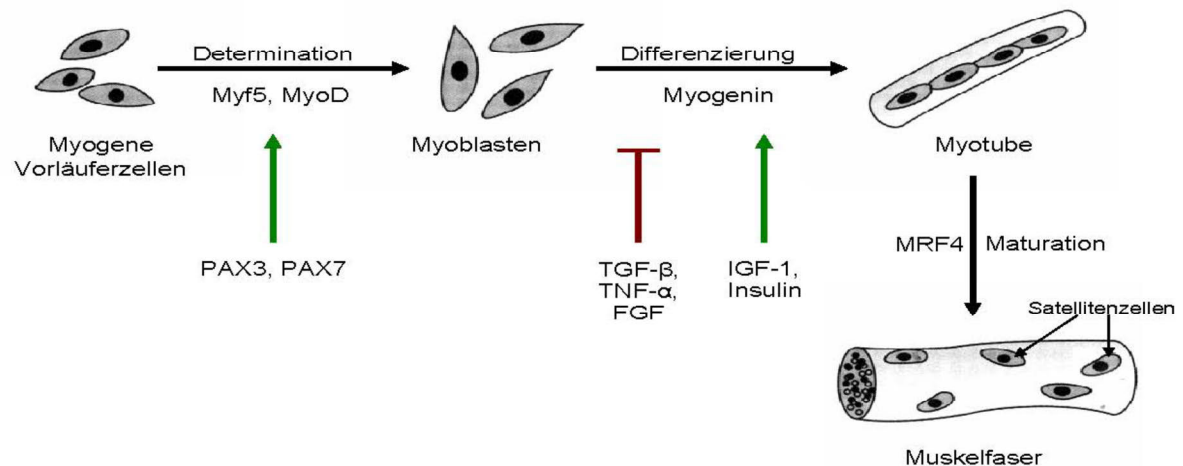


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entwicklung einer Muskelfaser (modifiziert nach Carlson 2004, Palmer und Rudnicki, 2002). Durch den Einfluss von MyoD und Myf5 sowie weiteren myogenen Transkriptionsfaktoren werden myogene Vorläuferzellen determiniert, welche sich daraufhin in Myoblasten umwandeln. Myogenin und andere Faktoren führen zur Differenzierung sowie zur Verschmelzung dieser Zellen. Es bilden sich multinukleäre Myotuben. Die Myotuben reifen unter MRF4-Einfluss und mehrere von ihnen bilden zusammen die fertige Muskelfaser.

Herz- und Skelettmuskulatur zählen zusammen zu der quergestreiften Muskulatur. Die Querstreifung kommt durch die regelmäßige Anordnung der Myofibrillen sowie der Aktin- und Myosinfilamente zustande. Ein einzelner Muskel besteht aus mehreren Faserbündeln, welche wiederum aus einzelnen Muskelfasern zusammengesetzt sind. Jede Muskelfaser wird durch ein Sarkolemm umgeben, mehrere Muskelfasern werden mithilfe des Perimysiums zu einem Muskelfaserbündel zusammengefasst. Der Aufbau von Herz- und Skelettmuskulatur ist prinzipiell ähnlich, jedoch gibt es einige charakteristische Unterschiede, welche in der folgenden Tabelle veranschaulicht sind (Tab.1). Der wichtigste funktionale Unterschied zwischen beiden quergestreiften Muskelarten ist die Fähigkeit einiger Zellen der Herzmuskulatur, einen Reiz spontan auszulösen und nicht nur einen externen Reiz

weiterzuleiten. Zudem kann die Aktivität der Herzmuskelzellen durch das vegetative Nervensystem beeinflusst werden.

	Skelettmuskulatur	Herzmuskulatur
Motorische Endplatte	Ja	Nein
Faserform	Zylindrisch, lang (max. 15cm)	verzweigt
Mitochondrien	Abhängig vom Muskeltyp	viele
Zellkern pro Faser	Viele	Einer
Elektrische Koppelung	Nein	Ja (funktionelles Synzytium)
Sarkoplasmatisches Retikulum	Stark entwickelt	mäßig entwickelt
Reizantwort	Abgestuft	Alles-oder-nichts-Prinzip
Tetanisierbarkeit	Ja	nein
Erregung	Willentlich	Primär unwillentlich

Tabelle 1: Wesentliche Unterschiede zwischen der Skelett- und Herzmuskulatur

Weiterhin besitzt die einzelne Herzmuskelzelle einen geringeren Querschnitt als die Skelettmuskelzelle. Zudem existieren in der Herzmuskulatur sog. Glanzstreifen, welche die Muskelzellen untereinander verbinden. Dies dient der Erregungsausbreitung über das gesamte Myokard hinweg (Silbernagel und Despopoulos, 2007).

1.2 Nascent polypeptide associated complex (NAC)

Für die Synthese funktioneller Proteine ist die präzise Produktion und Anordnung aller benötigten Bestandteile essentiell. Die Grundbausteine stellen die Aminosäuren dar, welche in der genetisch festgelegten Reihenfolge mithilfe der t-RNA in den Ribosomen zu Polypeptidketten verbunden werden. Die in den Ribosomen frisch gebildeten Peptidketten müssen adäquat gefaltet und an ihren endgültigen Bestimmungsort transportiert werden. Eine wichtige Aufgabe erfüllt hierbei das Protein NAC (*nascent polypeptide associated complex*). Das NAC-Gen ist ubiquitär exprimiert. NAC ist ein hochkonservierter, heterodimerer Proteinkomplex in höheren Eukaryonten, der reversibel an Ribosomen binden kann, um neu synthetisierte und gerade aus dem Ribosom austretende Polypeptidketten (ribosome-bound nascent polypeptide chains, RNCs) zu binden und sie somit vor unangemessenen Interaktionen mit anderen Proteinen zu schützen (Wiedmann *et al.*, 1994, Yotov und St-Arnaud, 1996, Rospert *et al.*, 2002). NAC kann daher als „molekulares Chaperon“ angesehen werden (Frydman, 2001). Weiterhin werden die mit NAC assoziierten Polypeptidketten vor proteolytischen Einflüssen geschützt (Lauring *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 2010). Das Einwirken von Proteasen auf den Komplex verfestigt die Bindung zu den Polypeptidketten sogar (Wang *et al.*, 2010). Manche Polypeptidketten sind dafür bestimmt, durch das Endoplasmatische Retikulum (ER) aus der Zelle heraus geschleust zu werden oder sollen in der Membran des ER's verbleiben. Dafür muss eine Translokation dieser Polypeptide zur Membran des ER's erfolgen, wofür *signal recognition particles* (SRPs) zuständig sind. Diese SRPs agieren als Shuttle zwischen dem Zytosol und der ER-Membran (Wiedmann *et al.*, 1994). Polypeptidketten, die Signalpeptide enthalten, welche für den „Bestimmungsort ER“ spezifisch sind, werden nicht von NAC gebunden, sondern von den SRPs (Wiedmann *et al.*, 1994, Lauring *et al.*, 1995). NAC kann daher durch die Freigabe solcher Polypeptidketten sicherstellen, dass nur solche Polypeptide, die für eine Translokation vorgesehen sind und die dafür nötige Signalsequenz enthalten, von den SRPs gebunden werden. Die Translokation wird also durch die NAC-Bindung bei Polypeptidketten ohne Signalsequenz verhindert und somit die Translokationsgenauigkeit sowie die Spezifität der SRPs gesichert (Lauring *et al.*, 1995).

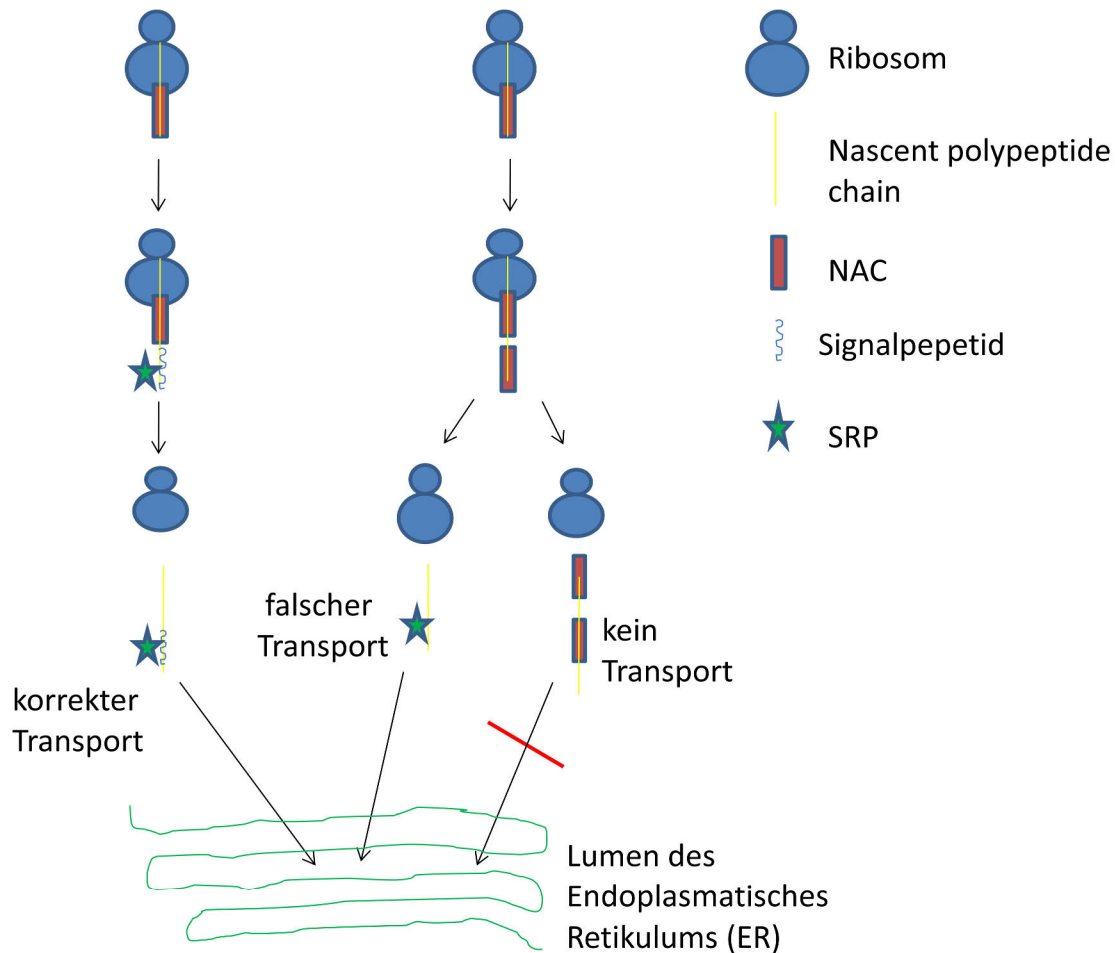


Abbildung 3: Schematische Darstellung der "Verarbeitung" von *nascent polypeptide chains*. Dargestellt ist die Synthese von *nascent polypeptide chains* (gelb) durch Ribosomen (blau). NAC (rot) bindet an die gerade aus den Ribosomen heraustretenden Ketten. Diejenigen *nascent chains*, welche eine ausreichend lange Signalsequenz (hellblau gewellt) beinhalten, werden von NAC freigegeben, von SRPs (Stern) gebunden und ins Endoplasmatische Retikulum transportiert. Wenn keine Signalsequenz in den Ketten vorhanden ist und NAC an die Polypeptidkette bindet, findet kein Transport ins ER statt. Wenn jedoch kein NAC anwesend ist und somit den Transport nicht verhindert, binden trotzdem SRPs und bedingen den Transport von Polypeptidketten ins ER, welche eigentlich nicht dafür bestimmt waren (modifiziert aus Wiedmann *et al.*, 1994).

Zusätzlich besteht bei Hefen die Vermutung, dass NAC als positiver Regulator für die Translokation von Polypeptiden in Mitochondrien fungiert (Rospert *et al.*, 2002, Fünfschilling und Rospert, 1999).

1.2.1 α/β Nac-Komplex

Wie im vorangehenden Abschnitt bereits erwähnt, besteht NAC aus zwei Untereinheiten. Diese heißen α NAC und β NAC. Unter physiologischen Bedingungen liegt dabei der Großteil von NAC als Heterodimer vor und bindet in dieser Form, wie bereits dargestellt, an naszierende Polypeptidketten (Beatrix *et al.*, 2000). Die Bindung der Polypeptide erfolgt dabei stärker über die β NAC- als über die α NAC-Domäne (Wang *et al.*, 2010). Neben dieser regulatorischen Rolle bei der Transkription werden dem α/β -NAC-Komplex aber noch weitere Funktionen zugeschrieben, auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll. Als Homodimere haben beide Untereinheiten wahrscheinlich verschiedene transkriptionsregulierende Funktionen in der Zelle (Rospert *et al.*, 2002).

Das α NAC-Protein ist 33 kD groß. Es bindet allgemein unspezifisch an Nukleinsäuren (Beatrix *et al.*, 2000), kann jedoch auch als transkriptioneller Koaktivator wirken (Moreau *et al.*, 1998, St-Arnaud, 1998, Yotov und St-Arnaud, 1996, Rospert *et al.*, 2002) und spielt eine Rolle bei der Regulation von Zellproliferation und -differenzierung (Al-Shanti *et al.*, 2004). Während der G₀-Phase des Zellzyklus transloziert α NAC aus dem Zytoplasma in den Zellkern (Yotov *et al.*, 1998). Eventuell hat α NAC auch eine Funktion als knochenspezifischer transkriptioneller Koaktivator (Moreau *et al.*, 1998). Moreau *et al.* konnten 1998 eine Expression von α NAC nicht vor dem vierzehnten Tag p.c. im Mausembryo detektieren. Erst ab diesem Zeitpunkt war das entsprechende Protein im Kern von differenzierten Osteoblasten nachweisbar. *Post partum* ist das α NAC-Transkript in allen Geweben anzutreffen (Yotov und St-Arnaud, 1996). Die Mineralisierung der Knochen beginnt ebenfalls ca. ab Tag E14 (Kaufman, 1992). Zum selben Zeitpunkt ist das α NAC-Protein im primären Ossifikationszentrum der Rippen und den langen Röhrenknochen zu finden (Moreau *et al.*, 1998). Ein natürlicher Bindungspartner von α NAC in Osteoblasten ist das AP-1-Protein, ein Transkriptionsfaktor, welcher als ein bekannter Modulator der Knochenentwicklung gilt (Grigoriadis *et al.*, 1995). AP-1-Proteine werden durch Dimerisierung von zwei Proteinen der Jun- oder Fos-Familie als Antwort auf verschiedene Stimuli bzw. Signale gebildet. α NAC interagiert als Koaktivator direkt mit dem c-Jun-Protein und stabilisiert dadurch die Bindung des AP-1-Proteins an seine Zielsequenz, was letztendlich zu einer gesteigerten Aktivierung eines AP-1-abhängigen Promotors und somit zur Verstärkung der basalen Gentranskription führt (Moreau *et al.*, 1998). Spezifische Interaktionen mit dem Fusionsprotein GAL4/VP16 sowie mit TATA-Box-bindenden Proteinen lassen vermuten, dass das α NAC-Genprodukt hier als ein transkriptioneller Koaktivator fungiert (Yotov *et al.*, 1998). Weiterhin verliert α NAC

seine Aktivität als Transkriptionsfaktor, wenn gleichzeitig β 1NAC aktiv ist, also phosphoryliert vorliegt (Yotov und St-Arnaud, 1996).

Al-Shanti *et al.* konnten 2004 in einem Versuchssystem mit Immunzellen ($CD8^+$ -T-Zellen) zeigen, dass die α NAC-Expressionsrate während der Proliferation und Differenzierung schwankt. Durch Inhibierung der α NAC-Expression konnte gezeigt werden, dass das α NAC-Protein eine proliferationsinhibierende Wirkung auf $CD8^+$ -T-Zellen besitzt, jedoch auf die Differenzierung keinen erkennbaren Einfluss hat. Die Inhibierung der α NAC-Expression führt außerdem dazu, dass der NACA-Komplex nicht korrekt funktioniert, wodurch zelluläre Proteine unkontrolliert aus den Zellen sezerniert werden und verloren gehen. Somit hat die vorhandene Menge an α NAC-Protein durchaus einen Einfluss auf physiologische Effekte in der Zelle.

β NAC wurde erstmals aus HeLa-Zellen isoliert (Zheng, 1987). Es handelt sich hierbei um eine 21 kD große Spleißvariante des *basic transcription factor 3a* (BTF3a) welche auch BTF3b genannt wird (Zheng, 1987, Zheng *et al.*, 1990). Das β NAC-Gen kann die beiden verschiedene Spleißvarianten β 1NAC (BTF3b) und β 2NAC (BTF3a) hervorbringen (Zheng *et al.*, 1990, Kanno *et al.*, 1992). Beide β NAC-Spleißvarianten gelten als evolutionär hochkonserviert (Zheng *et al.*, 1990). Beide Formen können stabile Komplexe mit α NAC bilden, wovon bisher nur der α/β 1Nac-Komplex *in vitro* näher charakterisiert wurde (Moreau *et al.*, 1998).

BTF3a gehört zusammen mit BTF1, BTF2 und STF zu den essentiellen Transkriptionsfaktoren, welche zusammen mit der RNA-Polymerase II einen Multiproteinkomplex in der Nähe des Promotors (meist im Bereich der TATA-Box) bilden, um Gentranskriptionsprozesse initiieren zu können (Yotov und St-Arnaud, 1996, Parthun *et al.*, 1992, Hu und Ronne, 1994). Das BTF3a/ β 2NAC-Protein ist dabei um 44 Aminosäuren länger als das BTF3b/ β 1NAC-Protein (Zheng *et al.*, 1990), was für die stärkere Bindung an die RNA-Polymerase II verantwortlich zu sein scheint. Weiterhin ist BTF3b/ β 1NAC im Gegensatz zu BTF3a/ β 2NAC transkriptionell inaktiv (Zheng, 1987, Zheng *et al.*, 1990), jedoch scheint es eine Rolle bei der RNA-Polymerase II-abhängigen Initiierung der Transkription zu spielen (Rospert *et al.*, 2002). Markesich *et al.*, (2000), Moncollin *et al.*, (1992) sowie Flores *et al.*, (1992) schreiben dagegen der Interaktion zwischen β NAC und der RNA-Polymerase II keine Signifikanz zu.

Bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* existiert eine Mutation, bei welcher der Phänotyp keinen Thorax und keinen Kopf aufweist, sondern in spiegelbildlicher Art und Weise zwei Hinterteile besitzt. Diese Mutante heißt ihrem Erscheinungsbild nach *bicaudal*. Es

handelt sich hierbei um eine Mutation im β NAC-Gen (Markesich *et al.*, 2000). Es besteht eine 100%-ige embryonale Letalität, welche laut Markesich auf die fehlende Rolle von β NAC bei der Regulation des Transkriptionsprozesses und daraus resultierend eine aberrante Lokalisation verschiedener, normalerweise im sich entwickelnden Embryo asymmetrisch verteilter Transkripte, zur Folge haben könnte. Auf welche Weise sich ein fehlgesteuerter Translationsprozess und eine räumliche Fehlverteilung dieser Transkripte gegenseitig bedingen könnten, ist dabei noch völlig unklar.

1.2.2 skNAC

Im quergestreiften Muskelgewebe existiert eine 220 kD große, prolinreiche Variante des α NAC-Proteins: skNAC (skeletal NAC α , skelett- und herzmuskelspezifische α NAC-Form). skNAC entsteht durch die Translation eines Transkriptes, welches wiederum durch das Einspleißen eines 6 kb großen Exons zwischen die für die Aminosäuren Nummer 23 und 24 von α NAC kodierenden Basenpaare gekennzeichnet ist (Yotov und St-Arnaud, 1996). Dieses Exon hat viele repetitive Sequenzen (Li *et al.*, 2009).



Abbildung 4: α NAC-Spleißvariationen Durch ein „Splice-in“ des Exon 2 entsteht die α NAC-Variante skNAC. Quelle: Felicitas Berger

Prolinreiche Domänen sind häufig in Transkriptionsfaktoren wie z.B. CTF/NF1 (Mermod *et al.*, 1989), MNF (Bassel-Duby *et al.*, 1994) oder auch AP-2 (William und Tjian, 1991) zu finden.

Mithilfe von phage-display-Bindungsstudien fanden Yotov und St-Arnaud 1996 eine Konsensussequenz für die Bindung von skNAC an DNA. Der murine Myoglobinpromotor weist dabei drei Domänen auf, die große Ähnlichkeit zur dieser skNAC-Bindungssequenz haben. In Reporterassays konnte skNAC tatsächlich die Transkription dieses Myoglobinpromotors aktivieren. Dieser ist demnach als natürlicher Promotor anzusehen,

welcher von skNAC reguliert wird (Yotov und St-Arnaud, 1996). Künstliche Mutationen im Bereich der skNAC-Bindungsstellen am *Myoglobin*-Promotoren führten demgemäß zur Aufhebung der skNAC-bedingten Stimulation (Yotov und St-Arnaud, 1996). Somit kann man skNAC vermutlich eine Rolle als Transkriptionsfaktor zuschreiben. Weiterhin korreliert das temporäre sowie das räumliche Expressionsmuster der für Myoglobin und skNAC kodierenden Gene: während der Embryogenese ist die *Myoglobin*-Expression eher gering, steigt jedoch nach der Geburt in der Herz- sowie in der Skelettmuskulatur deutlich an (Weller *et al.*, 1986, Parsons *et al.*, 1993).

skNAC kommt ausschließlich in Herz- und Skelettmuskelgewebe und nur bei Vertebraten vor, wobei die Länge des zweiten Exons und damit die Länge des Proteins bei den einzelnen Arten variiert (Li *et al.*, 2009). Es wird nur in differenzierenden und differenzierten Zellen exprimiert. Das für skNAC spezifische Exon 2 ist weniger stark konserviert als die beiden außen liegenden Exons 1 und 3 (Li *et al.*, 2009). Yotov und St-Arnaud (1996) konnten weiterhin zeigen, dass skNAC zwar in differenzierten Myotuben, nicht aber in Myoblasten exprimiert wird. Eine Expression lässt sich in C2C12-Zellen ab ca. 24 bis 30 h nach Differenzierungsinduktion nachweisen (Munz *et al.*, 1999). Untersuchungen von Munz *et al.*, 1999, sowie Yotov und St-Arnaud, 1996, zeigten, dass skNAC bei der Regulierung des myogenen Differenzierungsprogramms eine Rolle spielt. Eine Überexpression von *skNAC* in C2C12-Zellen führt dabei zur verfrühten Fusion der Zellen zu gigantischen, vielkernigen, „hypertrophierten“ Myotuben („*myosacs*“), welche Ausdruck einer Dysregulierung der Zellfusion sind. Im Gegensatz dazu verhindert eine Überexpression von α NAC die Zellfusion und die Differenzierung der C2C12-Zellen (Yotov und St-Arnaud, 1996). Hohe Konzentrationen an α NAC beeinflussen jedoch weder kompetitiv noch verstärkend die transkriptionsregulierende Wirkung von skNAC, obwohl beide NACA-Formen an potentiell transkriptionsregulierende DNA-Sequenzen binden können.

Neben den Funktionen als möglicher Transkriptionsfaktor während der Skelett- und Herzmuskeldifferenzierung, sowie bei der Regulierung der Myoblastenfusion (Yotov und St-Arnaud, 1996) spielt skNAC vermutlich eine zusätzliche Rolle bei der Muskelregeneration. Munz *et al.*, zeigten 1999, dass die Expressionsrate von *skNAC* in Skelettmuskelzellen des *Panniculus carnosus* nach Verwundung spezifisch erhöht ist. Das skNAC-Protein war dabei ca. 12 h nach Verwundung in erhöhter Konzentration besonders am Wundrand und ausschließlich in Muskelzellen nachweisbar. Die Induktion der *skNAC*-Expression geht dabei sogar der von *Myogenin* etwas voraus. Das *Myogenin*-Gen wird in Maus-

Skelettmuskelregenerationsmodellen normalerweise etwa 24 h nach Verwundung induziert (Füchtbauer und Westphal, 1992, Grounds und Garret, 1992). Somit kann skNAC als ein Marker für Muskelreparationsprozesse angesehen werden. Dafür spricht auch, dass im Skelettmuskelgewebe dystrophischer *mdx*-Mäuse, welches sich durch kontinuierlich ablaufende Degenerations-Regenerations-Prozesse auszeichnet (Wells und Wells, 2005) eine starke Induktion der *skNAC*-Expression zu beobachten ist (Munz *et al.*, 1999). Schließlich tritt eine abnorme *skNAC*-Expression bei verschiedenen Arten entzündlicher Muskelerkrankungen des Menschen auf (Wiedmann *et al.*, 1994). skNAC spielt also folglich sowohl eine Rolle bei der *de novo*- Skelettmuskeldifferenzierung als auch bei der Muskelregeneration.

Vor einigen Jahren wurde mithilfe des GAL4 Hefe-2-Hybrid-Systems (yeast-two-hybrid) ein spezifischer Interaktionspartner von skNAC identifiziert: Smyd1/mBop (Sims *et al.*, 2002). Das *Bop*-Gen kodiert für Proteine, welche besonders in Herz- und Skelettmuskelzellen (*muscle-Bop*, *m-Bop*), aber auch in zytotoxischen T-Lymphozyten (*t-Bop*) exprimiert werden (Hwang und Gottlieb, 1997, Sims *et al.*, 2002). Dabei werden die entsprechenden Gene bereits in den jeweiligen Vorläuferzellen exprimiert, also noch bevor eine Differenzierung dieser Zellen stattgefunden hat (Gottlieb *et al.*, 2002). Diese Proteine haben transkriptionsregulierende Eigenschaften durch Chromatinveränderungen (Sims *et al.*, 2002). Von m-Bop sind weiterhin die beiden Isoformen m-Bop1 und m-Bop2 bekannt, wobei es sich bei m-Bop2 um eine Isoform von m-Bop1 handelt, die durch den Wegfall von 13 Aminosäuren entsteht.

Smyd1/m-Bop spielt allgemein eine wichtige Rolle bei der Kardiogenese (Sims *et al.*, 2002). Es handelt sich hierbei um eine herz- und skelettmuskelspezifische Histon-Methyltransferase, welche sowohl eine Rolle bei der Muskeldifferenzierung als auch bei der Muskelkontraktion spielt (Tan *et al.*, 2006). Für die korrekte Entwicklung der einzelnen Herzkammern sind unterschiedliche Faktoren zuständig, beispielsweise die *basic helix-loop-helix* Transkriptionsregulatoren *Hand1* für die linke Herzkammer und *Hand2* für die rechte Herzkammer, welche wiederum von *m-Bop* abhängig sind. Dies wurde besonders deutlich, als Gottlieb *et al.*, 2002, *Bop*^{-/-}-null-Mäuse untersuchten: die entsprechenden Embryos sterben ca. an Tag 10,5 *in utero* aufgrund des Versagens bzw. des völligen Fehlens der rechten Herzkammer, starken Veränderungen im linken Ventrikel (u.a. sehr geringe Trabekelbildung) sowie großer Mengen an extrazellulärer Matrix im gesamten Herzmuskel (*cardiac jelly*).

Um zu untersuchen, ob m-Bop und skNAC auch in Säugerzellen miteinander interagieren, wurden von Sims *et al.*, 2002, zusätzlich Immunoprecipitationsassays durchgeführt. Dabei

ergab sich, dass beide m-Bop-Isoformen (m-Bop1 und m-Bop2) mit skNAC interagieren. α NAC zeigt keine Interaktion mit m-Bop. Weiterhin untersuchten Sims *et al.* 2002 das Expressionsmuster von *skNAC* und *m-Bop* in differenzierenden C2C12-Zellen. 24 h nach Differenzierungsinduktion wird *m-Bop* auf Proteinebene stark exprimiert, das skNAC-Protein ist zu diesem Zeitpunkt dagegen nur schwach detektierbar. Jedoch zeigten beide ein Expressionsmaximum bei 48 h nach Differenzierungsbeginn. Somit spielen beide Proteine wahrscheinlich eine Rolle bei der frühen Myoblastendifferenzierung. Im Verlauf der Zelldifferenzierung sank der m-Bop-Proteinspiegel nach 48h leicht ab, die *m-bop*-Expression blieb jedoch insgesamt für die darauffolgenden 2 Wochen nach Differenzierungsbeginn stabil. Die Expressionsrate von *skNAC* blieb zwar bis 6 Tage nach Differenzierungsbeginn hoch mit einem Peak nach ca. 48 h, war nach 2 Wochen jedoch kaum noch detektierbar. Sims *et al.* untersuchten 2002 zusätzlich die Lokalisation von m-Bop und skNAC innerhalb der C2C12-Zellen mittels Immunfluoreszenz: 24 h nach Differenzierungsinduktion befinden sich sowohl m-Bop als auch skNAC im Zellkern und im Zytoplasma. Nach 96 h waren beide Proteine überwiegend im Zytoplasma lokalisiert und kaum noch im Zellkern vorhanden. Daher lässt sich schließen, dass im Verlauf der Myoblastendifferenzierung eine Translokation von m-Bop und skNAC aus dem Zellkern ins Zytoplasma erfolgt.

Zusätzlich beschrieben und untersuchten Park *et al.* 2010 die Interaktion zwischen skNAC und Smyd1/m-Bop. Eine gezielte Unterbindung der *skNAC*-Expression in Mäusembryos führte teilweise zum embryonalen Tod an Tag E12,5. Die betroffenen *skNAC-knockout*-Embryos wiesen eine ventrikuläre Hypoplasie mit verringerter Trabekulation sowie schwacher septaler Entwicklung auf. Eine Hemmung der *Smyd1/m-Bop*-Genexpression im Herzen führte interessanterweise zu einem sehr ähnlichen Phänotypus (Park *et al.*, 2010), was wiederum für einen funktionellen Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen spricht. In beiden Fällen war zusätzlich die *myoglobin*- und die *IRX4*-Genexpression vermindert (Park *et al.*, 2010). Park *et al.* vermuteten bereits 2010 eine Rolle für skNAC bei der Bereitstellung von oder beim Wachstum von Muskelzellen aus dem Muskelvorläuferpool.

Eine Inhibierung der *Smyd1*-Genexpression bei Zebrafischembryos mittels siRNA-Behandlung führte weiterhin zur Entwicklung von Individuen, welche nicht fähig waren zu schwimmen bzw. keinen Herzschlag aufwiesen. Die ungeordneten Muskelzellen erschienen unreif besaßen einen zentralen Zellkern (Tan *et al.*, 2006).

All diese Daten lassen darauf schließen, dass skNAC und Smyd1 miteinander interagieren und eine wichtige Rolle bei der Kardiomyozytendifferenzierung und -reifung spielen könnten.

Li *et al.*, konnten schließlich 2009 zeigen, dass eine Repression der *skNAC*-Expression in *knockdown*-Tieren (Zebrafische bzw. Zebraquärlinge) zu Skelettmuskeldefekten wie ungeordneten Filamenten, kaum vorhandenen Muskelkontraktionen und Paralysen, erniedrigtem Myosinprotein-Gehalt (verminderter Gehalt an Myosin-heavy-chain (MyHC) auf Proteinebene, nicht jedoch auf RNA-Ebene), teilweise zu Herzödemen und stets verfrühtem Tod der Tiere zwischen Tag 5 und 6 p.f. führt. Vermutlich blieb die physiologische Faltung der MyHC-Proteine und somit die Bildung von geordneten Filamenten in den Muskelfasern durch die Abwesenheit von skNAC aus. Dies könnte auf eine mögliche Funktion von skNAC als molekulares Chaperon bei der Proteinfaltung bzw. Proteinstabilisierung hinweisen (Li *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu hat die Überexpression von *NACA* und *skNAC* keinen Effekt auf die Myofibrillenordnung im Zebrafisch (Li *et al.*, 2009). Interessanterweise kommt es in den Zebrafischembryos während der Myozytendifferenzierung - ähnlich wie bereits für das murine skNAC und m-Bop gezeigt (Sims *et al.*, 2002) - zu einer Translokation des NACA-Proteins aus dem Zellkern ins Zytoplasma, während skNAC nur im Zytoplasma nachzuweisen ist (Li *et al.*, 2009).

1.3 In dieser Arbeit verwendete myogene Differenzierungsmarker

Bestimmte Substanzen, meist Proteine, werden während der Muskelzellbildung und -reifung zu ganz bestimmten Zeitpunkten oder über Zeitabstände und in ganz spezifischen Konzentrationen gebildet. Solche bekannten Expressionsmuster kann man sich zunutze machen, indem man beispielsweise anhand der Detektion (RNA- oder Proteinebene) dieser sogenannten Marker den Erfolg der Differenzierung von Zellen überprüfen kann. Als klassische Differenzierungsmarker für die in dieser Arbeit genutzten C2C12-Zellen gelten u.a. Myogenin, p21, MyHC, Desmin, Caveolin-3, Entactin-1 und auch α -Actinin. Generell war es im Rahmen dieser Arbeit von Interesse zu untersuchen, ob skNAC als skelettmuskelspezifisches Protein einen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Expressionsrate dieser myogenen Marker hat oder nicht.

1.3.1 Myogenin

Myogenin ist ein Mitglied der Gruppe von wichtigen Transkriptionsfaktoren, die bei der Skelettmuskeldifferenzierung eine wesentliche Rolle spielen (siehe 1.1). *Myogenin* wird erst nach Determinierung und Einleitung der Differenzierung der Myoblasten exprimiert. Solange der Myoblast proliferiert, wird kein Myogenin gebildet. Das Protein ist in differenzierenden C2C12-Zellen bereits ca. 12 h nach Differenzierungsinduktion detektierbar (Langley *et al.*, 2002).

1.3.2 p21

P21 ist ein Zellzyklus-regulierendes Protein. Es inhibiert die *cyclin dependent kinases* (CDKs) und hemmt somit die Proliferation der Zellen bzw. fördert den Ausstieg der Zellen aus dem Zellzyklus, was während der Myogenese für die Muskelzelldifferenzierung notwendig ist. (Löffler *et al.*, 2006, Kitzmann und Fernandes, 2001). Daher dient *p21* als inverser Proliferationsmarker bzw. indirekter Differenzierungsmarker. In der C2C12-Zelllinie steigt die Expression von *p21* ca. 24 h nach Differenzierungsbeginn an. (Moran *et al.*, 2002, Tomczak *et al.*, 2004). Eine Dysregulation der p21-Aktivität ist ein Kennzeichen von neoplastisch veränderten Zellen (Xiong *et al.*, 1993).

1.3.3 Myosin-Heavy-Chain

Das *Myosin-heavy-chain* (MyHC)-Protein ist ein wichtiger Bestandteil des muskulären Myosins eukaryotischer Zellen. Durch dessen Interaktion mit Aktin sowie seiner ATPase-Aktivität nimmt es eine zentrale Rolle bei der Muskelkontraktion ein (Eisenberg und Greene, 1980). Ein jedes Myosinmolekül besteht aus zwei schweren (*Myosin-heavy-chain*, MyHC) und vier leichten Ketten (*Myosin-light-chain*, MyLC). Die schweren Ketten bilden neben dem alpha-helikalen gewundenen Molekülschwanz, welcher die Muskelfilamente bildet, die kugelförmige „Kopf-Region“ aus. In ihr steckt die Fähigkeit der Energieübertragung während der Muskelaktion (Weiss und Leinwand, 1996). Anhand des Grades der ATPase-Aktivität in diesen Kopfdomänen und somit der Kontraktionsgeschwindigkeit werden die Muskelfasern in schnelle und langsame unterteilt (Wright *et al.*, 1997). Diese Parameter werden durch die jeweilige Expression der unterschiedlichen *MyHC*-Gene bestimmt (Talmadge *et al.*, 1995, siehe auch weiter unten).

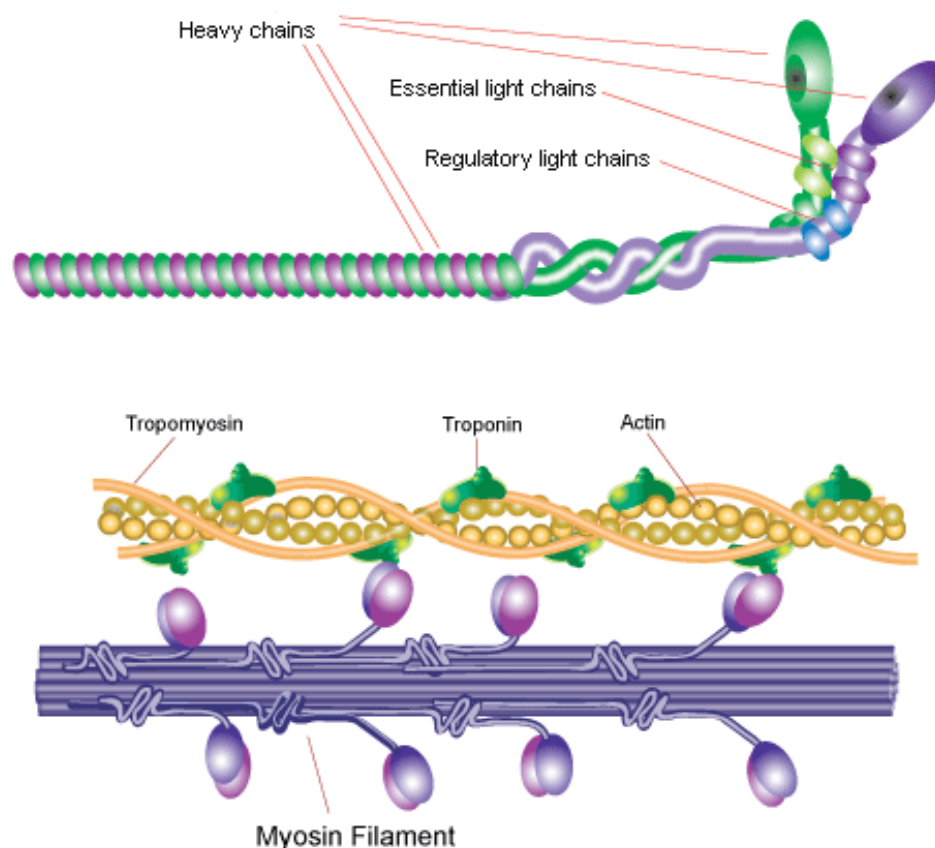


Abbildung 5: Darstellung des strukturellen Aufbaus einer Muskelfaser (Quelle: Sigma-Aldrich)

Es existieren drei MyHC-Isoform-Gruppen, welche nach ihrem räumlichen Vorkommen eingeteilt werden: nicht-muskulär, in quergestreifter und in glatter Muskulatur vorkommend. In diesen drei Gruppen wiederum gibt es verschiedene Isoformen, welche entwicklungsabhängig exprimiert werden. Innerhalb der Gruppe der in quergestreiften Muskeln vorkommenden Formen sind das embryonale MyHC (MyHC-3), das perinatale MyHC, das extraokuläre, das adulte (MyHC-1) sowie das kardiale MyHC (MyHC-2) zu nennen.

Li *et al.* gelang es 2009 mithilfe von *splicing*-Blockern einen *skNAC-knockdown*-Embryo im Zebrafischmodell zu generieren. Bei Untersuchungen dieser Embryos mittels *Western Blot*-Analyse wurde eine Reduzierung des Gehalts an MyHC-Protein bemerkt. Weiterhin wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich die Anordnung der dicken Filamente in den langsamen Muskelzellen als gestört. Das MyHC-Signal bei der Immunhistochemie war schwächer als bei den Kontrollen. Interessanterweise konnte jedoch beim *MyHC*-mRNA-Gehalt der Fischembryos keine Verminderung festgestellt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit die Zelllysate der transfizierten C2C12-Zellen ebenfalls sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene auf die Expression von *MyHC-1* hin untersucht.

1.3.4 Desmin

Desmin ist neben verschiedenen Keratinen, Vimentin, Neurofilamenten und Gliafilamenten ein Protein der Klasse der Intermediärfilamente, welche im Zytoplasma von höheren Eukaryonten vorkommen. Im Gegensatz zu den anderen Intermediärfilamenten kommt Desmin vor allem in Muskelzellen (glatten und quergestreiften) und Endothelzellen vor, wobei üblicherweise zwei verschiedene Arten von Filamenten in einer Zellart anzutreffen sind (Lazarides, 1980). Desminfilamente vernetzen wahrscheinlich *cytoplasmatic dense bodies* mit membrangebundenen *dense-plaques* (Lazarides, 1980) bzw. Sarkomeren (Costa *et al.*, 2004), wobei auch Actin-Filamente eng neben Desmin in dieses Netzwerk eingefügt sind. Weiterhin ist Desmin neben α -Actinin und Actin Bestandteil der Z-Linie in der quergestreiften Muskulatur (Lazarides, 1980). Aber auch bei der Positionierung von Mitochondrien innerhalb der Zelle soll Desmin eine Rolle spielen (Costa *et al.*, 2004). *Desmin* wird zeitgleich mit der ersten Muskelzellformation während der Embryogenese exprimiert (Costa *et al.*, 2004), eventuell sogar als eines der ersten exprimierten Gene parallel mit *MyoD* und *Myf5* während der Myogenese (Kaufman und Foster, 1988) oder sogar schon vorher (Maley *et al.*, 1994), wobei Desmin dann auch im Kern angetroffen wird. Aber auch in adultem Muskelgewebe ist es detektierbar (Lawson-Smith und McGeachie, 1998). Das zeitliche sowie quantitative Expressionsmuster von *Desmin* variiert innerhalb verschiedener Spezies (Allen *et al.*, 1991). In Mäusemyoblasten liegt Desmin zunächst strahlenförmig und über die Zelle verteilt vor. Im Verlauf der Myoblastenfusion akkumuliert Desmin und wird organisiert (Kaufmann und Foster, 1988), sodass es sich in gereiften Muskelzellen vornehmlich entlang der Z-Linien und Verbindungsmyofibrillen findet (Lawson-Smith und McGeachie, 1998). Da die *Desmin*-Expression als Charakteristikum für replizierende Säugermioblasten angesehen wird (Kaufmann und Foster, 1988), wird Desmin als Myoblastenmarker in Säuger-Skelettmuskelzelllinien benutzt.

1.3.5 Caveolin-3

Caveolin-3 ist ein muskelspezifisches Protein der Caveolin-Multigenfamilie. Es ist Bestandteil der Zellmembran und verantwortlich für die Bildung der sog. Caveolen, welche als Mikrodomänen in der Plasmamembran Interaktionspartner für verschiedene Signal- sowie Strukturproteine darstellen, aber auch bei Transportprozessen beteiligt sind (Song *et al.*, 1996, Anderson, 1998). Weiterhin ist es mit Dystrophin im Sarkolemm kolokalisiert. Während der Myogenese wird *Caveolin-3* in Myoblasten zunächst kaum bzw. nicht exprimiert, seine Expressionsrate steigt jedoch mit Beginn und im Verlauf der Differenzierung stark an (Song *et al.*, 1996).

1.3.6 Entactin-1

Entactin-1 und Entactin-2 sind Proteine, welche Bestandteile fast aller Basalmembranen sind. Beide Entactine binden an verschiedene Strukturen der Basalmembran und vernetzen sie so untereinander. Neben dieser Aufgabe haben sie aber auch eine Funktion bei der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten, bei der Regulierung verschiedener Zellbindungen, bei der Angiogenese sowie bei der Osteoblastendifferenzierung (Neu *et al.*, 2006). In adultem Herz- sowie Skelettmuskelgewebe unterscheidet sich das Expressionsmuster der beiden *Entactin*-Gene, sodass hier auf unterschiedliche Funktionen der beiden Isoformen geschlossen werden kann (Neu *et al.*, 2006). Neu *et al.* konnten 2006 zeigen, dass die *Entactin-1*-Expression nach Induktion der Differenzierung sinkt, wogegen die Expression von *Entactin-2* während der Differenzierung ansteigt. Somit können beide Entactine als myogene Differenzierungsmarker dienen. Die transfizierten Zellen dieser Arbeit wurden auf die *Entactin-1*-Expression hin untersucht.

1.3.7 α -Actinin

α -Actinin ist ein Actin-bindendes Protein und spielt eine Rolle bei der Bildung und struktureller Aufrechterhaltung des Zytoskeletts der Zellen (Lek *et al.*, 2006). Es vernetzt die Actin-Filamente mit Integrin (Glück und Ben-Ze'ev, 1994). Bei Vertebraten gibt es vier verschiedene Genvarianten: α -Actinin-1 bis 4. Die entsprechenden Gene werden in hohem Maße in der Muskulatur exprimiert und stellen den größten strukturellen Anteil der

kontraktilen Elemente der Z-Linien in Skelettmuskelfasern bzw. der *dense bodies* in glatten Muskelzellen. Zu den Interaktionspartnern zählen neben Actin, Titin und Myotilin auch Proteinbindungsdomänen anderer Proteine. α -Actinin-2 ist relativ ubiquitär exprimiert, das Protein findet sich in allen Skelettmuskeln sowie in der Herzmuskulatur, aber auch im Gehirn (Lek *et al.*, 2006). Dagegen hat α -Actinin-3 ein eher begrenztes Expressionsmuster: es wird nur in schnellen glykolytischen Skelettmuskelfasern exprimiert und nur zu einem geringen Anteil im Gehirn. Zusätzlich existieren zwei Isoformen von α -Actinin-2.

Li *et al.* beschrieben 2009 bei *skNAC-knockdown*-Zebrafischembryos eine völlige Unterbrechung der Anordnung und Organisation dicker Filamente in langsamen Muskelfasern. Die betroffenen Muskelfasern haben nur einen großen, zentralen Kern, was als Charakteristikum von unreifen Muskeln gilt. Weiterhin kommen kaum bzw. nur wenige dünne Filamente in den betroffenen Embryonen vor, sodass vermutet wird, dass skNAC auch für die physiologische Organisation der dünnen Filamente zuständig und notwendig ist. Jedoch war die Anwesenheit und ordnungsgemäße Anordnung von α -Actinin im Bereich der Z-Linie nicht beeinflusst oder abnormal.

1.4 Cocksackieviren- induzierte inflammatorische Kardiomyopathie

Die inflammatorische Kardiomyopathie ist eine Herzmuskelentzündung, die zu einer kardialen Dysfunktion führen kann. Unter einer Myokarditis wiederum versteht man allgemein eine entzündliche Schädigung von Myozyten. Eine Infiltration der Herzmuskelzellen mit Immunzellen kann dabei ursächlich oder auch reaktiv erfolgen. Als Antwort auf eine Herzmuskelschädigung erfolgt generell ein „interstitielles Remodelling“, wobei Bindegewebe als Ersatzstoff für das geschädigte Gewebe produziert und in den Herzmuskel eingebaut wird (Fibrosierung), was zu einer Reduzierung der Funktionsfähigkeit führt.

Als Ursache für eine Myokarditis kommen neben Toxinen und Bakterien diverse Viren wie beispielsweise Adenoviren, das Parvovirus B19, das Epstein-Barr-Virus, verschiedene Herpesviren oder auch das Hepatitis-C-Virus in Frage (Kandolf *et al.*, 2008). Von besonderer Bedeutung sind hierbei jedoch die Cocksackieviren der Gruppe B.

Enteroviren schädigen das Gewebe direkt durch Lyse der befallenen Myozyten. Parvoviren, insbesondere PB 19, infizieren Endothelzellen von intercardialen Arteriolen und Venulen,

wodurch es zu einer Beeinträchtigung der Mikrozirkulation kommt, was wiederum zu einer sekundären Nekrose der Myozyten führt (Klingel *et al.*, 2004).

Das Coxsackievirus ist ein Enterovirus und gehört zu der Familie der Picornaviridae. Es kann neben einer Myokarditis auch an der Entstehung einer Hepatitis oder einer Pankreatitis ursächlich beteiligt sein (McManus *et al.*, 2002). Beim Menschen stellen Coxsackieviren des Types 3B (CVB-3) die häufigste Ursache für entzündliche Kardiomyopathien dar (Maze und Adolph, 1990, Kandolf *et al.*, 2008, Yuan *et al.*, 2009).

Die Entwicklung der CVB-3-bedingten Myokarditis lässt sich in drei Stadien unterteilen (McManus *et al.*, 2002): zuerst erfolgt nach Eindringen des Virus in den Körper eine Verteilung über den Blutstrom (Virämie). Somit gelangt das Virus zu seinen Zielorten, zu welchen neben dem Herzen auch das Gehirn oder innere Organe zählen. Im Herzen angelangt dringt das Virus in die Myozyten ein und schädigt sie dabei. Voraussetzung für eine Infektion ist die Bindung des Virus an zelluläre Rezeptorproteine. Humane Myozyten besitzen vor allem im Bereich der Glanzstreifen (Selinka *et al.*, 2004) einen Rezeptor für Coxsackieviren und für das Adenovirus 2 und 5, das sog. „CAR-Protein“ (Coxsackie-Adenovirus-Rezeptorprotein), welches nach Bindung des Virus dessen Endozytose in die Zelle erlaubt (Kandolf *et al.*, 2008). Nach darauffolgendem *uncoating* wird die virale RNA in der Zelle freigegeben. Der hämatogenen Ausbreitung des Virus im Körper folgt dann auch die Zell-zu-Zell-Ausbreitung und somit die konsekutive Zunahme der Organinfektion (Kandolf *et al.*, 2008).

Immunzellen des Wirtes erkennen das Virus als Fremdkörper und aktivieren zunächst die unspezifische und später auch die spezifische zelluläre Immunabwehr, wobei u.a. Interleukine und Interferone als Mediatoren agieren und die Immunzellen aktivieren und an ihren Einsatzort locken (Sallusto *et al.*, 2000). Leukozyten (besonders zytotoxische T-Zellen) und mononukleäre Entzündungszellen versuchen, das Virus unschädlich zu machen. Dabei kommt es jedoch auch zu einer starken Schädigung des eigenen Gewebes (McManus *et al.*, 2002, Kandolf *et al.*, 2008). Laut Chow *et al.* (1992) und Henke *et al.* (1995) entwickelt sich die Myokarditis durch die direkte Schädigung des Gewebes durch das zytolytische Virus. Heute jedoch gilt die Auffassung, dass die durch das Virus ausgelöste zellvermittelte Immunantwort der Hauptgrund für die Entstehung der Herzmuskelentzündung ist (Kandolf *et al.*, 2008, McManus *et al.*, 2009). *Knockout*-Mäuse, welche keine oder nur sehr geringe Mengen an T-Zellen bilden können, entwickeln keine so starken Entzündungsbilder bzw. Herzveränderungen nach Inokulation mit dem CVB-3-Virus wie die Kontrolltiere (Opavsky

et al., 1999). Jedoch konnten Mason *et al.* 1995 beim Menschen keinen Vorteil einer immunsupprimierenden Therapie nachweisen.

Die dritte Phase der Myokarditis stellt die Phase der Reparatur und Gewebsumordnung dar. Hierbei wird nach Beseitigung des Virus das zerstörte Gewebe durch Bindegewebe ersetzt: es kommt zur Fibrosierung und somit zur Narbenbildung. Abhängig vom Ausmaß der ursprünglichen Gewebeschädigung kann die Myokarditis durch die Vernarbung zu einer Funktionsstörung des Herzens führen. In manchen Fällen wie zum Beispiel erhöhter Viruslast, Immuninkompetenz oder prädisponierender genetischer Faktoren (Kandolf *et al.*, 2008) kommt es jedoch nicht zu einer vollständigen Eliminierung des Virus, da dieses sich der Wirtsabwehr entziehen kann (Klingel *et al.*, 1992). Dieser Prozess wird durch die zytolytischen Eigenschaften und auch durch die hohe genetische Variabilität des CVB-3-Virus begünstigt. Diese Variabilität beruht darauf, dass die RNA-abhängige RNA-Polymerase des Virus keine „*proof-reading*“-Aktivität besitzt. Dadurch werden Mutationen seltener erkannt und somit begünstigt. Es kann sich somit auch eine persistierende Virusinfektion (Easton und Eglin, 1988) mit restringierender Virusreplikation (Kandolf *et al.*, 2008) entwickeln, welche klinisch zu einer chronischen Myokarditis führt. Die virale Persistenz des Virus kann schwerwiegende Folgen mit sich bringen. Durch die Interaktion des Virus mit den Immunzellen kann es zu einer großflächigen Verteilung des Virus und somit der Infektion im gesamten Körper kommen. Weiterhin können Fehlfunktionen des Immunsystems auftreten (Klingel *et al.*, 1996). Häufig hat eine persistierende CVB-3-Infektion und damit eine chronische Myokarditis eine dilatative Kardiomyopathie (DCM) zur Folge (Kandolf und Hofschneider, 1989, McManus und Kandolf, 1991), was für das betroffene Individuum i.d.R. eine Leistungseinbuße darstellt.

Das *skNAC*-Gen wird ausschließlich in Skelett- und Herzmuskelzellen exprimiert. Somit eignete sich das in dieser Arbeit untersuchte Modellsystem der durch Coxsackieviren induzierten inflammatorischen Kardiomyopathie besonders gut für die erfolgten Untersuchungen, da diese Viren im Gegensatz zu anderen kardiotropen Viren ausschließlich die Kardiomyozyten befallen (das Parvovirus B19 z.B. auch die Endothelzellen der Kardiomyozyten) (Klingel *et al.*, 2004).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mäusestämmen handelte es sich um *A.BY/SnJ* (im weiteren Verlauf ABY genannt) sowie um *C57BL/6* (im weiteren Verlauf BL6 genannt). Beide Stämme gelten als permissiv für eine CVB-3-Infektion, jedoch ist der ABY-Mäusestamm im Gegensatz zum BL6-Mäusestamm nicht in der Lage, das Virus in der akuten

Entzündungsphase zu eliminieren und bildet somit ein chronisches Erkrankungsbild aus (Klingel *et al.*, 2004).

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, wie sich eine Hemmung der *skNAC*-Expressionsrate auf die Muskelzellendifferenzierung im murinen C2C12-Skelettmuskelmodell auswirken könnte und ob auf Interaktionen mit unterschiedlichen, bei der Myogenese beteiligten Proteinen geschlossen werden kann. Weiterhin sollte überprüft werden, wie sich das zeitliche und räumliche Verteilungsmuster von *skNAC* in mit Coxsakievirus-B infizierten Mäuseherzen darstellt. Aufgrund der Vorarbeiten unseres Labors, die auf RNA-Ebene eine verstärkte Expression des *skNAC*-Gens in einem suszeptiblen gegenüber einem nicht-suszeptiblen Mausstamm sowie eine generelle Repression der *skNAC*-Expression nach Infektion gezeigt hatten, sollte untersucht werden, ob sich diese Unterschiede auch auf Proteinebene nachweisen lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose MP	Roche, Mannheim
ϵ -Aminocaprinsäure	Sigma, Steinheim
Ampicillin	Sigma, Steinheim
Ammoniumperoxoddisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bacto Trypton	Roth, Karlsruhe
BD Microlance 3 Spritzenkanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Plastipak 1 ml Einwegspritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
CDP-Star	Roche, Mannheim
Cell Freezing Medium-DMSO (1x)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chromatographiepapier (3mm)	Whatman, Maidtstone, GB
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories, Austria
ECL-Detektionsreagenzien	Amersham, Braunschweig
Einmalpipetten costar Strippetten®	Corning, New York
Entwickler für Röntgenfilme	Kodak GBX, Rochester, USA
Eppendorff-Gefäße (1,5 μ l, 2 μ l)	Eppendorff, Hamburg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe

Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Falcon Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
First strand buffer, 5x	Roche, Mannheim
Fixierer für Röntgenfilme	Kodak GBX, Rochester, USA
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Hybond®-N Membran	Amersham, Braunschweig
Hybond®-P Membran	Amersham, Braunschweig
Hybridisationsbeutel	Roche, Mannheim
Interferin Transfektionsreagenz	Polyplus, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kryo-Röhrchen	TPP, Trasadingen, CH
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid 25 mM	Fermentas, St.Leon-Roth
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Merck, Darmstadt
3-(N-morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
N-Lauroylsarcosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumascorbat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe

Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel, Braunschweig
Orange G	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PCR-Puffer, 10 x	Roche, Mannheim
Penicillin	Biochrom, Berlin
Phenol	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Polaroid-Filme (3000 ASA)	Polaroid, St. Albans, UK
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Precision plus dual Proteingrößenmarker	BioRad, München
Protease Inhibitor Complete	Roche, Mannheim
RNase Inhibitor	Roche, Mannheim
Röhrchen, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
siPORT™NEOFX™Transfektionsreagenz	Ambion.Inc, Huntington, UK
Streptomycin	Biochrom, Berlin
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween20	Roth, Karlsruhe
Ultra Pure Water	Biochrom, Berlin
Xylol	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	Biochrom, Berlin
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	Nunc, Dänemark
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, CH
Zellkultur-Testplatten	TPP, Trasadingen, CH
Zellschaber	TPP, Trasadingen, CH

2.1.2 Enzyme

DNA-Restriktionsendonukleasen (Bam HI, EcoRI) und Puffer	Fermentas, St.Leon-Rot
DreamTaq™ DNA-Polymerase und Puffer	Fermentas, St.Leon-Rot

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Primäre Antikörper

Anti- α -Tubulin, aus Maus	Santa Cruz, USA
Anti-Actin, aus Maus	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Caveolin 3, aus Maus	Santa Cruz, USA
Anti-Desmin, aus Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
Anti- Myosin heavy chain, aus Maus	Novus Biologicals, Littleton
Anti-Nidogen1, aus Kaninchen	Biozol, Eching
Anti-p21, aus Maus	Santa Cruz, USA
Anti-RIP 2, aus Kaninchen	Santa Cruz, USA
Anti- skNAC, aus Kaninchen	B.Munz, Charité Berlin
Anti-skNAC, aus Kaninchen	Eurogentec (Belgien)

2.1.3.2 Sekundäre Antikörper

anti-Digoxigenin-AP	Roche, Mannheim
Esel-anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-gekoppelt (ECL)	Amersham, Braunschweig
Schaf-anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt (ECL)	Amersham, Braunschweig
FITC (Flourescein-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ - Fragment), Goat-anti-mouse	BD Biosciences, Pharmingen

2.1.4 Oligodesoxynukleotide

Primer der Firma BioTeZ, Berlin, zur Klonierung eines 507 Nukleotide großen Fragmentes (Sequenz siehe Anhang), welches der kodierenden Region der Myosin heavy chain-1-mRNA der Maus entspricht:

Myhc1(5′): 5′-GCG GGA ATT CAT GAG TTC CGA CGC CGA G-3′

Myhc1(3′): 5′-GCG GGG ATC CAT CTG TCA GCA TGA ACT GGT-3′

2.1.5 Accession number der MyHC-Sequenz

NM_030679.1

2.1.6 Oligonukleotide (siRNAs)

Die verwendete *skNAC*-spezifische siRNA sowie die *srambled*-Kontroll-siRNA wurden von der Firma Sigma-Aldrich nach folgenden Sequenzen angefertigt:

siRNA(5′): 5′-GACAGUCCUGUUGAGAAAUU-3′

siRNA(3′): 5′-UUUCUCAACAGGAACUGUCUU-3′

scr(5′): 5′-CGUACGCGGAAUACUUCGAUU-3′

scr(3′): 5′-UCGAAGUAUCCGCGUACGUU-3′

2.1.7 Vektor

pBluescript SKII(-) (Transkriptionsvektor)

Stratagene, Heidelberg

2.1.8 Kommerzielle „Kits“

BCA*Proteinbestimmungssystem

Pierce,USA

Cell Proliferation ELISA- BrdU (colorimetric)

Roche, Mannheim

DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)

Roche, Mannheim

ECL Advance Western Blotting Detection Kit

GE Healthcare, UK

First strand cDNA Synthesis Kit

Fermentas, St.Leon-Rot

GeneJET™Plasmid Miniprep Kit

Fermentas, St.Leon-Rot

NucleoSpin®Extract II

Macherey-Nagel, Düren

Peroxidase Substrate DAB KIT

Vector Laboratories, USA

QIAGEN Plasmid Midi Kit

Qiagen, Düsseldorf

Rapid DNA Ligation and Transformation Kit

Fermentas, St.Leon-Rot

RNeasy Kit

Qiagen, Düsseldorf

Silencer ® siRNA Transfection II Kit

Ambion Inc.,Huntington,UK

VECTASTAIN Elite ABC Kit

Vector Laboratories, USA

2.1.9 Histologische Schnitte

Paraffinschnitte von Mausherzen

Karin Klingel, Tübingen

2.1.10 Bakterienstämme

E. coli XL1 Blue

Stratagene, Heidelberg

2.1.11 Eukaryontische Zelllinien

C2C12

Mäusemyoblasten, Helen Blau,
Stanford University

H9c2

Rattenmyoblasten, Ingo Morano,
Charité Berlin

2.1.12 RNA

Mouse Developmental Heart total RNA

Zyagen, California, USA

Mouse Developmental Skeletal total RNA

Zyagen, California, USA

2.1.13 Wasser

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Wasser wurde standardmäßig mit der Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Biocel aufbereitet. Dieses Wasser wird in dieser Arbeit als *Aqua destillata* (*Aqua dest.*) bezeichnet. Wasser, das zusätzlich durch den Millipak-40 Endfilter gelaufen war, wird als *Aqua bidestillata* (*Aqua bidest.*) bezeichnet. Wasser, welches für das Arbeiten mit RNA bestimmt war, wurde Diethylpyrocarbonat (DEPC) beigefügt, um eventuell enthaltene RNasen zu inaktivieren. Dazu wurde *Aqua dest.* mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt, mindestens 16 h bei RT unter Rühren auf dem Magnetrührer inkubiert und anschließend zur Inaktivierung des DEPC autoklaviert. Dieses Wasser wird im Folgenden als DEPC-Wasser bezeichnet.

2.1.14 Standardpuffer und Lösungen

PBS (Phosphate- buffered saline):

NaCl 140 mM

KCl 30 mM

Na₂HPO₄ 6,5 mM

KH₂PO₄ 1,4 mM

TAE (Tris-Acetat-EDTA):

Tris-Acetat 0,04 M

EDTA 0,1 mM

TBS-T (Tris-buffered saline+Tween20):

NaCl 0,15 mM

Tris-HCl pH 8,0 0,5 mM

Tween 20 0,05 % (v/w)

20xSSC (Saline-Sodium-Citrate):

NaCl 3 M

Na₃Citrat 0,3 M

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 **Kultivierung und Kryokonservierung eukaryontischer Zellen**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden überwiegend an C2C12-Zellen durchgeführt. Die Myoblastenzelllinie C2C12 entstand durch Immortalisierung von primären murinen Skelettmuskelzellen, welche aus dem Inzuchtstamm C3H isoliert wurden. Sie können durch Serumentzug (siehe 2.2.1.2) *in vitro* zu langgestreckten, mehrkernigen Myotuben differenziert werden, welche kontraktile Eigenschaften aufweisen. Da der Differenzierungsprozess mechanistisch dem *in vivo* beobachteten ähnelt, stellen C2C12-Zellen ein gutes Modellsystem zur funktionellen Analyse der Skelettmuskelzelldifferenzierung *in vitro* dar.

Das für die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten C2C12- und H9c2-Zellen benutzte Medium stellte *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) dar. Diesem wurde Penicillin/Streptomycin (je 100 U/ ml) sowie 20 % (C2C12-Zellen) bzw 10 % (H9c2-Zellen) Fötales Kälberserum (FKS) beigefügt.

C2C12-Proliferationsmedium: DMEM 1 x (1 g/ l Glucose)
FKS 20 %
Penicillin/Streptomycin 0,5 %
L-Glutamin 2 mM

H9c2-Proliferationsmedium: DMEM 1 x (4,5 g/l Glucose)
FKS 10 %
Penicillin/Streptomycin 0,5 %
L-Glutamin 2 mM

Die Aufzucht der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Atmosphäre. Kurz bevor eine vollständige Konfluenz der Zellen erreicht war, wurden sie umgesetzt. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche wurde durch fünfminütige Inkubation mit Trypsin/EDTA im Brutschrank erzielt. Danach wurden die Zellen in frischem Proliferationsmedium aufgenommen, abzentrifugiert, das Zellsediment in einer geeigneten Menge Proliferationsmedium resuspendiert und auf neue Zellkulturgefäße verteilt.

Trypsin/EDTA: Ultra pure water 1 x
Trypsin (w/v) 0,05 %
EDTA 0,02 M

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen nach dem Passagieren in DMSO-haltigem Einfriermedium aufgenommen, in speziellen Einfriergefäßen (Kryoröhrchen) auf Eis möglichst langsam (ca. 1 °C/ min) abgekühlt, für 24 h bei -80 °C und schließlich in Flüssigstickstoff bei -196 °C gelagert.

Einfriermedium C2C12-Zellen: Cell Freezing Medium-DMSO (Sigma-Aldrich)

Einfriermedium H9c2-Zellen: Lösung 1: DMEM + 40 % FKS

Lösung 2: DMEM + 40 % FKS + 20 %DMSO

Bei den H9c2-Zellen wurde zunächst das Zellsediment in einer geeigneten Menge Lösung 1 resuspendiert und anschließend vorsichtig die gleiche Menge von Lösung 2 hinzu gegeben, bevor die Zellsuspension ebenfalls auf Kryoröhrchen verteilt wurde.

Bei Bedarf wurden die eingefrorenen Zellen in den Kryotubes schnell in der Hand und im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, in 20 ml Proliferationsmedium gegeben und abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in geeigneter Menge Medium resuspendiert und für mindestens 24 h in den neuen Kultivierungsbehältnissen belassen.

2.2.1.2 Induktion der Differenzierung der C2C12-Zellen

Um die Differenzierung der C2C12-Zellen einzuleiten, wurde das Proliferationsmedium gegen DMEM mit nur 2 % Pferdeserum (HS) ausgetauscht, welches im Folgenden als C2C12-Differenzierungsmedium bezeichnet wird.

C2C12-Differenzierungsmedium: DMEM 1 x (1 g/1 Glucose, 3,7 g/1 NaHCO₃)
Pferdeserum 2 %
Penicillin/Streptomycin 0,5 %
L-Glutamin 1 %

2.2.1.3 Induktion der Differenzierung der H9c2-Zellen

Um die Differenzierung der H9c2-Zellen einzuleiten, wurde das Proliferationsmedium bei einer Konfluenz von 70-80 % gegen DMEM mit nur 1 % FKS ausgetauscht, welches im Folgenden als H9c2-Differenzierungsmedium bezeichnet wird.

H9c2-Differenzierungsmedium: DMEM 1x (4,5 g/1 Glc, 3,7 g/1 NaHCO₃)
Fetales Kälberserum 1 %
Penicillin/Streptomycin 0,5 %
L-Glutamin 1 %

2.2.1.4 Transfektion der C2C12-Zellen mit siRNA

Zur Untersuchung des Effekts der Repression der *skNAC*-Genexpression wurden die Zellen mit einer *skNAC*-spezifischen siRNA (small interfering RNA) transfiziert. Hierbei handelt es sich um ca. 22 bp kleine RNA-Fragmente, welche spezifisch an die Ziel-mRNA binden und so deren Abbau bedingen. Dieses Verfahren wird auch als posttranskriptionelles *gene-silencing* bezeichnet. Folglich wird bei erfolgreicher Transfektion die zu inhibierende mRNA weniger stark translatiert und das entsprechende Protein weniger stark synthetisiert. Zur Transfektion der zwischen 60 und 80 % konfluenten C2C12-Zellen wurde Interferin Transfektionsreagenz (Polyplus) eingesetzt. Bei der verwendeten siRNA sowie *scrambled*-RNA handelte es sich um von Sigma-Aldrich hergestellte RNA (siehe 2.1.5). Zunächst wurde die Transfektion bezüglich Menge und Konzentration von siRNA und Transfektionsreagenz laut Herstellerangaben durchgeführt. Da sich jedoch verschiedene Zelltypen unterschiedlich gut transfizieren lassen, wurden einige Parameter variiert, damit ein deutlicher Suppressionseffekt zu erkennen war. Letztendlich zeigte sich bei einer siRNA-Konzentration von 10 μ M und einer Transfektionsreagenzkonzentration von 0,75 - 0,8 % ein deutlicher Suppressionseffekt, ohne dass die Zellen einen zu starken Schaden durch die Transfektion davontrugen. Die Zellen wurden nach Zählung in der „Neubauer Zählkammer“ in geeigneter Menge sowohl auf Sechsnapfplatten (150.000 \pm 50.000 Zellen pro Napf), Zwölfnapfplatten (70.000 \pm 25.000 Zellen pro Napf) als auch auf 96-Napfplatten (ca. 5000 Zellen pro Napf) ausgesät und unter den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert. Als die erwünschte Konfluenz erreicht war, wurde die siRNA mit einer geeigneten Menge an Transfektionsreagenz (ca. 0,8 %) gemischt, ca. 10 min bei Raumtemperatur zur Komplexbildung inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Nach 24 h wurde das Proliferationsmedium gegen Differenzierungsmedium ausgetauscht. Je nach Fragestellung wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten RNA-Proben und / oder Proteinproben (bei Doppelansätzen) genommen. Bei Versuchen, die länger als 48 h dauerten, wurde alle 2 Tage das Differenzierungsmedium erneuert.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

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

Um *E.coli*-Kulturen in LB-Flüssigmedium zu erhalten, wurde ein Erlenmeyerkolben mit sterilem LB-Medium und Bakterien über Nacht unter starkem Schütteln bei 37 °C inkubiert.

LB-Medium: Bacto Trypton (w/v) 1 %
 Hefeextrakt (w/v) 0,5 %
 NaCl (w/v) 1 %

Transformierte *E.coli*-Bakterien wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert und ebenfalls über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Herstellung der Platten wurde LB-Flüssigmedium vor dem Autoklavieren mit 1,5 % (w/v) Agar versetzt, nach dem Autoklavieren auf etwa 50 °C abgekühlt, mit Antibiotikum (Ampicillin- Endkonzentration 100 µg/ ml) versetzt und anschließend in sterile Petrischalen gegossen. Die Platten wurden nach dem Erkalten bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.2.2 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien des Stammes *DH5α* wurde eine frische Übernachtskultur 1:100 mit LB-Medium verdünnt und unter Schütteln bei 37 °C so lange inkubiert, bis eine OD₆₂₀ von 0,4 bis 0,5 erreicht war. Nach Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 2500 Upm) wurde das Sediment vorsichtig in einem Viertel des ursprünglichen Volumens in kalter, steriler 0,1 M Magnesiumchloridlösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde wie oben zentrifugiert und das Sediment in einem Fünfzigstel des ursprünglichen Volumens in kalter, steriler 0,1 M Calciumchloridlösung resuspendiert. Nach 3-4 h Inkubation im Eisbad wurde steriles 87 %iges Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 30 % zugegeben. Die Bakterien wurden aliquotiert bei -80 °C gelagert.

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

200 µl transformationskompetente *E.coli*-Bakterien (siehe 2.2.2.2) wurden langsam im Eisbad aufgetaut und ein Ligationsansatz (siehe 2.2.3.5) oder eine geringe Menge Plasmid-DNA (50-100 ng) hinzupipettiert, sofort vorsichtig vermischt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Wärmeschock (45 sec.) im Wasserbad (42 °C) wurde der Transformationsansatz sofort wieder für mindestens 5 min auf Eis gestellt und danach mit 600 µl LB-Medium ohne Ampicillin versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C im Brutschrank unter Schütteln wurden ca. 200 µl der transformierten Bakterien auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Parallel dazu wurde stets eine Negativ-Kontrolle mit nicht transformierten Bakterien mit

angesetzt. Nach 16-20 h Inkubation bei 37 °C waren auf den Platten mit den transformierten Bakterien einzelne Bakterienkolonien zu erkennen, wobei jede Kolonie ursprünglich einer einzelnen transformierten Zelle entstammte. Das zur Transformation verwendete Plasmid pBluescript SK II- (-) enthält ein Gen für Ampicillinresistenz, so dass die ursprünglich ampicillinsensitiven Bakterien nur nach Aufnahme des Plasmids auf der Agarplatte wachsen können. Einige dieser Kolonien wurden in 2-5 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und weitere 16-20 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Plasmid-DNA wie unter 2.2.3.2 beschrieben isoliert.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 DNA-Isolierung aus transformierten *E.coli*-Bakterien

2.2.3.1.1 Plasmid-Schnellpräparation aus 2-5 ml-Kulturen

Zur Gewinnung kleiner Mengen an Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien durch alkalische Lyse, Bindung der DNA an eine Membran sowie anschließende Reinigung durch verschiedene Waschschrte wurde das „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ der Firma Fermentas entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.3.1.2 Plasmid-Präparation mit dem QIAGEN-Plasmidkit

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren wurden 25 ml bzw. 100 ml einer frischen *E.coli*-Übernachtskultur verwendet. Mit Hilfe des Plasmid Midi Kits (Qiagen, Düsseldorf) wurde die DNA entsprechend den Angaben des Herstellers aufbereitet.

2.2.3.2 In vitro-Reaktionen an DNA

2.2.3.2.1 Polymerasekettenreaktion

Die PCR dient der selektiven Amplifizierung bestimmter bekannter DNA-Fragmente aus einer DNA-Matrize. Hierbei dienen spezifische Oligonukleotide als Primer, welche die zu amplifizierende Region flankieren und den Beginn der Transkription einleiten. Die beiden DNA-Stränge werden unter Hitzeeinwirkung (4 min 95 °C) voneinander getrennt, sodass sich bei der nachfolgenden Abkühlung auf 50-60 °C die im Überschuss vorhandenen Primer an die komplementären DNA-Sequenzen beider DNA-Stränge binden können (Anlagerung). Die

entsprechenden Desoxynukleotide (dNTPs) werden durch die DNA-Polymerase bei 72 °C komplementär zu den beiden ursprünglichen DNA-Strängen von 5' in 3'-Richtung aus aneinandergereiht. Damit ist der gewünschte DNA-Abschnitt verdoppelt worden. Mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase, aus Archaeobakterium *Thermophilus aquaticus*) kann dieser Vorgang mehrmals hintereinander wiederholt werden. So werden die gewünschten DNA-Abschnitte exponentiell amplifiziert.

Für die PCR wurde in dieser Arbeit das Rapid Ligation and Transformation Kit (Fermentas) verwendet.

Reaktionsansatz:

H ₂ O millipore	13,5 µl
Dream Taq Buffer	2 µl
Desoxynukleotide (dNTPs) (250µmol)	2 µl
5'-Primer sense (25pmol)	0,5 µl
3'-Primer antisense (25pmol)	0,5 µl
cDNA	1 µl
Dream- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1U)	0,5 µl

Der Reaktionsansatz von 20 µl wurde in sterile, verschließbare Reaktionsgefäße pipettiert. Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis. cDNA und *Taq*-Polymerase wurden zuletzt und kurz vor dem Erhitzen hinzugegeben. Um eventuelle Verunreinigungen auszuschließen wurde stets ein Kontrollansatz (ohne cDNA) mitgeführt.

Die PCR wurde im PCR-Gerät *Primus evolution 25/96* der Firma Clemens (Waldbüttelbrunn) durchgeführt. Die erste Denaturierungsphase dauerte 4 min, danach sahen die Zyklen wie folgt aus:

1 min bei 94 °C (Denaturierung)

2 min bei 40-60 °C (Anlagerung)

30 s – 2 min bei 72 °C (Synthese)

Die Dauer der Synthesephase richtete sich nach der Länge des zu erwartenden Produkts; pro 1 kb zu synthetisierender DNA wurde etwa 1 min berechnet. Es wurden 30 Zyklen durchlaufen. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für weitere 10 min bei 72 °C inkubiert.

2.2.3.2.2 *Umschreiben von RNA in cDNA mittels reverser Transkription*

Die bei der PCR eingesetzte einzelsträngige, zur spezifischen RNA komplementäre DNA (cDNA) wurde durch *reverse Transkription* mithilfe des First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) hergestellt. Hierfür wurde Gesamt-RNA als Matrize verwendet. Es wurde laut Herstellerangaben verfahren.

2.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

2.2.3.3.1 *Analytische Agarose-Gelelektrophorese*

Die Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten erfolgte mittels Elektrophorese in 1 %igen Agarosegelen in TAE-Puffer. Um eine Visualisierung der Banden durch UV-Licht zu ermöglichen, wurde den Gelen standardmäßig Ethidiumbromid (1 µg/ ml Gel) hinzugefügt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit einer geeigneten Menge (1:5) 10 x Ladepuffer E versetzt. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V und 100 mA. Um eine Größenordnung der Banden zu gewährleisten, wurde ein Größenmarker (O'Gene Ruler, 1 kb, Fermentas) in der ersten Spur aufgetragen. Anschließend wurden die Gele im UV-Durchlicht (256 nm) betrachtet und gegebenenfalls mit einer Polaroidkamera (Polaroid, St. Albans, UK) fotografiert (Blende 16; Belichtungszeit 0,5 s; Rotfilter; 3000 ASA).

10xLadepuffer E: Saccharose 40 % (w/v)
Bromphenolblau 0,25 % (w/v)
Xylencyanol 0,25 % (w/v)
Orange G 0,25 % (w/v)

2.2.3.3.2 *Präparative Agarose-Gelelektrophorese*

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde standardmäßig das NucleoSpin®Extract II-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.3.4 **Spaltung und Reinigung von DNA und Vektor**

Damit ein zu inserierendes Stück DNA an der passenden Stelle in den Vektor eingefügt werden kann, müssen komplementäre Schnittstellen geschaffen werden. Zur Spaltung und Linearisierung der DNA und des Vektors mittels Restriktionsendonukleasen (*EcoRI* und *BamHI*) wurden je 0,5-1 U Restriktionsenzym pro μg DNA sowie eine entsprechende Menge an Puffer eingesetzt. Die Ansätze wurden 2-3 h bei 37 °C inkubiert.

Um die DNA von den Enzymen und den Puffern zu befreien, wurden sie mithilfe des NucleoSpin®Extract II-Kit (Macherey-Nagel) gemäß den Herstellerangaben gereinigt. Zur Kontrolle des Verdau wurde eine geringe Menge von DNA und Vektor nochmals auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.3.5 **Ligation**

Mithilfe des Rapid DNA Ligation Kits (Roche) erfolgte durch die DNA-Ligase der Einbau der geschnittenen DNA-Fragmente („Inserts“) in den ebenfalls geschnittenen pBlueskript SK II (-) -Vektor. Für eine effiziente Ligation war ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:3 bis 1:4 bei „überhängenden“ Enden (wie in diesem Fall) zwischen Vektor und *Insert* optimal. Der Ligationsansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.3.6 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA in wässriger Lösung wurde durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Messungen wurden in wiederverwendbaren Quarzküvetten gegen ddH₂O als Referenzwert durchgeführt. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm zu 280 nm wurde als Maßstab für die Reinheit der Nukleinsäuren herangezogen, wobei Werte zwischen 1,6 und 2,0 angestrebt wurden.

2.2.3.7 RNA-Techniken

2.2.3.7.1 Allgemeine Richtlinien

Beim Arbeiten mit RNA ist jede Verunreinigung durch RNasen, die zur Degradierung der RNA führen, strikt zu vermeiden. Deshalb wurden dabei ausschließlich sterile Plastik- oder gebackene Glasgefäße (200 °C, 8 h) verwendet, und bei allen Arbeitsschritten Einmalhandschuhe getragen. Allen Lösungen, die für das Arbeiten mit RNA bestimmt waren, wurde DEPC beigegeben, das eventuell enthaltene RNasen inaktiviert (siehe 2.1.12).

2.2.3.7.2 RNA-Isolierung aus C2C12-Zellen

Um die RNA der gewünschten C2C12-Zellen zu isolieren, wurden zunächst die gesamten Zellen aus dem Kulturgefäß geerntet. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, zweimal mit 1xPBS gewaschen und β -Mercaptoethanol-Lysispuffer auf die Zellen gegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen gelöst. Das Zelllysate wurde 1:1 mit 70 %igem Ethanol gemischt. Das weitere Vorgehen der RNA-Isolierung erfolgte mithilfe des RNeasy MiniKits von Qiagen wie vom Hersteller beschrieben.

2.2.3.7.3 Northern Blot

Mithilfe der *Northern Blot*-Analyse ist es möglich, spezifische Sequenzen gesamtzellulärer RNA qualitativ und quantitativ nachzuweisen. Dazu wird die RNA zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und dann auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. RNA liegt normalerweise als Einzelstrang vor und kann daher Sekundärstrukturen ausbilden, welche die größenabhängige Auftrennung bei der Gelelektrophorese beeinflussen würden. Daher wurde für die *Northern Blot*-Analyse ein denaturierendes Elektrophoreseverfahren eingesetzt. In RNase-freiem Wasser gelöste gesamtzelluläre RNA wurde auf eine einheitliche

Menge von 0,3-4 µg und ein einheitliches Volumen (meist 13 µl) aliquotiert. Die Proben wurden zusätzlich mit 10 µl Ladepuffer N versetzt und auf dem Heizblock für 1 min bei 85 °C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA zu zerstören. Danach wurden sie auf ein horizontales, 1 %-iges Agarosegel aufgetragen, welches mit Formaldehyd versetzt war. Mit MOPS-Puffer als Laufpuffer wurde bei 100 V und 40-60 mA für 60-90 min eine Elektrophorese durchgeführt. Anschließend wurde das Gel kurz in 20 x SSC geschwenkt und mittels eines vertikalen Kapillarblotverfahrens über Nacht auf eine zuvor mit 20 x SSC äquilibrierte Nitrozellulosemembran (Hybond®-N) transferiert. Dazu wurde 20 x SSC als Trägersubstanz verwendet. Um die Kapillarwirkung zu erzielen, wurde das Gel samt Membran mit einer geeigneten Menge an Chromatographiepapier über Nacht beschwert. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen und die RNA durch dreiminütige Bestrahlung mit 120 mJ/ cm² UV-Licht darauf fixiert (*cross-linking*). Durch Schwenken der Membran in einer Methylenblau-Lösung und anschließendem Spülen mit DEPC-Wasser wurde die RNA angefärbt. Bei intakter RNA sollten dabei eine 28S-rRNA-Bande bei einer Transkriptgröße von ca. 4700 bp und eine 18S-rRNA-Bande bei ca. 1900 bp sichtbar werden. Die Membran wurde nun fotokopiert und/oder gescannt, um die angefärbten Banden als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Spuren verwenden zu können. Beide Banden wurden außerdem auf der Membran mit einem Bleistift markiert, um später gegebenenfalls einen Größenvergleich mit anderen spezifischen Banden zu ermöglichen. Die Membran konnte dann getrocknet und bei RT gelagert oder direkt hybridisiert werden.

Der Hybridisierung ging zunächst eine Prähybridisierung zur Absättigung unspezifischer RNA-Bindungsstellen voraus. Dazu wurde die Membran mit Hybridisationslösung in einem dichten Hybridisationsbeutel für 1 h bei 68 °C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die eigentliche Hybridisierung mit einer mit Digoxigenin markierten, spezifischen *antisense*-RNA-DIG-Sonde, welche, je nach Art der Gensonde, in einer Konzentration zwischen 1:1000 bis 1:5000 eingesetzt wurde. Vor Zugabe wurde die Sonde in 100 µl Hybridisationslösung auf dem Heizblock für 10 min auf 68 °C erhitzt und dann in den Beutel zur bereits vorhandenen Hybridisationslösung gegeben. Teilweise wurde mit mehreren Sonden gleichzeitig hybridisiert. Die Hybridisierung fand über Nacht und ebenfalls bei 68 °C im Wasserbad unter Schütteln statt. Im Anschluss erfolgten verschiedene Waschstufen. Zunächst wurde die Membran bei RT 3 x 5 min auf dem Schüttler mit Waschlösung Nr.1 gewaschen, dann 2 x 20 min erneut im Wasserbad bei 68 °C in Waschlösung Nr.2. Alle folgenden Schritte fanden bei RT statt. Die Membran wurde für 5 min auf dem Schüttler in Puffer 1 gewaschen und dann für 1 h in 1 % Blockingpuffer zur Absättigung unspezifischer

Antikörperbindungsstellen geschüttelt. Diesem Blockingpuffer wurde dann der mit Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelte Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP) in einer 1:15000-fachen Endkonzentration zugegeben. Anschließend wurde die Membran für 1 x 5 min und 2 x 15 min in Puffer 1 plus 0,3 % Tween 20 sowie 1 x 5 min in Puffer 3 gewaschen. Um eine Lumineszenz der RNA zu erwirken, ließ man die Membran kurz abtropfen, danach wurde sie in Folie eingeschlagen und darin mit dem Chemolumineszenzsubstrat Luminol für die Alkalische Phosphatase (CDP-Star®, 1:100 in Puffer 3 verdünnt) für 5 min inkubiert. Abschließend konnte ein Röntgenfilm zur Belichtung aufgelegt werden. Je nach Signalstärke betrug die Belichtungsdauer 1 bis 20 min. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Spuren wurde das Signal auf die Methylenblaufärbung und/oder eine geeignete Ladekontrolle (z.B. α -NAC) normiert.

Agarosegel 1% (100 ml):

Agarose 1 g
DEPC-Wasser 84,6 ml
10xMOPS 10 ml
Formaldehyd 5,4 ml

Ladepuffer N (15 ml):

Formamid 7,2 ml
Formaldehyd 2,6 ml
DEPC-Wasser 1,8 ml
10 x MOPS 1,6 ml
80 % Glycerin 1 ml
Bromphenolblau-Lösung, wässrig, gesättigt 0,8ml

RNA-Hybridisationslösung (50 ml):

Formamid 100 % 25 ml
20 x SSC 12,5 ml
10 % Blocking-Lösung 10 ml
20 % N-Lauroylsarcosin 0,25 ml
10 % SDS 0,1 ml
DEPC-Wasser 2,15 ml

Waschlösung Nr.1 (500 ml):

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

<u>Waschlösung Nr.2 (500 ml):</u>	20 x SSC 2,5 ml 10 % SDS 5 ml DEPC-Wasser 492,5 ml
<u>Puffer 1 (1 l):</u>	Maleinsäure 11,6 g Natriumchlorid 8,75 g Natriumhydroxid (bis pH 7,5 erreicht ist) DEPC-Wasser auf 1 Liter auffüllen
<u>Puffer 3 (50 ml, immer frisch angesetzt):</u>	1 M Tris pH 9,5 5 ml 5 M Natriumchlorid 1 ml 5 M Magnesiumchlorid 0,5 ml DEPC-Wasser 43,5 ml

2.2.3.7.4 *Herstellung von RNA-Sonden aus rekombinanten Plasmiden*

Alle in dieser Arbeit verwendeten digoxigeninmarkierten *antisense*-RNA-Sonden wurden mit dem DIG RNA Labeling Kit (Roche, Mannheim) im Labor hergestellt. Dazu wurde ein rekombinantes Plasmid, welches bereits das jeweils gewünschte *Insert* enthielt, mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease (in diesem Fall *EcoRI* beim pBSK-Vektor, siehe 2.2.2.3) gespalten bzw. linearisiert (siehe 2.2.3.4). Es folgte eine *in vitro*-Transkription mit dem DIG RNA Labeling Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers, wobei von der DNA-Matrize eine entsprechende RNA synthetisiert wurde. Dafür wurden 0,5-2 µg des geschnittenen Plasmids verwendet. Abhängig von der Orientierung der Sequenz innerhalb des Plasmids wurde eine geeignete RNA-Polymerase (T7, T3) eingesetzt. Die weiteren Schritte wurden den Empfehlungen des Herstellers entsprechend durchgeführt.

Um die RNA-Sonde nach der *in vitro*-Transkription zu isolieren, wurde das RNeasy® Mini Kit 250 (Qiagen) nach Angaben des Herstellers benutzt. Zur Überprüfung der Sondengröße wurde abschließend eine geringe Menge an neu synthetisierter Sonde parallel zu einem Größenmarker in einem Kontrollgel aufgetrennt.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteinlysate waren Zytosollysate aus kultivierten C2C12-Zellen. Zur Herstellung solcher Lysate wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen. Eine geeignete Menge (100 µl pro Napf einer Sechsnapfplatte) kalten Lysispuffer inkl. Proteaseinhibitor wurde in das Kulturgefäß gegeben, dieses auf Eis gestellt und für 10 min unter leichtem Schwenken inkubiert, wobei die Zellmembran lysiert wurde. Anschließend wurde das Lysat in ein Eppendorfgefäß pipettiert und bei 4 °C sowie ca. 19000 x 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein neues beschriftetes Eppendorfgefäß überführt, welches kurz in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert wurde.

Lysispuffer: 1 % Triton-X
 20 mM Tris-HCl, pH 8,0
 137 mM NaCl
 10 % Glycerin (v/v)
 2 mM EDTA pH 8,0
 Protease-Inhibitor-Complete-Tabl. (Roche, Dosierung laut Hersteller)

2.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur relativen Konzentrationsbestimmung wurde der Kit BCA* Protein der Firma Pierce verwendet. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Absorption wurde im Spektralphotometer bei 562nm gemessen. Parallel dazu wurde mit BSA eine Proteinstandardkurve erstellt.

2.2.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dient der größenabhängigen Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld. Hierbei wurden die vorher denaturierten Proteine in auf 1,5 cm dicke Polyacrylamidgele aufgetragen und dann in vertikaler Richtung elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophoresegele wurden im Labor gegossen. Sie bestanden im oberen Teil

aus dem Sammelgel samt Geltaschen für die Proben. Daran schloss sich nach unten hin das Trenngel an, in welchem die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt wurden.

<u>Für ein Trenngel:</u>	12 %	10 %	7,5 %
H ₂ O	2,9 ml	3,4 ml	3,9 ml
Acrylamid-Bisacrylamid	2,5 ml	2 ml	1,5 ml
1 M Tris-HCl ph 8,8	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
10 % SDS (w/v)	80 µl	80 µl	80 µl
87 % Glycerin (v/v)	900 µl	900 µl	900 µl
10 % APS (w/v)	80 µl	80 µl	80 µl
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl

Für zwei Sammelgele:

H ₂ O	4,4 ml
Acrylamid-Bisacrylamid	750 µl
1 mM Tris-HCl ph 6,8	750 µl
10 % SDS (w/v)	60 µl
10 % APS (w/v)	60 µl
TEMED	4 µl

Die Zusammensetzung des Trenngels variierte je nach Größe des zu untersuchenden Proteins zwischen 7,5 % (bei größeren Proteinen) und 12 % (bei kleineren Proteinen) Acrylamid. Es wurde das Puffersystem nach Laemmli angewendet. Die nach der Proteinkonzentrationsbestimmung aliquotierten und auf 2,5-10 µg Protein genormten Proben wurden mit einer geeigneten Menge 5 x Probenauftragspuffer (im Verhältnis 1:5) versetzt.

5x Probenauftragspuffer:

50 % Glycerol
 7,5 g/l SDS
 250 mM Tris-HCl
 0,5 mg/ml Bromphenolblau
 12,5 % β-Mercaptoethanol

Kurz vor dem Gelauftrag wurden sie auf dem Heizblock für 5 min bei 95 °C erhitzt, um die Tertiär- und Sekundärstruktur zu zerstören. Um eine Größenordnung der Proteine zu gewährleisten wurde zusätzlich in die erste Tasche jeden Gels ein Größenmarker (Precision Plus, Biorad) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte dann bei 150 V und 70 mA so lange, bis die blaue Ladepufferfront sich im unteren Teil der Gele befand (ca. 1-2 h).

2.2.4.4 Immunologische Methoden

2.2.4.4.1 *Immunhistochemie*

Bei dieser Methode werden intra- oder extrazelluläre Proteine mithilfe von spezifischen primären Antikörpern markiert und anschließend mit sekundären Antikörpern, welche an ein Enzym gekoppelt sind, das nach Zugabe spezifischer Substrate eine Farbreaktion katalysiert, sichtbar gemacht. Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten histologischen Paraffinschnitten handelte es sich um Herzpräparate CVB-3-infizierter Mäuse sowie nicht infizierter Kontrollmäuse der Stämme ABY und BL6. Es wurden pro Mäusestamm unterschiedliche Zeitwerte nach der Infektion untersucht: 4 Tage, 8 Tage sowie 12 Tage.

Die Schnitte wurden zunächst nach folgendem Schema entparaffiniert:

Xylol	5 min
Xylol	5 min
100 % Ethanol	1 min
100 % Ethanol	1 min
96 % Ethanol	1 min
80 % Ethanol	1 min
70 % Ethanol	1 min
50 % Ethanol	1 min
dest. Wasser mind.	2 min

Um die endogene Peroxidase der Zellen zu sättigen, wurden die Schnitte für 20-30 min in 0,2 %iger Wasserstoffperoxidlösung (H₂O₂) inkubiert und anschließend für mind. 5 min in Leitungswasser stehen gelassen. Es befanden sich mehrere (5-7) Herzschnitte auf einem Objektträger. Diese sollten jedoch mit teilweise unterschiedlichen Substanzen behandelt werden. Daher wurden die Herzen bei Bedarf durch Umrandung mit Fotokleber voneinander abgetrennt. Für die Immunhistochemie wurde das VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector

Laboratories, USA) sowie das Peroxidase Substrate DAB Kit (Vector Laboratories, USA) benutzt. Diese Methode basiert darauf, dass an einen biotinylierten sekundären Antikörper zusätzlich Avidin gebunden ist. Das Biotin am Antikörper wiederum hat noch weitere freie Bindungsstellen, an die dann das Markermolekül Meerrettichperoxidase (*horse-raddish-peroxidase* HRP) bindet. Wenn nun das Substrat 3',3'-Diaminobenzidin (DAB) für dieses Enzym zugefügt wird, kommt es zu einer Farbreaktion. Beide Kits wurden laut den Herstellerangaben verwendet.

Auf jedem Objektträger wurde für jeweils einen Herzschnitt PBS als Negativkontrolle eingesetzt. Die anderen Schnitte wurden mit unterschiedlichen Antikörpern sowie deren Konzentrationen versetzt. Bei dem in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Antiserum (AK47) handelte es sich um einen polyklonalen Antikörper aus einem Kaninchen, welcher gegen eine kurze Peptidsequenz innerhalb der skNAC-spezifischen mittleren Peptidomäne des Proteins gerichtet ist und nicht gegen das komplette Protein. Er wurde von der Firma Eurogentec (Belgien) hergestellt. In der *Western Blot*-Analyse war es mit diesem Antikörper bereits gelungen, das skNAC-Protein in der erwarteten Größe nachzuweisen (Munz *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Zusätzlich wurde ein zweiter skNAC-Antikörper eines anderen, unabhängigen Kaninchens ausprobiert, welcher sich jedoch als weniger gut geeignet erwies, da auch bei hohen Verdünnungen eine starke, aufgrund der bekannten skelett- und herzmuskelspezifischen Lokalisation des skNAC-Proteins (Yotov und St.-Arnaud, 1996) vermutlich unspezifische Färbung von Nicht-Kardiomyozyten und extrazellulärer Matrix beobachtet wurde (nicht gezeigt).

Nach kurzem Schwenken in 1xPBS wurden die Herzschnitte unter dem Lichtmikroskop ausgewertet, mit Vectashield Mounting Medium (Vectastain Laboratories, USA) benetzt und ein Deckgläschen aufgelegt. Die Objektträger wurden mikroskopiert und schließlich bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.4.4.2 *Immunzytochemie*

Mithilfe der *Immunfluoreszenz* können Proteine detektiert werden. Hierzu wurden C2C12-Zellen auf Zwölfnapfplatten ausgesät, auf deren Boden vorher jeweils ein rundes Deckgläschen gelegt worden war, und wie unter 2.2.1.3 beschrieben transfiziert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, mit einer geeigneten Menge an Methanol (0,5-1 ml pro Napf) überschichtet und bei -20 °C 15-20 min inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Methanol abgesaugt, zweimal mit 1 x PBS gewaschen und das Kulturgefäß sorgfältig trockengesaugt. Zum Absättigen der

unspezifischen Bindungsstellen wurde ca. 1 ml Blockinglösung in jeden Napf pipettiert und 30 min bei RT inkubiert.

Blockinglösung: 10 % FKS in 1 x PBS

Danach wurde die Blockinglösung abgenommen. Pro Vertiefung wurde ein Tropfen des primären Antikörpers Anti-Myosin heavy chain (MyHC) (in der Verdünnung 1:20 mit 10 % FKS) in die Mitte des Napfes pipettiert und 20 min-1 h bei RT inkubiert.

Danach wurde dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper, welcher mit dem fluoreszierenden Stoff Fluoresceinisothiocyanat/ FITC konjugiert war, wurde 1:100 mit 10 % FKS verdünnt, ein Tropfen davon in jede Napfmitte pipettiert und weitere 30 min inkubiert. Zur Markierung der Zellkerne wurde der fluoreszierende Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) benutzt. Dieser interkaliert in die DNA und färbt somit die Zellkerne an, welche unter ultraviolettem Licht sichtbar werden. Je 1 ml einer 1:1000 (verdünnt mit PBS) DAPI-Lösung pro Napf wurde zum zweiten Antikörper hinzupipettiert und unter Lichtausschluss für 5 min inkubiert. Abschließend wurde dreimal mit 1 x PBS gewaschen, auf eine entsprechende Menge an Objektträgern 1 Tropfen eines Eindeckelmediums gegeben und die Deckgläschen mit der Oberseite nach unten auf den Objektträger gelegt. Die so angefärbten Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop mit verschiedenen Lichtfiltern betrachtet und fotografiert. Sie konnten unter Lichtausschluss ca. 3-4 Wochen gelagert werden.

2.2.4.4.3 *5-Bromo-2'desoxy-Uridin (BrdU) Markierung*

Mithilfe des Cell Proliferation ELISA, BrdU-Kits (Roche) konnte die Proliferationsrate von transfizierten Zellen bestimmt werden. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht darauf, dass proliferierenden Zellen das markierte Thymidinanalogon Bromdesoxyuridin zugegeben wird. Dieses wird von der Zelle in der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut.

Die Höhe der DNA-Synthese ist bei dieser Methode ein indirekter Parameter für die Zellvermehrung. Um die Quantität des Bromdesoxyuridin-Einbaus und somit die Quantität der Proliferation zu ermitteln, wird nach Denaturierung der DNA ein mit Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen das Bromdesoxyuridin eingesetzt. Durch eine anschließende Substratreaktion zwischen der Peroxidase und hinzugefügtem Substrat TMB (Tetra-Methyl-Benzidin) entstehen farbige Immunkomplexe. Diese Reaktion wird nach festgesetzter Zeit

(siehe Herstellerangaben) mit Schwefelsäure abgestoppt, um stabile Farbkomplexe zu erhalten. Nun können mithilfe der Colorimetrie Rückschlüsse auf die Proliferationsrate gezogen werden.

Für diese Methode wurden C2C12-Zellen in einer Konzentration von 5000 Zellen pro μl in die Vertiefungen einer 96-Napf-Platte ausgesät. Nach ca. 24 h erfolgte eine Transfektion der Zellen wie unter 2.2.1.3 beschrieben, aber mit je 1 μl siRNA bzw. mit unspezifischer Kontroll-siRNA (*scrambled* siRNA, *scr*) und 1 μl Transfektionsmedium. Nach 24 h wurde die BrdU-Markierung nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden dabei Zeitwerte von 2 h, 8 h sowie 24 h nur mit Proliferationsmedium und von 2 h, 8 h und 24 h mit anschließendem Differenzierungsmedium hergestellt. Die Absorptionsmessung erfolgte in einem Multinapfplatten-Spektrometer (ELISA-reader) bei 450 nm.

2.2.4.4.4 *Western Blot*

Mithilfe dieser Methode können die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine qualitativ und quantitativ durch Antikörper spezifisch nachgewiesen werden. Dazu wurden die aufgetrennten Proteine nach der Elektrophorese aus dem Gel elektrisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert („*geblottet*“). Hierfür wurde ein halbtrockenes *Blot*-Verfahren eingesetzt. Dabei wurde die Anode der *Blot*-Kammer mit Wasser befeuchtet und sechs Lagen mit in Anodenpuffer I getränkten, zurechtgeschnittenen Chromatographie-Papiere darauf gelegt. Darauf folgten vier Lagen in Anodenpuffer II getränkte Papiere sowie die ebenfalls in Anodenpuffer II getränkte Membran, das in Kathodenpuffer getränkte Gel sowie weitere sechs Lagen Chromatographie-Papier. Obenauf wurde die ebenfalls befeuchtete Kathode gelegt und die Kammer verschlossen. Der Transfer erfolgte bei 1-2 mA/cm² 1-2 h lang.

Anodenpuffer I: Tris-Base 300 mM
Methanol 20 %

Anodenpuffer II: Tris-Base 25 mM
Methanol 20 %

Kathodenpuffer: Tris-Base 25 mM
Methanol 20 %
6-Aminocaprinsäure 40 mM

Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt und mit 0,1 %iger Essigsäure gespült, um die erfolgreiche Übertragung auf die Membran sowie die Auftrennungsqualität der Proteine zu kontrollieren. Nach dem Kopieren und /oder Einscannen der Membran wurde diese für 1 h in Blockinglösung inkubiert.

Blockinglösung: 5 % Milchpulver in TBS-T 0,05 %

TBS-T 0,05%:

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

Anschließend wurde der erste Antikörper in geeigneter Verdünnung in TBS-T 0,05 % bzw. 5 % Milchpulver in TBS-T 0,05 % ca. 30 min-1 h bei RT auf dem Schüttler und dann über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Die darauffolgenden Schritte erfolgten alle auf dem Schüttler bei RT:

Waschen: 3 x 5 min mit TBS-T 0,05 %

Zweiter Antikörper: geeignete Verdünnung in TBS-T 0,05 % für 1 h

Waschen: 3 x 5 min mit TBS-T 0,0 5%

Entwicklung:

Für die Entwicklung wurde das ECL Advance Western Blotting Detection Kit nach Angaben des Herstellers angewendet. Das Prinzip beruht auf dem Enzym Meerrettichperoxidase, welches an den sekundären Antikörper gekoppelt ist. Es katalysiert die Oxidation des Luminols (3-Aminophthalhydrazid) durch H_2O_2 zu 3-Aminophthalsäure und Stickstoff. Dabei wird Energie in Form von Licht mit einer Wellenlänge von 425 nm freigesetzt (Lumineszenz). Die Lichtemission und somit das gesuchte Protein konnte durch Auflegen eines Röntgenfilms und dessen Schwärzung sichtbar gemacht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Lokalisation des skNAC-Proteins im murinen Herzen unter physiologischen Bedingungen und bei der CVB-3-induzierten inflammatorischen Kardiomyopathie

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte immunhistochemisch untersucht werden, wo *skNAC*-exprimierende Zellen im murinen Herzen lokalisiert sind sowie ob und ggf. wie sich das räumliche Expressionsmuster dieses Gens im Verlauf einer Coxsackievirus-B3 (CVB-3)-induzierten inflammatorischen Kardiomyopathie ändert.

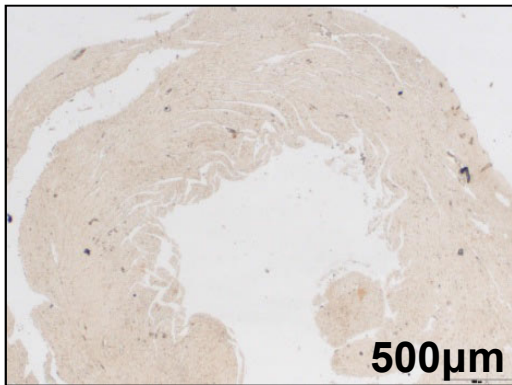
Hierfür wurden histologische Herzschnitte von nichtinfizierten sowie CVB-3-infizierten Mäusen mit folgenden Lösungen (in PBS und in verschiedenen Verdünnungen) inkubiert:

- skNAC-Antiserum, um spezifisch das skNAC-Protein anzufärben
- Antiserum mit dazugehörigem Peptid (AK+P), um als eine geeignete Kontrolle die Spezifität des skNAC-Antikörpers zu überprüfen
- Präimmunserum (PIS), um die Hintergrundfärbung der aus verschiedenen Tieren gewonnenen Antiseren zu kontrollieren
- Präimmunserum mit Peptid (PIS+P), um zu prüfen, ob die im Präimmunserum des Tieres vorhandenen Antikörper mit skNAC kreuzreagieren bzw. bereits aus unbekanntem Grund spezifische skNAC-Antikörper enthalten sind und so möglicherweise eine unspezifische Färbung hervorrufen
- PBS als Kontrolle und zum Ausschluss einer möglichen unspezifischen Färbung durch die Verdünnungslösung alleine

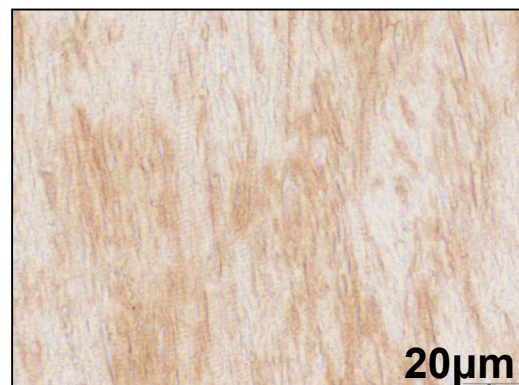
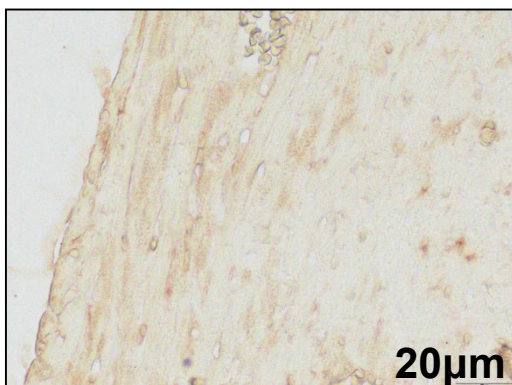
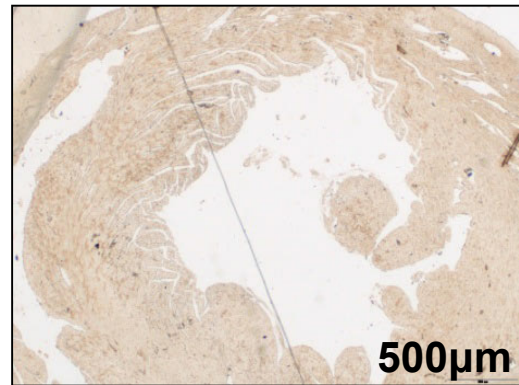
3.1.1 Optimierung der Antikörperkonzentration

Um das Färbeprotokoll zu optimieren, wurde zunächst die Antikörperkonzentration variiert: Das Verhältnis Antikörper zu Verdünnungslösung PBS betrug 1.:100, 1:50, 1:25 sowie 1:20. Die entsprechenden Ergebnisse sind nachfolgend exemplarisch am Beispiel beider Mäusestämme (BL6 und ABY, beides uninfizierte Kontrollen) dargestellt.

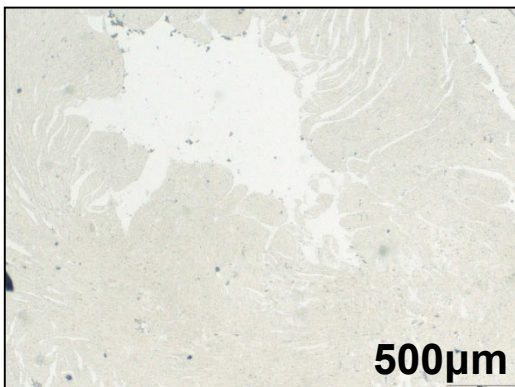
skNAC-AK-Verdünnung 1:100 (BL6):



skNAC-AK-Verdünnung 1:50 (BL6):



entsprechende PBS-Kontrolle:



entsprechende PBS-Kontrolle:

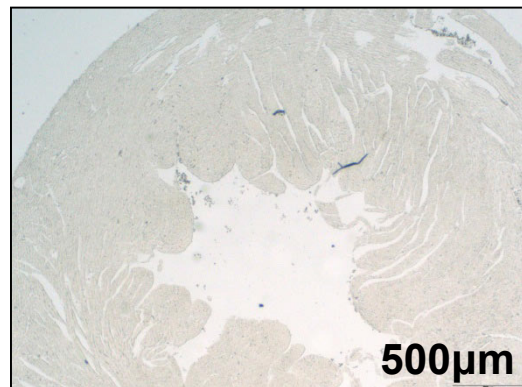
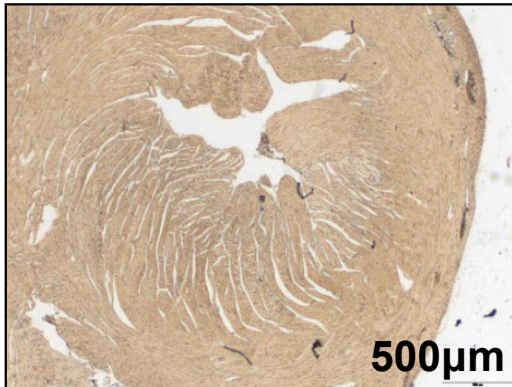


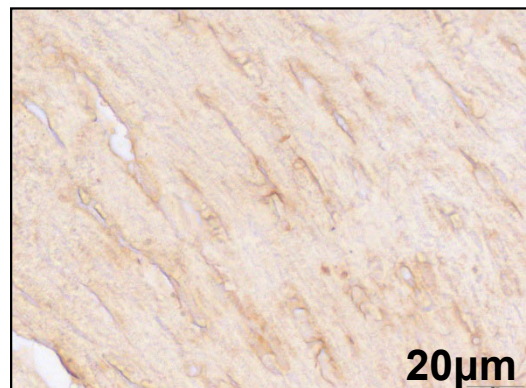
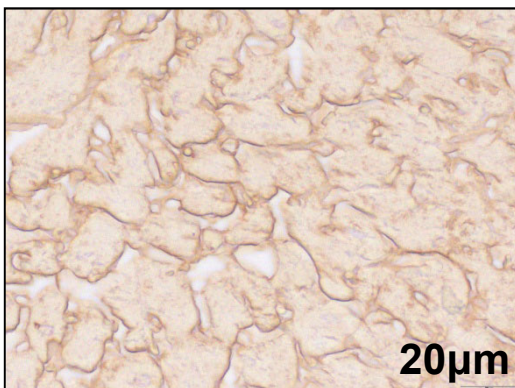
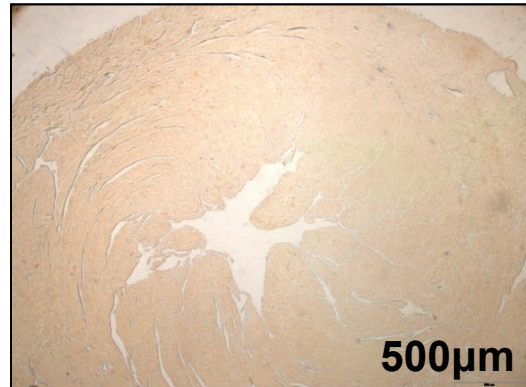
Abbildung 6: Optimierung der Antikörperkonzentration des skNAC-spezifischen Antikörpers 47. Braunes Reaktionsprodukt mit Diaminobenzidin als Chromogen. Dargestellt sind die immunhistochemischen Färbungen von nicht infizierten Mäuseherzen des Stammes BL6, inkubiert mit den AK-Verdünnungen 1:100 (linke Spalte) sowie 1:50 (rechte Spalte). In der unteren Reihe ist jeweils die dazugehörige PBS-Kontrolle des uninfizierten Mäusestammes BL6. Mikroskopiert und fotografiert in einer 200-fachen bzw. 4000-fachen Vergrößerung.

Deutlich zu sehen war die schwächere Färbeintensität der 1:100-Verdünnung im Vergleich zu der 1:50-Verdünnung. Bei beiden war eine mit Zellen assoziierte Färbung zu bemerken (Abb. 6). Daher wurde die AK- Konzentration noch weiter variiert.

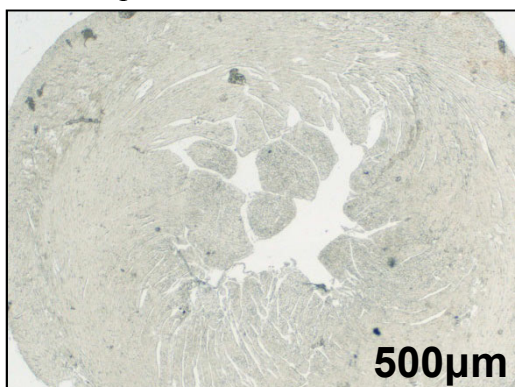
skNAC- AK-Verdünnung 1:20 (ABY):



skNAC- AK-Verdünnung 1:25 (ABY):



entsprechende PBS-Kontrolle:



entsprechende PBS-Kontrolle:

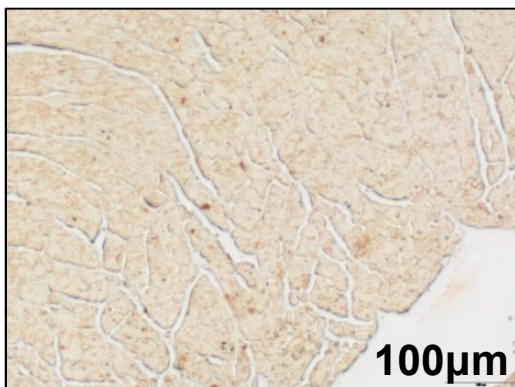


Abbildung 7: Optimierung der Antikörperkonzentration des Antikörpers 47. Reaktionsprodukt mit Diaminobenzidin als Chromogen. Dargestellt sind die immunhistochemischen Färbungen von nicht infizierten Mäuseherzen des Stammes ABY, inkubiert mit den AK-Verdünnungen 1:20 (linke Spalte) sowie 1:25 (rechte Spalte). In der unteren Reihe ist jeweils die dazugehörige PBS-Kontrolle des

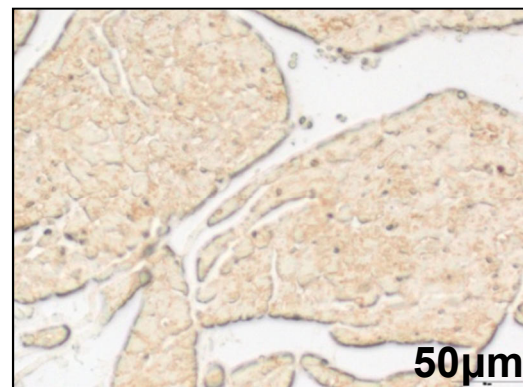
uninfizierten Mäusestammes BL6. Mikroskopiert und fotografiert in einer 200- fachen bzw. 4000-fachen Vergrößerung.

Es zeigte sich eine Intensivierung des Färbeergebnisses, je weniger verdünnt der Antikörper eingesetzt wurde. Dabei stellte sich die Verdünnung 1:25 als am besten geeignet heraus (Abb. 7), da sich hier im Vergleich zum Präimmunserum das beste Signal-Hintergrund-Verhältnis ergab und eine partielle Kompetition durch das spezifische Peptid möglich war. Diese Verdünnungsstufe wurde daher für alle anderen Herzfärbungen verwendet. Nachfolgend sind einige Ausschnitte der mit dieser Antikörperkonzentration gefärbten Schnitte in größerer Vergrößerung dargestellt.

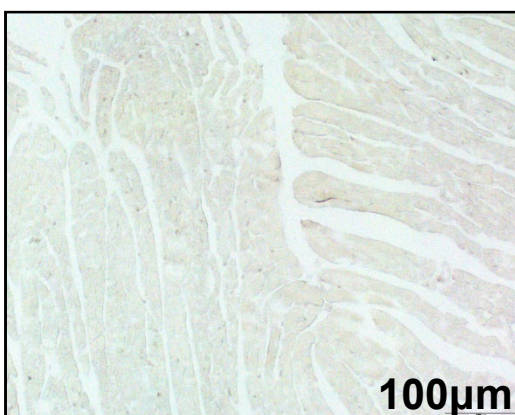
AK-Verdünnung 1:25 (ABY uninfiziert):



AK- Verdünnung 1:25 (ABY uninfiziert):



entsprechende PBS-Kontrolle:



entsprechende PBS-Kontrolle:

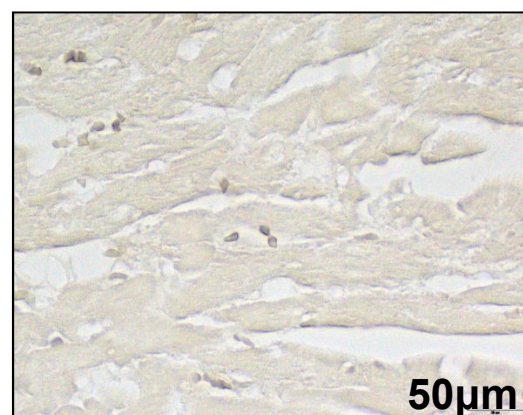


Abbildung 8: Ausschnitte eines mit dem skNAC-Antikörper in einer Konzentration von 1:25 behandelten Herzschnittes von einer nicht infizierten ABY-Maus, mikroskopiert und fotografiert in einer 1000-fachen (linke Seite) sowie in einer 2000-fachen (rechte

Seite) Vergrößerung. Darunter sind die jeweils dazugehörigen PBS-Kontrollen gezeigt. Reaktionsprodukt mit Diaminobenzidin als Chromogen.

Man kann insbesondere in der größeren Vergrößerung (Abb. 8) erkennen, dass bei dieser AK-Verdünnung eine gut differenzierte, ausschließlich zellassoziierte Färbung der Myozyten ohne verfälschenden Hintergrund sichtbar war.

3.1.2 Färbung der infizierten Mäuseherzen

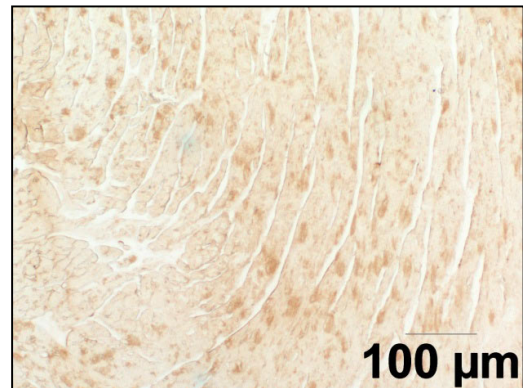
Nachdem nun die optimalste Antikörperkonzentration bestimmt worden war, wurden infizierte Herzen beider Mäusestämme aus unterschiedlichen Infektionsstadien wie oben beschrieben gefärbt und im Lichtmikroskop in unterschiedlichen Vergrößerungen betrachtet und fotografiert. Insgesamt wurde hierbei eine mehr oder weniger homogene Färbung beobachtet. Auffällige Unterschiede zwischen den beiden Mäusestämmen konnten nicht nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt 12 d wurde bei den ABY-Mäusen eine starke Färbung der bei diesen Tieren zu diesem Zeitpunkt zu beobachtenden (inflammatorischen) Läsionen nachgewiesen, welche jedoch auch nach Behandlung mit dem PIS sichtbar war und demzufolge als unspezifisch zu klassifizieren ist.

Nachfolgend sind exemplarisch Herzschnitte der ABY-Mäuse zu den Zeitpunkten 4 d und 8 d gezeigt, wobei sowohl das homogene Färbemuster als auch die Kompetition durch das spezifische Peptid als auch der Vergleich zum PIS als Nachweis für die (partielle) Spezifität der Färbung ersichtlich ist (Abb.9).

ABY 4 d p.i., AK-Verdünnung 1:25:



ABY 4 d p.i., AK mit Peptid, 1:25:



dazugehörige PBS-Kontrolle:



dazugehörige PBS-Kontrolle:

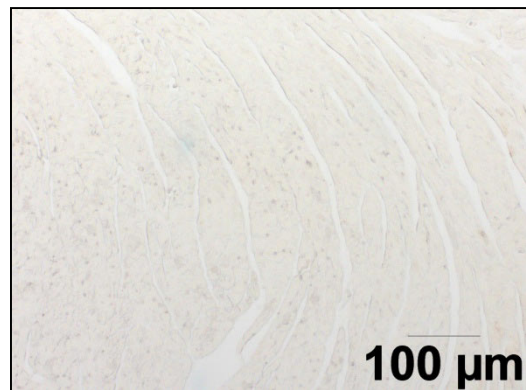
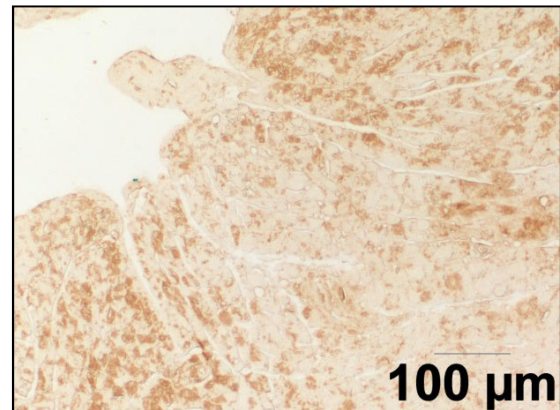


Abbildung 9: Links: Ausschnitt eines mit dem skNAC-Antikörper in einer Konzentration von 1:25 behandelten Herzschnittes von einer infizierten ABY-Maus 4 d p.i., mikroskopiert und fotografiert in einer 200-fachen Vergrößerung. Rechts: Ausschnitt eines Herzschnittes von einer infizierten ABY-Maus 4 d p.i., behandelt mit dem skNAC-Antikörper samt dem dazugehörigen spezifischen Peptid in einer Konzentration von 1:25, mikroskopiert und fotografiert in einer 1000-fachen Vergrößerung. Reaktionsprodukt mit Diaminobenzidin als Chromogen.

ABY 8 d p.i., AK-Verdünnung 1:25



dazugehörige PBS-Kontrollen:

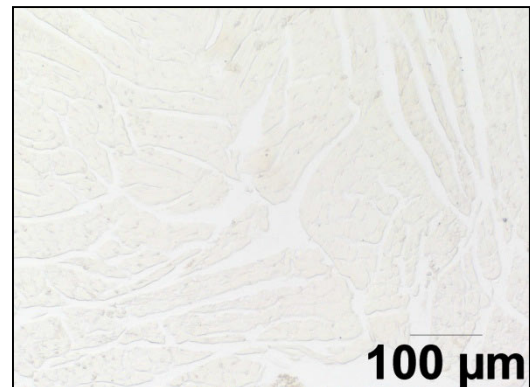
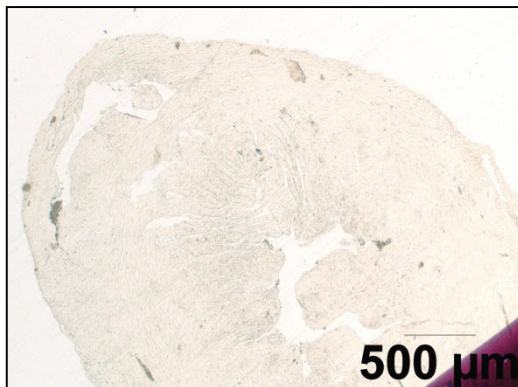
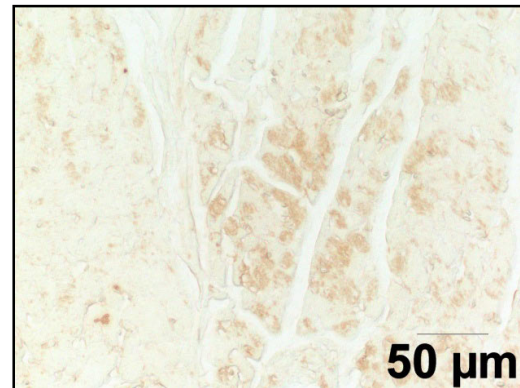
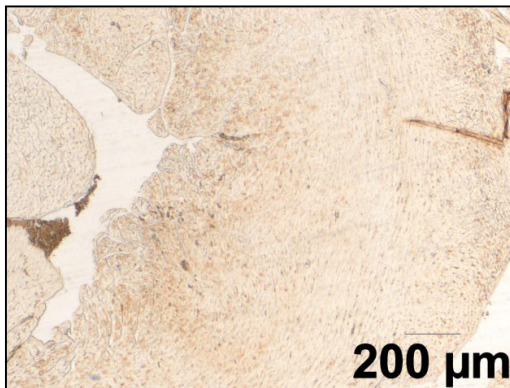


Abbildung 10: Ausschnitte eines mit dem skNAC-Antikörper in einer Konzentration von 1:25 behandelten Herzschnittes von einer infizierten ABY-Maus 8 d p.i., mikroskopiert und fotografiert in einer 200-fachen (links) sowie einer 1000-fachen (rechts) Vergrößerung. Darunter die dazugehörigen PBS-Kontrollen. Reaktionsprodukt mit Diaminobenzidin als Chromogen.

ABY 8d p.i., Präimmunserum 1:25



dazugehörige PBS-Kontrollen:

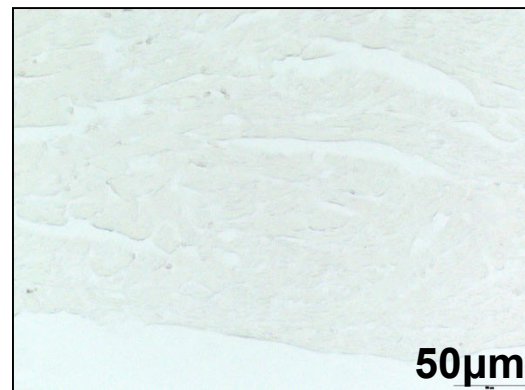
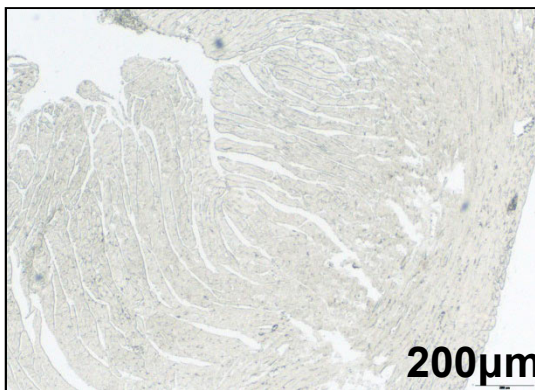
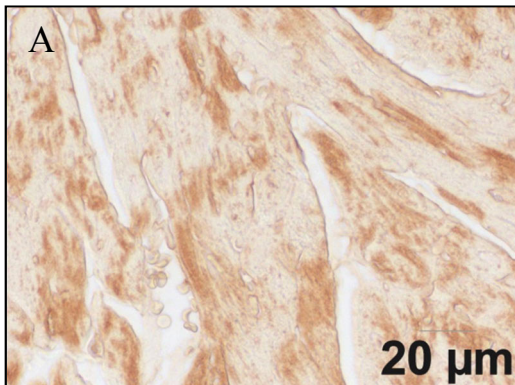


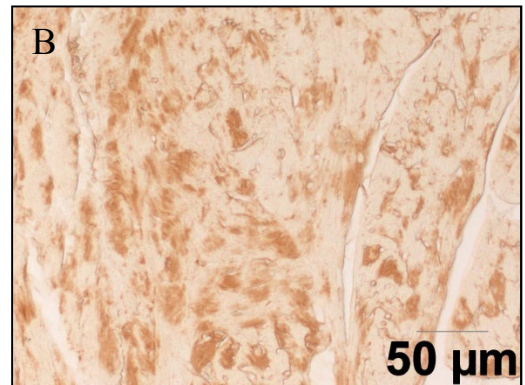
Abbildung 11: Ausschnitte eines Herzschnittes von einer infizierten ABY-Maus 8 d p.i., behandelt mit dem zu dem skNAC-Antikörper gehörenden Präimmunserum in einer Konzentration von 1:25, fotografiert in einer 400-fachen (links) sowie 2000-fachen (rechts) Vergrößerung. Darunter sind die jeweiligen PBS-Kontrollen abgebildet. Reaktionsprodukt mit Diaminobenzidin als Chromogen.

Zum Zeitpunkt 4 d p.i. war auffällig, dass das Färbemuster bei beiden Mäusestämmen ähnlich war, insgesamt erschien die Färbung beim *ABY*-Stamm etwas schärfer und stärker abgegrenzt und weniger diffus als bei den *BL6*-Mäusen. Die Färbeintensität war bei dem *ABY*-Stamm etwas schwächer als bei den *BL6*-Mäusen.

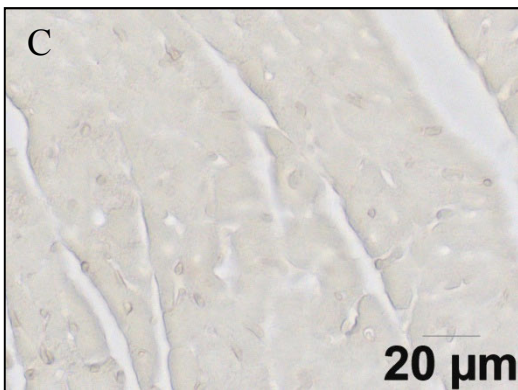
BL6 4d p.i., AK-Verdünnung 1:25:



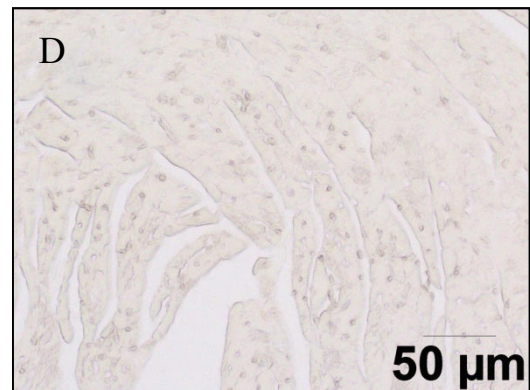
BL6 4d p.i., AK-Verdünnung 1:25:



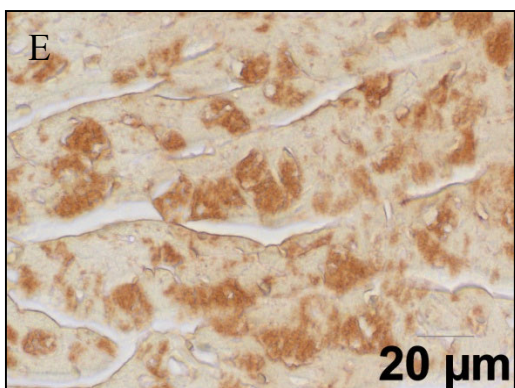
dazugehörige PBS-Kontrolle:



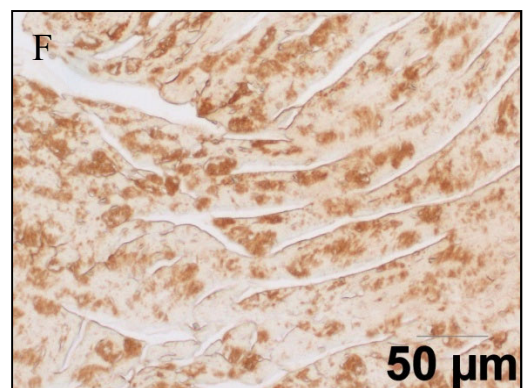
dazugehörige PBS-Kontrolle:



ABY 4d p.i., AK-Verdünnung 1:25:



ABY 4d p.i., AK-Verdünnung 1:25:



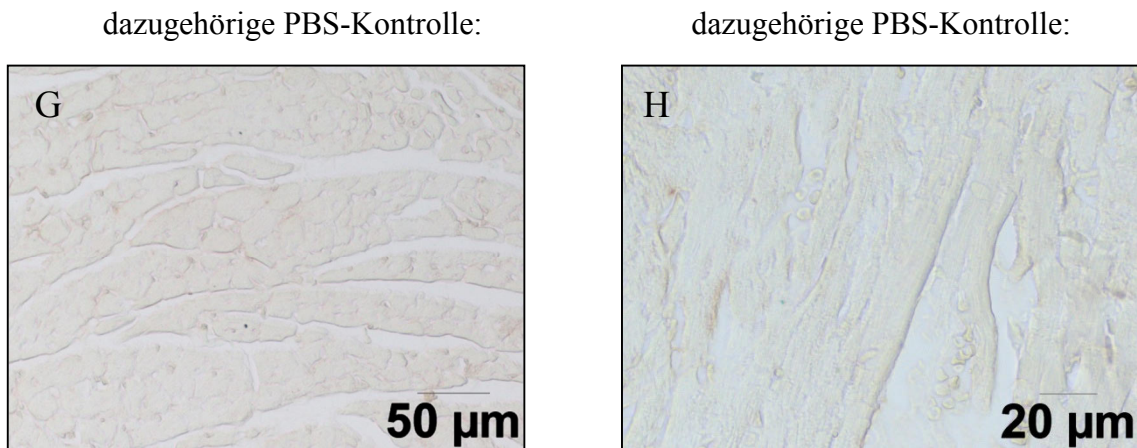
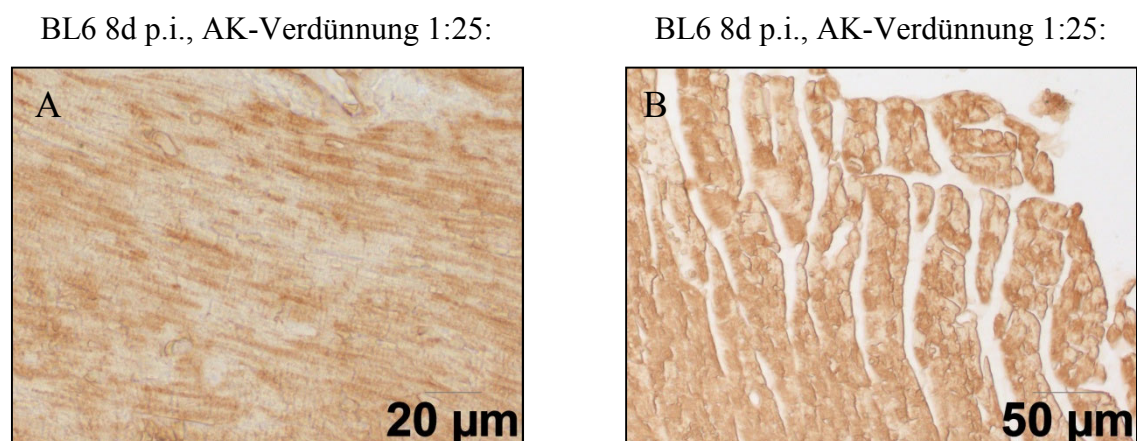


Abbildung 12: Ausgewählte Bildausschnitte von infizierten Mäusen beider Stämme (ABY und BL6) 4 d p.i., mikroskopiert und fotografiert in 4000-facher (A und E) und 2000-facher (B und F) Vergrößerung. C und D sowie G und H stellen die jeweiligen Kontrollen der darüber abgebildeten Herzschnitte dar, sie wurden lediglich mit PBS inkubiert. Mikroskopiert und fotografiert in 4000-facher (C und G) und 2000-facher (D und H) Vergrößerung. Reaktionsprodukt mit Diaminobenzidin als Chromogen.

Generell war die Färbung über das gesamte Myokard verteilt sichtbar. Insbesondere bei größerer Vergrößerung ließ sich weiterhin die spezifisch intrazelluläre Färbung der Kardiomyozyten erkennen (Abb.12). Die Spezifität der Antikörperfärbung und somit der Antikörperbindung konnte anhand der Kontrollfärbungen (s.o.) untermauert werden.

Zum Zeitpunkt 8 d p.i. stellte sich die Situation ähnlich dar, wobei die Färbemuster im Vergleich zwischen den beiden Stämmen eher noch einheitlicher waren (Abb. 13):



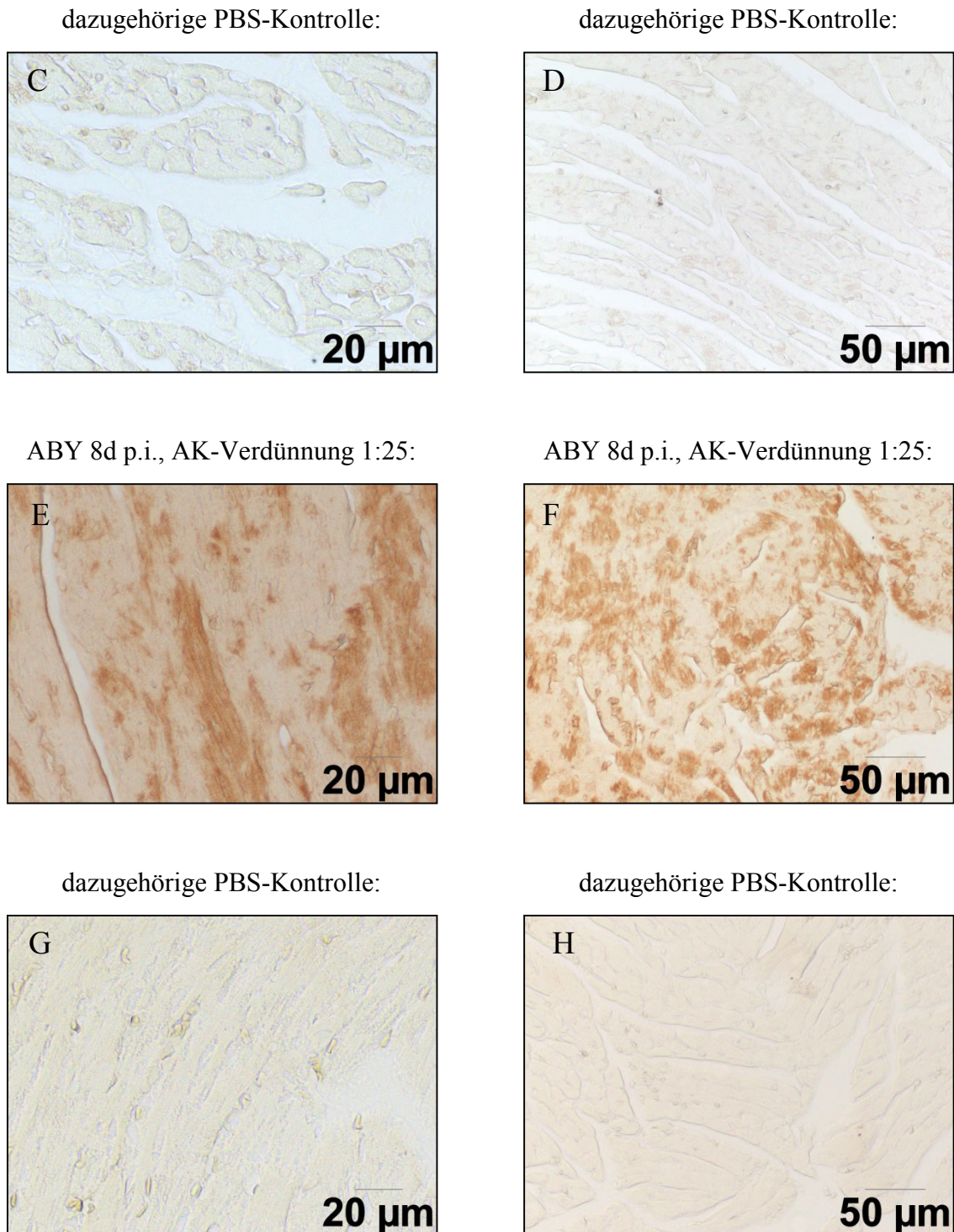
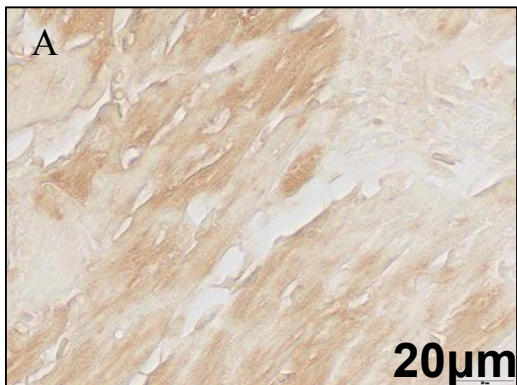


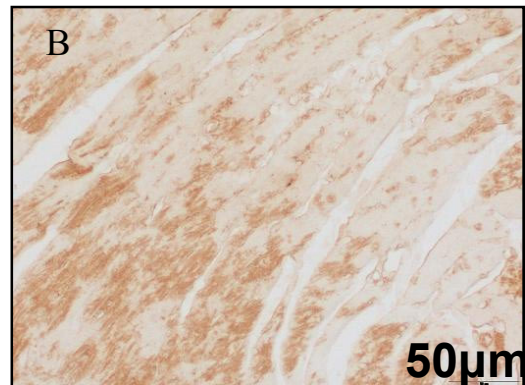
Abbildung 13: Ausgewählte Bildausschnitte von infizierten Mäusen beider Stämme (ABY und BL6) 8 d p.i., mikroskopiert und fotografiert in 4000-facher (A und E) und 2000-facher (B und F) Vergrößerung. C und D sowie G und H stellen die jeweiligen Kontrollen der darüber abgebildeten Herzschnitte dar, sie wurden lediglich mit PBS inkubiert. Mikroskopiert und fotografiert in 4000-facher (C und G) und 2000-facher (D und H) Vergrößerung. Reaktionsprodukt mit Diaminobenzidin als Chromogen.

Auch zwölf Tage nach Infektion mit dem Coxsackie-Virus B3 schien es – mit Ausnahme der oben erwähnten unspezifischen Effekte - keine erheblichen Unterschiede in der Färbintensität der Myozyten zu geben. Die Färbung war ausschließlich in den Myozyten lokalisiert und über das gesamte Myokard verteilt sichtbar (Abb. 14).

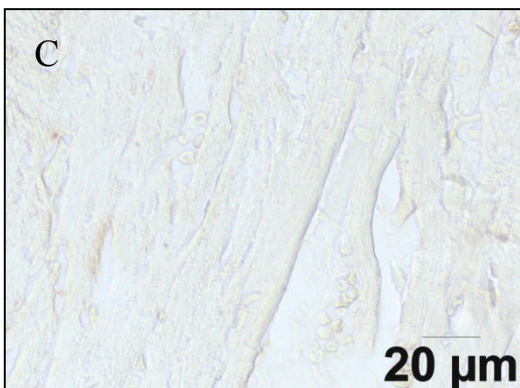
BL6 12 d p.i., AK-Verdünnung 1:25



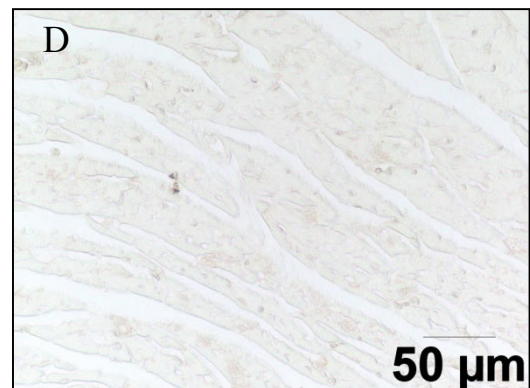
BL6 12 d p.i., AK-Verdünnung 1:25



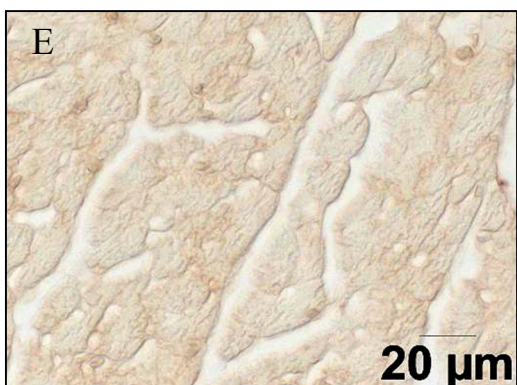
dazugehörige PBS-Kontrolle:



dazugehörige PBS-Kontrolle:



ABY 12 d p.i., AK-Verdünnung 1:25



ABY 12 d p.i., AK-Verdünnung 1:25



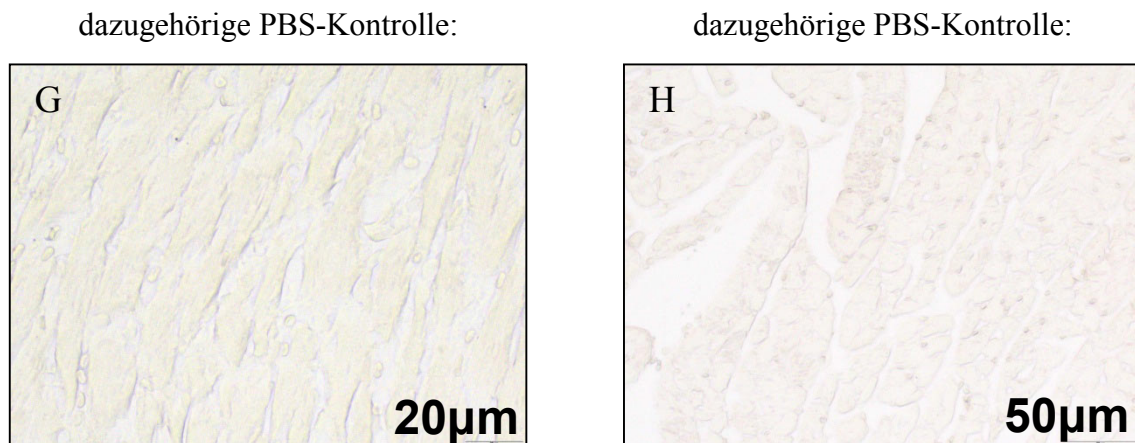


Abbildung 14: Ausgewählte Bildausschnitte von infizierten Mäusen beider Stämme (ABY und BL6) 12 d p.i., mikroskopiert und fotografiert in 4000-facher (A und E) und 2000-facher (B und F) Vergrößerung. C und D sowie G und H stellen die jeweiligen Kontrollen der darüber abgebildeten Herzschnitte dar, sie wurden lediglich mit PBS inkubiert. Mikroskopiert und fotografiert in 4000-facher (C und G) und 2000-facher (D und H) Vergrößerung. Reaktionsprodukt mit Diaminobenzidin als Chromogen.

Die skNAC-spezifische Antikörperfärbung war - soweit beurteilbar - ausschließlich in den Myozyten und verteilt über das gesamte Myokard sichtbar.

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass bei den beiden untersuchten Mäusestämmen, sowohl bei den uninfizierten Kontrollen als auch in den infizierten Gruppen beider Stämme zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (4 Tage, 8 Tage und 12 Tage p.i.) gravierende Unterschiede, weder bezüglich der Färbintensität noch des Verteilungsmusters zu erkennen waren. Es kam also in den untersuchten Mäusen zu keiner deutlich unterschiedlichen *skNAC*-Expression. Das skNAC-Proteinverteilungsmuster erschien mehr oder weniger gleich.

3.2 Hemmung der *skNAC*-Expression in Skelettmuskelzellen mittels spezifischer siRNAs und Untersuchung des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens der transfizierten Zellen

3.2.1 Transfektion von C2C12-Zellen mit *skNAC*-spezifischer siRNA

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, die *skNAC*-Expression in einem murinen Skelettmuskelzellmodell zu reprimieren und anschließend die Effekte dieser Hemmung auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zellen zu analysieren. Um die Funktion des *skNAC*-Proteins in Myoblasten näher zu untersuchen, wurde daher die Expression des *skNAC*-Gens in der Zelllinie C2C12 mittels spezifischer siRNA reprimiert und die Effekte dieser Hemmung auf die Zellen untersucht. Spezifische Effekte auf die Zell-Proliferationsrate und die Expression geeigneter myogener Differenzierungsmarker werden im Folgenden dargestellt.

3.2.1.1 Optimierung der Transfektionsbedingungen

Zu Anfang dieser Arbeit sollte zunächst die Methodik der siRNA-Transfektion von C2C12-Zellen mit *skNAC*-spezifischer siRNA etabliert und optimiert werden. Hierfür standen drei verschiedene *skNAC*-siRNAs (siRNA#1, siRNA#2 und siRNA#3) und eine *scrambled* siRNA (als Kontrolle, keine Homologie zu irgendeinem murinen Gen) der Firma Sigma-Aldrich sowie drei verschiedene Transfektionsreagenzien (*siPORTTMNeoFXTM* von Ambion, X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent von Roche (Abb. 16), und INTERFERinTM siRNA transfection reagent von Polyplus, PeqLab) zur Verfügung. Es zeigte sich, dass mithilfe der siRNA#3 und des INTERFERinTM-Transfektionsreagenz die beste bzw. deutlichste *skNAC*-Hemmung erzielt werden konnte. Diese Reagenzien wurden daher in Kombination für alle folgenden Transfektionen im Rahmen dieser Arbeit benutzt. Auf die Konzentration des α NAC-Transkripts hatte die Transfektion mit *skNAC*-spezifischer siRNA keinen Einfluss (Abb.15).

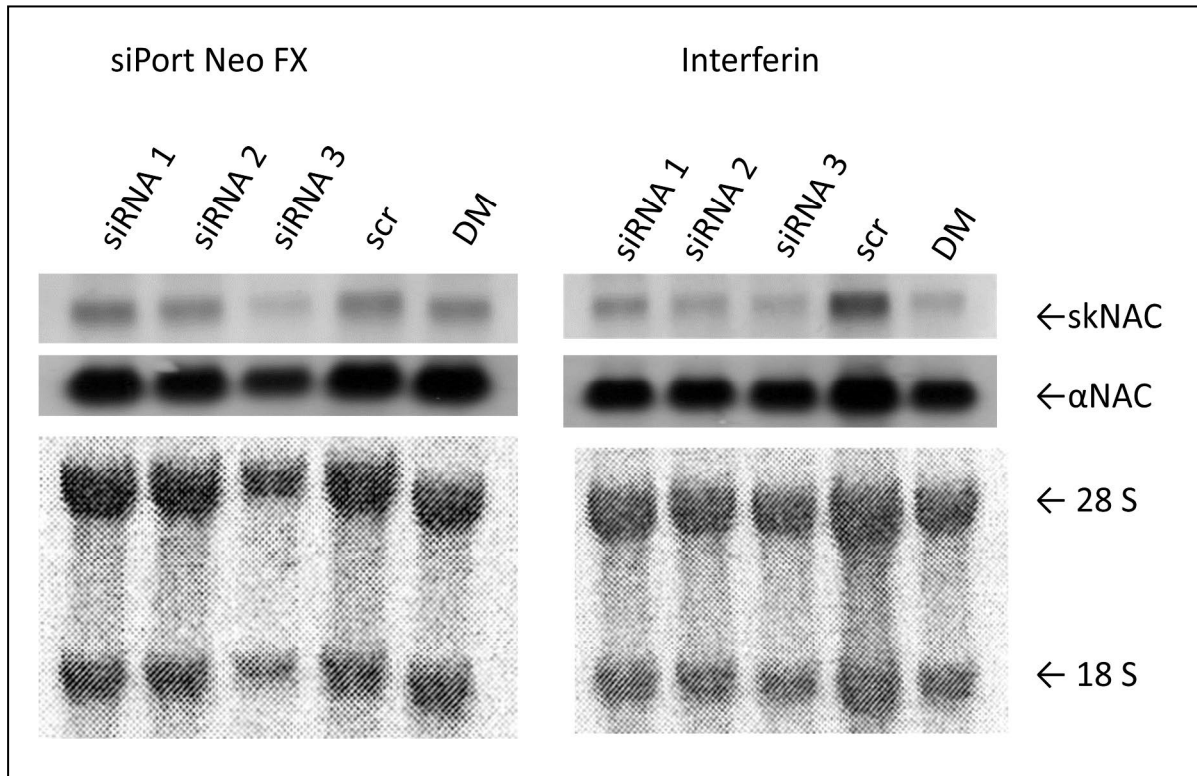


Abbildung 15: Optimierung der Transfektionsbedingungen für zwei verschiedenen Transfektionsreagenzien. *Northern Blot*-Analyse der Expression von *skNAC* bei mit *skNAC*-spezifischer siRNA (1 μ M) transfizierten C2C12-Zellen im Vergleich zu zwei Kontrollen: Zellen mit *scrambled* (*scr*)-RNA (1 μ M) transfiziert sowie Zellen lediglich in Differenzierungsmedium (DM) kultiviert. 24 h nach Differenzierungsinduktion wurde die gesamtzelluläre RNA aus den Zellen isoliert. Es wurden 2 μ g RNA pro Spur aufgetragen und mit einer α -*NAC*/ *skNAC*-*antisense*-Sonde hybridisiert. Als Kontrolle für die gleichmäßige RNA-Beladung sowie die Intaktheit der RNA diente die jeweils unten abgebildete Methylenblaufärbung. Unterschiede in der Beladung sind auf Mess- bzw. Pipettierfehler zurückzuführen.

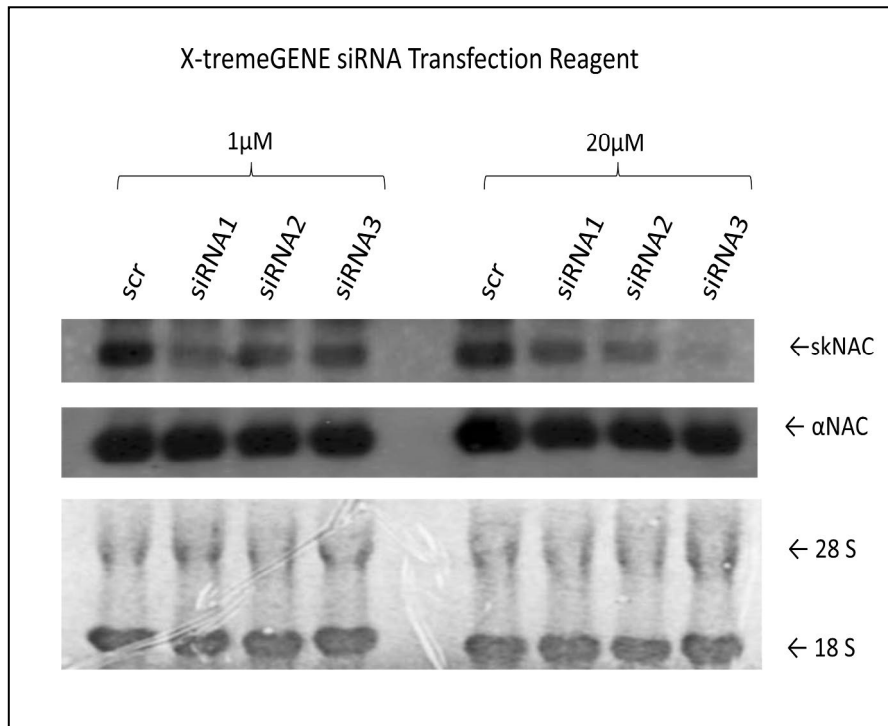


Abbildung 16: Abgebildet sind die Ergebnisse der *Northern Blot*-Analyse von C2C12-Zellen, welche mit dem Transfektionsreagenz X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent der Firma Roche behandelt wurden im Vergleich zu zwei Kontrollen: Zellen mit *scrambled* (*scr*)-RNA transfiziert sowie Zellen lediglich in Differenzierungsmedium (DM) kultiviert. Es wurden hierbei zusätzlich die Konzentrationen der siRNAs bzw. der *scrambled* (*scr*) RNA variiert (1 μM und 20 μM). 24 h nach Differenzierungsinduktion wurde die gesamtzelluläre RNA aus den Zellen isoliert. Es wurden 2,8 μg RNA pro Spur aufgetragen und mit einer α -NAC/*skNAC*-antisense-Sonde hybridisiert. Als Kontrolle für die gleichmäßige RNA-Beladung sowie die Intaktheit der RNA diente die jeweils unten abgebildete Methylenblaufärbung. Unterschiede in der Beladung sind auf Mess- bzw. Pipettierfehler zurückzuführen. Die deutlichste Hemmung der *skNAC*-Expression war bei siRNA#3 in einer Konzentration von 20 μM zu vermerken.

Weiterhin wurde die Zelldichte variiert. Es stellte sich heraus, dass das Aussäen einer Zellzahl gemäß den Angaben des Herstellers des Transfektionsreagenz INTERFERin™ (2×10^5 Zellen pro Vertiefung) nach vorherigem Auszählen der Zellen in der „Neubauer-Zählkammer“ die beste Effektivität der Transfektion zur Folge hatte.

3.2.1.2 Untersuchung des Transfektionserfolgs auf RNA-Ebene im zeitlichen Verlauf

Im Anschluss an die Optimierung der Transfektionsbedingungen sollte getestet werden, ob es möglich ist, mittels siRNA-Transfektion die *skNAC*-Expression in Differenzierungsmedium über einen längeren Zeitraum stabil zu hemmen. Hierfür wurden C2C12-Zellen wie unter 2.2.1.4 beschrieben mit *skNAC*-spezifischer siRNA sowie mit der Kontroll-siRNA (*scrambled*, *scr*) transfiziert und vier Tage lang kultiviert. In diesem Zeitraum wurden zu verschiedenen Zeitpunkten total RNA-Proben, z.T. auch zytosolische Proteinlysate, gewonnen und mittels *Northern Blot*-Analyse (bzw. *Western Blot*-Analyse) auf die Expression des *skNAC*-Gens hin untersucht (Abb. 17).

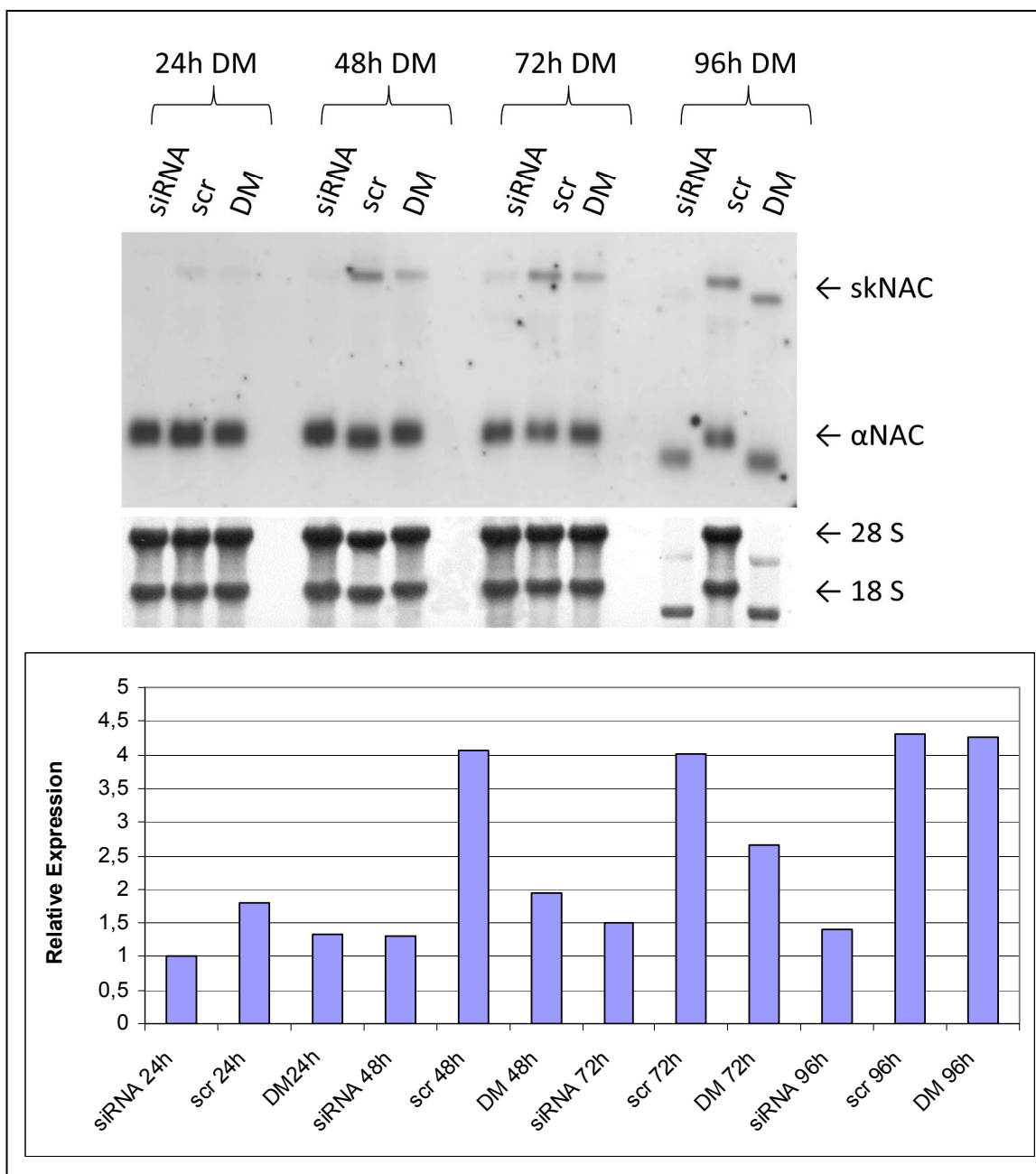


Abbildung 17: Northern Blot- Analyse der Expression von $\alpha/skNAC$ während der Differenzierung von C2C12-Zellen nach siRNA-Behandlung. Es wurden jeweils 2 μ g gesamtzelluläre RNA pro Spur aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit einer $\alpha/skNAC$ -spezifischen RNA-Sonde. Als Kontrolle für eine gleichmäßige RNA-Beladung der Spuren sowie für die RNA-Intaktheit diente die unten abgebildete entsprechende Methylenblau-Färbung. Unterschiede in der Beladung sind auf Mess-bzw. Pipettierfehler zurückzuführen. Zur Veranschaulichung wurde dieser Versuch mittels densitometrischer Methoden quantifiziert (Diagramm).

Bei den Kontrollen (*scr*) sowie bei den Zellen, die nicht transfiziert worden waren (DM), sah man nach 24 h eine leichte und später eine deutliche Expression des *skNAC*-Gens. Gleichzeitig konnte eine deutliche Minderung der *skNAC*-RNA-Expression zu allen vier untersuchten Zeitpunkten von durchschnittlich ca. 60 % festgestellt werden (nach 24 h eine Hemmung um ca. 45 %, nach 48 h eine Hemmung um ca. 68 %, nach 72 h eine Hemmung um ca. 63 % sowie nach 96 h eine Hemmung der *skNAC*-Expression um ca. 66 %). Somit wurde die Transfektion als erfolgreich angesehen.

Die im weiteren Verlauf dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse machten es erforderlich, mehr und auch etwas spätere Zeitpunkte zu analysieren (s.u.). Ebenso sollte die Reproduzierbarkeit gegeben sein bzw. überprüft werden. Daher wurde im späteren Verlauf dieser Arbeit ein weiterer, entsprechender Transfektionsversuch nach gleichem Versuchsmuster durchgeführt. Hierbei wurden die C2C12-Zellen jedoch über 120 h kultiviert und es wurden nach 20 h, 28 h, 35 h, 44 h, 72 h, 96 h sowie nach 120 h gesamtzelluläre RNA-Proben sowie Proteinlysate entnommen (Abb. 17). Die RNA-Isolierung und –Aufreinigung sowie das *Northern Blot*-Verfahren erfolgte wie beim vorher beschriebenen Versuch.

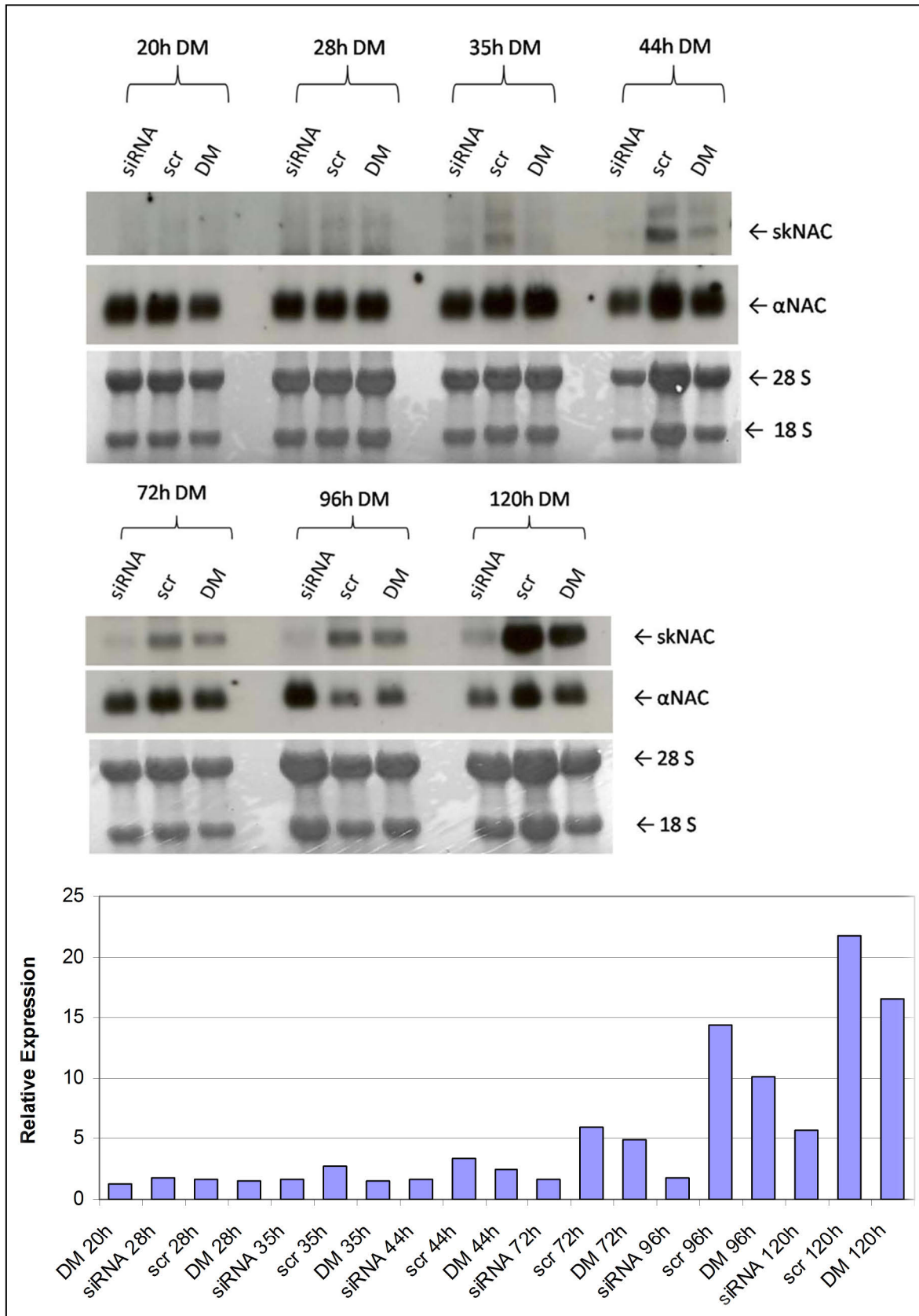


Abbildung 18: *Northern Blot*-Analyse der Expression von *skNAC* während der Differenzierung von C2C12-Zellen nach siRNA-Behandlung. Es wurden 1,5 μ g RNA pro Spur aufgetragen und mit einer *skNAC*-antisense-Sonde hybridisiert. Als

Kontrolle für eine gleichmäßige RNA-Beladung sowie für die RNA-Intaktheit diene die unten abgebildete Methylenblau-Färbung. Zusätzlich wurden die Banden mittels densitometrischer Methoden quantifiziert um die Expressionsunterschiede unter Berücksichtigung eines möglicherweise ungleichmäßigen Beladungsauftrags besser darstellen zu können. Zur Veranschaulichung wurde dieser Versuch mittels densitometrischer Methoden quantifiziert (Diagramm).

Auch in diesem Versuch zeigte sich eine verminderte *skNAC*-RNA-Expression nach Transfektion der C2C12-Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten. Insbesondere zu späteren Zeitpunkten mit normalerweise hoher *skNAC*-Expression (siehe Kontrollen *scr* und DM) war eine deutliche Hemmung in den mit siRNA transfizierten Zellen zu beobachten.

3.2.1.3 Untersuchung des Transfektionserfolgs auf Proteinebene

Um den Transfektionserfolg auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurden die parallel zu den oben beschriebenen RNA-Proben genommenen Proteinlysate mithilfe eines laboreigenen $\alpha/skNAC$ -Antikörpers untersucht. Der hierfür benutzte Antikörper war derselbe, welcher für die Immunhistochemie benutzt wurde (siehe 2.2.4.4.1).

Dabei war erkennbar, dass die mit siRNA-transfizierten Zellen auch auf Proteinebene eine geringere *skNAC*-Expression zeigten als die behandelten Kontrollen sowie die unbehandelten Zellen. Die Konzentration des parallel dazu nachgewiesenen α -NAC-Proteins war hingegen nicht verändert (Abbildung aufgrund zu starken Hintergrundes in der *Western Blot*-Analyse nicht gezeigt).

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte dann der Einfluss einer Hemmung der *skNAC*-Expression mittels siRNA-Transfektion auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der C2C12-Zellen analysiert werden. Hierfür wurden mit *skNAC*-siRNA-transfizierte Zellen sowie geeignete Kontrollen differenziert und anschließend einerseits histologisch begutachtet. Andererseits wurden die Zellproliferation sowie die Expression geeigneter myogener Differenzierungsmarker im Differenzierungsverlauf analysiert.

3.2.1.4 Histologische Untersuchung der *skNAC*-siRNA-transfizierten Zellen

Die transfizierten Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion unter dem Lichtmikroskop betrachtet und auf ihre Zelldichte hin untersucht. Hierbei konnte lichtmikroskopisch kein erkennbarer Unterschied zwischen den transfizierten Zellen und den Kontrollen ausgemacht werden (Abb.19).

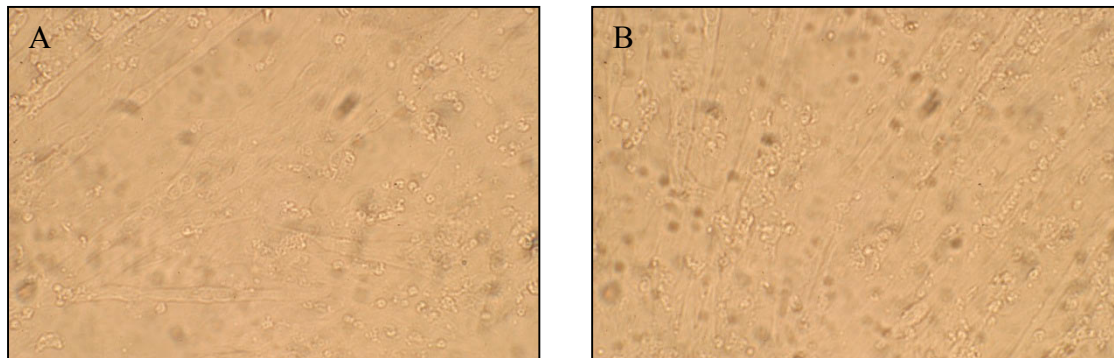


Abbildung 19: Lichtmikroskopische Aufnahme von mit *skNAC* spezifischer siRNA transfizierten (A) und nicht transfizierten (B) C2C12-Zellen nach 96 h in Differenzierungsmedium. Hierbei konnte kein deutlicher Unterschied bezüglich der Zelldichte der Zellen ausgemacht werden.

Daraufhin wurde als nächster Schritt molekularbiologisch die Proliferationsrate bestimmt.

3.2.1.5 Analyse des Proliferationsverhaltens der transfizierten Zellen in

Proliferationsmedium

Um den Einfluss der siRNA-Behandlung auf das Proliferationsverhalten der C2C12-Zellen in Proliferationsmedium zu überprüfen, wurden Zellen wie oben beschrieben transfiziert, und mithilfe des *BrdU-labeling-Kits* untersucht (siehe 2.2.4.4.3). Jedoch wurden hierbei anstelle von 6-Napf-Platten 96-Napf-Platten verwendet. Anhand des Grades der Lichtabsorption durch die Farbkomplexe kann auf die Proliferationsrate geschlossen werden.

Bei der Versuchsdurchführung wurden drei Gruppen im Dreifachansatz gebildet: ein Teil der Zellen wurde mit *skNAC*-spezifischer siRNA transfiziert, eine zweite Gruppe mit *scr*-siRNA und eine weitere Charge als Kontrollen (PM) gar nicht. 24 h nach der Transfektion wurden alle Zellen mit der *BrdU*-Lösung inkubiert. Nach weiteren 2 h, 8 h und nach 24 h wurde

jeweils die Reaktion gestoppt, bei 450 nm die Absorption im ELISA-Reader gemessen und aus dieser die Proliferationsrate bestimmt (Abb.20).

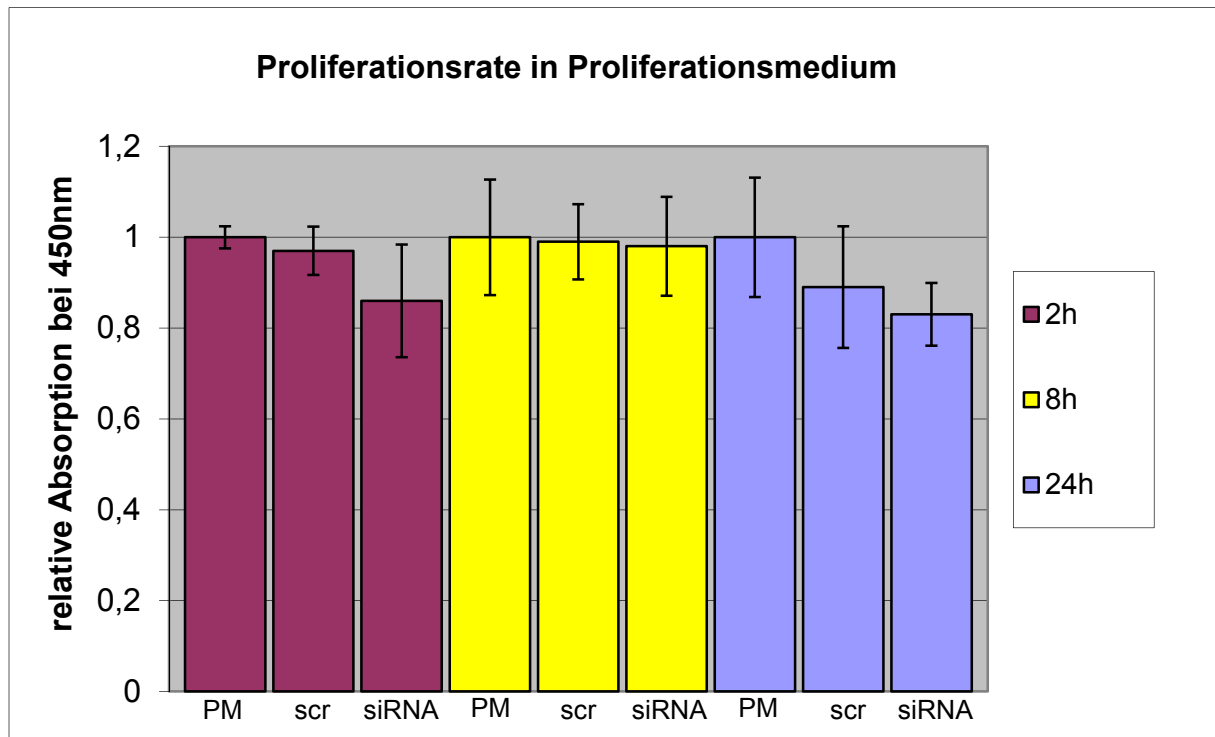


Abbildung 20: Diagramm zum Proliferationsverhalten der mit *skNAC*-siRNA bzw. *scrambled* (*scr*)-siRNA transfizierten und der unbehandelten C2C12-Zellen im Proliferationsmedium (PM). Dargestellt sind die drei verschiedenen Zellgruppen (Kontrolle PM, mit *scr* und mit *skNAC*-siRNA transfiziert) zu jeweils drei verschiedenen Zeitpunkten (2 h lila, 8 h gelb, 24 h blau) in Proliferationsmedium. Die relative Absorption der behandelten Zellen ist dabei jeweils pro Zeitpunkt für PM gleich 1 gesetzt; alle anderen Werte sind pro Zeitpunkt relativ dazu berechnet. Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt (n=3).

Hierbei war kein signifikanter Unterschied zwischen *skNAC*-siRNA-transfizierten und *scrambled*- bzw. nichttransfizierten Kontrollen zu beobachten. Somit lässt sich schlussfolgern, dass eine Hemmung der *skNAC*-Expression keinen Einfluss auf die Proliferationsrate von Myoblasten hatte.

3.2.1.6 Analyse des Proliferationsverhaltens der transfizierten Zellen in Differenzierungsmedium

Um auch den Einfluss der Transfektion der Zellen auf deren Proliferationsverhalten in Differenzierungsmedium zu untersuchen, wurde mithilfe des *BrdU-labeling-Kits* wie oben beschrieben verfahren, jedoch wurde 24 h nach der Transfektion das Proliferationsmedium gegen Differenzierungsmedium ausgetauscht und wiederum erst 24 h später die *BrdU*-Lösung eingesetzt. Auch hier wurde nach 2 h, 8 h sowie nach weiteren 24 h die Reaktion abgestoppt, die Absorption der Zellen bei 450 nm gemessen und daraus die Proliferationsrate bestimmt (Abb.21).

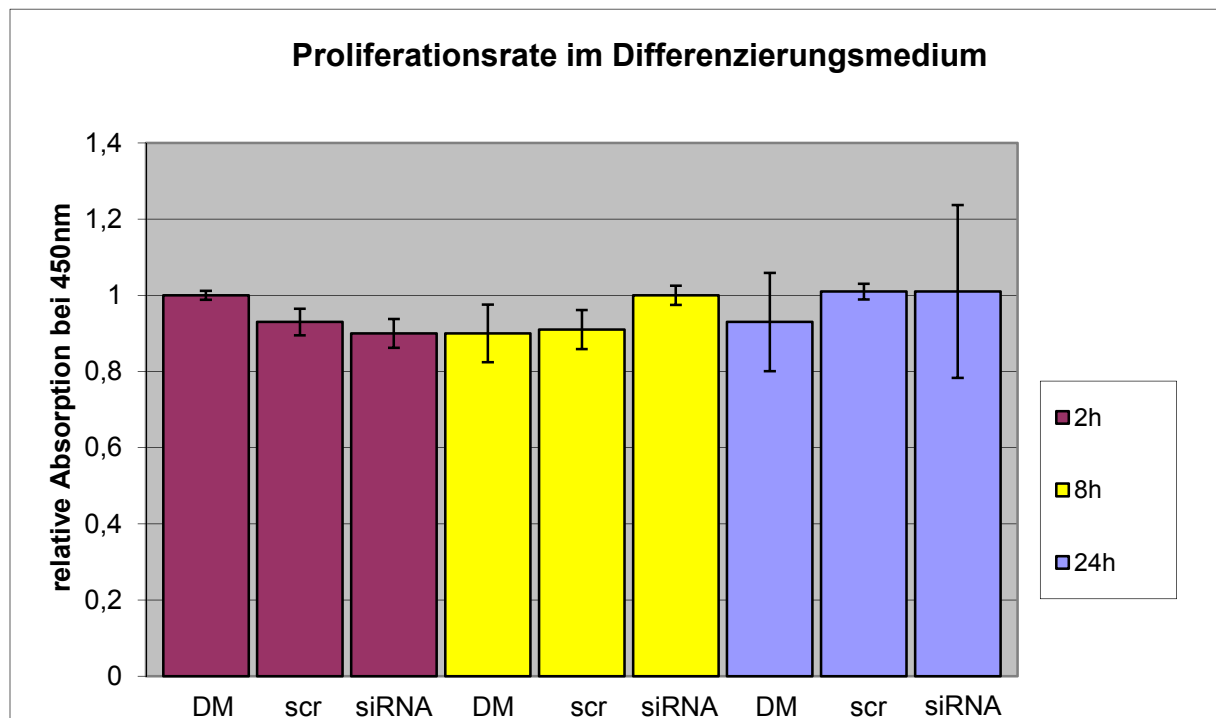


Abbildung 21: Diagramm zum Proliferationsverhalten der mit *skNAC*-siRNA bzw. *scrambled (scr)*-siRNA transfizierten und der unbehandelten C2C12-Zellen in Differenzierungsmedium (PM). Dargestellt sind die drei verschiedenen Zellgruppen (Kontrolle DM, mit *scr* und mit *skNAC*-siRNA transfiziert) zu jeweils drei verschiedenen Zeitpunkten (2 h lila, 8 h gelb, 24 h blau) in Differenzierungsmedium. Die relative Absorption der behandelten Zellen ist dabei jeweils pro Zeitpunkt für PM gleich 1 gesetzt; alle anderen Werte sind pro Zeitpunkt relativ dazu berechnet. Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt (n=3).

Bezüglich des Proliferationsverhaltens der transfizierten C2C12-Zellen in Differenzierungsmedium konnten mithilfe des *BrdU*-Verfahrens ebenfalls keine markanten Unterschiede ausgemacht werden. Hier zeigten die mit siRNA transfizierten Zellen nach 24 h eine leicht geringere Proliferationsrate als die nicht transfizierten Zellen (DM) sowie die Transfektionskontrollen (*scr*).

3.2.2 Analyse des Differenzierungsverhaltens der transfizierten Zellen

Da bei histologischer Betrachtung der transfizierten Zellen durch ein Lichtmikroskop keine Beeinflussung der Differenzierung durch die Hemmung der *skNAC*-Expression zu erkennen war wurden verschiedene Differenzierungsmarker auf molekularer Ebene untersucht.

3.2.2.1 Untersuchung des Einflusses der Hemmung der *skNAC*-Expression auf die *MyHC-I*-Expression auf RNA-Ebene

Wie bereits unter 1.3.3 beschrieben spielt Myosin-heavy-chain (MyHC) in der Muskelphysiologie eine zentrale Rolle bei der Muskelkontraktion. Während der Skelettmuskeldifferenzierung wird das *MyHC*-Gen in C2C12-Zellen relativ früh exprimiert, bereits 24 h nach Inkubation in Differenzierungsmedium konnten Langley *et al.* 2002 das MyHC-Protein detektieren, nach 48h in noch höherer Konzentration. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Repression der *skNAC*-Expression Auswirkungen auf die *MyHC*-Expression haben könnte. Zusätzlich sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich ähnliche Beobachtungen ergeben könnten wie von Li *et al.* 2009 beschrieben: Hier war im Zebrafisch-Embryo nach einem *knockdown* der *skNAC*-Expression eine Verminderung des MyHC-Proteinlevels sowie eine anormale Myofibrillenbildung beobachtet worden.

3.2.2.1.1 Herstellung der *Myosin-heavy-chain-I*-Sonde

Die in dieser Arbeit untersuchte adulte Isoform des *MyHC* ist das *MyHC-I*, welches in langsamen Muskelfasern vorkommt. In unserem Labor stand zu Beginn dieser Arbeit noch keine geeignete *MyHC-I*-Sonde zur Verfügung. Um jedoch den Einfluss der *skNAC*-Hemmung auf das myogene Differenzierungsverhalten analysieren zu können, wurde im

Verlauf dieser Arbeit eine *antisense*-RNA-Sonde hergestellt, mit deren Hilfe das adulte *Myosin-heavy-chain* (MyHC-1), ein klassischer myogener Differenzierungsmarker, durch die *Northern Blot*-Analyse nachgewiesen werden sollte.

Zur Generierung einer entsprechenden Sonde musste zunächst ein geeignetes cDNA-Fragment amplifiziert und in einen Transkriptionsvektor kloniert werden, mit dessen Hilfe dann später die Transkription der eigentlichen Sonde erfolgen sollte.

Hierfür wurde zunächst eine geeignete cDNA aus muriner Skelettmuskel-RNA (6 Monate alte Mäuse, Zyagen) mithilfe des *First strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Anschließend wurde mit MyHC1-spezifischen Primern eine PCR durchgeführt. Die erhaltenen Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, wobei Banden in der erwarteten Größe sichtbar wurden (Abb.22). Diese wurden dann präparativ aufgereinigt.

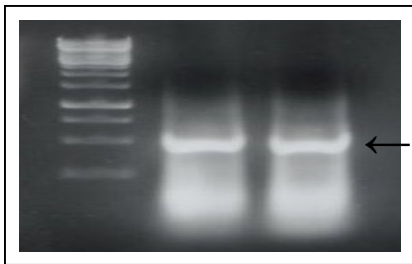


Abbildung 22: PCR-Produkte. In der ersten Spur wurden 5 μ l eines Größenmarkers aufgetragen, in der zweiten und dritten die gesamten PCR-Produkte als Doppelansatz. Es ist jeweils eine deutliche Bande bei 500 bp sichtbar (Pfeil).

Anschließend wurden das Fragment sowie der Vektor, in den dieses eingefügt werden sollte, mit dem Restriktionsenzym-*EcoRI* verdaut, um kompatible Enden zu erzeugen. Nach erneuter Reinigung der DNA (siehe 2.2.3.4) wurde erneut ein analytisches Agarosegel angefertigt. Dieses Kontrollgel diente zum einen dem Nachweis der Intaktheit und Reinheit von *Insert* und Vektor und zum anderen der Abschätzung der Konzentrationen beider Komponenten. Da der Vektor, um eine Einfügung des gewünschten cDNA-Fragments zu begünstigen, in einer geringeren molaren Konzentration als das zu inserierende Fragment vorhanden sein sollte, wurde dieser in der darauffolgenden Ligation (siehe 2.2.3.5) verdünnt (1:8-1:10) eingesetzt. Nach der Transformation der Bakterien und analytischer Aufreinigung der DNA aus geeigneten Kolonien wurde das Plasmid aus zwei Kolonien sequenziert, wobei sich ergab, dass das hergestellte Konstrukt in der Tat das gewünschte Fragment aus der *MyHC*-cDNA enthielt (cDNA-Sequenz siehe Anhang). Das Plasmid diente dann nach erneuter Linearisierung mittels *EcoRI* als Matrize für die *in-vitro*-Transkription durch T3- RNA-Polymerase in *antisense*-Orientierung. Anschließend wurde die so gewonnene RNA gereinigt und eine geringe Menge davon auf ein letztes Kontrollgel aufgetragen.

Um die Spezifität der neuen RNA-Sonde zu überprüfen, wurde gesamtzelluläre RNA, welche aus proliferierenden und differenzierenden C2C12-Zellen isoliert worden war, auf ein Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, mithilfe des *Northern Blot*-Verfahrens auf eine Membran transferiert und diese mit der neu hergestellten *MyHC*-1-Sonde in einer 1:1000-Verdünnung hybridisiert (Abb.23).

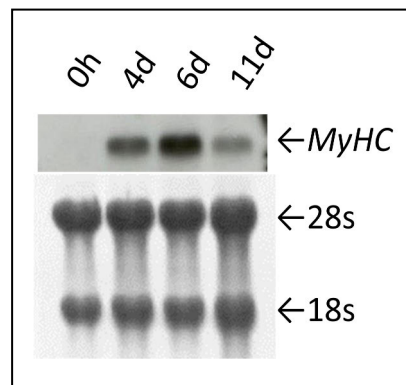


Abbildung 23: Northern Blot-Analyse der Myosin-heavy-chain Genexpression bei einer C2C12-Differenzierungskinetik. Es wurden jeweils 2 µg gesamtzelluläre RNA pro Spur aufgetragen und mit der neu hergestellten antisense-Sonde gegen Myosin-heavy-chain (*MyHC*) hybridisiert. Die unten abgebildete Methylenblau-Färbung diente als Kontrolle der RNA-Menge in jeder Spur sowie der RNA-Intaktheit.

Hier war in differenzierenden Zellen deutlich eine *MyHC*-spezifische Bande im Bereich von ca. 6000 bp sichtbar, welche zum Zeitpunkt 0 d, also in proliferierenden Zellen, noch nicht auftrat. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass das adulte *MyHC-1* erst nach zwei Tagen in Differenzierungsmedium auf RNA-Ebene exprimiert wird. Die Funktionalität und Spezifität der neu hergestellten Sonde konnte hiermit bestätigt werden.

3.2.2.1.2 Untersuchung des Einflusses der Hemmung der *skNAC*-Expression auf die *MyHC*-Expression auf RNA-Ebene

Nachfolgend sollten die RNA-Isolate der transfizierten C2C12-Zellen bezüglich der Expression von *MyHC-1* untersucht werden. Hierfür wurde ebenfalls die *Northern Blot*-Analyse sowie die neu hergestellte *MyHC*-Sonde verwendet.

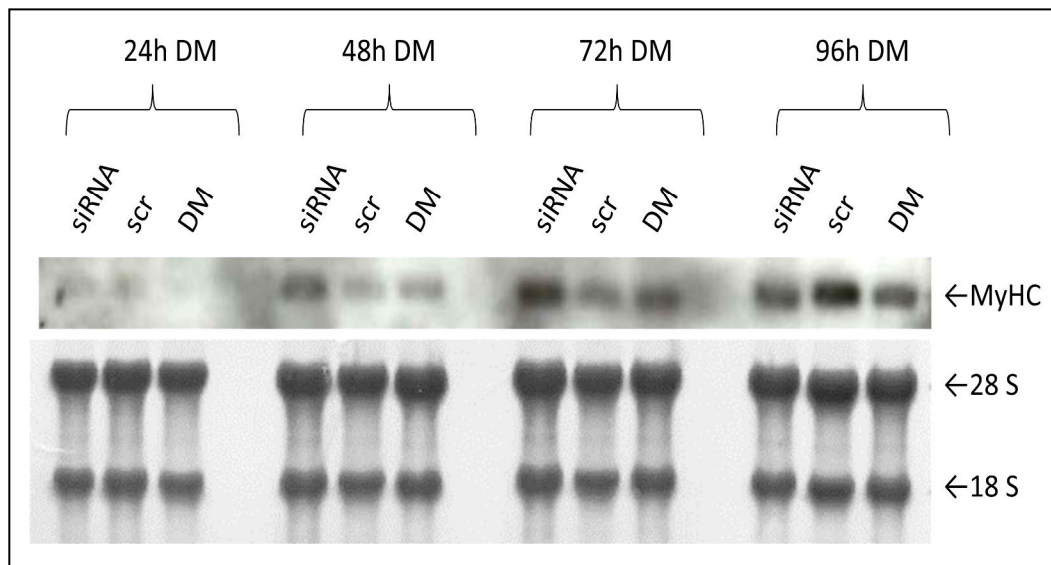


Abbildung 24: Northern Blot-Analyse der Expression von *MyHC* während der Differenzierung von C2C12-Zellen nach siRNA-Behandlung. Es wurden 2 µg RNA pro Spur aufgetragen und mit einer *MyHC*-antisense-Sonde hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige RNA-Beladung sowie für die RNA-Intaktheit diente die unten abgebildete Methylenblau-Färbung.

Es zeigte sich keine verminderte *MyHC-I*-Expression durch die *skNAC*-siRNA Transfektion der C2C12-Zellen (Abb.24). Da die Ergebnisse der ersten beiden Versuche offen ließen, ob eventuell sogar eine leichte Induktion der *MyHC*-Expression vorliegen könnte, wurde ein weiterer Versuch nach gleichem Versuchsmuster durchgeführt. Jedoch wurden dabei insgesamt mehr Proben über einen längeren Zeitraum genommen (20 h, 28 h, 35 h, 44 h, 72 h, 96 h, 120 h). Auch hier wurde die *MyHC*-Expression zunächst mithilfe des *Northern Blot*-Verfahrens untersucht (Abb.25).

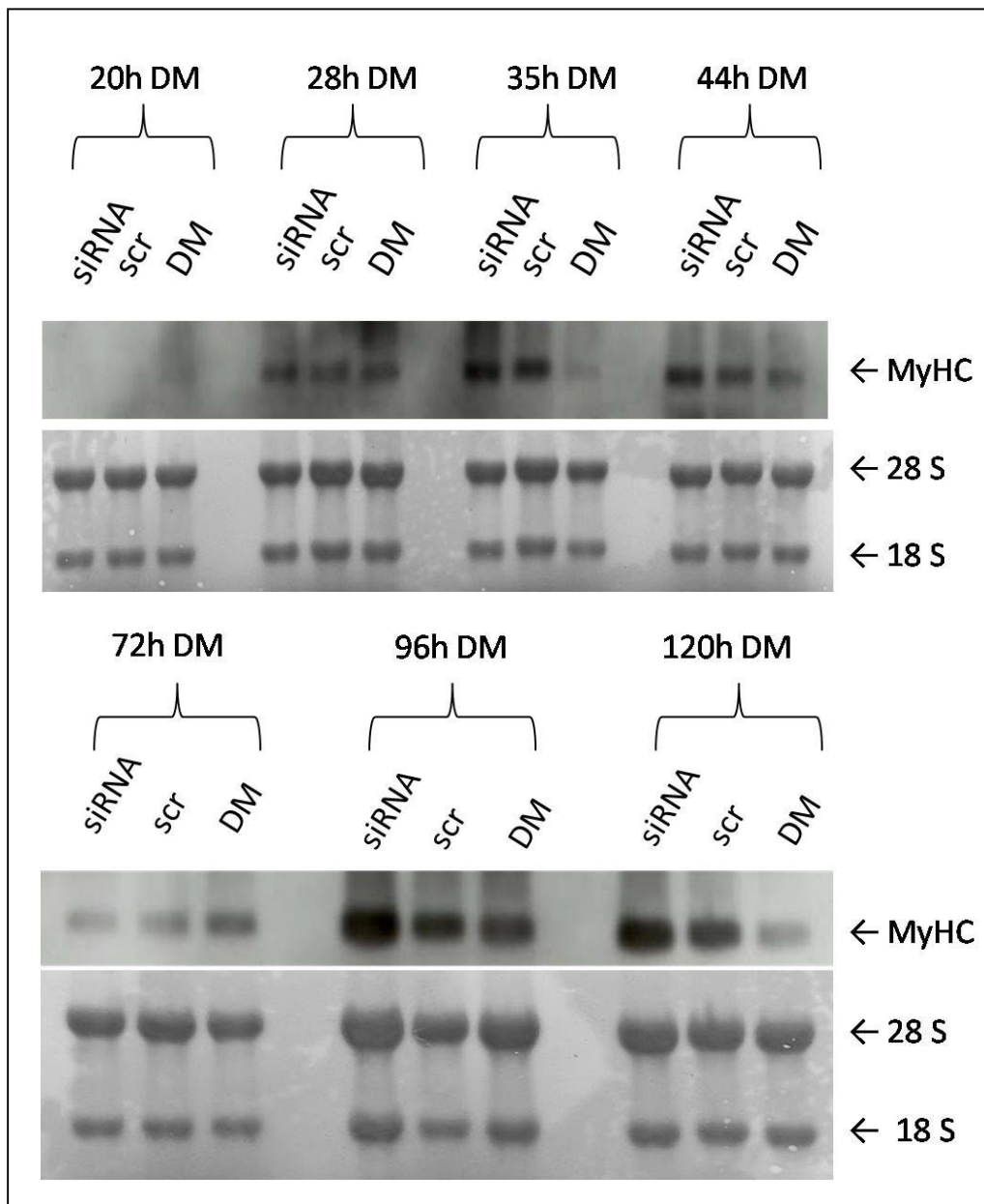


Abbildung 25: Northern Blot–Analyse der Expression von *MyHC* während der Differenzierung von C2C12-Zellen nach siRNA-Behandlung. Es wurde 1 μg RNA pro Spur aufgetragen und mit einer *MyHC*-antisense-Sonde hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige RNA-Beladung sowie für die RNA-Intaktheit diente die unten abgebildete Methylenblau-Färbung.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sowie die graphisch-statistische Auswertung aller anderen, in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten jedoch, dass sich die *MyHC*-Expression von siRNA- bzw. *scrambled*-siRNA-transfizierten Zellen und Kontrollzellen nicht deutlich

unterschied. Bei den transfizierten Zellen kam es zu nicht zu einer Hemmung der *MyHC*-Expression. Sogar eine leichte Induktion der *MyHC*-Expression war nicht auszuschließen.

3.2.3 Untersuchung weiterer Differenzierungsmarker

Wie weiter oben bereits erwähnt eignen sich bestimmte Gene bzw. Genprodukte als sog. Differenzierungsmarker. Ihre Detektion bzw. Expressionsanalyse gibt Aufschluss über den Erfolg der Differenzierung der zu untersuchenden Zellen.

Als besonders geeignet für die in dieser Arbeit genutzten C2C12-Zellen gelten u.a. Myogenin, p21, MyHC, Desmin, Caveolin-3, Entactin-1 und auch α -Actinin. Daher wurden sowohl die transfizierten C2C12-Zellen als auch die nicht transfizierten Kontrollzellen auf die Expression dieser Differenzierungsmarker hin untersucht. Es sollte hierdurch überprüft werden, ob eine Hemmung der *skNAC*-Expression einen Einfluss auf die typischen, bei der Skelettmuskeldifferenzierung eine Rolle spielenden Proteine haben könnte.

3.2.3.1 Untersuchung des Einflusses der Hemmung der *skNAC*-Expression auf die *MyHC*-Expression auf Protein-Ebene

Li *et al.* untersuchten 2009 in *skNAC-knockdown*-Fischembryos die Anordnung der Myofibrillen in den dicken Filamenten von langsamen Muskelfasern. Interessanterweise stellte sich die Anordnung der Filamente als unterbrochen dar. Die Myofibrillen wiesen einen großen zentralen Zellkern auf, ein Bild, wie es sich in Skelettmuskelzellen normalerweise nur bei unreifen Zellen während der Myogenese zeigt. Bei den Kontrolltieren kam es nicht zu solchen Veränderungen. Daher vermuteten Li *et al.*, dass *skNAC* eine wichtige Rolle bei der Organisation der dicken Filamente im Zebrafischembryo spielt.

Um zu untersuchen, ob eine Hemmung der *skNAC*-Expression die Konzentration des MyHC-Proteins in den transfizierten C2C12-Zellen beeinflusst, wurden die Proteinlysate, welche im Versuchsverlauf parallel zu den RNA-Zelllysaten genommen wurden, mithilfe des *Western Blot*-Verfahrens untersucht (Abb.26).

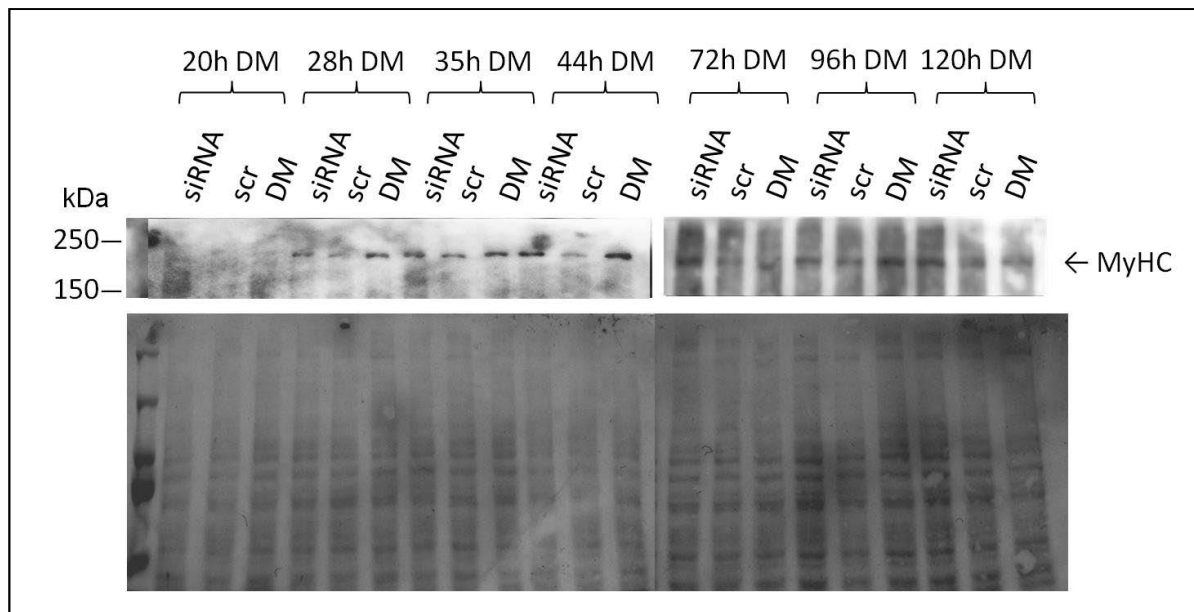


Abbildung 26: Western Blot-Analyse der Expression von MyHC während der Differenzierung von C2C12-Zellen nach siRNA-Behandlung. Es wurde ein 7,5 %iges Gel verwendet und je Spur wurden 5 µg Protein aufgetragen. Die Detektion des 220 kDa großen MyHC-Proteins erfolgte mithilfe eines spezifischen Antikörpers. Zur Größenorientierung diente ein Proteinmarker in der ersten Spur. Als Kontrolle der gleichmäßigen Spurbeladung sowie der Transfereffizienz und der Intaktheit der Proteine diente die unten abgebildete Ponceaus-Färbung.

Es zeigte sich nach 28 h eine leichte Steigerung der MyHC-Proteinkonzentration bei den mit siRNA-behandelten Zellen, welche im zeitlichen Verlauf mehr oder weniger konstant bestehen blieb. Es war hierbei kein deutlicher Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen zu beobachten. Die MyHC-Analyse auf Proteinniveau bestätigte somit bis hierhin die für die *MyHC*-mRNA gewonnenen Daten in der Weise, dass es zu keiner Verminderung der MyHC-Proteinkonzentration kommt. Gegenteilig erschien es in der *Western Blot*-Analyse sogar so, dass es zu einem leichten Anstieg der Proteinbildung bei den mit *skNAC*-spezifischer-siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu den anderen beiden Kontrollgruppen (*scr*, DM) gekommen sein könnte.

3.2.3.2 Untersuchung des Einflusses der Hemmung der *skNAC*-Expression auf die *Myogenin*-Expression auf RNA-Ebene

Neben MyHC wurde als weiterer Differenzierungsmarker in den transfizierten C2C12-Zellen die Expression des *Myogenin*-Gens auf RNA-Ebene untersucht. Myogenin ist ein skelettmuskelspezifischer Transkriptionsfaktor, wobei das entsprechende Gen 24 h nach Differenzierungsbeginn am stärksten exprimiert und später wieder reprimiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit war eine Analyse der *Myogenin*-Genexpression insbesondere deshalb interessant, weil auch Li *et al.* 2009 die Expression dieses Gens im Modellsystem des *skNAC*-knockdown-Zebrafisch-Embryos analysiert hatten.

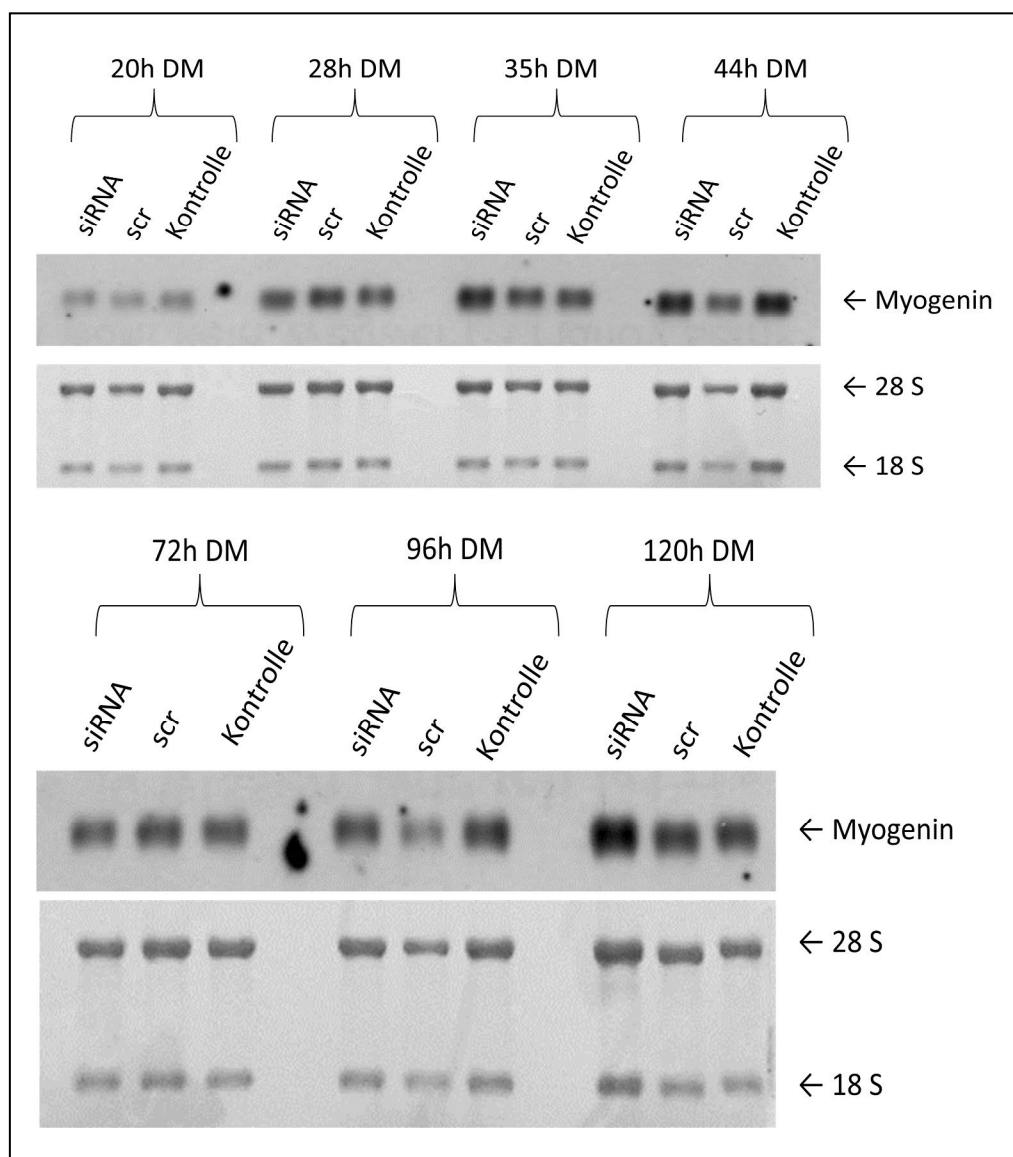


Abbildung 27: Northern Blot-Analyse der Expression von *Myogenin* während der Differenzierung von C2C12-Zellen nach siRNA-Behandlung. Es wurden 0,3 µg RNA pro Spur aufgetragen und mit einer *Myogenin*-antisense-Sonde

hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige RNA-Beladung sowie für die RNA-Intaktheit diente die unten abgebildete Methylenblau-Färbung.

Wie in Abbildung 27 gezeigt, ließ sich bei den siRNA-transfizierten Zellen ein ähnlicher Verlauf der *Myogenin*-Induktion beobachten wie bei den nicht transfizierten und bei den mit *scr* transfizierten Kontrollen, woraus sich schließen lässt, dass eine Reprimierung von skNAC keinen Einfluss auf die *Myogenin*-Genexpression auf RNA-Ebene hat. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Li *et al.* 2009, auch dort führte ein *skNAC-knockdown* bei Zebrafischen zu keiner Beeinflussung der *Myogenin*-Expression.

3.2.4 Untersuchung weiterer Differenzierungsmarker auf Proteinebene

Möglicherweise beeinflusst skNAC die Expression anderer myogener Gene. Daher wurde, wie nachfolgend beschrieben, die Expression einiger ausgewählter, typischer Differenzierungsmarker in den mit siRNA-transfizierten Zellen auf Proteinebene untersucht.

3.2.4.1 Desmin

Desmin ist ein Intermediärfilament, welches besonders in Muskelzellen und Endothelzellen vorkommt. Es spielt beim strukturellen Aufbau der Muskelfaser eine entscheidende Rolle (siehe 1.3.4). Im Rahmen dieser Arbeit war es daher interessant zu untersuchen, ob eine Repression der *skNAC*-Expression in C2C12-Zellen einen Einfluss auf die *Desmin*-Expression und somit eventuell auf den strukturellen Aufbau der Skelettmuskulatur hat. Daher wurden die transfizierten Zellen auf ihre *Desmin*-Expression hin mittels *Western Blot*-Analyse untersucht.

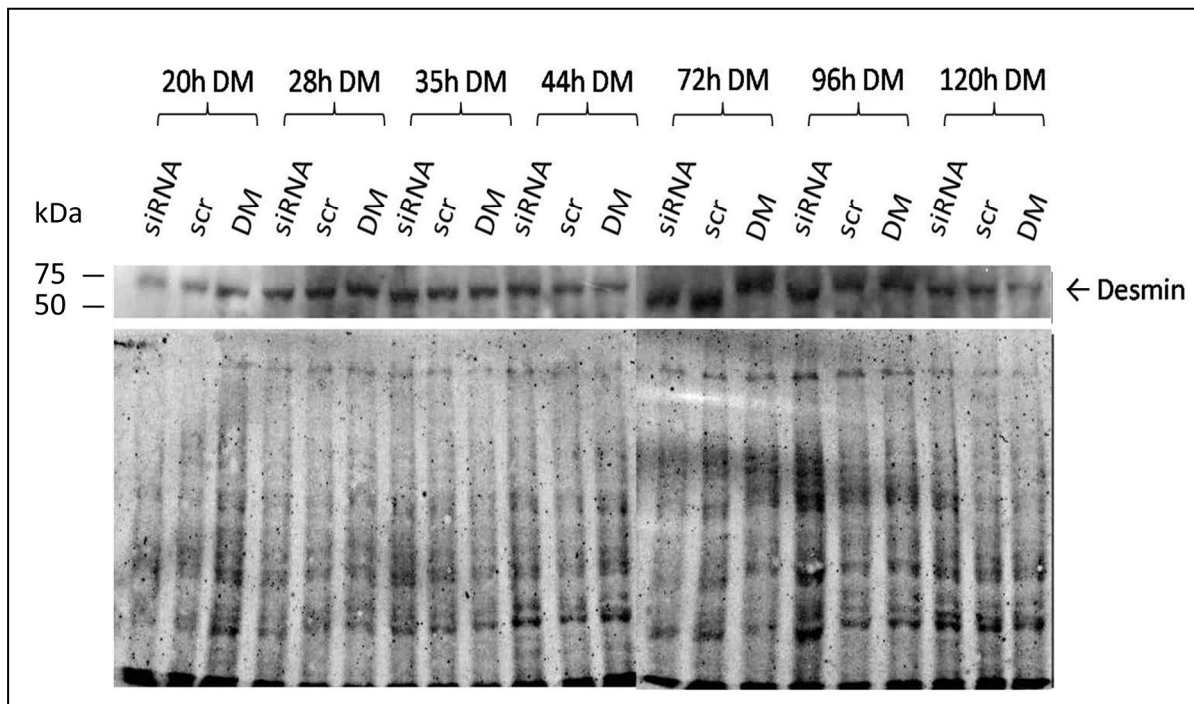


Abbildung 28: *Western Blot*-Analyse der Expression von *Desmin* während der Differenzierung von C2C12-Zellen nach siRNA-Behandlung. Es wurde ein 10 %-iges Gradientengel verwendet und je Spur wurden 5 µg Protein aufgetragen. Die Detektierung des 53 kDa großen *Desmin*-Proteins erfolgte mithilfe eines spezifischen Antikörpers. Zur Größenorientierung diente ein Proteinmarker in der ersten Spur. Als Kontrolle der gleichmäßigen Spurbeladung sowie der Transfereffizienz und der Intaktheit der Proteine diente die unten abgebildete PonceauS-Färbung.

Bezüglich der *Desmin*-Expression waren sowohl bei den transfizierten als auch bei den unbehandelten Zellen keine Unterschiede bemerkbar. Eine Expression dieses Gens war erwartungsgemäß bereits beim ersten Zeitwert von 20 h nach Differenzierungsinduktion detektierbar (Abb.28).

3.2.4.2 P21

Als nächstes sollte untersucht werden, ob eine Hemmung der *skNAC*-Expression Einfluss auf die Expression des für den Zellzyklus regulierenden Proteins p21 kodierenden Gens hat oder nicht.

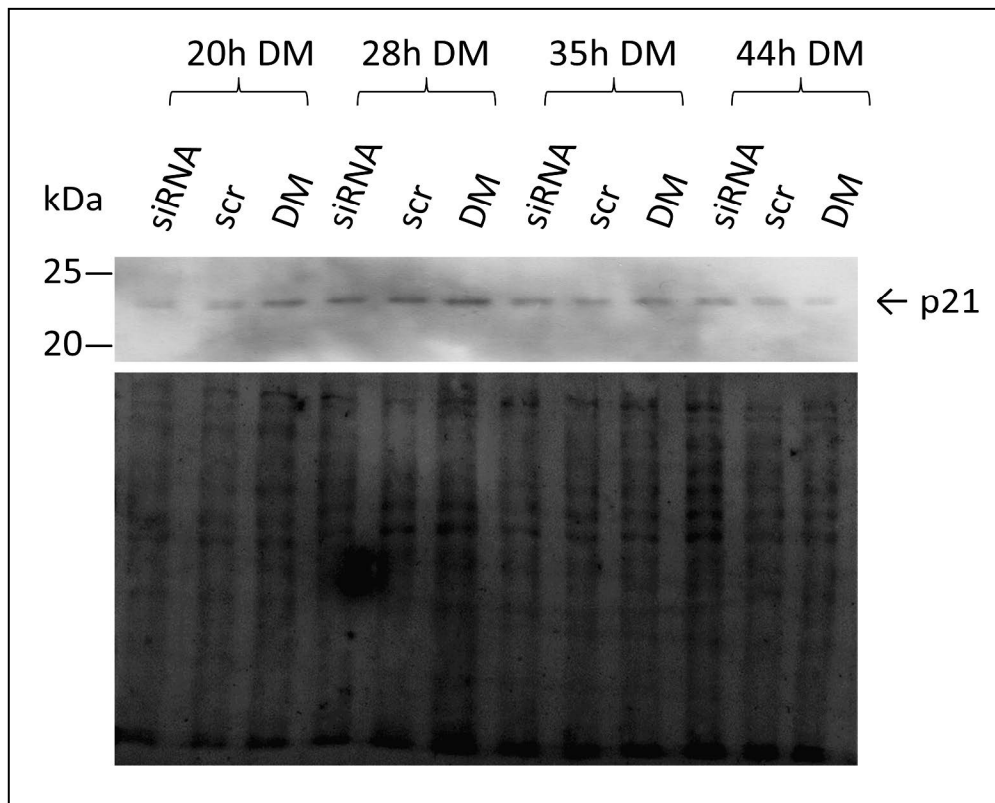


Abbildung 29: *Western Blot*-Analyse der Expression von *p21* während der Differenzierung von C2C12-Zellen nach siRNA-Behandlung. Es wurde ein 12,5 %iges Gel verwendet und je Spur wurden 2,5 µg Protein aufgetragen. Die Detektierung des 21 kDa großen *p21*-Proteins erfolgte mithilfe eines spezifischen Antikörpers. Zur Größenorientierung diente ein Proteinmarker in der ersten Spur. Als Kontrolle der gleichmäßigen Spurbeladung sowie der Transfereffizienz und der Intaktheit der Proteine diente die unten abgebildete PonceauS-Färbung.

Ein erwarteter Anstieg des *p21*-Proteins zu Beginn des Versuchs war deutlich zu erkennen. Es waren jedoch keine Unterschiede zwischen den behandelten und nicht behandelten Zellen zu beobachten. Somit hat skNAC vermutlich keinen Einfluss auf die *p21*-Expression in C2C12-Zellen.

3.2.4.3 Caveolin-3

Auch das muskelspezifische Protein Caveolin-3 wurde auf eine mögliche Beeinflussung durch die Hemmung der *skNAC*-Expression hin untersucht. Hierbei ergab sich folgendes Bild mittels *Western Blot*-Analyse:

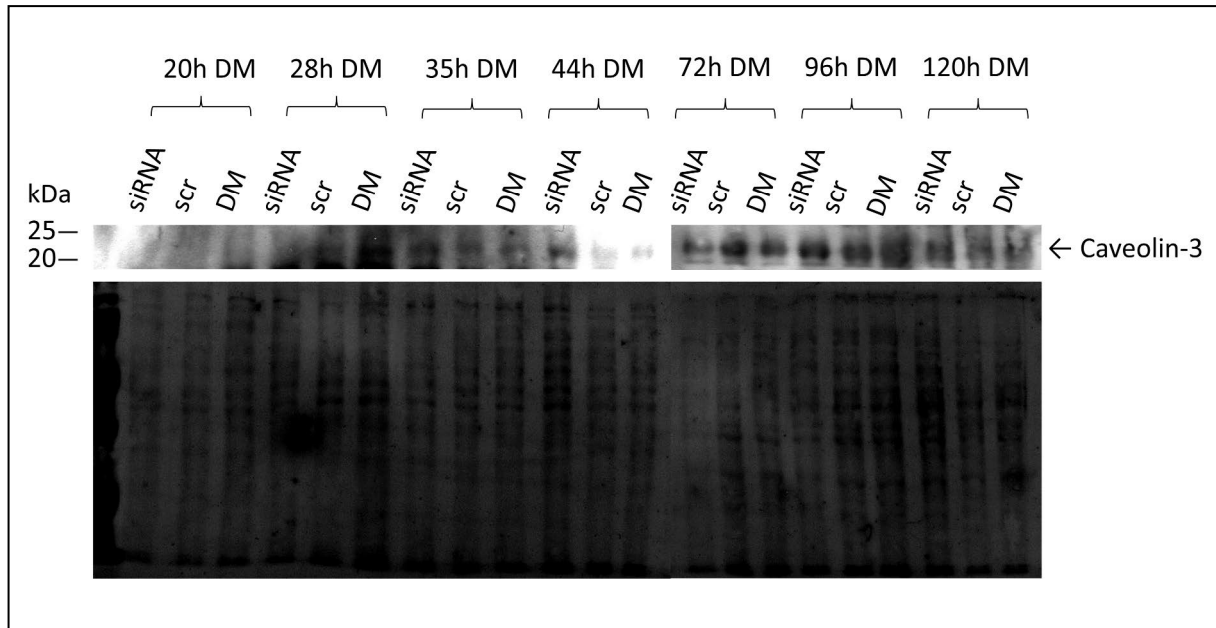


Abbildung 30: *Western Blot*-Analyse der Expression von *Caveolin-3* während der Differenzierung von C2C12-Zellen nach siRNA-Behandlung. Es wurde ein 12,5 %iges Gel verwendet und je Spur wurden 2,5 µg Protein aufgetragen. Die Detektion des 20-25 kDa großen Proteins erfolgte mithilfe eines spezifischen Antikörpers. Zur Größenorientierung diente ein Proteinmarker in der ersten Spur. Als Kontrolle der gleichmäßigen Spurbeladung sowie der Transfereffizienz und der Intaktheit der Proteine diente die unten abgebildete PonceauS-Färbung.

Wie in Abbildung 30 gezeigt, kam es bei den in dieser Arbeit transfizierten C2C12-Zellen nach 28 h in Differenzierungsmedium zu einer Induktion der *Caveolin-3*-Expression. Jedoch waren auch hier keine Unterschiede zwischen den behandelten und nicht behandelten Zellen zu bemerken.

Bei einigen *Western Blots*, welche im Rahmen dieser Arbeit angefertigt wurden, war wie hier beim *Caveolin-3-Blot* zum Zeitwert 44 h eine leichte Verschattung des Röntgenfilms aufgetreten, die unspezifisch war und nicht in Zusammenhang mit den untersuchten Proteinlysaten stand sondern vermutlich technisch bedingt war.

3.2.4.4 α -Actinin

α -Actinin ist Bestandteil der dünnen Filamente von Muskelfasern. Es bewirkt die Verankerung der Actin-Filamente im Bereich der Z-Scheiben. Es ist das Baugerüst des Zytoskeletts und reguliert u.a. die Aktivitäten von verschiedenen Rezeptoren und Transmembranproteinen (Sjöblom *et al.*, 2008). Um zu untersuchen, ob dieses Strukturprotein und somit die Struktur der Z-Linie der Muskelfasern durch eine Repression von *skNAC* beeinflusst wird oder nicht, untersuchten Li *et al.* 2002 daraufhin *skNAC-knockdown*-Zebrafischembryos immunhistochemisch mittels anti α -Actinin-Antikörpers. Das α -Actinin befand sich in den Sarkomeren. Der Aufbau der Z-Linie wurde als ungestört angesehen. Jedoch erschienen die Fasern bei den *skNAC-knockdown*-Tieren als etwas überdreht im Vergleich zu den Fasern der Kontrolltiere.

Um im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen, ob eine Repression des *skNAC*-Gens Auswirkungen auf den Gehalt an α -Actinin in den von uns untersuchten murinen Myozyten hat, wurde das Proteinlysate mittels *Western Blot*-Analyse unter Zuhilfenahme eines spezifischen monoklonalen Anti- α -Actinin-Antikörpers untersucht.

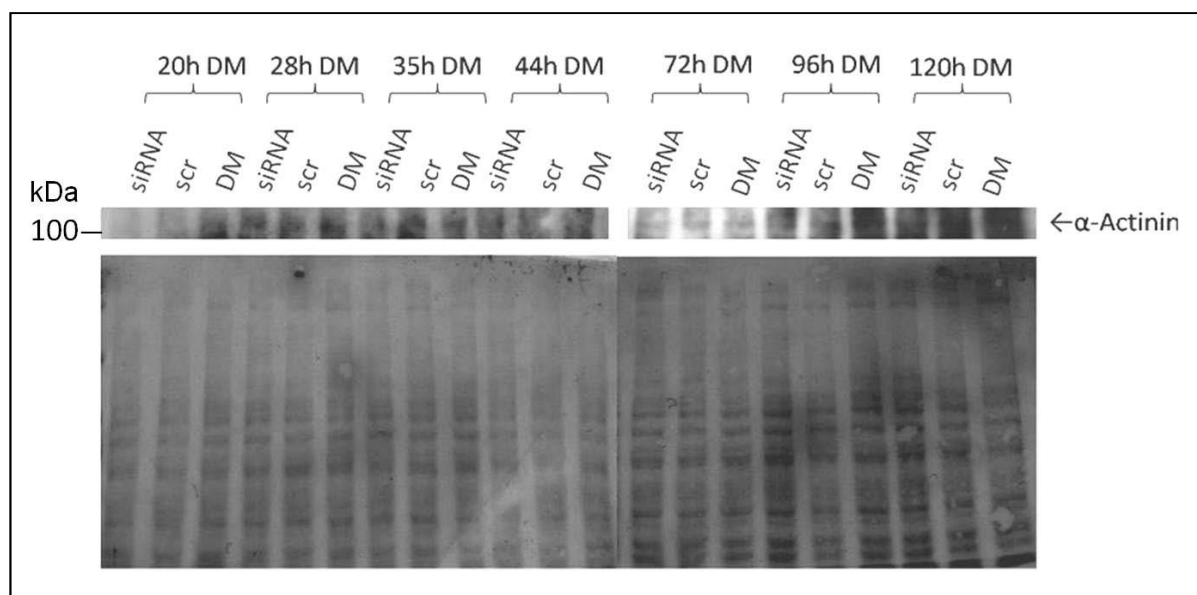


Abbildung 31: Western Blot-Analyse der Expression von α -Actinin während der Differenzierung von C2C12-Zellen nach siRNA-Behandlung. Es wurde ein 7,5 %iges Gradientengel verwendet und je Spur wurden 5 μ g Protein aufgetragen. Die Detektion des 107 kDa großen α -Actinin-Proteins erfolgte mithilfe eines spezifischen Antikörpers. Zur Größenorientierung diente ein Proteinmarker in der ersten Spur. Als Kontrolle der gleichmäßigen Spurbeladung sowie der Transfereffizienz und der Intaktheit der Proteine diente die unten abgebildete PonceauS-Färbung.

Hierbei war zu erkennen, dass das α -Actinin-Protein erst nach ca. 72 h in den transfizierten C2C12-Zellen gebildet wurde bzw. detektierbar war (Abb.31). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Allen *et al* (1979). Damals wurde der Höhepunkt der Proteinakkumulation der myofibrillären Proteine Actin, Myosin, Tropomyosin und α -Actinin 60-72 h nach Kultivierungsbeginn und kurz nach Fusion der Myofibrillen zu Myotuben beobachtet. In dieser Arbeit waren jedoch auch bei diesem Differenzierungsmarker keine Unterschiede zwischen siRNA-transfizierten Zellen und Kontrollmyoblasten bezüglich des Gehalts an α -Actinin erkennbar.

3.2.4.5 Entactin-1

Das Basalmembranprotein Entactin-1 wird u.a. in der Skelettmuskulatur gebildet. Die Expression des *Entacin-1*-Gens findet während der Proliferation der Zellen statt und sinkt nach Differenzierungsinduktion ab (Neu *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Expressionsmuster dieses Differenzierungsmarkers auf eine mögliche Beeinflussung durch die verminderte *skNAC*-Expression hin untersucht werden.

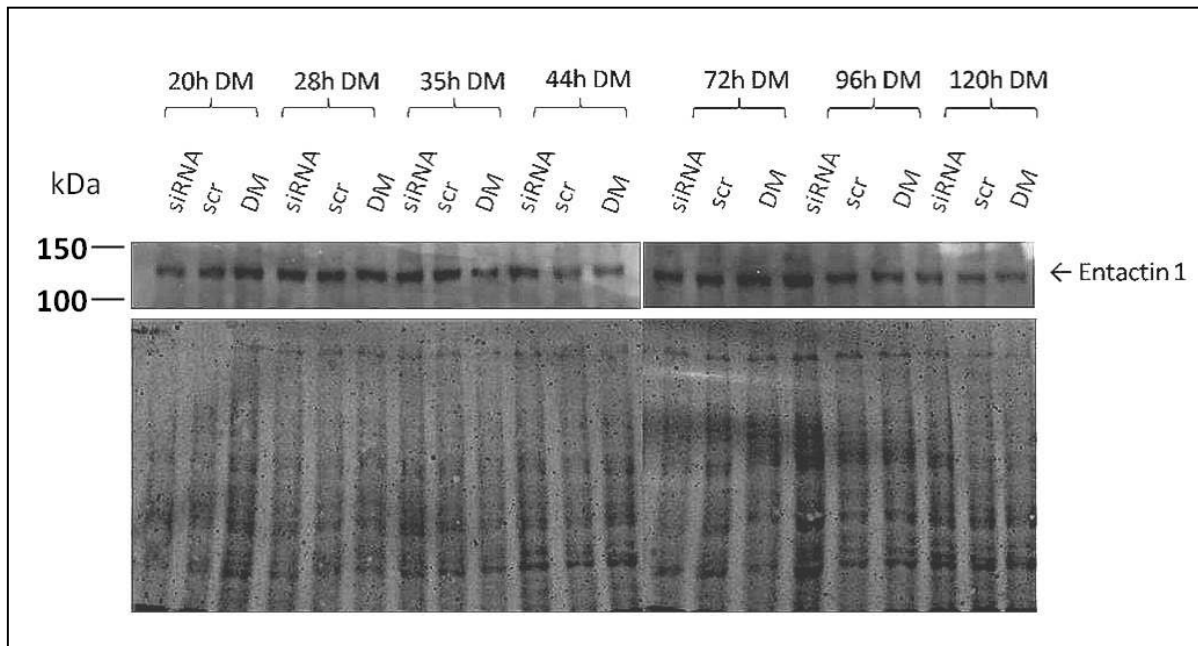


Abbildung 32: Western Blot-Analyse der Expression von *Entactin-1* während der Differenzierung von C2C12-Zellen nach siRNA-Behandlung. Es wurde ein 10 %iges Gradientengel verwendet und je Spur wurden 5 μ g Protein aufgetragen. Die Detektion des 137 kDa großen Proteins erfolgte mithilfe eines spezifischen Antikörpers. Zur Größenorientierung diente ein Proteinmarker in der ersten Spur. Als Kontrolle der gleichmäßigen Spurbeladung sowie der Transfereffizienz und der Intaktheit der Proteine diente die unten abgebildete Ponceaus-Färbung.

Die Zellen zeigten wie erwartet bereits zum ersten Zeitpunkt der Probenahme (20 h in Differenzierungsmedium) eine deutliche *Entactin-1*-Expression. Die sich normalerweise anschließende Verminderung der *Entactin-1*-Expression war nach ca. 44 h in Differenzierungsmedium nur leicht erkennbar. Bei der siRNA- Probe nach 96 h in Differenzierungsmedium wurde durch ein Mess- und/oder Pipettierfehler eine erhöhte Menge an Protein aufgetragen, wodurch man auf den ersten Blick eine erhöhte Expression von *Entactin-1* hätte vermuten können. Es konnten jedoch zu keinem Zeitwert Unterschiede zwischen den transfizierten und nicht-transfizierten Zellen erkannt werden. Somit ließ sich kein Einfluss der Transfektion, also der Repression der *skNAC*-Expression der C2C12-Zellen, auf die *Entactin-1*-Expression erkennen.

3.2.4.6 Untersuchung des *housekeeping*-Proteins α -Tubulin

α -Tubulin gehört zusammen mit β - und γ -Tubulin zu der *Tubulin*-Genfamilie. Tubuline sind struktureller und funktioneller Bestandteil der eukaryontischen Mikrotubuli und des Zytoskeletts und genetisch hochkonserviert (Keeling und Doolittle, 1995). Je ein kugelförmiges α - und β -Tubulinmolekül formen zusammen als Heterodimer ein Protofilament, wobei wiederum 13 Protofilamente einen Mikrotubulus bilden. Mikrotubuli stellen röhrenförmige Gebilde dar, welche in Geißeln, Cilien und auch im Spindelapparat der Zellen vorkommen. Ein Mikrotubulus befindet sich in ständigem Auf- und Abbau durch Polymerisation und Depolymerisation und ist somit flexibel, wodurch eine asymmetrische Zellform, beispielweise während der Zellteilung, entstehen kann. Aufgrund ihrer universellen zellbiologischen Funktion werden die *Tubulin*-Gene von einer Vielzahl von Zelltypen robust und stabil exprimiert („*housekeeping*-Gene“). Sie eignen sich daher als Ladekontrolle, um die Expression anderer Gene, z.B. verschiedener myogener Differenzierungsmarker, zu normalisieren.

Daher wurde bei den in dieser Arbeit verwendeten *Western Blots* auch die Expression des α -*Tubulin*-Gens auf Proteinebene analysiert. Hierbei ergab sich, dass das entsprechende Signal in allen Spuren gleichmäßig erschien, was - zusätzlich zu den Ponceau S-Färbungen - andeutet, dass die Beladung in allen Spuren gleichmäßig war (Abb.33). Die α -Tubulin-Färbung könnte in späteren Analysen dazu verwendet werden, die entsprechenden Ergebnisse zu quantifizieren und graphisch-statistisch auszuwerten. Hierfür müssten diese aber noch mit unabhängigen Versuchen verifiziert werden.

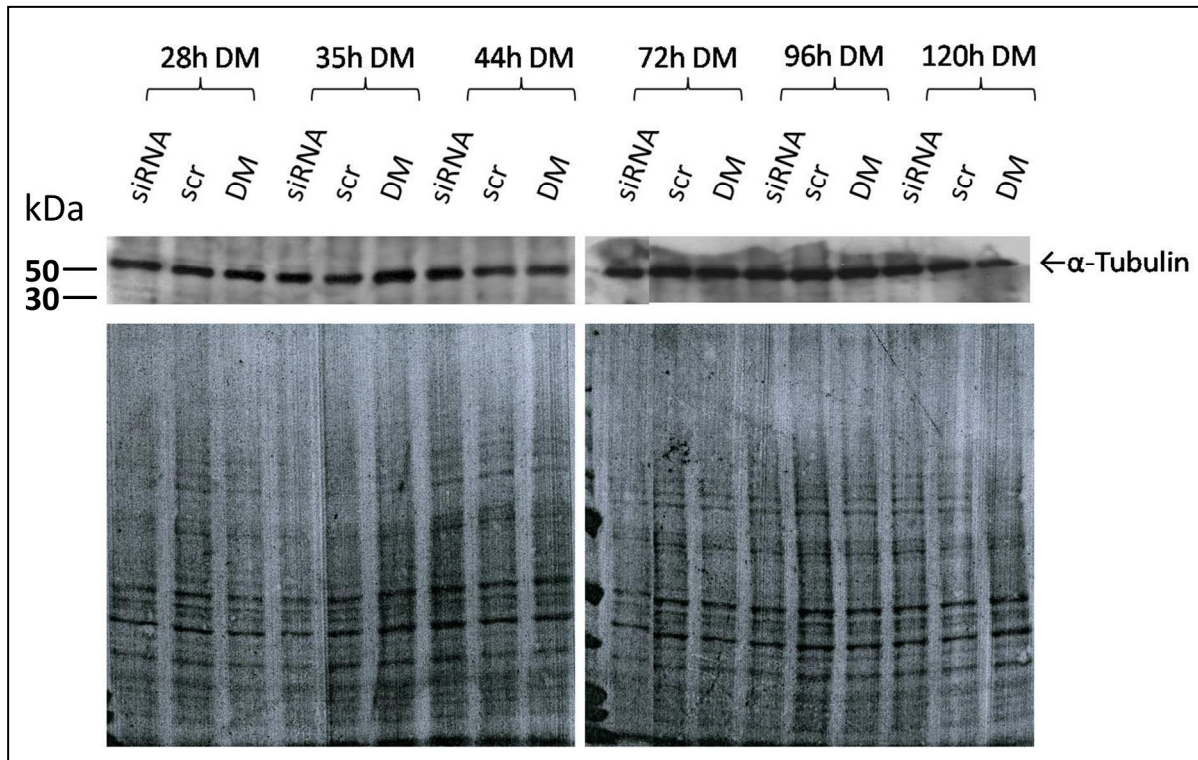


Abbildung 33: Western Blot-Analyse der Expression von α -Tubulin während der Differenzierung von C2C12-Zellen nach siRNA-Behandlung. Es wurde ein 4-12 %iges Gradientengel verwendet und je Spur wurden 5 μ g Protein aufgetragen. Die Detektion des 52 kDa großen Proteins erfolgte mithilfe eines spezifischen Antikörpers. Zur Größenorientierung diente je ein Proteinmarker in der ersten Spur. Als Kontrolle der gleichmäßigen Spurbeladung sowie der Transfereffizienz und der Intaktheit der Proteine diente die unten abgebildete Ponceaus-Färbung.

Es war erkennbar, dass die Expression des α -Tubulins in den transfizierten Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten ähnlich erschien. Auch zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen konnten keine Unterschiede bemerkt werden.

3.2.5 Immunzytochemische Untersuchungen der *MyHC*-Expression von mit *skNAC*-spezifischer siRNA transfizierten C2C12-Zellen

3.2.5.1 Immunzytochemie

Um den Einfluss der Transfektion der C2C12-Zellen mit *skNAC*-spezifischer siRNA auf das intrazelluläre Myosin-heavy-chain-Verteilungsmuster der Zellen zu untersuchen, wurden transfizierte Zellen und nicht transfizierte Kontrollen nach 96 h Differenzierung mithilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das MyHC-Protein behandelt. Um eine unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbare Markierung zu erzielen, wurde ein fluoreszierender sekundärer Antikörper eingesetzt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Mittels verschiedener Lichtfilter konnten dann die entsprechenden Strukturen in fünf repräsentativen Gesichtsfeldern unter dem Mikroskop untersucht und geeignete Bildausschnitte fotografiert werden (Abb.34).

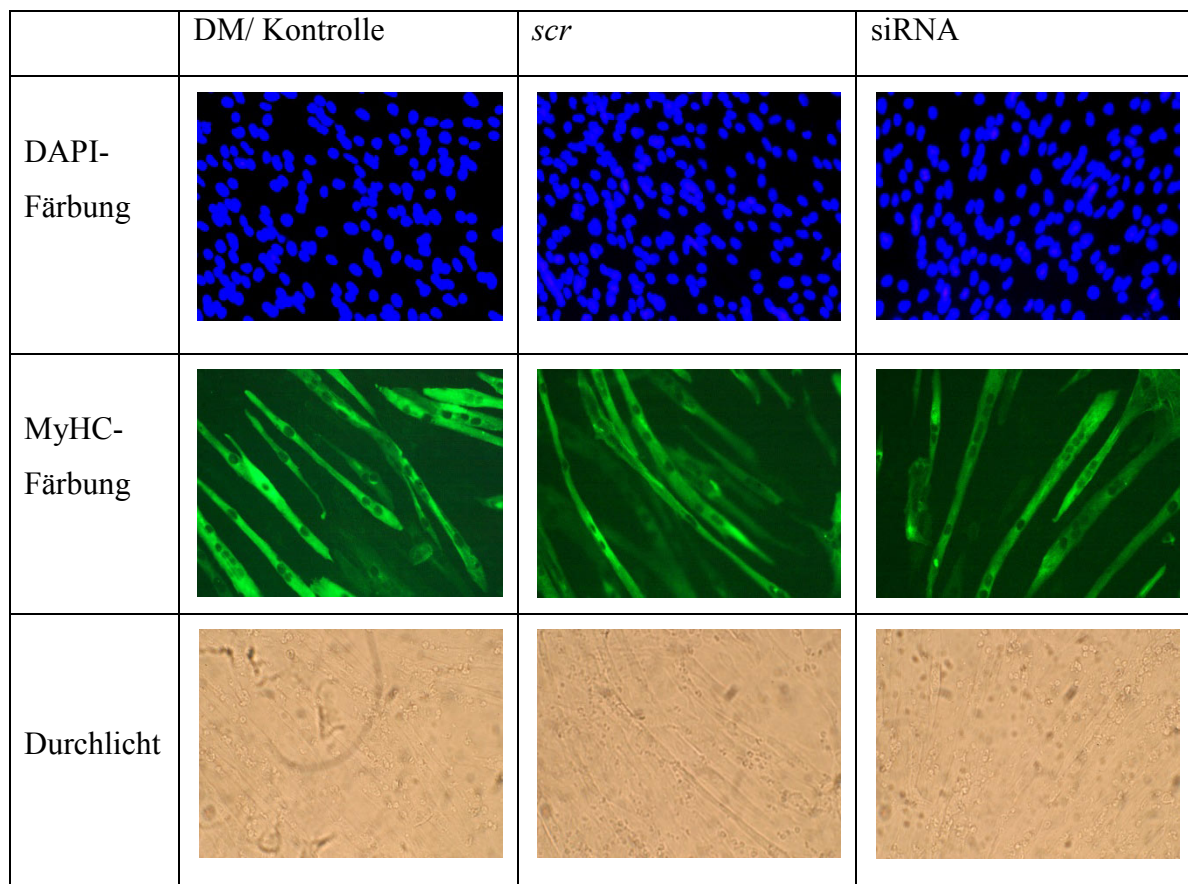


Abbildung 34: Immunfluoreszenzfärbung mit einem MyHC-spezifischen primären AK. Immunzytochemisch angefärbt wurden C2C12-Zellen, welche mit *skNAC*-spezifischer siRNA oder mit *scr*-siRNA behandelt wurden sowie nicht transfizierte

Kontrollen (mittlere Zeile). Zusätzlich sind eine DAPI-Kernfärbung (obere Zeile) sowie Durchlicht-Aufnahmen der entsprechenden Ausschnitte gezeigt (untere Zeile).

Es zeigte sich, dass das MyHC-Signal bei den mit siRNA behandelten Zellen sehr viel schwächer bzw. diffuser erschien als bei den Kontrollen und den mit *scr*-siRNA behandelten Zellen.

3.2.5.2 Bestimmung des Differenzierungsindex

Mithilfe der DAPI-Färbung konnten im ultravioletten Licht die Zellkerne einzelner Gesichtsfelder quantitativ beurteilt und auf dem Computer markiert werden. Zusätzlich konnte durch einen anderen Lichtfilter die grüne Fluoreszenz des MyHC-Proteins sichtbar gemacht werden. Nun konnte ermittelt werden, wie viele der vorher markierten Kerne sich tatsächlich in MyHC-positiv erscheinenden Zellen befanden. Hieraus wurde dann der sogenannte Differenzierungsindex bestimmt (Anzahl der in MyHC-positiven Zellen befindlichen Zellkerne / Anzahl der gezählten Zellkerne, Abb.35).

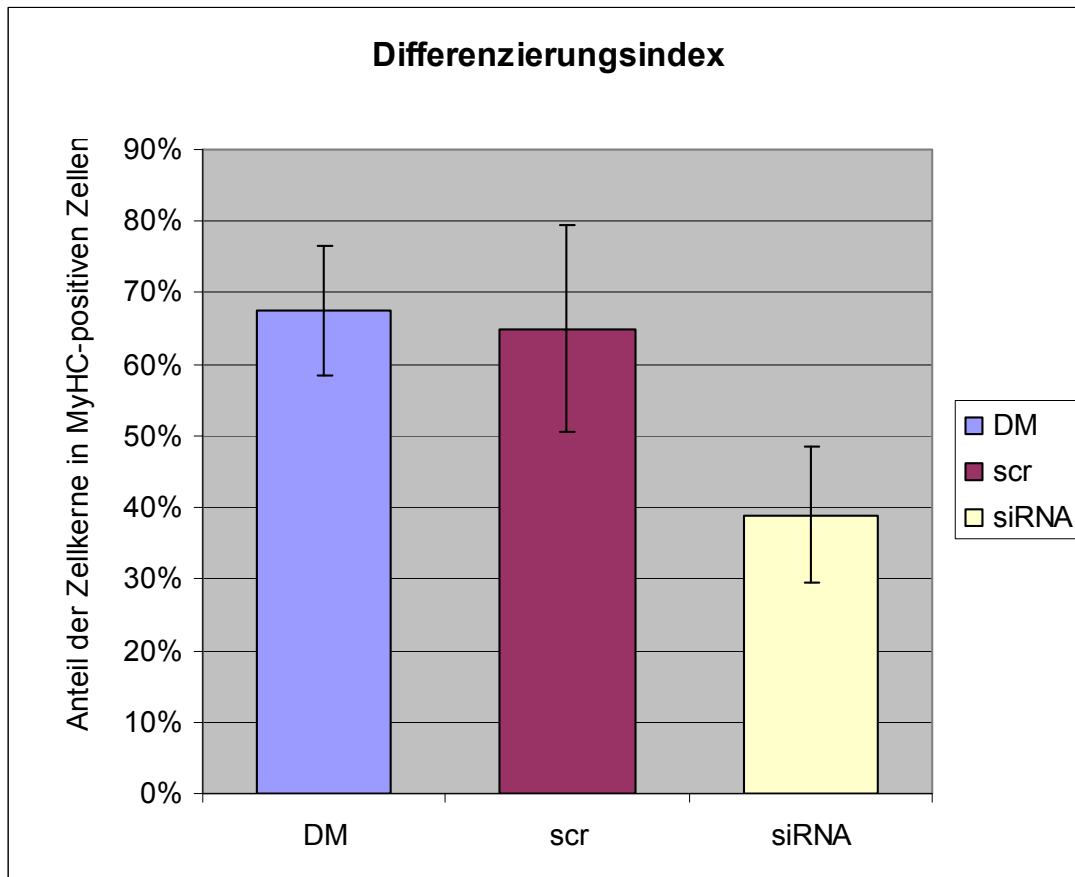


Abbildung 35: Diagramm zum Differenzierungsindex von transfizierten C2C12-Zellen (*scr*, siRNA) sowie nicht transfizierte Kontrollen (DM) nach 96 h in Differenzierungsmedium. Es wurden für alle drei Versuchstypen von C2C12-Zellen (DM, *scr*, siRNA) die Anzahl der MyHC-positiven Zellkerne in den Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl der Kerne im gleichen Gesichtsfeld ausgezählt.

Hierbei ließ sich ein deutlicher Unterschied zwischen den mit siRNA behandelten und den unbehandelten Zellen erkennen. Der Differenzierungsindex war bei den transfizierten Zellen nach 96 h in Differenzierungsmedium mit 39 % deutlich niedriger als bei den unbehandelten Kontrollen (67,42 %). Die mit *scr*-siRNA transfizierten Zellen wiesen mit 65 % einen nur geringfügig niedrigeren Differenzierungsindex auf als die Kontrollen.

3.2.5.3 Bestimmung des Fusionsindex

Weiterhin stellt der Grad der Fusion ein Kriterium für den Grad der myogenen Differenzierung dar. Um zu untersuchen, ob eine Hemmung der *skNAC*-Expression eine veränderte Fusion der Zellen bedingen könnte, wurde zusätzlich der Fusionsindex bestimmt.

Hierfür identifiziert man all diejenigen Kerne, welche anteilig an der gesamten Kernanzahl in mehrkernigen Myotuben vorhanden sind (Anzahl der Kerne in Zellen mit zwei oder mehr Kernen/ Anzahl der gezählten Kerne, Abb.36).

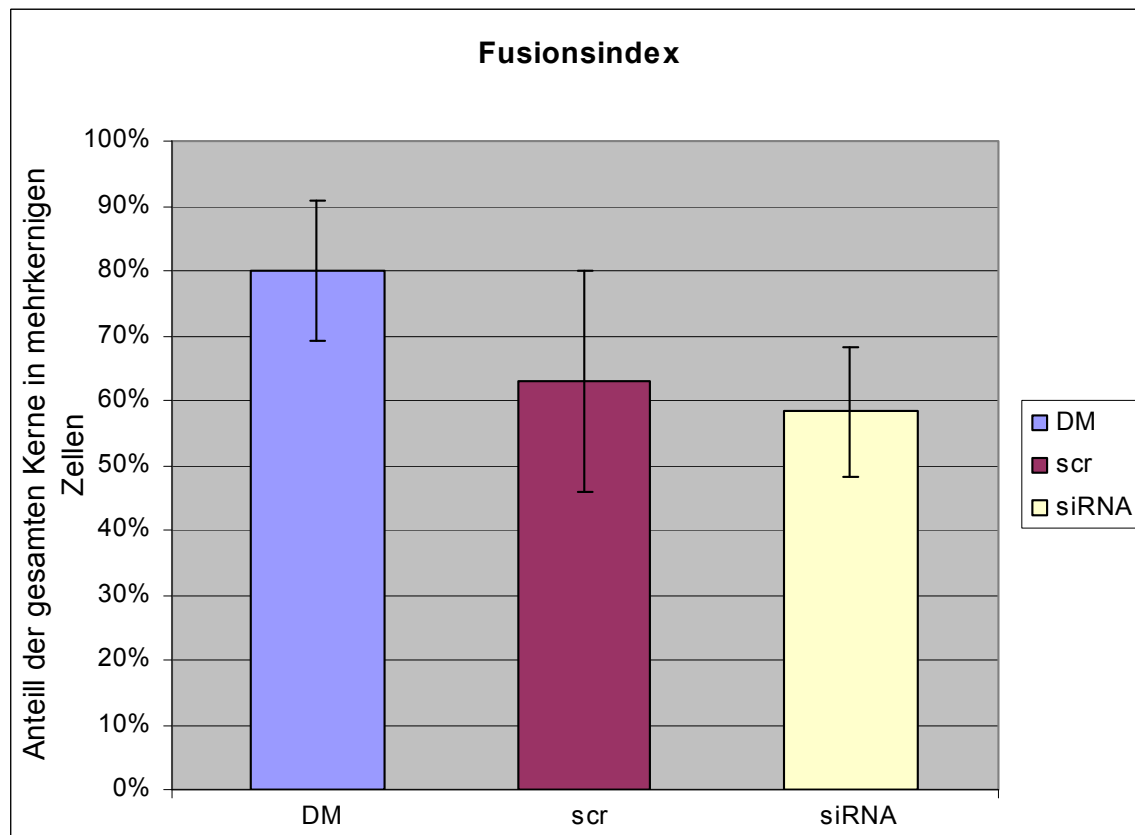


Abbildung 36: Diagramm zum Fusionsverhalten von transfizierten C2C12-Zellen sowie nicht transfizierten Kontrollen (DM). Es wurden für alle drei Versuchstypen von C2C12-Zellen (DM, scr, siRNA) die Anzahl der Zellkerne in mehrkernigen Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl der Kerne im gleichen Gesichtsfeld ausgezählt.

Bezüglich der Fusion von Myoblasten zu Myotuben ließ sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen den transfizierten Zellen (58,29 %) und den unbehandelten Kontrollen (DM) feststellen, wo ein Fusionsindex von 80 % auftrat. Die mit *scr*-siRNA behandelten Zellen wiesen jedoch auch nur einen Fusionsindex von 63 % auf. Folglich ließ sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen den mit *scr*- und den mit *skNAC*-siRNA transfizierten Zellen beobachten. Der Unterschied zu den unbehandelten Kontrollen stellt hierbei wahrscheinlich keinen spezifischen Effekt dar. Vielmehr ist zu vermuten, dass sich die Ursache für den Unterschied auf die Transfektion an sich zurückführen lässt. Somit hat die Transfektion der C2C12-Zellen mit *skNAC*-spezifischer siRNA wahrscheinlich keinen spezifischen Einfluss auf den Fusionsindex.

3.3 Untersuchung der Expression von *skNAC* in H9c2-Zellen

Zur Untersuchung der *skNAC*-Expression in Herzmuskelzellen stand vor Beginn dieser Arbeit in unserem Labor kein geeignetes Zellmodell zur Verfügung. Vorherige Untersuchungen an murinen HL-1-Kardiomyozyten hatten ergeben, dass diese kein *skNAC* exprimieren (F. Berger und B. Munz, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die permanente H9c2-Zelllinie stammt aus einem 13 Tage alten embryonalen BDIX-Rattenherz und wurde von Kimes und Brandt durch Serienpassage als Herzmuskelzellsystem etabliert. Es handelt sich dabei also um einen Subklon der Originalzellen. Trotz ihres kardialen Ursprungs weisen die Zellen zusätzlich einige skelettmuskeltypische Merkmale auf wie die Fusion der mononukleären Myoblasten zu multinukleären Myotuben nach 7-8 d in Proliferationsmedium, Expression des eines nicotinergischen Acetylcholinrezeptors sowie die Bildung eines muskelspezifischen Creatinin-Phosphokinase-Isoenzym (Kimes und Brandt 1976).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten H9c2-Zellen stammten aus dem Labor von Herrn Prof. Morano, Charité Berlin. Sie wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben auf 6- ml-Petrischalen kultiviert. Zur Untersuchung der Zellen auf RNA-Ebene wurden diese nach Erreichen der gewünschten Konfluenz gewaschen und das Proliferationsmedium gegen das Differenzierungsmedium ausgetauscht (siehe 2.2.1.3). Zeitgleich wurde die erste Probe zum Zeitpunkt 0h genommen. Die weiteren RNA-Proben wurden 24 h, 48 h sowie 96 h nach Differenzierungsbeginn genommen. Nach RNA-Reinigung und -Aufbereitung wurden zunächst 1 µg RNA für das *Northern Blot*-Verfahren verwendet. Der *Blot* wurde mit einer *skNAC*-spezifischen und mit einer *Myogenin*-spezifischen Sonde gleichzeitig hybridisiert.

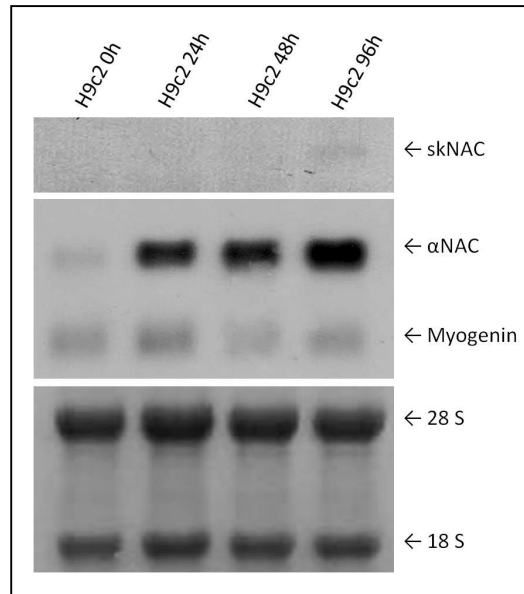


Abbildung 37: Northern Blot-Analyse der Expression von $\alpha/skNAC$ und *Myogenin* während der Differenzierung von H9c2-Zellen. Es wurde 1 μg RNA pro Spur aufgetragen und mit einer $\alpha/skNAC$ -sowie einer *Myogenin-antisense*-Sonde gleichzeitig hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Spurbeladung diente die unten abgebildete Methylenblau-Färbung.

Da hierbei nur ein sehr schwaches skNAC-Signal zu erkennen war, wurde erneut eine *Northern Blot*-Analyse mit den gleichen H9c2-Zellproben durchgeführt. Dieses Mal wurden jedoch 3 μg RNA auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde als Kontrolle für die ordnungsgemäße Detektionsfähigkeit beider Sonden in der ersten Spur 3 μg einer 96 h-Gesamtzellprobe aus einer C2C12-Zellkinetik aufgetragen. Der entsprechende *Blot* wurde ebenfalls mit der *skNAC*- und der *Myogenin*-Sonde gleichzeitig hybridisiert.

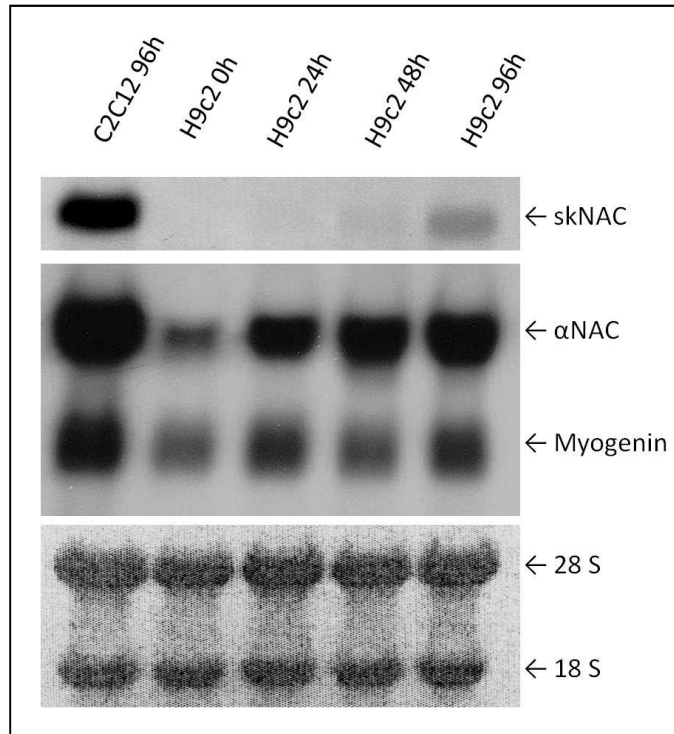


Abbildung 38: *Northern Blot*-Analyse der Expression von *skNAC* und *Myogenin* während der Differenzierung von H9c2-Zellen. Es wurden 3 μg RNA pro Spur aufgetragen und mit einer α /*skNAC*- sowie einer *Myogenin-antisense*-Sonde gleichzeitig hybridisiert. Weiterhin wurden als Sondenkontrolle 3 μg RNA aus einer C2C12-Zellkinetik (96 h nach Differenzierungsinduktion) aufgetragen. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Spurbeladung diente die unten abgebildete Methylenblau-Färbung.

Anhand der deutlichen Signale beider Sonden beim 96 h-Wert der C2C12-Kontrolle war von einer Funktionstüchtigkeit beider Sonden auszugehen.

Eine *skNAC*-Expression war bei den H9c2-Zellen 48 h nach Differenzierungsinduktion leicht, nach 96 h jedoch deutlich sichtbar. *Myogenin* war bereits vor Differenzierungsinduktion detektierbar. Vermutlich zeigten einige Zellen in Arealen mit einer höheren Zelldichte bereits im Proliferationsmedium Ansätze einer Differenzierung. α *NAC* stieg im Verlauf der Differenzierung der H9c2-Zellen leicht an, war jedoch ebenfalls bereits vor Differenzierungsbeginn vorhanden.

Somit konnte eine *skNAC*-Expression in differenzierenden H9c2-Zellen nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 Coxsackievirus-B3-Infektion und Verteilungsmuster von skNAC in der Herzmuskulatur

Es ist bekannt, dass *skNAC* ausschließlich in der Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert wird. Das räumliche Expressionsmuster dieses Gens wurde jedoch bisher insbesondere in der Herzmuskulatur kaum untersucht. Es gibt jedoch einige Hinweise darauf, dass das skNAC-Protein im Herzen ähnlich wie im Skelettmuskel eine wichtige Rolle spielt: Bereits 2002 konnten Sims *et al.* zeigen, dass skNAC an den für die Herzmuskelentwicklung wichtigen Transkriptionsfaktor m-Bop bindet. Li *et al.* wiesen dann 2009 im *skNAC-knockdown*-Zebrafischmodell verschiedene Herzfehlbildungen nach, wodurch auf eine Funktion dieses Proteins bei der Kardiogenese geschlossen werden kann. Schließlich konnte dann 2010 gezeigt werden, dass auch *skNAC-knockout*-Mäuse einen unphysiologischen Herzphänotyp aufweisen (Park *et al.*, 2010).

Aus vorherigen Untersuchungen unseres Labors war bereits vor Beginn dieser Arbeit bekannt gewesen, dass die *skNAC*-Expression im intakten Herzmuskel bei verschiedenen Mäusestämmen unterschiedlich stark ausgeprägt ist: Während beispielsweise *C57BL/6* (BL6)-Mäuse eine starke Expression dieses Gens aufwiesen, war diese bei *A.BY/SnJ* (ABY)-Mäusen nur schwach vorhanden. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass *A.BY/SnJ*-Mäuse suszeptibel für eine durch CVB-3-induzierte inflammatorische Kardiomyopathie sind, während dies bei *C57BL/6*-Mäusen nicht der Fall ist. Nach Infektion war dann bei beiden Stämmen nur noch wenig *skNAC*-mRNA nachweisbar (unveröffentlichte Ergebnisse, Munz und Berger).

Somit ergab sich die Hypothese, dass eine Expression von *skNAC* im Herzmuskel mit einem protektiven Effekt in Bezug auf eine CVB-3-induzierte inflammatorische Kardiomyopathie assoziiert sein könnte.

Um diese Frage zu analysieren sollte zunächst die räumliche Lokalisation des skNAC-Proteins im Herzmuskel untersucht werden. Daher wurden histologische Schnitte des Herzmuskels der beiden Mäusestämme *A.BY/SnJ* und *C57BL/6* sowohl im uninfizierten Zustand als auch zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (4 Tage, 8 Tage, 12 Tage) immunhistochemisch mithilfe verschiedener skNAC-spezifischer polyklonaler Antikörper sowie Antikörperkonzentrationen untersucht.

4.1.1 Es lassen sich immunhistochemisch keine deutlichen Unterschiede zwischen den Mäusestämmen ausmachen

Zunächst wurde das Protokoll zur Antikörperfärbung an Gewebeschnitten aus intaktem murinen Herzmuskelgewebe etabliert. Insbesondere sollte überprüft werden, ob die zur Verfügung stehenden polyklonalen Antiseren zum *skNAC*-Nachweis auf Paraffinschnitten geeignet sind. Zudem wurden verschiedene Antikörperverdünnungen getestet und die Spezifität der Färbung mithilfe serieller Kompetition durch das spezifische Peptid, welches zur Herstellung der verschiedenen polyklonalen Antiseren verwendet worden war, überprüft. Insgesamt ergab sich dabei, dass sich die entparaffinierten Mäuseherzen zur immunhistochemischen Analyse als geeignet erwiesen. Das Präimmenserum alleine rief eine deutlich weniger starke Färbung hervor als das *skNAC*-Antiserum. Somit konnte darauf geschlossen werden, dass die Färbung, welche durch das *skNAC*-Antiserum bedingt wurde, spezifisch war. Weiterhin wurde bei den Färbungen, bei denen das Antiserum zusammen mit dem *skNAC*-spezifischen Peptid angewendet wurde, eine partielle Kompetition durch das Peptid beobachtet – ein weiterer Hinweis auf die Spezifität der entsprechenden Färbemuster.

Im Anschluss daran wurde getestet, ob und wenn ja wie sich das räumliche *skNAC*-Expressionsmuster nach CVB-3-Infektion ändert und ob es Unterschiede zwischen suszeptiblen und nicht suszeptiblen Mäusestämmen gibt.

Hierbei ergab sich, dass sich keine deutlich erkennbaren Unterschiede bemerken lassen konnten. Das *skNAC*-Expressionsmuster stellte sich bei beiden Stämmen als diffus über das gesamte Myokard verteilt dar, was auf eine Lokalisation in den Kardiomyozyten hindeutet. Um dies sicher nachweisen zu können, sollen in Zukunft Ko-Färbungen mit geeigneten Antikörpern (z.B. mit Spezifität für Kardiomyozyten oder für Endothelzellen) erfolgen.

Zwischen den beiden Mäusestämmen *C57BL/6* (nicht suszeptibel) und *A.BY/SnJ* (suszeptibel) waren immunhistochemisch nur geringfügige Unterschiede bezüglich des Expressionsmusters von *skNAC* zu beobachten. Insgesamt erschien die Färbung beim Stamm *C57BL/6* etwas diffuser als beim Stamm *A.BY/SnJ*. Dieses Ergebnis passt zu den oben beschriebenen RNA-Expressionsdaten, allerdings sind immunhistochemische Ergebnisse nur sehr bedingt als quantitativ einzustufen.

Auch nach Infektion waren nur geringfügige Unterschiede zwischen den beiden Stämmen zu sehen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die untersuchten Zeitpunkte zu früh gewählt wurden, um eine Repression der *skNAC*-Expression auf Proteinebene nachweisen zu können.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass bezüglich des räumlichen Verteilungsmusters des *skNAC*-Proteins keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Stämmen oder im Infektionsverlauf zu beobachten waren.

4.2 Welche Auswirkungen hat eine *skNAC*-Repression in C2C12-Zellen auf deren Proliferations- und Differenzierungsverhalten?

4.2.1 Die *skNAC*-Expression in C2C12-Zellen lässt sich durch siRNA-Transfektion hemmen

Um die Funktion des herz- und skelettmuskelspezifischen Proteins *skNAC* weiter zu charakterisieren, sollte in dieser Arbeit ein Zellkultur-Modellsystem etabliert werden, bei dem die Expression des entsprechenden Gens mittels spezifischer siRNAs gehemmt wird. Dies gelang: Mittels genau definierter Zellzahlen und einem optimierten Transfektionsprotokoll konnte die *skNAC*-Expressionsrate in der murinen Myoblastenzelllinie C2C12 um über 90 % gesenkt werden. Die Hemmung war sehr stabil und hielt nach Induktion der Differenzierung zumindest auf RNA-Ebene über mehrere Tage an, die *skNAC*-Expression auf Proteinebene wird momentan im Labor analysiert.

Die zu einigen Zeitpunkten als erhöht erscheinende *skNAC*-Expression bei den mit der unspezifischen „*scrambled*“ siRNA transfizierten Kontrollzellen im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollen könnte sich damit erklären lassen, dass das Transfektionsprozedere generell Stress für Zellen bedeutet und somit deren Proliferation und / oder Differenzierung temporär hemmt und / oder apoptotische oder nekrotische Prozesse induziert. Daher weisen zu einem bestimmten Zeitpunkt x nach Transfektion die unbehandelten und die transfizierten Zellen möglicherweise nicht genau die gleiche Zelldichte auf: die unbehandelten Zellen konnten über den gesamten Zeitraum hinweg ungehindert und damit stärker proliferieren. Folglich liegen zum Zeitpunkt der Differenzierungsinduktion die transfizierten Zellen bezüglich ihrer Dichte gegenüber den unbehandelten Kontrollen eventuell etwas „zurück“, d.h. letztere differenzieren schneller und früher. Wenn man sich vor diesem Hintergrund die normale Kinetik der *skNAC*-Induktion in Erinnerung ruft, welche von einem scharfen „*Peak*“ etwa 24 h nach Induktion der Differenzierung und einem darauffolgenden raschen Abfallen charakterisiert ist (Yotov und St-Arnaud 1996, Munz *et al.* 1999), erscheint es einleuchtend, dass zu den untersuchten Zeitpunkten ab etwa 20 h

nach Differenzierungsinduktion die Expression in den mit der *scr*-siRNA transfizierten Zellen höher ist als in den unbehandelten Kontrollen, da letztere zu diesem Zeitpunkt den Höhepunkt der *skNAC*-Expression vermutlich bereits durchlaufen haben

4.2.2 Eine Hemmung der *skNAC*-Expression führt nicht zu einer veränderten Morphologie der C2C12-Zellen

Bei der histologischen Betrachtung der transfizierten und der nicht-transfizierten Zellen im Durchlichtmikroskop konnten morphologisch keine wesentlichen Unterschiede ausgemacht werden. Dabei wurde berücksichtigt, dass das Transfektionsmedium kurze Zeit nach der Transfektion zu einer leichten Zellschädigung führt, was zu einer anfänglich leicht veränderten Zellform und einer eventuell etwas geringeren Zelldichte (s.o.) führte. Diese normalisierte sich jedoch nach ein bis zwei Tagen.

4.2.3 Eine Hemmung der *skNAC*-Expression führt zu keiner signifikant veränderten Proliferationsrate der C2C12-Zellen

Das *skNAC*-Gen wird in proliferierenden Myoblasten so gut wie gar nicht exprimiert (Yotov und St-Arnaud 1996). Während der Differenzierung von Myoblasten zu Myozyten wird das Gen anfänglich, ungefähr 24 h nach Differenzierungsinduktion, stark exprimiert. Die Expressionsrate fällt danach kontinuierlich ab (Munz *et al.* 1999).

Um zu untersuchen, ob eine Repression der *skNAC*-Genexpression zu einem veränderten Proliferationsverhalten führt, wurden die mit *skNAC*-spezifischer siRNA-transfizierten C2C12-Zellen sowie die entsprechenden Kontrollen (nicht transfizierte und mit *scr* siRNA transfizierte Zellen) mit dem Thymidinanalogon BrdU behandelt und dessen Einbau in neu synthetisierte DNA mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Anschließend konnten Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten der Zellen sowohl in Proliferations- als auch in Differenzierungsmedium gezogen werden.

Es zeigten sich dabei keinerlei spezifische Unterschiede. Auch in Differenzierungsmedium ließen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen. Hier wäre zu erwarten gewesen, dass bei dem Wegfall bzw. der Reduzierung des potentiell differenzierungsinduzierenden Proteins *skNAC* eine erhöhte Proliferation im Vergleich zu den Kontrollen in Differenzierungsmedium auftritt. Es konnte jedoch keine verstärkte Proliferation der siRNA-transfizierten Zellen beobachtet und somit kein Einfluss der siRNA-Transfektion auf das Proliferationsverhalten

der C2C12-Zellen nachgewiesen werden. Die Abwesenheit bzw. verringerte Konzentration von skNAC hat also wahrscheinlich keine Auswirkung auf das Proliferationsverhalten von Myoblasten.

4.2.4 Eine Hemmung der *skNAC*-Expression führt nicht zu einer Verminderung der *MyHC*-Expression

skNAC spielt bei der Herz- und Skelettmuskelzellendifferenzierung eine wesentliche Rolle. Li *et al.* konnten 2009 in einem Zebrafischmodell zeigen, dass der völlige Wegfall der *skNAC*-Expression zu einem verminderten MyHC-Gehalt auf Proteinebene führt. Um zu überprüfen, ob bei transfizierten C2C12-Zellen ein ähnlicher Effekt zu bemerken ist, wurde das Proteinlysate von mit *skNAC*-spezifischer siRNA transfizierten C2C12-Zellen mittels SDS-PAGE und anschließendem *Western Blot*-Verfahren auf den Gehalt des MyHC-Proteins hin untersucht. Hierbei konnte keine Verminderung der MyHC-Proteinmenge bemerkt werden. Eher war bei einigen *Western Blots* ein leichter Anstieg des MyHC-Proteingehaltes zu beobachten. Möglicherweise könnte dies auf die im Zebrafisch-Modell bereits nachgewiesene Funktion des skNAC-Proteins als Regulator der Sarkomerogenese (Li *et al.* 2009) zurückzuführen sein.

Es wäre beispielsweise denkbar, dass es nach mangelhaftem Einbau des MyHC-Proteins in sich neu bildende Sarkomere und möglichem nachfolgendem Abbau dieses Proteins zu einer kompensatorischen Rückkopplung kommt, welche letztendlich eine Neubildung von MyHC induziert. Aufgrund der Daten von Li *et al.*, 2009 sowie der Funktion von α NAC, welches von einer Spleißvariante des skNAC-Transkripts kodiert wird und welches als molekulares Chaperon wirkt, liegt eine ähnliche Funktion für skNAC nahe, welches somit möglicherweise die Faltung myofibrillärer Proteine wie MyHC und deren Einbau in sich neu bildende Sarkomere steuern könnte. Zudem zeigten unsere immunhistochemischen Untersuchungen (siehe 3.2.6.1), dass sich die MyHC-Färbung in den mit skNAC-spezifischer siRNA transfizierten Zellen als diffus und insgesamt schwächer als bei den Kontrollzellen darstellte.

Wie von Li *et al.* 2009 beschrieben, kam es hingegen nach *skNAC-knockdown* in Fischembryonen zu einer Verminderung der MyHC-Proteinmenge. Dieser von unseren Daten abweichende Befund könnte auf speziesspezifischen Unterschieden bezüglich der skNAC-Funktion oder allgemein der Regulation der Sarkomerogenese bzw. der Produktion von Sarkomerproteinen zwischen Fisch- und Säugerzellen beruhen. Eine kompensatorische

Rückkopplung der MyHC-Produktion, wie sie im murinen Modell vermutet wird, ist evtl. im Fischembryo nicht vorhanden. Vielleicht überwiegt hier jedoch auch lediglich das Ausmaß des MyHC-Abbaus gegenüber dem einer etwaigen kompensatorischen Stabilisierung.

Auf der anderen Seite hat skNAC vermutlich keinen Einfluss auf die Transkriptionsrate des *MyHC*-Gens, da bei unseren Untersuchungen der Gehalt an MyHC-RNA in den transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen weder vermindert noch erhöht war (vergleiche *Northern-Blot*-Ergebnisse dieser Arbeit). Auch bei den von Li *et al.* 2009 beschriebenen *skNAC-knockdown*-Zebrafisch-Embryos war zwar eine signifikante Verminderung der MyHC-Konzentration auf Protein-Ebene zu beobachten, es konnte jedoch keine Veränderung der *MyHC*-Expression auf RNA-Ebene bemerkt werden. Somit hat nach bisherigen Erkenntnissen skNAC wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Transkription des *MyHC*-Gens. Die in manchen unserer Versuche leicht erhöhte MyHC-Proteinmenge nach *skNAC-knockdown* ist daher höchstwahrscheinlich auf einen posttranskriptionellen Mechanismus, d.h. gesteigerte Translationsraten oder Stabilisierung des MyHC-Proteins, zurückzuführen.

4.2.5 Eine Repression der *skNAC*-Expression hat keinen Einfluss auf die Expression von für verschiedene myogene Differenzierungsmarker kodierende Gene

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob skNAC eine Schlüsselrolle bei der Skelettmuskeldifferenzierung spielt und somit einen Einfluss auf die Expression verschiedener, für die Myogenese typischer Markergene haben könnte. Daher wurden RNA- bzw. -Proteinproben der siRNA-transfizierten Zellen sowie entsprechender Kontrollen sowohl mithilfe des *Northern Blot*- als auch mithilfe des *Western Blot*-Verfahrens auf die Expression verschiedener Marker hin untersucht.

Sämtliche Zellproben stammten aus einem Transfektionsversuch. Um eine repräsentative Aussage tätigen zu können, müssten die Ergebnisse reproduziert werden.

Eine Hemmung der *skNAC*-Expression führt nicht zu einer Beeinflussung der *Myogenin*-Expression. Zunächst wurde die Expressionsrate des *Myogenin*-Gens untersucht. Myogenin gilt als eines der wichtigsten Signalmoleküle, welche eine Rolle bei der Differenzierung von Skelettmuskelzellen spielen. Es wird in C2C12-Zellen relativ früh (ca. 24 h) nach Differenzierungsinduktion exprimiert.

Es konnte auf RNA-Ebene keine Beeinflussung der *Myogenin*-Expressionsrate nach Hemmung der *skNAC*-Expression festgestellt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen

von Li *et al.* 2009, bei denen die *Myogenin*-Expression bei *skNAC-knockdown*-Embryos nicht verändert war. Somit beeinflusst *skNAC* vermutlich nicht die Skelettmuskeldifferenzierung in dem frühen Stadium, in welchem *Myogenin* exprimiert wird (siehe Einleitung).

Eine Hemmung der *skNAC*-Expression führt nicht zu einer Beeinflussung der *p21*-Expression *p21* ist ein indirekter Differenzierungsmarker, da das *p21*-Gen zum Ende der Proliferationsphase hin exprimiert wird. Es führt dazu, dass die Zellen aus dem Zellzyklus ausscheiden und somit die Differenzierung eingeleitet wird.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich mittels *Western Blot*-Analyse, dass es durch eine Hemmung der *skNAC*-Expression zu keiner Beeinflussung der *p21*-Expression auf Proteinebene kommt, was darauf hindeutet, dass *skNAC* nicht an der Hemmung der Zellproliferation beim Eintritt in die myogene Differenzierung beteiligt ist.

Eine Hemmung der *skNAC*-Expression führt nicht zu einer Beeinflussung der *Caveolin-3*-Expression. Als nächster Differenzierungsmarker wurde das muskelspezifische Protein *Caveolin-3* untersucht. *Caveolin-3* stellt ein Signal- sowie Strukturprotein der Zellmembran dar. Die Expression des entsprechenden Gens wird nach Differenzierungsbeginn induziert und steigt stetig an. Es sollte analysiert werden, ob eine Repression des *skNAC*-Gens einen Einfluss auf die *Caveolin-3*-Expression haben könnte. Auch hier zeigte sich keine Beeinflussung der *Caveolin-3*-Expression auf Proteinebene im *Western-Blot*-Verfahren bei der Untersuchung der mit *skNAC*-spezifischer siRNA transfizierten C2C12-Zelllysate im Vergleich zu deren Kontrollen (DM und *scr*).

Eine Hemmung der *skNAC*-Expression führt nicht zu einer Beeinflussung der α -Actinin Expression. α -Actinin bewirkt als Bestandteil der dünnen Filamente von Muskelfasern die Verankerung der Actin-Filamente im Bereich der Z-Scheiben. Es gilt ebenso wie die zuvor beschriebenen und untersuchten Proteine als myogener Differenzierungsmarker.

Die Untersuchungen von Li *et al.* 2009 ergaben, dass die Lokalisation des α -Actinin-Proteins bei den *skNAC-knockdown*-Zebrafischembryos unauffällig war. Auch bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden zumindest bezüglich der Expression des α -Actinin-Gens keine Unterschiede zwischen den transfizierten C2C12-Zellen und den Kontrollen beobachtet; weiterführende Untersuchungen zur Lokalisation wurden nach Abschluss dieser Arbeit im Labor durchgeführt und zeigen ebenfalls keinen Effekt des

skNAC-knockdowns (Berger *et al.* 2012). Somit sprechen diese Daten dafür, dass *skNAC* vermutlich keine Rolle bei der Organisation der Z-Scheiben spielt.

Eine Hemmung der *skNAC*-Expression führt nicht zu einer Beeinflussung der *Entactin-1*-Expression Es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der *Entactin-1*-Expression in der *Western Blot*-Analyse zwischen den transfizierten Zellen und den Kontrollen (DM und *scr*). Die in der in der Literatur (Neu *et al.* 2006) beschriebene Verminderung der *Entactin-1*-Expression im Verlauf der Differenzierung war jedoch in den Analysen im Rahmen dieser Arbeit nicht deutlich erkennbar. Vermutlich waren hier die Zeitpunkte, zu denen die Zellproben entnommen wurden, zu früh, um eine Repression der Expression auf Proteinebene detektieren zu können.

Eine Hemmung der *skNAC*-Expression führt nicht zu einer Beeinflussung der *Desmin* Expression Ebenso wie bei den übrigen untersuchten Differenzierungsmarkern zeigte sich auch bei der Überprüfung der *Desmin*-Expression kein Unterschied zwischen den transfizierten Zellen und den dazugehörigen Kontrollen. Daraus lässt sich schließen, dass eine Hemmung der *skNAC*-Expression wahrscheinlich keinen Einfluss auf die *Desmin*-Expression hat.

4.2.6 *skNAC* könnte bei der Myofibrillogenese und der Sarkomerbildung eine Rolle spielen

Da das *skNAC*-Gen in differenzierenden Muskelzellen (Yotov und St.Arnaud, 1996) und auch nach Verwundung im Skelettmuskel (Munz *et al.*, 1999) induziert wird, wurde für *skNAC* bereits eine Rolle bei der Regulation der Skelettmuskeldifferenzierung sowie bei der Muskelregeneration vermutet. Weitere Untersuchungen zeigten, dass es nach einer *skNAC*-Überexpression in murinen Myoblasten zu der Bildung von besonders langen und breiten Myotuben kommt (Yotov und St.-Arnaud, 1996). Daher lässt sich eine Rolle von *skNAC* bei der Muskelfaserdifferenzierung und/oder -fusion vermuten. Einen weiteren Anhaltspunkt dafür stellen die Ergebnisse von Park *et al.*, 2010, dar, in welchen *skNAC*-defiziente Mäusembryonen ein vermindertes Skelettmuskelwachstum und eine verminderte Regenerationsfähigkeit der Muskulatur aufwiesen. Die Untersuchungen von Li *et al.*, 2009, ließen zudem vermuten, dass *skNAC* möglicherweise eine Rolle bei der Proteinfaltung

spielen könnte, da es bei *skNAC-knockdown*-Zebrafischen zu einem veränderten Anordnungsmuster der Myofibrillen bzw. einer unvollständigen Sarkomerbildung kam. In Anlehnung an dieses Ergebnis war es daher unser Ziel, mit Hilfe der Immunfluoreszenz erste Hinweise auf die Sarkomerorganisation von mit *skNAC*-spezifischer siRNA transfizierten murinen C2C12-Zellen zu erhalten. Die Zellen wurden dabei mit einem MyHC-spezifischen Antikörper angefärbt, da MyHC eines der Hauptbestandteile des Sarkomers ist, zudem war dieses auch in den von Li *et al.*, 2009, beschriebenen Zebrafisch-Experimenten als Marker verwendet worden. Die Morphologie der Myotuben erschien hierbei, wie bereits weiter oben erwähnt, normal, jedoch erschien die MyHC-Färbeintensität bei den transfizierten Zellen insgesamt schwächer und diffuser als bei den Kontrollen. Dies war zunächst erstaunlich, da - wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben - bei *Western Blot*-Studien keine Reduktion der absoluten MyHC-Proteinmenge beobachtet worden war. Hieraus ergab sich die Hypothese, dass die insgesamt schwächer erscheinende Färbeintensität nicht auf Unterschiede bezüglich der Gesamt-MyHC-Proteinmenge, sondern auf ein abweichendes Verteilungsmuster dieses Proteins innerhalb der Muskelzelle zurückzuführen sein könnte. Um diesbezüglich genauere Untersuchungen zu unternehmen, wäre die Beurteilung der Zellen mithilfe eines Konfokalmikroskopes sinnvoll, da hierbei durch eine stärkere Auflösung des Präparates exaktere Beurteilungen zu der räumlichen Verteilung des MyHC-Proteins möglich sind. Auch die Untersuchung weiterer Strukturproteine, wie beispielsweise Titin, wäre interessant, um zu prüfen, ob *skNAC* auch auf andere Strukturproteine der Muskelzelle einen Einfluss haben könnte.

4.3 *skNAC* wird auch in differenzierenden H9c2-Kardiomyozyten induziert

Nach der Etablierung des Skelettmuskelzell-Systems zur funktionellen Analyse des *skNAC*-Proteins *in vitro*, sollte auch für Kardiomyozyten ein entsprechendes Modellsystem etabliert werden.

Hierfür wurde zunächst in unserem Labor die murine Zelllinie HL-1 auf die Expression des *skNAC*-Gens hin untersucht. HL-1-Zellen stellen ein gängiges Zellsystem für Untersuchungen an Kardiomyozyten dar. Jedoch konnten wir nachweisen, dass sie – auch in serumfreiem Medium – kein *skNAC* exprimieren (Munz und Berger, unveröffentlichte Ergebnisse).

Somit wurde in dieser Arbeit die Zelllinie H9c2 aus der Ratte auf eine potentielle *skNAC*-Expression hin untersucht.

Hierfür wurden die Zellen nach einem Standardprotokoll kultiviert und die Differenzierung induziert. Nach 24 h, 48 h, 72 h sowie 96 h wurde zelluläre RNA isoliert und diese im *Northern Blot*-Verfahren untersucht. Es konnte eine *skNAC*-Expression der H9c2-Zellen 48h nach Differenzierungsinduktion nachgewiesen werden. Die Konzentration der *Myogenin*-mRNA wurde als Differenzierungskontrolle parallel dazu detektiert. Hierbei zeigte sich eine Bildung der *Myogenin*-mRNA bereits vor Differenzierungsbeginn. Dies lässt sich dadurch erklären, dass einzelne Zellen bereits zum Zeitpunkt der Differenzierungsinduktion partiell differenziert waren. Dies könnte daraus resultieren, dass H2c9-Zellen bei Erreichen einer bestimmten Konfluenz spontan selber beginnen zu differenzieren. Insgesamt lassen diese Daten darauf schließen, dass sich die H9c2-Zelllinie für weitergehende Untersuchungen bezüglich der Funktion des skNAC-Proteins in Kardiomyozyten eignen könnte.

5 Zusammenfassung

skNAC ist ein herz-sowie skelettmuskelspezifisches Protein, über dessen Funktion noch wenig bekannt ist. Es gibt Hinweise darauf, dass skNAC während der frühen Myogenese als transkriptioneller Kofaktor die Expression verschiedener Gene moduliert. Während späterer Phasen der Muskeldifferenzierung könnte das Protein als eine Art molekulares *Chaperon* zytoplasmatische Prozesse, insbesondere Myofibrillogenese und Sarkomerogenese, regulieren. Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zudem nachweisen, dass es bei der Skelettmuskelregeneration sowie bei entzündlichen Skelettmuskelerkrankungen zu einer dramatischen Induktion der *skNAC*-Expression kommt. Zur *skNAC*-Genexpression im adulten Nager-Herzen lagen jedoch vor Beginn dieser Arbeit keine Daten vor.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher zunächst das räumliche Expressionsmuster von *skNAC* in mit Coxsackievirus-B3 (CVB-3)-infizierten Herzen untersucht werden. Coxsackieviren lösen eine Myokarditis im betroffenen Herzen aus. Hierfür wurden Paraffinschnitte von Herzen zweier, für eine CVB-3-induzierte Kardiomyopathie unterschiedlich susceptible Mäusestämme immunhistochemisch mithilfe eines skNAC-Antiserums untersucht. Jedoch ließen sich mit dem verwendeten Antiserum keine spezifischen Unterschiede bezüglich des Färbemusters zwischen dem Stamm *A.BY/SnJ* (ABY), welcher nicht in der Lage ist, das Virus zu eliminieren, und dem Stamm *C57BL/6* (BL6), welcher das Virus eliminieren kann und i.d.R. keine Kardiomyopathie entwickelt, nachweisen.

Im zweiten, skelettmuskelspezifischen Teil der Arbeit sollte dann anhand eines definierten Zellkulturmodells die Funktion von skNAC während der Skelettmuskeldifferenzierung genauer analysiert werden. Dazu untersuchten wir zunächst die Auswirkungen einer Hemmung der *skNAC*-Expression in C2C12-Skelettmuskelzellen. Hierfür wurde eine Transfektion von C2C12-Zellen mittels einer skNAC-spezifischen siRNA durchgeführt. Anschließend wurden die Zelllysate auf die Expression verschiedener myogener Differenzierungsmarker sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene mittels *Northern Blot*- und *Western Blot*-Analyse hin untersucht. Hierbei ergab sich zusammenfassend, dass eine Hemmung der *skNAC*-Expression keinen Einfluss auf die Expression von *Myogenin*, *Desmin*, *p21*, *Caveolin-3*, *Entactin-1* sowie α -*Actinin* hat. Die Expression von *MyHC* erschien weder auf RNA- noch auf Proteinebene vermindert, bei einigen Experimenten war auch eine leichte Induktion der Expression auf Proteinebene sichtbar. Hierfür verantwortlich könnten posttranskriptionelle Mechanismen sein. Zudem ergab sich, dass die Morphologie der transfizierten Zellen zwar normal erschien, jedoch erschien die MyHC-Färbung im Vergleich

zu den Kontrollen diffus. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Prozesse der Myofibrillogenese / Sarkomerogenese durch eine Hemmung der *skNAC*-Expression gestört wurden.

Da vor Beginn dieser Arbeit noch kein Herzmuskelzellsystem etabliert war, an welchem Untersuchungen zur *skNAC*-Genexpression und zur Funktion des entsprechenden Protein in Kardiomyozyten durchgeführt werden konnten, wurde geprüft, ob sich die Zelllinie H9c2 dafür eignen könnte. Diese wurde mittels *Northern Blot*-Analyse auf eine mögliche Expression von *skNAC* hin untersucht mit dem Ergebnis, dass diese Zelllinie tatsächlich *skNAC* exprimiert. Sie könnte somit für weitergehende Untersuchungen eingesetzt werden.

6 Summary

The role of the heart and skeletal specific transcription factor *skNAC* during the muscle cell differentiation and in inflammatory cardiomyopathies

skNAC is a heart and skeletal muscle-specific protein. To date, little is known about its functions. Evidence exists that *skNAC* might act as a transcriptional coactivator during myogenesis. At later stages of myogenic differentiation, the protein might act as a molecular chaperone and could as such regulate cytoplasmic processes, especially myofibrillogenesis and sarcomerogenesis. In addition, in recent studies, we could show that in skeletal muscle regeneration and also in inflammatory skeletal muscle diseases, there is a strong induction of *skNAC* expression. Finally, at the beginning of this study, little was known on *skNAC* expression in the adult heart.

So, one goal of this study was to examine the spatial pattern of *skNAC* expression in coxsackievirus B3 (CVB-3)-infected hearts. Coxsackieviruses can cause myocarditis in infected hearts. Therefore, paraffin sections of hearts from two mousestrains with different susceptibility for CVB-3 were immunohistochemically analyzed with a *skNAC*-specific antiserum. However, no specific differences with respect to the staining pattern could be found between the two strains *A.BY/SnJ* (ABY), which is not able to eliminate the virus, and *C57BL/6* (BL6), which is able to eliminate the virus without developing a cardiomyopathy.

In the second, skeletal muscle-specific part of this study, the function of *skNAC* in skeletal muscle differentiation was analyzed using an *in vitro* system. For this purpose, we inhibited *skNAC* expression in cultured murine C2C12 myoblasts. Specifically, C2C12 cells were transfected with a *skNAC*-specific siRNA. Subsequently, cell lysates were analyzed for the expression of several myogenic differentiation markers at both the RNA and the protein levels using *Northern* and *Western Blot* analysis. We found that inhibition of *skNAC*-expression has no influence of the expression of *Myogenin*, *Desmin*, *p21*, *Caveolin-3*, *Entactin-1* and α -*Actinin*. In addition, expression of *MyHC* was not reduced, by contrast, it appeared even slightly induced at the protein level in some experiments. Most likely, posttranscriptional mechanisms are responsible for this effect. In addition, we found that the morphology of the transfected cells appeared normal, however, their MyHC staining patterns appeared more diffuse in comparison with the controls. This finding suggests that the processes of

myofibrillogenesis and/or sarcomerogenesis might be perturbed after inhibition of the *skNAC* expression.

Finally, at the beginning of this study, no *in vitro* system for the analysis of skNAC functions in cardiomyocytes was available. Thus, we tested if the rat H9c2 cardiomyocyte cell line might be a suitable model system. Via *Northern Blot* analysis, we found that *skNAC* was indeed expressed in these cells, indicating that the H9c2 line might be a useful model for the analysis of skNAC functions in cardiomyocytes in the future.

7 Anhang

cDNA-Sequenz von murinem *Mus musculus* MyHC I, complete cds, BC150739. Der Leserahmen liegt zwischen nt 37 und 5865.

```
37 ATGAGTTCCGACGCCGAGATGGCCGTTTTTCGGGGAGGCTGCTCCTTACCTCCG
GAAGTCT 96
97 GAAAAGGAGCGAATCGAGGCTCAGAACAAGCCTTTTGACGCCAAGTCATCGG
TGTTTGTG 156
157 GTGGATGCTAAGGAGTCTTTTGTAAGCAACGGTGCAGAGCAGGGAAGGG
GGGAAGGTG 216
217 ACAGCCAAGACCGAAGGTGGAACACTGTAACAGTAAAAGATGATCAGGTCT
ACCCCATG 276
277 AACCTCCCAAGTACGACAAGATCGAGGACATGGCCATGATGACCCACCTGC
ACGAGCCC 336
337 GCTGTGCTGTACAACCTCAAAGAGCGTTATGCAGCCTGGATGATCTATACCTA
CTCGGGC 396
397 CTGTTCTGCGTCACTGTCAACCCCTACAAGTGGCTGCCAGTGTATAACGCAGA
GGTGGTG 456
457 GCAGCCTACAGAGGCCAAAAGCGCCAGGAGGCCCCACCCACATCTTCTCCA
TCTCTGAC 516
517 AATGCCTACCAGTTCATGCTGACAGAT 543
```

8 Literaturverzeichnis

- Allen, R.E., Rankin, L.L., Greene, E.A., Boxhorn, L.K., Johnson, S.E., Taylor, R.G., Pierce, P.R., 1991: Desmin is present in proliferating rat muscle satellite cells but not in bovine muscle satellite cells. *Journal of Cellular Physiology* 149, 525–535.
- Allen, R.E., Stromer, M.H., Goll, D.E., Robson, R.M., 1979: Accumulation of myosin, actin, tropomyosin, and α -actinin in cultured muscle cells. *Developmental Biology* 69, 655–660.
- Al-Shanti, N., Steward, C.G., Garland, R.J., Rowbottom, A.W., 2004: Investigation of alpha nascent polypeptide-associated complex functions in a human CD8(+) T cell ex vivo expansion model using antisense oligonucleotides. *Immunology* 112, 397–403.
- Anderson, R.G.W., 1998: The Caveolae Membrane System. *Annual Review of Biochemistry* 67, 199–225.
- Bassel-Duby, R., Hernandez, M.D., Yang, Q., Rochelle, J.M., Seldin, M.F., Williams, R.S., 1994: Myocyte nuclear factor, a novel winged-helix transcription factor under both developmental and neural regulation in striated myocytes. *Molecular and Cellular Biology* 14, 4596–4605.
- Beatrix, B., Sakai, H., Wiedmann, M., 2000: The α and β Subunit of the Nascent Polypeptide-associated Complex Have Distinct Functions. *Journal of Biological Chemistry* 275, 37838–37845.
- Berger, F., Berkholz, J., Breustedt, T., Ploen, D., Munz, B., 2012: Skeletal muscle-specific variant of nascent polypeptide associated complex alpha (skNAC): implications for a specific role in mammalian myoblast differentiation. *European Journal of Cell Biology* 91, 150–155.
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., Relaix, F., 2003. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *Journal of Anatomy* 202, 59–68.
- Carlson, B., 2004: Development of the body systems: Skeletal muscle In: *Human embryology and developmental biology.* / Mosby (Hrsg.). Philadelphia: Elsevier. - S. 195-204.
- Chow, L.H., Beisel, K.W., McManus, B.M., 1992: Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency. Evidence for direct viral pathogenesis of myocardial injury. *Laboratory Investigation* 66, 24–31.
- Christ, B., Ordahl, C.P., 1995: Early stages of chick somite development. *Anatomy and Embryology* 191, 381–396.
- Cossu, G., Tajbakhsh, S., Buckingham, M., 1996: How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet* 12, 218–223.
- Costa, M.L., Escaleira, R., Cataldo, A., Oliveira, F., Mermelstein, C.S., 2004: Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37, 1819–1830.

- Delgado, I., Huang, X., Jones, S., Zhang, L., Hatcher, R., Gao, B., Zhang, P., 2003: Dynamic gene expression during the onset of myoblast differentiation in vitro. *Genomics* 82, 109–121.
- Easton, A.J., Eglin, R.P., 1988: The Detection of Coxsackievirus RNA in Cardiac Tissue by in situ Hybridization. *Journal of General Virology* 69, 285–291.
- Eisenberg, E., Greene, L.E., 1980: The Relation of Muscle Biochemistry to Muscle Physiology. *Annual Review of Physiology* 42, 293–309.
- Frydman, J., 2001: Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry* 70, 603–647.
- Füchtbauer, E.M., Westphal, H., 1992: MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. *Developmental Dynamics* 193, 34–39.
- Fünfschilling, U., Rospert, S., 1999: Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Molecular Biology of the Cell* 10, 3289–3299.
- Glück, U., Ben-Ze'ev, A., 1994: Modulation of alpha-actinin levels affects cell motility and confers tumorigenicity on 3T3 cells. *Journal of Cell Science* 107 (Pt 7), 1773–1782.
- Gottlieb, P.D., Pierce, S.A., Sims, R.J., Yamagishi, H., Weihe, E.K., Harriss, J.V., Maika, S.D., Kuziel, W.A., King, H.L., Olson, E.N., Nakagawa, O., Srivastava, D., 2002: Bop encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis. *Nature Genetics* 31, 25–32.
- Grigoriadis, A.E., Wang, Z.Q., Wagner, E.F., 1995: Fos and bone cell development: lessons from a nuclear oncogene. *Trends in Genetics* 11, 436–441.
- Grounds, M.D., Garrett, K.L., Lai, M.C., Wright, W.E., Beilharz, M.W., 1992: Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell and Tissue Research* 267, 99–104.
- Henke, A., Huber, S., Stelzner, A., Whitton, J.L., 1995: The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Journal of Virology* 69, 6720–6728.
- Hu, G.-Z., Ronne, H., 1994: Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes in vivo. *Nucleic Acids Research* 22, 2740–2743.
In: *Human embryology and developmental biology.* / Mosby (Hrsg.). Philadelphia: Elsevier. - S. 195-204.
- Kandolf, R., Bültmann, B., Klingel, K., Bock, C.-T., 2008: Molecular mechanisms and consequences of cardiac viral infections. *Pathologe* 29 Suppl 2, 112–117.
- Kandolf, R., Hofschneider, P., 1989: Viral heart disease. *Springer Semin Immunopathol* 11.
- Kanno, M., Chalut, C., Egly, J.-M., 1992: Genomic structure of the putative BTF3 transcription factor. *Gene* 117, 219–228.
- Kaufman, M.H., 1992: *The atlas of mouse development.* Academic Press, London; San Diego.

- Kaufman, S.J., Foster, R.F., 1988. Replicating myoblasts express a muscle-specific phenotype. *Proceedings of the National Academy of Science* 85, 9606–9610.
- Keeling, P.J., Doolittle, W.F., 1996: Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Molecular Biology and Evolution* 13, 1297–1305.
- Kimes, B.W., Brandt, B.L., 1976: Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Experimental Cell Research* 98, 367–381.
- Kitzmann, M., Fernandez, A., 2001: Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 571–579.
- Klingel, K., Hohenadl, C., Canu, A., Albrecht, M., Seemann, M., Mall, G., Kandolf, R., 1992: Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 314–318.
- Klingel, K., Sauter, M., Bock, C.T., Szalay, G., Schnorr, J.-J., Kandolf, R., 2004: Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Medical Microbiology and Immunology* 193, 101–107.
- Klingel, K., Stephan, S., Sauter, M., Zell, R., McManus, B.M., Bültmann, B., Kandolf, R., 1996: Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets. *Journal of Virology* 70, 8888–8895.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., Kambadur, R., 2002: Myostatin Inhibits Myoblast Differentiation by Down-regulating MyoD Expression. *J. Biol. Chem.* 277, 49831–49840.
- Lauring, B., Sakai, H., Kreibich, G., Wiedmann, M., 1995: Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5411–5415.
- Lawson-Smith, M.J., McGeachies, J.K., 1998: The identification of myogenic cells in skeletal muscle, with emphasis on the use of tritiated thymidine autoradiography and desmin antibodies. *Journal of Anatomy* 192, 161–171.
- Lazarides, E., 1980: Desmin and intermediate filaments in muscle cells. *Results and Problems in Cell Differentiation* 11, 124–131.
- Lek, M., Quinlan, K.G.R., North, K.N., 2010: The evolution of skeletal muscle performance: gene duplication and divergence of human sarcomeric α -actinins. *BioEssays* 32, 17–25.
- Li, H., Randall, W.R., Du, S.-J., 2009: skNAC (skeletal Naca), a muscle-specific isoform of Naca (nascent polypeptide-associated complex alpha), is required for myofibril organization. *FASEB Journal* fj.08–125542.
- Löffler, G., Petrides, P.E., Heinrich, P.C., 2006. *Biochemie Und Pathobiochemie*. Springer DE.

- Ludolph, D.C., Konieczny, S.F., 1995: Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. *FASEB Journal* 9, 1595–1604.
- Maley, M.A., Fan, Y., Beilharz, M.W., Grounds, M.D., 1994: Intrinsic differences in MyoD and myogenin expression between primary cultures of SJL/J and BALB/C skeletal muscle. *Experimental Cell Research* 211, 99–107.
- Mansouri, A., Gruss, P., 1998: Pax3 and Pax7 are expressed in commissural neurons and restrict ventral neuronal identity in the spinal cord. *Mechanisms of Development* 78, 171–178.
- Markesich, D.C., Gajewski, K.M., Nazimiec, M.E., Beckingham, K., 2000: Bicaudal encodes the *Drosophila* beta NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery*. *Development* 127, 559–572.
- Mason, J.W., O'Connell, J.B., Herskowitz, A., Rose, N.R., McManus, B.M., Billingham, M.E., Moon, T.E., 1995: A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *The New England Journal of Medicine* 333, 269–275.
- Mauro, A., 1961: Satellite cell of skeletal muscle fibers. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 9, 493–495.
- Maze, S.S., Adolph, R.J., 1990: Myocarditis: unresolved issues in diagnosis and treatment. *Clinical Cardiology* 13, 69–79.
- McManus, B., Kandolf, R., 1991: Evolving concepts of cause, consequence, and control in myocarditis. *Current Opinion in Cardiology* 6: 418-427.
- McManus, B.M., Yanagawa, B., Rezai, N., Luo, H., Taylor, L., Zhang, M., Yuan, J., Buckley, J., Triche, T., Schreiner, G., Yang, D., 2002: Genetic determinants of coxsackievirus B3 pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 975, 169–179.
- Mermod, N., O'Neill, E.A., Kelly, T.J., Tjian, R., 1989: The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* 58, 741–753.
- Molkentin, J.D., Olson, E.N., 1996: Defining the regulatory networks for muscle development. *Current Opinion in Genetics and Development* 6, 445–453.
- Moncollin, V., Fischer, L., Cavallini, B., Egly, J.M., Chambon, P., 1992: Class II (B) general transcription factor (TFIIB) that binds to the template-committed preinitiation complex is different from general transcription factor BTF3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 397–401.
- Moran, J.L., Li, Y., Hill, A.A., Mounts, W.M., Miller, C.P., 2002: Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling. *Physiological Genomics* 10, 103–111.
- Moreau, A., Yotov, W.V., Glorieux, F.H., St-Arnaud, R., 1998: Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Molecular and Cellular Biology* 18, 1312–1321.

- Munz, B., Wiedmann, M., Lochmüller, H., Werner, S., 1999: Cloning of novel injury-regulated genes. Implications for an important role of the muscle-specific protein skNAC in muscle repair. *Journal of Biological Chemistry* 274, 13305–13310.
- Neu, R., Adams, S., Munz, B., 2006: Differential expression of entactin-1/nidogen-1 and entactin-2/nidogen-2 in myogenic differentiation. *Differentiation* 74, 573–582.
- Opavsky, M.A., Penninger, J., Aitken, K., Wen, W.H., Dawood, F., Mak, T., Liu, P., 1999: Susceptibility to myocarditis is dependent on the response of alphabeta T lymphocytes to coxsackieviral infection. *Circulation Research* 85, 551–558.
- Palmer, C.M., Rudnicki, M.A., 2002: Chapter 1: The myogenic regulatory factors, in: *Advances in Developmental Biology and Biochemistry*. Elsevier, pp. 1–32.
- Park, C.Y., Pierce, S.A., Von Drehle, M., Ivey, K.N., Morgan, J.A., Blau, H.M., Srivastava, D., 2010. skNAC, a Smyd1-interacting transcription factor, is involved in cardiac development and skeletal muscle growth and regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 20750–20755.
- Parsons, W.J., Richardson, J.A., Graves, K.H., Williams, R.S., Moreadith, R.W., 1993: Gradients of transgene expression directed by the human myoglobin promoter in the developing mouse heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 1726–1730.
- Parthun, M.R., Mangus, D.A., Jaehning, J.A., 1992: The EGD1 product, a yeast homolog of human BTF3, may be involved in GAL4 DNA binding. *Molecular and Cellular Biology* 12, 5683–5689.
- Rospert, S., Dubaquié, Y., Gautschi, M., 2002: Nascent-polypeptide-associated complex. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 1632–1639.
- Sallusto, F., Mackay, C.R., Lanzavecchia, A., 2000: The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annual Review of Immunology* 18, 593–620.
- Selinka, H.-C., Wolde, A., Sauter, M., Kandolf, R., Klingel, K., 2004: Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism. *Medical Microbiology and Immunology* 193, 127–131.
- Silbernagl, S., Despopoulos, A., 2007. *Taschenatlas Physiologie*. Georg Thieme Verlag.
- Sims, R.J., Weihe, E.K., Zhu, L., O'Malley, S., Harriss, J.V., Gottlieb, P.D., 2002: m-Bop, a Repressor Protein Essential for Cardiogenesis, Interacts with skNAC, a Heart- and Muscle-specific Transcription Factor. *Journal of Biological Chemistry* 277, 26524–26529.
- Sjöblom, B., Salmazo, A., Djinić-Carugo, K., 2008: Alpha-actinin structure and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 2688–2701.
- Song, K.S., Scherer, P.E., Tang, Z., Okamoto, T., Li, S., Chafel, M., Chu, C., Kohtz, D.S., Lisanti, M.P., 1996: Expression of Caveolin-3 in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry* 271, 15160–15165.

- St-Arnaud, R., 1998: Transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation: the role of coactivators. *Critical Review™ in Eukaryotic Gene Expression* 8, 191–202.
- Tajbakhsh, S., Buckingham, M., 2000: The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Current Topics in Developmental Biology* 48, 225–268.
- Talmadge, R.J., Roy, R.R., Jiang, B., Edgerton, V.R., 1995: Myofibrillar ATPase activity of feline muscle fibers expressing slow and fast myosin heavy chains. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 43, 811–819.
- Tan, X., Rotllant, J., Li, H., DeDeyne, P., Du, S.J., 2006: SmyD1, a histone methyltransferase, is required for myofibril organization and muscle contraction in zebrafish embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2713–2718.
- Tomczak, K.K., Marinescu, V.D., Ramoni, M.F., Sanoudou, D., Montanaro, F., Han, M., Kunkel, L.M., Kohane, I.S., Beggs, A.H., 2004: Expression profiling and identification of novel genes involved in myogenic differentiation. *FASEB Journal* 18, 403–405.
- Wang, L., Zhang, W., Wang, L., Zhang, X.C., Li, X., Rao, Z., 2010: Crystal structures of NAC domains of human nascent polypeptide-associated complex (NAC) and its α NAC subunit. *Protein and Cell* 1, 406–416.
- Weiss, A., Leinwand, L.A., 1996: The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12, 417–439.
- Weller, P.A., Price, M., Isenberg, H., Edwards, Y.H., Jeffreys, A.J., 1986: Myoglobin expression: early induction and subsequent modulation of myoglobin and myoglobin mRNA during myogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 6, 4539–4547.
- Wells, D.J., Wells, K.E., 2005: What do animal models have to tell us regarding Duchenne muscular dystrophy? *Acta Myologica* 24, 172–180.
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T.A., Wiedmann, M., 1994: A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 370, 434–440.
- Williams, T., Tjian, R., 1991: Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes and Development* 5, 670–682.
- Wright, C., Haddad, F., Qin, A.X., Baldwin, K.M., 1997: Analysis of myosin heavy chain mRNA expression by RT-PCR. *Journal of Applied Physiology* 83, 1389–1396.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D., 1993: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. , Published online: 16 December 1993; | doi:10.1038/366701a0 366, 701–704.
- Yotov, W.V., Moreau, A., St-Arnaud, R., 1998: The alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex functions as a transcriptional coactivator. *Molecular and Cellular Biology* 18, 1303–1311.

- Yotov, W.V., St-Arnaud, R., 1996: Differential splicing-in of a proline-rich exon converts alphaNAC into a muscle-specific transcription factor. *Genes and Development* 10, 1763–1772.
- Yuan, J., Liu, Z., Lim, T., Zhang, H., He, J., Walker, E., Shier, C., Wang, Y., Su, Y., Sall, A., McManus, B., Yang, D., 2009: CXCL10 inhibits viral replication through recruitment of natural killer cells in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Circulation Research* 104, 628–638.
- Zheng, X., 1987: A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B (II). *Cell* 50, 361–368.
- Zheng, X.M., Black, D., Chambon, P., Egly, J.M., 1990: Sequencing and expression of complementary DNA for the general transcription factor BTF3. *Nature* 344, 556–559.

PUBLIKATIONEN

“Skeletal muscle-specific variant of nascent polypeptide associated complex alpha (skNAC): Implications for a specific role in mammalian myoblast differentiation”

Felicitas Berger, Janine Berkholz, Theresia Breustedt, Daniela Ploen, Barbara Munz

European Journal of Cell Biology Volume 91, Issue 2, February 2012, Pages 150-155

Eigenleistung hierbei: Vorarbeit/ Etablierung von verschiedenen Experimenten sowie Durchführung von Experimenten, aus denen die Abbildungen Nr. 4 und 5 (Durchführung der siRNA-Versuche), Nr. 6 (Durchführung der MyHC-spezifischen Immunzytochemie) und Nr. 7 (Ermittlung des Fusionsindex‘ der transfizierten C2C12-Zellen) entstanden sind.

DANKSAGUNG

Der größte Dank für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit geht an Frau Prof. Dr. Barbara Munz. Durch ihre Engelsgeduld, ihre stets produktiven und kreativen Ideen sowie ihre konstruktive Kritik hat sie mich häufig wieder auf die richtige Bahn gebracht. Immer hilfsbereit und zu jeder Sekunde ein offenes Ohr für Fragen (mögen sie auch noch so eigenartig gewesen sein): einfach eine unglaublich tolle Betreuerin!

Ein ganz herzlicher Dank geht an Herrn Prof. Dr. Ralf Einspanier, der mir durch die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit die Promotion am Fachbereich Veterinärmedizin der FU Berlin ermöglicht hat.

Allen Mitgliedern der AG Munz, zu welchen ich in der Zeit Kontakt hatte (Felicitas Berger, Anna Mikolajczyk, Renate Noske-Reimers, Ralitsa Valchanova, Janine Berkholz) ergeht ebenfalls ein herzliches Dankeschön für die nette Zusammenarbeit, die interessanten Gespräche, die unterhaltsamen Besuche der Kantine oder die Unterstützung bei kleinen „Durchhängern“. Insbesondere ist hierbei Ingrid Büchsler zu nennen. Nicht nur durch die gemeinsame Zeit im Labor und die gleiche Berufswahl besteht der Kontakt zwischen uns bis heute.

Herr Prof. Dr. Achim Gruber ermöglichte es mir, die Fotos der immunhistochemisch gefärbten Schnitte im Institut der Pathologie der FU Berlin anfertigen zu können. Vielen Dank hierfür! Ebenfalls vielen Dank an Nikola Heblinski, die mir das technische Verständnis hierfür vermittelt hat.

Frau Prof. Karin Klingel danke ich für die Bereitstellung der Herzschnitte der mit Coxsackievirus B3 infizierten Mäuse.

Herrn Prof. Dr. Ingo Morano danke ich für die Übergabe einiger Aliquots von H2c9-Zellen.

Und schließlich danke ich von ganzem Herzen meiner Familie, die mich in allen Lebenslagen stets unterstützt und mir immer Zuspruch geschenkt hat, um diese Arbeit anzufertigen.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

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

Berlin, den

Theresia Breustedt