

Aus dem Institut für Physiologie, CBF  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

# **Die Rolle von Entactin-1 und -2 bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

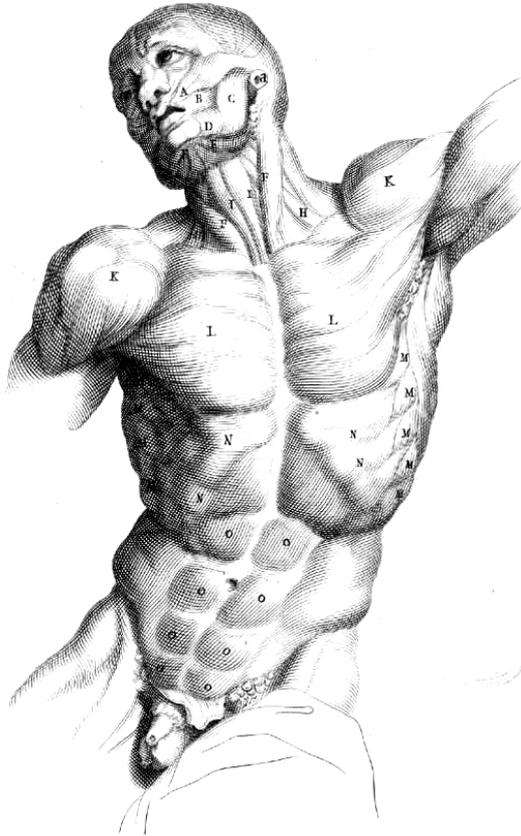
von  
Ricarda Flöttmann (geb. Neu)  
aus Arnshausen

Gutachter:      1. Prof. Dr. Barbara Munz  
                         2. Prof. Dr. D. Blottner  
                         3. Prof. Dr. med. H. Lochmüller

Datum der Promotion:      04. Februar 2011

TAVOLA X.

19



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>7</b>
1.1	Aufbau der Skelettmuskulatur .....	7
1.2	Aufbau einer Muskelfaser .....	8
1.3	Muskelzellendifferenzierung .....	9
1.4	Die Basalmembran .....	9
1.4.1	Struktur und Aufbau von Basalmembranen .....	10
1.4.2	Funktionen der Basalmembran .....	11
1.4.3	Die Proteine der Basalmembran .....	12
1.5	Fragestellung und Ziele dieser Arbeit .....	18
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>20</b>
2.1	Material .....	20
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	20
2.1.2	Enzyme .....	21
2.1.3	Antikörper .....	21
2.1.4	Oligodesoxynukleotide .....	22
2.1.5	Plasmide .....	22
2.1.6	„Kits“ .....	22
2.1.7	Bakterienstämme .....	22
2.1.8	Eukaryontische Zelllinien .....	23
2.1.9	Standardpuffer und Lösungen .....	23
2.2	Methoden .....	24
2.2.1	Zellbiologische Methoden .....	24
2.2.2	Mikrobiologische Methoden .....	25
2.2.3	Molekularbiologische Methoden .....	27
2.2.4	Proteinchemische Methoden .....	36
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>40</b>
3.1	Untersuchungen an C2C12-Zelllinien, die das <i>entactin-1</i> bzw. das <i>entactin-2</i> -Gen überexprimieren .....	40

3.1.1	Analyse der Expression von rekombinantem und endogenen <i>entactin-1</i> und -2 in den Zelllinien .....	40
3.1.2	Ergebnisse der Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer .....	44
3.1.3	Ergebnisse des BrdU-Labelings .....	45
3.1.4	Untersuchung der Expression von Genen, die mit der Regulation von Proliferationsvorgängen assoziiert sind .....	48
<b>3.2</b>	<b>Untersuchung der Expression von Genen, die die Myogenese kontrollieren .....</b>	<b>54</b>
3.2.1	Untersuchung der Expression des <i>myogenin</i> -Gens auf RNA-Ebene .....	54
3.2.2	Untersuchung der Expression des <i>aktin</i> -Gens auf Protein-Ebene .....	56
3.2.3	Untersuchung der Expression von Caveolin-3 .....	57
<b>3.3</b>	<b>Hemmung der Expression des <i>entactin-2</i>-Gens in Myoblasten mittels spezifischer siRNAs .....</b>	<b>58</b>
3.3.1	Optimierung der Transfektionsbedingungen .....	58
3.3.2	Untersuchung der Expression verschiedener Markergene in den siRNA-behandelten Zellen .....	60
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungen an C2C12-Zelllinien, die das <i>entactin-1</i> bzw. das <i>entactin-2</i>-Gen überexprimieren .....</b>	<b>64</b>
4.1.1	Während der Differenzierung lässt die Expression des rekombinanten <i>entactin-1</i> und -2 nach .....	65
4.1.2	<i>entactin-2</i> -überexprimierende Zellen können nur kurzfristig in Kultur gehalten werden .....	65
4.1.3	Die <i>entactin-1</i> -überexprimierenden Zellen zeigen nach 48 Stunden eine erhöhte Zellzahl gegenüber den Kontrollzellen .....	66
4.1.4	<i>entactin-1</i> überexprimierende Zellen proliferieren schneller als die Kontrollen .....	66
4.1.5	Entactin-1 hat Einfluss auf die Expression verschiedener Proliferations- und Differenzierungsmarker .....	67
4.1.6	Entactin-1 beeinflusst die Ki67-Expression .....	67
4.1.7	Entactin-1 beeinflusst die <i>rip-2</i> -Genexpression .....	67
4.1.8	Entactin-1 beeinflusst die <i>p21</i> -Genexpression .....	68
4.1.9	Entactin-1 beeinflusst die <i>caveolin-3</i> -Genexpression .....	69
4.1.10	Entactin-1 hat keinen Einfluss auf die Expression des <i>aktin</i> -, des <i>myogenin</i> - und des <i>cyclin D1</i> -Gens .....	69
4.1.11	Entactin-1 hat einen positiven Einfluss auf die Myoblastenproliferation und einen negativen Einfluss auf die Myoblastendifferenzierung .....	71
<b>4.2</b>	<b>Hemmung der Expression des <i>entactin-2</i>-Gens in Myoblasten mittels spezifischer siRNAs .....</b>	<b>71</b>
4.2.1	Optimierung der Bedingungen .....	72
4.2.2	Entactin-2 beeinflusst die <i>cyclin D1</i> Expression .....	73
4.2.3	Entactin-2 beeinflusst die <i>p21</i> -Genexpression .....	74

4.2.4	Entactin-2 beeinflusst die Myoblastenproliferation .....	74
4.3	<b>Entactin-1 und -2 könnten unterschiedliche Funktionen bei der Skelettmuskeldifferenzierung haben .....</b>	<b>75</b>
5	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>77</b>
6	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>79</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>82</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>84</b>
	<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>85</b>
	<b>LEBENS LAUF VON RICARDA FLÖTTMANN .....</b>	<b>86</b>
	<b>PUBLIKATIONS LISTE.....</b>	<b>87</b>

# 1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Rolle der Basalmembranproteine Entactin-1 und -2 (auch bekannt unter dem Namen Nidogen-1 und -2) bei der Skelettmuskeldifferenzierung untersucht werden.

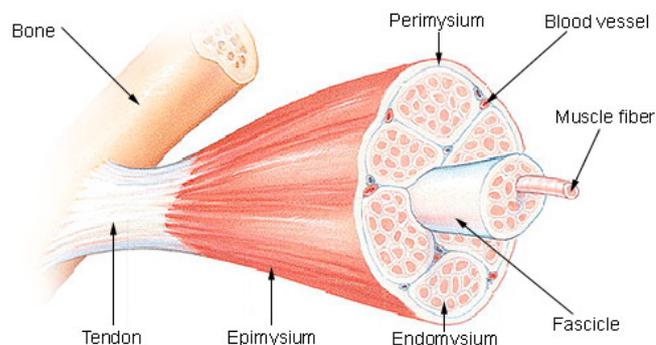
Daher soll in der Einleitung zunächst kurz auf den Aufbau der Skelettmuskulatur und anschließend auf die Skelettmuskelzellendifferenzierung eingegangen werden. Im Anschluss daran wird die Struktur und Funktion der Basalmembran erläutert.

## 1.1 Aufbau der Skelettmuskulatur

Der menschliche Körper besitzt drei Arten von Muskulatur: die Skelettmuskulatur, die Herzmuskulatur sowie die glatte Muskulatur.

Dabei ist die Skelettmuskulatur diejenige, welche für die Mobilität des Menschen unerlässlich ist: durch sie werden alltägliche Dinge wie Gehen und Stehen erst ermöglicht.

Ein Skelettmuskel besteht dabei aus einzelnen Fasern, welche auf unterschiedlichen Organisationsebenen von Faszien umgeben werden. Eine Übersicht über den Aufbau eines einzelnen Skelettmuskels gibt Abbildung 1.



**Abb. 1: Übersicht des Aufbaus eines Skelettmuskels.** Bone: Knochen, Tendo: Sehne, Epi-, Endo-, Perimysium: Epi-, Endo-, Perimysium, Fascicle: Fibrillenbündel, Muscle fiber: Muskelfibrille, Blood Vessel: Blutgefäß. Aus U.S. National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program (<http://training.seer.cancer.gov>).

## 1.2 Aufbau einer Muskelfaser

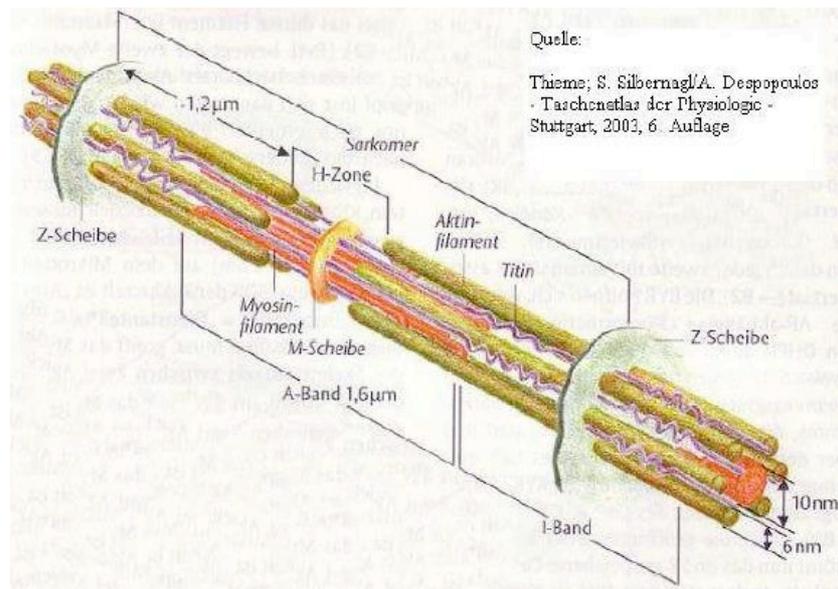
Die Skelettmuskelzelle selbst ist ein langes, multinukleäres Synzytium, weshalb sie auch als Skelettmuskelfaser bezeichnet wird.

In einer Muskelfaser finden sich pro Millimeter Muskelfaserstrecke ungefähr 50 Zellkerne. Ihr Durchmesser liegt zwischen 40 und 80 Mikrometern, wohingegen ihre Länge sehr variabel sein kann.

An ihrer Oberfläche werden Skelettmuskelzellen durch das Plasmalemm abgeschlossen, welches speziell bei Muskelzellen auch als Sarkolemm bezeichnet wird.

Das Sarkolemm bildet quer zu seiner Oberfläche weit in die Zelle vordringende Einstülpungen aus, welche als T-Tubuli (transversale Tubuli) bezeichnet werden.

Die kleinste funktionelle Einheit der Muskelfibrille ist das Sarkomer. Die Sarkomere haben einen strengen, regelmäßigen Aufbau aus Aktin- und Myosinfibrillen. Sie sind in Längsrichtung der Myofibrille angeordnet (Abbildung 2). Im Ruhezustand haben sie eine Länge von ungefähr zwei bis zweieinhalb Mikrometern. Bei einer Kontraktion kommt es zu einer Verkürzung der Sarkomere, weil sich die Aktin- und Myosinfilamente ineinander schieben.



**Abb. 2: Übersicht eines Sarkomers.** Auf der Abbildung ist der Aufbau eines Sarkomers zu sehen. Aus Silbernagel und Despopoulos, 2003.

### 1.3 Muskelzellendifferenzierung

Die Muskelzellendifferenzierung ist ein komplexer und hoch geordneter Vorgang (Übersicht bei Sabourin und Rudnicki, 2000). Während der Embryonalentwicklung kommt es unter dem Einfluss verschiedener intra- und extrazellulärer Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Proteinen der extrazellulären Matrix und Transkriptionsfaktoren zur Differenzierung von noch proliferationskompetenten Myoblasten zu proliferationsinkompetenten Myozyten. Letztere können dann miteinander zu reifen Muskelfasern fusionieren (Übersicht bei Sabourin und Rudnicki, 2000). Wenn gleich viele der Faktoren, die die Myogenese regulieren, bekannt sind (beispielsweise die myogenen Transkriptionsfaktoren), spricht die Komplexität des ganzen Prozesses dafür, dass noch viele Regulatoren unbekannt sind.

### 1.4 Die Basalmembran

Basalmembranen stellen eine hochspezialisierte Form der extrazellulären Matrix dar, die sich in Form beweglicher,

dünnere Matten zwischen allen Parenchym-Bindegewebe-Übergängen befindet, das heißt also auch um und an Muskelzellen (Übersicht bei Sanes, 2003).

Basalmembranen trennen Gewebe voneinander indem sie schichtartige Strukturen ausbilden und dienen gleichzeitig der Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix des Bindegewebes und denjenigen Zellen, welche die Komponenten der Basalmembran produzieren.

Basalmembranen sind ubiquitär vorkommende Strukturen, die entweder unter Zellen abgelagert werden (wie bei Epithel und Endothel) oder Zellen vollständig umgeben (wie bei Muskel-, Fett- und Nervenzellen) (Übersicht in Erickson und Couchman, 2000).

#### 1.4.1 Struktur und Aufbau von Basalmembranen

Die Basalmembran besteht, wie mit Hilfe der Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden konnte, aus zwei Schichten: der direkt mit der Plasmamembran in Verbindung stehenden, inneren Basallamina, sowie der außen liegenden Lamina fibroreticularis.

Die Basallamina unterteilt sich weiterhin in die Lamina lucida (auch Lamina rara externa genannt) und die Lamina densa (Übersicht bei Lüllmann-Rauch, 2003).

Das derzeitige Basalmembranmodell beruht auf der Vorstellung von zwei selbstpolymerisierenden Netzwerken aus Kollagen Typ IV beziehungsweise verschiedenen Lamininen die durch Entactin-1 zusammengehalten werden (Übersicht bei Erickson und Couchman, 2000).

## 1.4.2 Funktionen der Basalmembran

Die Funktionen der Basalmembran sind zahlreich und vielfältig, weshalb im Rahmen dieser Einleitung nur auf die wichtigsten Aspekte hingewiesen werden kann.

1) Basalmembranen dienen der Adhäsion von Zellen an das Bindegewebe. Diese Adhäsion wird durch spezifische und unspezifische Verbindungen zwischen Zellmembranen und Basalmembran sowie Basalmembran und Bindegewebe gewährleistet (Übersicht bei Alberts *et al.*, 2004).

2) Basalmembranen können Filterfunktionen übernehmen. Diese Eigenschaft ist zwar ubiquitär, findet sich jedoch in der deutlichsten Ausprägung in den renalen Glomerula (Übersicht bei Alberts *et al.*, 2004).

3) Basalmembranen dienen der Bindung von Wachstumsfaktoren und Hormonen. Dadurch ist gewährleistet, dass an Zellmembranen immer eine konstante Konzentration dieser Substanzen herrscht und etwaige Abweichungen schnell ausgeglichen werden können.

4) Basalmembranen beeinflussen außerdem das Verhalten von Zellen in verschiedenen Entwicklungsprozessen, wie etwa der Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Sie wirken als Leitschiene für Migration und Adhäsion von Zellen, Axonwachstum und Zellpolarisierung, erfüllen also so genannte „morphogenetische Funktionen“, was im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wichtig ist. Die Basalmembran-Zell-Interaktionen werden vermutlich durch verschiedene Arten von Integrinen vermittelt. Integrine sind eine Klasse von Adhäsionsmediatoren in der Lamina densa, die die Kommunikation zwischen dem Zellinneren und der extrazellulären Matrix ermöglichen. Wirksam werden Integrine durch Bindung an das Zytoskelett beziehungsweise

diverse „*second messenger*“-Systeme (intrazellulär), aber vor allem auch durch Bindung von Zelladhäsionsmolekülen an ihre die extrazelluläre Domäne, wodurch Signalweiterleitung in beide Richtungen realisiert wird (Übersicht bei Alberts *et al.*, 2004)

Der frühzeitige Nachweis von Basalmembranen in der Embryonalentwicklung, vor allem von Laminin-1, unterstreicht die Wichtigkeit der Basalmembran bei Entwicklungsprozessen (Übersicht bei Sasaki *et al.*, 2004).

### 1.4.3 Die Proteine der Basalmembran

#### 1.4.3.1 Kollagene

Die Kollagene sind eine Familie von Faserproteinen, die in allen vielzelligen Organismen vorkommen. Sie sind wichtiger Strukturbestandteil von Haut, Knochen, Sehnen, Knorpel, Blutgefäßen und Zähnen. Bis heute sind 20 verschiedene Kollagene beschrieben worden. Nach ihrer Struktur werden sie in fibrilläre, fibrillen-assoziierte, netzbildende, verankernde und perlenkettenartige Kollagene eingeteilt (Übersicht bei Alberts *et al.*, 2004).

#### 1.4.3.2 Laminine

Laminin ist das häufigste Glykoprotein der Basalmembran, und wurde bis heute in mehreren verschiedenen Formen charakterisiert. Bei Laminin handelt es sich um ein großes, gut verformbares Protein, das sich aus drei Polypeptidketten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) zusammensetzt, die zu einem asymmetrischen Kreuz zusammengelagert sind (Übersicht bei Alberts *et al.*, 2004).

Laminine weisen mehrere funktionelle Domänen auf, über die Verbindungen zu anderen Molekülen gestellt werden können. Eine davon bindet beispielsweise an Perlecan, andere wiederum binden an Laminin-Rezeptormoleküle auf

der Zelloberfläche oder an Entactin. Da sich sowohl die Entactine als auch Perlecan an Laminin anlagern können, sieht man sie als eine Art Verbindungsmolekül an.

Laminine spielen in der Embryonalentwicklung sowie bei Regenerationsprozessen und Initiierung der Ausbildung von Basalmembranen eine wichtige Rolle (Foster *et al.* 1987).

#### 1.4.3.3 *Proteoglykane*

Proteoglykane bestehen aus Glykosaminoglykanketten, die kovalent an einen Proteinkern (Core-Protein) gebunden sind.

Das häufigste Proteoglykan ist das Perlecan, welches hier Erwähnung finden soll, weil es eine Bindung zu Entactin eingeht. Perlecan besteht aus einem ungefähr 400 Kilodalton schweren Kernprotein und ist aus sechs globulären Regionen aufgebaut (Übersicht bei Alberts *et al.*, 2004). Es ist während der Embryogenese der Maus schon im 2-Zell-Stadium nachweisbar. Hierbei ist vor allem seine Fähigkeit Wachstumsfaktoren zu binden von Bedeutung (Übersicht bei Erickson und Couchman, 2000).

#### 1.4.3.4 *Entactin (Nidogen)*

Die bei dieser Arbeit zu untersuchenden Glykoproteine Entactin-1 und -2 sind ubiquitär in Basalmembranen vorkommende Proteine (Übersicht bei Erickson und Couchman, 2000). Die erstmalige Isolierung des Entactin-1 erfolgte aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumor einer Maus (Timpl *et al.*, 1983).

Die Entactin-1 Proteine haben eine Größe von 1245 (Maus), beziehungsweise 1247 (Mensch) Aminosäuren und sind zu 85 Prozent identisch (Übersicht bei Erickson und Couchman, 2000).

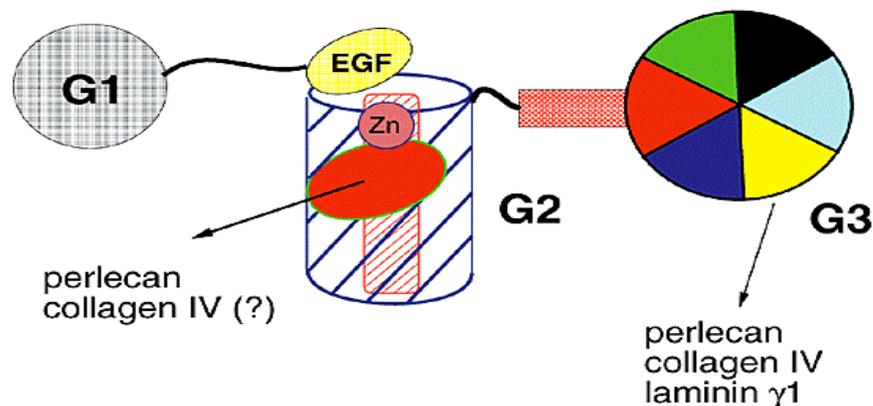
1998 wurde dann das Gen für das homologe Entactin-2 kloniert (Kohfeldt *et al.*, 1998; Kimura *et al.*, 1998). Dieses Gen kodiert für ein Polypeptid mit 1375 Aminosäuren (Kohfeldt *et al.*, 1998). Die Aminosäuresequenzen von humanem Entactin-1 und -2 zeigen eine Übereinstimmung von 46 Prozent (Kohfeldt *et al.*, 1998). Das murine Entactin-2 hingegen hat nur 27,4 Prozent Sequenzgleichheit zu dem murinen Entactin-1, besitzt jedoch viele strukturelle Ähnlichkeiten.

Durch Ultrazentrifugation konnte für Entactin-1 ein Molekulargewicht von 148 Kilodalton beziehungsweise mittels SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ein Molekulargewicht von 141 beziehungsweise 158 Kilodalton (im reduzierten beziehungsweise nichtreduziertem Zustand) ermittelt werden. Bei weiteren elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte eine gezeigt werden, dass Entactin-1 aus einer einzelnen Polypeptidkette besteht, die sich zu einer länglichen Struktur faltet und aus drei globulären Domänen (G1-G3) besteht, die durch zwei gestreckte Domänen verbunden werden (Paulsson *et al.*, 1986, Fox *et al.*, 1991). Die Verbindungsregion zwischen der G1 und der G2 Domäne zeigt eine gewisse Flexibilität, während die Verbindung zwischen der G2 und der G3 Domäne starr ist (siehe Abbildung 3).

Die Gesamtlänge des Glykoproteins wurde auf ungefähr 30 Nanometer geschätzt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Entactin-1 sechs Domänen besitzt, die Ähnlichkeit mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) besitzen, sowie zwei Domänen, die Ähnlichkeit mit Thyreoglobulin (TY) besitzen: EGF-ähnliche Domänen und TY-ähnliche Domänen. Am C-terminalen Ende konnte außerdem eine

Domäne ermittelt werden, die Ähnlichkeit mit dem Rezeptor für Lipoproteine geringer Dichte (LDLR) aufweist (zur Übersichtsdarstellung charakteristischer Domänen, die bei verschiedenen Proteinen auftreten siehe Hohenester und Engel, 2001). Die LDLR-ähnliche Domäne sitzt zwischen einer TY- und einer EGF-ähnlichen Domäne. Ebenfalls in dieser Region befinden sich sechs YWTD-Wiederholungen (YWTD ist der Einbuchstabencode der Aminosäuren Tyrosin-Tryptophan-Threonin-Asparaginsäure; Springer, 1998).



**Abb. 3: Übersicht über den Aufbau von Entactin-1.** Entactin-1 besteht aus drei globulären Domänen: G1, G2 und G3. Über Funktion und Struktur von G1 ist wenig bekannt. Die fassförmige G2-Domäne wird durch 11  $\beta$ -Faltblätter gebildet, durch deren Hohlraum sich eine  $\alpha$ -Helix zieht. Sie ist verantwortlich für die Bindung an Perlecan und Kollagen IV. Die Struktur der G3 Domäne wurde als  $\beta$ -Propeller vorhergesagt (Springer, 1998). Die G3 Domäne bildet einen sechsblättrigen  $\beta$ -Propeller. Sie bindet Perlecan, Kollagen IV und die Laminin  $\gamma$ 1 Kette (aus: Liddington, 2001)

Innerhalb der Basalmembran vermutet man, dass Entactin eine wichtige Rolle bei der Verknüpfung zwischen Kollagen IV und Laminin-1, welche selbständig zu Netzwerken polymerisieren, zukommt (Fox *et al.*, 1991).

Entactin und Laminin bilden dabei einen stabilen, nicht-kovalenten Komplex, in dem die G3 Domäne des Entactins mit der  $\gamma$ 1-Kette des Laminins interagiert (Übersicht bei

Mayer *et al.*, 1998). Während die beiden Proteine in der embryonalen Matrix sowie im EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) Tumor zu gleichen Anteilen vorliegen, findet man in der Basalmembran adulter Tiere einen Entactin Überschuss (Mohan und Spiro, 1986).

Bei dem Entactin-Kollagen IV Komplex konnte eine Interaktion zwischen der G2 Domäne (Übersicht bei Mayer, Kohfeldt und Timpl, 1998) und einem ungefähr 80 Nanometer von der NC1-Domäne des Kollagen IV entfernten Epitop identifiziert werden. Die G3 Domäne zeigt zwar auch Bindungseigenschaften, diese sind aber wesentlich schwächer als die Laminin Bindung.

Die Summe der *in vitro*-Analysen führte zu einem Modell, in welchem Entactin eine zentrale Rolle bei der Organisation der Basalmembran einnimmt. Das Hauptargument hierfür liefert die Fähigkeit des Entactins, auf Grund der räumlichen Trennung der Bindungsstellen Dreifachkomplexe mit Laminin und Kollagen IV zu bilden (Fox *et al.*, 1991). Dieses vereinfachte Bild wird jedoch der Komplexität der vielfältigen zusätzlichen Bindungsmöglichkeiten des Entactins, zum Beispiel an Fibuline, nicht gerecht.

Für das humane Entactin-2 konnte ein Molekulargewicht von 200 kD ermittelt werden (Kohfeldt *et al.*, 1998). Wie auch das Entactin-1 ist es ein Glykoprotein (Kohfeldt *et al.*, 1998). Zwar ist es mit 40 Nanometern etwas länger als Entactin-1 (Kohfeldt *et al.*, 1998), aber es lässt sich eine ähnliche Proteinstruktur erkennen, welche ebenfalls aus drei Domänen besteht, die zwischen G1 und G2 flexibel, sowie zwischen G2 und G3 starr verbunden sind (Kohfeldt *et al.*, 1998).

Sowohl beim menschlichen als auch beim murinen Entactin-2 konnten innerhalb der G2 Domäne eine EGF-ähnliche

Domäne und in dem steifen Verbindungsstück vier EGF-ähnliche sowie zwei Thyroglobulin-ähnliche Domänen (TY) gezeigt werden (Kohfeldt *et al.*, 1998). Dies ähnelt der Struktur von Entactin-1, allerdings fehlt die EGF-ähnliche Domäne am C-terminalen Ende (Kohfeldt *et al.*, 1998) und es konnte nur eine TY-ähnliche Domäne identifiziert werden (Mann *et al.*, 1989).

Es konnte gezeigt werden, dass Entactin-2 ebenfalls an Kollagen IV und Perlecan bindet (Kohfeldt *et al.*, 1998), wohingegen die Bindung zu Laminin schwächer ist (Kohfeldt *et al.*, 1998). Außerdem zeigt rekombinantes Entactin-2 keine signifikante Bindung an Fibulin-1 und -2 (Kohfeldt *et al.*, 1998).

Exprimiert wird Entactin hauptsächlich in mesenchyalem Gewebe (Ekblom *et al.*, 1994) und kann bereits früh während der Mausentwicklung nachgewiesen werden.

Kohfeldt *et al.* konnten 1998 weiterhin zeigen, dass beide Entactine eine ähnliche Verteilung in den Basalmembranen verschiedener Gewebe aufweisen. Eine Abweichung zeigten lediglich Skelett- und Herzmuskulaturfasern, in deren Basalmembranen Entactin-2 nur schwach vertreten war. Entactin-1 zeigte hierbei keine unterschiedliche Verteilung (Kohfeldt *et al.*, 1998). Dies weist auf unterschiedliche Funktionen der beiden Entactine in diesen Geweben hin.

Durch *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass Entactin-1 *knockout* Mäuse subtile neurologische Defekte und strukturelle Abweichungen der Basalmembran aufweisen (Dong *et al.*, 2002), obwohl zuvor weder in Entactin-1 noch in Entactin-2 *knockout* Mäusen offensichtliche Phänotypen nachgewiesen werden konnten (Murshed *et al.*, 2000; Schymeinsky *et al.*, 2002).

Entactin-1 und -2 Doppel-*knockout* Mäuse entwickeln sich bis zur Geburt, sterben jedoch danach an Herz- und Lungendefekten. Dass unterschiedliche Effekte auf verschiedene Organe und Gewebe zu finden waren, lässt auf gewebsspezifisch unterschiedliche Funktionen der Proteine schließen (Bader *et al.*, 2005).

## 1.5 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit gab es Hinweise auf eine Rolle der Entactine bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung: Insbesondere findet man eine starke Anreicherung von Entactinen in den myogenen Regionen der murinen Extremitätenknospen (Godfrey und Gradall, 1998). Auf eine unterschiedliche Funktion der beiden Entactin-Isoformen in der Skelettmuskulatur weist die Tatsache hin, dass Entactin-2 in den Basalmembranen von Skelett- und Herzmuskelfasern nur in sehr geringem Umfang vorhanden ist, wohingegen Entactin-1 keine unterschiedliche Verteilung aufweist (Kohfeldt *et al.*, 1998). Schließlich konnte unsere Arbeitsgruppe vor Beginn dieser Arbeit zeigen, dass die Expression der beiden Entactin-Isoformen während des Muskelzellendifferenzierungsprozesses gegenläufig reguliert wird: die Expression des *entactin-1*-Gens wird reprimiert, während die des *entactin-2*-Gens stark induziert wird (Munz und Blau, unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Ergebnisse weisen auf eine wichtige aber unterschiedliche Funktion beider Entactin-Isoformen in der Skelettmuskulatur und bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung hin.

Weiterhin konnte unsere Arbeitsgruppe mittels *Northern* Blot zeigen, dass das Expressionsniveau des *entactin-2*-Gens ungefähr 24 Stunden nach Induktion der Differenzierung den Maximalwert (ungefähr 10 mal höher als in proliferierenden Zellen) erreicht, um nach 48-72 Stunden wieder den

Basalwert zu erreichen. Die Expression des *entactin-1*-Gens hingegen sinkt kontinuierlich ab. Ungefähr 72-96 Stunden nach der Induktion der Differenzierung ist kaum mehr Entactin-1 nachzuweisen.

Allerdings ist die absolute Expression des *entactin-1*-Gens in proliferierenden Zellen um ein Vielfaches höher als die des *entactin-2*-Gens.

Auf Proteinebene konnte mittels *Western* Blot mit entsprechender zeitlicher Verzögerung Ähnliches festgestellt werden.

Zudem konnte gezeigt werden, dass das *ent-2*-Gen ein *primary response*-Gen ist, was bedeutet dass keine Neusynthese von Proteinen erforderlich ist, um die Induktion herbeizuführen.

Ebenfalls gezeigt werden konnte, dass durch Hemmung der p38 MAP Kinase, welcher eine Schlüsselrolle bei der Myoblastendifferenzierung zukommt, die Induktion der *entactin-2*-Expression nicht gehemmt wurde. Das lässt auf andere, p38-unabhängige, Signaltransduktionswege schließen (Munz und Blau, unveröffentlichte Ergebnisse).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun der Frage nachgegangen werden, welche Funktion die beiden Entactin-Proteine bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung haben. Dabei sollten zum einen Muskelzelllinien untersucht werden, die die beiden *entactin*-Gene überexprimieren, zum anderen sollte die *entactin*-Expression in Skelettmuskelzellen mittels spezifischer siRNAs gehemmt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose MP	Roche, Mannheim
Ampicillin	Sigma, Steinheim
Blocking Reagent	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
CDP-Star	Roche, Mannheim
Chamberslides	Nunc, Wiesbaden
Chromatographiepapier (3MM)	Whatman, Maidstone, GB
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
ECL-Detektionsreagenzien	Amersham, Braunschweig
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth, Karlsruhe
Falcon Einmalpipetten (5ml, 10ml, 15ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom, Berlin
first strand buffer, 5x	Roche, Mannheim
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glutamin	Biochrom, Berlin
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hybond-N-Membran	Amersham, Braunschweig
Hybond-P-Membran	Amersham, Braunschweig
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kryo-Röhrchen	TPP, Schweiz
Ligationspuffer, 10x	Roche, Mannheim
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Merck, Darmstadt
MOPS	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

N-Lauroylsarcosine	Sigma, Steinheim
Oligo d(T) <sub>15</sub> -Primer	Promega, Madison, U.S.A.
PCR-Puffer, 10x	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenol	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Polaroid-Filme	Polaroid, St. Albans, UK
Röhrchen, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Roti-Mark Prestained	Roth, Karlsruhe
SDS/Natriumlaurylsulfat	Roth, Karlsruhe
Trichlormethan (Chloroform)	Roth, Karlsruhe
Tris-Hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween20	Roth, Karlsruhe
Ultra Pure Water	Biochrom, Berlin
5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid (X-Gal)	Roche, Mannheim
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen	TPP, Schweiz
Zellkultur-Testplatten	TPP, Schweiz

## 2.1.2 Enzyme

Restriktionsenzyme + Puffer	Roche, Mannheim
Reverse Transkriptase	Roche, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim

## 2.1.3 Antikörper

anti-Aktin, aus Kaninchen	Sigma-Aldrich, München
anti-α Tubulin, aus Maus	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-Caveolin-3, aus Maus	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-Digoxigenin-AP	Roche, Mannheim
anti-Ki67, Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-RIP2, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Esel-anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-gekoppelt (ECL)	Amersham, Braunschweig
Schaf-anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt (ECL)	Amersham, Braunschweig

Kaninchen-anti-Ziege IgG, Peroxidase-gekoppelt Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA  
(ECL)

## 2.1.4 Oligodesoxynukleotide

### Primer zu Klonierung von Entactin 1

Entactin-1, Maus (Durkin *et al.*, 1988)

zur Klonierung eines 501bp-Fragmentes

Ent-1(5'): 5'-CG GGATCC GCAAGCTGGT CCTGAAGCAG-3'

Ent-1(3'): 5'-CG GAATTC TAGCAAGTCT GCCCGTCTCC-3'

## 2.1.5 Plasmide

pSPORT1-Entactin-1, verified partial clone rzpd, Berlin

pYX-Asc-Entactin-2, full length clone rzpd, Berlin

pME18S-FL3-MyoD1, EST Clone (sequence-verified) rzpd, Berlin

pBluescript LION-p21, EST Clone (sequence-verified) rzpd, Berlin

pBluescript LION-Myogenin, verified partial clone rzpd, Berlin

### 2.1.5.1 Vektoren

pBluescript SKII(-) (Transkriptionsvektor) Stratagene, Heidelberg

## 2.1.6 „Kits“

BCA\* Proteinbestimmungssystem Pierce, Rockford, Illinois, USA

5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit Roche, Mannheim

Kit

DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) Roche, Mannheim

QIAGEN Plasmid Maxi/Midi Kits Diagen, Düsseldorf

QIAexII Kit Diagen, Düsseldorf

RNeasy Kit Diagen, Düsseldorf

Silencer ® siRNA Transfection II Kit Ambion Inc., Huntington, UK

## 2.1.7 Bakterienstämme

*E. coli* XL1 Blue Stratagene, Heidelberg

## 2.1.8 Eukaryontische Zelllinien

C2C12	Mäusemyoblasten, Helen Blau, Stanford University
C2C12-ent-1	Mäusemyoblasten, Barbara Munz und Helen Blau, Stanford University
C2C12-ent-1 <i>antisense</i>	Mäusemyoblasten, Barbara Munz und Helen Blau, Stanford University
C2C12-ent-2	Mäusemyoblasten, Barbara Munz und Helen Blau, Stanford University
C2C12-ent-2 <i>antisense</i>	Mäusemyoblasten, Barbara Munz und Helen Blau, Stanford University
C2C12-lacZ	Mäusemyoblasten, Barbara Munz und Helen Blau, Stanford University

## 2.1.9 Standardpuffer und Lösungen

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

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung eukaryontischer Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit Penicillin/Streptomycin (je 100U/ml) sowie 20% Serum vom fötalen Kalb (FKS) kultiviert. Die Anzucht erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>.

Alle Zellen wurden vor Erreichen vollständiger Konfluenz passagiert. Dazu wurden sie nach Abnahme des Kulturmediums mit sterilem PBS gewaschen und durch Zusatz von Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und weiterkultiviert.

#### Trypsin/EDTA:

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

Zur längerfristigen Lagerung wurden eukaryontische Zellen nach dem Passagieren in DMSO-haltigem Einfriermedium aufgenommen, in speziellen Einfriergefäßen (Kryotubes) möglichst langsam (ca. 1°C/min) abgekühlt und in Stickstofftürmen aufbewahrt.

#### Einfriermedium:

DMEM	1x
FKS	10%
DMSO	10%

Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen im 37°C Wasserbad aufgetaut, mit viel DMEM/20% FKS gewaschen und in geeignete Kulturflaschen überführt.

#### *2.2.1.2 Kontrolle transfizierter Zellklone durch G-418-Selektion*

Zuweilen wurden dem Kulturmedium der C2C12-ent-1 Zellen 400µg/ml G-418 zugegeben und die überlebenden Zellen bis zum Einfrieren in G-418-haltigem Medium kultiviert.

#### *2.2.1.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Kammer*

Um die Anzahl von Zellen in einem Kulturgefäß zu bestimmen wurden die Zellen trypsinisiert und das Sediment anschließend in 1ml Zellkulturmedium resuspendiert. Davon wurden 10µl abgenommen und mit 90µl Trypanblau 0,5% versetzt, was eine Verdünnung von 1:10 ergab. Davon wiederum wurden 10µl auf die Zählkammer gegeben und die vier äußeren Eckquadrate, jedes mit einem Volumen von 0,1µl, ausgezählt, der Mittelwert gebildet und dieser Wert dann mit  $0,1\mu\text{l} \cdot 10 \cdot 1000\mu\text{l}$  multipliziert (Volumen des Eckquadrates\*Verdünnung\*Zellsuspensionsvolumen).

#### *2.2.1.4 Transfektion von Silencer siRNA*

Das Kit der Firma Ambion wurde den Angaben des Herstellers folgend angewendet. Es hat sich das Transfektionsreagent siPort *Amine* mit einer Konzentration von 10µl pro Vertiefung einer Zellkulturplatte mit sechs Vertiefungen als günstig erwiesen.

### 2.2.2 Mikrobiologische Methoden

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

*E.coli* Flüssigkulturen in LB-Medium (gegebenenfalls mit Antibiotika versetzt) wurden über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

### LB-Medium:

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

### Antibiotika:

Ampicillin	100µg/ml
------------	----------

*E.coli* Kulturen wurden 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 ca. 50°C abgekühlt, bei Bedarf mit Antibiotika versetzt und in sterile Petrischalen gegossen. Die Platten wurden nach dem Erkalten bei 4°C aufbewahrt.

Waren die Bakterien mit Plasmiden transformiert, die die Möglichkeit des „Blau/Weiß-Screenings“ zur Überprüfung der Klonierungseffizienz boten (z.B. pBluescript SK II (-)), wurden vor dem Ausstreichen der Bakterien zunächst 100µl X-Gal- und 40µl IPTG-Stammlösung pro LB-Ampicillin-Platte ausplattiert.

### X-Gal-Stammlösung:

2% X-Gal (5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktosid) in 100% Dimethylformamid (DMF) (w/v)

### IPTG-Stammlösung:

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

Zur längerfristigen Lagerung von *E.coli* Zellen wurden 2,5ml einer frischen Übernachtskultur mit 0,8ml autoklaviertem

Glycerin (ca.87%ige Stammlösung) versetzt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.2.2.2 Herstellung transformationskompetenter *E.coli* Zellen

Um rekombinante Plasmide zu vermehren, wurden diese in *E.coli* Zellen eingebracht. Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien des Stammes XL1 *blue* wurde eine frische Übernachtskultur 1:100 mit LB-Medium verdünnt und unter Schütteln bei  $37^{\circ}\text{C}$  so lange inkubiert, bis eine Absorption von 0,4 bis 0,5 bei 620nm erreicht war. Nach Zentrifugation (10min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 2500 Upm) wurde das Sediment vorsichtig in einem Viertel des ursprünglichen Volumens an kalter, steriler 0,1M Magnesiumchloridlösung resuspendiert. Nach 30min Inkubation auf Eis wurde wie oben zentrifugiert und das Sediment in einem Fünfzigstel des ursprünglichen Volumens an kalter, steriler 0,1M Calciumchloridlösung resuspendiert. Nach 3-4h Inkubation im Eisbad wurde steriles 87%iges Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 30% zugegeben. Aliquotiert konnten die Zellen dann über mehrere Monate hinweg bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

## 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

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

200 $\mu\text{l}$  transformationskompetenter *E.coli* Zellen (siehe 2.2.2.2) wurden mit einer geeigneten Menge Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz versetzt. Es wurde sofort vorsichtig gemischt und mindestens 30min im Eisbad inkubiert. Nach einem Wärmeschock (90sec bei  $42^{\circ}\text{C}$ ) wurde der Transformationsansatz sofort wieder auf Eis gebracht und nach weiteren 5min mit 600 $\mu\text{l}$  LB-Medium versetzt. Nach 30min Schütteln wurden die Bakterien auf LB-Ampicillin-Platten, die gegebenenfalls vorher mit X-Gal und

IPTG behandelt worden waren (siehe 2.2.2.1),  
ausgestrichen und 16-20h bei 37°C inkubiert.

### 2.2.3.2 *Reinigung von Nukleinsäuren über Phenolextraktion und Ethanolfällung*

Um Nukleinsäuren von entsprechenden Verunreinigungen zu säubern, wurden sie einem Phenol/Chloroformwaschgang unterzogen und anschließend mit Ethanol gefällt.

Dazu wurden die Proben 1:1 mit der unteren Phase des Phenol-Chloroformansatzes versetzt und nach gutem vortexen zur Phasentrennung zentrifugiert (13.000Upm, 1min, RT). Im Folgenden wurden die sich in der wässrigen (oberen) Phase befindlichen Nukleinsäuren mit dem 2,5-fachen Volumen 100%igem Ethanol, sowie dem 0,1-fachen Volumen 3M Natriumacetatlösung bei -80°C während einer halben Stunde gefällt.

Schließlich wurde der Ansatz erneut zentrifugiert (13.000UpM, 15min, RT) und das Sediment, nach einem Waschgang mit 70%igem Ethanol, in einer entsprechenden Menge DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

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

Phenol	4,5 Volumina
Chloroform	4,5 Volumina
1M Tris-HCl pH 9,5	1 Volumen

### 2.2.3.3 *Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren*

Die Konzentration von DNA und RNA in wässriger Lösung wurde durch Absorptionsmessung bei 260nm bestimmt. Die Messungen wurden in Quarzküvetten gegen ddH<sub>2</sub>O als Referenzwert durchgeführt. Das Verhältnis der Absorptionen 260nm zu 280nm wurde als Maßstab für die Reinheit der

Nukleinsäuren herangezogen, wobei im Idealfall Werte zwischen 1,6 und 2,0 erreicht wurden.

#### 2.2.3.4 DNA Präparation

##### 2.2.3.4.1 Plasmid-Schnellpräparation aus 2 ml-Kulturen

Diese Methode diene der schnellen Gewinnung von Plasmid-DNA in kleinen Mengen, vor allem zum analytischen Gebrauch.

Eine 2ml LB-Übernachtskultur wurde zentrifugiert (13.000Upm, 30sec, RT) und anschließend das Sediment in 100µl Puffer P1 (aus dem QIAGEN Plasmid Maxi/Midi Kit von Diagen) resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 100µl Puffer P2, ebenfalls aus o.g. Kit, wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und dann bei RT 5min inkubiert. Es wurden dann 100µl Puffer P3, ebenso aus o.g. Kit, zur Neutralisation hinzugegeben und während einer weiteren fünf-minütigen Inkubation im Eisbad aggregiert die chromosomale DNA mit Proteinen und Lipiden zu einem unlöslichen Präzipitat. Dieser wurde dann auch nach kurzer Zentrifugation (13.000Upm, 5min, 4°C) abgenommen, einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen und die DNA mit 100%igem Ethanol präzipitiert. Die gefällte DNA wurde nach einer weiteren Zentrifugation (13.000Upm, 15min, 4°C) in 100µl wässriger RNase A-Lösung (100µg/µl) aufgenommen. In der Regel wurden davon 10µl für einen Restriktionsverdau eingesetzt.

##### 2.2.3.4.2 Plasmid-Präparation mit dem Qiagen-Plasmidkit

Plasmid-DNA in größeren Mengen wurde aus 100ml einer frischen *E.coli* Übernachtskultur mit Hilfe der *Plasmid Midi* bzw. *Maxi Kits* der Firma Diagen entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert.

## 2.2.3.5 *Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren*

### 2.2.3.5.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,7-2,5%igen Agarosegelen in TAE Puffer. Zur Auftrennung gesamtzellulärer DNA wurden 1%ige Gele verwendet. Standardmäßig wurde 1µg Ethidiumbromid pro ml Gel hinzugegeben.

Die Proben wurden jeweils mit einem geeigneten Volumen Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100V.

Die Gele wurden im UV-Durchlicht betrachtet (256nm) und mit einer Polaroidkamera (Blende 16, 0,5sec; 3000ASA; Rotfilter) fotografiert.

#### Auftragspuffer:

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

### 2.2.3.5.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde standardmäßig das QIAexII-Kit der Firma Diagen nach Angaben des Herstellers verwendet.

## 2.2.3.6 *In vitro Reaktionen an DNA*

### 2.2.3.6.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Arbeit mit den Restriktionsendonukleasen erfolgte den Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) entsprechend. Es wurden 0,5-1 Einheit Restriktionsenzym pro µg DNA eingesetzt.

#### 2.2.3.6.2 Ligation

Im Allgemeinen wurde ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:3 bis 1:4 zwischen Vektor und dem einzufügenden DNA-Fragment gewählt. Das Herstellen des Ansatzes aus Vektor, dem über präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigten DNA-Fragment, sowie 1,5-2µl 10x Ligationspuffer erfolgte auf Eis. Anschließend wurde 1U T4-DNA-Ligase hinzugegeben.

Die Inkubationszeit betrug 2-20h bei RT.

#### 2.2.3.6.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR erfolgte mit einem Volumen von 50µl in speziellen, sterilen Gefäßen in der PCR-Maschine.

##### Ansatz, allgemein:

DNA-Matrize (cDNA)	2µl
10x Puffer	5µl
dNTP-Mix (je 2,5mM)	8µl
5'-Primer (50µM)	1µl
3'-Primer (50µM)	1µl
ddH <sub>2</sub> O	32,8µl
Taq-DNA-Polymerase (1U)	0,2µl

Je nach Konzentration der eingesetzten DNA-Matrize wurden 20 bis 40 Reaktionszyklen durchlaufen. Die Amplifikationszeit richtete sich nach der Länge des zu erwartenden Produktes, wobei davon ausgegangen wurde das pro 1kb zu synthetisierender DNA ungefähr eine Minute benötigt wird.

Denaturierung	4min	95°C
„Annealing“ der Primer	2min	40-60°C
Polymerisation	0,5-3min	72°C

## 2.2.3.7 RNA-Techniken

### 2.2.3.7.1 Allgemeine Richtlinien für das Arbeiten mit RNA

Beim Arbeiten mit RNA wurden sterile Plastik- oder gebackene Glasgefäße (200°C, 8h) verwendet. Alle Lösungen wurden durch Zusatz von Diethylpyrocarbonat (DEPC) von RNasen befreit. Die Lösungen wurden dazu mit 0,1% (v/v) DEPC versetzt, mindestens 16h bei RT inkubiert und anschließend, um das DEPC zu entfernen, autoklaviert. Tris-haltige Lösungen wurden in gebackenen Gefäßen mit DEPC-Wasser hergestellt.

### 2.2.3.7.2 Isolierung gesamtzellulärer RNA

Die Isolierung der RNA wurde anhand des Qiagen RNeasy Kits der Firma Qiagen durchgeführt und anschließend die Konzentration im Photometer (siehe 2.2.3.3) gemessen.

### 2.2.3.7.3 Northern Blot

0,5-8µg gesamtzelluläre RNA wurden mit 10-15µl Ladepuffer und eventuell mit einer entsprechenden Menge DEPC-Wasser, um ein einheitliches Probenvolumen zu erlangen, versetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 1min im Heizblock auf 85°C erhitzt.

Es wurde ein 1%iges, vertikales Agarosegel mit 1x MOPS als Laufpuffer verwendet und die Elektrophorese dann bei 100-150V (40mA) für 1-2h durchgeführt.

Anschließend wurde das Gel mit 20x SSC angefeuchtet und über Nacht mittels des Kapillarblotverfahrens auf eine Nylonmembran (N-Hybrid) transferiert, welche vorher mit DEPC und 20x SSC benetzt worden ist. Als Puffer wurde 20x SSC verwendet, sowie Chromatographie-Papiere in geeigneter Menge um die Kapillarwirkung aufrecht zu erhalten.

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran einige Minuten in 2x SSC gewaschen und danach durch 3min UV-Bestrahlung bei 120mJ die RNA auf der Membran fixiert.

Das Anfärben der RNA erfolgte durch 1-2min Schwenken in Methylblau-Färbelösung. Im Folgenden wurde die Membran mit DEPC-Wasser entfärbt und die 18S- sowie die 28S-RNA-Bande markiert um später die Größe der mRNA abschätzen zu können.

Die Vorhybridisierung wurde für 1h bei 68°C im Wasserbad, unter Schütteln, mit Hybridisationslösung durchgeführt.

Die Hybridisierung erfolgte dann im gleichen Puffer, welcher zusätzlich die entsprechende Sonde enthielt. Diese wurde vorher in 100µl Hybridisationslösung im Heizblock 10min auf 68°C erhitzt. Die Hybridisierung fand über Nacht und ebenfalls bei 68°C im Wasserbad statt.

Im Anschluss erfolgten verschiedene Wasch-Schritte. Zuerst wurde die Membran bei RT 3x 5min auf dem Schüttler mit Waschlösung Nr.1 gewaschen, dann 2x 20min erneut im Wasserbad bei 68°C in Waschlösung Nr.2. Anschließend wurde bei RT für 5 min auf dem Schüttler in Puffer 1 gewaschen und dann für 1h, ebenfalls bei RT und auf dem Schüttler, in Blockingpuffer 1%. Diesem wurde dann Anti-Digoxigenin-AP in 1:15000 Verdünnung zugegeben. Letztendlich wurde die Membran dann noch 1x 5min, 2x 15min in Puffer 1 plus 0,3% Tween 20 sowie 1x 5min in Puffer 3 gewaschen.

Zum Entwickeln wurde die Membran dann in Folie eingeschlagen und 5min mit Puffer 3 plus 1:100 CDP-Star inkubiert.

Abschließend konnte ein Film aufgelegt werden.

Als Kontrolle für gleichmäßige Beladung der Spuren wurde eine Hybridisierung mit einer gegen die für das ribosomale Protein rpl32 kodierende mRNA verwendet oder das Signal auf die Methylenblaufärbung normiert

1%iges Agarose Gel (100ml):

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

Ladepuffer (15ml):

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

RNA-Hybridisationslösung (50ml):

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

Waschlösung Nr.1:

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

Waschlösung Nr.2:

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

Puffer 1 (1l):

Maleinsäure	11,6g
NaCl	8,75g
NaOH	auf pH 7,5 einstellen
DEPC-H <sub>2</sub> O	auf 1 Liter auffüllen

Puffer 3 (50ml), immer frisch angesetzt:

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

2.2.3.7.4 Umschreiben von RNA in cDNA mittels reverser Transkription

5µg RNA wurden in 7µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst, mit 0,5µl Oligo d(T)<sub>15</sub>-Primer (=0,5µg) gemischt, 10min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gebracht.

Nach Zugabe des RT-Mixes wurde der Ansatz 60min bei 37°C inkubiert und danach 5min auf 95°C erhitzt.

RT-Mix:

5xPuffer (first strand buffer)	4µl
RNAse Inhibitor	1µl
dNTP-Mix (je 2,5mM)	4µl
Reverse Transkriptase (200U)	0,5µl

## 2.2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.2.4.4 *Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Zellen*

Nach Abnahme des Mediums und zweimaligem Waschen mit PBS wurde das Zellsediment in 100-200µl Lysispuffer mit Protease Inhibitor resuspendiert.

Anschließend wurde die Lösung einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Danach wurden die restlichen Zelltrümmer bei 4°C 1min herunterzentrifugiert, der Überstand abgenommen und davon 1µl zur Proteinkonzentrationsbestimmung weiterverwendet.

### 2.2.4.5 *Bestimmung von Proteinkonzentrationen*

Zur Konzentrationsbestimmung wurde mit dem Kit BCA\* Protein der Firma Pierce gearbeitet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Die Absorbtion wurde im Photometer bei 562nm gemessen.

### 2.2.4.6 *Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Es wurde mit dem Puffersystem nach Laemmli (1970; Glycin als Zwitterion) gearbeitet, wobei die Elektrophorese in vertikaler Richtung in Gelen von ca. 1,5mm Dicke erfolgte. Die Gele bestanden aus einem jeweils ca. 1,5cm breitem Sammelgel, sowie einem sich daran anschließenden ca. 5cm breitem Trenngel.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit einem geeigneten Volumen Proben-Auftragspuffer (5x konz.) versetzt, anschließend 5min im Heizblock auf 95°C erhitzt und unmittelbar danach auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei maximal 35mA bis die Lauffront das Gelende erreicht hatte (ungefähr 1 bis 1,5h).

### Zusammensetzung des Trenngels:

<b>Acrylamid Konzentration</b>	<b>7,5%</b>	<b>10%</b>	<b>15%</b>
Acrylamid-Bisacrylamid (30:0,8)	10ml	13,3ml	20ml
1M Tris-HCl pH 8,8	15ml	15ml	15ml
10% (w/v) SDS	0,4ml	0,4ml	0,4ml
87% (v/v) Glycerin	4,5ml	4,5ml	4,5ml
H <sub>2</sub> O	10ml	6,7ml	-
10% (w/v) APS	0,4ml	0,4ml	0,4ml
TEMED	20µl	20µl	20µl

### Zusammensetzung des Sammelgels:

Acrylamid-Bisacrylamid (30:0,8)	5,0ml
1M Tris-HCl pH 6,8	3,75ml
10% (w/v) SDS	0,3ml
H <sub>2</sub> O	20,7ml
10% (w/v) APS	0,3ml
TEMED	20µl

### Proben-Auftragspuffer (5x konz.):

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

### SDS-PAGE-Laufpuffer:

Tris	25mM
Glycin	192mM
SDS	0,1%

## 2.2.4.7 Immunologische Methoden

### 2.2.4.7.1 Western Blot

Dies ist eine Methode, die dem Nachweis von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen mit Hilfe von Antikörpern dient. Zunächst wurden die Proteine elektrisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert („geblottet“). Anschließend wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit einer hochkonzentrierten Proteinlösung und dann mit dem ersten Antikörper, welcher das nachzuweisende Protein erkennt, inkubiert. Die Detektion erfolgte dann mit Hilfe eines an ein spezifisches Enzym gekoppelten zweiten Antikörpers, welcher eine geeignete Nachweisreaktion katalysiert.

#### Transfer:

Auf die Anode der Blotapparatur wurden zuerst sechs Lagen in Anodenpuffer 1 (300mM Tris; 20% Ethanol) sowie vier Lagen in Anodenpuffer 2 (25mM Tris; 20% Methanol) getränkte Chromatographiepapiere gelegt. Daran schlossen sich die in Anodenpuffer 2 getränkte Nitrozellulosemembran (Hybond P), das Trenngel sowie sechs Lagen in Kathodenpuffer (25mM Tris; 20% Methanol; 40mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure) getränkten Chromatographiepapiers an, wodurch die Verbindung zur Kathode hergestellt wurde. Es wurde mit einer Stromstärke von 1mA/cm<sup>2</sup> geblottet.

#### Inkubation mit den Antikörpern:

Alle Inkubationschritte erfolgten unter leichtem Schwenken bei RT.

Absättigung	3% Milchpulver in TBS-T; 0,5h
1. Antikörper	geeignete Verdünnung in 3% Milchpulver/TBS-T; 1h

Waschen	3x5min in TBS-T		
2. Antikörper	geeignete Verdünnung	in	3%
	Milchpulver/TBS-T; 30-60min		
Waschen	3x5min		
TBS-T	0,15M		NaCl
	10mM		Tris-HCl pH 8,0
	0,05% (v/v)		Tween 20

Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren wurde die Inkubation mit einem  $\alpha$ -Tubulin Antikörper verwendet.

#### Entwicklung:

ECL: Die Antikörper-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol (3-Aminophthalhydrazid) durch Wasserstoffperoxid, wodurch 3-Aminophthalsäure und Stickstoff entstehen. Bei dieser Reaktion wird Energie in Form von Licht (425nm) freigesetzt, wodurch eine Detektion anhand der Schwärzung auf dem Röntgenfilm möglich ist. Es wurde ein entsprechender Kit der Firma Amersham verwendet.

#### 2.2.4.7.2 5-Bromo-2'-deoxy-uridin Markierung

Zur Proliferationsbestimmung wurde ein Kit der Firma Roche verwendet, mit dessen Hilfe die zu untersuchenden Zellen während der Replikation BrdU anstelle von Thymidin in ihr Genom einbauen.

Proliferierende Zellen konnten nun einfach über einen monoklonalen Antikörper gegen BrdU und einem sekundären, mit Fluorochrom konjugiertem Antikörper mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes visualisiert werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen an C2C12-Zelllinien, die das *entactin-1* bzw. das *entactin-2*-Gen überexprimieren

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von C2C12-Zelllinien, welche die *entactin*-Gene überexprimieren, untersucht werden.

Dazu wurde die murine Myoblasten-Zelllinie C2C12 verwendet.

Die Induktion der Differenzierung bei C2C12-Zellen erfolgt generell durch Zugabe von Medium mit zwei-prozentigem Pferdeserum. Der Ablauf der Differenzierung bei diesen Zellen gleicht mechanistisch sehr stark der Muskeldifferenzierung während der Embryonalzeit. Daher stellt diese Zelllinie ein gutes *in vitro* Untersuchungssystem zur Muskeldifferenzierung dar und wurde aus diesem Grunde für die vorliegende Arbeit verwendet.

##### 3.1.1 Analyse der Expression von rekombinantem und endogenen *entactin-1* und *-2* in den Zelllinien

Zu Beginn dieser Arbeit wurden zunächst verschiedene Zelllinien in Kultur genommen, welche sich durch die Überexpression von *entactin-1* und *entactin-2* in *sense*- und *antisense*-Orientierung auszeichneten. In *sense*-Orientierung bedeutet dabei, dass die Zellen das Gen in der ursprünglichen Ableserichtung überexprimieren, während es bei *antisense*-Orientierung entgegen der ursprünglichen Ableserichtung exprimiert wird. Die *antisense*-RNA bindet an die bereits in der Zelle vorhandene mRNA, wodurch doppelsträngige RNA entsteht. Diese wird in der Zelle abgebaut, was letztlich zu einer geringeren Proteinmenge führt.

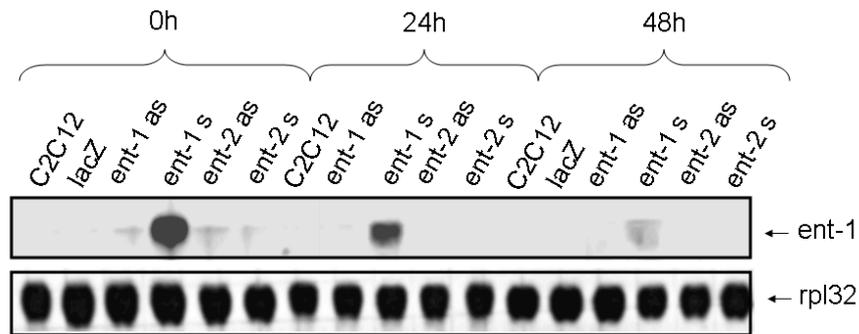
Diese Zelllinien waren bereits vor Beginn dieser Arbeit mittels Transduktion mit geeigneten retroviralen Vektoren hergestellt worden (Munz und Blau, unveröffentlichte Ergebnisse), jedoch nicht genauer charakterisiert worden. Als Kontrollen diente die Zelllinie C2C12 selbst, sowie C2C12-Zellen, die das *lacZ*-Gen, welches für die bakterielle  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, überexprimieren.

Aus Zellen in Proliferationsmedium (null Stunden) bzw. 24 und 48 Stunden nach Induktion der Differenzierung wurde die gesamtzelluläre RNA extrahiert.

Die extrahierte RNA wurde dann mittels eines Agarose-Gels aufgetrennt und anschließend anhand des *Northern Blot*-Verfahrens auf eine entsprechende Membran transferiert und mit spezifischen *antisense* RNA-Sonden hybridisiert.

Letztere wurden hergestellt, indem die gewünschte Sequenz mittels Standard-Klonierungstechniken in einen geeigneten Transkriptionsvektor eingefügt wurde. Nach Linearisierung diente dieses Konstrukt dann als Matritze für die Transkription in *antisense*-Orientierung durch eine geeignete RNA-Polymerase.

Falls nicht anders vermerkt, wurden bei allen hier beschriebenen Genexpressionsanalysen mindestens zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse.



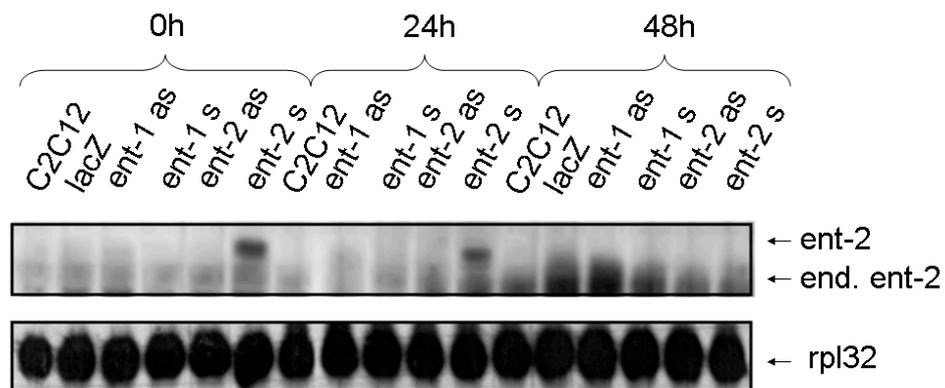
**Abb. 4.: Untersuchung der Expressionskinetik des *entactin-1*-Gens mit Hilfe einer *Northern Blot*-Analyse.** Es wurden jeweils 8 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer entsprechenden *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-1* hybridisiert. Zu sehen ist hier das rekombinante Transkript mit einer Größe von 7 kb. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung der Spuren diente die Hybridisierung mit einer Sonde gegen die mRNA des ribosomalen Proteins rpl32. Man beachte das Abnehmen der Expression des rekombinanten *entactin-1* im Verlauf der Differenzierung.

Zuerst wurde die Expression des *entactin-1*-Gens im Verlauf der Differenzierungskinetik betrachtet (siehe Abbildung 4). Die Abbildung zeigt in diesem Falle nur das Signal, das dem rekombinanten *entactin-1* entspricht, da das endogene *entactin-1* viel schwächer exprimiert ist und auf Grund der kurzen Expositionsdauer des Films nicht zu sehen war.

Das rekombinante Transkript ist etwas größer als das endogene, sieben gegenüber sechs Kilobasen, da es noch den *IRES (internal ribosome entry site) -lacZ*-Anteil aus dem retroviralen Vektorkonstrukt enthält. Daher können die beiden Transkripte bei der *Northern Blot*-Analyse unterschieden werden.

Bei längerer Expositionszeit des Films konnte aber auch das endogene *entactin-1* Transkript nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), wobei auffiel, dass die Expression der rekombinanten Form keinen Einfluss auf die der endogenen Variante hatte.

Eine besonders starke Expression des rekombinanten *entactin-1* konnte bei den Zellen beobachtet werden, die das Gen in *sense*-Orientierung überexprimieren (siehe Abbildung 1: ent-1 s 0h, ent-1 s 24h und ent-1 s 48h). Auffällig war, dass das Expressionsniveau des *entactin-1*-Gens im Verlauf der Kinetik abnahm. Zu Beginn des Versuchs, also unter Proliferationsbedingungen, war noch eine sehr hohe Expression des Gens zu beobachten. 24 Stunden nach Induktion der Differenzierung wurde das Signal jedoch schon deutlich schwächer und nach weiteren 24 Stunden (48 h-Werte) in Differenzierungsmedium war kaum noch ein Signal zu detektieren. Bei allen anderen Zelllinien war wie erwartet keine Expression von rekombinantem *entactin-1* zu erkennen.



**Abb. 5: Untersuchung der Expressionskinetik des *entactin-2*-Gens mit Hilfe einer Northern Blot-Analyse.** Es wurden jeweils 8 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-2* hybridisiert. Die mRNA von Entactin-2 hat eine Größe von 5,5 kb, hier als untere Bande zu erkennen. Das rekombinante Transkript ist etwas größer (obere Bande). Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung der Spuren diente die Hybridisierung mit einer Sonde gegen die mRNA des ribosomalen Proteins rpl32. Man beachte die Induktion des endogenen *entactin-2* unter Differenzierungsbedingungen.

Des Weiteren wurde das Expressionsmuster des *entactin-2*-Gens bei dieser Differenzierungskinetik untersucht (siehe Abbildung 5). Wie erwartet konnte eine starke Expression von rekombinantem *entactin-2* bei den Zelllinien detektiert werden, die das *entactin-2*-Gen in *sense* Richtung überexprimieren. Es war allerdings, wie bei den das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Zellen, deutlich ein Nachlassen der Expression im Verlauf der Differenzierung zu sehen. Während zu Beginn des Versuchs noch eine relativ starke Expression zu beobachten war, nahm diese bis zum 48 Stunden-Wert hin so stark ab, dass kein Signal mehr zu sehen war.

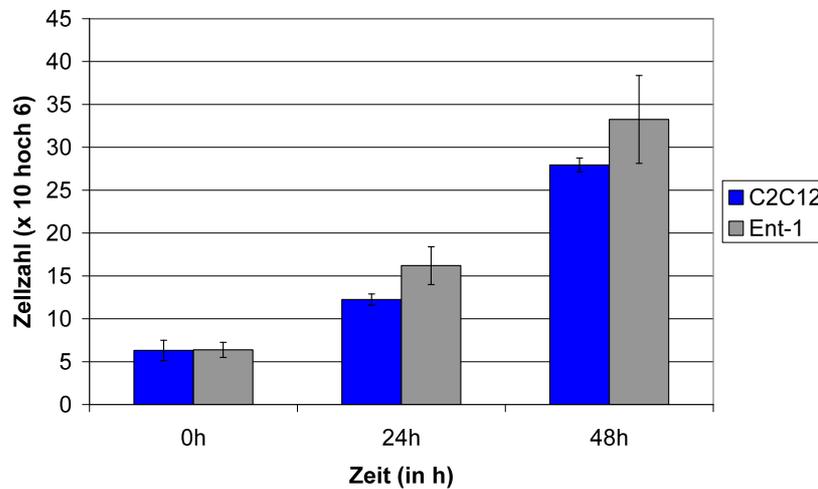
Das endogene *entactin-2*-Signal war jedoch in allen Zellen zu detektieren. Hierbei war aber, im Gegensatz zu dem rekombinanten Transkript, schon 24 Stunden nach Serumentzug eine deutliche Induktion der Expression zu erkennen. Weitere 24 Stunden später war die Expression noch höher.

Nach mehrmaligem Passagieren der Zellen stellte sich heraus, dass die *entactin-2*-überexprimierenden Zellen in Proliferationsmedium durch ein rasches Nachlassen der Expression des rekombinanten *entactin-2* charakterisiert sind. Daher können sie nicht lange in Kultur gehalten werden. Im Folgenden wurde deshalb nur mit den das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Zellen weitergearbeitet.

### 3.1.2 Ergebnisse der Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer

Bei der Routine-Kultur der das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Myoblasten fiel bereits auf, dass diese durch eine schnellere Vermehrung der Zellzahl im Vergleich zu Kontroll-Myoblasten charakterisiert waren. Um dies genauer zu quantifizieren, wurden *entactin-1 sense*- und C2C12-Zellen in der gleichen Dichte ausgesät. Nach 24 und

48 Stunden Kultur in Proliferationsmedium wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt.



**Abb. 6: Diagramm zur Darstellung der Zellzahl.** Es wurden *entactin-1* überexprimierende und C2C12-Zellen in gleicher Dichte ausgesät (0h) und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer nach 24 und 48 Stunden ausgezählt.

Mit Hilfe der Zellzahlbestimmung konnten, im Vergleich mit den C2C12 Zellen, sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden in Kultur erhöhte Zellzahlen bei den das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden, wie Abbildung 6 zeigt.

### 3.1.3 Ergebnisse des BrdU-Labelings

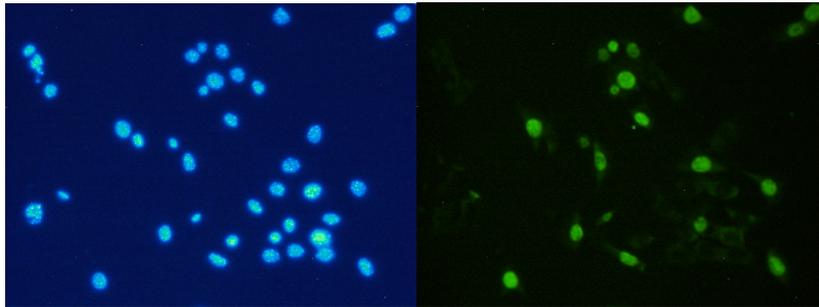
Die Bestimmung absoluter Zellzahlen ließ jedoch keine Rückschlüsse darauf zu, ob bei den *entactin-1* überexprimierenden Zellen eine erhöhte Proliferationsrate vorlag, da auch andere Faktoren wie Zelltod in Form von Nekrose oder Apoptose auf die absolute Zellzahl Einfluss nehmen können.

Daher wurden die entsprechenden Zelllinien auf *chamber slides* ausgesät und mit dem *BrdU labeling kit* behandelt.

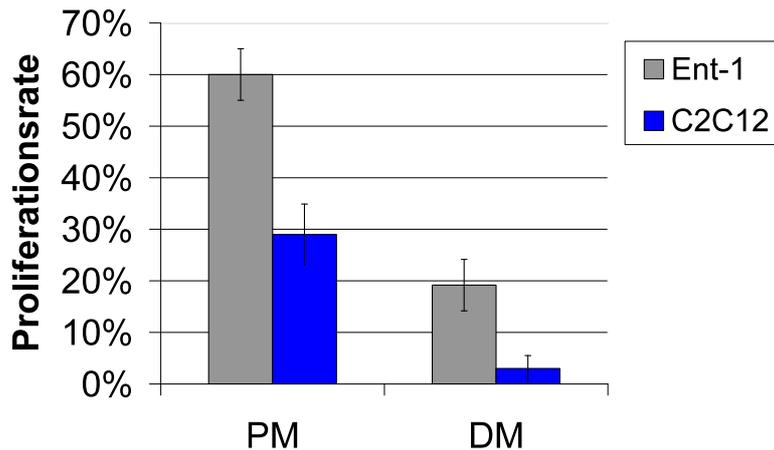
Bei dieser Methode werden die Zellen während eines definierten Zeitraums mit dem Thymidinanalogon 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin behandelt. Die Zellen bauen dieses Analogon dann anstelle von Thymidin in ihr Genom ein. Zellen, die BrdU in ihre DNA eingebaut haben, können mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen BrdU und einem Fluorchrom-konjugiertem sekundärem Antikörper im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Zudem wurden alle Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt, um im Nachhinein eine Unterscheidung zwischen proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen treffen zu können.

Der Versuch wurde sowohl unter Proliferations- als auch unter Differenzierungsbedingungen durchgeführt.



**Abb. 7: Beispielhafte Darstellung proliferierender, *entactin-1* überexprimierender Zellen.** Es wurden Zellen mit dem *BrdU labeling kit* behandelt und gleichzeitig mit DAPI gefärbt. Links sieht man die DAPI-Färbung, in der alle Zellkerne sichtbar sind. Rechts sind von diesen Zellen diejenigen zu sehen, die sich während der Markierungszeit geteilt haben.



**Abb. 8: Diagramm des Proliferationsverhaltens der *entactin-1*-überexprimierenden Zellen im Vergleich mit Kontroll-C2C12-Zellen.** *entactin-1*- und C2C12-Zellen wurden mit Hilfe des *BrdU labeling kits* auf ihr Proliferationsverhalten in Proliferationsmedium (links) sowie Differenzierungsmedium (rechts) hin untersucht. Man beachte die gesteigerte Proliferationsrate bei den das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Zellen gegenüber den Kontrollmyoblasten.

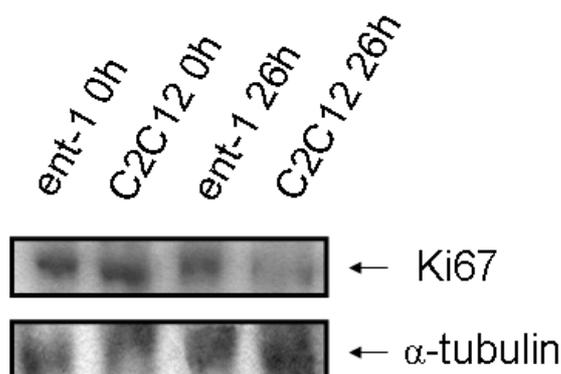
Zur Auswertung wurden jeweils fünf repräsentative Gesichtsfelder mit einer ähnlichen Anzahl an DAPI-gefärbten Zellkernen unter dem Mikroskop ausgezählt. Anschließend wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops im gleichen Gesichtsfeld diejenigen Zellen ausgezählt, die das BrdU in ihr Genom eingebaut hatten. Aus den Daten wurde dann die Proliferationsrate errechnet. Wie man mit Hilfe des Diagramms (Abbildung 8) sehen kann, war ein deutlicher Unterschied zwischen den das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Zellen und den C2C12 Zellen zu sehen. Sowohl unter Proliferations- als auch unter Differenzierungsbedingungen wiesen die das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Zellen eine offensichtlich höhere Proliferationsrate auf als die C2C12-Zellen. Dies weist darauf hin, dass Entactin-1 die Proliferationsrate von Myoblasten modulieren kann.

### 3.1.4 Untersuchung der Expression von Genen, die mit der Regulation von Proliferationsvorgängen assoziiert sind

#### 3.1.4.1 Expression von Ki67

Um das Proliferationsverhalten der das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Myoblasten genauer zu untersuchen, wurde die Expression des im Zellkern lokalisierten Proliferationsmarkers Ki67 betrachtet. Ki67 zeigt während der Myoblastendifferenzierung einen Rückgang seiner Genexpression (Tomczak *et al.*, 2003).

Dazu wurde bei den C2C12 und den *entactin-1*-überexprimierenden Zellen die Differenzierung induziert. Unter Proliferationsbedingungen (null Stunden) sowie nach 26 Stunden wurde dann gesamtzelluläres Protein extrahiert. Dieses wurde anschließend mittels eines SDS-Polyacrylamidgels der Größe nach aufgetrennt. Da Ki67 ein Molekulargewicht von 395 bzw. 345 Kilodalton besitzt, wurde ein 7,5-prozentiges Gel verwendet. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und Ki67 mit einem spezifischen Antikörper detektiert.



**Abb. 9: Western Blot-Analyse der Expression des Proliferationsmarkers Ki67 in einer Differenzierungskinetik.** Ki67 besitzt ein Molekulargewicht von 395 / 345 kDa. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung der Spuren diente die Inkubation desselben

Filters mit einem gegen das Strukturprotein  $\alpha$ -Tubulin gerichteten Antikörper. Man beachte die geringere Ki67 Menge bei den C2C12-Zellen nach Differenzierungsinduktion.

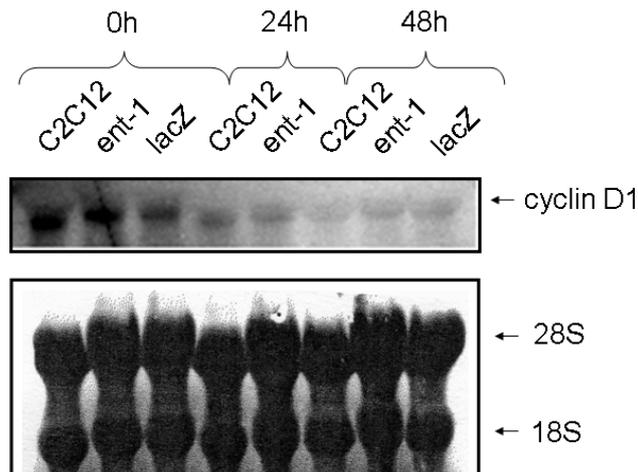
Unter Proliferationsbedingungen konnten, wie man in Abbildung 9 sieht, keine Unterschiede bezüglich der Proteinmenge von Ki67 zwischen den C2C12- bzw. den *entactin-1*-Zellen gefunden werden. 26 Stunden nach Serumentzug konnte jedoch eine unterschiedliche Ki67 Expression festgestellt werden. Die C2C12-Zellen zeigten den erwarteten Rückgang der Expression. Die das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Zellen wiesen dagegen unter Differenzierungsbedingungen eine ähnlich hohe Ki67 Expression wie unter Proliferationsbedingungen auf.

#### 3.1.4.2 Untersuchung der Expression von Cyclin D1 auf RNA-Ebene

Als weiterer Proliferationsmarker wurde Cyclin D1, ein Zellzyklusprotein, untersucht. Cyclin D1 aktiviert zwei Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk's) in der G1-Phase des Zellzyklus (Alberts *et al.* 2004).

Dazu wurde aus den verschiedenen Zelllinien unter Proliferationsbedingungen (null Stunden) und nach Induktion der Differenzierung gesamtzelluläre RNA extrahiert und mittels *Northern Blot* analysiert.

Die Cyclin D1-RNA-Sonde wurde dabei durch Klonierung eines geeigneten Fragments in einem Transkriptionsvektor im Verlauf dieser Arbeit hergestellt.



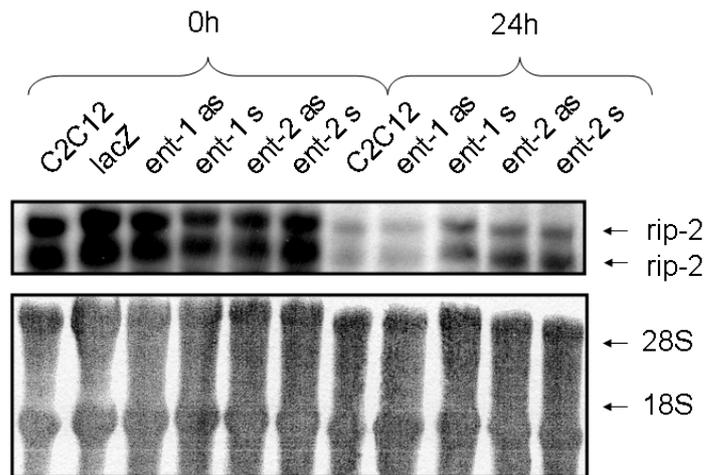
**Abb. 10: Northern Blot-Analyse der Expression von Cyclin D1 in einer Differenzierungskinetik.** Bei den C2C12-Zellen sowie bei *entactin-1*- und *lacZ*-überexprimierenden Myoblasten wurde die Differenzierung induziert. Es wurden jeweils 8 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen Cyclin D1 hybridisiert. Die mRNA von Cyclin D1 besitzt eine Größe von 1,8 kb. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung der Spuren diente die Methyleneblau-Färbung. Man beachte die Abnahme der Expression im Verlauf der Differenzierung.

Wie Abbildung 10 zeigt, wurde bei allen Zelllinien das erwartete Nachlassen der *cyclin D1*-Genexpression im Verlauf der Differenzierung beobachtet (Tomczak *et al.* 2003). Zwischen den C2C12, den *lacZ*- und den *entactin-1*-Zellen waren aber weder unter Proliferationsbedingungen noch nach Induktion der Differenzierung Unterschiede bezüglich der Expression des *cyclin D1*-Gens festzustellen.

### 3.1.4.3 Untersuchung der Expression des *rip-2*-Gens

RIP-2 (*receptor interacting protein-2*) ist ein intrazelluläres Protein, dessen Expression während der Myoblastendifferenzierung abnimmt. Zellen, die das *rip-2*-Gen überexprimieren können auch durch Zugabe von serumarmem Medium nicht zur Differenzierung gebracht werden, sondern proliferieren weiter (Munz *et al.*, 2002).

Es wurde bei verschiedenen Zelllinien unter Proliferationsbedingungen (null Stunden) und nach Induktion der Differenzierung (24 Stunden) RNA extrahiert und der Northern Blot mit einer *rip-2* spezifischen RNA-Sonde hybridisiert.



**Abb. 11: Northern Blot-Analyse der *rip-2*-Genexpression.** Es wurde bei den verschiedenen Zelllinien die Differenzierung induziert und RNA extrahiert. Es wurden jeweils 8 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *rip-2 antisense*-RNA-Sonde hybridisiert. *rip-2* ist im Northern Blot als eine Doppelbande in Höhe von 2 und 2,2 kb zu detektieren. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung der Spuren diente die Methylenblau-Färbung.

Zu Beginn des Versuchs, also unter Proliferationsbedingungen, waren zwischen den verschiedenen Zelllinien keine Unterschiede bezüglich der *rip-2*-Genexpression zu erkennen, wie Abbildung 11 zeigt. Wie erwartet war nach Induktion der Differenzierung (24 Stunden) bei allen Zelllinien, sowie den Kontroll-Myoblasten eine deutlich niedrigere *rip-2*-Genexpression als unter Proliferationsbedingungen zu sehen. Generell war die Expression des *rip-2*-Gens in den das *entactin-1*-Gen in *sense*- sowie den das *entactin-2*-Gen in *sense*- und *antisense*-Orientierung überexprimierenden Zellen nicht so stark ausgeprägt wie in den Kontrollmyoblasten und den das

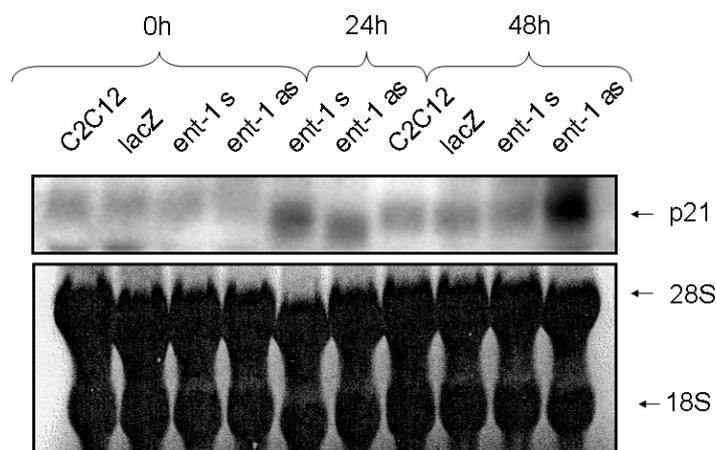
*entactin-1*-Gen in *antisense*-Orientierung überexprimierenden Zellen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass *entactin*-Gene die Expression des *rip-2*-Gens modulieren können.

#### 3.1.4.4 Untersuchung der Expression des p21-Gens auf RNA- und Proteinebene

Zunächst wurde die Expression des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor (CDK-Inhibitor) p21 auf RNA- sowie Protein-Ebene betrachtet. Dessen Genexpression steigt in C2C12-Myoblasten 24 Stunden nach Induktion der Differenzierung steil an (Moran *et al.* 2002).

Dazu wurden wiederum aus verschiedenen Zelllinien RNA und Proteine extrahiert, und die Expression von *p21* mittels *Northern* bzw. *Western Blot* untersucht. P21 besitzt ein Molekulargewicht von 21 Kilodalton, weshalb in diesem Fall mit einem 15-prozentigen Gel gearbeitet wurde.

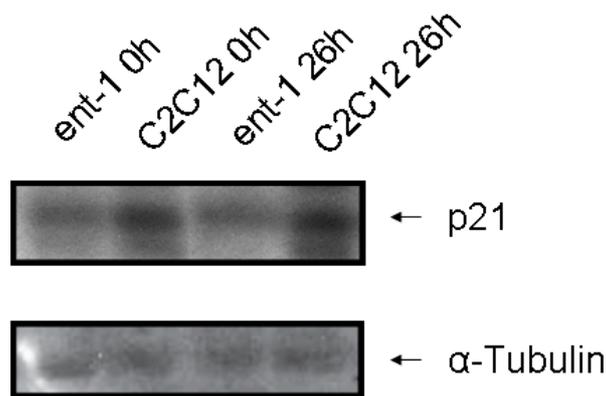
Die *antisense*-RNA-Sonde wurde, wie die vorherigen Sonden ebenfalls, auf der Basis geeigneter Plasmide hergestellt, welche im Verlauf dieser Arbeit mittels Standard-Klonierungstechniken hergestellt worden waren.



**Abb. 12: Northern Blot-Analyse der Expression des p21-Gens.** Bei den verschiedenen Zelllinien wurde die Differenzierung induziert. Es

wurden jeweils 8 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen p21 hybridisiert. Die mRNA von p21 besitzt eine Größe von 2,3 kb. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren diente die Methylblau-Färbung. Man beachte die deutlich gesteigerte *p21*-Genexpression bei den das *entactin-1*-Gen in *antisense*-Orientierung überexprimierenden Zellen nach 48 Stunden.

Bei der *Northern Blot*-Analyse (siehe Abbildung 12) fiel sofort die letzte Spur (*entactin-1 antisense*, 48 Stunden nach Induktion der Differenzierung) ins Auge, bei der sich die *p21*-Genexpression gegenüber den anderen Zelllinien deutlich erhöht zeigte. Unter Proliferationsbedingungen (0h) waren zu Beginn keine Unterschiede bezüglich der *p21*-Genexpression zu detektieren. Insgesamt stieg die Expression dann nach Induktion der Differenzierung wie erwartet (Moran *et al.* 2002) an. 24 Stunden nach Induktion der Differenzierung war die Expression bei den *entactin-1 sense*- sowie bei den *entactin-1 antisense*-Zellen leicht erhöht (siehe Abbildung 12). Allerdings fehlt bei diesem Zeitwert sowohl die C2C12 als auch die *lacZ*-Kontrolle, da bei diesen Zelllinien nicht genügend RNA extrahiert werden konnte. Nach weiteren 24 Stunden unter Differenzierungsbedingungen waren keine Unterschiede zwischen den C2C12-Zellen, den *lacZ*- und den *entactin-1 sense*-Zelllinien bezüglich der *p21*-Genexpression zu erkennen. Nur die oben bereits erwähnten *entactin-1 antisense*-Zellen zeigten eine deutlich gesteigerte Expression dieses Markers.



**Abb. 13: Western Blot-Analyse des CDK-Inhibitors p21.** p21 hat ein Molekulargewicht von 21 kDa. Als Nachweis für gleichmäßige Beladung der Spuren diente  $\alpha$ -Tubulin. Man beachte die geringere p21-Proteinmenge bei den das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Zellen.

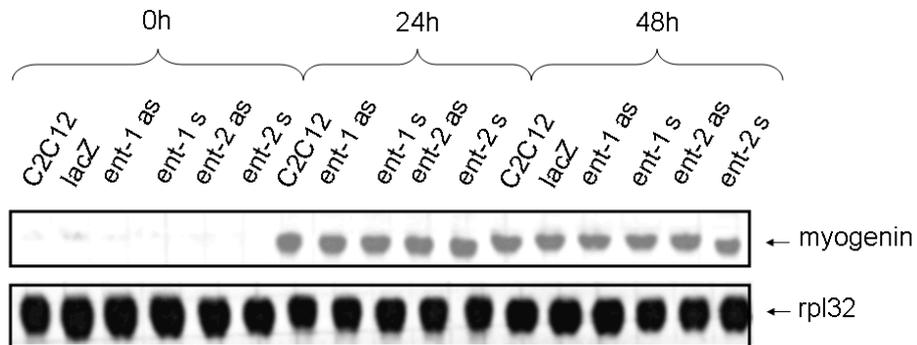
Die *p21*-Expression wurde, wie bereits erwähnt, auch mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens analysiert. Hier fiel sofort die deutlich geringere Menge an p21 auf, die bei den das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Zellen sowohl unter Proliferations- als auch unter Differenzierungsbedingungen zu erkennen war (vergleiche Abbildung 13). Interessanterweise war diese Tendenz nur auf Protein-Ebene zu sehen, nicht aber in der *Northern Blot*-Analyse (siehe auch Abbildung 12).

### 3.2 Untersuchung der Expression von Genen, die die Myogenese kontrollieren

#### 3.2.1 Untersuchung der Expression des *myogenin*-Gens auf RNA-Ebene

Myogenin ist ein Transkriptionsfaktor, der in Myoblasten die Differenzierung einleitet und dementsprechend im Verlauf derselben eine erhöhte Expression aufweist (Tomczak *et al.* 2003). Die Expression des *myogenin*-Gens wurde bei den *entactin-1*- und *entactin-2*-überexprimierenden Zellen sowie geeigneten Kontrollen auf RNA-Ebene mittels einer selbst

hergestellten *antisense* RNA-Sonde gegen die mRNA von Myogenin analysiert.



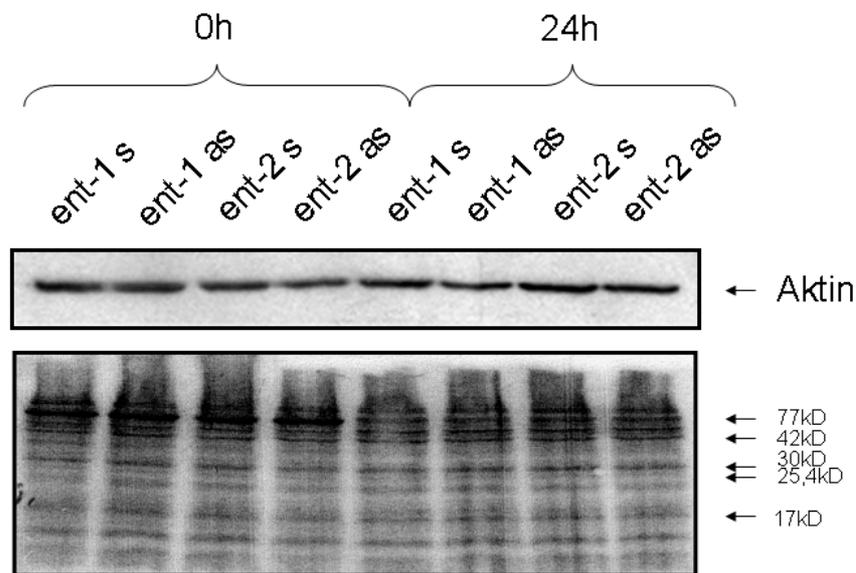
**Abb. 14: Northern Blot-Analyse der Expression des Differenzierungsmarkers Myogenin.** Es wurden 8µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *myogenin* hybridisiert. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung der Spuren diente eine Sonde gegen die mRNA für das ribosomale Protein rpl32. Man beachte die Induktion der Expression des *myogenin*-Gens nach Induktion der Differenzierung.

Wie Abbildung 14 zeigt, war bei allen Zelllinien sowie den Kontrollen sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Induktion der Differenzierung wie erwartet eine Induktion der *myogenin*-Genexpression zu sehen (Tomczak *et al.*, 2003). Zu Anfang des Versuchs, also während die Zellen im Proliferationsmedium kultiviert wurden, war keine *myogenin*-Genexpression zu sehen. Erst nach Serumentzug konnte das Signal detektiert werden. Zwischen den verschiedenen Zelllinien, die die beiden *entactin*-Gene jeweils in *sense*- und *antisense*-Orientierung überexprimieren sowie den lacZ- und den C2C12-Zellen, die als Kontrolle dienten, waren weder 24 noch 48 Stunden nach Induktion der Differenzierung Unterschiede bezüglich der *myogenin*-Genexpression zu sehen.

### 3.2.2 Untersuchung der Expression des *aktin*-Gens auf Protein-Ebene

Es wurde des Weiteren die Expression von Aktin in den verschiedenen Zelllinien untersucht. Aktin ist ein wichtiges Strukturprotein von Muskelfasern und erreicht 48 Stunden nach Induktion der Differenzierung sein endgültiges Expressionsniveau (Tomczak *et al.*, 2003).

Unter Proliferationsbedingungen sowie nach 24 Stunden in Differenzierungsmedium wurden Proteine extrahiert und mittels einer *Western Blot*-Analyse untersucht.



**Abb. 15: *Western Blot*-Analyse der Expression von Aktin.** Es wurden jeweils gleiche Mengen Protein aufgetragen. Aktin besitzt ein Molekulargewicht von 42 kDa und konnte mit Hilfe des ECL-Kits detektiert werden. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung diente die Ponceau-Färbung.

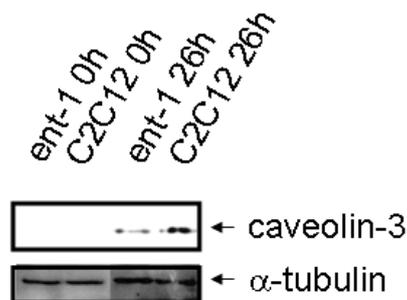
Bezüglich der Aktin Expression konnten auf Proteinebene keine Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien und den Kontrollen festgestellt werden, wie man in Abbildung 15 sieht. Die Expression dieses Strukturproteins war bei den Zellen, die die beiden *entactin*-Gene jeweils in *sense*- und *antisense*-Orientierung überexprimieren sowohl

bei Kultur in Proliferationsmedium als auch nach Umstellung auf Differenzierungsbedingungen gleich.

### 3.2.3 Untersuchung der Expression von Caveolin-3

Caveolin-3 ist ein in Muskeln vorkommendes Protein, welches vor allem auf Caveolae vorkommt. Es ist in der Myogenese stark induziert (Tomczak *et al.*, 2003).

Es wurden sowohl aus Zellen in Proliferationsmedium als auch 26 Stunden nach Induktion der Differenzierung Proteine extrahiert und mittels eines 15-prozentigen Gels aufgetrennt.



**Abb. 16: Western Blot-Analyse der Expression von Caveolin-3.**

Caveolin-3 hat ein Molekulargewicht von 20 bis 25 kDa und konnte mit Hilfe des ECL-Kits detektiert werden. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung der Spuren diente  $\alpha$ -Tubulin. Man beachte die unterschiedliche Expression bei den beiden Zelllinien nach Induktion der Differenzierung.

Interessanterweise konnten auf Protein-Ebene Expressionsunterschiede zwischen den das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Zellen und den Kontrollmyoblasten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 16).

Bei den Zellen in Proliferationsmedium (0h) war, wie erwartet, keine Expression von Caveolin-3 zu sehen (Tomczak *et al.*, 2003). Im Verlauf der Differenzierung war zwar sowohl bei den *entactin-1*-überexprimierenden Zellen als auch bei den Kontrollen die erwartete

Expressionsinduktion zu beobachten (Tomczak *et al.*, 2003), jedoch war diese bei den C2C12-Zellen wesentlich stärker als bei den das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Zellen.

### **3.3 Hemmung der Expression des *entactin-2*-Gens in Myoblasten mittels spezifischer siRNAs**

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Expression des *entactin-2*-Gens in Myoblasten mittels spezifischer siRNAs inhibiert und der Einfluss dieser Behandlung auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zellen untersucht werden.

siRNAs sind kleine, 21 Basenpaare lange, doppelsträngige RNA-Moleküle. Sie sind komplementär zu dem jeweiligen Transkript des Gens, dessen Expression unterdrückt werden soll, und werden in die lebende Zelle transfiziert.

#### **3.3.1 Optimierung der Transfektionsbedingungen**

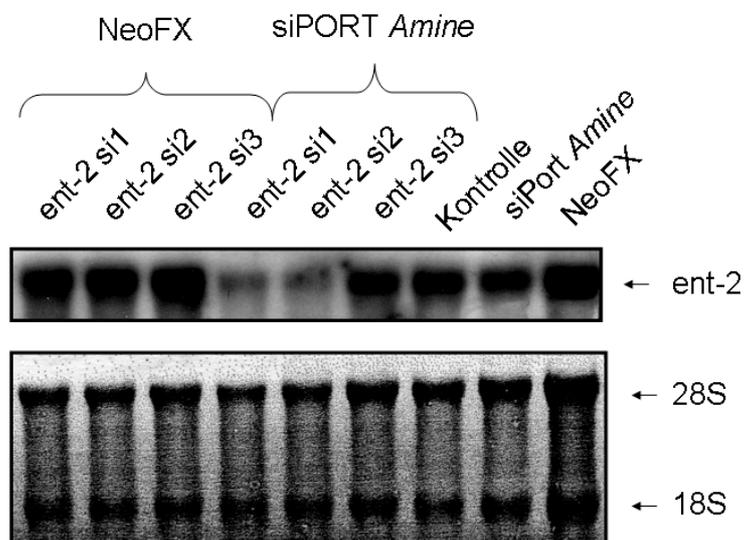
Im Verlauf dieser Arbeit wurden dabei von der Firma Ambion hergestellte, *entactin-2*-spezifische siRNAs verwendet. Die Transfektion erfolgte mit einem *kit* derselben Firma. Um eine möglichst gute Suppression der *entactin-2*-Genexpression zu erlangen, wurde der Versuch mit drei verschiedenen siRNA Spezies durchgeführt. Es wurden ebenfalls zwei verschiedene Transfektionsmedien ausprobiert.

Im Verlauf der Optimierungsversuche wurden verschiedene Parameter verändert.

Zum einen wurden die Zellen entweder 24 Stunden vor Beginn des Versuches oder gleichzeitig mit der Transfektion ausgesät. Außerdem wurde die Konzentration des Transfektionsmediums von sechs bis zehn Mikromol pro Vertiefung, sowie die Konzentration der siRNAs von 50 bis 100 Nanomol pro Vertiefung variiert.

Bei den initialen Experimenten wurden die transfizierten Zellen 48 Stunden in Proliferationsmedium kultiviert und anschließend RNA zur Analyse der Expression des *entactin-2*-Gens extrahiert.

Bei späteren Versuchen wurden die transfizierten Zellen 24 Stunden in Proliferationsmedium kultiviert und anschließend wurde aus der einen Hälfte der Zellen RNA extrahiert (24 h PM), während bei der anderen Hälfte der Zellen die Differenzierung induziert wurde (48 h DM).



**Abb.17: Northern Blot-Analyse der *entactin-2*-Genexpression bei siRNA- behandelten Zellen.** C2C12-Zellen wurden mit verschiedenen siRNAs (Ent-2 si1, -si2 und -si3), sowie mit verschiedenen Transfektionsmedien (siPORT *Amine*, NeoFX) versetzt; nach 48 Stunden wurde RNA extrahiert. Die Kontroll-Spur enthält RNA von unbehandelten C2C12-Zellen. Pro Spur wurden jeweils 8µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA -Sonde gegen *entactin-2* hybridisiert. Die mRNA von *entactin-2* besitzt eine Größe von 5,5 kb. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung diente die Methyleneblau-Färbung. Man beachte die verminderte *entactin-2*-Genexpression bei den mit siRNA Nummer eins bzw. zwei und siPORT *Amine* behandelten Zellen.

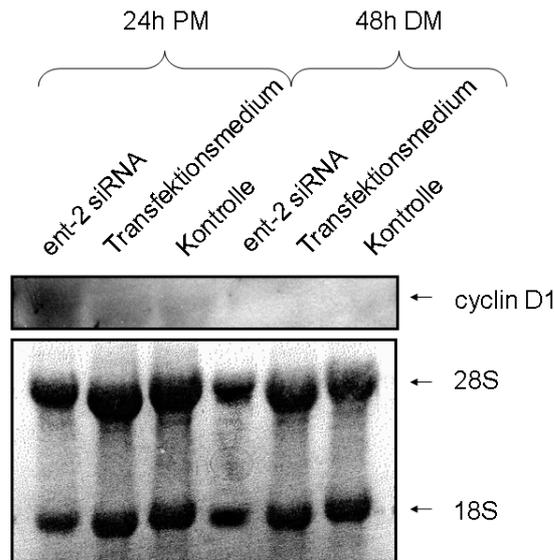
Nach mehreren Optimierungsversuchen erwies es sich als günstig, jeweils eine 70- bis 80-prozentige konfluente

Zellkulturflasche von 75 Quadratcentimetern auf drei Zellkulturplatten mit jeweils sechs Vertiefungen (je Vertiefung neun Quadratcentimeter) auszusäen, und im gleichen Schritt mit zehn Mikrolitern Transfektionsmedium siPORT *Amine* sowie der passenden siRNA mit einer Endkonzentration von 100 Nanomol pro Vertiefung zu versetzen. Als siRNA mit den besten Ergebnissen stellte sich dabei Nummer 1 (Nr. 155580) heraus. Das ergab die Überprüfung des Ergebnisses mittels einer *entactin-2* antisense-RNA-Sonde (siehe Abbildung 17). Daher wurde diese siRNA für die weiteren Experimente verwendet. Eine *scrambled* siRNA, das heißt eine siRNA, die keine Homologie zu einem murinen Gen besitzt und somit als negative Kontrolle diente, hatte keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.2 Untersuchung der Expression verschiedener Markergene in den siRNA-behandelten Zellen

#### 3.3.2.1 Untersuchung der *cyclin D1*-Genexpression

Um den Einfluss der verringerten *entactin-2*-Genexpression auf Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Myoblasten zu prüfen, wurde mit der zuvor hergestellten *antisense*-RNA-Sonde (siehe Abschnitt 3.2.2) die Expression des *cyclin D1*-Gens untersucht.



**Abb. 18: Northern Blot-Analyse der *cyclinD1*-Gen Expression bei den mit siRNA behandelten Zellen.** C2C12-Zellen wurden mit *entactin-2* siRNA behandelt und in Proliferations- (links) bzw. Differenzierungsmedium (rechts) kultiviert; anschließend wurde RNA extrahiert. Es wurden jeweils 1,5 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer entsprechenden *antisense*-Sonde hybridisiert. Die mRNA von Cyclin D1 besitzt eine Größe von 1,8 kb. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Spuren diente die Methylenblau-Färbung. Man beachte die verstärkte *cyclin D1*-Genexpression bei den siRNA behandelten Zellen unter Proliferationsbedingungen.

Als Kontrolle dienten die Zelllinien, die nur mit Transfektionsmedium behandelt worden waren und die C2C12 Myoblasten selbst. Diese zeigten untereinander keine Unterschiede bezüglich der *cyclin D1*-Genexpression.

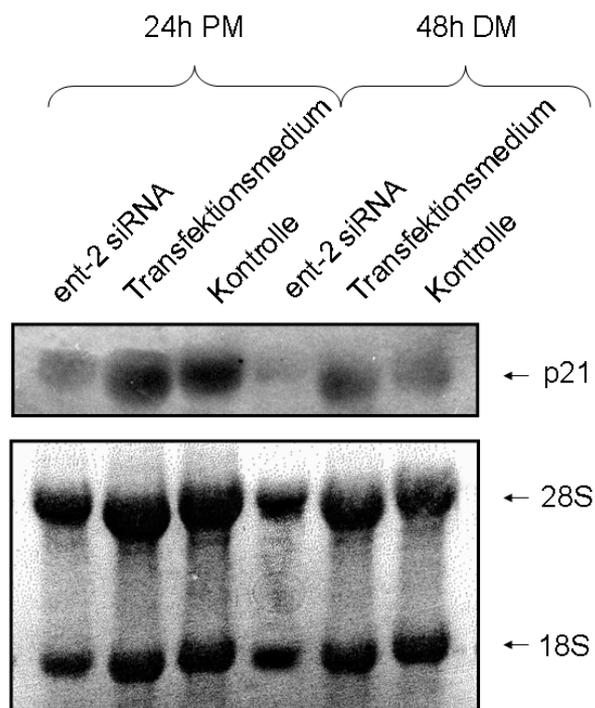
Insgesamt zeigte sich wie erwartet, dass Cyclin D1 unter Proliferationsbedingungen wesentlich stärker exprimiert wurde als dies unter Differenzierungsbedingungen der Fall war (vergleiche Abbildung 18). Weiterhin waren im Proliferationsmedium besonders offensichtliche Unterschiede zwischen den mit siRNA behandelten Zellen und den Kontrollzellen (sowohl mit als auch ohne Transfektionsmedium) zu beobachten: Das Expressionsniveau des *cyclin D1*-Gens war bei den siRNA-

behandelten Zellen wesentlich höher als bei den Kontrollzellen.

Unter Differenzierungsbedingungen war kein Unterschied zwischen behandelten und den nicht behandelten Zellen auszumachen (siehe Abbildung 18).

### 3.3.2.2 Untersuchung der *p21*-Genexpression

Ebenfalls untersucht wurde die Expression des *p21*-Gens (siehe 1.3.1).



**Abb. 19: Northern Blot-Analyse der *p21*-Genexpression bei den mit siRNA behandelten Zellen.** C2C12-Zellen wurden mit siRNA behandelt und in Proliferations- (links) bzw. Differenzierungsmedium (rechts) kultiviert; anschließend wurde RNA extrahiert. Es wurden jeweils 1,5 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer entsprechenden *antisense*-Sonde hybridisiert. Die mRNA von *p21* hat eine Größe von 2,3 kb. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung der Spuren diente die Methylenblau-Färbung. Man beachte die geringere Expression bei den siRNA behandelten Zellen.

Bei diesem Versuch fiel sofort auf (vergleiche Abbildung 19), dass die siRNA-behandelten Zellen sowohl zu Beginn des

Versuchs, also unter Proliferationsbedingungen, als auch nach Serumentzug, also unter Differenzierungsbedingungen, eine wesentlich geringere *p21*-Genexpression aufwiesen, als die jeweiligen Kontrollzellen. Die Kontrollzellen, also nur mit Transfektionsmedium behandelte Myoblasten und C2C12-Zellen selbst, wiesen untereinander keine unterschiedliche Expression bezüglich des *p21*-Gens auf.

Weiterhin wurde insgesamt sowohl bei den siRNA-behandelten Zellen, als auch bei den Kontrollzellen eine etwas geringere *p21*-Genexpression in Differenzierungsmedium als in Proliferationsmedium beobachtet. Die Ursache hierfür ist im Moment noch unklar und muss mittels weiterer Experimente geklärt werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Untersuchungen an C2C12-Zelllinien, die das *entactin-1* bzw. das *entactin-2*-Gen überexprimieren

Wie bereits erwähnt gab es schon vor Beginn dieser Arbeit Hinweise auf eine wichtige, aber unterschiedliche Rolle der Entactin-Isoformen bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung. Zum einen ist Entactin-2 in den Basalmembranen von Skelett- und Herzmuskulatur nur in sehr geringen Mengen vorhanden, wohingegen Entactin-1 keine unterschiedliche Verteilung aufweist (Kohfeldt *et al.*, 1998).

Zum anderen konnte in unserer Arbeitsgruppe vor Beginn dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression der beiden endogenen Entactin-Isoformen während des Muskelzellendifferenzierungsprozesses gegenläufig reguliert wird: die Expression des *entactin-1*-Gens wird reprimiert, während die des *entactin-2*-Gens stark induziert wird (Munz und Blau, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die unterschiedliche Expressionskinetik der beiden Proteine im Verlauf der Differenzierung lässt unterschiedliche Funktionen bei diesem Prozess vermuten. Nach diesen ersten Ergebnissen könnte man annehmen, dass Entactin-1 insbesondere in proliferierenden Myoblasten wichtig ist, während Entactin-2 eine Funktion bei der Induktion der Differenzierung zukommt.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, in wie weit die beiden Entactine wirklich Einfluss auf die Skelettmuskelzellendifferenzierung haben. Dazu wurden murine Myoblastenzelllinien charakterisiert, die die beiden *entactin*-Gene jeweils in *sense*- und *antisense*-Orientierung überexprimieren. Diese Zellen waren bereits im Vorfeld der Arbeit mittels geeigneter retroviraler Vektoren hergestellt

worden (Munz und Blau, unveröffentlichte Ergebnisse). Als Kontrollzellen dienten C2C12- bzw. lacZ- überexprimierende C2C12-Zellen.

#### 4.1.1 Während der Differenzierung lässt die Expression des rekombinanten *entactin-1* und *-2* nach

Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen, die das *entactin-1*- oder das *entactin-2*-Gen in *sense*-Orientierung überexprimieren während der Differenzierung durch ein Abnehmen der Expression des rekombinanten Gens gekennzeichnet waren.

Die Ursache hierfür ist der virale LTR (*long terminal repeat*), ein Promotor am 5'-Ende des retroviralen Konstrukts, welcher normalerweise für eine Transkription der viralen Gene sorgt. Diese LTR-abhängige Transkription wird jedoch bei Serumentzug, also unter Differenzierungsbedingungen, reprimiert (Ozawa, Munz und Blau, unveröffentlichte Ergebnisse), was zu einem Nachlassen der Transkription und somit zu einer verminderten Expression der rekombinanten *entactin*-Gene führt.

#### 4.1.2 *entactin-2*-überexprimierende Zellen können nur kurzfristig in Kultur gehalten werden

In Kultur sind *entactin-2*-überexprimierende Zellen durch ein rasches Nachlassen der Expression des rekombinanten Gens gekennzeichnet. Dieses Nachlassen kann man erklären, wenn man von der Hypothese ausgeht, dass Entactin-2 die Differenzierung induziert (siehe 4.1). In diesem Fall macht es Sinn, dass die Zellen, die große Mengen des rekombinanten Transkripts exprimieren (direkt nach erfolgter Infektion also fast alle), langsamer proliferieren und irgendwann von den Zellen, die von Anfang an nicht produktiv infiziert waren oder die auf Grund einer

Spontanmutation kein bzw. weniger rekombinantes Entactin-2 produzieren, überwachsen werden. Diese Zellen hätten somit einen Selektionsvorteil gegenüber denen mit gelungener Infektion.

#### 4.1.3 Die *entactin-1*-überexprimierenden Zellen zeigen nach 48 Stunden eine erhöhte Zellzahl gegenüber den Kontrollzellen

Da während der Routine-Zellkultur die *entactin-1*-überexprimierenden Zellen durch eine schnellere Zellzahlvermehrung im Vergleich zu den Kontrollzellen auffielen wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Zellzählung bestimmt. Nach 24 Stunden war auch wie erwartet eine erhöhte Zellzahl bei den *entactin-1*-überexprimierenden Zellen zu sehen. Jedoch hätte theoretisch, wenn man von einem exponentiellen Wachstum ausgeht, nach 48 Stunden der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien größer sein müssen, als er nach 24 Stunden war. Im Versuch war die Differenz jedoch ungefähr gleich groß.

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt schon so konfluent waren, dass sie nur noch in geringem Maße proliferierten.

#### 4.1.4 *entactin-1* überexprimierende Zellen proliferieren schneller als die Kontrollen

Im Anschluss an die Zellzählungsexperimente wurde analysiert, ob die schnellere Vermehrung der Zellzahl bei den *entactin-1*-überexprimierenden Zellen auf eine gesteigerte Proliferationsrate zurückzuführen ist. Mit Hilfe der BrdU-Methode konnte eine signifikant höhere Proliferationsrate bei Zellen nachgewiesen werden, die rekombinantes Entactin-1 in erhöhtem Maße produzieren.

#### 4.1.5 Entactin-1 hat Einfluss auf die Expression verschiedener Proliferations- und Differenzierungsmarker

Darauf aufbauend sollte in einem nächsten Schritt analysiert werden, ob und in welcher Weise Entactin-1 die Expression verschiedener Wachstums- und Differenzierungsmarker beeinflusst. Dazu wurde die Expression verschiedener Marker auf RNA- und Protein-Ebene untersucht.

Es konnten bei verschiedenen Markern Unterschiede bezüglich der Expression festgestellt werden, was auf eine direkte oder indirekte Regulation dieser Marker durch Entactin-1 hinweist.

#### 4.1.6 Entactin-1 beeinflusst die Ki67-Expression

Bei der Expression von Ki67 konnte auf Proteinebene bei den C2C12-Zellen 26 Stunden nach Differenzierungsinduktion eine erniedrigte Expression festgestellt werden, während bei den Entactin-1 überexprimierenden Zellen kein sichtbares Nachlassen der Expression zu sehen war. Ki67 ist ein im Zellkern lokalisierter Proliferationsmarker. Das Nachlassen der Ki67-Produktion in den Kontrollzellen deutet auf einen Übergang der Kontrollzellen in die G0-Phase hin, während die *entactin-1*-überexprimierenden Zellen sich offenbar noch weiterhin bevorzugt in einer der anderen Phasen befanden. Der Serumentzug scheint bei den das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Zellen in geringerem Maße zu einem Ausscheiden aus dem Zellzyklus zu führen.

#### 4.1.7 Entactin-1 beeinflusst die *rip-2*-Genexpression

In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass sowohl die *entactin-1*-überexprimierenden Zellen als auch entsprechende Kontrollen 26 Stunden nach Induktion der Differenzierung ein Nachlassen der *rip-2*-Genexpression

zeigen. Jedoch sinkt die Expression bei diesen Zellen in wesentlich geringerem Umfang als bei den C2C12-Zellen.

Die erhöhte *rip-2*-Genexpression deutet auf eine im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöhte Proliferationsrate nach Induktion der Differenzierung hin (Munz *et al.*, 2002).

Ebenfalls eine erhöhte Expressionsrate von *rip-2* während der Differenzierung wiesen die das *entactin-2*-Gen in *sense*- und *antisense*-Orientierung überexprimierenden Myoblasten auf. Bei den das *entactin-2*-Gen in *antisense*-Orientierung überexprimierenden Zellen könnte dieses Verhalten darauf zurückzuführen sein, dass weniger von dem vermutlich differenzierungsförderndem Entactin-2 vorhanden ist. Bei den Zellen, die das *entactin-2*-Gen in *sense*-Orientierung überexprimieren hätte man allerdings nach der Theorie, dass Entactin-2 die Differenzierung fördert, ein eher erniedrigtes *rip-2*-Genexpressionsniveau erwartet. Die Erklärung dafür könnte in einem kompensatorischen Effekt zu finden sein. Die das *entactin-2*-Gen überexprimierenden Zellen haben vermutlich eine stärkere Tendenz zur Differenzierung. Man könnte daher annehmen, dass bei der Kultur diejenigen einen Selektionsvorteil haben, die bestimmte „proliferationsfördernde“ Faktoren exprimieren.

#### 4.1.8 Entactin-1 beeinflusst die *p21*-Genexpression

Bei der Untersuchung des Cdk-Inhibitors p21 konnte auf RNA-Ebene im Verlauf der Differenzierung bei allen Zelllinien sowie den Kontrollen die erwartete Induktion von p21 nachgewiesen werden. Außerdem konnte aber bei den Zellen, die das *entactin-1*-Gen in *antisense*-Orientierung überexprimieren, 48 Stunden nach Induktion der Differenzierung eine besonders hohe Expression gezeigt werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Überexpression in *antisense*-Orientierung zu einer Abnahme

des Proteins führt. Und da somit weniger des vermutlich differenzierungsinhibierenden Entactin-1 vorhanden ist, können diese Zellen schon weiter im Differenzierungsprozess fortgeschritten sein als die Kontrollzellen.

Auf Proteinebene war sowohl unter Proliferationsbedingungen als auch unter Differenzierungsbedingungen bei den das *entactin-1*-überexprimierenden Zellen eine erniedrigte p21-Expression im Vergleich zu den Kontrollen zu sehen, was auf eine erhöhte Proliferationsrate dieser Zellen sowohl in Proliferations- als auch in Differenzierungsmedium, hinweist. Bei den 24 Stunden-Werten hätte man eine Induktion der *p21*-Genexpression erwarten können, jedoch ist bei Wildtyp-Myoblasten im Bezug auf die p21-Expression während der Differenzierung aber auch erst nach ca. 24 Stunden und später ein steiler Anstieg der Expression zu beobachten (Moran *et al.* 2002).

#### 4.1.9 Entactin-1 beeinflusst die *caveolin-3*-Genexpression

Im Verlauf der Differenzierung war zudem eine geringere Induktion der *caveolin-3*-Expression bei den das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den C2C12-Zellen zu sehen. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass Entactin-1 das Gleichgewicht zwischen Myoblastenproliferation und -differenzierung beeinflusst, da die Expression von *caveolin-3* während der Myogenese normalerweise stark induziert wird (Tomczak *et al.*, 2003).

#### 4.1.10 Entactin-1 hat keinen Einfluss auf die Expression des *aktin*-, des *myogenin*- und des *cyclin D1*-Gens

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss von Entactin-1 auf die Expression des *aktin*-, *myogenin*- und *cyclin D1*-Gens

untersucht. Im Bezug auf die Expression dieser Marker konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den das *entactin-1*-Gen-überexprimierenden Zellen und den Kontrollzellen festgestellt werden.

Obwohl eine erhöhte Proliferationsrate in den *entactin-1*-überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden konnte, scheinen diese Zellen *cyclin D1* unter Proliferationsbedingungen nicht in höherem Maße als die Kontrollzellen zu exprimieren. Entactin-1 scheint also offensichtlich keinen Einfluss auf die Expression des Cdk Aktivators zu nehmen. Dies deutet darauf hin, dass Entactin-1 selektiv die Expression bestimmter Proliferationsmarker stimuliert.

Unter Differenzierungsbedingungen hätte man bei den das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Zellen auch eine geringere Aktin-Expression erwarten können. Aktin wird normalerweise jedoch erst spät in der Myoblastendifferenzierung induziert (Tomczak *et al.*, 2003), weshalb es möglich ist, dass man 26 Stunden nach Induktion der Differenzierung auf Proteinebene noch keine Unterschiede zwischen den Zellen sieht. Man müsste gegebenenfalls spätere Zeitwerte untersuchen oder die *aktin*-Genexpression auf RNA-Ebene überprüfen, um genauere Aussagen über die Regulation treffen zu können.

Auch auf den myogenen Transkriptionsfaktor Myogenin scheint Entactin-1 keinen Einfluss zu haben. Seine Expression ist genauso hoch wie in den Kontrollzellen, obwohl man aufgrund der gestiegenen Proliferationsrate der *entactin-1*-überexprimierenden Zellen erwarten könnte, dass die Induktion dieses Differenzierungsmarkers geringer ausfallen sollte. Dies deutet gleichfalls an, dass Entactin-1 nur bestimmte Aspekte des myogenen Differenzierungsprogramms beeinflusst.

#### 4.1.11 Entactin-1 hat einen positiven Einfluss auf die Myoblastenproliferation und einen negativen Einfluss auf die Myoblastendifferenzierung

Zusammenfassend kann man sagen, dass die murinen Myoblasten, die das *entactin-1*-Gen überexprimieren, sowohl in Wachstums- als auch in Differenzierungsmedium durch eine erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu Kontrollzellen charakterisiert sind. Außerdem fällt bei diesen Zellen die Induktion myogener Differenzierungsmarker bei Kultur in serumarmen Medium deutlich geringer aus.

Allerdings wurden während dieser Arbeit höchstens Werte 48 Stunden nach Induzierung der Differenzierung untersucht. Für weitere Experimente wäre es notwendig, längere Kinetiken zu untersuchen. Außerdem müssen weitere Marker untersucht werden. Auch ist noch zu klären, auf welchem Weg Entactin-1 die Proliferation oder zumindest bestimmte Aspekte der Proliferation dieser Zellen fördert.

#### 4.2 Hemmung der Expression des *entactin-2*-Gens in Myoblasten mittels spezifischer siRNAs

Zellen, die das *entactin-2*-Gen überexprimieren, weisen eine sehr viel geringere Überexpression des rekombinanten Gens auf als Zellen, die das *entactin-1*-Gen überexprimieren. Zudem lässt die Expression des rekombinanten *entactin-2* in Kultur rasch nach, weshalb eine längere Beobachtung von *entactin-2*-Gen-überexprimierenden Zellen nur schlecht möglich ist.

Schließlich wird, wie bereits erwähnt zu Beginn der Differenzierung die *entactin-2*-Genexpression natürlicherweise induziert, während die *entactin-1*-Genexpression gehemmt wird, weswegen die

Überexpression des rekombinanten Gens im Verlauf des Differenzierungsprozesses wohl auch nur geringe Effekte zeigen sollte. Daraus folgt, dass die *entactin-2*-überexprimierenden Zellen kein geeignetes Modellsystem für weitere Untersuchungen waren.

Um nun dennoch auch Erkenntnisse zur Rolle von Entactin-2 bei der Myogenese zu gewinnen, bot es sich vor diesem Hintergrund an, parallel zu den Überexpressionsstudien in Bezug auf das *entactin-1*-Gen die *entactin-2*-Genexpression zu hemmen, also das entgegengesetzte Experiment zu den Überexpressions-Studien durchzuführen, und den Einfluss dieser Hemmung auf die Myoblastenproliferation und – differenzierung zu analysieren.

Daher wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der siRNA-Methode die Expression des *entactin-2*-Gens bei C2C12-Zellen gehemmt und im Anschluss daran die Effekte dieser Behandlung in Bezug auf die Myogenese analysiert.

#### 4.2.1 Optimierung der Bedingungen

Zuerst wurden die Bedingungen für den Versuch optimiert, da keine Informationen darüber vorlagen, mit welchem Transfektionsmedium, welcher siRNA-Konzentration sowie welcher siRNA-Spezies die Hemmung der *entactin-2*-Genexpression am effizientesten ist. In mehreren Versuchen wurden schließlich die für C2C12-Zellen optimalen Bedingungen definiert. Hierbei zeigte sich weiterhin, dass weder das Transfektionsmedium alleine noch die Behandlung mit einer unspezifischen siRNA-Spezies Einfluss auf die *entactin-2*-Genexpression hatte.

Im Anschluss daran wurde die Expression einiger der oben schon erwähnten Proliferations- und Differenzierungsmarker auf RNA-Ebene untersucht. Als Kontrollen dienten C2C12-

Zellen selbst, sowie C2C12-Zellen, die nur mit Transfektionsmedium behandelt wurden.

#### 4.2.2 Entactin-2 beeinflusst die *cyclin D1* Expression

Bei der Untersuchung der Expression von *cyclin D1*, einem Cdk-Aktivator, ergab sich, dass dieses Gen unter Proliferationsbedingungen eine verstärkte Expression bei den mit siRNA behandelten Zellen zeigte. Wenn man von der Theorie ausgeht, dass Entactin-2 die Differenzierung induziert, würde man bei den behandelten Zellen durchaus eine gegenüber den Kontrollzellen gesteigerte Proliferationsrate erwarten. Interessant ist jedoch, dass *entactin-1*-überexprimierende Zellen, trotz gesteigerter Proliferationsrate, keine erhöhte *cyclin D1*-Genexpression gegenüber den Kontrollzellen aufwiesen. Offensichtlich hat eine Hemmung der *entactin-2*-Genexpression teilweise andere Effekte als eine Überexpression des *entactin-1*-Gens.

Unter Differenzierungsbedingungen war kein Unterschied mehr zwischen den mit *entactin-2*-siRNA behandelten und den entsprechenden Kontrollzellen bezüglich der *cyclin D1*-Expression sehen. Dies könnte darin begründet sein, dass unter diesen Bedingungen die Expression des endogenen *entactin-2* stark ansteigt und so die Hemmung durch Behandlung mit den siRNAs vergleichsweise gering ausfällt. Außerdem ist die Expression des *cyclin D1*-Gens unter Differenzierungsbedingungen generell geringer, so dass mögliche Unterschiede nicht mehr so stark ins Gewicht fallen.

Ein Anstieg der *entactin-2*-Expression scheint also negativ mit der *cyclin D1*-Genexpression verknüpft zu sein, d.h. je mehr Entactin-2 vorhanden ist, desto weniger Cyclin D1 wird produziert.

### 4.2.3 Entactin-2 beeinflusst die *p21*-Genexpression

Im Bezug auf die *p21*-Genexpression bei den mit siRNA behandelten Zellen fiel auf, dass die behandelten Zellen sowohl in Proliferations- als auch in Differenzierungsmedium eine wesentlich geringere Expression aufwiesen als die unbehandelten Kontrollen. Dies weist, wie die erhöhte *cyclin D1*-Genexpression, auf eine gesteigerte Proliferationsrate der behandelten Zellen hin, was wiederum auf einen hemmenden Effekt von Entactin-2 auf die Myoblastenproliferation hindeutet.

Unter Differenzierungsbedingungen war weder bei den Kontrollzellen noch bei den mit siRNA behandelten Myoblasten eine deutliche *p21* Induktion zu erkennen, was dadurch erklärt werden könnte, dass die *p21*-Genexpression erst ca. 24 Stunden nach Induktion der Differenzierung steil ansteigt (Moran *et al.* 2002) und daher möglicherweise während des Versuchszeitraums noch nicht erfolgt war. Auch bei den das *entactin-1*-Gen überexprimierenden Zellen und den entsprechenden Kontrollen war ja keine Induktion der Expression dieses Markers zu sehen gewesen (siehe 3.1.4.4). Trotzdem war aber insgesamt nach Induktion der Differenzierung eine deutlich verringerte *p21*-Genexpression bei den behandelten Zellen gegenüber den nicht-behandelten zu sehen. Dies deutet, wie auch die anderen Ergebnisse, auf ein Verharren der mit *entactin-2*-siRNA behandelten Zellen in der Proliferationsphase hin.

### 4.2.4 Entactin-2 beeinflusst die Myoblastenproliferation

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit den mit siRNA behandelten Zellen weisen auf einen modulierenden Effekt des Entactin-2 auf Skelettmuskelzellwachstum und – differenzierung hin. In den Versuchen, bei denen die *entactin-2*-Genexpression gehemmt wurde, zeigte die

erhöhte Expression von Proliferationsmarkern, dass die behandelten Zellen im Gegensatz zu den Kontrollmyoblasten eine höhere Proliferationsrate aufweisen.

Bis jetzt konnten aber nur zwei Proliferationsmarker untersucht werden und es ist nötig, in weiteren Versuchen mit den mit siRNA behandelten Zellen andere Marker, insbesondere spezifische myogene Differenzierungsmarker, zu bestimmen. Außerdem könnte man die Proliferationsrate der Zellen mit Hilfe der BrdU-Methode untersuchen.

### **4.3 Entactin-1 und -2 könnten unterschiedliche Funktionen bei der Skelettmuskeldifferenzierung haben**

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Hinweise darauf erhalten, dass die beiden Entactin-Isoformen bei der Skelettmuskeldifferenzierung unterschiedliche Funktionen haben könnten. Insbesondere konnte nachgewiesen werden, dass die beiden Entactine *in vitro* unterschiedliche Effekte auf die Proliferation und Differenzierung von Skelettmuskelzellen haben.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression von Entactin-2 in den Basalmembranen von Herz- und Skelettmuskelzellen geringer ausgeprägt ist, als in anderen Geweben, während die Entactin-1 Expression keine unterschiedliche spatiale Verteilung aufweist (Kohfeldt *et al.*, 1998). Die beiden Isoformen weisen also in Skelett- und Herzmuskelgewebe ein unterschiedliches Expressionsmuster auf, während sie in den meisten anderen Geweben kolokalisiert sind (Kohfeldt *et al.*, 1998). Dies deutet, ebenso wie die im Verlaufe dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, darauf hin, dass die beiden Entactine speziell in Herz- und Skelettmuskulatur im Gegensatz zu den meisten anderen Geweben unterschiedliche Funktionen haben könnten.

*In vivo*-Untersuchungen sprechen allerdings auf den ersten Blick eher dafür, dass die beiden Entactine auch in Herz- und Skelettmuskulatur weitgehend redundante Funktionen haben: Aus der Literatur ist bekannt, dass in *entactin-1-knockout* Mäusen, in Herz- und Skelettmuskelzellen die Expression des *entactin-2*-Gens gesteigert wird (Dong *et al.*, 2002). In *entactin-2-knockout* Mäusen jedoch findet keine Änderung der *entactin-1*-Genexpression statt (Schymeinsky *et al.*, 2002). *Entactin-1-knockout* Mäuse weisen nur geringe neurologische Defekte sowie einige Basalmembrandefekte auf (Dong *et al.*, 2002), während *entactin-2-knockout* Mäuse gar keinen offensichtlichen Phänotyp zeigten (Schymeinsky *et al.*, 2002). Das Fehlen von Entactin-1 scheint folglich *in vivo* in hohem Maße, aber nicht vollständig durch Entactin-2 ausgeglichen werden zu können, während das Fehlen von Entactin-2 alleine auf den ersten Blick keine ersichtliche Auswirkung zu haben scheint. Unklar ist jedoch, ob das Fehlen von Entactin-1 oder -2 in Herz- und Skelettmuskelzellen *in vivo* zu subtilen Abnormalitäten führt. Dies müsste mittels genauerer Untersuchung der *knockout*-Mäuse geklärt werden.

Schließlich wäre es möglich, dass die beiden Entactine in Herz- und Skelettmuskulatur, aber auch in anderen Geweben bei ganz spezifischen und pathologischen Situationen wie Krankheit, Regeneration, Tumorgenese oder Altern bzw. bei einem bestimmten genetischen Hintergrund wichtig sind. Auch diese Überlegungen würden eine Grundlage für weitere Untersuchungen bieten.

## 5 Zusammenfassung

Die beiden ubiquitär vorkommenden Basalmembranproteine Entactin-1 und -2 (auch: Nidogen-1 und -2) dienen vermutlich als Verknüpfung zwischen den selbstaggregierenden Kollagen IV- und Laminin-1-Netzwerken. Die beiden Isoformen zeigen eine ähnliche Verteilung in unterschiedlichen Geweben. Abweichungen gibt es lediglich bei Herz- und Skelettmuskelfasern, in deren Basalmembranen Entactin-2 nur schwach vertreten ist, während Entactin-1 keine unterschiedliche Verteilung aufweist. Vor Beginn dieser Arbeit konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die beiden Isoformen während des Muskelzelldifferenzierungsprozesses gegenläufig reguliert werden: die Expression des *entactin-1*-Gens wird reprimiert, während die des *entactin-2*-Gens stark induziert wird.

Diese Ergebnisse wiesen bereits auf eine wichtige, aber unterschiedliche Funktion beider Entactin-Isoformen bei der Skelettmuskelzelldifferenzierung hin. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnte dann anhand von Zellen, die das *entactin-1*- und *entactin-2*-Gen jeweils in *sense*- und *antisense*-Orientierung überexprimieren, gezeigt werden, dass Entactin-1 einen positiven Einfluss auf die Myoblastenproliferation sowie einen negativen Einfluss auf den Differenzierungsprozess dieser Zellen hat. Dabei wurde die Auswirkung der *entactin-1*-Überexpression auf die Expression verschiedener Wachstums- und Differenzierungsmarker untersucht. Im zweiten Teil wurde die Expression des *entactin-2*-Gens durch siRNAs gehemmt und wiederum der Einfluss dieser Hemmung auf das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der Zellen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass Entactin-

2 tatsächlich einen negativen Effekt auf die Myoblastenproliferation hat. Diese Ergebnisse zeigen, dass Entactine wichtige Modulatoren der Myoblastendifferenzierung sind.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2004).  
Molekularbiologie der Zelle. Vierte Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH und Co.  
KGaA
- Bader B.L., Smyth N., Nedbal S., Miosge N., Baranowsky A., Mokkaapati S., Murshed M., Nischt R. (2005). Compound Genetic Ablation of Nidogen 1 and 2 Causes Basement Membrane Defects and Perinatal Lethality in Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 25:6846-6856
- Brand-Saberi B., Christ B. (2002). Limb muscle development. Review. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 905 - 914
- Dong L., Chen Y., Lewis M., Hsieh J.C., Reing J., Chaillet J.R., Howell C.Y., Melhem M., Inoue S., Kuszak J.R., DeGeest K., Chung A.E. (2002). Neurologic defects and selective disruption of basement membranes in mice lacking entactin-1/nidogen-1. *Lab. Invest.* 82: 1617-30
- Durkin M.E., Chakravarti S., Bartos B.B., Liu S.H., Friedman R.L. und Chung, A.E. (1988) Amino acid sequence and domain structure of entactin. Homology with epidermal growth factor precursor and low density lipoprotein receptor. *J. Cell Biol.* (107) 2749-2756
- Eklblom P., Eklblom M., Fecker L., Klein G., Zhang H.Y., Kadoya Y., Chu M.L., Mayer U., and Timpl R., (1994). Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro. *Development* 120:2003-2014
- Erickson A. C., Couchman J. R. (2000). Still more complexity in mammalian basement membranes. Review. *J Histochem Cytochem* 48:1291-1306
- Foster R. F., Thompson J. M., Kaufman S. J. (1987). A laminin substrate promotes myogenesis in rat skeletal muscle cultures: analysis of replication and development using antidesmin and anti-BrdU monoclonal antibodies. *Dev. Bio.* 224:11-20
- Fox J.W., Mayer U., Nischt R., Aumailley M., Reinhardt D., Wiedemann H., Mann K., Timpl R., Krieg T., Engel J., und Chu M.L. (1991). Recombinant nidogen consists

- of three globular domains and mediates binding to laminin and collagen type IV. *EMBO J.* 10:3137-3146.
- Godfrey E.W., Gradall K.S. (1998). Basal lamina molecules are concentrated in myogenic regions of the mouse limb bud. *Anat Embryol (Berl)*. 198(6):481-6.
- Hohenester E., Engel J. (2001). Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* 21:115-128
- Kimura N., Toyoshima T., Kojima T., Shimane M. (1998). Entactin-2: a new member of basement membrane protein with high homology to Entactin/Nidogen. *Exp. Cell Res.* 241:36-45
- Kohfeldt E., Sasaki T., Göhring W. und Timpl R. (1998). Nidogen-2, a new basement membrane protein with diverse binding properties. *J. Mol. Biol.* 282:99-109
- Liddington R.C. (2001). Mapping out the basement membrane. *Nature Structural Biology* 8, 573 - 574
- Lüllmann-Rauch R. (2003). *Histologie*. Thieme Verlag Stuttgart, New York
- Mann K., Deutzmann R., Aumailley M., Timpl R., Raimondi L., Yamada Y., Pan T., Conway D. and Chu M.L. (1989). Amino acid sequence of mouse nidogen, a multidomain basement protein with binding activity for laminin, collagen IV and cells. *EMBO J.* 8:65-72
- Mayer U., Kohfeldt E., Timpl R. (1998). Structural and genetic analysis of Laminin-Nidogen interaction. *Annals of the New York Academy of sciences* 857:130-142
- Mohan P.S., and Spiro R.G., (1986). Macromolecular organization of basement membranes. Characterization and comparison of glomerular basement membrane and lens capsule components by immunochemical and lectin affinity procedures. *J. Biol. Chem.* 261:4328-4336
- 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. *Physiol Genomics* 10(2):103-11
- Munz B., Hildt E., Springer M. L., Blau H. M. (2002). RIP2, a checkpoint in Myogenic Differentiation. *Mol. Cell Biol.* 22(16):5879-86

- Murshed M., Smyth N., Miosge N., Karolat J., Krieg T., Paulsson M., Nischt R. (2000). The absence of nidogen-1 does not affect murine basement membrane formation. *Mol. Cell Biol.* 20:7007-12
- Paulsson M., Dziadek M., Suchanek D., Huttner W. B., und Timpl R., (1985). Nature of sulfated macromolecules in Reicherts membrane. Evidence for tyrosine-O-sulfate in basement membrane proteins. *Biochem. J.* 231:571-579
- Sabourin L. A., Rudnicki M. A. (2000). The molecular regulation o myogenesis. Review. *Clin Genet.* 57(1):16-25
- Sanes J. R. (2003). The basement membrane/ basal lamina of skeletal muscle. Minireview. *JBC* 278(15): 12601-12604
- Sasaki T., Fässler R., Hohenester E. (2004). Laminin: the crux of basement membrane assembly. Mini Review. *JCB* 164: 959-963
- Schymeinsky J., Nedbal S., Miosge N., Poschl E., Rao C., Beier D. R., Skarnes W. C., Timpl R., Bader B. L. (2002). Gene structure and functional analysis of the mouse nidogen-2 gene: nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice. *Mol. Cell. Biol.* 22: 6820-30
- Silbernagl S., Despopoulus A. (2003). Taschenatlas der Physiologie. Thieme Verlag Stuttgart, New York
- Springer T. A. (1998). An extracellular  $\beta$ -propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *J Mol Biol.* 283(4): 837-62
- Timpl R., Dziadek M., Fujiwara S., Nowack H., Wick G. (1983). Nidogen: a new, self-aggregating besement membrane protein. *Eur. J. Biochem.* 137, 455-465
- Tomczak K. K., Marinescu V. D., Ramoni M. F., Saoudou D., Montanaro F., Han M., Kunkel L. M. Kohane I. S., Beggs A. H. (2003). Expression profiling and identification of novel genes involved in myogenic differentiation. *FASEB J* 18(2):403-5

## Abkürzungsverzeichnis

as	<i>antisense</i> , Gegensinn-Orientierung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleid acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alii</i> , und andere
FCS	fetal calf serum, Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	<i>hour</i> , Stunde
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
mRNA	<i>messenger</i> (Boten) - Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease

rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	<i>sense</i> , Sinn-Richtung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolettes Licht
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

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir beim erstellen dieser Arbeit hilfreich zu Seite standen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Barbara Munz, für ihre außergewöhnliche und weit über meine Erwartungen hinausgehende Betreuung, sowie für die Bereitstellung des spannenden Themas und all die hilfreichen Vorschläge zu meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich der netten Arbeitsgruppe für das tolle Klima und die hilfsbereite Zusammenarbeit danken. Ganz besonders möchte ich Stefanie Adams danken, die auch die gleiche Frage beim hundertsten Mal noch nett beantwortet hat und ohne die ich wahrscheinlich immer noch keinen Northern Blot aufbauen könnte. Auch bedanken möchte ich mich bei Frau Renate Noske-Reimers für die Bestellungen und das ganze „Drumherum“.

Bei Frau Bayer möchte ich mich für die Einführung in die Zellkultur sowie für das pflegen meiner Zellen wenn ich keine Zeit hatte bedanken.

Außerdem sollten die Damen der Spülküche and dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben.

Dem Labor von Prof. Dr. Timpl möchte ich für die Bereitstellung des Plasmids danken.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Eberhart Hildt für den erfolgreichen Tip bei inversen Western-Blots bedanken, sowie für Aufnahmen der Fluoreszenz-Fotos.

Das weiteren möchte ich Alexander Bujotzek für das lesen und bearbeiten dieser Arbeit danken.

Meinen Eltern möchte ich für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen danken.

Und als letztes möchte ich Max Flöttmann danken. Zum einen für die Hilfe bei allen kleinen und großen technischen Problemen, sowie dafür, dass ich überhaupt hier in Berlin gelandet bin!

Danke

## **Erklärung**

„Ich, Ricarda Flöttmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Die Rolle von Entactin-1 und -2 bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **Lebenslauf von Ricarda Flöttmann**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Doktorarbeit nicht veröffentlicht.

## **Publikationsliste**

Neu R., Adams S., Munz B. (2006). Differential expression of entactin-1/nidogen-1 and entactin-2/nidogen-2 in myogenic differentiation. Differentiation 2006 Dec; 74 (9-10): 573-82

