

Aus dem Institut für Physiologie – Dahlem  
Campus Benjamin Franklin  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

eingereicht über das  
Institut für Veterinärpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

---

**Expression von**  
***receptor interacting protein*-Genen**  
**in**  
**Rhabdomyosarkomzellen**

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

vorgelegt von  
**Svenja Katharina Ehlers**  
Tierärztin  
aus Bad Segeberg

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3310

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Anja Sterner-Kock, PhD  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Barbara Munz  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dieter Blottner

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

muscular diseases, neoplasms, muscle cells, cell differentiation,  
gene expression, molecular biology, mice

Tag der Promotion: 11. September 2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86664-734-3

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© **mensch und buch** verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

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

...meiner Familie...



**I INHALTSVERZEICHNIS**

<b>II</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
<b>III</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>XI</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>RECEPTOR INTERACTING PROTEIN (RIP)-FAMILIE .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	<i>Strukturen der RIPs.....</i>	2
1.1.2	<i>Physiologische Funktionen der RIPs.....</i>	4
<b>1.2</b>	<b>MUSKELZELLDIFFERENZIERUNG .....</b>	<b>6</b>
1.2.1	<i>Embryonale Entwicklung der Muskelzellen.....</i>	6
1.2.2	<i>Regulation der Muskelzelldifferenzierung.....</i>	7
<b>1.3</b>	<b>RIP-PROTEINE UND MYOBLASTENDIFFERENZIERUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4</b>	<b>RHABDOMYOSARKOME .....</b>	<b>10</b>
1.4.1	<i>Ätiologie der Rhabdomyosarkome .....</i>	10
1.4.2	<i>Pathologie und Biologie.....</i>	11
1.4.3	<i>Rhabdomyosarkome in der Veterinärmedizin .....</i>	13
<b>1.5</b>	<b>FRAGESTELLUNG UND ZIELE DIESER ARBEIT.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>16</b>
2.1.1	<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....</i>	16
2.1.2	<i>Enzyme.....</i>	18
2.1.3	<i>Antikörper .....</i>	18
2.1.4	<i>Oligodesoxynukleotide .....</i>	18
2.1.5	<i>Vektoren.....</i>	19
2.1.6	<i>„Kits“ .....</i>	19
2.1.7	<i>siRNA und Templates zur siRNA-Herstellung.....</i>	19
2.1.8	<i>Bakterienstamm .....</i>	19
2.1.9	<i>Eukaryontische Zelllinien.....</i>	19
2.1.10	<i>Versuchstiere.....</i>	19
<b>2.2</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>20</b>
2.2.1	<i>Zellbiologische Methoden.....</i>	20
2.2.1.1	Kultivierung und Aufbewahrung eukaryontischer Zellen.....	20
2.2.1.2	Differenzierung von Rhabdomyosarkomzellen.....	20
2.2.1.3	Transfektion mit siRNA.....	21
2.2.2	<i>Tierexperimentelle Arbeiten.....</i>	21
2.2.2.1	Haltung von Versuchsmäusen.....	21
2.2.2.2	Tötung der Versuchsmäuse .....	22
2.2.2.3	Gewinnung von murinem Gewebe .....	22
2.2.3	<i>Mikrobiologische Methoden.....</i>	22
2.2.3.1	Anzucht und Aufbewahrung von E. coli-Stämmen.....	22
2.2.3.2	Herstellung transformativkompetenter E. coli-Zellen .....	22

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>2.2.4</b>	<b><i>Molekularbiologische Methoden</i></b> .....	<b>23</b>
2.2.4.1	Umschreiben von RNA in cDNA mittels reverser Transkription .....	23
2.2.4.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	23
2.2.4.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	24
2.2.4.4	Reinigung von Nukleinsäuren über Phenolextraktion und Ethanol-fällung.....	24
2.2.4.5	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	25
2.2.4.6	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	25
2.2.4.7	Ligation.....	25
2.2.4.8	Transformation von E. coli-Zellen mit Plasmid-DNA.....	25
2.2.4.9	Beurteilung der Klonierungseffizienz und Auswahl geeigneter Kolonien für die weitere Analyse .....	26
2.2.4.10	DNA-Präparation.....	26
2.2.4.11	Sequenzierung von DNA.....	27
2.2.4.12	Generierung einer DIG-markierten antisense-Sonde definierter Länge durch in vitro-Transkription aus dem isolierten Plasmid.....	27
2.2.4.13	Allgemeine Richtlinien für das Arbeiten mit RNA.....	27
<b>2.2.5</b>	<b><i>Proteinchemische Methoden</i></b> .....	<b>31</b>
2.2.5.1	Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten eukaryontischen Zellen .....	31
2.2.5.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	31
2.2.5.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	31
2.2.5.4	Immunologische Methoden .....	33
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>EXPRESSION DER <i>RIP</i>-GENE IN C2C12- UND C2F3-ZELLINIEN</b> .....	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION DER <i>RIP</i>-GENE IN RHABDOMYOSARKOM-ZELLINIEN</b> .....	<b>38</b>
3.2.1	<i>Differenzierung von Rhabdomyosarkomzellen in vitro</i> .....	38
3.2.1.1	Lichtmikroskopische Untersuchungen.....	39
3.2.1.2	Untersuchung der Expression von Genen, die mit der Regulation von Proliferationsprozessen assoziiert sind.....	41
3.2.2	<i>Expression der rip-Gene in RD/12- und RD/18-Zellen</i> .....	42
3.2.2.1	Expression von rip1 in Rhabdomyosarkomzelllinien .....	43
3.2.2.2	Expression von rip2 in RD/12- und RD/18-Zelllinien .....	44
3.2.2.3	Expression von rip3 in Rhabdomyosarkomzellen.....	47
3.2.2.4	Expression von rip4 in Rhabdomyosarkomzellen.....	49
3.2.2.5	Expression von rip5 in RD/18- und C2C12-Zellen.....	49
3.2.3	<i>Expression von rip2 in Muskeln von mdx-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren</i> .....	51
<b>3.3</b>	<b>HEMMUNG DER EXPRESSION DES <i>RIP2</i>-GENS IN C2C12-ZELLEN MITTELS SPEZIFISCHER siRNAs</b> .....	<b>53</b>
3.3.1	<i>Optimierung der Transfektionsbedingungen</i> .....	53
3.3.2	<i>Überprüfung der silencer-Effektivität der verschiedenen rip2-siRNAs</i> .....	53

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.3.3	<i>rip2-siRNA-Transfektion bei C2C12-Zellen und Induktion der Differenzierung...</i>	54
3.3.3.1	Lichtmikroskopische Untersuchung der mit rip2-siRNA-behandelten C2C12-Zellen.....	56
3.3.3.2	Proliferationsrate von unbehandelten und siRNA-behandelten C2C12-Zellen.....	57
<b>3.4</b>	<b>HEMMUNG DER EXPRESSION DES RIP2-GENS IN RD/18-ZELLEN MITTELS SPEZIFISCHER siRNA .....</b>	<b>60</b>
3.4.1	<i>Optimierung der Transfektionsbedingungen bei RD/18-Zellen.....</i>	60
3.4.2	<i>rip2-siRNA-Transfektion bei RD/18-Zellen und Induktion der Differenzierung....</i>	61
3.4.2.1	Lichtmikroskopische Untersuchung der mit rip2-siRNA-behandelten RD/18-Zellen.....	62
3.4.2.2	Proliferationsrate von unbehandelten und mit rip2-siRNA-behandelten RD/18-Zellen.....	63
<b>3.5</b>	<b>IMMUNZYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION VON MYOSIN HEAVY CHAIN (MHC) IN C2C12- UND RD/18-ZELLEN.....</b>	<b>65</b>
3.5.1	<i>Immunzytochemische Untersuchung der unbehandelten und mit rip2-spezifischer siRNA behandelten C2C12- und RD/18-Zellen zum Nachweis von myosin heavy chain.....</i>	66
3.5.2	<i>Grafische Auswertung der mit einem myosin heavy chain-Antikörper inkubierten differenzierten C2C12- und RD/18-Zellen – ein Vergleich zwischen unbehandelten und mit rip2-spezifischer siRNA behandelten Zellen .....</i>	68
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>70</b>
4.1	<b>DIE EXPRESSION VON RIP1-4 IN MYOBLASTENZELLINIEN MIT UNTERSCHIEDLICHEM DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL UNTERSCHIEDET SICH .....</b>	<b>70</b>
4.2	<b>DIE RIP-GENEXPRESSION IN RHABDOMYOSARKOMZELLINIEN WEICHT STARK VON DER NORMALER MYOBLASTENZELLINIEN AB.....</b>	<b>71</b>
4.2.1	<i>Rhabdomyosarkomzellen zeigen lichtmikroskopisch und auf RNA- bzw. Proteinebene Anfänge myogener Differenzierung .....</i>	71
4.2.2	<i>Das rip1-Genexpressionsmuster in Rhabdomyosarkomzellen weicht nicht von dem normaler Myoblasten ab.....</i>	72
4.2.3	<i>Die rip2-Genexpression in Rhabdomyosarkomzellen weicht stark von der normaler Myoblasten ab.....</i>	72
4.2.4	<i>rip3 wird in Rhabdomyosarkomzellen nicht exprimiert.....</i>	75
4.2.5	<i>rip4 wird in Rhabdomyosarkomzellen nicht exprimiert.....</i>	76
4.2.6	<i>rip5 wird in normalen Myoblasten und in Rhabdomyosarkomzellen exprimiert..</i>	76
4.2.7	<i>rip2 wird auch in vivo exprimiert .....</i>	76
4.3	<b>EINE HEMMUNG DER RIP2-GENEXPRESSION HEMMT DIE PROLIFERATION UND VERBESSERT DIE DIFFERENZIERUNGSFÄHIGKEIT VON MYOBLASTEN.....</b>	<b>77</b>
4.3.1	<i>Die spezifische Hemmung des rip2-Gens in C2C12-Myoblasten hemmt die Proliferationsrate dieser Zellen.....</i>	78
4.3.2	<i>Die spezifische Hemmung des rip2-Gens in C2C12-Myoblasten fördert die Differenzierung dieser Zellen.....</i>	79
4.3.3	<i>Die spezifische Hemmung des rip2-Gens in RD/18-Zellen hemmt die Zellproliferation .....</i>	80

## INHALTSVERZEICHNIS

---

4.4	ZUSAMMENFASSEND E DARSTELLUNG DER <i>RIP2</i> -GENREGULATION IN MUSKELZELLEN UND DIE AUSWIRKUNGEN AUF DIE MYOGENESE .....	82
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	85
6	SUMMERY.....	86
7	LITERATURVERZEICHNIS .....	87
	EIGENE PUBLIKATIONEN.....	97
	DANKSAGUNG.....	98
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	99



## II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1: SIGNALTRANSDUKTIONSWEG DES TNF-REZEPTORS 1 IM ZUSAMMENHANG MIT AUSGEWÄHLTEN ZYTOPLASMATISCHEN ADAPTORPROTEINEN (MODIFIZIERT NACH BAKER UND REDDY 1998) .....	2
ABB. 2: FAMILIE DER <i>RECEPTOR INTERACTING PROTEINS</i> : SCHEMATISCHE DARSTELLUNG IHRER DOMÄNENSTRUKTUREN (MODIFIZIERT NACH MEYLAN UND TSCHOPP 2005) .....	3
ABB. 3: SKELETTMUSKELENTWICKLUNG AUS DEN SOMITEN GEZEIGT AN EINEM SCHEMATISIERTEN EMBRYOQUERSCHNITT (MODIFIZIERT NACH PERRY UND RUDNICKI 2000). 6	
ABB. 4: SCHEMA DER MUSKELDIFFERENZIERUNG (MODIFIZIERT NACH SABOURIN UND RUDNICKI 2000).....	8
ABB. 5: BEISPIELHAFT DARGESTELLT IST EINE T(2;13) (Q35;Q14)-CHROMOSOMALE TRANSLOKATION BEIM ALVEOLÄREN RHABDOMYOSARKOM (ABBILDUNG MODIFIZIERT NACH XIA ET AL. 2002) .....	12
ABB. 6: MOLEKULARE PATHOGENESE DES EMBRYONALEN UND DES ALVEOLÄREN RHABDOMYOSARKOMS IM ÜBERBLICK .....	13
ABB. 7: UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION DER <i>RIP1</i> -, <i>RIP2</i> -, <i>RIP3</i> - UND <i>RIP4</i> -GENE IN PROLIFERIERENDEN UND DIFFERENZIERENDEN C2F3- UND C2C12-ZELLEN MIT HILFE DER <i>NORTHERN BLOT</i> -ANALYSE.....	37
ABB. 8: LICHTMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG VON UNFIXIERTEN RD/18- UND RD/12-ZELLINIEN IN PROLIFERATIONS- UND DIFFERENZIERUNGSMEDIUM.....	40
ABB. 9: <i>NORTHERN BLOT</i> -ANALYSE DER <i>P21</i> -GENEXPRESION .....	41
ABB. 10: <i>WESTERN BLOT</i> -ANALYSE DER <i>P21</i> -EXPRESSION.....	42
ABB. 11: <i>NORTHERN BLOT</i> -ANALYSE DES <i>RIP1</i> -GENS IN RD/18 UND RD/12-ZELLINIEN .....	43
ABB. 12: <i>WESTERN BLOT</i> -ANALYSE DER EXPRESSION VON <i>RIP1</i> IN RHABDOMYOSARKOMZELLEN .....	44
ABB. 13: <i>WESTERN BLOT</i> -ANALYSE DER EXPRESSION VON <i>RIP2</i> .....	45
ABB. 14: <i>NORTHERN BLOT</i> -ANALYSE DER <i>RIP2</i> -EXPRESSION .....	46
ABB. 15: <i>NORTHERN BLOT</i> -ANALYSE DER <i>RIP2</i> -EXPRESSION WÄHREND DER DIFFERENZIERUNG. ....	46
ABB. 16: <i>WESTERN BLOT</i> -ANALYSE DES <i>RIP2</i> -PROTEINS IN RD/18- UND RD/12-ZELLEN.....	47
ABB. 17: <i>NORTHERN BLOT</i> -ANALYSE DER EXPRESSION VON <i>RIP3</i> IN RD18-ZELLEN. ....	48
ABB. 18: <i>WESTERN BLOT</i> -ANALYSE DER <i>RIP3</i> -EXPRESSION IN RD/18-ZELLEN.....	48
ABB. 19: <i>NORTHERN BLOT</i> -ANALYSE DER <i>RIP4</i> -EXPRESSION IN RHABDOMYOSARKOMZELLEN...49	
ABB. 20: <i>NORTHERN BLOT</i> -ANALYSE DER <i>RIP5</i> EXPRESSION IN RD/18- UND C2C12-ZELLEN. ..50	
ABB. 21: EXPRESSION DES <i>RIP2</i> -GENS IN AUSGEWÄHLTEN GEWEBEN VON <i>MDX</i> -MÄUSEN UND ENTSPRECHENDEN KONTROLLTIEREN.....	52
ABB. 22: VERGLEICH DER <i>SILENCER</i> -EFFEKTIVITÄT DER VERSCHIEDENEN <i>RIP2</i> - <i>SIRNAs</i> .....	54
ABB. 23: <i>NORTHERN BLOT</i> -ANALYSE DER HEMMUNG DER <i>RIP2</i> -GENEXPRESION IN PROLIFERATIONS- UND DIFFERENZIERUNGSMEDIUM.....	55
ABB. 24: LICHTMIKROSKOPISCHE ANALYSE VON UNBEHANDELTEN UND TRANSFIZIERTEN C2C12-ZELLEN .....	56

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

ABB. 25: UNBEHANDELTE UND siRNA-BEHANDELTE C2C12-ZELLEN MIT DAPI- UND BRDU-FÄRBUNG .....	58
ABB. 26: PROLIFERATIONSVERHALTEN DER MIT <i>RIP2</i> -siRNA BEHANDELTEN IM VERGLEICH ZU C2C12-KONTROLLZELLEN.....	59
ABB. 27: <i>NORTHERN BLOT</i> -ANALYSE DER HEMMUNG DER <i>RIP2</i> -GENEXPRESSION MIT HILFE EINER SPEZIFISCHEN siRNA IN RD/18-ZELLEN. ....	60
ABB. 28: <i>NORTHERN BLOT</i> -ANALYSE DER HEMMUNG DER <i>RIP2</i> -GENEXPRESSION IN PROLIFERATIONS- UND DIFFERENZIERUNGSMEDIUM.....	62
ABB. 29: LICHTMIKROSKOPISCHE ANALYSE VON UNBEHANDELTEN UND TRANSFIZIERTEN RD/18-ZELLEN .....	63
ABB. 30: UNBEHANDELTE UND siRNA-BEHANDELTE RD/18-ZELLEN MIT DAPI- UND BRDU-FÄRBUNG.....	64
ABB. 31: PROLIFERATIONSVERHALTEN DER MIT <i>RIP2</i> -siRNA BEHANDELTEN IM VERGLEICH ZU UNBEHANDELTEN RD/18-KONTROLLZELLEN.....	65
ABB. 32: IMMUNFLUORESCENZEN VON DIFFERENZIIERTEN UNBEHANDELTEN UND MIT <i>RIP2</i> -SPEZIFISCHER siRNA BEHANDELTEN C2C12- [1]] UND RD/18-ZELLEN [2]].....	67
ABB. 33: ANTEIL DER ZELLKERNE IN MHC-POSITIVEN ZELLEN IM VERGLEICH ZWISCHEN UNBEHANDELTEN UND MIT <i>RIP2</i> -SPEZIFISCHER siRNA BEHANDELTEN RD/18- UND C2C12-ZELLEN .....	68
ABB. 34: ANTEIL DER ZELLKERNE IN MEHRKERNIGEN ZELLEN IM VERGLEICH ZWISCHEN UNBEHANDELTEN UND MIT <i>RIP2</i> -SPEZIFISCHER siRNA BEHANDELTEN RD/18- UND C2C12-ZELLEN .....	69
ABB. 35: ÜBERSICHT ÜBER MÖGLICHE AUSWIRKUNGEN EINER PERMANENT HOHEN <i>RIP2</i> -GENEXPRESSION IN RHABDOMYOSARKOMZELLEN IM VERGLEICH ZU NORMALEN MYOBLASTEN .....	84

**III ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i> , Helix-Schleife-Helix-Strukturmotiv
BMP	<i>bone morphogenic proteins</i>
bp	Basenpaare
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i>
CARDIAK	<i>caspase-recruitment-domain(CARD)-containing IL-1<math>\beta</math> converting enzyme(ICE)-associated kinase</i>
CDK-Inhibitor	<i>cyclin dependent kinases-inhibitor</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
DAPI	4', 6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DD	<i>Death-Domain</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIK	<i>PKC<math>\delta</math>-interacting protein kinase</i>
DM	Differenzierungsmedium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleid acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E. coli	Escherichia coli
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
et al.	et alii, und andere
FADD	<i>FAS associated death domain</i>
FAS	TNF-Rezeptor Superfamilienmitglied
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , Fötales Kälberserum
FKHR	<i>forkhead domain</i>
g	Gramm
h	<i>hour</i> , Stunde

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

hRIP	<i>human receptor interacting protein</i>
IGF	<i>insulin like growth factor</i>
IKK	IκB kinase
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IκB	<i>inhibitor of κB</i>
JNK	<i>c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal activated kinase</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium/ -Agarplatten	Luria-Bertani-Medium/ -Agarplatten
LPS	Lipopolysaccharide
M	molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF	muskelenhancerbindende Familie
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-morpholino)-Propansulfonsäure
MRF	Muskelregulationsfaktoren
mRIP	<i>mouse receptor interacting protein</i>
mRNA	<i>messenger (Boten)-Ribonukleinsäure</i>
myf	<i>myogenic factor</i>
Myo D	<i>myogenic determination factor</i>
NEMO	<i>NF-κB-essential modulator</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i>
ng	Nanogramm

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

nm	Nanometer
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PM	Proliferationsmedium
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RB-Protein	Retinoblastomaprotein
RHIM	<i>RIP homotypic interaction motif</i>
RICK	<i>RIP-like-interacting CLARP kinase</i>
RIP	<i>Receptor Interacting Protein</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> (Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion)
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small inhibitory</i> Ribonukleinsäure
SSC	<i>Sodium Chloride-Sodium Citrate</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered Saline with Tween</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktosid

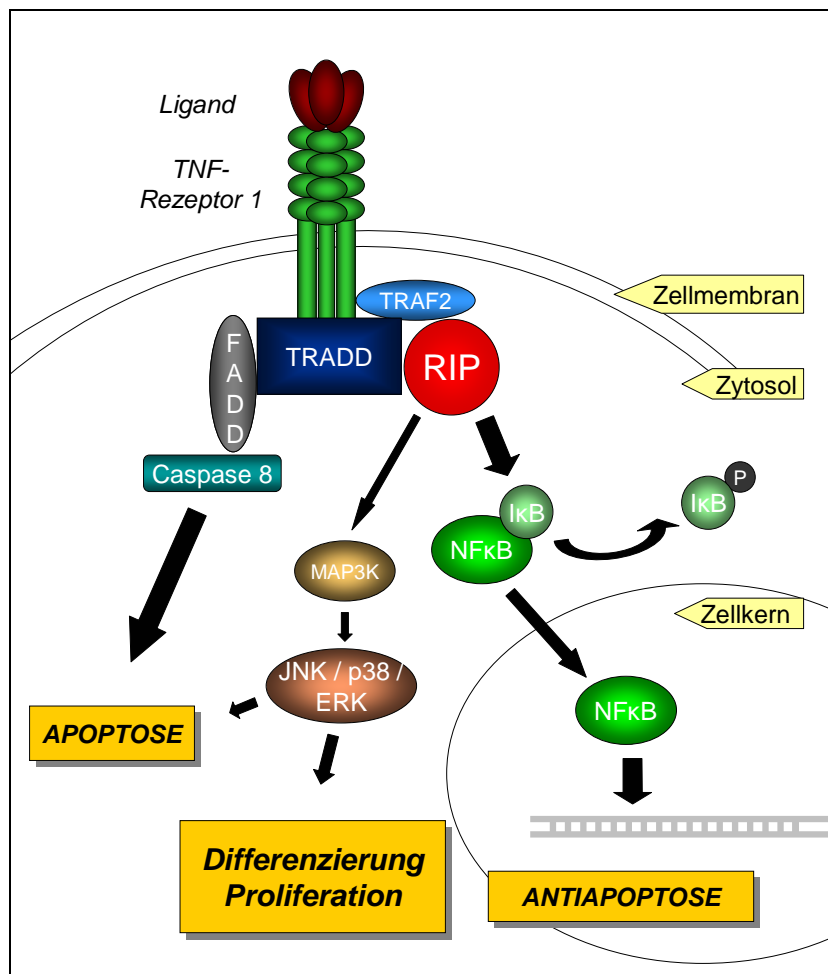


# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Receptor Interacting Protein (RIP)-Familie

RIP-Proteine konnten als zytoplasmatische Adaptorproteine von Rezeptoren der Tumornekrosefaktor-Rezeptor- (TNFR-) Superfamilie identifiziert werden. Inzwischen sind fünf Mitglieder aus der Familie der RIP-Proteine näher bekannt.

Bei der Familie der TNF-Rezeptoren handelt es sich um ein transmembranäres Liganden-Rezeptor-System, welches in unterschiedliche physiologische Prozesse involviert ist (Übersicht bei Aggarwal, 2003). Die Mitglieder der TNFR-Superfamilie besitzen keine eigene endogene Enzymaktivität, daher erfolgt die Weiterleitung der extrazellulären Signale über eine schrittweise Rekrutierung von Signalproteinen an die zytoplasmatische Rezeptordomäne. Diese Adaptorproteine lassen sich insbesondere zwei Gruppen zuordnen: Entweder der TRAF-(TNF *receptor associated factor*)-Familie oder der Gruppe der *Death-Domain* (DD)-Proteine. Bei der DD handelt es sich um ein spezielles Motiv, welches häufig an der Induktion von apoptotischen Prozessen beteiligt ist.



**Abb. 1: Signaltransduktionsweg des TNF-Rezeptors 1 im Zusammenhang mit ausgewählten zytoplasmatischen Adaptorproteinen (modifiziert nach Baker und Reddy 1998)**

Durch die Bindung eines Liganden, z.B. TNF $\alpha$ , an einen Rezeptor der TNF-Rezeptor-Superfamilie (hier: TNFR-1) werden intrazellulär verschiedene Adaptorproteine an eine sogenannte „*death domain*“ (Todesdomäne) gebunden. In Abhängigkeit von den rekrutierten Proteinen können sowohl zytotoxische als auch zytoprotektive Signale übermittelt werden. Proapoptotische Signale werden zum einen über TRADD (TNF receptor associated death domain) und zum anderen über FADD (FAS associated death domain) vermittelt. FADD kann durch die Spaltung von Caspase 8-Proenzymen eine Caspasenkaskade auslösen, an deren Ende die Zerstörung der chromosomalen DNA durch Endonukleasen und der apoptotische Zelltod stehen. Durch die Bindung weiterer Faktoren wie TRAF2 (TNFR associated factor-2) und insbesondere RIP (*receptor interacting protein*) an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors kommt es durch die Phosphorylierung des I $\kappa$ B- (*inhibitor of  $\kappa$ B*)-Komplexes zur Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (*nuklear factor  $\kappa$ B*). NF- $\kappa$ B kann daraufhin in den Zellkern eindringen und die Transkription derjenigen Gene aktivieren, welche in erster Linie antiapoptotische, immunregulatorische und entzündungsfördernde Effekte vermitteln. Des Weiteren wurde festgestellt, dass auch Proteine der Familie der MAPKs (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) aktiviert werden können. Bei den aktivierten MAPKs handelt es sich um JNK (*c-Jun-NH2-terminal activated kinase*), p38 und ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*); durch sie können in Abhängigkeit vom Liganden Signale der Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose vermittelt werden.

In Abhängigkeit von der molekularen Zusammensetzung der an den intrazellulären Rezeptorteil rekrutierten Multiprotein-Signalkomplexe werden entweder Zellproliferation oder -differenzierung, sowie *Nuclear Transcription Factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B)-Aktivierung (Wiegmann *et al.* 1992; Rothe *et al.* 1994; Hsu *et al.* 1995) und Apoptose (Tartaglia *et al.* 1993; Grell *et al.* 1993) induziert.

### 1.1.1 Strukturen der RIPs

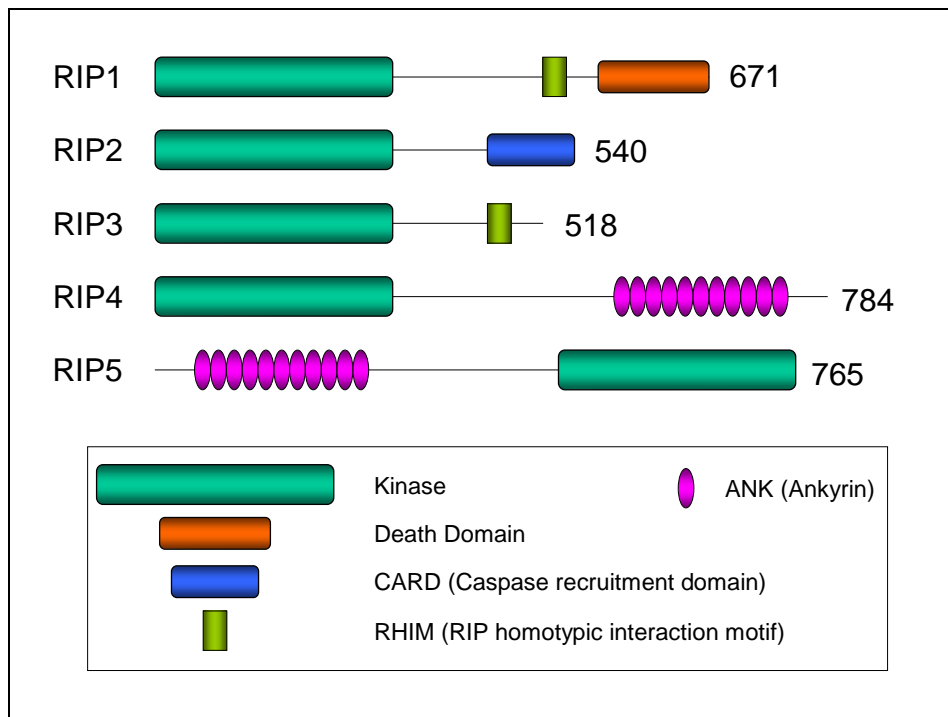
Inzwischen sind fünf verschiedene RIPs näher beschrieben worden. Das gemeinsame Strukturmerkmal von RIP, RIP2, RIP3 und RIP4 ist eine homologe aminoterminaler Serin-Threonin-Kinase-Domäne. Das Kernstück der jeweiligen RIP-Struktur bilden die carboxyterminalen Enden, an welchen unterschiedliche, für die einzelnen Proteine spezifische, Domänen lokalisiert sind. Alle RIPs weisen eine spezielle -strukturell ähnliche- Intermediärdomäne auf.

RIP1 (auch RIP genannt) ist das erste beschriebene Mitglied aus der RIP-Familie. An seinem carboxyterminalen Ende weist es eine Todesdomäne DD (*death domain*) auf, welche als Bindungsstelle an TNF-Rezeptoren, wie z.B. TNFR-1 oder Fas (CD95, Apo1) und an



andere Adaptormoleküle, wie TRADD (TNF *receptor associated death domain*), FADD (FAS *associated death domain*) sowie TRAF1, TRAF2, TRAF3 (TNFR *associated factor*) (Hsu *et al.* 1996, Stanger *et al.* 1995) fungiert.

C-terminal konnte außerdem eine 35 Aminosäuren lange Region identifiziert werden, die als RHIM (*RIP homotypic interaction motif*) bezeichnet wird und u.a. der Interaktion mit anderen Proteinen, speziell RIP3 dient.



**Abb. 2: Familie der *Receptor interacting proteins*: Schematische Darstellung ihrer Domänenstrukturen (modifiziert nach Meylan und Tschopp 2005)**

Schematisch dargestellt sind die Proteine RIP1 bis 5. Zur Veranschaulichung der einzelnen Domänen sind diese in unterschiedlicher Farbe und Form abgebildet. Die Zahlenangaben rechts neben den jeweiligen schematischen Proteinstrukturen kennzeichnen die Anzahl der im jeweiligen Protein enthaltenen Aminosäuren.

Die intermediäre Domäne mit einer  $\alpha$ -Helix-Struktur ist sowohl für die Bindung als auch für die Rekrutierung der IKKs (*I $\kappa$ B kinases*) zum aktivierten TNFR-1-Komplex (Hsu *et al.* 1996) notwendig.

*In vitro* wurde nachgewiesen, dass eine Überexpression des *rip1*-Gens sowohl eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Hsu *et al.* 1996) als auch Apoptose (Stanger *et al.* 1995, Grimm *et al.* 1996, Hsu *et al.* 1996) induzieren kann.

RIP2 – in der Literatur auch als RICK (*RIP-like-interacting CLARP kinase*) oder CARDIAK (*caspase-recruitment-domain(CARD)-containing IL-1 $\beta$  converting enzyme(ICE)-associated kinase*) bezeichnet – interagiert ebenfalls mit den intrazellulären Domänen von Rezeptoren der Todesrezeptorfamilie, wie z.B. TNFR-1 oder TLR (*toll-like receptor*). RIP2 weist im

Gegensatz zu RIP1 eine  $\alpha$ -helikale CARD (*caspase activation and recruitment domain*)-Domäne am C-terminalen Ende auf. CARD-Domänen können entsprechend der DD von RIP1 über die Anlagerung von spezifischen Adaptorproteinen die Induktion von apoptotischen Prozessen vermitteln (Inohara *et al.* 1998, McCarthy *et al.* 1998, Thome *et al.* 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass neben NF- $\kappa$ B über eine Komplexbildung mit TRAF1-, -5-, -6- oder -2-Molekülen auch die MAPKs (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) JNK (*c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal activated kinase*) kinaseunabhängig und ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase*) kinaseabhängig (Thome *et al.* 1998, Navas *et al.* 1999) aktiviert werden.

RIP3 unterscheidet sich von den anderen RIP-Proteinen durch eine einzigartige C-terminale Domäne, deren Sequenz keinerlei Homologie zu anderen bekannten Proteinen aufweist (Padzernik *et al.* 1999, Sun *et al.* 1999, Yu *et al.* 1999).

Aufgrund der Ähnlichkeit zu DD-Strukturen interagiert RIP3 mit den proapoptotischen Rezeptoren FAS, FADD und TNF-R1 und auch Adaptorproteinen, wie TRAF2 und den Caspasen-2, -8, -9, und -10. Eine Bindung an RIP1 erfolgt mit Hilfe des am Carboxylende lokalisierten homotypischen Interaktionsmotives RHIM.

Es konnte gezeigt werden, dass RIP3 eine TNF $\alpha$ -vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung sowie Apoptose auslöst. Wie bei den anderen RIPs wird die Kinaseaktivität für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung und Apoptose nicht benötigt.

RIP4 wurde zunächst unabhängig voneinander bei der Maus und beim Menschen beschrieben, daher sind in der Literatur auch die Bezeichnungen DIK (*PKC $\delta$ -interacting protein kinase*) (Bähr *et al.* 2000) für humanes RIP4 und PKK (*protein kinase C-associated kinase*) (Chen *et al.* 2001) für Maus-RIP4 gebräuchlich. Die Besonderheit von RIP4 zeigt sich in der carboxyterminalen Domäne, sie enthält 11 Ankyrineinheiten (Bähr *et al.* 2000, Chen *et al.* 2001, Holland *et al.* 2002, Meylan *et al.* 2002). Interessanterweise können die aminoterminalen Kinasedomäne und die Ankyrineinheiten homodimerisieren und in Folge dessen die Kinaseaktivität beeinflussen (Meylan *et al.* 2002).

Experimentell konnte gezeigt werden, dass RIP4 kinaseabhängig - mit Hilfe von Adaptorproteinen der TRAF-Familie – NF- $\kappa$ B (Meylan *et al.* 2002; Moran *et al.* 2002), sowie den JNK-AP-1 Signaltransduktionsweg induziert.

Erst kürzlich wurde RIP5 identifiziert. Die Besonderheit der Struktur von RIP5 ist die carboxyterminale, RIP-spezifische Kinasedomäne (Zha *et al.* 2004), die eine große Homologie zu RIP1 aufweist. Sowohl die intermediäre, als auch die aminoterminalen Domäne zeigen wenig Homologie zu anderen bekannten Proteinen. Am N-terminalen Ende konnten einige Ankyrineinheiten – ähnlich RIP4 – identifiziert werden (Zha *et al.* 2004; Meylan *et al.* 2005). *In vitro* wurde gezeigt, dass die Überexpression von RIP5 sowohl caspaseabhängigen als auch caspaseunabhängigen Zelltod induzieren kann.

### 1.1.2 Physiologische Funktionen der RIPs

Um die physiologischen Funktionen der einzelnen RIPs weiter charakterisieren zu können, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen spezifische *knockout*-Mäuse generiert. Den

Mäusen wurde dabei jeweils das kodierende Gen für RIP1, RIP2, RIP3 und RIP4 vollständig entfernt.

RIP1 *knockout*-Mäuse scheinen bei der Geburt normal entwickelt zu sein, bleiben aber sogleich in der Entwicklung zurück und sterben spätestens drei Tage nach der Geburt. Bei der Sektion konnten Ödeme am Hals, in den Achselregionen und in der Leistengegend nachgewiesen werden, während sich die inneren Organe ohne Auffälligkeiten darstellten. Veränderungen zeigten sich insbesondere im Lymph- und Fettgewebe: Histologisch waren massiver Zelltod, Nekrosen und Granulozyteninfiltration vor allem im Thymus und in den Lymphknoten, aber auch in der Unterhaut und im braunen Fettgewebe nachweisbar.

Es liegt daher nahe, dass die primäre physiologische Funktion von RIP1, insbesondere in Lymph- und Fettgeweben, eine TNF $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist (Kelliher *et al.* 1998), um proinflammatorische und antiapoptotische Signale zu aktivieren.

RIP2-defiziente Mäuse zeigen im Gegensatz zu RIP1 *knockout*-Mäusen eine normale Überlebensrate und Fruchtbarkeit. Es konnte jedoch anhand dieser Tiere gezeigt werden, dass RIP2 eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort der Zellen spielt: Gegenüber einer Infektion mit dem intrazellulären Erreger *Listeria monocytogenes* zeigten die RIP2 *knockout*-Mäuse eine verminderte Abwehrfähigkeit sowie eine herabgesetzte Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Andererseits waren die Mäuse gegenüber dem durch Lipopolysaccharide (LPS) induzierten endotoxischen Schock resistent. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass RIP2-defiziente Makrophagen sowohl Defekte bezüglich der T-Zell-Rezeptorinduzierten NF- $\kappa$ B- oder MAPK-Aktivierung, als auch der Produktion proinflammatorischer Zytokinen - wie z.B. Interleukin 2 oder TNF - und der T-Zell-Proliferation aufweisen. *In vivo* resultieren hieraus Defekte bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort.

Abschließend lässt sich sagen, dass ein Fehlen von RIP2 sowohl Defizite bei der Übertragung von Signalen der Rezeptoren für die angeborenen Immunität, wie z.B. *Toll-like receptor* (TLR), als auch bei den antigenspezifischen Rezeptoren der erworbenen Immunität, herrührend aus dem Fehlen von Antigen induzierter T-Zell-Proliferation und NF- $\kappa$ B-Aktivierung, verursachen kann. Die Funktion von RIP2 scheint also die Koordination der angeborenen und der erworbenen Immunität zu sein (Chin *et al.* 2002, Kobayashi *et al.* 2002, Ruefli-Brasse *et al.* 2004).

RIP3 *knockout*-Mäuse sind gesund, fruchtbar und normal entwickelt. Bei der histologischen Untersuchung der Hauptorgane waren keine Abweichungen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nachweisbar. Es wurden keine Anzeichen einer NF- $\kappa$ B-Aktivierungsdysregulation im Rahmen des TNF-R1- und TLR-Signaltransduktionsweges nachgewiesen. RIP3 scheint also sowohl für die normale Mausentwicklung, als auch für die Entwicklung von Makrophagen, Lymphozyten und natürliche Killerzellen erlässlich zu sein. RIP3-defiziente Zellen zeigen eine normale Sensivität gegenüber apoptotischen Stimuli: in *rip3*<sup>-/-</sup> Thymozyten konnte keine von Wildtyp abweichende Apoptose festgestellt werden (Newton *et al.* 2004).

RIP4-defiziente Mäuse sterben innerhalb kürzester Zeit nach der Geburt, da das Epithel an sämtlichen externen Körperöffnungen (Nase, Mund, Anus) weiterhin fusioniert ist und sie

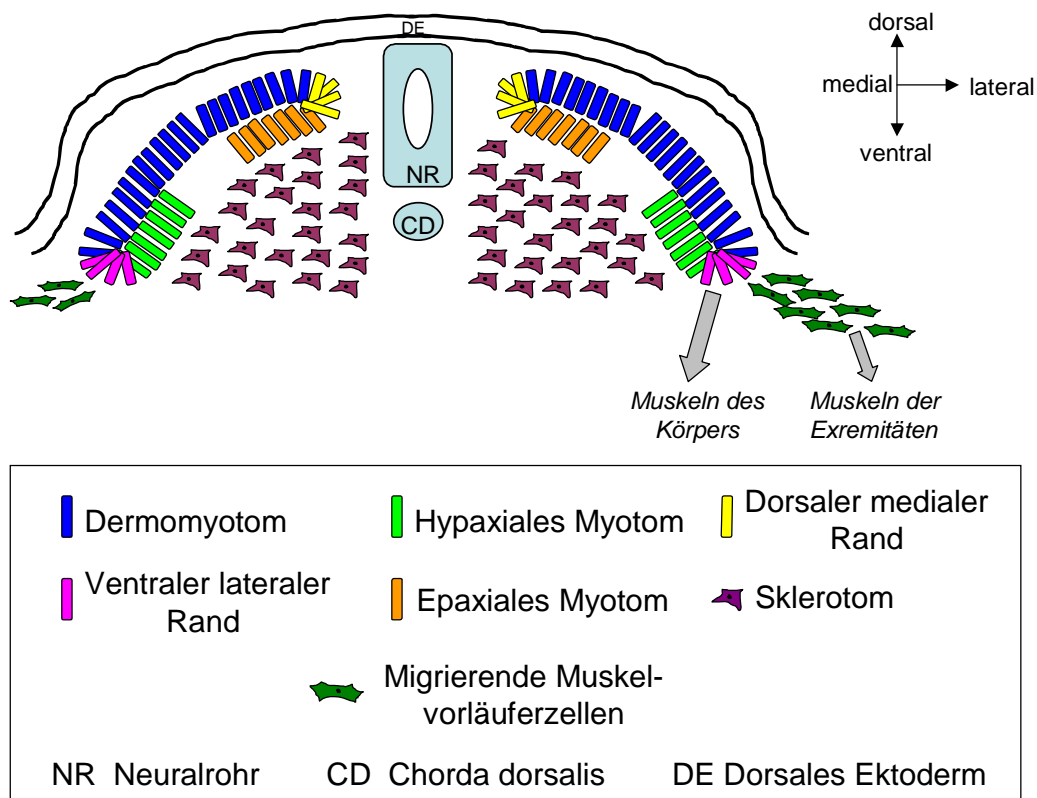
daher nach der Geburt nicht in der Lage sind, zu atmen. Immunhistochemisch und histologisch konnte gezeigt werden, dass die gesamte Haut eine abnormale epidermale Differenzierung sowie starke morphologische Defekte aufweist. Diese Abnormalitäten weisen starke Parallelen zu *IKK $\alpha$ -knockout* Mäusen auf. Es zeigte sich somit, dass RIP4 einen wichtigen Faktor für das Wachstum und die Differenzierung der Epidermis, sowie eine essentielle Komponente des Signalweges darstellt, welcher die Keratinozytendifferenzierung kontrolliert (Holland *et al.* 2002).

## 1.2 Muskelzellendifferenzierung

Die Muskelzellendifferenzierung ist ein komplexer Vorgang, der sich aus zahlreichen molekularen und zellulären Ereignissen zusammensetzt.

### 1.2.1 Embryonale Entwicklung der Muskelzellen

Bei Vertebraten bilden die paarweise entlang des Neuralrohres liegenden Somiten den Ausgangspunkt für die Muskelzellendifferenzierung. Diese zunächst noch multipotenten Zellen besitzen die Fähigkeit, sich zu Knorpel, Skelettmuskel, Haut, Endothel, glatter Muskulatur und Bindegewebe weiterzuentwickeln (Christ und Ordahl 1995).



**Abb. 3: Skelettmuskelentwicklung aus den Somiten gezeigt an einem schematisierten Embryoquerschnitt (modifiziert nach Perry und Rudnicki 2000)**

Das Wachstum des Dermomyotoms führt durch Zellwanderung des dorsomedialen Randes und ventrolateralen Randes zu der Bildung des epaxialen bzw. hypaxialen Myotoms. In den Regionen der Extremitätenknospen wandern Muskelvorläuferzellen aus dem ventrolateralen Rand aus, um die Muskeln der Extremitäten zu formen. Die Muskeln des Körpers entspringen dem in der Embryonalentwicklung sich ständig erweiternden ventralen Myotom.

Durch den Einfluss verschiedener intra- und extrazellulärer Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Zytokinen, teilen sich die Somiten in das ventrale mesenchymale Sklerotom und das dorsale epitheliale Dermomyotom. Das direkt unter dem Ektoderm liegende Dermomyotom bildet die zelluläre Grundlage für die Hautentwicklung und die Muskeln des Körpers und der Extremitäten (Christ und Ordahl 1995, Brand-Saberi und Christ 2000).

Durch Zellwanderung vom Rand des dorsomedialen Dermomyotoms bildet sich das epaxiale Myotom, welches aus einer Ansammlung von postmitotischen Muskelvorläuferzellen besteht. In ähnlicher Weise migrieren auch die Zellen vom ventrolateralen Rand des Myotoms, und bilden das hypaxiale Myotom.

Während der weiteren Muskeldifferenzierung bilden sich aus dem epaxialen Teil des Myotoms die tiefen Muskeln des Rückens (Huang und Christ 2000).

Ein Teil der Muskelvorläuferzellen migriert in einem proliferierenden undifferenzierten Zustand aus dem ventro-lateralen Anteil des Dermomyotoms in Richtung der Extremitätenknospen, um dort die Gliedmaßenmuskulatur auszubilden (Ordahl und Le Duarin 1992, Christ und Ordahl 1995). Erst nach Erreichen ihrer jeweiligen Zielregion differenzieren sie zu Myozyten. Der laterale Anteil des Dermomyotoms ist auch der Ursprung der ventralen Körpermuskulatur.

### 1.2.2 Regulation der Muskelzellendifferenzierung

Die koordinierte Regulation der Myoblastenproliferation und -differenzierung deutet auf einen komplizierten Komplex von Signalinteraktionen hin, durch welche Wachstum und Regeneration während der Embryonalentwicklung streng kontrolliert werden.

Am Anfang der epaxialen Myogenese, also der Spezifizierung von Muskelzellen, werden Signalmoleküle aus den umliegenden Geweben – insbesondere vom Neuralrohr und der Chorda dorsalis (Brand-Saberi *et al.* 1993) - ausgesandt (Tajbakhsh und Buckingham 2000). Es handelt sich hierbei um die Signalmoleküle *Sonic hedgehog (Shh)* und *Wnt*. Durch sie wird die Expression von Schlüsselregulatorgenen wie den *Homeobox-/ paired box-* Transkriptionsfaktoren *Pax3* und *Pax7* (Mansouri *et al.* 1999), sowie der frühen Muskelregulationsfaktoren (MRFs), wie z.B. *Myf 5* (Tajbakhsh *et al.* 1998), induziert.

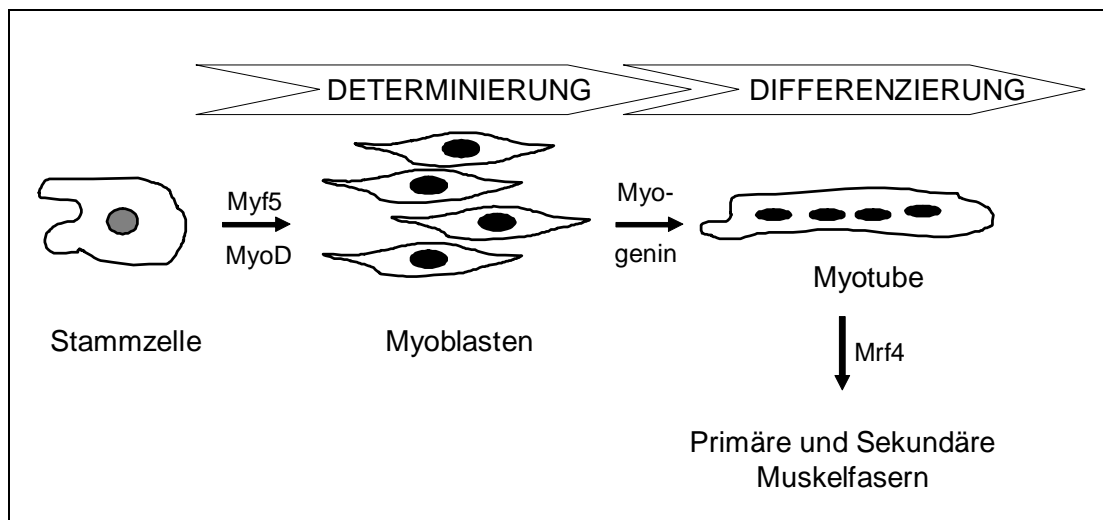
Eine besondere Rolle bei der Migration der Vorläuferzellen zu den Gliedmaßenknospen spielt *Pax3*: Mäuse, die eine spontane Mutation von *Pax3* aufweisen, zeigen eine reduzierte Proliferation und eine gestörte Migration der Muskelvorläuferzellen im Dermomyotom. Daher

sind insbesondere Störungen bei der Bildung der Skelettmuskeln von Extremitäten, Zwerchfell und Zunge zu beobachten (Bober *et al.* 1994, Goulding *et al.* 1994).

*Pax7* wird insbesondere in proliferierenden Myoblasten der zentralen und dorsomedialen Region des Dermomyotoms exprimiert, von wo aus die epaxiale Muskulatur gebildet wird (Seale *et al.* 2000). *Pax7-knockout* Mäuse zeigen einen geringeren Durchmesser der Muskelfibrillen, vor allem in den Extremitätenmuskeln und dem Diaphragma, sowie Fehlen von Satellitenzellen, welche für Regenerationsprozesse wichtig sind.

Eine Schlüsselrolle bei der Muskelentwicklung spielen vier Proteine: MyoD1 (*Myogenic Determination Factor 1*, Myf3), Myf5, Myogenin (Myf1) und MRF4 (Myf6/ Herkulin), die auch als Muskelregulationsfaktoren (MRFs) bezeichnet werden. Sie gehören zur Familie der DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren mit dem basischen Helix-Schleife-Helix-Strukturmotiv (*basic helix-loop-helix*, bHLH). Ihre Aufgabe ist es, die Aktivierung von skelettmuskelspezifischen Genen zu kontrollieren: MyoD und Myf5 determinieren eine multipotente Vorläuferzelle zum Myoblasten (Tajbakhsh und Buckingham 2000).

Durch Expression der für die MRFs kodierenden Gene werden weitere Gene, die den Ausstieg aus dem Zellzyklus im irreversibel spezifizierten, aber noch undifferenzierten, proliferierenden und migrierenden Myoblasten vorbereiten, aktiviert. Um das Differenzierungsprogramm zu Myozyten zu starten, spielt die Expression des *p21*-Gens, welches für einen Inhibitor von *cyclin dependent kinases* (CDKs) kodiert und die Dephosphorylierung des Retinoblastoma- (Rb-) Proteins induziert, eine entscheidende Rolle.



**Abb. 4: Schema der Muskeldifferenzierung (modifiziert nach Sabourin und Rudnicki 2000)**

Aus einer multipotenten Mesenchymzelle entstehen durch Determinierung mit Hilfe der Muskelregulationsfaktoren Myf5 und MyoD Myoblasten. Unter dem Einfluss des Differenzierungsfaktors Myogenin ändert sich durch Fusion der Myoblasten der Phänotyp der Zellen zu vielkernigen Myotuben. MRF4 bewirkt die weitere Differenzierung zu primären und sekundären Muskelfasern.

Im Anschluss daran fördern Myogenin und MRF4 die Differenzierung der aus dem Zellzyklus ausgeschiedenen Myoblasten zu terminal differenzierten multinukleären Myotuben (Tajbakhsh und Buckingham 2000).

Durch Maturation der Myotuben entstehen primäre Muskelfasern. Sie exprimieren Gene, die für kontraktile Proteine kodieren, wie z.B. *myosin heavy chain* (MHC) (Ontell *et al.* 1993). Diese auch als embryonale Muskelfasern bezeichneten Muskelzellen sind dafür zuständig, den Muskeltyp sowie die Muskelform und -lokalisierung zu bestimmen (Arnold und Winter 1998).

Einige Muskelvorläuferzellen bilden ein Reservoir von ruhenden undifferenzierten Stammzellen (Satellitenzellen) aus, welche für Wachstum und Reparatur der Skelettmuskulatur in der späten pränatalen und postnatalen Phase benötigt werden (Charge und Rudnicki 2004).

### 1.3 RIP-Proteine und Myoblastendifferenzierung

Munz *et al.* (2002) konnten durch Genexpressionsanalysen von differenzierten und undifferenzierten C2C12-Myoblasten zeigen, dass nach der Induktion der Differenzierung die Expression einer Vielzahl von Genen ansteigt oder absinkt. Als besonders interessant im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist dabei die Repression des Gens zu bewerten, welches für RIP2 kodiert:

RIP2 ist ein Aktivator der MAPKs JNK und ERK2 (Thome *et al.* 1998, Navas *et al.* 1999). Über diese Signaltransduktionswege kann eine Regulation der myogenen Differenzierung erfolgen. Im Gegensatz dazu hat die Regulation des Apoptosepfades durch RIP-Proteine keinen Einfluss auf die Muskelzelldifferenzierung (Munz *et al.* 2002).

Außerdem ist bekannt, dass RIP2 ein Aktivatorprotein von NF- $\kappa$ B ist (Inohara *et al.* 1998, McCarthy *et al.* 1998, Thome *et al.* 1998). In Myoblasten ist der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ein wichtiger Stimulator der Zellproliferation und ein Inhibitor von Differenzierungsprozessen (Guttridge *et al.* 1999), was bedeutet, dass eine Repression der NF- $\kappa$ B-Aktivität eine wichtige Voraussetzung für die myogene Differenzierung ist. Es liegt also die Vermutung nahe, dass dieser Signaltransduktionsweg bei der Muskelzelldifferenzierung eine sehr bedeutende Rolle spielt.

In den von Munz *et al.* (2002) durchgeführten Experimenten wurde - um die Rolle von RIP2 bei der Muskelzelldifferenzierung näher charakterisieren zu können - in C2C12-Myoblasten durch Kultivierung der Zellen in einem Medium mit geringem Serumanteil die Differenzierung induziert und zu bestimmten Zeitpunkten die gesamtzelluläre RNA isoliert. Mittels cDNA-*Microarrays* und subtraktiver cDNA-Hybridisierung konnte dabei gezeigt werden, dass C2C12-Zellen vor der Induktion der Differenzierung eine sehr hohe Basalexpression des *rip2*-Gens aufwiesen, sich jedoch schon 16 Stunden nach Induktion der Differenzierung eine stark reprimierte *rip2*-Expression zeigte, die auch im weiteren Differenzierungsverlauf stetig abnahm. Die Überprüfung des Differenzierungsstatus der Zellen erfolgte dabei zum einen lichtmikroskopisch, sowie zum anderen durch die Analyse der Expression myogener Differenzierungsmarker, wie z.B. des *myogenin*-Gens.

Da es sich bei C2C12-Zellen um eine immortalisierte Zelllinie handelt, wurden die Ergebnisse zusätzlich an kultivierten primären Mäusemyoblasten überprüft: Auch hier zeigte sich zunächst eine hohe *rip2*-Basalexpression, welche dann nach Induktion der Differenzierung sehr schnell herunterreguliert wurde (Munz *et al.* 2002).

Um die Funktion von RIP2 in Myoblasten zu untersuchen, führten Munz *et al.* im Anschluss daran Überexpressionsstudien mit Hilfe eines retroviralen Expressionssystems durch, wobei das *rip2*-Gen in C2C12-Myoblasten überexprimiert wurde. Dabei zeigte sich, dass diese *rip2*-überexprimierenden Muskelzellen nicht wie die unveränderten Kontrollmyoblasten in der Lage waren, in Differenzierungsmedium zu differenzieren; bei ihnen blieb der proliferierende Status erhalten. Hieraus lässt sich schließen, dass die Repression der *rip2*-Genexpression als ein sehr kritischer Punkt für die Initiation der myogenen Differenzierung anzusehen ist.

Auch die Expression von *rip* und *rip3* wurde nach der Induktion der Differenzierung in C2C12-Zellen überprüft: Sowohl *rip* als auch *rip3* waren in proliferierenden Myoblasten exprimiert. *rip* zeigte ähnlich wie *rip2* eine – wenn auch schwächere - Repression in differenzierenden C2C12-Zellen. Die Expression von *rip3* war eher schwach und blieb im Verlaufe des Differenzierungsprozesses mehr oder weniger konstant (Munz *et al.* 2002).

### 1.4 Rhabdomyosarkome

Rhabdomyosarkome sind vornehmlich im Kindesalter auftretende Tumorerkrankungen. Bis zum frühen Erwachsenenalter gehören sie zu den häufigsten Weichteiltumoren.

Die Tumoren sind insbesondere im Kopf-Hals-Bereich, im Urogenitalsystem und an den Extremitäten lokalisiert. Histopathologisch können zwei vorwiegend in der Kindheit auftretende Haupttypen unterschieden werden: Der alveoläre und der weniger aggressive embryonale Tumortyp (Barr 1997).

Diese klinischen und pathologischen Unterschiede sind auf genetische Veränderungen in myogenen Vorläuferzellen, welche unterschiedliche Mechanismen der Tumorigenese auslösen, zurückzuführen (Übersicht bei Xia *et al.* 2002).

#### 1.4.1 Ätiologie der Rhabdomyosarkome

Das Ursprungsgewebe von Rhabdomyosarkomen ist auf partiell differenziertes, pluripotentes embryonales mesenchymales Gewebe zurückzuführen. Die Tumorentstehung kann daher an allen Körperstellen erfolgen, an welchen mesenchymales Gewebe vorhanden ist.

Es wird vermutet, dass Rhabdomyosarkome durch eine Unterbrechung des regulären Wachstums- und Differenzierungsprozesses von Skelettmuskelvorläuferzellen entstehen, dafür spricht auch, dass die am Tumor beteiligten Muskelzellen einen geringen Differenzierungsgrad bzw. ein Verharren auf einer frühen Stufe des Differenzierungsprogrammes aufweisen (Astolfi *et al.* 2001, Merlino *et al.* 1999). Weiterhin findet man hohe Proliferationsraten, da nicht – wie normalerweise im Zuge des myogenen Differenzierungsprozesses – eine Induktion von Zellzyklusinhibitoren und damit ein Ausscheiden aus dem Zellzyklus erfolgt.



1.4.2 Pathologie und Biologie

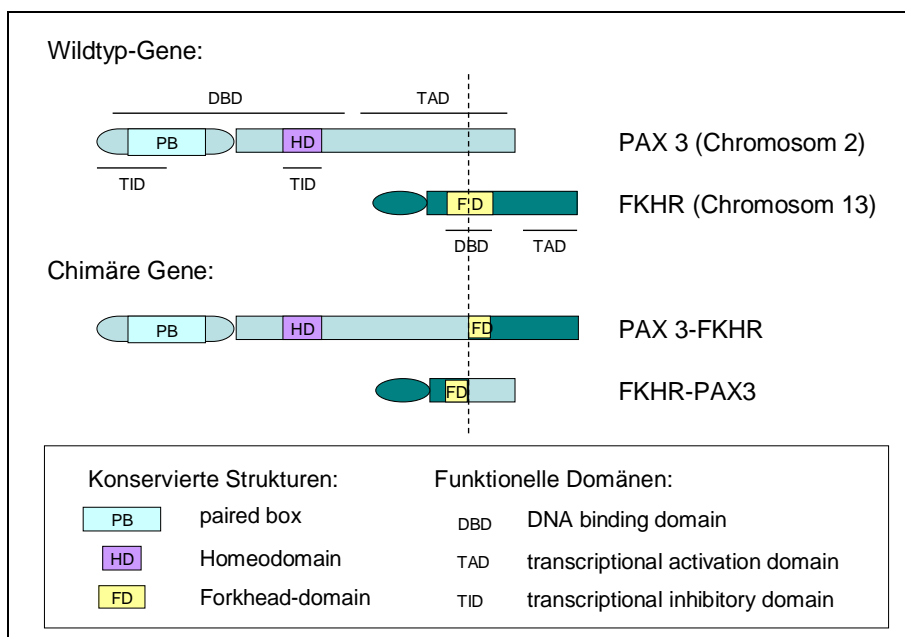
Am häufigsten tritt das weniger aggressive embryonale Rhabdomyosarkom auf: Betroffen sind vor allem Säuglinge und Kinder bis zum 15. Lebensjahr im Kopf-Hals-Bereich (Orbita, Gehörgang, Nase und Nasennebenhöhlen) sowie im Urogenitaltrakt und Retroperitoneum (Harnblase, Prostata, Hoden, Vagina).

Weniger häufig kommt das alveoläre Rhabdomyosarkom vor, dabei sind die Tumoren bevorzugt an Rumpf und an den Extremitäten lokalisiert; überwiegend sind Heranwachsende und junge Erwachsene im Alter zwischen dem 10. und 25. Lebensjahr betroffen.

In der Literatur werden zwei weitere Tumortypen beschrieben: Bei dem botryoiden Rhabdomyosarkom handelt es sich um einen Subtyp des embryonalen Rhabdomyosarkoms, welches sich an mit Mukosa überzogenen Hohlorganen ausbildet, während das pleomorphe Rhabdomyosarkom wenig Verbindung zu den kongenital auftretenden Rhabdomyosarkomtypen zu haben scheint, da es erst im späten Erwachsenenalter auftritt.

Es ist bekannt, dass das alveoläre Rhabdomyosarkom zum einen auf eine t(2,13) (q35;q14)-Gentranslokation und zum anderen etwas weniger häufig auf eine t(1,13) (p36;q14)-Translokation zurückzuführen ist (Davis *et al.* 1994). Dadurch werden Fusionsproteine aus Transkriptionsfaktoren der *paired box*- und *fork head*-Familien gebildet: PAX3-FKHR und PAX7-FKHR. FKHR ist ein Mitglied der *fork head transcription faktor*-Familie und weist eine N-terminale DNA-Bindungsdomäne sowie eine C-terminale Transkriptionsaktivationsdomäne auf.

Das PAX3-FKHR-Fusionsprotein ist ein aktiver Transkriptionsfaktor, der in der Lage ist an dieselben Domänen wie das Wildtypprotein PAX3 zu binden. Die *paired box*- und die *homeodomain*, d.h. die DNA-Bindungsdomäne, sowie die C-terminale Transkriptionsaktivierungsdomäne von FKHR sind intakt, während die *Forkhead*-Domäne verkürzt im Fusionsprotein vorliegt.



**Abb. 5: Beispielhaft dargestellt ist eine t(2;13) (q35;q14)-chromosomale Translokation beim alveolären Rhabdomyosarkom (Abbildung modifiziert nach Xia et al. 2002)**

Die PB (*paired box*), die HD (*Homeodomain*) und FD (*Forkhead-domain*) sind konservierte Strukturen der Gene. Der Fusionspunkt ist mit Hilfe der vertikalen gestrichelten Linie dargestellt. Die Funktionsdomänen werden durch horizontale schwarze Balken dargestellt. Jeweils die langen Arme der Gene *pax3* von Chromosom 2, bzw. *pax7* von Chromosom 1 fusionieren mit *fkhr* von Chromosom 13 (Barr et al. 1993).

Die Fusionsproteine zeichnen sich im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypproteinen durch eine veränderte Expression der entsprechenden Gene und eine veränderte DNA-Bindungs- und Aktivierungsfunktion von PAX3- und PAX7-Zielgenen (Fredericks et al. 1995, Bennicelli et al. 1996) aus. Dadurch werden Zellproliferation, -differenzierung und -apoptose moduliert und tragen letztendlich zum tumorösen Verhalten bei: Das PAX3-FKHR-Fusionsprotein ist insgesamt wesentlich effektiver in der Hemmung der myogenen Differenzierung als PAX3.

Transgene Mauslinien mit PAX3-FKHR-Fusionsproteinen zeigen zwar Defekte der Muskulatur an den Hintergliedmaßen, weisen jedoch kein Tumorwachstum auf, was vermuten lässt, dass PAX3-FKHR nicht alleine für die Tumorigenese verantwortlich ist, sondern vielmehr auch noch andere kooperierende genetische Veränderungen erforderlich sind (Übersicht bei Xia et al. 2002).

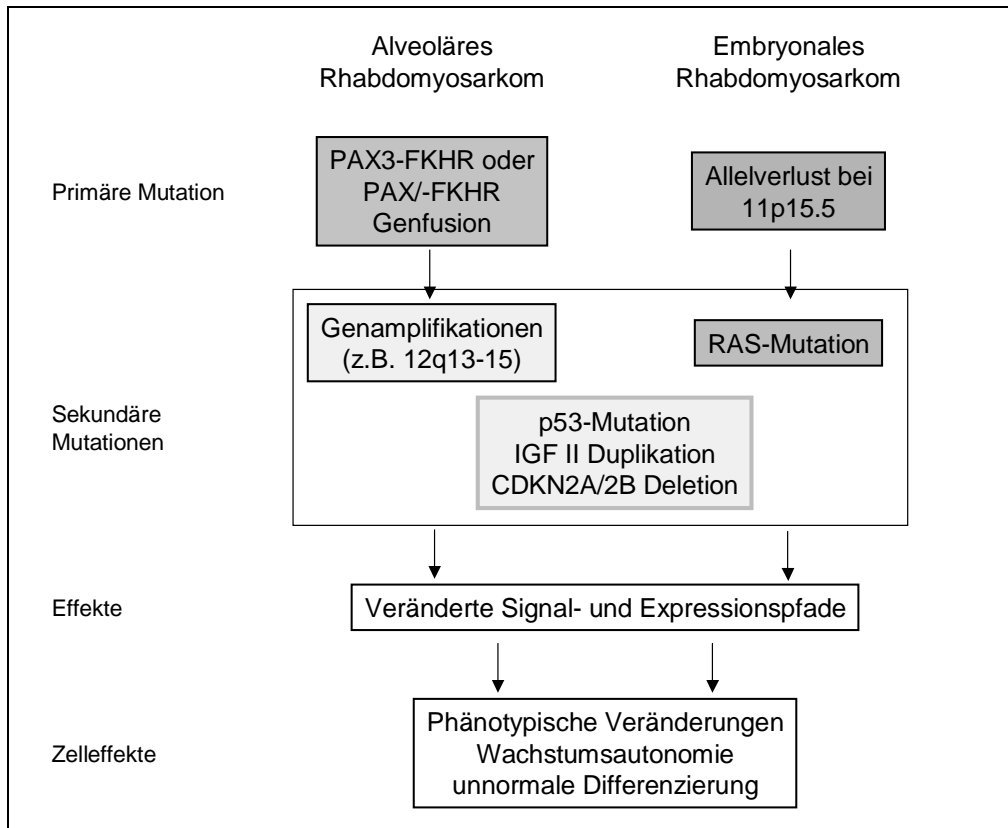
Die t(2;13) und t(1;13)-Gentranslokationen sind bei keinem weiteren Tumor bekannt und können als spezifischer Marker für alveoläre Rhabdomyosarkome betrachtet werden (Barr 1997).

Im Gegensatz dazu beruhen Rhabdomyosarkome vom embryonalen Typ meist auf einem Allelverlust innerhalb der chromosomalen Region 11p15.5.

Des Weiteren könnte, wie sich in Allelverluststudien mit Rhabdomyosarkomzellen zeigte, die Inaktivierung oder Mutation anderer sich innerhalb des Genlokus 11p15.5 befindlicher Gene, wie z.B. der für die Tumorsuppressoren H19 oder CDKN1C kodierenden Gene, eine entscheidende Rolle bei der Tumorigenese spielen (Übersicht bei Xia et al. 2002).

Inzwischen werden PAX3-/ PAX7-FKHR Fusionsgene und Allelverluste an der Lokalisation 11p15.5 lediglich als die genetischen Veränderungen betrachtet, die alveoläre und embryonale Rhabdomyosarkome charakterisieren. Es ist jedoch nachgewiesen, dass für die Tumorentstehung selbst noch weitere Faktoren eine Rolle spielen müssen. Hieraus kann deutlich abgeleitet werden, dass Rhabdomyosarkome erst durch einen Vielstufenprozess entstehen:

Für die Entstehung des alveolären Subtypus wurden auch häufig vorkommende Sekundärmutationen, wie beispielsweise die Amplifikation des mit Wachstumsgenen (z.B. *mdm2* und *cdk4*) assoziierten chromosomalen Lokus 12q13-15, identifiziert. Bei einer großen Anzahl von embryonalen Tumoren konnte ausserdem eine Veränderung der Protoonkogen-Familie *Ras* festgestellt werden.



**Abb. 6: Molekulare Pathogenese des embryonalen und des alveolären Rhabdomyosarkoms im Überblick**

Hierbei handelt es sich um eine Darstellung derjenigen genetischen Ereignisse, welche bei Rhabdomyosarkomen identifiziert werden konnten und eine Rolle bei der Tumorentstehung spielen könnten (modifiziert nach Barr 1997).

Neben genetischen Veränderungen, welche den Genlocus 11p15 des Wachstumsfaktors IGF II (*insulin like growth factor*) betreffen, konnten sowohl beim alveolären als auch beim embryonalen Rhabdomyosarkom Mutationen des Tumorsuppressorgens *p53* identifiziert werden.

Eine weitere Rolle bei der Tumorigenese wird schließlich dem Zellzyklusregulator CDKN2A/2B, dem Cdk-Inhibitor p16, welcher die Rb1-Funktion (Suppressor der Zellproliferation) reguliert, sowie dem Rb-Protein selbst zugesprochen.

Aus dem Gesagten wird ersichtlich, dass viele verschiedene molekulare Mechanismen mit der Entstehung der beiden Rhabdomyosarkomsubtypen verbunden sind: Infolge veränderter Signaltransduktionswege und abnormer Genexpressionsmuster können phänotypische Veränderungen, Wachstumsautonomie und abnormale Differenzierung von Zellen zur Tumorentstehung beitragen (Barr 1997).

#### 1.4.3 Rhabdomyosarkome in der Veterinärmedizin

Rhabdomyosarkome sind in der Veterinärmedizin die am häufigsten auftretenden Tumoren mit Skelettmuskelgewebsursprung; sie machen bei Haustieren jedoch weniger als ein

Prozent aller spontan auftretenden Tumoren aus. Es liegt keinerlei tierartspezifische, Geschlechts-, Alters-, Rasse- oder regionale Prädisposition vor (Ginel *et al.* 2002).

Auch in der Veterinärmedizin werden Rhabdomyosarkome aufgrund histologischer Kriterien in Kategorien eingeteilt: Wie in der Humanmedizin wird zwischen alveolärem und embryonalem – wozu auch hier der botryoide Typ gehört - Rhabdomyosarkom unterschieden.

Entsprechend der Humanmedizin werden pluripotente Mesenchymzellen als der Ursprungsort der Tumoren betrachtet. Es wird vermutet, dass pränatale Vorkommnisse oder chromosomale Abnormalitäten Rhabdomyosarkome schon im Fetus induzieren. Weitergehende molekularbiologische Daten sind für den Bereich der Veterinärmedizin jedoch nicht bekannt.

Das ebenfalls in der Literatur beschriebene pleomorphe Rhabdomyosarkom tritt insbesondere bei älteren Tieren in Erscheinung (Enzinger und Weiss), dieses lässt einen nicht kongenitalen Ursprung vermuten.

Bei Tieren konnte das Auftreten des Tumors insbesondere in der Harnblase (Halliwell *et al.* 1974, Kelly 1973, Kim *et al.* 1996, Kuwamura *et al.* 1998, Pletcher *et al.* 1981, Senior *et al.* 1993, Stamps *et al.* 1968, Takiguchi *et al.* 2002, van Vechten *et al.* 1990), Pharynx (Ladds and Webster 1971) und seltener im Herzmuskel (Akkoc *et al.* 2006, Gonin-Jmaa *et al.* 1996, Krotje *et al.* 1990, Perez *et al.* 1998), im Larynx (Block *et al.* 1995, Madewell *et al.* 1988), in der Skelettmuskulatur (Sundberg *et al.* 1991, Ginel *et al.* 2002), im Zahnfleisch (Kim *et al.* 1996), in der Urethra (Clark *et al.* 1984) in der Vagina (Suzuki *et al.* 2006), in der Trachea (Yanoff *et al.* 1996), retrobulbär (Necas *et al.* 2003), perianal (Ueno *et al.* 2002), parameningeal (Illanes 2002), in der Zunge (Lascelles *et al.* 1998, Brockus *et al.* 2004) und im Uterus (Torbeck *et al.* 1980) nachgewiesen werden.

Das Auftreten von Rhabdomyosarkomen wurde in den letzten Jahrzehnten bei verschiedenen Tierarten beschrieben, beispielsweise bei Rindern (Aoyagi *et al.* 2000, Jimma *et al.* 1999, Matsui *et al.* 1991), Schafen (Donnelly *et al.* 1989, Tanaka *et al.* 1993), Pferden (Hamir 1982, Torbeck *et al.* 1980, Turnquist *et al.* 1993), Frettchen (Sakai *et al.* 2004), Ratten (Conner 1994, Glaister 1981, Kerry *et al.* 1995, Minato *et al.* 1983, Radi 2006, Tageldin *et al.* 1981), Katzen (Minkus *et al.* 1997, Patnaik *et al.* 1986), Mäusen (Sundberg *et al.* 1991), Affen (Blanchard *et al.* 1988), Damwild (Holscher *et al.* 1977, Kidd *et al.* 1989), Vögeln (Erer *et al.* 1989; Raphael *et al.* 1980), Schweinen (Vos *et al.* 1993) und insbesondere beim Hund.

Der Hauptanteil an diagnostizierten und in der Literatur beschriebenen Rhabdomyosarkomen wurde bei verschiedenen Rassehunden beobachtet, beispielsweise beim Labrador Retriever (Gonin-Jmaa *et al.* 1996, Illanes 2002, Kuwamura *et al.* 1998, Senior *et al.* 1993, Ueno *et al.* 2002), beim Golden Retriever (Kobayashi *et al.* 2004, Krotje *et al.* 1990), bei der Dogge (Andreasen *et al.* 1988, Akkoc *et al.* 2006), beim Terrier (Brockus *et al.* 2004), beim Basset (Kim *et al.* 1996), beim Deutschen Schäferhund (Perez *et al.* 1998), beim Neufundländer (Kuwamura *et al.* 1998), beim Malteser (Takiguchi *et al.* 2002), beim Staffordshire Bullterrier (Lascelles *et al.* 1998), beim Bernhardiner (Kelly 1973), beim Pudel (Kelly 1973), beim Boxer

(Ginel *et al.* 2002), beim Hovawart (Necas *et al.* 2003) und beim Irischen Setter (Pletcher *et al.* 1981).

### 1.5 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Wie in Abschnitt 1.3 dargestellt, lagen vor Beginn dieser Arbeit in unserer Arbeitsgruppe bereits Daten zur Expression und Funktion von *rip*-Genen - insbesondere *rip2* - bei der Muskelzellendifferenzierung vor. Da *rip2*-überexprimierende Muskelzellen auch unter Differenzierungsbedingungen nicht differenzierten, war es insbesondere interessant, zu überprüfen, ob das Differenzierungspotential verschiedener Muskelzelllinien auch mit einer unterschiedlichen *rip*-Genexpression assoziiert ist.

Daraus ergaben sich im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit folgende weiterführende Fragen:

- (1) Unterscheidet sich das Expressionsmuster der *rip*-Gene in Skelettmuskelzellen mit unterschiedlichem Differenzierungsverhalten?
- (2) Welche *rip*-Gene sind in Rhabdomyosarkomzellen exprimiert? Finden sich Unterschiede im Vergleich zu anderen Skelettmuskelzellen?
- (3) Lässt sich das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von normalen Skelettmuskel- und von Rhabdomyosarkomzellen durch Hemmung der Expression von *rip*-Genen beeinflussen?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose MP	Roche, Mannheim
$\epsilon$ -Aminocaprinsäure	Sigma, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto-Pepton	Roth, Karlsruhe
Bacto-Trypton	Roth, Karlsruhe
<i>Blocking Reagent</i>	Roche, Mannheim
Bovines Serum Albumin	Sigma, Steinheim
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
CDP-Star	Roche, Mannheim
Chromatographiepapier (3MM)	Whatman, Maidstone, GB
DAPI	Roche, Mannheim
<i>Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade</i>	Roche, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Sigma, Steinheim
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
<i>DNA Molecular Weight Marker XIV</i>	Roche, Mannheim
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</i>	Biochrom AG, Berlin
ECL-Detektionsreagenzien	Amersham, Braunschweig
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (Etbr)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Falcon Einmalpipetten (5ml, 10ml, 15ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Fetales Bovines Serum (FBS)	Biochrom, Berlin
<i>First strand buffer, 5x</i>	Roche, Mannheim
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roche, Mannheim
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
<i>Horse Serum</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Hybridisations-Beutel	Roche, Mannheim

## MATERIAL UND METHODEN

---

Hybond-C-Membran	Amersham, Braunschweig
Hybond-N-Membran	Amersham, Braunschweig
Hybond-P-Membran	Amersham, Braunschweig
Hyperfilm ECL	Amersham, Braunschweig
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kodak Entwickler	Sigma, Steinheim
Kodak Fixierer	Sigma, Steinheim
Kryo-Röhrchen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Ligationspuffer, 10x	Roche, Mannheim
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarcosin	Sigma, Steinheim
Oligo d(T) <sub>15</sub> -Primer	Promega, Madison, U.S.A.
Oligodesoxynukleotide	Bio Tez, Berlin
Parafilm	Sigma, Steinheim
PBS Dulbecco (1x)	Biochrom, Berlin
PCR-Puffer, 10x	Roche, Mannheim
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenol	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Polaroid-Filme	Polaroid, St. Albans, UK
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
<i>Precision plus</i> Kaleidoskop-Marker	Biorad, München
Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim
Reaktionsgefäße (1,7ml)	Roth, Karlsruhe
Rnasin Plus RNase Inhibitor	Promega, Madison, USA
Röhrchen, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Roti-Mark <i>Prestained</i> -Marker	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 40 (29:1)	Roth, Karlsruhe
SDS / Natriumlauroylsulfat	Roth, Karlsruhe

## MATERIAL UND METHODEN

---

TEMED	Sigma, Steinheim
Trichlormethan (Chloroform)	Roth, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma, Steinheim
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/ EDTA-Solution (10x)	Biochrom, Berlin
Tween 20	Roth, Karlsruhe
<i>Ultra Pure Water</i>	Biochrom, Berlin
5-Bromo-6-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid (X-Gal)	Roche, Mannheim
<i>X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent</i>	Roche, Mannheim
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkultur-Testplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz

### 2.1.2 Enzyme

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

### 2.1.3 Antikörper

anti-Digoxigenin-AP	Roche, Mannheim
Anti-p21, Maus	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-RIP1, Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
Anti-RIP2, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-RIP3, Kaninchen	ProSci, Poway, USA
Anti-MHC, Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Esel-anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-gekoppelt (ECL)	Amersham, Braunschweig
Schaf-anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt (ECL)	Amersham, Braunschweig
Cy2-Esel-anti-Ziege IgG	Biomol, Hamburg

### 2.1.4 Oligodesoxynukleotide

*Primer zur Klonierung eines 361bp-Fragmentes aus einer humanen RIP2-cDNA:*

hRIP2(5'): 5'-CG GGATCC CTTGGC CATTGA GATTTC GC-3'

hRIP2(3'): 5'-CG GAATTC TGCAAA GGATTG GTGACA TC -3'



## MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.1.5 Vektoren

pBluescript SK II (-) (Transkriptionsvektor)      Stratagene, Heidelberg

### 2.1.6 „Kits“

BCA\* Proteinbestimmungssystem      Pierce, Rockford, Illinois, USA  
5-Bromo-2'-deoxy-uridine *Labeling and Detection Kit*      Roche, Mannheim  
DIG RNA *Labeling Kit* (SP6/ T7)      Roche, Mannheim  
*EsiWay RNA Resource Kit*      rzpd, Berlin  
*Nukleo Spin Extrakt II*      Macherey-Nagel, Düren  
*QIAGEN Plasmid Maxi/ Midi Kits*      Qiagen, Düsseldorf  
*RNeasy Kit*      Qiagen, Düsseldorf  
*Silencer © siRNA Transfection II Kit*      Ambion Inc., Huntington, UK  
*X-tremeGene siRNA Dicer Kit*      Roche, Mannheim

### 2.1.7 siRNA und *Templates* zur siRNA-Herstellung

*RIPK2 human esiWay Silencing Resources*      rzpd, Berlin  
*Silencer pre-designed siRNA mRIP2*      Ambion Inc., Huntington, UK  
*Silencer Negative Control #1 siRNA*      Ambion Inc., Huntington, UK  
*Allstars Negative Control RNA*      Qiagen, Düsseldorf

### 2.1.8 Bakterienstamm

E. coli XL1 Blue      Statagene, Heidelberg

### 2.1.9 Eukaryontische Zelllinien

C2C12      Mäusemyoblasten, Helen Blau, Stanford University  
C2F3      Mäusemyoblasten, Helen Blau, Stanford University  
RD/12      Rhabdomyosarkomzellen, Pier-Luigi Lollini, Bologna University  
RD/18      Rhabdomyosarkomzellen, Pier-Luigi Lollini, Bologna University  
HaCaT      Epidermale Keratinozyten, Petra Boukamp, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (Boukamp *et al.* 1988)

### 2.1.10 Versuchstiere

Es wurden mdx-Mäuse und geeignete Kontrolltiere vom Stamm C57 BL/10SNJ über Charles River aus dem Jackson Laboratory (USA) bezogen.

## 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 Proliferationsmedium bestehend aus *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 0,5% Penicillin / Streptomycin, 1% L-Glutamin (200mM) sowie 10% Serum vom fötalen Kalb (FBS) kultiviert. Die Anzucht erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>.

Vor Erreichen vollständiger Konfluenz wurden die Zelllinien passagiert. Dazu wurden sie nach Abnahme des Kulturmediums mit sterilem PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin / EDTA-Lösung abgelöst. Nach fünf Minuten wurde diese Reaktion mit Zellkulturmedium gestoppt und die Zellsuspension in einer Zentrifuge bei 1200Upm sedimentiert. Durch Aufnahme des Zellsedimentes in frischem Medium konnten die Zellen weiterkultiviert werden.

#### 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
FBS	10%
DMSO	10%

Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen im 37°C-Wasserbad aufgetaut, mit 10% FBS in DMEM gewaschen und in geeignete Kulturflaschen überführt.

#### 2.2.1.2 Differenzierung von Rhabdomyosarkomzellen

Die beiden Rhabdomyosarkomzelllinien RD/12 und RD/18 wurden bis zu einer Konfluenz von 80% in Proliferationsmedium gehalten und anschließend für bis zu 72 Stunden in einem Differenzierungsmedium (entspricht Proliferationsmedium, bei dem die 10% FBS durch 2% Pferdeserum ersetzt wurden) weiterkultiviert.

Der Differenzierungsprozess wurde lichtmikroskopisch und mittels Expressionsanalyse spezifischer Marker kontrolliert und fotografisch festgehalten.

### 2.2.1.3 Transfektion mit siRNA

siRNAs (*small inhibitory RNAs*) sind wichtige Werkzeuge in der Molekular- und Zellbiologie. Mit Hilfe von speziellen Transfektionsreagenzien ist es möglich, siRNA in lebende Zellen einzuschleusen und dadurch spezifisch die Expression bestimmter Gene zu hemmen. Es handelt sich dabei um kurze, etwa 20bp lange doppelsträngige RNA-Moleküle. Die Basensequenz entspricht der des Gens, welches reprimiert werden soll (Übersicht bei Sen und Blau 2006).

Im Zuge dieser Arbeit wurden die C2C12-Zellen mit kommerziell erhältlicher *rip2*-spezifischer siRNA der Firma Ambion transfiziert. Für die Transfektion wurde ein Kit derselben Firma entsprechend den Angaben des Herstellers angewendet. Hierzu wurden die Zellen 24 Stunden vor der Transfektion aus einer 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche mit etwa 50 bis 80% Konfluenz in Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen so ausgesät, dass zum Transfektionszeitpunkt 24 Stunden später eine Konfluenz von etwa 60 bis 80% gegeben war. Die Transfektion erfolgte durch Zugabe von je 200µl eines Gemisches aus serumfreiem Zellkulturmedium, Transfektionsreagenz und siRNA zu 2,3ml Zellkulturmedium, welches pro Vertiefung vorgelegt wurde. Dabei erwies sich die Zugabe von 10µl der Transfektionsreagenz siPort *Amine* und von siRNA mit einer Endkonzentration von 100µM pro Vertiefung als günstig.

Nach acht bis zehn Stunden wurde das Transfektionsmedium durch Proliferationsmedium ersetzt. Je nach Versuchsaufbau erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion der Zellen die Extraktion von gesamtzellulärer RNA und Protein oder zur Weiterkultivierung erneut ein Austausch des Zellkulturmediums durch Differenzierungsmedium bzw. Proliferationsmedium.

Da bisher kommerziell keine humane *rip2*-spezifische siRNA erhältlich ist, wurde diese zur Transfektion der Rhabdomyosarkomzellen selbst hergestellt. Hierfür wurde das *EsiWay RNA Resource Kit* mit einem geeigneten *Template* (*RIPK2 human esiWay Silencing Resources*, rzpd, Berlin) in Verbindung mit dem *X-tremeGene siRNA Dicer Kits* (Roche, Mannheim) verwendet.

Für die Transfektion wurden die Zellen aus einer 70 bis 80% konfluenten 75 Quadratcentimeter großen Zellkulturflasche auf eine Platte mit sechs Vertiefungen ausgesät. Etwa 24 Stunden später konnte die Transfektion der Zellen mit siRNA erfolgen. In diesem Fall wurden 2,0ml Proliferationsmedium vorgelegt, zu welchem 200µl des Gemisches aus serumfreiem Medium, Transfektionsreagenz und siRNA hinzupipettiert wurden. Pro Vertiefung stellte sich eine Menge von 9µl X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent als optimal heraus. Von der selbst hergestellten siRNA wurden pro Vertiefung 1,5µg, einer Konzentration von 0,7µg pro Milliliter Kulturmedium entsprechend, eingesetzt. Die weiteren Schritte entsprachen der Vorgehensweise bei der Zelllinie C2C12.

### 2.2.2 Tierexperimentelle Arbeiten

#### 2.2.2.1 Haltung von Versuchsmäusen

Die Betreuung der *mdx*-Mäuse sowie entsprechender Kontrolltiere erfolgte im Tierstall der Physiologie der Charité. Dort wurde eine konstante Raumtemperatur von 22°C sowie eine

relative Luftfeuchtigkeit von 50-60% eingehalten. Der Hell-Dunkelzyklus war unabhängig von der Jahreszeit täglich zwölf Stunden. Alle Arbeiten mit den Mäusen wurden entsprechend den geltenden Richtlinien der Tierschutzkommission durchgeführt.

### 2.2.2.2 Tötung der Versuchsmäuse

Entsprechend dem Versuchsaufbau wurden *mdx*- und Kontrollmäuse, jeweils gleichen Alters und Geschlechts im Alter von acht und zwölf Wochen durch zervikale Dislokation getötet.

### 2.2.2.3 Gewinnung von murinem Gewebe

Nach Tötung wurden die zu untersuchenden Gewebe präpariert und schnell entnommen. Um die Intaktheit der RNA zu gewährleisten, war es wichtig, die entnommenen Gewebe sofort in vorbereiteten Röhrchen mit flüssigem Stickstoff schockzugefrieren. Bis zur Weiterverwendung der Proben wurden sie bei -80°C gelagert.

## 2.2.3 Mikrobiologische Methoden

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

*E. coli*-Flüssigkulturen in LB-Medium mit 100mg / 1ml Ampicillin wurden unter Schütteln über Nacht 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 auf LB-Agarplatten 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, mit Antibiotika versetzt und in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Erkalten konnten die Kulturplatten bei 4°C für einige Wochen aufbewahrt werden.

Zur längerfristigen Lagerung von *E. coli*-Zellen wurden 2,5ml einer frischen Übernachtskultur mit 0,8ml autoklavierten Glycerin (ca. 87%ige Stammlösung) versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.3.2 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Vermehrung rekombinanter Plasmide wurden diese in *E. coli* Zellen eingebracht. Die Herstellung transformationskompetenter Bakterien des Stammes XL1 *blue* erfolgte mit Hilfe einer frischen Übernachtskultur, welche 1:100 mit LB-Medium verdünnt und unter Schütteln

bei 37°C so lange inkubiert wurde, bis eine Absorption von 0,4 bis 0,5 bei 620nm erreicht war. Nach Zentrifugation (10min bei 4°C und 2500Upm) wurde das Sediment vorsichtig in einem Viertel des ursprünglichen Volumens an kalter, steriler 0,1M Magnesiumchloridlösung resuspendiert. Nach dreißigminütiger Inkubation auf Eis wurde wie oben zentrifugiert und das Sediment in einem Fünfzigstel des ursprünglichen Volumens an kalter, steriler 0,1M Calciumchloridlösung aufgenommen. Nach drei bis vier Stunden Inkubation im Eisbad wurde steriles 87%iges Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 30% zu der Bakteriensuspension hinzugegeben. Aliquotiert konnten die Zellen dann für mehrere Monate bei -80°C gelagert werden.

### 2.2.4 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.4.1 Umschreiben von RNA in cDNA mittels reverser Transkription

cDNA aus eukaryontischen Zellen wurde durch reverse Transkription aus gesamtzellulärer RNA gewonnen.

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

Nach Zugabe des RT-Mixes wurde der Ansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach für fünf Minuten auf 95°C erhitzt.

##### RT-Mix:

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

#### 2.2.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mittels der Polymerasekettenreaktion ist es möglich, bei Vorhandensein geeigneter Oligodesoxynukleotid-Primer ein beliebiges Fragment aus einer DNA-Matrize heraus zu amplifizieren. Die Reaktionen erfolgten mit einem Volumen von 50µl in speziellen, sterilen Gefäßen in der PCR-Maschine.

##### Ansatz, allgemein:

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

Je nach Konzentration der eingesetzten DNA-Matrize wurden 20 bis 40 Reaktionszyklen durchlaufen. Es wurde stets eine Kontrolle mit allen oben aufgeführten Komponenten außer

der Matrize mitgeführt, um Verunreinigungen der Reagenzien oder der Reaktionsgefäße nachweisen zu können. Zu Beginn jeder PCR-Reaktion wurde der Ansatz für fünf Minuten auf 95°C erhitzt, um die DNA-Stränge zu denaturieren. Die Amplifikationszeit richtete sich nach der Länge des zu erwartenden Produktes, wobei davon ausgegangen wurde, dass pro 1kb zu synthetisierender DNA ungefähr eine Minute benötigt wird. Nach Beendigung des letzten Zyklus wurden die PCR-Reaktionen für weitere acht Minuten bei 72°C inkubiert, während derer die Enden unvollständig synthetisierter Fragmente gegebenenfalls aufgefüllt wurden.

Denaturierung der DNA-Stränge	5min	95°C	} 20-40 Reaktionszyklen
Anlagerung der Primer	2min	40-60°C	
Kettenverlängerung durch Polymerase	0,5-3min	72°C	

#### 2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA in wässriger Lösung wurde durch Absorptionsmessung bei 260nm bestimmt. Die Messungen erfolgten in Quarzküvetten gegen DEPC-H<sub>2</sub>O als Referenzwert. 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.

#### 2.2.4.4 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 wässrigen DNA- oder RNA-Lösungen 1:1 mit der unteren Phase des pH-äquilibrierten Phenol-Chloroformgemisches versetzt und nach kräftigem Vortexen zur Phasentrennung zentrifugiert (13.000Upm, 1min, RT). Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nachdem die Probe mit dem 2,5-fachen Volumen an 100%igem Ethanol sowie dem 0,1-fachen Volumen 3M Natriumacetatlösung versetzt wurde, erfolgte eine Fällung bei -80°C für mindestens 30 Minuten.

Anschließend konnte das Präzipitat durch Zentrifugation (13.000Upm, 15min, 4°C) sedimentiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in einer entsprechenden Menge DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert werden.

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

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

Alternativ erfolgte eine Reinigung der Nukleinsäuren mit dem *Nukleo Spin Extrakt II Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.4.5 *Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren*

#### 2.2.4.5.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA- und RNA Fragmenten erfolgte in 1-2%igen Agarosegelen in TAE Puffer. Zur Auftrennung gesamtzellulärer RNA wurden 1%ige Gele verwendet. Standardmäßig enthielten die Agarosegele 1µg Ethidiumbromid pro Milliliter Gel.

Vor dem Auftragen wurden die Proben jeweils mit einem geeigneten Volumen Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100V und 60mA.

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

#### TAE:

Tris-Acetat	0,04M
EDTA	0,1mM

#### Auftragspuffer (10x):

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

#### 2.2.4.5.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen wurde standardmäßig der *Nucleo Spin Extrakt II Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.2.4.6 *Spaltung mit Restriktionsendonukleasen*

Die Arbeit mit den Restriktionsendonukleasen erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim). Üblicherweise wurden 0,5 bis 1 Einheit der entsprechenden Restriktionsenzyme pro µg DNA eingesetzt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 2.2.4.7 *Ligation*

Für eine effiziente Ligation ist ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:3 bis 1:4 zwischen Vektor und dem einzufügenden DNA-Fragment optimal. Das Herstellen eines 20µl Ansatzes aus Vektor, dem über präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigten DNA-Fragment, sowie 1,5-2µl 10x Ligationspuffer erfolgte auf Eis. Nach Zugabe von 1U T4-DNA-Ligase wurde 2 bis 20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

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

200µl transformationskompetenter E. coli Zellen (siehe 2.2.3.2) wurden mit einer geeigneten Menge Ligationsansatz (siehe 2.2.4.7) versetzt, vorsichtig gemischt und mindestens 30

Minuten im Eisbad inkubiert. Nach einem Wärmeschock (90 sec bei 42°C) wurde der Transformationsansatz sofort wieder auf Eis gebracht und fünf Minuten später mit 600µl LB-Medium versetzt. Nach 30 Minuten Schütteln bei 37°C wurden die Bakterien auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und 16 - 20 Stunden bei 37°C inkubiert.

### 2.2.4.9 *Beurteilung der Klonierungseffizienz und Auswahl geeigneter Kolonien für die weitere Analyse*

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

Aufgrund der Vektoreigenschaften verfügten die Bakterien, die den Vektor aufgenommen hatten, über eine Ampicillin-Resistenz. Folglich konnten auf den mit Ampicillin supplementierten Platten nur erfolgreich transformierte Bakterien wachsen.

Darüber hinaus konnten die Bakterien, die den nativen Vektor ohne Insert besaßen, das funktionsfähige Enzym  $\beta$ -Galaktosidase bilden, da dieses Enzym durch die Zugabe von IPTG induziert wurde.  $\beta$ -Galaktosidase spaltet X-Gal, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Diese Bakterien konnten an der Ausbildung blauer Kolonien erkannt werden. Demgegenüber bildeten die erwünschten Bakterienklone mit Vektoren, bei denen durch die Aufnahme des Inserts die kodierende Sequenz für das Enzym unterbrochen wurde, weiße Kolonien.

### 2.2.4.10 *DNA-Präparation*

#### 2.2.4.10.1 Plasmid-Schnellpräparation aus 2ml-Kulturen (Mini-Präparation)

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

Es wurde jeweils eine weiße Einzelkolonie mit einer sterilen Impföse aufgenommen, in 2ml flüssiges LB-Ampicillin-Medium überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bebrütet. Die Übernachtskultur wurde zentrifugiert (13.000Upm, 30sec, RT). Mit Hilfe der Puffer aus dem *QIAGEN Plasmid Maxi/Midi Kits* konnte das Plasmid aus den Bakterien gewonnen werden. Hierzu wurde das Sediment in 100µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 100µl Puffer P2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und dann fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation erfolgte die Zugabe von 100µl eiskaltem Puffer



P3. Während einer Inkubationszeit von fünf Minuten im Eisbad aggregierte die chromosomale DNA mit Proteinen und Lipiden zu einem unlöslichen Präzipitat, die Plasmid-DNA blieb in der wässrigen Phase enthalten. Nach kurzer Zentrifugation (13.000Upm, 5min, 4°C) konnte die wässrige Phase abpipettiert, einer Phenol-/ Chloroform-Extraktion unterzogen und die Plasmid-DNA mit Hilfe von 100%igem Ethanol präzipitiert werden. 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.

### 2.2.4.10.2 Plasmid-Präparation mit dem Qiagen-Plasmidkit (Maxi-Präparation)

Es wurden 100µl der Übernachtskultur (siehe 2.2.4.10.1), die die entsprechenden plasmidtragenden Bakterienklone enthielt, zu 100ml flüssigem LB-Ampicillin-Medium gegeben und in einem Erlenmeyerkolben im Schüttelinkubator über Nacht bei 37°C vermehrt. Mit Hilfe der *Plasmid Midi* bzw. *Maxi Kits* der Firma Qiagen konnte hieraus entsprechend den Angaben des Herstellers Plasmid-DNA in größeren Mengen isoliert werden.

### 2.2.4.11 *Sequenzierung von DNA*

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA (siehe 2.2.4.10.2) erfolgte bei einem kommerziellen Sequenzierservice (AGOWA, Berlin) unter Verwendung vektorspezifischer Primer (T7- und SP6-Primer).

### 2.2.4.12 *Generierung einer DIG-markierten antisense-Sonde definierter Länge durch in vitro-Transkription aus dem isolierten Plasmid*

Nach der Linearisierung der Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte eine Phenol-/ Chloroform-Extraktion und eine Ethanolfällung, um die DNA zu reinigen.

Anschließend wurden 1µg der gereinigten, linearisierten Plasmid-DNA für die Herstellung der Sonde eingesetzt. Diese musste zu Beginn der Reaktion auf einem Heizblock für fünf Minuten bei 65°C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt werden. Im Folgenden wurde nach dem Protokoll des *DIG RNA Labeling Kits* der Firma Roche verfahren.

### 2.2.4.13 *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 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend, um das DEPC zu entfernen, autoklaviert. Tris-haltige Lösungen, die nicht direkt mit DEPC behandelt werden können, wurden in gebackenen Gefäßen mit DEPC-Wasser hergestellt.

### 2.2.4.13.1 Isolierung gesamtzellulärer RNA aus kultivierten Zellen

Die Isolierung der gesamtzellulären RNA wurde mit Hilfe des *Qiagen RNeasy Kits* der Firma Qiagen durchgeführt und anschließend die Konzentration im Photometer (siehe 2.2.4.3) gemessen.

### 2.2.4.13.2 Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Gewebeproben

Die Isolierung von RNA aus Geweben erfolgte mit Hilfe von Trizol, welches in einer Menge von 1ml pro 50 - 100 mg gefrorener Probe hinzugefügt wurde. Sofort wurde das Gemisch mit einem Ultraturrax homogenisiert und im Anschluss mit 12.000Upm für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß dekantiert und bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert. Anschließend konnte ein Fünftel der ursprünglich eingesetzten Menge Trizol an Chloroform hinzugegeben und für 15 Sekunden kräftig geschüttelt werden. Nach etwa drei Minuten Inkubation erfolgte eine zweite Zentrifugation (12.000Upm, 15min, 4°C).

Die obere wässrige Phase mit der gelösten RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, während die restlichen Phasen für eine spätere Isolierung von DNA oder Proteinen bei -80°C über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden konnten. Zu der wässrigen Phase musste die Hälfte des Trizolausgangsvolumens an Isopropanol hinzupipettiert und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Um die isolierte RNA zu pelletieren, wurde bei 12.000Upm und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes konnte das Sediment mit 75%igem Ethanol gewaschen und für fünf Minuten bei 4°C mit 7.500Upm zentrifugiert werden. Durch die Zugabe von RNase freiem Wasser wurde das kurz getrocknete RNA-Pellet resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung der enthaltenen RNA in der jeweiligen Probe erfolgte photometrisch (siehe 2.2.4.3).

### 2.2.4.13.3 Northern Blot

0,5-8µg gesamtzellulärer RNA wurden mit 10µl Ladepuffer und mit einer entsprechenden Menge DEPC-Wasser versetzt, um ein einheitliches Probenvolumen zu erhalten. Vor dem Auftragen wurden die Proben für eine Minute im Heizblock auf 85°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt.

Es erfolgte eine Elektrophorese bei 100V (50mA) für ein bis zwei Stunden auf einem 1%igen, horizontalen Agarosegel mit 1xMOPS als Laufpuffer.

Anschließend wurde das mit 20xSSC angefeuchtete Gel mittels des Kapillarblotverfahrens über Nacht auf eine Nylonmembran (N-Hybrid) transferiert, welche vorher mit DEPC-Wasser und 20xSSC benetzt worden war. Zur Aufrechterhaltung der Kapillarwirkung wurde ein Stapel Whatman-Papiere in geeigneter Menge, sowie ausreichend 20xSSC als *Blotpuffer* verwendet.

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran einige Minuten in 2xSSC gewaschen und die RNA anschließend durch eine zwei Minuten lange UV-Bestrahlung mit 120mJ auf der Nylonmembran fixiert.

## MATERIAL UND METHODEN

---

Das Anfärben der RNA erfolgte durch Schwenken in Methylenblau-Färbelösung (0,04g Methylenblau; 0,5M NaAc pH 5,2). Um später die Größe der mRNA-Transkripte besser abschätzen zu können, wurden die angefärbten 18S- sowie die 28S-RNA-Banden markiert.

Die Vorhybridisierung der Membran wurde für mindestens eine Stunde bei 68°C mit RNA-Hybridisationslösung im Wasserbad unter Schütteln durchgeführt.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht ebenfalls bei 68°C im Wasserbad im gleichen Puffer, dem zusätzlich 100µl Hybridisationslösung mit der entsprechenden Menge der markierten Sonde hinzugefügt wurden. Dieser Ansatz musste vor der Zugabe zum Hybridisationspuffer für zehn Minuten bei 68°C im Heizblock erhitzt werden.

Im Anschluss erfolgen verschiedene Waschschrte. Zuerst wurde die Membran bei Raumtemperatur auf dem Schüttler dreimal fünf Minuten mit Waschlösung Nr.1 gewaschen, dann zweimal 20 Minuten erneut im Wasserbad bei 68°C in Waschlösung Nr.2. Anschließend wurde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler für fünf Minuten in Puffer 1 gewaschen und dann ebenfalls bei Raumtemperatur und auf dem Schüttler in 1% Blockingpuffer. Diesem wurde dann nach einer Stunde Anti-Digoxigenin-AP in einer 1:15000 Verdünnung hinzugegeben. Schließlich wurde die Membran dann noch einmal fünf Minuten und zweimal 15 Minuten in Puffer 1 mit 0,3% Tween 20, sowie einmal fünf Minuten in Puffer 3 gewaschen.

Der Filter wurde in eine Folie eingeschlagen und fünf Minuten in Puffer 3 mit einer 1:100-Verdünnung der Detektionsreagenz CDP-Star inkubiert. Anschließend konnten durch Auflegen eines Röntgenfilmes (Hyperfilm ECL, Amersham, Braunschweig) in einer Filmkassette die Signale des in Folie eingeschlagenen Filters in Form von Schwärzungen des Filmes detektiert werden.

### 1%iges Agarose Gel:

Agarose	1g
DEPC-H <sub>2</sub> O	84,6ml
10xMOPS	10,0ml
Formaldehyd	5,4ml

### Ladepuffer:

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

## MATERIAL UND METHODEN

---

### MOPS(10x):

MOPS	0,20M
Na Acetat	0,05M
EDTA	0,01M

### 20xSSC:

NaCl	3,0M
Na <sub>3</sub> Citrat	0,3M

### RNA-Hybridisationslösung:

Formamid 100%	25,0ml
20xSSC	12,5ml
10% <i>Blocking</i> -Lösung	10,0ml
20% N-Lauroylsarcosin	0,25ml
10% SDS	0,10ml
DEPC-H <sub>2</sub> O	2,15ml

### Waschlösung Nr.1:

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

### Waschlösung Nr.2:

20x SSC	2,5ml
10% SDS	5,0ml
DEPC-H <sub>2</sub> O	492,5ml

### Puffer 1:

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

Puffer 3 (immer frisch angesetzt):

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

### 2.2.5 Proteinchemische Methoden

#### 2.2.5.1 *Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten eukaryontischen Zellen*

Nach Abnahme des Mediums und zweimaligem Waschen mit PBS wurde zu den adhärenen kultivierten Zellen direkt in den Kulturschalen 300 bis 500µl Lysispuffer mit Protease-Inhibitoren zugegeben. Auf Eis wurden die Schalen für zehn Minuten geschwenkt, wobei die Zellkerne an der Kunststoffoberfläche der Kulturschalen haften blieben. Das Zelllysat wurde in ein Reaktionsgefäß pipettiert, für fünf Minuten zentrifugiert (13.000Upm, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 2µl hiervon konnten zur Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet werden, der Rest des Überstandes wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

1xLysispuffer:

Triton X-100	1%
Glycerin	10%
Tris-HCl pH 8,0	200 mM
NaCl	137mM
EDTA	2mM

#### 2.2.5.2 *Bestimmung von Proteinkonzentrationen*

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

Die Absorption konnte im Photometer bei 562nm gemessen werden.

#### 2.2.5.3 *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 breiten Sammelgel, sowie einem sich daran anschließenden ca. 5cm breiten Trenngel.

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit einem geeigneten Volumen Proben-Auftragspuffer (5x konzentriert) versetzt, anschließend für fünf Minuten im Heizblock bei 95°C erhitzt und unmittelbar danach auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 100V (50mA) bis die Lauffront der Proben das Gelende erreicht hatte (ungefähr zwei Stunden).

## MATERIAL UND METHODEN

---

### Zusammensetzung des Trenngels:

<b>Acrylamid Konzentration</b>	<b>7,5%</b>	<b>10%</b>	<b>15%</b>
Rotiphorese Gel 40 (29:1)	10,0ml	13,3ml	20,0ml
1M Tris-HCl pH 8,8	15,0ml	15,0ml	15,0ml
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	10,0ml	6,7ml	-
10% (w/v) APS	0,4ml	0,4ml	0,4ml
TEMED	20µl	20µl	20µl

### Zusammensetzung des Sammelgels:

Rotiphorese Gel 40 (29:1)	5,0ml
1M Tris-HCl pH 6,8	3,8ml
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%
β-Mercaptoethanol	12,5%
SDS	7,5g/l
Tris-HCl pH 8,0	250mM
Bromphenolblau	0,5mg/ml

### SDS-PAGE-Laufpuffer:

Tris	25mM
Glycin	192mM
SDS	0,1%

2.2.5.4 *Immunologische Methoden*

2.2.5.4.1 Western Blot

Dieses ist eine Methode, die dem Nachweis von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen mit Hilfe von Antikörpern dient. Zunächst wurden die Proteine elektrisch auf eine Nitrozellulose- (Hybond C) oder eine PVDF-Membran (Hybond P) transferiert („*geblottet*“). Anschließend musste die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit einer hochkonzentrierten Proteinlösung und dann mit dem ersten Antikörper, welcher das nachzuweisende Protein erkennt, inkubiert werden. Die Detektion erfolgte 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 Membran, das Trenngel, sowie sechs Lagen in Kathodenpuffer (25mM Tris; 20% Methanol; 40mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure) getränkte Chromatographiepapiere an, wodurch eine Verbindung zur Kathode hergestellt wurde. Die Stromstärke beim mindestens für eine Stunde durchgeführten Blotten der Membran betrug  $1\text{mA}/\text{cm}^2$ .

Zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung der einzelnen Proteinspuren konnten die Membranen vor Inkubation mit den Antikörpern mit Ponceau S angefärbt werden.

*Inkubation mit den Antikörpern:*

Alle Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur.

Absättigung	3% bis 5% Milchpulver in TBS-T	30min
1. Antikörper	geeignete Verdünnung in 3% Milchpulver in TBS-T	120min
Waschen	TBS-T	3x5min
2. Antikörper	geeignete Verdünnung in 3% Milchpulver in TBS-T	30-60min
Waschen	TBS-T	3x5min

TBS-T:

NaCl	0,15M
Tris HCl pH 8,0	10mM
Tween20	0,05%

*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, welches den Röntgenfilm schwärzt und somit eine spezifische Detektion ermöglicht. Es wurde ein entsprechender Kit der Firma Amersham verwendet.

### 2.2.5.4.2 Immunzytochemie

Die intrazelluläre Lokalisation spezifischer Proteine wurde mittels Immunfluoreszenz *in situ* nachgewiesen. Hierfür wurde zu bestimmten Zeitpunkten von den in Kulturschalen kultivierten Zellen das Medium abgenommen und die Zellen gründlich mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte für zehn Minuten eine Fixation mit einem auf  $-20^{\circ}\text{C}$  abgekühlten 1:1 Gemisch aus Methanol und Aceton bei Raumtemperatur. Zusätzlich in der Fixationslösung enthalten war im Verhältnis 1:1000 der Fluoreszenzfarbstoff DAPI, um später auch die Zellkerne betrachten zu können. Nach dem Trocknen konnten die Schalen bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Vor den weiteren Schritten des immunzytochemischen Nachweises wurden die Schalen kurz mit PBS äquilibriert.

#### PBS:

NaCl	0,14M
KCl	30mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,5mM
KH <sub>2</sub> PO	1,5mM

#### PBS-T

NaCl	0,14M
KCl	30mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,5mM
KH <sub>2</sub> PO	1,5mM
Tween20	0,05%

Für den Immunfluoreszenz-Nachweis wurde der erste Antikörper in geeigneter Weise in einer Lösung aus 1%igen BSA in PBS-T verdünnt und auf die Schalen aufgebracht. Die Anfangsverdünnung betrug hier in der Regel 1:100. Die Inkubation der mit einem Parafilm abgedeckten Schalen erfolgte bei  $4^{\circ}\text{C}$  in einer Feuchtkammer für mindestens zwei Stunden bis über Nacht. Anschließend wurde unter leichtem Schwenken dreimal zehn Minuten mit PBS-T gewaschen. Der zweite Antikörper, der mit den fluoreszierenden Farbstoffen Cy2 oder Cy3 gekoppelt war, wurde in der Lösung aus PBS-T und 1%igen BSA verdünnt (Verhältnis zu Beginn meist 1:400). Nach dem Aufbringen des fluoreszierenden Antikörpers erfolgten alle weiteren Schritte unter weitgehendem Ausschluss von Licht. Der einstündigen Inkubation mit dem Antikörper bei RT in der feuchten Kammer folgte erneut ein Waschschriff, der wie oben dreimal für zehn Minuten mit PBS-T durchgeführt wurde. Anschließend konnten die Präparate mit Mounting Medium (10% Glycerol, 10% PBS) überschichtet und mit einem Deckglas eingedeckt werden. Die über einen längeren Zeitraum konservierbaren Präparate



wurden im Fluoreszenzmikroskop bei einer für den verwendeten Farbstoff geeigneten Anregungswellenlänge betrachtet und fotografiert.

### 2.2.5.4.3 5-Bromo-2'-deoxy-uridin Markierung

Zur Ermittlung der zellulären Proliferationsrate 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. Hierfür war es notwendig die in Kulturschalen kultivierten Zellen für einen definierten Zeitraum mit dem Thymidinanalogon 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin zu inkubieren. Die Zellen, die BrdU in ihre DNA eingebaut hatten, konnten mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen BrdU und einem Fluorchrom-konjugierten sekundären Antikörper im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Zusätzlich wurden alle Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt, um im Nachhinein eine Unterscheidung zwischen proliferierenden und nicht proliferierenden Zellen treffen zu können.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Expression der *rip*-Gene in C2C12- und C2F3-Zelllinien

Ausgehend von früheren Daten unserer Arbeitsgruppe (Munz *et al.* 2002), die einen Zusammenhang zwischen der Expression von *rip*-Genen und der Differenzierung von Myoblasten zeigten, sollte im ersten Teil meiner Arbeit die Expression der *rip*-Gene in proliferierenden und differenzierenden C2F3- und C2C12-Zelllinien untersucht werden.

Sowohl bei C2F3- als auch bei C2C12-Zellen handelt es sich um Mäusemyoblastenzelllinien. Beide Zelllinien besitzen den gleichen klonalen Ursprung, unterscheiden sich jedoch in ihrem Differenzierungsverhalten: C2F3-Zellen differenzieren langsamer und weniger komplett als C2C12-Zellen (Helen Blau, Stanford University, persönliche Mitteilung). Daher war es interessant zu untersuchen, ob das unterschiedliche Differenzierungsverhalten mit Unterschieden bezüglich der *rip*-Genexpression korreliert.

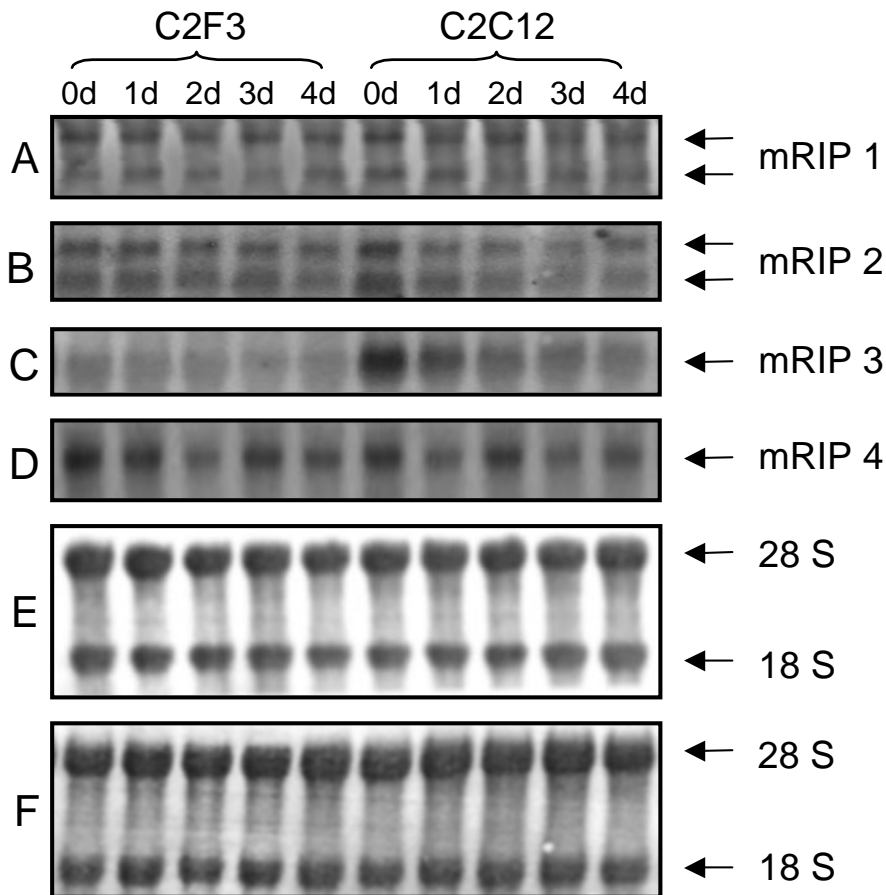
C2F3- und C2C12-Zellen können wie viele andere Skelettmuskelzelllinien in Kultur zur Differenzierung gebracht werden, indem der normalerweise im Kulturmedium vorhandene Anteil von 10% fötalem Kälberserum durch 2% Pferdeserum ersetzt wird. Der Verlauf dieses Differenzierungsprozesses ähnelt mechanistisch dem, der *in vivo* während der Embryonalentwicklung beobachtet wird. Aufgrund dieser Eigenschaften stellen C2F3- und C2C12-Zellen ein gutes *in vitro* Untersuchungssystem zur Muskelzelldifferenzierung dar.

C2F3- und C2C12-Zellen wurden in Proliferationsmedium bis zum Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz kultiviert und dann mit Differenzierungsmedium versetzt. Aus Zellen in Proliferationsmedium (0 Tage) sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Differenzierung (1, 2, 3 und 4 Tage) wurde gesamtzelluläre RNA isoliert. Diese wurde über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des *Northern Blot*-Verfahrens auf eine Nylonmembran aufgebracht. Anschließend erfolgte eine Hybridisierung der Membran mit den für die einzelnen *rip*-Gene spezifischen *antisense* RNA-Sonden.

Für alle der nachfolgend beschriebenen Genexpressionsanalysen wurden mindestens zwei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt, gezeigt sind jeweils repräsentative Ergebnisse.

Abbildung 7 zeigt, dass sich die Expressionsmuster der einzelnen *rip*-Gene in proliferierenden und differenzierenden C2F3- und C2C12-Zellen sehr deutlich voneinander unterscheiden.

Im Einzelnen betrachtet zeigte sich, dass *rip1* sowohl bei den C2F3- als auch bei den C2C12-Zellen im Verlauf der Differenzierung eine sehr leichte Abnahme der Expression aufwies. Folglich waren hier keine Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien zu beobachten.



**Abb. 7: Untersuchung der Expression der *rip1*-, *rip2*-, *rip3*- und *rip4*-Gene in proliferierenden und differenzierenden C2F3- und C2C12-Zellen mit Hilfe der Northern Blot-Analyse.**

Es wurden jeweils 3µg RNA aufgetragen und mit den entsprechenden Maus-*antisense* RNA-Sonden gegen *rip1*, *rip2*, *rip3* und *rip4* hybridisiert. (A) Sichtbar sind die beiden *rip1*-Transkripte mit einer Größe von 3,8kb und 2,5kb. (B) Hier sind die beiden Banden des *rip2*-Genes mit einer Größe von 2,5kb und 2,0kb gezeigt. (C) Für *rip3* zeigen sich zwei Banden mit 2,6kb und 2,1kb, wobei die benutzte Maus-*rip3*-RNA-Sonde die zweite Bande immer nur sehr schwach darstellt. (D) *rip4* ließ sich deutlich auf einer Höhe von 3,9kb nachweisen. (E,F) Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Spuren wird hier die Methylenblaufärbung der verwendeten Membranen, die jeweils zweimal benutzt wurden, gezeigt. Hierbei gehört die Abb. E zu den in A und D gezeigten Northern Blots und Abb. F zu den in B und C gezeigten Membranen.

Im Gegensatz dazu zeigte das *rip2*-Gen äußerst deutliche Unterschiede im Expressionsmuster. Auffällig war, dass die C2C12-Zellen im Vergleich zu den C2F3-Zellen eine höhere *rip2*-Basalexpression in Proliferationsmedium aufwiesen. Schon einen Tag nach Induktion der Differenzierung war jedoch, wie bereits früher von unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Munz *et al.*, 2002), eine sehr deutliche Abnahme des Expressionsniveaus von *rip2* zu beobachten. Im Vergleich dazu zeigten C2F3-Zellen nach Induktion der

Differenzierung zunächst keine Abnahme der *rip2*-Expression. Erst ab dem zweiten Tag in Differenzierungsmedium war eine ganz leichte Repression zu verzeichnen.

Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Zelllinien konnte auch bei der Analyse der Expression des *rip3*-Gens nachgewiesen werden: C2F3-Zellen zeigten keine Expression, im Vergleich hierzu wiesen C2C12-Zellen eine geringe Basalexpression auf, die im Verlauf des Differenzierungsprozesses bis zum Tag vier allmählich abnahm.

Bezüglich der Expression von *rip4* waren kaum Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien zu beobachten: Sowohl in den C2F3-, als auch in den C2C12-Zellen zeigte sich eine Abnahme der Expression zwischen dem ersten und zweiten Tag nach Induktion der Differenzierung. Etwa 24 Stunden später war bei beiden Zelllinien eine erneute Zunahme der Expression zu verzeichnen, die sich schließlich etwa in Höhe der Basalexpression einpendelte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich C2F3- und C2C12-Zellen bezüglich der Expression des *rip2*- und des *rip3*-Gens unterscheiden, was mit dem unterschiedlichen Differenzierungsverhalten dieser beiden Myoblastenzelllinien zusammenhängen könnte.

### **3.2 Untersuchung der Expression der *rip*-Gene in Rhabdomyosarkom-Zelllinien**

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse legten nahe, dass eine differentielle Expression von *rip*-Genen mit dem Proliferations- und Differenzierungspotential von Skelettmuskelzellen assoziiert sein könnte. Darauf aufbauend stellte sich die Frage, ob auch in Rhabdomyosarkomzellen, also Tumorzellen vom Skelettmuskelzelltyp, ein von normalen Muskelzellen abweichendes Expressionsmuster der verschiedenen *rip*-Gene beobachtet werden kann.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde daher die Expression von *rip1*, *rip2*, *rip3*, *rip4* und *rip5* in zwei unterschiedlichen Rhabdomyosarkomzelllinien analysiert.

#### **3.2.1 Differenzierung von Rhabdomyosarkomzellen *in vitro***

Bei den verwendeten humanen Rhabdomyosarkomzelllinien vom embryonalen Typus handelte es sich um RD/12- und RD/18-Zellen, welche wie die im vorherigen Abschnitt beschriebenen C2F3- und C2C12-Zellen aus demselben Klon stammen und daher direkt miteinander vergleichbar sind. Diese Tatsache ist deshalb besonders wichtig, weil Rhabdomyosarkome sich meistens nicht in der Skelettmuskulatur selbst, sondern in anderen Geweben ausbilden. Es ist daher in der Regel unmöglich, nicht transformierte Skelettmuskelzellen aus demselben Patienten zu isolieren, aus dessen Tumor die jeweilige Rhabdomyosarkomzelllinie stammt. Wie C2F3- und C2C12-Zellen unterscheiden sich RD/12- und RD/18-Zellen in Hinblick auf ihr Differenzierungspotential: Während RD/18-Zellen noch in der Lage sind in Medium mit 2% Pferdeserum frühe Differenzierungsschritte, wie beispielsweise die Expression verschiedener myogener Differenzierungsmarker, zu durchlaufen, weisen RD/12-Zellen nur noch ein sehr geringes Differenzierungspotential auf (Übersicht bei Astolfi *et al.* 2001).

Da die Kultivierung von Rhabdomyosarkomzellen zu Beginn meiner Arbeit in unserer Arbeitsgruppe nicht etabliert war, wurden zunächst die Kultur- und Differenzierungsbedingungen für RD/12- und RD/18-Zellen optimiert. Hierbei stellte es sich als besonders vorteilhaft heraus, die Zellen so in Zellkulturschalen auszusäen, dass sie 24 Stunden später bei der Induktion der Differenzierung einen Konfluenzgrad von mindestens 70 bis 80% aufwiesen. Die nachfolgenden Abschnitte stellen dar, dass unter diesen Bedingungen eine standardisierte Kultur dieser beiden Zelllinien in Proliferations- und Differenzierungsmedium möglich war.

### 3.2.1.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Für die lichtmikroskopische Darstellung des Verhaltens von RD/12- und RD/18-Zelllinien in Proliferations- und Differenzierungsmedium wurden die Zellen in Zellkulturschalen kultiviert und gegebenenfalls mit Differenzierungsmedium versetzt. Nach dem Absaugen des Zellkulturmediums zu den entsprechenden Zeitpunkten konnten die Zellen unfixiert mit dem Lichtmikroskop betrachtet und ihr Erscheinungsbild fotografisch festgehalten werden.

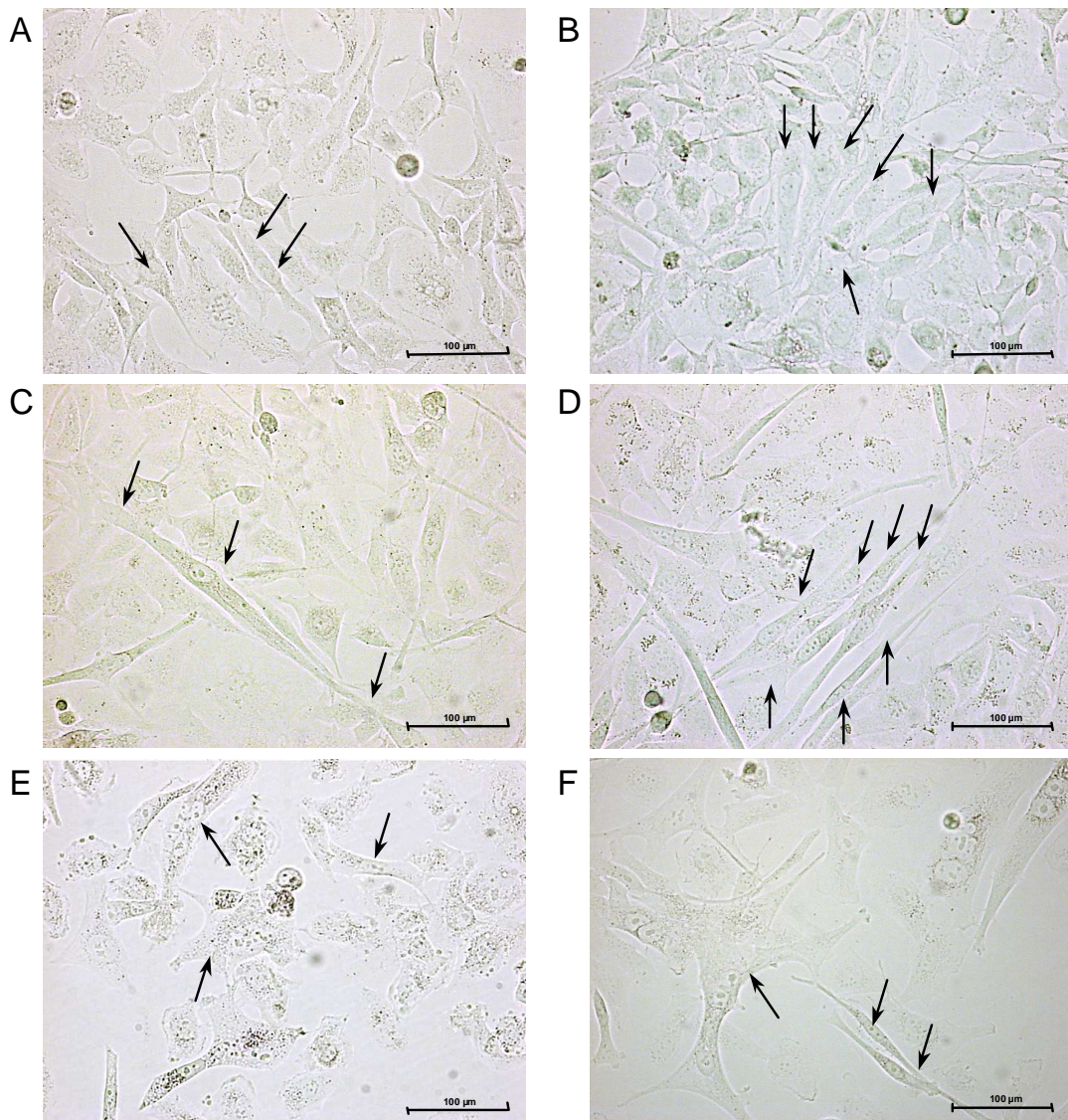
Wie in Abbildung 8 gezeigt, fiel dabei auf, dass beide Zelllinien eine deutlich pleomorphe Gestalt aufwiesen, wobei insbesondere bei den RD/12-Zellen Riesen- und multinukleäre Zellen vorherrschend waren. Beim Vergleich des Wachstumsverhaltens beider Zelllinien mittels Zellzählung (Daten nicht gezeigt), ließ sich deutlich erkennen, dass RD/12-Zellen im Vergleich zu RD/18-Zellen in etwa die doppelte Verdopplungszeit aufwiesen. Diese Charakteristika entsprechen den für RD/12- und RD/18-Zellen in der Literatur beschriebenen Merkmalen (Übersicht bei Croci *et al.* 2004), so dass davon ausgegangen werden konnte, dass mit den oben beschriebenen Kulturbedingungen gearbeitet werden kann.

In Abbildung 8 A sind RD/18 Zellen in Proliferationsmedium (null Stunden) gezeigt, deutlich sichtbar sind die Zell-Zell-Kontakte (siehe beide rechten Pfeile) der einzelnen Zellen. Die Zellkerne sind in der Regel zentral gelegen (siehe linker Pfeil).

24 Stunden nach der Induktion der Differenzierung (Abb. 8 B) war deutlich zu erkennen, dass die Zellen untereinander vermehrt Zell-Zell-Kontakte gebildet haben. In der Bildmitte sind mehrere langgestreckte Zellen direkt nebeneinander erkennbar, die die Tendenz haben, mit weiteren Zellen zu fusionieren (siehe Pfeile).

Abbildung 8 C zeigt RD/18-Zellen, die 48 Stunden in Differenzierungsmedium kultiviert worden waren. Deutlich sichtbar sind neben einer besonders langgestreckten Zelle mit zwei sehr weitläufigen Zytoplasmafortsätzen (siehe Pfeile) weitere Zellen, die vermehrt Zellfortsätze ausgebildet haben, sowie die Tendenz zur Ausbildung von *Myotubes*. Bei *Myotubes* handelt es sich entsprechend dem Verlauf von Muskelzeldifferenzierung um die Produkte der Fusion von Myoblasten zu langen Muskelzellschläuchen, die dann mehrere Zellkerne enthalten.

Nach 72 Stunden Kultivierung in Differenzierungsmedium ließen sich in RD/18-Zellen (Abb. 8 D) vermehrt parallel angeordnete Zellen mit spindelförmigen Zellausläufern und mehreren Zellkernen nachweisen (siehe Pfeile). Diese morphologischen Merkmale sind sehr deutliche Hinweise auf das in der Literatur beschriebene myogene Differenzierungspotential von RD/18-Zellen.



**Abb. 8: Lichtmikroskopische Darstellung von unfixierten RD/18- und RD/12-Zelllinien in Proliferations- und Differenzierungsmedium**

Dargestellt sind zum einen jeweils Zellen in Proliferationsmedium (Tag null), zum anderen Zellen in Differenzierungsmedium, fotografiert zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Differenzierung: A: null Stunden (RD/18); B: 24 Stunden (RD/18); C: 48 Stunden (RD/18); D: 72 Stunden (RD/18); E: null Stunden (RD/12); F: 48 Stunden (RD/12). Man beachte die unterschiedliche Morphologie der beiden Zelllinien unter den verschiedenen Kulturbedingungen. Die Pfeile (↑) deuten jeweils auf die im Text beschriebenen Merkmale hin.

In Abbildung 8 E sind RD/12-Zellen in Proliferationsmedium dargestellt. Deutlich zeigt sich deren pleomorphe Gestalt sowie das Vorkommen von mehreren Zellkernen (siehe Pfeil oben links) in einer Zelle. Dem Betrachter erscheint ihr Gesamtbild sehr uneinheitlich.

48 Stunden nach Kultivierung in Differenzierungsmedium (Abb. 8 F) zeigten RD/12-Zellen eine große Neigung zum Ausbilden von Riesenzellen (linker Pfeil) und wenig Tendenz zur gerichteten Differenzierung. Die Zellen besaßen morphologisch wenig Ähnlichkeit mit Myozyten oder *Myotubes*.

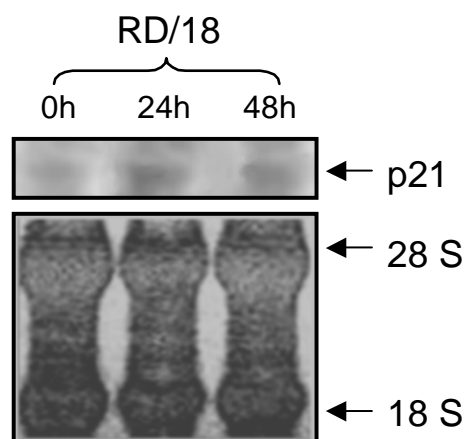
### 3.2.1.2 Untersuchung der Expression von Genen, die mit der Regulation von Proliferationsprozessen assoziiert sind

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

Neben der lichtmikroskopischen Betrachtung der morphologischen Veränderungen bei Rhabdomyosarkomzelllinien nach Induktion der Differenzierung wurde auch die Expression von bestimmten Genen, deren differentielle Expression in Myoblasten mit Proliferations- und Differenzierungsvorgängen assoziiert ist, untersucht. Dieses sollte weiter untermauern, dass sich RD/12- und RD/18-Zellen unter den von uns gewählten Kulturbedingungen authentisch, also wie in der Literatur beschrieben, verhalten.

Das Protein *p21* ist ein Inhibitor von *cyclin dependent kinases* (CDK-Inhibitor). Die Expression des *p21*-Gens steigt in der Mäusemyoblastenzelllinie C2C12 24 Stunden nach Induktion der Differenzierung sehr stark an. Rhabdomyosarkomzelllinien zeigen auch einen Anstieg der Expression von *p21* nach Induktion der Differenzierung. Im Gegensatz zu C2C12-Zellen ist dieser, wie auch die Basalexpression des Gens vor der Induktion der Differenzierung, wesentlich niedriger (Otten *et al.* 1997).

Zur Untersuchung der Expression von *p21* in Rhabdomyosarkomzellen wurden zu definierten Zeitpunkten gesamtzelluläre RNA und gesamtzelluläres Protein aus den Zellen extrahiert und mit Hilfe des *Northern* und *Western Blot*-Verfahrens analysiert.

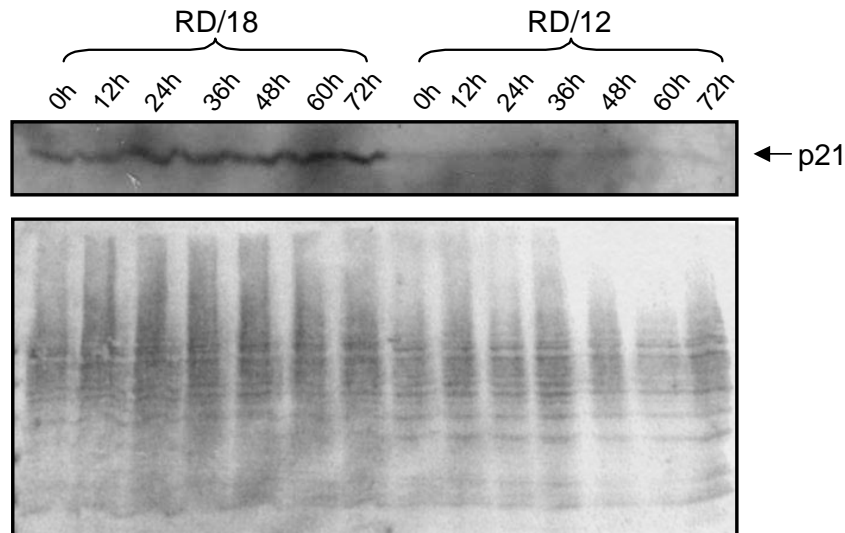


**Abb. 9: Northern Blot-Analyse der *p21*-Genexpression**

Es wurden jeweils 3µg RNA aufgetragen und mit der entsprechenden *antisense*-RNA-Sonde gegen *p21* hybridisiert. Es sind Banden auf Höhe von 1,8kb zu erkennen. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung ist die Methylenblaufärbung (unteres Bild) gezeigt. Man beachte die Induktion der *p21*-Genexpression 24 Stunden nach Induktion der Differenzierung.

## ERGEBNISSE

In Proliferationsmedium war bei den RD/18-Zellen eine sehr niedrige Basalexpression von *p21* zu erkennen (siehe Abb. 9). 24 Stunden nach der Induktion der Differenzierung ließ sich ein leichter Anstieg der Genexpression erkennen, welcher auch nach 48 Stunden erhalten blieb.



**Abb. 10: Western Blot-Analyse der *p21*-Expression.**

Proteinlysate aus RD/18- und RD/12-Zellen wurden auf ein 15%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und das 21kDa große Protein mit Hilfe seines spezifischen Antikörpers detektiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurde die Ponceaufärbung der Membran angewendet (unteres Bild).

Es ist deutlich erkennbar, dass *p21* sowohl in RD/18- als auch in RD/12-Zellen auf Proteinebene exprimiert wird (Abb. 10). Insgesamt gesehen war in den RD/12-Zellen eine viel niedrigere Basalexpression als in den RD/18-Zellen zu beobachten. Das *p21*-Protein zeigte bei den RD/18 Zellen eine ganz leichte Zunahme im Laufe der Differenzierung, während bei den RD/12-Zellen zu den verschiedenen Zeitwerten keine Unterschiede der Expressionsstärke nachgewiesen werden konnten.

### 3.2.2 Expression der *rip*-Gene in RD/12- und RD/18-Zellen

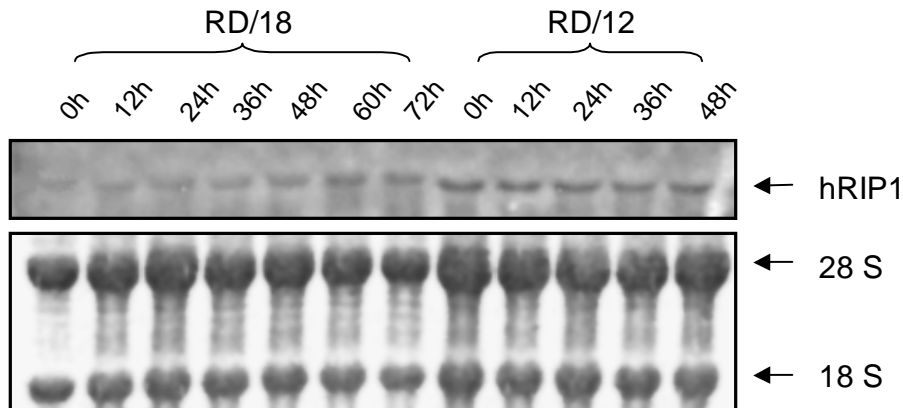
Nach Etablierung der Kultur- und Differenzierungsbedingungen für die beiden Rhabdomyosarkomzelllinien sollte nun die Expression der *rip*-Gene während der Proliferation und Differenzierung derselben mit Hilfe des *Northern*- und *Western Blot*-Verfahrens analysiert werden.

Hierzu wurden die Zellen in Zellkulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 70 bis 80 Prozent die Differenzierung induziert. Entsprechend den Versuchsbedingungen wurden an vorgegebenen Zeitpunkten gesamtzelluläre RNA und gesamtzelluläres Protein extrahiert.



3.2.2.1 Expression von *rip1* in Rhabdomyosarkomzelllinien

Für die Untersuchung der Expression von *rip1* wurden RD/18- und RD/12-Zellen für 72 bzw. 48 Stunden nach Induktion der Differenzierung in Zellkulturschälchen kultiviert und zu bestimmten Zeitpunkten gesamtzelluläre RNA geerntet.



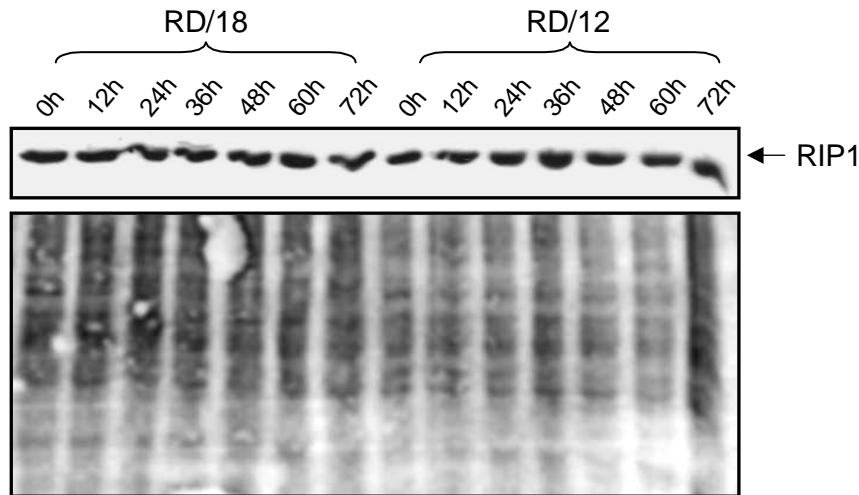
**Abb. 11: Northern Blot-Analyse des *rip1*-Gens in RD/18 und RD/12-Zelllinien**

Nach Induktion der Differenzierung und RNA-Extraktion konnten jeweils 3µg RNA auf ein Agarosegel aufgetragen werden. Im Anschluss an das *Blotting* wurde die Membran mit einer humanen *rip1 antisense*-RNA Sonde hybridisiert. Man beachte die *rip1*-spezifische Bande bei 3,8kb. Die untere Bande bei 2,5kb ist, wie in diesem Fall, bei *rip1* häufig schwach, so dass sie kaum zu detektieren ist. Die gleichmäßige Beladung war mit Hilfe der Methylenblaufärbung nachweisbar (unteres Bild).

Wie aus Abbildung 11 ersichtlich, zeigten RD/18-Zellen eine gleichmäßige Expression des *rip1*-Gens, welche nur zu sehr späten Zeitpunkten nach Induktion der Differenzierung leicht induziert war. Bei RD/12-Zellen war insgesamt eine etwas höhere Basalexpression nachweisbar, die sich jedoch bis 48 Stunden nach Induktion der Differenzierung nicht veränderte. Spätere Zeitpunkte wurden hier nicht untersucht.

Ergänzend zu den RNA-Daten wurde die Expression des *rip1*-Gens auch auf Proteinebene mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers untersucht (Abb. 12).

Hierbei konnte für das *rip1*-Gen über einen Zeitraum von 72 Stunden sowohl in RD/12- als auch in RD/18-Zellen eine gleichmäßige Expression nachgewiesen werden. Der leichte Anstieg der *rip1*-Expression in RD/18-Zellen zwei bis drei Tage nach Induktion der Differenzierung sowie die höhere *rip1*-Basalexpression in RD/12-Zellen, die auf RNA-Ebene nachgewiesen worden war, wurde auf Proteinebene nicht beobachtet.



**Abb. 12: Western Blot-Analyse der Expression von *rip1* in Rhabdomyosarkomzellen**

Nach Extraktion von Proteinlysaten aus den kultivierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb eines Zeitraumes von drei Tagen wurden diese mit Hilfe eines 10%igen SDS-Polyacrylamid-Geles elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine geeignete Membran transferiert. Nach Inkubation mit einem RIP1-spezifischen Antikörper konnte eine deutliche Bande bei 74kDa detektiert werden. Die Überprüfung der gleichmäßigen Beladung erfolgte durch die Ponceaufärbung der Membran (unteres Bild).

Insgesamt zeigen diese Daten keine oder nur eine geringe Regulation des *rip1*-Gens nach Induktion der Differenzierung in Rhabdomyosarkomzellen, ähnlich wie dieses auch in C2C12- und C2F3-Zellen beobachtet wurde (Abb. 7). Daraus lässt sich schließen, dass einer differentiellen Expression von *rip1* vermutlich keine entscheidende Rolle bei der Regulation der Myoblastendifferenzierung zukommt.

### 3.2.2.2 Expression von *rip2* in RD/12- und RD/18-Zelllinien

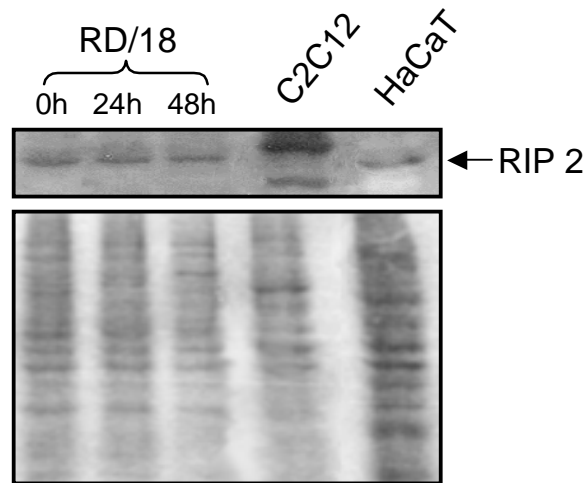
#### 3.2.2.2.1 Vorarbeiten zur Untersuchung der *rip2*-Genexpression in Rhabdomyosarkomzellen

Bei der Untersuchung der Expression von *rip2* gelang uns zunächst nur der Nachweis des Proteins (Abb. 13), nicht jedoch der des entsprechenden Transkripts.

In den Proteinlysaten aus den RD/18-Zellen und den Positivkontrollen (C2C12- und HaCaT-Zellen) konnten mit dem RIP2-Antikörper deutliche Banden in Höhe von 61kDa detektiert werden (Abb. 13). Dabei war die Expression von *rip2* in den RD/18-Zellen nach Induktion der Differenzierung über den untersuchten Zeitraum unverändert. Insgesamt war die *rip2*-Basalexpression in den C2C12-Zellen deutlich höher als in den Rhabdomyosarkomzellen, während in HaCaT-Zellen (epidermale Keratinozyten) nur geringe RIP2-Mengen gefunden

## ERGEBNISSE

wurden. Auf Proteinebene war daher der Nachweis von RIP2 in Rhabdomyosarkomzellen gelungen.



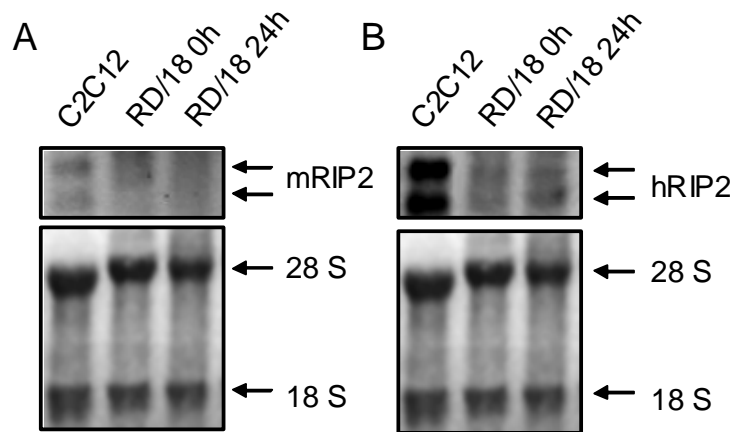
**Abb. 13: Western Blot-Analyse der Expression von *rip2***

Aus RD/18-, C2C12- und HaCaT-Zellen wurden Proteinlysate gewonnen. Diese wurden auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine geeignete Membran transferiert und mit einem RIP2-spezifischen Antikörper inkubiert. Es konnten Banden mit der für das RIP2-Protein charakteristischen Größe von 61 kDa bei allen aufgetragenen Proben detektiert werden. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung diente die Ponceaufärbung (unteres Bild).

Auf RNA-Ebene jedoch war es zunächst nicht möglich, mit der schon im Labor vorhandenen Maus-*rip2-antisense*-RNA-Sonde die Expression von *rip2* bei RD/18-Zellen zu detektieren. Wie Abbildung 14 A sehr deutlich zeigt, waren mit dieser Sonde die beiden für *rip2*-spezifischen Banden von 2,5 und 2,0 kb nur in den als Positivkontrolle aufgetragenen C2C12-Zellen und nicht in den Rhabdomyosarkomzellen nachweisbar.

Wie konnte es also sein, dass das RIP2-Protein eindeutig in Rhabdomyosarkomzellen nachweisbar war, nicht jedoch das entsprechende Transkript?

Dadurch, dass beim *Northern Blot*-Verfahren bei den C2C12-Zellen *rip2*-spezifische Banden sichtbar waren, konnte ein technischer Fehler zunächst ausgeschlossen werden. Die Lösung des Problems lag vielmehr in der Basensequenz der Maus-*rip2-antisense*-RNA-Sonde, die nur zu einem sehr geringen Anteil mit dem humanen *rip2*-Gen homolog war. Nach der Generierung einer humanen *rip2-antisense*-RNA-Sonde im Rahmen meiner Arbeit konnte das *rip2*-Gen auch in den RD/18-Zellen detektiert werden (Abbildung 14 B).

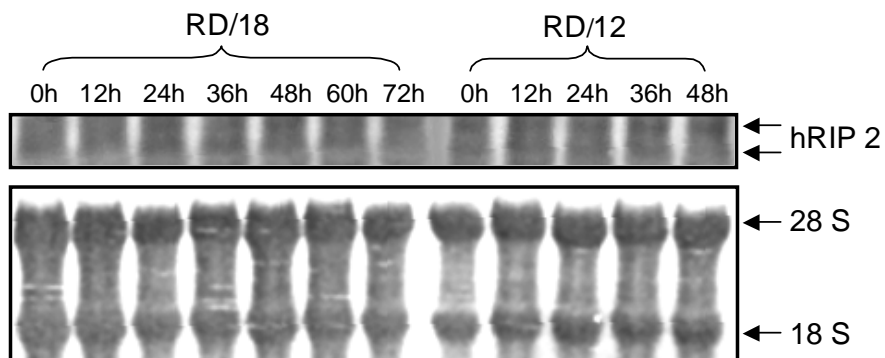


**Abb. 14: Northern Blot-Analyse der *rip2*-Expression**

Nach Extraktion von gesamtzellulärer RNA wurden jeweils 2µg auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. (A) zeigt den mit der Maus *rip2*-antisense-RNA-Sonde hybridisierten Blot und (B) den gleichen Blot hybridisiert mit der humanen *rip2*-antisense-RNA-Sonde. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung ist die Methylenblaufärbung der Membran gezeigt (unteres Bild).

#### 3.2.2.2.2 Untersuchung der *rip2*-Expression in Rhabdomyosarkomzellen

Mit der im Rahmen meiner Arbeit generierten humanen *rip2*-antisense-RNA-Sonde konnten im Folgenden weitere Zeitwerte nach Induktion der Differenzierung bei den RD/18- und RD/12-Zellen hinsichtlich der Expression von *rip2* untersucht werden.



**Abb. 15: Northern Blot-Analyse der *rip2*-Expression während der Differenzierung.**

Es wurden nach Extraktion gesamtzellulärer RNA aus kultivierten Zellen jeweils 3µg auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine geeignete Membran konnte diese mit einer humanen *rip2*-antisense-RNA-Sonde hybridisiert werden. Deutlich zu sehen ist die charakteristische Doppelbande für *rip2* bei 2,5kb und 2,0kb. Die gleichmäßige Beladung der Membran konnte mit der Methylenblaufärbung nachgewiesen werden (unteres Bild).

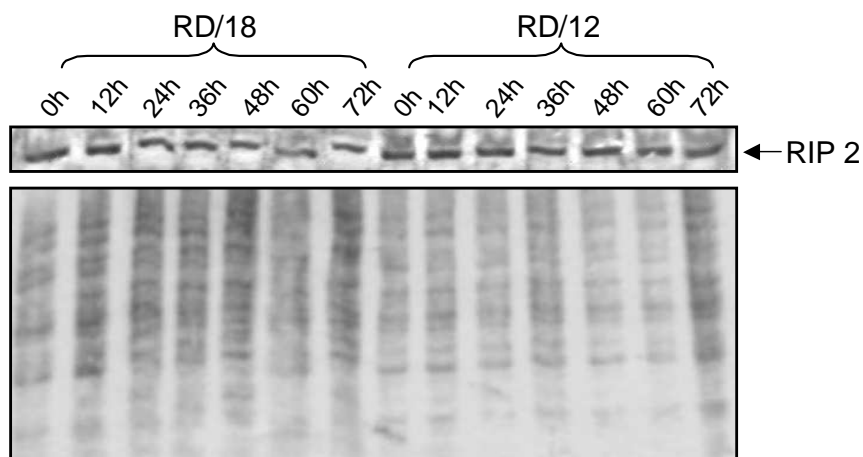
## ERGEBNISSE

Sowohl bei RD/18- als auch bei RD/12-Zellen war mit Hilfe des *Northern Blot*-Verfahrens bei allen analysierten Zeitwerten eine sehr gleichmäßige Expression des *rip2*-Gens zu verzeichnen (siehe Abb.15). Weiterhin war kein Unterschied bezüglich der *rip2*-Expression zwischen den beiden Rhabdomyosarkomzelllinien zu detektieren.

In diesem Ergebnis liegt offensichtlich ein bedeutender Unterschied im Vergleich zu den C2C12-Zellen vor, da bei diesen das Expressionsniveau von *rip2* nach Induktion der Differenzierung sehr schnell absinkt (vergleiche Abb. 7), während es bei den Rhabdomyosarkomzellen konstant blieb. Insgesamt schien die *rip2*-Basalexpression allerdings bei den Tumorzellen niedriger zu sein (Abb. 14 A und B).

Es wurde deutlich, dass die Expression von *rip2* auch auf Proteinebene nach Induktion der Differenzierung konstant bleibt (siehe Abb. 16). Weiterhin waren keine Unterschiede zwischen den beiden Rhabdomyosarkomzelllinien nachweisbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass in Rhabdomyosarkomzellen im Gegensatz zu normalen Muskelzellen keine Repression der *rip2*-Genexpression nach Induktion der Differenzierung stattfindet.



**Abb. 16: Western Blot-Analyse des RIP2-Proteins in RD/18- und RD/12-Zellen**

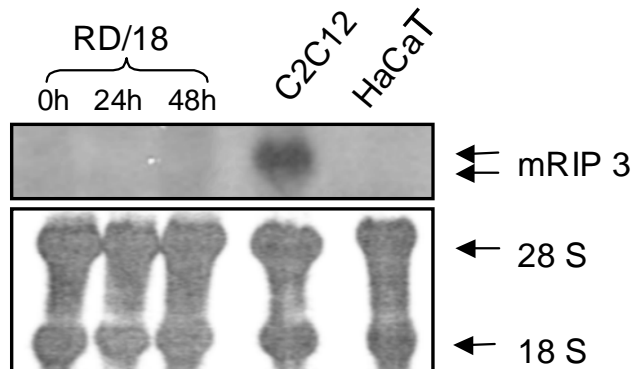
Nach Extraktion von Proteinlysaten aus kultivierten Rhabdomyosarkomzellen zu definierten Zeitpunkten wurden diese auf ein 10% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und im Anschluss daran auf eine Membran transferiert. Durch Inkubation mit einem RIP2-spezifischen Antikörper konnten Banden mit einer Größe von 61kDa detektiert werden. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung wurde die Ponceaufärbung verwendet (unteres Bild).

### 3.2.2.3 Expression von *rip3* in Rhabdomyosarkomzellen

Bei der Analyse der *rip3*-Expression in Rhabdomyosarkomzellen ließ sich auf RNA-Ebene kein Transkript nachweisen, obwohl bekannt war, dass die entsprechende Sonde sowohl das Mensch- als auch das Maus-Transkript erkennt und sich eine deutliche *rip3*-Expression in

## ERGEBNISSE

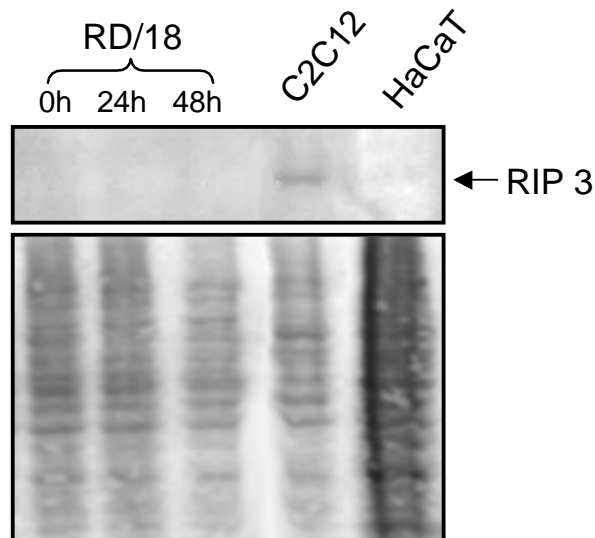
C2C12-Zellen, welche als Positivkontrolle mitgeführt worden waren, nachweisen ließ (Abb. 17). Es zeigten sich zwei Banden, wobei anzumerken ist, dass mit der verwendeten *rip3-antisense*-RNA-Sonde die zweite Bande bei 2,6kb immer nur sehr schwach sichtbar ist und beide Banden oft wenig fokussiert erscheinen.



**Abb. 17: Northern Blot-Analyse der Expression von *rip3* in RD18-Zellen.**

Nach Extraktion von gesamtzellulärer RNA aus RD/18-, C2C12- und HaCaT-Zellen wurden jeweils 5µg auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Im Anschluss erfolgte der Transfer und die Fixation der RNA auf einer geeigneten Membran, die dann mit einer Maus *rip3-antisense*-RNA-Sonde hybridisiert wurde. Es konnten bei den C2C12-Zellen Banden mit einer Größe von 2,1kb und 2,6kb detektiert werden. Die Bande bei 2,6kb ist jedoch immer nur sehr schwach sichtbar. Die Kontrolle der gleichmäßigen Beladung erfolgte mit der Methylenblaufärbung (unteres Bild).

Auch auf Proteinebene konnte RIP3 in Rhabdomyosarkomzellen nicht nachgewiesen werden (Abb. 18).



**Abb. 18: Western Blot-Analyse der *rip3*-Expression in RD/18-Zellen.**

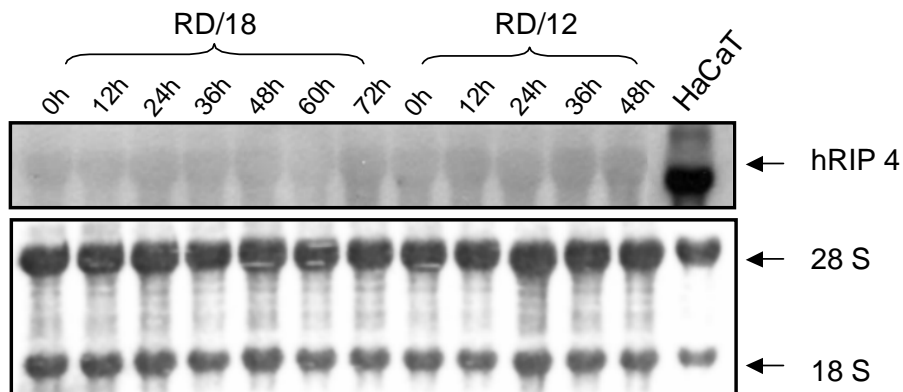
## ERGEBNISSE

Nach Extraktion des gesamtzellulären Proteins und elektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe eines 10%igen SDS-Polyacrylamid-Geles wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und mit einem RIP3-Antikörper inkubiert. Es konnte eine schwache Bande bei den als Postivkontrolle aufgetragenen C2C12-Zellen mit einer Größe von 57 kDa detektiert werden. Die Ponceaufärbung diente zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung (unteres Bild).

Daraus lässt sich schließen, dass Rhabdomyosarkomzellen im Gegensatz zu C2C12-Zellen, wie die C2F3-Zellen keine Expression von *rip3* zeigen.

### 3.2.2.4 Expression von *rip4* in Rhabdomyosarkomzellen

Sowohl bei den RD/18- als auch bei den RD/12-Zellen war keine Expression des *rip4*-Genes nachweisbar, im Gegensatz dazu zeigte sich bei den als Positivkontrolle aufgetragenen HaCaT-Zellen eine deutlich angefärbte Bande der Größe 3,9 kb (Abb. 19).



**Abb. 19: Northern Blot-Analyse der *rip4*-Expression in Rhabdomyosarkomzellen**

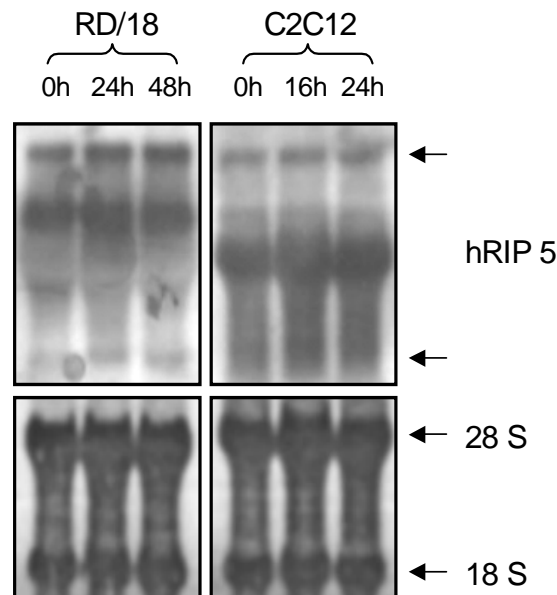
Nach Extraktion von gesamtzellulärer RNA konnten jeweils 3µg auf ein Agarosegel aufgetragen werden. Im Anschluss daran erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran und die Inkubation mit einer humanen *rip4*-*antisense*-RNA-Sonde. Es konnte eine deutliche Bande der Größe 3,9kb bei den als Positivkontrolle aufgetragenen HaCaT-Zellen detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden Rhabdomyosarkomzelllinien keine Expression von *rip4*. Die Kontrolle der gleichmäßigen Beladung erfolgte mit Hilfe der Methylenblaufärbung (unteres Bild).

Diese Daten zeigen, dass *rip4* in Rhabdomyosarkomzellen im Gegensatz zu C2F3- und C2C12-Zellen (siehe Abb. 7) nicht exprimiert wird.

### 3.2.2.5 Expression von *rip5* in RD/18- und C2C12-Zellen

Die für das *rip5*-Transkript typischen Banden waren sowohl bei den RD/18- als auch bei den C2C12-Zellen nachweisbar (siehe Abb. 20). Rhabdomyosarkom- und C2C12-Zellen zeigten

kaum Unterschiede bezüglich der *rip5*-Expression, jedoch schien bei den C2C12-Zellen das Expressionsniveau von *rip5* etwas höher zu liegen.



**Abb. 20: Northern Blot-Analyse der *rip5* Expression in RD/18- und C2C12-Zellen.**

Es wurde gesamtzelluläre RNA aus kultivierten Zellen extrahiert und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine geeignete Membran konnte diese mit einer humanen *rip5-antisense* RNA-Sonde inkubiert werden. Sowohl bei den RD/18- als auch bei den C2C12-Zellen konnten die für das *rip5*-Gen typischen Banden mit einer Größe von 7,5kb und 3,0kb detektiert werden. Mit Hilfe der Methylenblaufärbung konnte die gleichmäßige Beladung der einzelnen Geltaschen nachgewiesen werden (unteres Bild).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den beiden untersuchten Rhabdomyosarkomzelllinien im Gegensatz zu den Mäusemyoblasten nur *rip1*, *rip2* und *rip5* exprimiert wurden.

Weiterhin zeigte die Kinetik der *rip2*-Expression in Rhabdomyosarkomzellen einen grundlegend anderen Verlauf als in C2C12-Zellen, während es bezüglich der Expression von *rip1* und *rip5* keine Unterschiede gab.

Daher und aufgrund verschiedener Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, die eine besondere Rolle von RIP2 bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung zeigten (Munz *et al.* 2002), sollte in den im Folgenden beschriebenen Experimenten insbesondere die Rolle von RIP2 bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung unter besonderer Berücksichtigung der Rolle dieses Proteins in Rhabdomyosarkomzellen analysiert werden.



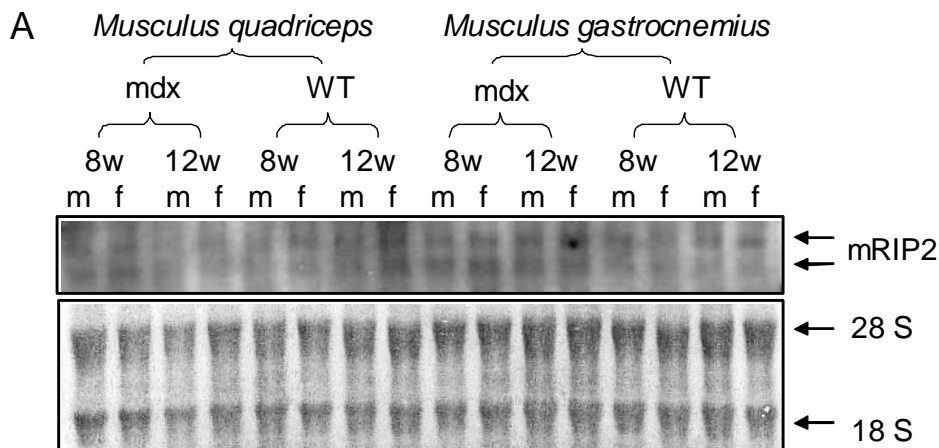
3.2.3 Expression von *rip2* in Muskeln von *mdx*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren

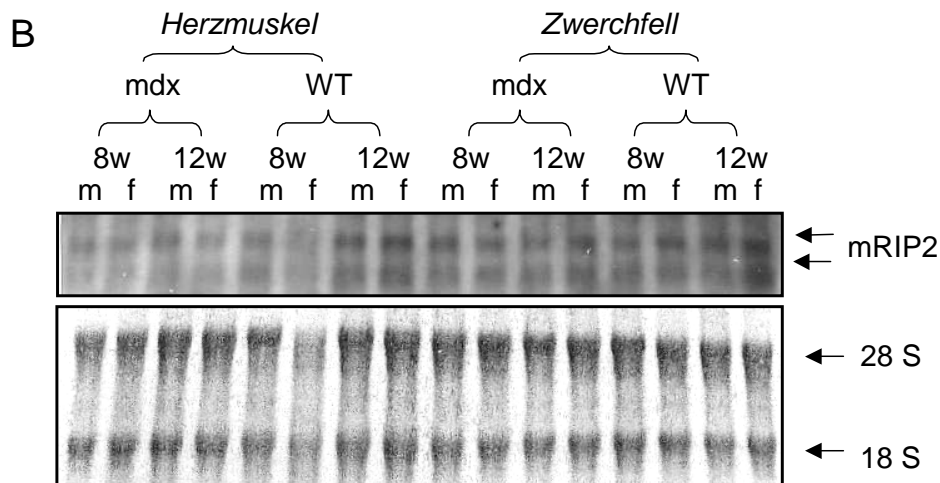
Wie oben erwähnt, legen die in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Ergebnisse nahe, dass *rip*-Gene, insbesondere das *rip2*-Gen, zumindest *in vitro* bedeutende Regulatoren der Skelettmuskelzellproliferation und –differenzierung darstellen könnten. Um daher der Frage nachzugehen, ob eine differentielle Expression von *rip*-Genen auch *in vivo* mit Skelettmuskelzellproliferations- und –differenzierungsprozessen assoziiert sein könnte, wurde die Expression des *rip2*-Gens im *mdx*-Mausmodell analysiert.

*mdx*-Mäuse bilden eine genetisch bedingte Muskeldystrophie aus, die der menschlichen Muskeldystrophie vom Typ Duchenne entspricht. Bei der Maus wie beim Menschen ist das Vererbungsmuster der verantwortlichen Mutation im Gen für das Strukturprotein Dystrophin x-chromosomal rezessiv. Wenngleich die Symptomatik bei der Maus aus noch weitgehend unbekanntem Gründen weit weniger dramatisch ist als beim Menschen, ist bei beiden der Grad der Muskelveränderung altersabhängig. Dabei werden bei der Maus kontinuierliche Zyklen von Muskeldegeneration und –regeneration beobachtet, welche sich einem engen Zeitfenster in Bezug auf das Alter der Tiere mit geringen interindividuellen Schwankungen zuordnen lassen: Nach Lagrota-Candido *et al.* (2002) zeigen die Mäuse im Alter von vier Wochen den höchsten Grad der Muskelnekrose, mit einem Alter von etwa zwölf Wochen erscheint die Nekrose neben hypertrophen Muskelfasern durch Regeneration verbessert und mit 24 Wochen sind neben Muskelhypertrophie Fibrosen vorherrschend, wobei die einzelnen Muskelpartien jeweils unterschiedlich betroffen sein können.

Pro Altersgruppe und Versuch wurden je eine weibliche und eine männliche *mdx*-Maus, sowie eine entsprechende geschlechts- und altersgleiche Wildtypmaus analysiert. Der Grad der Muskelnekrose wurde histologisch überprüft (nicht gezeigt).

Für die Untersuchung der *rip2*-Genexpression wurden der *Musculus quadriceps*, der *Musculus gastrocnemius*, das *Zwerchfell* und das *Herz* entnommen. Aus den Geweben wurde mit Hilfe von Trizol gesamtzelluläre RNA extrahiert und mittels *Northern Blot* analysiert.





**Abb. 21: Expression des *rip2*-Gens in ausgewählten Geweben von *mdx*-Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren**

Es wurden jeweils 3µg RNA auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurde mit einer Maus *rip2*-antisense-RNA-Sonde hybridisiert. (A) Hier wurde die RNA von *Musculus quadriceps* und *gastrocnemius* jeweils im Vergleich zwischen *mdx*- und Wildtyp (WT)-Maus aufgetragen. Es wurden jeweils Proben von männlichen (m) und weiblichen (f) Tieren im Alter von acht (8w) und zwölf (12w) Wochen verwendet. (B) In diesem Fall wurde aus Herzmuskel und Zwerchfell extrahierte RNA aufgetragen, die entnommenen Proben korrelieren mit den Tieren aus (A). Die Überprüfung der gleichmäßigen Beladung erfolgte durch Anfärbung mit Methylenblau (jeweils unteres Bild). Man beachte die insgesamt höhere *rip2*-Genexpression im Zwerchfell.

Die Expression von *rip2* konnte in allen entnommenen Muskelgeweben nachgewiesen werden, jedoch ergaben sich geringe Unterschiede in der Expressionsstärke (siehe Abb. 21). Bei der aus dem *Musculus quadriceps* extrahierten RNA fiel auf, dass eine sehr gleichmäßige Expression von *rip2* unabhängig vom Alter, Geschlecht und Typ vorlag, woraus sich allerdings die acht Wochen alten männlichen und weiblichen *mdx*-Mäuse durch eine leicht höhere Expression von *rip2* hervorhoben.

*rip2* im *Musculus gastrocnemius* war in der Gesamtheit gleichmäßig exprimiert, jedoch wiesen beide Altersstufen der *mdx*-Mäuse eine etwas höhere Genexpression von *rip2* als die dazugehörigen Wildtypmäuse auf.

Mit Hilfe des *Northern Blot*-Verfahrens konnte detektiert werden, dass *rip2* im Herzmuskel geringer exprimiert wurde als im Zwerchfell, sich jedoch keine Unterschiede innerhalb der Altersstufen oder zwischen den Geschlechtern nachweisen ließen.

Zwischen den einzelnen Muskeltypen ergaben sich Unterschiede in der *rip2*-Genexpression, insbesondere wurde eine erhöhte *rip2*-Genexpression im Zwerchfell gefunden. Vorerst sind

die Ergebnisse als präliminar zu betrachten. Um sichere Aussagen zu der Rolle von *rip2* in *mdx*-Mäusen machen zu können, müssten noch weitere Tiere untersucht werden.

### 3.3 Hemmung der Expression des *rip2*-Gens in C2C12-Zellen mittels spezifischer siRNAs

Im zweiten Teil meiner Arbeit sollte das Verhalten der Mäusemyoblasten nach Hemmung der Expression des *rip2*-Genes mit Hilfe von spezifischen siRNAs untersucht werden. Munz *et al.* (2002) konnten nachweisen, dass C2C12-Zellen, die *rip2* überexprimieren, ihre Fähigkeit zur Differenzierung verlieren. Gelingt es im umgekehrten Fall nun, durch Hemmung der *rip2*-Expression das myogene Differenzierungspotential der Zellen zu steigern, so könnte dieses einen wichtigen therapeutischen Ansatzpunkt, beispielsweise für das Rhabdomyosarkom, darstellen.

Aufgrund des schnellen Wachstums und der hervorragenden Transfizierbarkeit wurden die Versuche zunächst mit der murinen Zelllinie C2C12, im Anschluss daran aber auch mit den klinisch relevanten Rhabdomyosarkomzellen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.4).

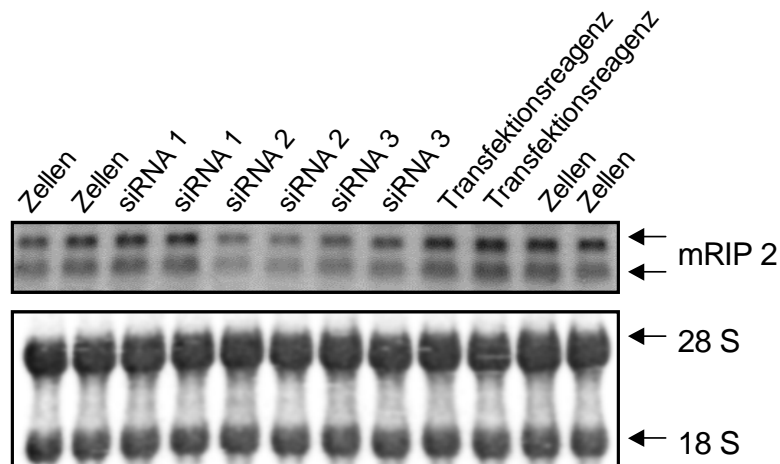
#### 3.3.1 Optimierung der Transfektionsbedingungen

Hierzu wurden C2C12-Zellen in Zellkulturschalen so ausgesät, dass sie 24 Stunden später zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von etwa 60 bis 80% aufwiesen. Für die Transfektion erwies sich dabei nach dem Austesten verschiedener Bedingungen eine siRNA-Endkonzentration von 100  $\mu$ M in Kombination mit der Zugabe von 4  $\mu$ l Transfektionsmedium pro Milliliter Kulturmedium als besonders effektiv. Aus früheren Versuchen mit C2C12-Zellen in unserem Labor war bereits bekannt, dass sich mit dem Transfektionsreagenz *siPort Amine* der Firma Ambion bei dieser Zelllinie die besten Hemmeffekte erzielen ließen.

24 Stunden nach Transfektion der Zellen mit der spezifischen siRNA wurden die ersten Zellextrakte geerntet, was in den nachfolgend beschriebenen Versuchsreihen dem Zeitpunkt null Stunden entspricht. Falls die Zellen mit Differenzierungsmedium versetzt werden sollten, wurde zu diesem Zeitpunkt das Wachstumsmedium gegen Zellkulturmedium mit 2% Pferdeserum ausgetauscht.

#### 3.3.2 Überprüfung der *silencer*-Effektivität der verschiedenen *rip2*-siRNAs

Neben der Optimierung der Transfektionsbedingungen sollten drei unterschiedliche, von der Firma Ambion hergestellte, *rip2*-spezifische siRNA-Spezies auf ihre *silencer*-Effektivität untersucht werden. Hierfür wurde 24 Stunden nach erfolgter Transfektion aus den transfizierten Zellen, aus nur mit Transfektionsreagenz behandelten Zellen und aus unbehandelten C2C12-Zellen die gesamtzelluläre RNA extrahiert. Die RNA konnte mit Hilfe des *Northern Blot*-Verfahrens elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran aufgebracht werden. Mit Hilfe einer Maus *rip2-antisense*-RNA-Sonde konnten die typischen Banden detektiert werden.



**Abb. 22: Vergleich der *silencer*-Effektivität der verschiedenen *rip2*-siRNAs**

Die gesamtzelluläre RNA wurde 24 Stunden nach Transfektion der C2C12-Zellen isoliert und die *rip2*-Genexpression mittels *Northern Blot* analysiert. Es wurden jeweils 3µg RNA auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Man beachte die für die *rip2*-Transkripte spezifischen Banden bei 2,5kb und 2,0kb. Die gleichmäßige Beladung der einzelnen Bahnen konnte mit der Methylenblaufärbung überprüft werden (unteres Bild).

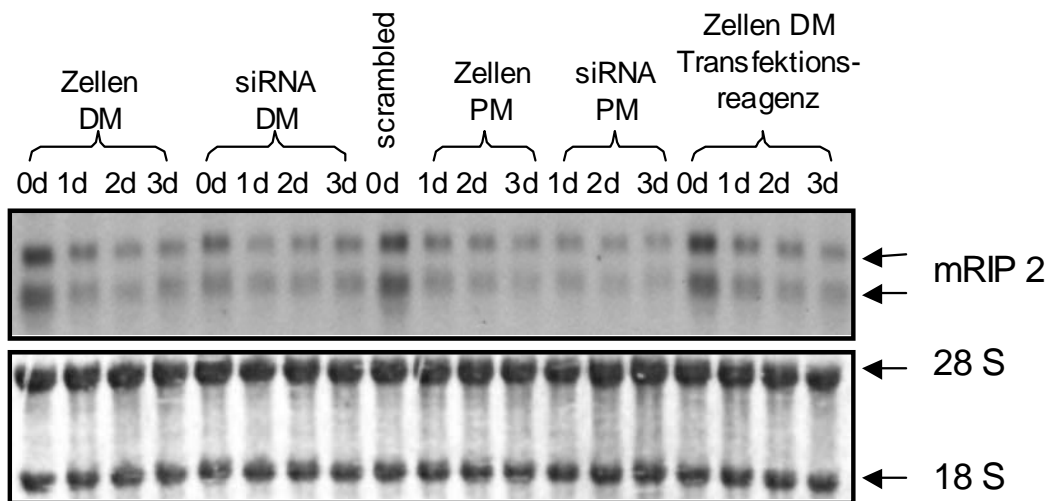
Es war deutlich zu erkennen (Abb. 22), dass siRNA 2 zur stärksten Hemmung der *rip2*-Genexpression führte. Eine geringere Hemmung wurde nach Behandlung mit siRNA 3 beobachtet. Bei siRNA 1 war kein Unterschied im Vergleich zu den verschiedenen anderen, als Negativkontrollen aufgetragenen Proben zu detektieren, was zeigt, dass diese Spezies nicht zu einer Hemmung der *rip2*-Genexpression führt. Auch eine unspezifische (*scrambled*) siRNA hatte keinen Einfluss auf die *rip2*-Genexpression (Daten nicht gezeigt).

Mit diesem Versuch konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass siRNA 2 den größten *silencer*-Effekt besitzt: sie wurde daher für alle weiteren siRNA-Versuche mit C2C12-Zellen verwendet.

### 3.3.3 *rip2*-siRNA-Transfektion bei C2C12-Zellen und Induktion der Differenzierung

Im Anschluss an die Optimierung der Transfektionsbedingungen wurde der Einfluss der Hemmung der *rip2*-Genexpression auf das Differenzierungsverhalten der C2C12-Zellen analysiert. Hierfür wurde wie oben beschrieben 24 Stunden nach Transfektion aus einem Teil der Zellen gesamtzelluläre RNA isoliert (0 Stunden-Wert). Weitere Transfektanden und Kontrollen wurden mit Differenzierungsmedium versetzt oder in Proliferationsmedium weiterkultiviert. Ein, zwei und drei Tage später wurde jeweils aus einem Teil der kultivierten Zellen gesamtzelluläre RNA extrahiert und zunächst mittels *Northern Blot* die Effektivität der Hemmung der *rip2*-Expression in Proliferations- und Differenzierungsmedium überprüft.

## ERGEBNISSE



**Abb. 23: Northern Blot-Analyse der Hemmung der *rip2*-Genexpression in Proliferations- und Differenzierungsmedium.**

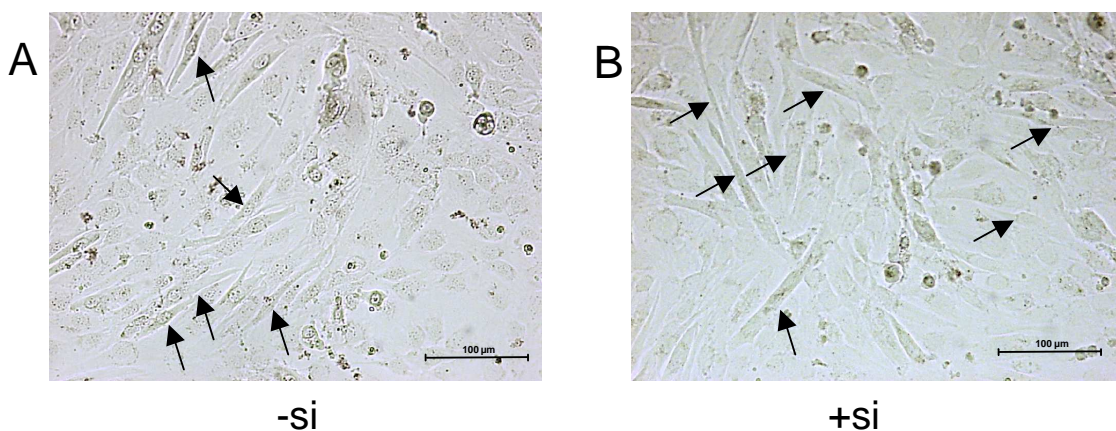
Aus den mit *rip2*-spezifischer siRNA transfizierten und in unterschiedlichen Kulturmedien gehaltenen C2C12-Zellen wurde zu bestimmten Zeitpunkten gesamtzelluläre RNA extrahiert. Nach dem Auftragen von je 2µg auf ein 1%iges Agarosegel und dem anschließenden Transfer auf eine Nylonmembran wurde diese mit einer Maus *rip2*-antisense-RNA-Sonde hybridisiert. Es konnten die *rip2*-spezifischen Banden der Größe 2,5kb und 2,0kb detektiert werden. Anhand der Methylenblaufärbung konnte die gleichmäßige Beladung der einzelnen Bahnen nachgewiesen werden (unteres Bild). Man beachte die starke Hemmung der *rip2*-Genexpression in den transfizierten Zellen in Proliferations- wie auch in Differenzierungsmedium. DM: Differenzierungsmedium, PM: Proliferationsmedium

Abbildung 23 zeigt in unbehandelten Zellen (Zellen DM: Spur 1 - 4) zunächst die erwartete hohe *rip2*-Basalexpression und eine rasche Abnahme der Expression nach Induktion der Differenzierung (Munz *et al.* 2002). Nach Transfektion mit *rip2*-spezifischer siRNA (siRNA DM: Spur 5 - 8) war die Basalexpression von *rip2* wesentlich geringer als bei den unbehandelten Zellen. In Differenzierungsmedium war sie dann wie bei den unbehandelten Kontrollen sehr gering. Die Behandlung mit einer unspezifischen (*scrambled*) siRNA hatte wie erwartet keinen Effekt. Bei den im Proliferationsmedium weiterkultivierten Zellen (Spur 10 - 15) zeigten sowohl die unbehandelten (Zellen PM), als auch die mit siRNA behandelten Zellen (siRNA PM) eine Abnahme der *rip2*-Genexpression im Vergleich zu den jeweiligen null Stunden-Werten, welche vermutlich auf eine erhöhte Zelldichte und damit arretierte Zellproliferation zurückzuführen ist. Dabei wiesen die mit siRNA behandelten Zellen jeweils eine etwas geringere *rip2*-Genexpression auf. Eine Behandlung von Zellen nur mit Transfektionsmedium alleine (Zellen DM Transfektionsreagenz: Spur 16 - 19) hatte auch in Differenzierungsmedium keinen Effekt auf die *rip2*-Genexpression.

Diese Daten zeigen, dass die Hemmung der *rip2*-Expression mittels siRNA sowohl in proliferierenden als auch in differenzierenden C2C12-Zellen effektiv war.

3.3.3.1 *Lichtmikroskopische Untersuchung der mit rip2-siRNA-behandelten C2C12-Zellen*

Zu Beginn der Analyse des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens der transfizierten Zellen sollten diese zunächst lichtmikroskopisch untersucht werden. Hierfür wurde die Hälfte der in Zellkulturschalen ausgesäten C2C12-Zellen mit *rip2*-siRNA behandelt und der andere Teil als Kontrollzellen mitgeführt. Einen Tag nach der Transfektion wurde bei den Zellen das Proliferationsmedium (null Stunden) durch Differenzierungsmedium ausgetauscht. Nach 24 Stunden und 48 Stunden wurde jeweils von den behandelten und den Kontrollzellen das Medium abgenommen, unfixiert mit dem Lichtmikroskop betrachtet und fotografisch festgehalten.



**Abb. 24: Lichtmikroskopische Analyse von unbehandelten und transfizierten C2C12-Zellen**

Dargestellt sind unbehandelte und mit *rip2*-siRNA behandelte C2C12-Zellen, die 48 Stunden in Differenzierungsmedium kultiviert wurden. (A) zeigt unbehandelte C2C12-Zellen, die 48 Stunden in Differenzierungsmedium kultiviert wurden. Die Pfeile deuten auf differenzierte Myoblasten (*Myotubes*). In (B) werden die mit *rip2*-siRNA behandelten Mäusemyoblasten dargestellt. Die zahlreichen *Myotubes* sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Man beachte die größere Zahl der differenzierten Muskelzellen bei den mit siRNA behandelten Zellen.

Bei der lichtmikroskopischen Analyse der Zellen konnte schon 24 Stunden und, wie Abbildung 24 zeigt, sehr deutlich 48 Stunden nach Induktion der Differenzierung bei den mit siRNA behandelten Zellen ein deutlich höherer Anteil von differenzierten Myoblasten (Abb. 24 B) im Vergleich zu den unbehandelten C2C12-Zellen (Abb. 24 A) beobachtet werden. Dieses deutet bereits an, dass eine Hemmung der *rip2*-Genexpression die Differenzierung von C2C12-Zellen fördern kann.

Darauf aufbauend sollen weitere Untersuchungen, insbesondere eine Quantifizierung der Zellproliferation und eine genaue Analyse der Expression myogener Differenzierungsmarker in den behandelten Zellen durchgeführt werden.

### 3.3.3.2 *Proliferationsrate von unbehandelten und siRNA-behandelten C2C12-Zellen*

#### 3.3.3.2.1 Bestimmung der Proliferationsrate mittels BrdU-Markierung: Qualitative Darstellung

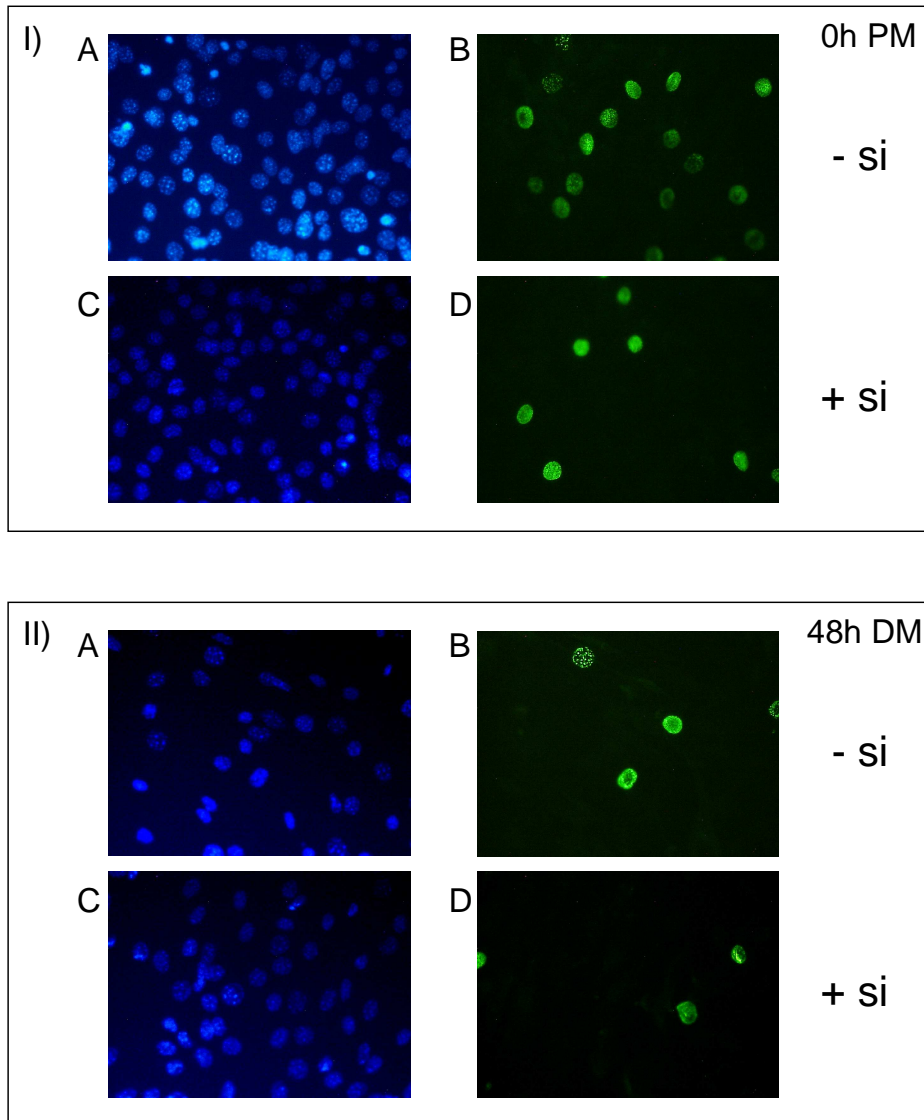
Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden die unbehandelten und die mit *rip2*-siRNA behandelten C2C12-Zellen in Zellkulturschalen ausgesät und mit dem *BrdU labeling kit* der Firma Roche behandelt.

Die Zellen wurden hierfür über einen definierten Zeitraum mit dem Thymidinanalogon 5-Bromo-2' desoxy-Uridin inkubiert. Das Analogon konnte dadurch anstelle von Thymidin in das Genom der Zellen eingebaut und mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen BrdU und einem Fluorchrom-konjugierten sekundären Antikörper im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Alle Zellkerne wurden zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt, dadurch ist es möglich, proliferierende und nicht proliferierende Zellen voneinander zu unterscheiden.

Ein Teil der ausgesäten Zellen wurde zum Zeitpunkt null Stunden fixiert, während der andere Teil für 48 Stunden zum einen in Proliferationsmedium und zum anderen in Differenzierungsmedium kultiviert wurde.

Insgesamt zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich des Anteils der proliferierenden Zellen zwischen unbehandelten und mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten Mäusemyoblasten. Zu den Zeitpunkten null Stunden und 48 Stunden war deutlich zu erkennen, dass die Zahl der proliferierenden Zellen bei denjenigen Myoblasten, die *rip2*-siRNA behandelt worden waren geringer war [Abb. 25 I) und II) jeweils B und D]. Dieses sollte, wie im nächsten Abschnitt dargestellt, durch Auszählen der markierten Zellen quantifiziert werden.



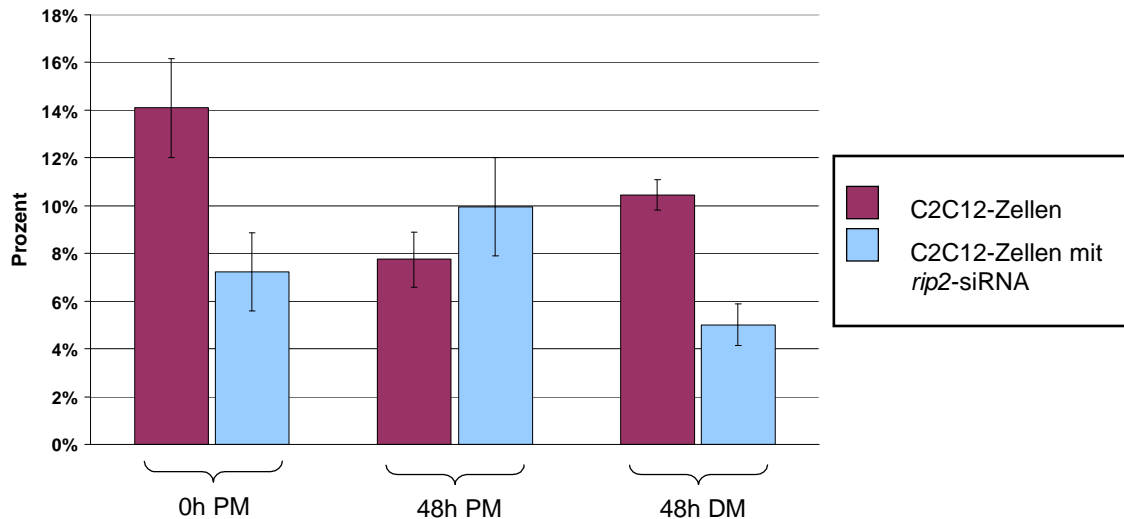
**Abb. 25: Unbehandelte und siRNA-behandelte C2C12-Zellen mit DAPI- und BrdU-Färbung**

Die Zellen wurden mit dem *BrdU labeling kit* behandelt und gleichzeitig mit DAPI gefärbt. Jeweils auf der linken Seite ist die Gesamtheit der Zellkerne (DAPI-Färbung) sichtbar, während auf der rechten Seite genau die Zellkerne in der BrdU-Färbung angefärbt sind, die sich während der Markierungszeit geteilt haben. I) A bis D stellt unbehandelte und transfizierte C2C12-Zellen zum Zeitpunkt der Induktion der Differenzierung (null Stunden) dar. In II) A bis D sind die entsprechenden Zellen 48 Stunden nach Kultivierung in Differenzierungsmedium gezeigt. Man beachte die Unterschiede in der Anzahl an BrdU-gefärbten Zellkernen zum Zeitpunkt null Stunden und 48 Stunden und zwischen den behandelten und unbehandelten Mäusemyoblasten. PM: Proliferationsmedium; DM: Differenzierungsmedium.



3.3.3.2.2 Grafische Darstellung der Proliferationsrate bei C2C12-Zellen

Zur Auswertung der Proliferationsrate wurden jeweils fünf repräsentative Gesichtsfelder mit einer entsprechend ähnlichen Anzahl an DAPI-gefärbten Zellkernen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Jeweils in dem gleichen Gesichtsfeld wurden auch diejenigen Zellen ausgezählt, die BrdU in ihr Zellgenom eingebaut hatten. Aus diesen Daten konnte die Proliferationsrate berechnet und im Diagramm dargestellt werden.



**Abb. 26: Proliferationsverhalten der mit *rip2*-siRNA behandelten im Vergleich zu C2C12-Kontrollzellen.**

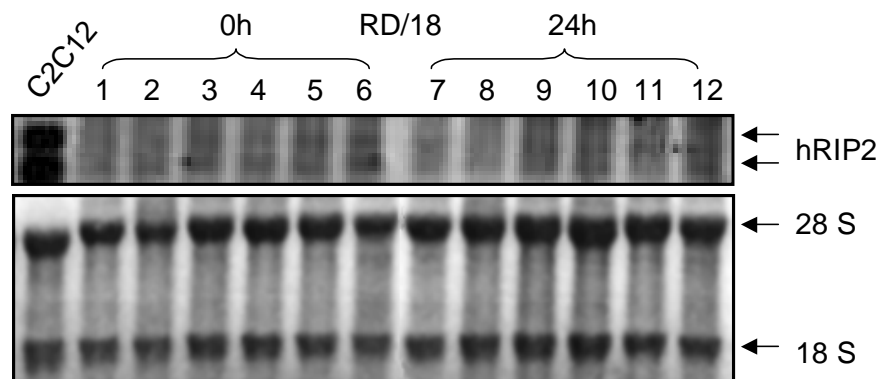
Mit *rip2*-siRNA transfizierte und unbehandelte C2C12-Zellen wurden mit Hilfe des *BrdU labeling kits* auf ihr Proliferationsverhalten in Proliferations- (PM) und Differenzierungsmedium (DM) zu unterschiedlichen Zeitwerten (null Stunden und 48 Stunden) untersucht. Man beachte die deutlich niedrigere Proliferationsrate der behandelten Zellen bei null Stunden und 48 Stunden Differenzierungsmedium.

In dem gezeigten Balkendiagramm (Abb. 26) sind die Proliferationsraten von unbehandelten und siRNA-behandelten Mäusemyoblasten zum Zeitpunkt null Stunden in Proliferationsmedium und zum Zeitpunkt 48 Stunden in Proliferations- und Differenzierungsmedium dargestellt. Es war sehr deutlich zu sehen, dass bei null und 48 Stunden in Differenzierungsmedium die transfizierten C2C12-Zellen eine deutlich geringere Proliferationsrate als die unbehandelten Kontrollzellen aufwiesen. Diejenigen mit siRNA behandelten Muskelzellen, die bis 48 Stunden weiter im Proliferationsmedium kultiviert worden waren, wiesen eine wesentlich höhere Proliferationsrate als die entsprechenden Kontrollzellen auf. Dieses könnte damit zusammenhängen, dass die behandelten Zellen aufgrund einer geringeren Proliferationsrate zu Beginn des Versuchs im Vergleich zu unbehandelten C2C12-Zellen zum Zeitpunkt 48 Stunden noch eine geringere Zelldichte aufwiesen, was sich förderlich auf ihre Proliferationsrate auswirkt.

### 3.4 Hemmung der Expression des *rip2*-Gens in RD/18-Zellen mittels spezifischer siRNA

#### 3.4.1 Optimierung der Transfektionsbedingungen bei RD/18-Zellen

Im Anschluss an die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Experimente mit C2C12-Zellen sollte nun untersucht werden, ob mittels spezifischer siRNAs auch eine Hemmung der *rip2*-Genexpression in Rhabdomyosarkomzellen erreicht werden kann und ob diese gegebenenfalls Einfluss auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten dieser Zellen hat.



**Abb. 27: Northern Blot-Analyse der Hemmung der *rip2*-Genexpression mit Hilfe einer spezifischen siRNA in RD/18-Zellen.**

Es wurde gesamtzelluläre RNA aus *rip2*-siRNA transfizierten RD18-Zellen extrahiert. Auf das 1%ige Agarosegel wurden jeweils 2µg RNA aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine geeignete Membran transferiert. Die Membran konnte in Anschluss daran mit einer humanen *rip2*-antisense-RNA-Sonde hybridisiert werden. Es konnten die für *rip2*-spezifischen Banden mit einer Größe von 2,5kb und 2,0kb detektiert werden. Als Positivkontrolle sind C2C12-Zellen aufgetragen. Die anderen Spuren stellen RD/18-Zellen dar, deren gesamtzelluläre RNA zum Zeitpunkt null und 24 Stunden extrahiert worden war. Die Zellen aus Spur 1 und 7 waren mit je 1,5µg spezifischer siRNA und 9µl Transfektionreagenz behandelt worden. Spur 2 und 8 stellen diejenigen Zellen dar, die ebenfalls mit 1,5µg siRNA, jedoch nur mit 4,5µl Transfektionsreagenz behandelt worden sind. Bei den Spuren 3,4,9 und 10 waren die Zellen mit 0,5µg siRNA behandelt und entweder mit 9µl (Spur 3 und 9) oder mit 4,5µl (Spur 4 und 10) Transfektionsreagenz transfiziert worden. In den Spuren 5 und 11 wurde RNA aus Kontrollzellen aufgetragen, die nur mit Transfektionsreagenz (9µl) behandelt worden waren. Die Spuren 6 und 12 entsprechen unbehandelten RD/18-Zellen. Die gleichmäßige Beladung wurde mit Hilfe der Methylenblaufärbung überprüft (unteres Bild). Man beachte, dass in den Spuren mit 1,5µg (entspricht der Konzentration von 0,7µg pro Milliliter Kulturmedium) siRNA (Spur 1,2,7 und 8) die stärkste Hemmung erreicht wurde.

Wie für C2C12-Zellen beschrieben, mussten hierfür zunächst die Transfektionsbedingungen optimiert werden. Dafür wurden RD/18-Zellen so in Kulturschalen ausgesät, dass zum Transfektionszeitpunkt 24 Stunden später eine Konfluenz von 70 bis 80% erreicht war. Da humane *rip2*-spezifische siRNA bisher nicht kommerziell erhältlich ist, wurde diese mit Hilfe des *siRNA Dicer Kits* der Firma Roche und eines entsprechenden *Templates* selbst hergestellt. Als optimal erwies sich hierbei eine siRNA-Konzentration von 0,7µg pro Milliliter Kulturmedium. Das Transfektionsreagenz der Firma Roche wurde in einer Menge von 4µl pro Milliliter Kulturmedium hinzugefügt.

Entsprechend den Versuchsmodalitäten bei den C2C12-Zellen wurde 24 Stunden nach der Transfektion erstmals gesamtzelluläre RNA aus einem Teil der Transfektanden isoliert (0 Stunden-Wert). Die verbleibenden Zellen wurden dann mit Differenzierungsmedium versetzt und zu definierten Zeitpunkten die gesamtzelluläre RNA extrahiert.

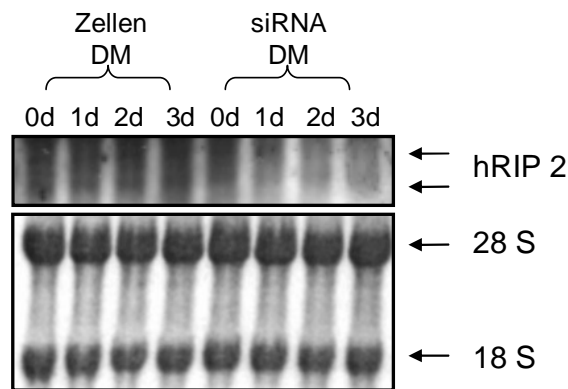
Es ist deutlich zu erkennen (Abb. 27), dass die stärkste Hemmung der *rip2*-Genexpression bei den RD/18-Zellen, die mit 1,5µg spezifischer siRNA transfiziert (entsprechend einer Endkonzentration von 0,7µg pro Milliliter Kulturmedium) wurden, zu beobachten war. Bei einer Menge von 0,5µg siRNA (entsprechend einer Endkonzentration von 0,25µg pro Milliliter Kulturmedium) oder weniger pro Zellkulturschälchen war kein Unterschied mehr zu den aufgetragenen Kontrollzellen zu verzeichnen.

Hierdurch konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass eine Konzentration von 0,7µg *rip2*-spezifischer siRNA pro Milliliter Kulturmedium den größten *silencer*-Effekt besitzt, daher wurde in den nachfolgenden Versuchen mit RD/18-Zellen jeweils diese Konzentration eingesetzt.

### 3.4.2 *rip2*-siRNA-Transfektion bei RD/18-Zellen und Induktion der Differenzierung

Entsprechend den C2C12-Zellen wurde im Anschluss an die Optimierung der Transfektionsbedingungen der Einfluss der Hemmung der *rip2*-Genexpression auf das Differenzierungsverhalten der RD/18-Zellen analysiert. Wie in Abschnitt 3.3.3. für Mäusemyoblasten beschrieben, wurde im weiteren auch bei den Rhabdomyosarkomzellen vorgegangen und die Effektivität der Hemmung der *rip2*-Expression in Differenzierungsmedium mittels *Northern Blot*-Verfahrens überprüft.

In Abbildung 28 sind in den ersten vier Spuren Rhabdomyosarkomzellen gezeigt, bei denen am Tag 0 die Differenzierung induziert wurde. Es ist deutlich zu sehen, dass die *rip2*-Genexpression bis zum Tag drei der Differenzierung auf Höhe der Basalexpression blieb (vergleiche Abschnitt 3.2.2.2.). Die mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten Zellen (Spur 5-8) zeigten schon bei null Tagen eine geringere *rip2*-Basalexpression, die im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen im weiteren Verlauf der Differenzierung weiter abnahm. Die Behandlung mit einer unspezifischen (*scrambled*) siRNA und mit Transfektionsmedium alleine hatte wie erwartet keinen Effekt auf die *rip2*-Genexpression.



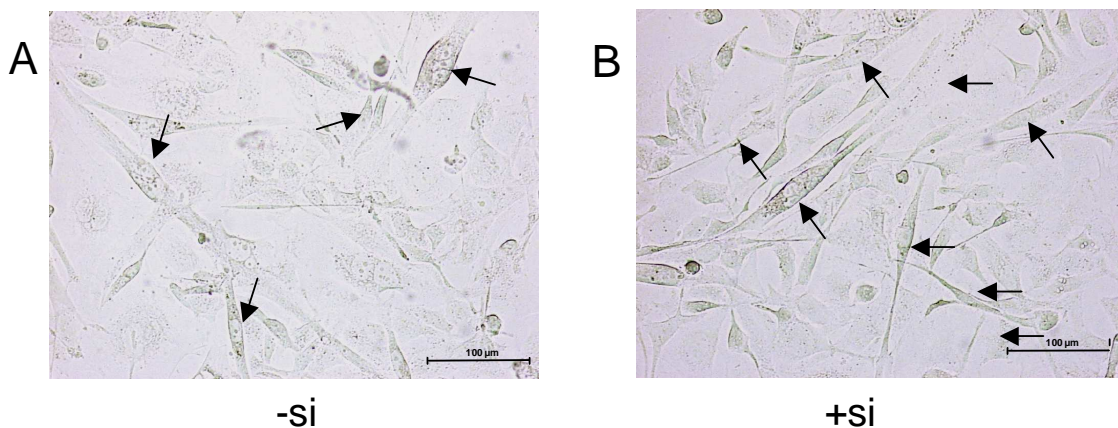
**Abb. 28: Northern Blot-Analyse der Hemmung der *rip2*-Genexpression in Proliferations- und Differenzierungsmedium.**

Aus den mit *rip2*-spezifischer siRNA transfizierten RD/18-Zellen wurde zu bestimmten Zeitpunkten gesamtzelluläre RNA extrahiert. Nach dem Auftragen von jeweils 3µg auf ein 1%iges Agarosegel und dem anschließenden Transfer auf eine Nylonmembran wurde diese mit einer Mensch-*rip2*-antisense-RNA-Sonde hybridisiert. Es konnten die *rip2*-spezifischen Banden der Größe 2,5kb und 2,0kb detektiert werden. Anhand der Methylenblaufärbung konnte die gleichmäßige Beladung der einzelnen Bahnen nachgewiesen werden (unteres Bild). DM: Differenzierungsmedium. Man beachte die deutliche Abnahme der *rip2*-Expression bei den mit siRNA behandelten Rhabdomyosarkomzellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Hemmung der *rip2*-Genexpression in Rhabdomyosarkomzellen mittels spezifischer siRNAs sowohl in proliferierenden als auch in differenzierenden Zellen erfolgt.

#### 3.4.2.1 Lichtmikroskopische Untersuchung der mit *rip2*-siRNA-behandelten RD/18-Zellen

Entsprechend den Mäusemyoblasten (siehe Abschnitt 3.3.3.1) wurden auch die unbehandelten und mit *rip2*-siRNA transfizierten Rhabdomyosarkomzellen unfixiert mit dem Lichtmikroskop betrachtet und ihr Erscheinungsbild fotografisch festgehalten.



### **Abb. 29: Lichtmikroskopische Analyse von unbehandelten und transfizierten RD/18-Zellen**

Dargestellt sind unbehandelte und mit *rip2*-siRNA behandelte RD/18-Zellen, die 48 Stunden in Differenzierungsmedium kultiviert wurden. (A) Zeigt Kontroll-RD/18-Zellen, die 48 Stunden in Differenzierungsmedium kultiviert wurden. Die Pfeile deuten auf differenzierte Myoblasten (*Myotubes*) hin. In (B) sind die mit *rip2*-siRNA behandelten Rhabdomyosarkomzellen dargestellt. Die zahlreichen *Myotubes* sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Man beachte die große Anzahl der differenzierten Muskelzellen bei den mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten Zellen.

Bei der lichtmikroskopischen Analyse von Rhabdomyosarkomzellen konnte 48 Stunden nach Induktion der Differenzierung ein deutlich höherer Anteil von differenzierten Myoblasten bei den mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten Zellen (Abb. 29 B) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 29 A) nachgewiesen werden.

Dieses deutet an, dass eine Hemmung der *rip2*-Genexpression die Differenzierung nicht nur bei den normalen Mäusemyoblasten, sondern auch bei Rhabdomyosarkomzellen fördern kann. Dieses könnte einen wichtigen therapeutischen Ansatzpunkt für Rhabdomyosarkome darstellen.

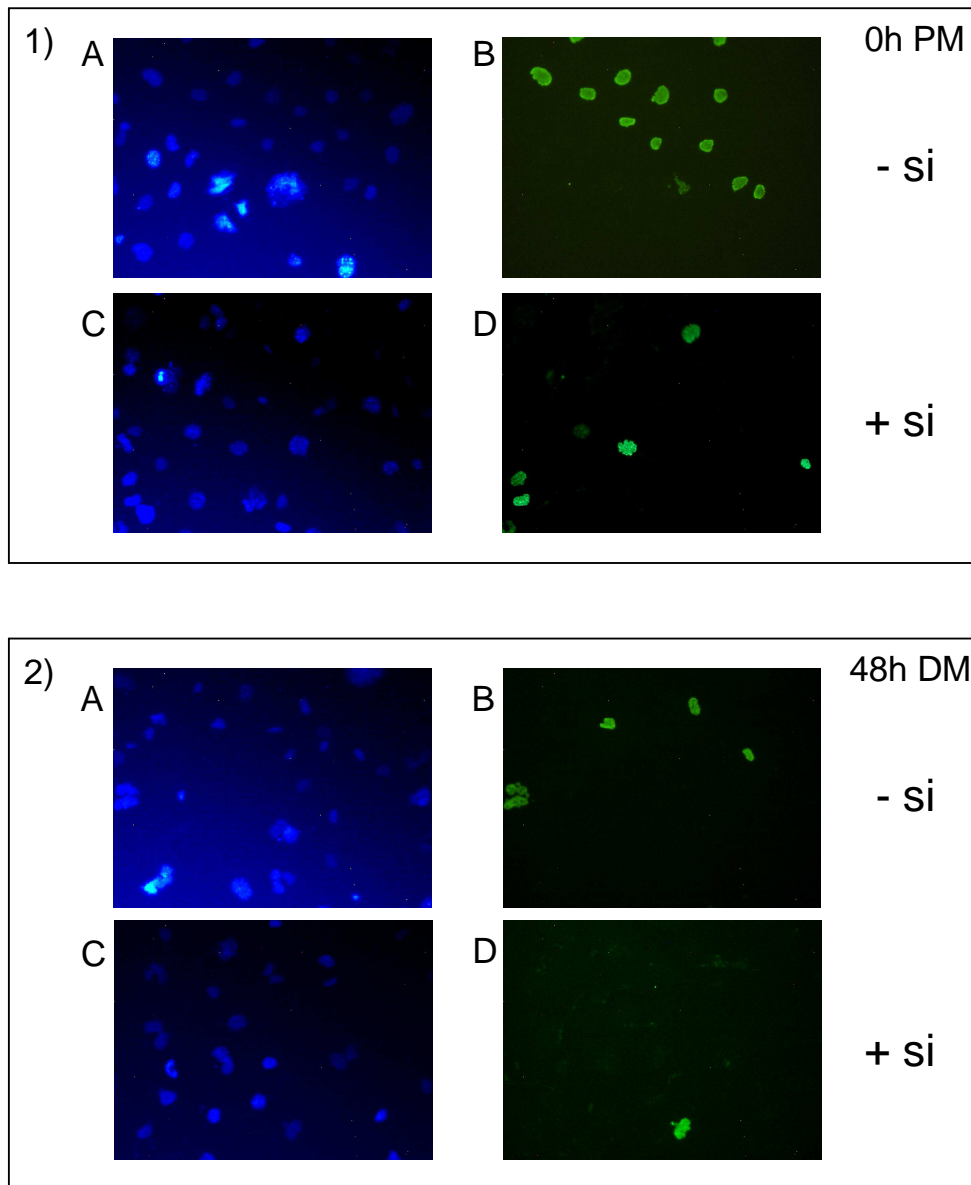
#### 3.4.2.2 *Proliferationsrate von unbehandelten und mit rip2-siRNA-behandelten RD/18-Zellen*

##### 3.4.2.2.1 Bestimmung der Proliferationsrate mittels BrdU-Markierung: Qualitative Darstellung

Wie bei den C2C12-Mäusemyoblasten (Abschnitt 3.3.3.2) wurde auch bei den mit *rip2*-spezifischer siRNA transfizierten RD/18-Zellen mit Hilfe des *BrdU labeling kits* der Firma Roche die Zellproliferationsrate bestimmt.

Entsprechend den C2C12-Zellen wurde ein Teil der ausgesäten Zellen zum Zeitpunkt null Stunden fixiert, während der andere Teil für 48 Stunden in Differenzierungsmedium weiterkultiviert wurde.

Die mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie dargestellten unbehandelten und mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten Rhabdomyosarkomzellen zeigten deutliche Unterschiede bezüglich ihres Anteils an proliferierenden Zellen. Zu den Zeitpunkten null Stunden und 48 Stunden war sehr deutlich zu erkennen, dass die Zahl der proliferierenden Zellen bei denjenigen RD/18-Zellen, die *rip2*-siRNA behandelt worden waren, sehr viel geringer war [Abb. 30 1) und 2) jeweils B und D] als bei den entsprechenden Kontrollzellen [Abb.30 1) und 2) jeweils A und C].

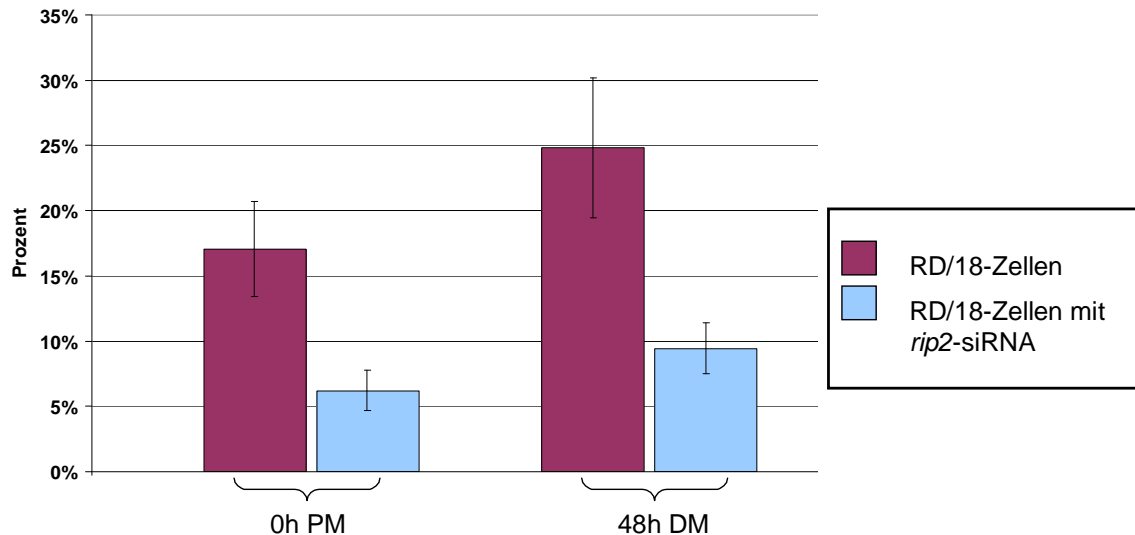


**Abb. 30: Unbehandelte und siRNA-behandelte RD/18-Zellen mit DAPI- und BrdU-Färbung.**

Die Zellen wurden mit dem BrdU *labeling kit* behandelt und gleichzeitig mit DAPI gefärbt. Jeweils auf der linken Seite ist die Gesamtheit der Zellkerne in der DAPI-Färbung sichtbar, während auf der rechten Seite genau die Zellkerne in der BrdU-Färbung angefärbt sind, die sich während der Markierungszeit geteilt haben. 1) A bis D stellt unbehandelte und transfizierte RD/18-Zellen zum Zeitpunkt der Induktion der Differenzierung (null Stunden) dar. In 2) A bis D sind die entsprechenden Zellen 48 Stunden nach Kultivierung in Differenzierungsmedium gezeigt. Man beachte die Unterschiede in der Anzahl an BrdU gefärbten Zellkernen zum Zeitpunkt null Stunden und 48 Stunden. PM: Proliferationsmedium; DM: Differenzierungsmedium

### 3.4.2.2.2 Grafische Darstellung der Proliferationsrate bei RD/18-Zellen

Die Auswertung der Proliferationsrate bei den Rhabdomyosarkomzellen erfolgte entsprechend der für die C2C12-Mäusemyoblasten beschriebenen Strategie (Abschnitt 3.3.3.2.2).



**Abb. 31: Proliferationsverhalten der mit *rip2*-siRNA behandelten im Vergleich zu unbehandelten RD/18-Kontrollzellen**

Unbehandelte und mit *rip2*-siRNA transfizierte Rhabdomyosarkomzellen wurden mit Hilfe des BrdU *labeling kits* auf ihr Proliferationsverhalten in Proliferations- (PM) und Differenzierungsmedium (DM) zu unterschiedlichen Zeitwerten (null Stunden und 48 Stunden) untersucht. Man beachte die deutlich niedrigere Proliferationsrate der behandelten Zellen bei null Stunden und 48 Stunden.

In dem Balkendiagramm (Abb. 31) sind die Proliferationsraten von unbehandelten und *rip2*-siRNA-behandelten Rhabdomyosarkomzellen zum Zeitpunkt null Stunden in Proliferationsmedium und zum Zeitpunkt 48 Stunden in Differenzierungsmedium dargestellt. Es war sehr deutlich zu sehen, dass bei null und 48 Stunden die transfizierten RD/18-Zellen eine deutlich geringere Proliferationsrate als die unbehandelten Kontrollzellen aufwiesen.

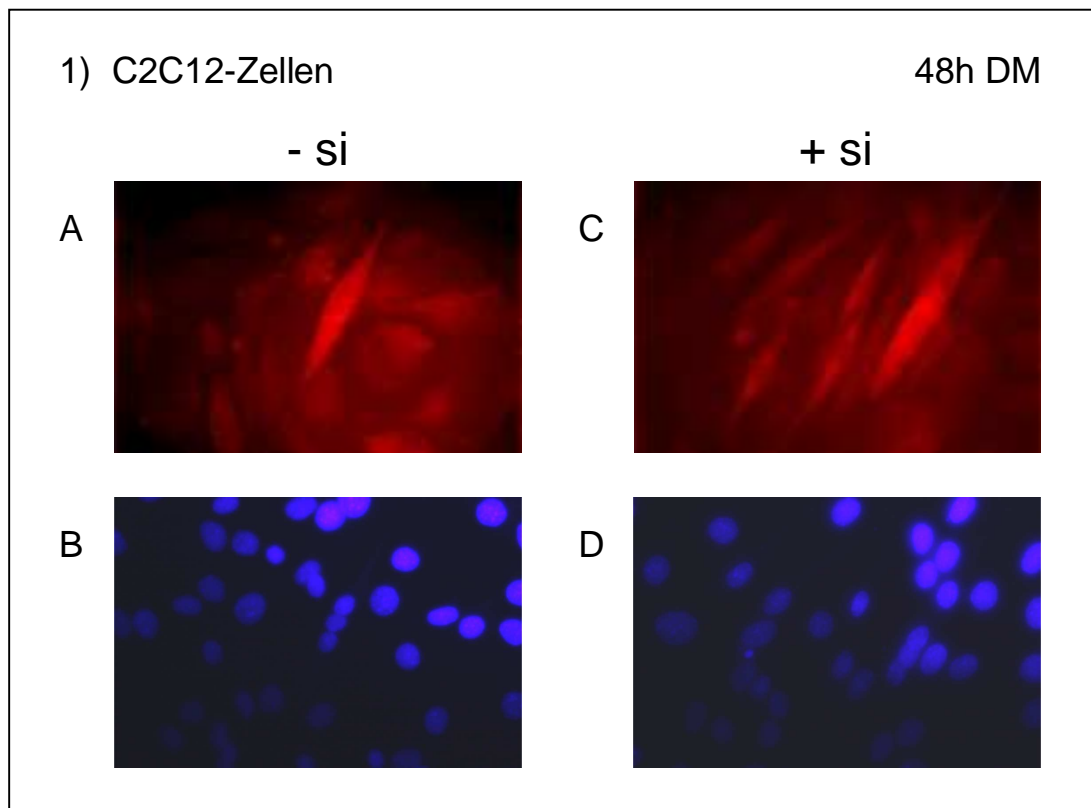
Diese Ergebnisse zeigen, dass durch eine Behandlung mit *rip2*-spezifischer siRNA eine Hemmung der Proliferationsrate von Rhabdomyosarkomzellen erreicht werden kann.

## 3.5 Immunzytochemische Untersuchung der Expression von *myosin heavy chain* (MHC) in C2C12- und RD/18-Zellen

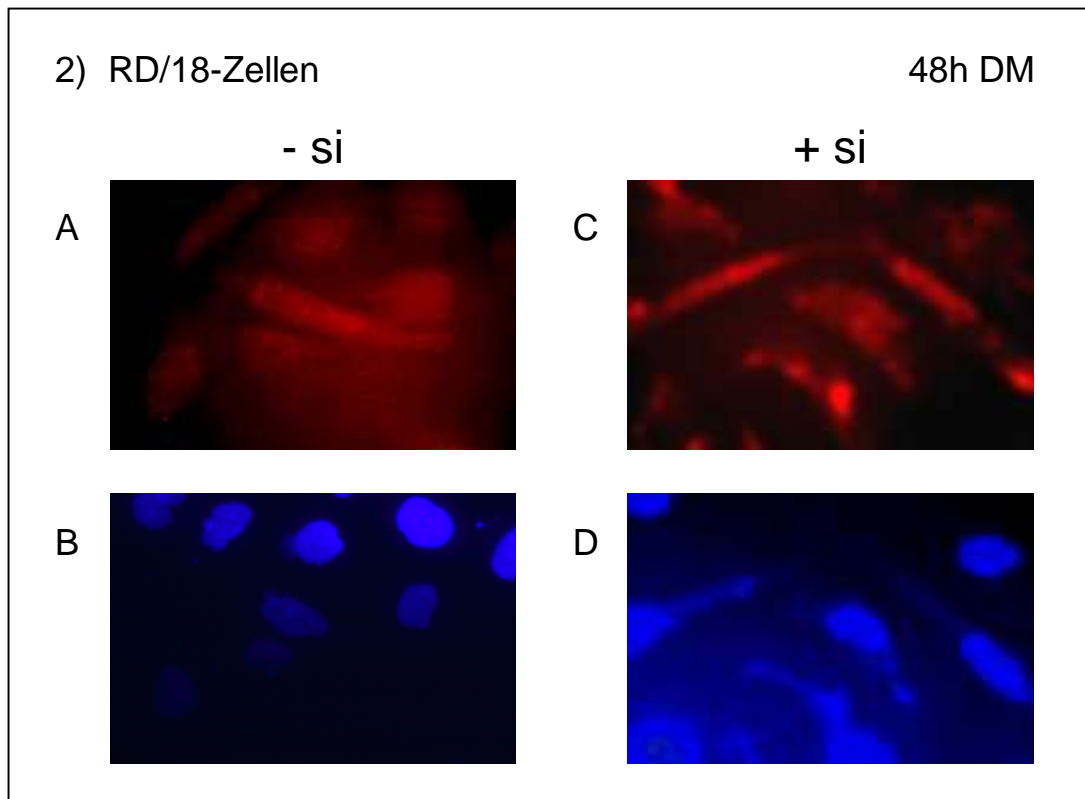
Einige Gene verändern im Verlauf der Muskeldifferenzierung ihre Expressionsstärke, sie werden als myogene Differenzierungsmarker bezeichnet. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression des muskelspezifischen Proteins *myosin heavy chain* (MHC) sowohl bei C2C12-Zellen (Langley *et al.* 2002), als auch bei RD/18-Zellen (Astolfi *et al.* 2001) während der Differenzierung stark ansteigt.

3.5.1 Immunzytochemische Untersuchung der unbehandelten und mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten C2C12- und RD/18-Zellen zum Nachweis von *myosin heavy chain*

Um den Einfluss der Behandlung mit *rip2*-spezifischen siRNAs auf die Expression des *myosin heavy chain*-Gens zu untersuchen, wurden jeweils unbehandelte und mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelte C2C12-Mäusemyoblasten und RD/18-Rhabdomyosarkomzellen in Zellkulturschalen kultiviert und durch den Austausch des Kulturmediums die Differenzierung induziert. Nach 48 Stunden wurde das Medium komplett abgesaugt und die Zellen mit einem Aceton-Methanol-Gemisch, dem der Fluoreszenzfarbstoff DAPI zur Markierung der Zellkerne beigefügt worden war, fixiert. Anschließend konnten die fixierten Zellen zur Überprüfung der Differenzierung mit einem Anti-MHC (*myosin heavy chain*) Antikörper und einem zweiten fluoreszierenden Antikörper inkubiert und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes betrachtet werden.







**Abb. 32: Immunfluoreszenzen von differenzierten unbehandelten und mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten C2C12- [1] und RD/18-Zellen [2]**

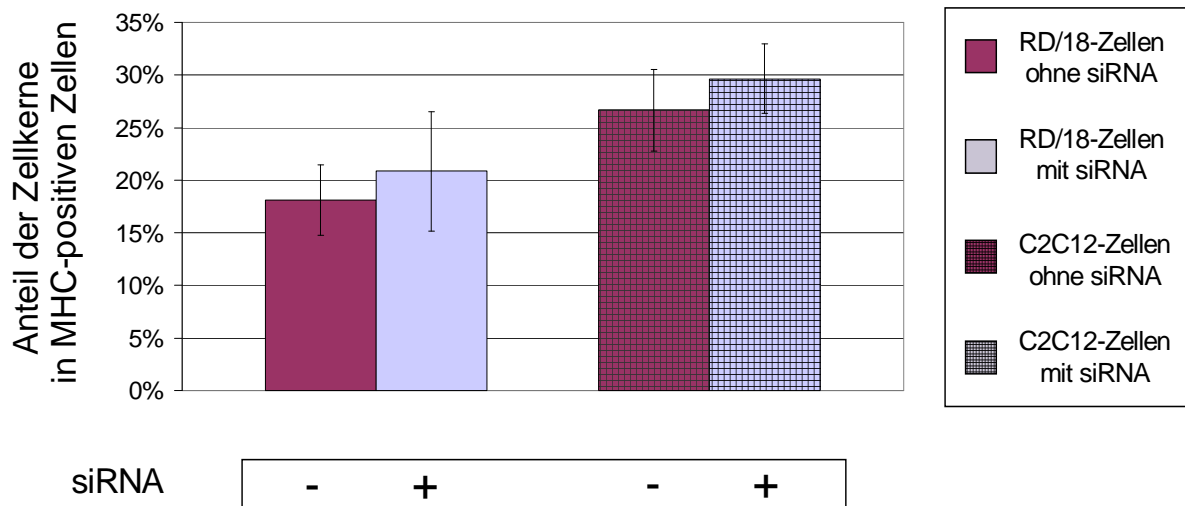
Die beiden Zelllinien wurden 48 Stunden nach Induktion der Differenzierung fixiert und mit dem ersten Antikörper anti-MHC-Ziege und einem zweiten fluoreszierenden Antikörper Cy3 Esel anti-Ziege inkubiert. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes und einer entsprechenden Anregungswellenlänge konnten die Cy3-spezifischen Signale für MHC im Cytosol der Zellen detektiert werden. Man beachte die spezifischen Anfärbung von Myozyten und Myotuben sowie die insgesamt vermehrte Anfärbung von Zellen in den Präparaten, die mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelt worden waren.

Hierdurch konnte, wie in Abb. 32 gezeigt, eine spezifische Anfärbung insbesondere derjenigen Zellen erreicht werden, welche die Morphologie von Myozyten und Myotuben zeigten. Außerdem wurde deutlich, dass sowohl bei den C2C12- als auch bei den RD/18-Zellen jeweils die mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine wesentlich größere Anzahl von *myosin heavy chain*-positiven Zellen aufwiesen. Dieses spricht dafür, dass die Hemmung von *rip2* sowohl in den Mäusemyoblasten, als auch in den Rhabdomyosarkomzellen zu einer verbesserten Differenzierung führt. Diese Ergebnisse könnten einen wichtigen Ansatzpunkt in Hinblick auf die Therapie von Rhabdomyosarkomen darstellen.

3.5.2 Grafische Auswertung der mit einem *myosin heavy chain*-Antikörper inkubierten differenzierten C2C12- und RD/18-Zellen – ein Vergleich zwischen unbehandelten und mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten Zellen

Es wurde eine bestimmte Anzahl von Gesichtsfeldern der mit einem MHC-Antikörper inkubierten und im Fluoreszenzmikroskop betrachteten Zellen (siehe Abschnitt 3.5.1) ausgewertet, um ihre Differenzierungseigenschaften grafisch darzustellen.

Dafür wurden zunächst diejenigen Zellen ausgezählt, die MHC-positiv waren. Außerdem wurde im selben Gesichtsfeld die Anzahl der Zellkerne, die mit Hilfe der DAPI-Färbung angefärbt worden waren, bestimmt.



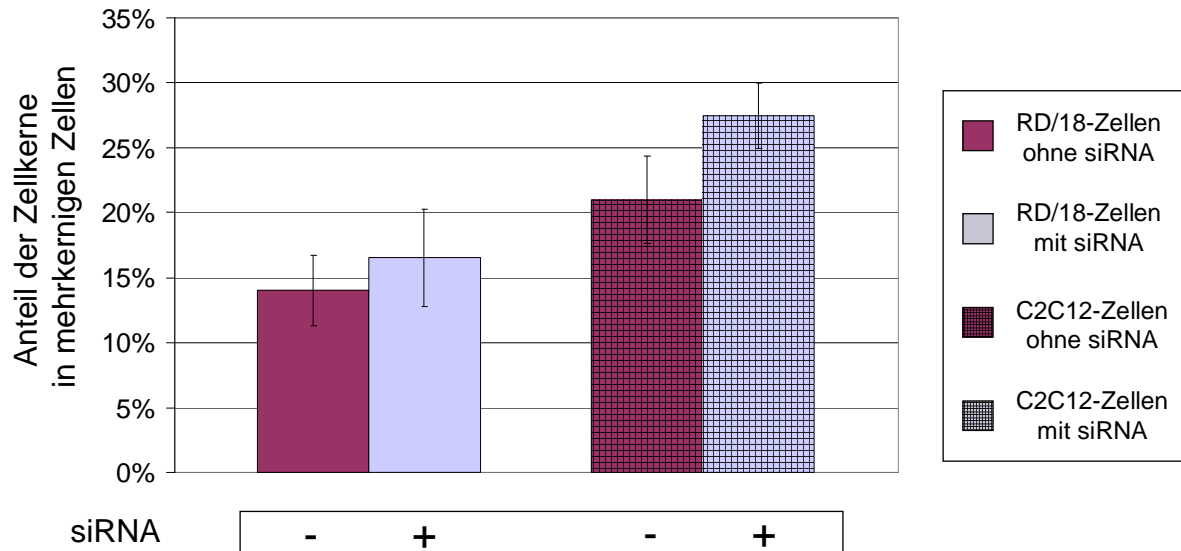
**Abb. 33: Anteil der Zellkerne in MHC-positiven Zellen im Vergleich zwischen unbehandelten und mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten RD/18- und C2C12-Zellen**

Bei mit *rip2*-siRNA transfizierten und unbehandelten RD/18- und C2C12-Zellen, welche für 48 Stunden in Differenzierungsmedium kultiviert worden sind, wurden zum einen die Zahl der MHC-positiven Zellen und zum anderen die Anzahl der Zellkerne in genau diesen Zellen ausgezählt. Man beachte den allgemein geringeren Anteil an MHC-positiven Zellkernen bei den RD/18-Zellen im Vergleich zu den C2C12-Zellen, und außerdem in den beiden untersuchten Zelllinien den jeweils höheren Anteil an Zellkernen in MHC-positiven Zellen bei denjenigen Muskelzellen welche mit siRNA transfiziert worden waren.

Wie Abbildung 33 zeigt, war der Anteil an Zellkernen in MHC-positiven Zellen bei beiden Zelllinien höher, wenn sie vorher mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelt worden waren. Die Ergebnisse zeigen einen klaren Trend, sind jedoch statistisch noch nicht signifikant und müssen durch das Auszählen weiterer Präparate verifiziert werden.

## ERGEBNISSE

Da auch die Fusion zu mehrkernigen Myotuben ein Kriterium für den Grad der myogenen Differenzierung ist, wurde außerdem auch ausgezählt, wieviele Zellkerne jeweils in mehrkernigen Zellen lokalisiert waren.



**Abb. 34: Anteil der Zellkerne in mehrkernigen Zellen im Vergleich zwischen unbehandelten und mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten RD/18- und C2C12-Zellen**

Bei mit *rip2*-siRNA transfizierten und unbehandelten RD/18- und C2C12-Zellen, welche für 48 Stunden in Differenzierungsmedium kultiviert worden waren, wurde die Anzahl der Zellkerne in mehrkernigen Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl der Zellkerne im gleichen Gesichtsfeld ausgezählt. Man beachte den insgesamt geringeren Anteil an Zellkernen in mehrkernigen Myotuben bei den RD/18-Zellen im Vergleich zu den C2C12-Zellen und zusätzlich bei beiden untersuchten Zelllinien den jeweils höheren Anteil an Zellkernen in mehrkernigen Zellen, wenn die Zellen vorher mit *rip2*-spezifischer siRNA transfiziert worden waren.

Wie in Abbildung 34 gezeigt, war auch der Anteil der Zellkerne in mehrkernigen Zellen bei beiden Zelllinien größer, wenn diese vor Induktion der Differenzierung mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelt wurden.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass eine Behandlung mit *rip2*-spezifischer siRNA die myogene Differenzierung von RD/18-Rhabdomyosarkomzellen fördert. Dieses könnte interessante therapeutische Optionen eröffnen.

## 4 DISKUSSION

In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Repression der *rip2*-Genexpression eine wichtige Voraussetzung für die Initiation der myogenen Differenzierung (Munz *et al.* 2002) darstellt: Durch die Überexpression des *rip2*-Gens in C2C12-Myoblasten konnte die Differenzierung in diesen Zellen inhibiert werden (Munz *et al.* 2002). Aufbauend auf diese Daten wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit zunächst die Expressionsmuster der anderen *rip*-Gene bei der myogenen Differenzierung analysiert. Weiterhin erfolgte ein Vergleich von den Expressionsmustern der *rip*-Gene in Myoblasten mit unterschiedlichem Differenzierungspotential, insbesondere in Rhabdomyosarkomzellen. Im Anschluss daran wurde analysiert, ob über eine Hemmung der *rip2*-Genexpression das Differenzierungspotential dieser Zellen gesteigert und ihre Proliferationsrate reduziert werden kann.

### 4.1 Die Expression von *rip1-4* in Myoblastenzelllinien mit unterschiedlichem Differenzierungspotential unterscheidet sich

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Expressionsmuster der einzelnen *rip*-Gene in C2F3- und C2C12-Myoblasten miteinander verglichen. Beide Zelllinien entstammen dem gleichen klonalen Ursprung, zeigen jedoch ein unterschiedliches Differenzierungspotential: C2F3-Zellen differenzieren langsamer und weniger komplett als C2C12-Zellen.

Es zeigte sich, dass die Genexpression von *rip1* nach Induktion der Differenzierung bei beiden Zelllinien sehr leicht herunterreguliert wurde, wobei bei den C2F3-Zellen nur eine sehr schwache Repression zu verzeichnen war.

Wie nach Munz *et al.* (2002) zu erwarten war, wurde die Expression von *rip2* in C2C12-Myoblasten nach Induktion der Differenzierung sehr stark reprimiert. Ganz anders hingegen verhielten sich die weniger differenzierungskompetenten C2F3-Zellen, die erstaunlicherweise im Verlauf der Differenzierung eine gleichbleibende *rip2*-Genexpression zeigten, die dem Niveau zum Zeitpunkt null Tage (proliferierende Zellen) entsprach. Dieses lässt die Vermutung zu, dass eine permanent hohe *rip2*-Genexpression in dieser Myoblastenzelllinie mit ihrem vergleichsweise geringen Differenzierungspotential assoziiert sein könnte.

Hier fand sich also ein erster Hinweis darauf, dass Muskelzelllinien mit unterschiedlichem Differenzierungspotential sich auch in ihrem *rip*-Genexpressionsmuster – speziell bezüglich des *rip2*-Gens - unterscheiden.

Eine Erklärung für den Wirkungsmechanismus von RIP2 als Inhibitor der Myogenese ergibt sich dabei möglicherweise aus den Untersuchungen von McCarthy *et al.* (1998), die nachweisen konnten, dass RIP2 ein wichtiger Aktivator des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B ist. Für die Initiation der myogenen Differenzierung ist es jedoch von sehr großer Bedeutung, dass die NF- $\kappa$ B-Aktivität herunterreguliert wird (Guttridge *et al.* 1999), da der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ein Stimulator der Zellproliferation ist, Differenzierungsprozesse jedoch inhibiert.

C2F3-Zellen zeigen also möglicherweise aufgrund der permanent hohen *rip2*-Expression eine geringere Tendenz zu differenzieren als C2C12-Myoblasten, weil das hohe Aktivierungsniveau von NF- $\kappa$ B die myogene Differenzierung blockiert.

Interessanterweise war das Gen, welches für *rip3* codiert, nur in C2C12- und nicht in C2F3-Myoblasten exprimiert. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass RIP3 mit RIP1 interagiert und so möglicherweise auch dessen Aktivität reguliert (Sun *et al.* 1999, Yu *et al.* 1999). Es besteht daher also die Möglichkeit, dass in C2F3-Zellen aufgrund des Fehlens von RIP3 die Aktivität von RIP1 fehlreguliert sein könnte und auf diesem Wege die Myogenese beeinflusst wird. Bisher liegen jedoch weder zur Rolle von RIP1 noch zu der von RIP3 bei der Myogenese Daten vor.

Weiterhin ist RIP3 selbst ein Regulator der NF- $\kappa$ B-Aktivität, da NF- $\kappa$ B normalerweise durch RIP3 inhibiert wird (Sun *et al.* 1999). Hieraus ergibt sich möglicherweise eine weitere Erklärung für die geringe Differenzierungsfähigkeit der C2F3-Myoblasten: Aufgrund des Fehlens von RIP3 könnte die NF- $\kappa$ B-Aktivität in diesen Zellen übermäßig erhöht sein, wodurch die Myogenese inhibiert würde.

Im Unterschied dazu wurden bezüglich der *rip4*-Genexpression keine Unterschiede zwischen C2C12- und C2F3-Myoblasten beobachtet, was darauf hindeutet, dass jedes einzelne RIP-Protein eine sehr spezifische Rolle bei der Regulation der myogenen Differenzierung haben könnte.

Zusammenfassend lässt sich also nach Analyse der Expressionsmuster der einzelnen *rip*-Gene in den beiden Mäusemyoblastenzelllinien sagen, dass insbesondere das *rip2*-Gen im Zusammenhang mit dem Differenzierungsverhalten von Skelettmuskelzellen stehen könnte.

Hieraus ergab sich die Hypothese, dass möglicherweise auch in Rhabdomyosarkomzellen – Tumorzellen mit Skelettmuskel-Hintergrund – eine aberrante Expression der *rip*-Gene vorliegen könnte, was mit dem geringen Differenzierungspotential dieser Zellen in Zusammenhang stehen könnte. In einem nächsten Schritt wurden daher Rhabdomyosarkomzellen hinsichtlich ihrer *rip*-Genexpression nach Induktion der Differenzierung näher betrachtet.

## **4.2 Die *rip*-Genexpression in Rhabdomyosarkomzelllinien weicht stark von der normaler Myoblastenzelllinien ab**

### **4.2.1 Rhabdomyosarkomzellen zeigen lichtmikroskopisch und auf RNA- bzw. Proteinebene Anfänge myogener Differenzierung**

Um eine mögliche Korrelation zwischen dem geringeren Differenzierungspotential von Rhabdomyosarkomzellen im Vergleich zu normalen Muskelzellen und deren *rip*-Genexpressionsmuster aufzuzeigen, musste zunächst untersucht werden, ob sich – wie in der Literatur (Astolfi *et al.* 2001) beschrieben – eine partielle Differenzierung der in dieser Arbeit verwendeten Linien RD/12 und RD/18 durch deren Kultivierung in serumarmem Differenzierungsmedium erzielen lässt.

Bei den beiden verwendeten Rhabdomyosarkomzelllinien RD/12 und RD/18 handelt es sich – wie bei den C2F3- und C2C12-Myoblasten - um Zelllinien, die von demselben Klon abstammen. RD/12-Zellen besitzen nur noch ein sehr geringes Differenzierungspotential, wohingegen RD/18-Zellen noch in der Lage sind, frühe Differenzierungsschritte zu durchlaufen und sogar frühe myogene Differenzierungsmarker zu exprimieren (Astolfi *et al.* 2001).

Sowohl lichtmikroskopisch als auch auf RNA- bzw. Proteinebene konnte dabei in dieser Arbeit gezeigt werden, dass insbesondere RD/18-Zellen in der Lage sind, die myogene Differenzierung zu initiieren. Sie zeigten nach 72 Stunden Kultivierung in Medium mit einem geringen Serumanteil die Ausbildung von Myozyten sowie auch einiger Myotuben. RD/12-Zellen hingegen zeichneten sich schon lichtmikroskopisch durch eine sehr geringe Anzahl von ausgebildeten Myozyten aus.

Das unterschiedliche Differenzierungsverhalten der beiden Rhabdomyosarkomzelllinien ließ sich auch mit Hilfe einer Expressionsanalyse des CDK-Inhibitors *p21* auf Proteinebene zeigen: Bei RD/18-Zellen war eine Expression dieses Markers sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nachweisbar. Im Gegensatz zu normalen Myoblasten nahm bei diesen die *p21* Expression nach Induktion der Differenzierung nur noch geringfügig zu. RD/12-Zellen zeigten eine insgesamt deutlich schwächere Expression von *p21* als die RD/18-Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die beiden Rhabdomyosarkomzelllinien - wie in der Literatur beschrieben - in unseren Händen eine unterschiedliche Differenzierungskompetenz aufwiesen, so dass sie ein geeignetes Modellsystem für die geplanten weiterführenden Experimente zur Expression der *rip*-Gene in Rhabdomyosarkomzellen darstellten.

#### 4.2.2 Das *rip1*-Genexpressionsmuster in Rhabdomyosarkomzellen weicht nicht von dem normaler Myoblasten ab

Auf mRNA-Ebene konnte gezeigt werden, dass sich der Verlauf der *rip1*-Genexpression in den beiden Tumorzelllinien nach Induktion der Differenzierung wie bei den normalen Myoblasten verhielt: Es war keine Regulation der Genexpression zu verzeichnen. Im Vergleich zu den RD/18-Zellen zeigten die RD/12-Zellen allerdings insgesamt eine etwas höhere *rip1*-Basalexpression.

Beim Nachweis von RIP1 auf Proteinebene war nach Induktion der Differenzierung ebenfalls keine Regulation der Genexpression sowie kein Unterschied zwischen den beiden Rhabdomyosarkomzelllinien aufzuzeigen.

Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass eine differentielle Expression des *rip1*-Gens wahrscheinlich keine Rolle bei der Regulation der Myoblastendifferenzierung spielt.

#### 4.2.3 Die *rip2*-Genexpression in Rhabdomyosarkomzellen weicht stark von der normaler Myoblasten ab

Im Gegensatz zu normalen Myoblasten konnte auf mRNA-Ebene gezeigt werden, dass *rip2* in beiden Rhabdomyosarkomzelllinien nach der Induktion der Differenzierung nicht reprimiert

wird. Die basale Expression dieses Gens blieb in beiden Tumorzelllinien auch nach 72 Stunden in Differenzierungsmedium konstant.

Wie schon für das *rip1*-Gen beobachtet, zeigten RD/12-Zellen auf mRNA-Ebene auch in Bezug auf *rip2* eine etwas stärkere Expression als RD/18-Zellen.

Möglicherweise kann die unterschiedliche Höhe der *rip2*-Basalexpression bei den beiden Rhabdomyosarkomzelllinien mit dem von Astolfi *et al.* (2001) beschriebenen voneinander abweichenden Differenzierungspotential in Einklang gebracht werden: RD/12-Zellen weisen ein viel geringeres Differenzierungspotential als RD/18-Zellen auf.

Hier kann eine deutliche Parallele zu den Ergebnissen von Munz *et al.* (2002) gezogen werden: Es konnte gezeigt werden, dass *rip2*-überexprimierende Myoblasten nicht in der Lage sind, in Medium mit einem geringen Serumanteil myogene Differenzierungsschritte auszuführen. Übertragen auf die Rhabdomyosarkomzellen lässt sich hieraus möglicherweise folgern, dass diese potentiellen Tumorzellen vom Skelettmuskeltyp eben aufgrund ihrer „natürlichen“ Überexpression von *rip2* keine bzw. nur eine sehr geringe Differenzierungsfähigkeit besitzen.

Wie sich im Zusammenhang mit den Analysen zur *rip2*-Genexpression bei C2C12- und den weniger differenzierungskompetenten C2F3-Zellen schon andeutete, konnte folglich mit Hilfe der Rhabdomyosarkomzelllinien gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen der *rip2*-Expression von Myoblasten und deren Differenzierungspotential besteht.

Eine Bestätigung dieser auf mRNA-Ebene festgestellten Ergebnisse zeigte sich auch auf Proteinebene: In beiden Rhabdomyosarkomzelllinien konnte ein permanent hohes Niveau von RIP2 nachgewiesen werden, wobei entsprechend den Ergebnissen auf RNA-Ebene die RD/12-Zellen eine etwas höhere Basalexpression als RD/18-Zellen aufwiesen.

Wie schon bei den Ausführungen über den Verlauf der *rip2*-Genexpression bei C2F3- im Vergleich zu C2C12-Myoblasten angedeutet, sind bereits eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen bekannt, die das Differenzierungspotential von Muskelzellen regulieren (Übersicht bei Munz *et al.* 2002).

Im Zusammenhang mit RIP2 ist hierbei insbesondere der NF- $\kappa$ B-Weg interessant, da alle RIP-Proteine Aktivatoren der NF- $\kappa$ B- Aktivität sind (Inohara *et al.* 1998; Thome *et al.* 1998; McCarthy *et al.* 1998). Eine hohe NF- $\kappa$ B-Aktivität inhibiert dabei die myogene Differenzierung und umgekehrt ist eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität erforderlich, um Differenzierungsprozesse zu initiieren (Guttridge *et al.* 1999). NF- $\kappa$ B fungiert dabei in der frühen Phase des Zellzyklus als Modulator der Zellproliferation und inhibiert in proliferierenden Myoblasten die Differenzierung (Guttridge *et al.* 1999).

Interessanterweise ist eines der Zielgene von NF- $\kappa$ B das Zellzyklusregulatorprotein CyclinD1, welches direkt die Zellproliferation stimuliert. Die Initiation der Muskelzelldifferenzierung kann erst nach dem Ausscheiden der jeweiligen Zelle aus dem Zellzyklus beginnen, was zuvor die Herunterregulation von CyclinD1 erfordert. Dieses bedeutet zum einen also, dass die - durch das hohe *rip2*-Expressionsniveau hervorgerufene - NF- $\kappa$ B-Aktivierung ein hohes Level an CyclinD1 zu Folge hat, was den Einstieg in die Myogenese stark inhibiert (Guttridge *et al.* 1999). Zum anderen wird durch eine hohe NF- $\kappa$ B-

Aktivität auch die Transkription von MyoD, welches bei Muskeldifferenzierungs- und – regenerationsprozessen von Bedeutung ist (Guttridge *et al.* 2000) gehemmt.

Insbesondere für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B konnte gezeigt werden, dass er bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen von Bedeutung ist, da er einen wichtigen Modulator von Zellproliferationsprozessen darstellt. NF- $\kappa$ B ist in der Lage, neben der Transkription vieler antiapoptotischer Zielgene (Sun und Xiao 2003, Greten und Karin 2004) auch die Transkription von Protoonkogenen zu stimulieren. Des Weiteren wird durch ein hohes Aktivierungsniveau von NF- $\kappa$ B auch die Expression vieler Gene, die für Zelladhäsionsmoleküle kodieren, reguliert, was auch zu Tumorwachstum und Metastasierung beitragen kann (Sun und Xiao 2003, Greten und Karin 2004).

Diese Daten sprechen dafür, dass ein Zusammenhang zwischen der möglicherweise durch die hohe *rip2*-Expression in Rhabdomyosarkomzellen ausgelösten hohen NF- $\kappa$ B-Aktivität in Differenzierungsmedium und der mangelnden Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen bestehen könnte.

Weiterhin ist im Zusammenhang mit RIP2 auch der MAPK-Signalweg interessant, der ebenfalls von RIP2 aktiviert wird und dem eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proliferations- und Differenzierungsprozessen zugeordnet wird (Übersicht bei Thome *et al.* 1998; Navas *et al.* 1999).

Zu der Familie der MAPKs zählen JNK (*c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal activated kinase*), p38 und ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*). Sie sind in der Lage, myogene Differenzierungsprozesse sowohl zu induzieren, als auch zu inhibieren (Coolican *et al.* 1997; Milasinic *et al.* 1996; Weyman und Wolfman 1998). Olwin *et al.* (2002) konnten nachweisen, dass eine Hemmung der MAPK p38 die Expression von Genen, die mit der myogenen Differenzierung assoziiert sind, sowie auch die Fusion von Myoblasten verhindert.

Thome *et al.* (1998) konnten zeigen, dass eine Überexpression von RIP2 die Aktivierung von JNK induziert und folglich auch die Aktivität der JNK-Zielproteine, insbesondere der Transkriptionsfaktoren c-Jun und Aktivatorprotein 1 (AP-1), stimuliert. AP-1 wird eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Zellproliferation und –differenzierung zugeordnet (Übersicht bei Baud und Karin 2001).

Bezogen auf die gleichbleibend hohe *rip2*-Expression in Rhabdomyosarkomzellen auch nach Induktion der Differenzierung liegt daher in den jeweiligen Zellen wahrscheinlich auch eine permanent hohe Aktivität von AP-1 vor, wodurch möglicherweise die Induktion myogener Differenzierungsprozesse erschwert wird.

Ein weiterer RIP2-stimulierter Signalweg, der möglicherweise die Differenzierungsfähigkeit von Rhabdomyosarkomzellen beeinflusst, könnte der ERK (*extracellular signal regulated kinase*)-Weg sein: RIP2 ist selbst eine Raf-1-aktivierte MAPKK, welche letztendlich den ERK-Weg aktiviert (Navas *et al.* 1999). ERK reguliert in der frühen Phase seiner Aktivierung in Myoblasten zunächst die Zellproliferation und später die Zelldifferenzierung (Übersicht bei Lechner *et al.* 1996). Insbesondere konnte nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von ERK6 in C2C12-Mäusemyoblasten die Differenzierungsfähigkeit deutlich verbessert.



Diese im ersten Augenblick widersprüchlich erscheinenden Aufgaben von ERK können durch eine differentielle Regulation der Transkription spezifischer Gene erklärt werden: Im Verlauf der Muskelentwicklung wird zunächst durch die Stimulation des Transkriptionsfaktors AP-1 die Induktion von CyclinD1 vermittelt, welches das Zellwachstum fördert. Zum Ende der Zellproliferationsphase muss die *CyclinD1*-Expression herunterreguliert werden, um im Anschluss daran den Zellzyklusinhibitor *p21* und den myogenen Transkriptionsfaktor Myo D zur Initiation der Differenzierung zu aktivieren.

Es ist daher möglich, dass es in den Rhabdomyosarkomzellen zu einer Fehlregulation der durch die RIP2-Kinase-Aktivität über ERK ausgelösten CyclinD1-Transkription kommt, da es aufgrund der Überexpression von *rip2* in den Zellen wahrscheinlich nach der Wachstumsphase nicht – wie im Normalfall – zu einer Repression von CyclinD1 kommen kann. Als Folge daraus können möglicherweise zum einen die Zellen den Zellzyklus nicht verlassen und zum anderen werden potentielle Gene der Muskelzellendifferenzierung gar nicht erst transkribiert.

Es besteht daher also die Möglichkeit, dass die permanent hohe Expression von *rip2* in Rhabdomyosarkomzellen auch in Differenzierungsmedium zu einer permanenten Aktivierung von NF- $\kappa$ B oder anderen Signaltransduktionswegen wie dem MAPKs-Weg führt, was eine Blockade ihres myogenen Differenzierungsprogrammes auslösen könnte.

#### 4.2.4 *rip3* wird in Rhabdomyosarkomzellen nicht exprimiert

Im Gegensatz zu C2C12-Zellen exprimierten die beiden Rhabdomyosarkomzelllinien wie auch C2F3-Zellen das *rip3*-Gen nicht. Dieses konnte zum einen auf mRNA-Ebene und zum anderen auch auf Proteinebene gezeigt und durch geeignete Positivkontrollen bestätigt werden.

Wie oben schon erwähnt, weisen sowohl C2F3- als auch die beiden RD-Zelllinien ein vergleichsweise niedriges Differenzierungspotential auf. Es ist daher möglich, dass eine fehlende Expression von *rip3* möglicherweise mit einem geringen Differenzierungspotential von Skelettmuskelzellen assoziiert ist.

Es ist bekannt, dass RIP3 mit RIP1 interagiert und somit möglicherweise die RIP1-Aktivität reguliert. RIP1 ist dabei ein NF- $\kappa$ B-Aktivator, während RIP3 die NF- $\kappa$ B-Aktivierung inhibiert (Sun *et al.* 1999). Möglicherweise führt also die Abwesenheit von RIP3 in den Rhabdomyosarkomzellen zu einer Stimulation der RIP1- und damit der NF- $\kappa$ B-Aktivität, was die myogene Differenzierung negativ beeinflussen könnte.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich die Expressionskinetiken der *rip*-, *rip2*- und *rip3*-Gene interessanterweise nach Induktion der Differenzierung bei den beiden Rhabdomyosarkomzelllinien und den ebenfalls wenig differenzierungskompetenten C2F3-Zellen annähernd gleich verhielten. Die differenzierungskompetentere C2C12-Muskelzelllinie sowie primäre Mäusemyoblasten (Munz *et al.* 2002) zeigen hingegen ein stark hiervon abweichendes Genexpressionsmuster.

Um jedoch insbesondere in diesem Zusammenhang auch spezie-spezifische Unterschiede zwischen Maus und Mensch ausschließen zu können, müssten noch weitere Zelllinien analysiert werden.

### 4.2.5 *rip4* wird in Rhabdomyosarkomzellen nicht exprimiert

Im Gegensatz zu C2C12- und C2F3-Zellen war das *rip4*-Gen in keiner der beiden Rhabdomyosarkomzelllinien exprimiert. Es ist jedoch nach dem heutigen Stand der Wissenschaft sehr schwierig, eine Verbindung zwischen der *rip4*-Expression und dem Differenzierungspotential von Rhabdomyosarkomzellen zu ziehen, da bisher noch nichts über die Funktion von *rip4* bei der Muskelzelldifferenzierung bekannt ist. Es wäre sicherlich sehr interessant, experimentell zu überprüfen, ob eine permanente Überexpression von *rip4* in den Rhabdomyosarkomzellen einen Einfluss auf deren Wachstums- und Differenzierungspotential hat.

### 4.2.6 *rip5* wird in normalen Myoblasten und in Rhabdomyosarkomzellen exprimiert

Es konnte festgestellt werden, dass *rip5* sowohl von RD/18- als auch von C2C12-Zellen exprimiert wird. Da bislang jedoch noch nicht viel über RIP5 bekannt ist, ist es zum jetzigen Zeitpunkt schwierig, über eine mögliche Funktion dieses Faktors bei der Myogenese zu spekulieren. Zha *et al.* (2004) konnten jedoch in *in vitro*-Studien zeigen, dass *rip5* eine Rolle bei der Regulation apoptotischer Prozesse spielt. Aufgrund der engen Verknüpfung von Apoptose und Differenzierung (Übersicht bei Adams *et al.* 2001) ist somit auch eine Funktion als Regulator von Differenzierungsprozessen denkbar.

Aufgrund der Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Munz *et al.* 2002) und insbesondere anhand der oben diskutierten Experimente, ist zu vermuten, dass in erster Linie RIP2 eine sehr entscheidende Rolle bei der Regulation der Muskelzelldifferenzierung spielen könnte. Daher wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Expression des entsprechenden Gens sowie die Funktion von RIP2 bei der myogenen Differenzierung *in vivo* und *in vitro* genauer analysiert.

### 4.2.7 *rip2* wird auch *in vivo* exprimiert

Um das *rip2*-Genexpressionsmuster bei Skelettmuskelproliferations- und -differenzierungsprozessen zu untersuchen, wurde das *mdx*-Mausmodell ausgewählt. Im Skelettmuskelgewebe dieser Tiere kommt es aufgrund einer Mutation des *dystrophin*-Gens altersabhängig kontinuierlich zu Zyklen von Muskeldegeneration und -regeneration (Übersicht bei Lagrota-Candido *et al.* 2002): Den höchsten Grad der Muskelnekrose zeigen die Mäuse im Alter von etwa vier Wochen, mit einem Alter von etwa zwölf Wochen erscheint die Nekrose neben hypertrophen Muskelfasern durch Regeneration verbessert und mit 24 Wochen herrschen neben Muskelhypertrophie Fibrosen vor, wobei die einzelnen Muskelpartien unterschiedlich betroffen sein können.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass es zwischen den einzelnen Altersstufen sowie zwischen den verschiedenen Geweben Unterschiede bezüglich der *rip2*-Genexpression gibt. So konnte bei der *Northern Blot*-Analyse der aus dem *Musculus quadriceps* extrahierten RNA im Vergleich zu den anderen Altersstufen und den Wildtypmäusen sowohl bei den acht Wochen alten männlichen als auch bei den weiblichen *mdx*-Mäusen eine leicht höhere *rip2*-Genexpression festgestellt werden. Ähnlich verhielt sich auch die Expression von *rip2* im *Musculus gastrocnemius*, die sich bei den acht und zwölf Wochen alten *mdx*-Mäusen auch etwas höher als bei den Wildtypmäusen darstellte (Vergleiche Abschnitt 3.2.3). Keinerlei Unterschiede ergaben sich dagegen bei den untersuchten Proben aus Zwerchfell und Herz.

Aufgrund der hier zu beobachtenden differentiellen Expression von *rip2* liegt es sehr nahe, dass RIP2 eine Rolle bei den hier stattfindenden Proliferations- und Differenzierungsprozessen im Rahmen der Muskelfaserregeneration spielt. Hingegen haben die geringen Unterschiede der *rip2*-Expression zwischen allen vier untersuchten Muskelgeweben – insbesondere zwischen Herz und Zwerchfell – vermutlich ihre Ursache in der natürlichen Variation der Genexpressionsmuster in den einzelnen Körpergeweben (McCarthy *et al.* 1998).

Eine zusätzliche vergleichende Untersuchung von Muskelgewebeproben aus zum einen höchstens vier Wochen alten und zum anderen mindestens 24 Wochen alten *mdx*- und Wildtyp-Mäusen könnte möglicherweise weiteren Aufschluss darüber geben, ob *rip2* tatsächlich in die Regulation von Muskeldegenerations- und -regenerationsprozessen involviert ist und sich die festgestellten Unterschiede auch hier weiter fortsetzen.

Aufgrund der relativ geringen Anzahl von Zeitwerten und Proben müssen diese Ergebnisse jedoch noch als vorläufig betrachtet werden.

### **4.3 Eine Hemmung der *rip2*-Genexpression hemmt die Proliferation und verbessert die Differenzierungsfähigkeit von Myoblasten**

Durch den Einsatz von spezifischen siRNAs ist es möglich, speziell ein Gen in kultivierten Zellen zu hemmen und so dessen Funktion zu analysieren. Aufgrund der zuvor beschriebenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und anderer Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe erschien es daher sinnvoll, das Gen, welches für *rip2* codiert, zu hemmen und dann das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Skelettmuskelzellen zu überprüfen.

Die spezifische Hemmung von *rip2* in Mäusemyoblasten und auch Rhabdomyosarkomzellen erschien dabei interessanter als beispielsweise eine Hemmung des *rip*-Gens zu sein, da zum einen bekannt ist, dass RIP2 eine wichtige Funktion bei der myogenen Differenzierung erfüllt (Munz *et al.* 2002) und sich zum anderen im Rahmen dieser Arbeit ein von dem normaler Muskelzellen abweichendes *rip2*-Genexpressionsmuster in den klinisch interessanten Rhabdomyosarkomzellen zeigte.

Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Daten bestand die Möglichkeit, dass durch eine Inhibition der *rip2*-Genexpression in C2C12-Zellen und insbesondere in Rhabdomyosarkomzellen das Differenzierungspotential der Zellen gesteigert werden kann. Da das Differenzierungspotential der Rhabdomyosarkomzellen eng mit deren metastatischen Eigenschaften verbunden ist (Lollini *et al.* 1991) wäre hierdrin auch ein sehr interessanter therapeutischer Ansatzpunkt in der Tumorthherapie von Rhabdomyosarkomen zu sehen.

### 4.3.1 Die spezifische Hemmung des *rip2*-Gens in C2C12-Myoblasten hemmt die Proliferationsrate dieser Zellen

Zunächst wurde die *rip2*-Genexpression spezifisch in C2C12-Zellen gehemmt, um später einen Vergleich zu den durchgeführten siRNA-Versuchen bei Rhabdomyosarkomzellen zu haben. Auf mRNA-Ebene konnte deutlich gezeigt werden, dass diejenigen Zellen, bei denen *rip2* spezifisch gehemmt wurde, auch wie erwartet eine geringere *rip2*-Genexpression aufwiesen. Im Folgenden musste überprüft werden, ob die mit siRNA behandelten Zellen auch tatsächlich ein höheres Differenzierungspotential als unbehandelte Zellen aufwiesen.

Da bei Myoblasten Zellteilungsaktivität und Differenzierungsverhalten eng miteinander verknüpft sind – ein Ausscheiden der Zellen aus dem Zellzyklus ist für die Initiation der Differenzierung kritisch (Übersicht bei Tajbakhsh und Buckingham 2000) - wurde die Proliferationsrate von unbehandelten und mit siRNA behandelten C2C12-Zellen mittels BrdU-Markierung bestimmt. Schon ohne Auszählung der Zellen auf den fluoreszenzmikroskopischen Bildern zeigte sich, dass jeweils die mit siRNA behandelten Zellen eine deutlich geringere Proliferationsrate aufwiesen als diejenigen Mäusemyoblasten, die nicht behandelt wurden. In der statistischen Analyse und grafischen Auswertung mittels Balkendiagramm zeigte sich dann eindeutig, dass die mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten Zellen sowohl in Proliferationsmedium als auch nach 48 Stunden Kultivierung im Differenzierungsmedium eine wesentlich niedrigere Proliferationsrate aufwiesen als unbehandelte Mäusemyoblasten. In Zusammenhang mit den von Munz *et al.* (2002) beschriebenen Untersuchungen an *rip2*-überexprimierenden Myoblasten, welche auch in Medium mit geringem Serumanteil nicht differenzierten, unterstreichen diese Ergebnisse weiter, dass die Proliferationsrate von Myoblasten sehr eng mit dem Expressionsniveau des *rip2*-Gens verknüpft ist.

Interessanterweise zeigen die siRNA-behandelten Mäusemyoblasten, welche 48 Stunden in Proliferationsmedium kultiviert worden waren, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen eine höhere Proliferationsrate. Dieses Ergebnis hat sehr wahrscheinlich seine Ursache darin, dass die behandelten C2C12-Zellen zuvor jeweils sehr niedrige Proliferationsraten und somit auch eine wesentlich geringere Zelldichte zeigten. Da die Proliferationsrate von Zellen auch eng mit der Zelldichte verknüpft ist – Kontaktinhibition - (Übersicht bei Sabourin und Rudnicki 2000; Otten *et al.* 1997), konnten die behandelten Myoblasten wahrscheinlich aufgrund einer geringeren Zelldichte auch zu späteren Zeitpunkten noch proliferieren.

Für C2C12-Mäusemyoblasten konnte hier also gezeigt werden, dass ihre Proliferationsrate durch die Hemmung der *rip2*-Genexpression mittels spezifischer siRNAs stark beeinflusst werden kann.

### 4.3.2 Die spezifische Hemmung des *rip2*-Gens in C2C12-Myoblasten fördert die Differenzierung dieser Zellen

Bei dem zunächst lichtmikroskopisch durchgeführten Vergleich zwischen C2C12-Mäusemyoblasten, bei denen die *rip2*-Genexpression mittels siRNA spezifisch gehemmt worden war, und unbehandelten Zellen, zeigte sich schon bei der subjektiven Betrachtung, dass sich in den Zellkulturschalen mit den behandelten C2C12-Zellen viel mehr Myozyten und Myotuben darstellten als in den Zellkulturschalen mit den unbehandelten Kontrollzellen.

Im Folgenden stellte sich daher die Frage, ob auch quantitativ auf der Basis der Analyse myogener Differenzierungsmarker in den mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten Mäusemyoblasten gezeigt werden kann, dass neben der Proliferationsrate zusätzlich auch das Differenzierungsverhalten durch eine Hemmung der *rip2*-Genexpression in diesen Zellen beeinflusst wird.

Wiederum wurde daher bei unbehandelten und bei mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten C2C12-Myoblasten durch Kultivierung in Medium mit einem geringen Serumanteil die Differenzierung induziert. Zum Nachweis der Muskelzelldifferenzierung wurden die Zellen immunzytochemisch mit Hilfe von MHC-Antikörpern analysiert. Bei MHC handelt es sich um einen Marker der myogenen Differenzierung (siehe Abschnitt 3.5), welcher sowohl von C2C12-Zellen (Langley *et al.* 2002) als auch von RD/18-Zellen (Astolfi *et al.* 2001) im Verlauf der Differenzierung exprimiert wird.

Es zeigte sich dabei zunächst sehr deutlich, dass bei denjenigen C2C12-Mäusemyoblasten, die mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelt worden waren, im Immunfluoreszenzmikroskop qualitativ vermehrt mit MHC angefärbte Myozyten und Myotuben nachweisbar waren. Hier deutete sich also bereits an, dass RIP2 bei der Differenzierung von Muskelzellen eine Rolle spielen könnte.

Eine Bestätigung dieser Vermutungen fand sich in der statistisch-grafischen Auswertung der Anzahl der Zellkerne in MHC-positiven behandelten und unbehandelten Zellen. Hierbei zeigten die Mäusemyoblasten, die mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelt worden waren, jeweils einen höheren Zellkernanteil in MHC-positiven Zellen im Vergleich zu den Zellen, die unbehandelt kultiviert worden waren. Zusätzlich erfolgte auch noch eine Auszählung des Zellkernanteils in mehrkernigen Zellen, also denjenigen Zellen, welche bereits mit Nachbarzellen fusioniert waren. Auch hier konnte bestätigt werden, dass die mit siRNA-behandelten C2C12-Zellen einen höheren Anteil von Zellkernen in mehrkernigen – also differenzierten – Zellen aufwiesen. Dieses bedeutet, dass sie im Vergleich zu unbehandelten Zellen vermehrt Myotuben ausgebildet hatten.

Dieses steht in einem engen Zusammenhang mit den von Munz *et al.* (2002), beschriebenen Ergebnissen, welche mit Hilfe *rip2*-überexprimierender Myoblasten zeigen konnten, dass eine hohe RIP2-Konzentration die Differenzierung von Muskelzellen verhindert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde also gewissermaßen im Umkehrschluss gezeigt, dass diejenigen Muskelzellen, bei denen die *rip2*-Expression gehemmt worden war, eine stärkere Tendenz zur Differenzierung zeigten als unbehandelte Zellen.

Ein möglicher Mechanismus, durch den RIP2 als Inhibitor der myogenen Differenzierung wirken könnte, könnte in seiner Funktion als Aktivator des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B liegen (McCarthy *et al.* 1998). Um das myogene Differenzierungsprogramm zu starten, ist zwangsweise eine Repression der NF- $\kappa$ B-Aktivität notwendig (Guttridge *et al.* 1999). Weiterhin besteht auch die Möglichkeit, dass RIP2 über seine Aktivität als MAPK-Regulator (Coolican *et al.* 1997; Milasinic *et al.* 1996; Weyman und Wolfman 1998) die myogene Differenzierung beeinflusst.

### 4.3.3 Die spezifische Hemmung des *rip2*-Gens in RD/18-Zellen hemmt die Zellproliferation

In Bezug auf die C2C12-Mäusemyoblasten konnte somit nachgewiesen werden, dass die Hemmung der *rip2*-Genexpression die Proliferationsrate senken und insbesondere das Differenzierungspotential von Muskelzellen steigern kann.

Es stellte sich also die Frage, ob es auch möglich ist, in den vergleichsweise wenig differenzierungskompetenten Rhabdomyosarkomzellen das Differenzierungsverhalten mit Hilfe *rip2*-spezifischer siRNA zu beeinflussen. Hieraus könnten sich sehr interessante therapeutische Optionen ergeben.

Wie oben beschrieben, konnte zu Beginn dieser Arbeit gezeigt werden, dass die *rip2*-Genexpression bei Rhabdomyosarkomzellen nicht wie bei C2C12-Zellen nach Induktion der Differenzierung stetig herunterreguliert wird, sondern auf einem permanent hohen Level bleibt. Es stellte sich also zunächst die Frage, ob eine *rip2*-spezifische siRNA auch in der Lage ist, ein so hohes *rip2*-Genexpressionslevel zu reprimieren. Da RD/18-Zellen mit einer höheren Proliferationsrate im Vergleich zu RD/12-Zellen in der Zellkultur wachsen (Übersicht bei Croci *et al.* 2004), wurden sie bevorzugt ausgewählt, um die benötigte Probenmenge in einem angebrachten Zeitfenster gewinnen zu können.

Zunächst konnte auf mRNA-Ebene gezeigt werden, dass es tatsächlich möglich ist, auch in Rhabdomyosarkomzellen spezifisch das Gen, welches für *rip2* codiert, zu hemmen. Im Folgenden war es daher interessant zu untersuchen, ob sich auch das Verhalten der siRNA behandelten Zellen bezüglich der Proliferation und insbesondere der Differenzierung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen unterscheidet.

Wie bei den C2C12-Zellen wurden die Zellkerne von behandelten und unbehandelten RD/18-Zellen zunächst mit BrdU und DAPI markiert, dann jeweils im Fluoreszenzmikroskop betrachtet sowie zur grafischen Darstellung ausgezählt. Aufgrund der Ergebnisse von Munz *et al.* 2002 und der Ergebnisse im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit den C2C12-Zellen

ergab sich die Hypothese, dass es möglich ist, auch die Proliferationsrate von Rhabdomyosarkomzellen mit Hilfe von *rip2*-spezifischer siRNA-Behandlung zu beeinflussen.

Schon bei qualitativer Analyse konnte diese Vermutung für RD/18-Zellen untermauert werden: In Proliferationsmedium zeigte sich, dass Rhabdomyosarkomzellen, die nicht mit spezifischer siRNA behandelt worden waren, über einen bestimmten Zeitraum viel mehr sich teilende Zellkerne aufwiesen als diejenigen RD/18-Zellen, die mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelt worden waren. Ebenso verhielt es sich bei der weiteren Kultivierung im Differenzierungsmedium: Auch dort zeigten die mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten Rhabdomyosarkomzellen im Vergleich zu den unbehandelten Tumorzellen nur noch eine sehr geringe Anzahl von sich teilenden Zellkernen. Dieser Eindruck konnte in der statistisch-grafischen Auswertung bestätigt werden:

Es zeigte sich, dass auch in den wenig differenzierungskompetenten Rhabdomyosarkomzellen mit Hilfe von *rip2*-spezifischer siRNA wie in normalen Myoblasten eine Hemmung der Proliferationsrate erreicht werden konnte. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse ergab sich die weitere Hypothese, dass mit Hilfe der *rip2*-spezifischen siRNAs auch die Möglichkeit bestehen könnte, bei den Rhabdomyosarkomzellen eine verbesserte Differenzierungsfähigkeit zu erreichen. Wie bei den C2C12-Myoblasten wurden RD/18-Zellen daher mit Hilfe von MHC-Antikörpern angefärbt, um differenzierte Muskelzellen auch optisch darzustellen. Schon die subjektive lichtmikroskopische vergleichende Betrachtung von differenzierenden RD/18-Zellen, welche zum einen mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelt worden waren, zum anderen unbehandelt belassen worden waren, deutete an, dass die behandelten Zellen offensichtlich viel besser in der Lage waren, erste Stufen der Differenzierung wie die Ausbildung von Myozyten und Myotuben auszuführen. In den betrachteten Bildausschnitten konnten jeweils bei den mit siRNA-behandelten Rhabdomyosarkomzellen eine größere Anzahl von Myotuben dargestellt werden.

Durch Auswertung des Quotienten aus dem Anteil der Zellkerne in MHC-positiven Zellen und der Anzahl der MHC-positiven Zellen insgesamt ließ sich diese Beobachtung auch statistisch-grafisch untermauern: RD/18-Zellen, welche mit siRNA behandelt worden waren, wiesen einen höheren Anteil an Zellkernen in MHC-positiven Zellen auf.

Zusätzlich wurde zur weiteren Charakterisierung -wie oben für normale Myoblasten erläutert- die Anzahl der Zellkerne in mehrkernigen MHC-positiven Zellen grafisch dargestellt. Erwartungsgemäß bildeten mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelte Rhabdomyosarkomzellen im Gegensatz zu unbehandelten RD/18-Zellen vermehrt fusionierte Zellen im Sinne von Myotuben aus.

Dieses korreliert mit den früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe mit C2C12-Zellen: *rip2*-überexprimierende Myoblasten waren – wie die unbehandelten Rhabdomyosarkomzellen - nicht oder kaum in der Lage, in Medium mit einem geringem Serumanteil zu differenzieren (Munz *et al.* 2002). Die mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten RD/18-Zellen verhielten sich dagegen ähnlich wie die normalen Mäusemyoblasten, da sie Myozyten sowie Myotuben ausbilden konnten.

Eine Erklärung ist möglicherweise - ähnlich wie weiter oben für normale Myoblasten beschrieben - die Tatsache, dass aufgrund der niedrigen *rip2*-Genexpression die differenzierungsinhibierende Aktivierung von NF- $\kappa$ B in den Zellen gehemmt ist und daher eine Initiation der myogenen Differenzierung möglich ist. Ausserdem könnte sich die experimentelle Repression von *rip2* auch – wie oben bereits für normale Myoblasten angedeutet - auf den MAPK-Signaltransduktionsweg auswirken.

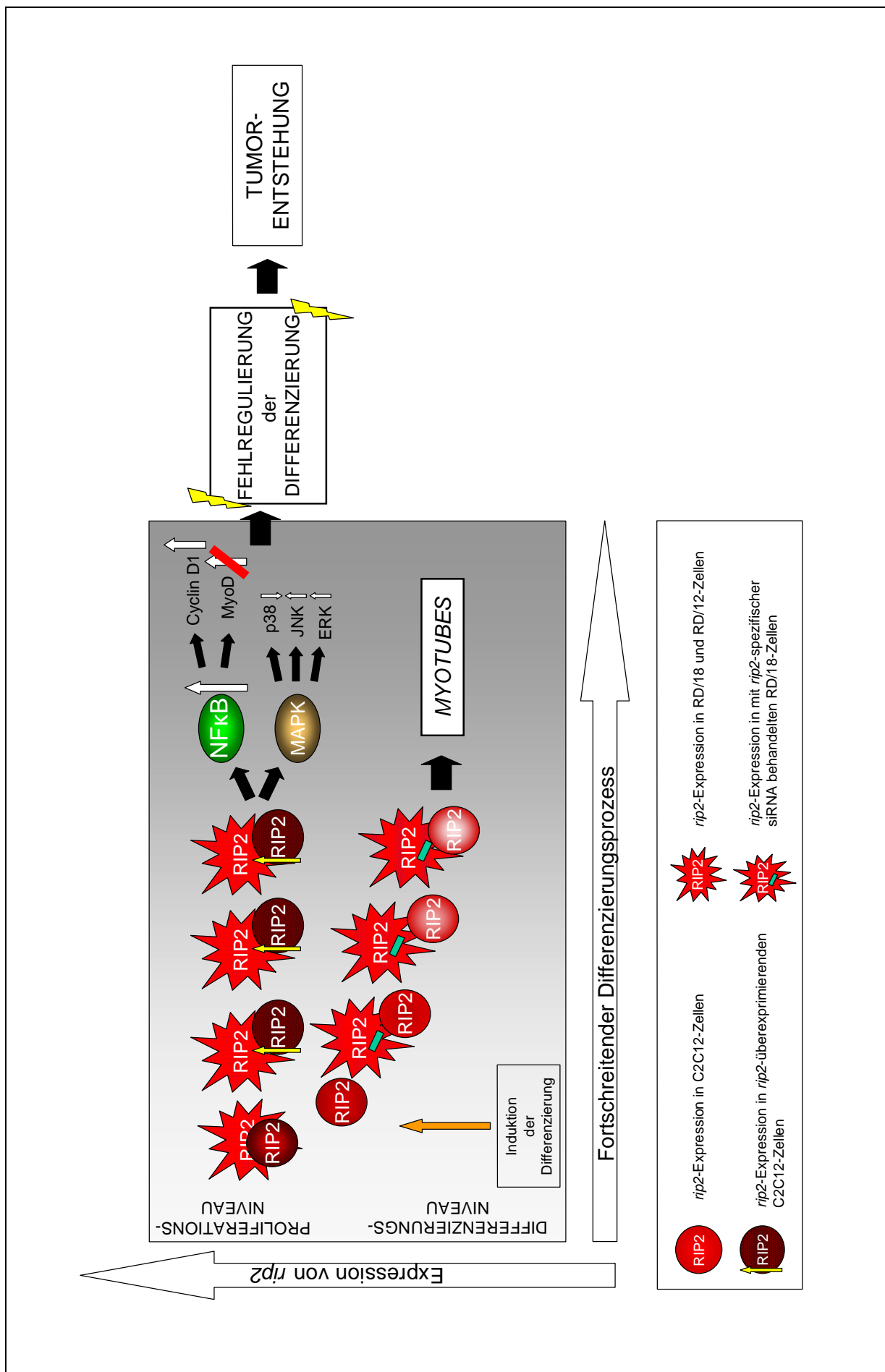
Experimentell war es also möglich, mit Hilfe von *rip2*-spezifischer siRNA in vergleichsweise differenzierungsinkompetenten Rhabdomyosarkomzellen eine verbesserte Differenzierungsfähigkeit zu erreichen. Unklar bleibt momentan jedoch noch der genaue Mechanismus, also in welcher Weise RIP2 das Wachstum und die Differenzierung von Muskelzellen beeinflusst. Hierzu sind in Zukunft noch weiterführende Studien, insbesondere in Bezug auf den TNF- $\alpha$ -NF- $\kappa$ B- und den MAPK-Signalweg, notwendig.

#### **4.4 Zusammenfassende Darstellung der *rip2*-Genregulation in Muskelzellen und die Auswirkungen auf die Myogenese**

Im Gegensatz zu differenzierungskompetenten Myoblasten (Munz *et al.* 2002) wird *rip2* in den Rhabdomyosarkomzellen nach Initiation des Differenzierungsprozesses nicht herunterreguliert. Die *rip2*-Genexpression befindet sich permanent auf dem gleichen Niveau wie in proliferierenden Zellen. Dadurch sind der NF- $\kappa$ B- sowie der MAPK-Signaltransduktionsweg weiterhin aktiv, so dass keine oder nur eine teilweise Differenzierung erfolgen kann: Beispielsweise werden einige Gene, die normalerweise den Ausstieg einer Zelle aus dem Zellzyklus ermöglichen, gar nicht erst transkribiert, während andere Gene, die normalerweise nach Initiation der Differenzierung abgeschaltet werden, z.B. *Cyclin D1*, weiterhin transkribiert. Übereinstimmend hierzu wiesen Munz *et al.* (2002) nach, dass in *rip2*-überexprimierenden C2C12-Zellen keine Muskelzellendifferenzierung erfolgt; diese Zellen sind also direkt mit den Rhabdomyosarkomzellen nicht nur bezüglich der *rip2*-Genexpression vergleichbar. Während jedoch fest steht, dass Rhabdomyosarkomzellen Tumorzellen sind, muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass *rip2*-überexprimierenden Zellen nicht auf ihre Tumorigenität (beispielsweise durch Kultivierung in Softagar oder im Nacktmaussystem) getestet worden sind, zumal auch schon seit geraumer Zeit bekannt ist, dass selbst „normale“ C2C12-Zellen unter bestimmten Bedingungen tumorigen sein können.



DISKUSSION



**Abb. 35: Übersicht über mögliche Auswirkungen einer permanent hohen *rip2*-Genexpression in Rhabdomyosarkomzellen im Vergleich zu normalen Myoblasten**

Schematisiert ist dargestellt, welche Auswirkungen eine permanent hohe *rip2*-Genexpression in Rhabdomyosarkomzellen auf die Myogenese haben könnte. Es werden im Vergleich die *rip2*-Genexpressionsniveaus von RD/18-Zellen, *rip2*-überexprimierenden C2C12-Zellen, mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelten RD/18-Zellen und von normalen C2C12-Zellen dargestellt.

Im unteren Bereich ist die Genexpression normaler C2C12-Myoblasten und mit *rip2*-spezifischer siRNA behandelter RD/18-Zellen dargestellt. Nach Initiation der Differenzierung kommt es zur Repression von *rip2* und myogene Differenzierungsschritte können erfolgen.

Im oberen Bereich ist schematisch angedeutet, dass es bei RD/18-Zellen und *rip2*-überexprimierenden C2C12-Zellen zu einem permanent hohem *rip2*-Level kommt und in dessen Folge die Zellen nicht adäquat in den myogenen Differenzierungsprozess eintreten können. Nach den bisherigen Ergebnissen sind hierfür insbesondere Fehlregulierungen des NF- $\kappa$ B- und des MAPK-Signaltransduktionsweges verantwortlich.

Auf der anderen Seite waren C2C12-Zellen, in denen *rip2* nach Initiation des Differenzierungsvorgangs reprimiert wird, weiterhin durch einen normalen – jedoch beschleunigten - Differenzierungsprozess charakterisiert. Auch bei RD/18-Rhabdomyosarkomzellen, bei denen die *rip2*-Expression durch siRNA-Behandlung gewissermaßen „künstlich“ reprimiert war, wurde im Vergleich zu unbehandelten Rhabdomyosarkomzellen eine deutlich gesteigerte myogene Differenzierung beobachtet (siehe Abbildung 35).

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass es eine wichtige Beziehung zwischen den Genexpressionsmustern der *rip*-Gene und dem Differenzierungspotential von normalen Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen gibt. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass eine Repression des *rip2*-Gens bei normalen Myoblasten und insbesondere bei Rhabdomyosarkomzellen jeweils ein stark gesteigertes Differenzierungspotential zur Folge hat. Im Hinblick auf die Relevanz in der Klinik können diese Ergebnisse einen Weg für wichtige therapeutische Ansatzpunkte von Rhabdomyosarkomen aufzeigen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

### Expression von *receptor interacting protein*-Genen in Rhabdomyosarkomzellen

RIP2 (Receptor Interacting Protein 2) – ein Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Adaptorprotein – spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Myoblasten. Kürzlich konnte sowohl in C2C12-Zellen als auch in primären Mäusemyoblasten gezeigt werden, dass eine Repression der *rip2*-Genexpression eine wichtige Voraussetzung für die Initiation der myogenen Differenzierung darstellt. Zur näheren Untersuchung der Expression der anderen bekannten Mitglieder aus der Familie der *rip*-Gene wurden deren Genexpressionsmuster in zwei Myoblastenzelllinien – C2C12 und C2F3 – nach Induktion der Differenzierung miteinander verglichen. Beide Zelllinien entstammen demselben klonalen Ursprung, weisen jedoch ein unterschiedliches Differenzierungsverhalten auf: Der Differenzierungsprozess von C2F3-Zellen verläuft langsamer und inkompletter als die Differenzierung von C2C12-Zellen.

Bei der Analyse der Expression der einzelnen *rip*-Gene bis zu dem Zeitpunkt vier Tage nach der Induktion der Differenzierung konnte bei den C2F3-Myoblasten für das *rip2*-Gen keine Repression im Verlaufe der Differenzierung beobachtet werden, was möglicherweise mit dem geringen Differenzierungspotential dieser Zellen in Zusammenhang steht. Außerdem war *rip3* zusätzlich im Gegensatz zu den C2C12-Zellen in den C2F3-Myoblasten nicht exprimiert.

Um die Expressionsmuster der *rip*-Gene bei der Myoblastenproliferation und –differenzierung genauer zu charakterisieren, wurde die Expression von *rip1 - 4* in zwei Muskeltumorzelllinien – den Rhabdomyosarkomzelllinien RD/12 und RD/18 - überprüft. Es zeigte sich, dass in beiden Rhabdomyosarkomzelllinien im Vergleich zu den C2C12-Zellen die Expression von *rip2* nach der Induktion der Differenzierung nicht herunterreguliert wird. Im Vergleich zu normalen Myoblasten wurden weder *rip3* noch *rip4* in den Tumorzellen exprimiert.

Aufbauend auf diese Daten wurde die Funktion von RIP2 in Rhabdomyosarkomzellen näher untersucht: Es zeigte sich, dass nach Inhibition der *rip2* Genexpression mittels spezifischer siRNAs sowohl bei den C2C12-Zellen als auch insbesondere bei den Rhabdomyosarkomzellen die Zellproliferation gehemmt und Muskelzelldifferenzierung stark gefördert wurde.

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass eine aberrante Expression der *rip*-Gene – speziell *rip2* - mit abnormem Wachstums- und Differenzierungsverhalten in Skelettmuskelvorläuferzellen einhergehen kann.

Schlüsselwörter: RIP Proteine; Skelettmuskel; Muskeldifferenzierung; Rhabdomyosarkom

## 6        **SUMMERY**

### **Expression of *receptor interacting protein*-genes in rhabdomyosarcoma cells**

RIP2 is an important regulator of myoblast proliferation and differentiation. It had previously been demonstrated that in the myoblast cell line C2C12 and in primary myoblasts, downregulation of *rip2* gene expression is a prerequisite for differentiation. To further study the role of the *rip* gene family in myogenesis, we compared expression patterns of *rip1-4* in two myoblast cell lines – C2C12 and C2F3 – after the induction of differentiation. These two cell lines are derived from the same clonal origin, but differ with respect to their differentiation behaviour: the differentiation process is slower and more incomplete in C2F3 cells.

When analyzing cells up to four days after the induction of differentiation, we found no downregulation of *rip2* gene expression in C2F3 cells, which might be linked to the low differentiation potential of these cells. In addition, in contrast to C2C12 cells, the *rip3* gene was not expressed in C2F3 cells.

To further study the role of *rip* genes in the regulation of myoblast growth and differentiation, the expression patterns of *rip1-4* in rhabdomyosarcoma cell lines were analyzed: in contrast to the C2C12 myoblasts, *rip2* expression was not downregulated after the induction of differentiation in rhabdomyosarcoma cells. Furthermore, in contrast to normal myoblasts, they did not express the *rip3* and *rip4* genes.

The focus was now on the functional role of RIP2 in rhabdomyosarcoma cells: inhibition of *rip2* gene expression in C2C12 and in rhabdomyosarcoma cells using specific siRNAs led to decreased proliferation and promoted the differentiation process of these cells. These data indicate that differential expression of *rip* genes can be associated with abnormal growth and differentiation behaviour of skeletal myoblasts.

Keywords: RIP proteins; Skeletal muscle, Rhabdomyosarcoma

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, V., Gielen, S., Hambrecht, R., Schuler, G. (2001): Apoptosis in skeletal muscle  
*Front. Biosci.* 6: D1-D11
- Aggarwal, B.B (2003): Signaling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword.  
*Nat. Rev. Immunol.* 3: 745-756
- Aggarwal, B.B., Takada, Y., Shishodia, S., Gutierrez, A.M., Oommen, O.V., Ichikawa, H.,  
Baba, Y. Kumar, A. (2004): Nuclear transcription factor NF-kappa B: role in biology  
and medicine. *Indian. J. Exp. Biol.* 42: 341-353
- Akkoc, A., Ozigit, M.O., Yilmaz, R., Alasonyalilar, A., Cangul, I.T. (2006): Cardiac  
metastasizing rhabdomyosarcoma in a Great Dane. *Vet. Rec.* 158: 803-804
- Andreasen, C.B., White M.R., Swayne, D.E., Graves, G.N. (1988): Desmin as a marker for  
canine botryoid rhabdomyosarcomas. *J. Comp. Path.* 98: 23–29
- Aoyagi, T., Saruta, K., Asahi, I., Hojo, H., Shibahara, T., Kadota, K. (2000): Pleomorphic  
rhabdomyosarcoma in a cow. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 107-110
- Arnold, H.H., Braun, T. (1996): Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their  
role during mouse myogenesis: a review. *Int. J. Dev. Biol.* 40: 345-353
- Arnold, H.H., Winter, B. (1998): Muscle differentiation: more complexity to the network of  
myogenic regulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 539-544
- Astolfi, A. , De Giovanni, C., Landuzzi, L., Nicoletti, G., Ricci, C., Croci, S., Scopece, L.,  
Nanni, P., Lollini, P.L. (2001): Identification of new genes related to the myogenic  
differentiation arrest of human rhabdomyosarcoma cells. *Gene.* 274: 139-149
- Bähr, C., Rohwer, A., Stempka, L., Rincke, G., Marks, F., Gschwendt, M. (2000): DIK, a novel  
protein kinase that interacts with protein kinase C $\delta$ . *J. Biol. Chem.* 275: 36350-36357
- Baker, S.J., Reddy, E.P. (1998): Modulation of life and death by the TNF receptor  
superfamily. *Oncogene* 17: 3261-3270
- Barr, F.G. (1997): Molecular genetics and pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *J. Pediatr.*  
*Hematol. Oncol* 19: 483-491
- Baud, V., Karin, M. (2001): Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives.  
*Trends in Cell. Biol.* 11: 372-377
- Bennicelli, J.L., Edwards, R.H., Barr, F.G.(1996): Mechanism for transcriptional gain of  
function resulting from chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 5455-5459
- Blanchard, J.L., Watson, E.A. (1988): Spontaneous rhabdomyosarcoma in a rhesus monkey.  
*J. Comp. Pathol.* 99: 109-113

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Block, G., Clarke, K., Salisbury, S.K., DeNicola, D.B. (1995): Total laryngotomy and permanent tracheostomy for treatment of laryngeal rhabdomyosarcoma in a dog. *J. Am. Animal Hosp. Ass.* 31: 510-513
- Bober, E., Franz, T., Arnold, H.H., Gruss, P., Tremblay, P. (1994): Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development* 20: 603-612
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E.(1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell. Biol.* 106: 761-771
- Brand-Saberi, B. (2002): *Vertebrate Myogenesis* Springer Verlag; ISBN 3-540-43178-0
- Brand-Saberi, B., Christ, B. (2000): Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites. *Curr. Top. Dev. Biol.* 48: 1-42
- Brand-Saberi, B., Ebensperger, C., Wilting, J., Balling, R., Christ, B. (1993) The ventralizing effect of the notochord on somite differentiation in chick embryos. *Anat. Embryol.* 188: 239-245
- Brockus, C.W., Myers, R.K. (2004): Multifocal rhabdomyosarcomas within the tongue and oral cavity of a dog. *Vet. Pathol.* 41: 273-274
- Buckingham, M., Bajard, L., Daubas, P., Esner, M., Lagha, M., Relaix, F.; Rocancourt, D. (2006): Myogenic progenitor cells in the mouse embryo are marked by the expression of Pax3/7 genes that regulate their survival and myogenic potential. *Anat. Embryol.* 211: 51-56
- Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A., Moore, K.J. (1984): X-chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Nat. Acad. Sci U S A.* 81: 1189-1192
- Charge, S.B., Rudnicki, M.A. (2004): Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84: 209-238
- Chen, L., Haider, K., Ponda, M., Cariappa, A., Rowitch, D., Pillai, S. (2001): Protein kinase C-associated kinase (PKK) is a novel membrane-associated ankyrin repeat-containing protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 21737-21744
- Chin, A.I., Dempsey, P.W., Bruhn, K., Miller, J.F., Xu, Y. Cheng, G. (2002): Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses. *Nature* 416: 190-194
- Christ, B., Ordahl, C.P. (1995): Early stages of chick somite development. *Anat. Embryol.* 191: 381-396
- Clark, W.T., Shaw, S.E., Pass, D.A. (1984): Rhabdomyosarcoma of the urethra in a dog. *J. Sm. Anm. Pract.* 25: 203-206

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Coolican, S.A., Samuel, D.S. Ewton, D.Z., McWade, F.J., Florini, J.R. (1997): The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 272: 6653-62
- Croci, S., Landuzzi, L., Astolfi, A., Nicoletti, G., Rosolen, A., Sartori, F., Follo, M.Y., Oliver, N., De Giovanni, C., Nanni, P., Lollini, P.-L. (2004): Inhibition of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression decreases the survival and myogenic differentiation of human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res.* 64: 1730-1736
- Dagher, R., Helman, L. (1999): Rhabdomyosarcoma: An overview. *Oncologist* 4: 34-44.
- Davis, R.J., D'Cruz, C.M., Lovell, M.A., Biegel, J.A., Barr, F.G. (1994): Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 54: 2869-2872
- Devin, A., Lin, Y., Liu Z.-G. (2003): The role of the death-domain kinase RIP in tumor-necrosis-factor-induced activation of mitogen-activated protein kinases. *EMBO Rep.* 4: 623-627
- Erer, H., Kiran, M.M. (1989): A case of an undifferentiated rhabdomyosarcoma in a hen. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 102: 382-385
- Fredericks, W.J., Galili, N., Mukhopadhyay, S., Rovera, G., Bennicelli, J., Barr, F.G., Rauscher, F.J. (1995): The PAX3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas is a more potent transcriptional activator than PAX3. *Mol. Cell. Biol.*: 1522-1535
- Ginel, P.J., Martin de Las Mulas, J., Lucena, R., Milán, Y., Novales, M. (2002): Skeletal muscle rhabdomyosarcoma in a dog. *Vet. Rec.* 151: 736-738
- Glaister, J.R. (1981): Rhabdomyosarcoma in a young rat. *Lab. Animals* 15: 145-146
- Gonin-Jmaa, D., Paulsen, D.B., Taboada, J. (1996): Pericardial effusion in a dog with rhabdomyosarcoma in the right ventricular wall. *J. Sm. Anm. Pract.* 37: 193-196
- Goulding, M., Lumsden, A., Paquette, A.J. (1994): Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* 120: 957-971
- Grell, M., Scheurich, P., Meager, A., Pfizenmaier, K. (1993) TR60 und TR80 tumor necrosis factor (TNF)-receptors can independently mediate cytolysis. *Lymphokine Cytokine Res* 12: 143-148
- Grell, M., Zimmermann, G., Hülser, D., Pfizenmaier, K., Scheurich, P. (1994): TNF receptors TR60 und TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways. *J Immunol* 153: 1963-1972
- Greten, F.R., Karin, M. (2004): The IKK/ NF-kappa B activation pathway – a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett.* 206: 193-199

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Grimm, S., Stanger, B.Z., Leder, P. (1996): RIP and FADD: Two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways. *Genetics* 93: 10923-10927
- Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G., Baldwin, A.S.Jr. (1999): NF-kappa B controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.* 19: 5785-5799
- Guttridge, D.C., Mayo, M.W., Madrid, L.V., Wang, C.Y., Baldwin, A.S. Jr. (2000): NF-kappa B-induced loss of Myo D messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* 289: 2363-2366
- Halliwell, W.H., Ackerman, N. (1982): Botryoid rhabdomyosarcoma of the urinary bladder and hypertrophic osteoarthropathy in a young dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 15: 911-913
- Hamir, A.N. (1982): Striated muscle tumours in horses. *Vet. Rec.* 111, 367-368
- Holland, P., Willis, C., Kanaly, S., Glaccum, M., Warren, A., Charrier, K., Murison, J., Derry, J., Virca, G., Bird, T., Peschon, J. (2002): RIP4 is an ankyrin repeat-containing kinase essential for keratinocyte differentiation. *Curr. Biol.* 12: 1424-1428
- Holscher, M.A., Page, D.L., Netsky, M.G., Powell, H.S. (1977) Mixed glioma and rhabdomyosarcoma in brain of a wild deer. *Vet. Pathol.* 14: 643-647
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H.-B., Baichwal, V., Goeddel, D.V. (1996): TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF Receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4: 387-396
- Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D.V. (1995): The TNF receptor 1 associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.* 81: 495-504
- Huang, R., Christ, B. (2000): Origin of the epaxial and hypaxial myotome in avian embryos. *Anat. Embryol.*: 369-374
- Ilanes, O.G. (2002): Juvenile parameningeal rhabdomyosarcoma in a dog causing unilateral denervation atrophy of masticatory muscles. *J. Comp.Path.* 126: 303-307
- Inohara, N., del Peso, L., Koseki, T., Chen, S., Nuñez, G. (1998): RICK, a novel protein kinase containing a caspase recruitment domain, interacts with CLARP and regulates CD95-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273: 12296-12300
- Jimma, K., Wada, Y., Ishikawa, Y., Kadota, K. (1999): Differentiated embryonal rhabdomyosarcoma in a cow. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 577-580
- Kasof, G.M., Prosser, J.C., Liu, D., Lorenzi, M.V., Gomes, B.C. (2000): The RIP-like kinase, RIP3, induces apoptosis and NF-kappa B nuclear translocation and localizes to mitochondria. *FEBS Letters* 473: 285-291



## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Kassar-Duchossy, L., Giacone, E., Gayraud-Morel, B. Jory, A., Gomès, D., Tajbakhsh, S. (2005): Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes and Dev.* 19: 1426-1431
- Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B.Z., Leder, P. (1998): The Death Domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- $\kappa$ B signal. *Immunity* 8: 297-303
- Kelly, D.F. (1973): Rhabdomyosarcoma of the urinary bladder in dogs. *Vet. Pathol.* 10: 375-384
- Kerry, P.J., Evans, J.G., Pearson, E.C., Coleman, H. (1995): Identification of a spontaneous pleomorphic rhabdomyosarcoma in the thoracic and abdominal cavities of a female Wistar Rat. *Vet. Pathol.* 32: 76-78
- Kidd, G.N., Reuter, R.E. (1989): Rhabdomyosarcoma in a fallow deer. *Vet. Rec.* 124: 466
- Kim, D.-Y., Hodgins, E.C., Cho, D.-Y., Varnado, J.E. (1996): Juvenile rhabdomyosarcomas in two dogs. *Vet. Pathol.* 33: 447-450
- Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L.D., Galán, J.E., Nuñez, G., Janeway, C.A., Medzhitov, R., Flavell, R.A. (2002): RICK/ RIP2/ CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* 416: 194-199
- Kobayashi, M., Sakai, H., Hirata, A., Yonemaru, K., Yanai, T., Watanabe, K., Yamazoe, K., Kudo, T., Masegi, T. (2004): Expression of myogenic regulating factors, myogenin and myoD, in two canine botryoid rhabdomyosarcomas. *Vet. Pathol.* 41: 275-277
- Krotje, I.J., Ware, W.A., Niyo, Y. (1990): Intracardiac rhabdomyosarcoma in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197: 368-371
- Kuwamura, M., Yoshida, H., Yamate, J., Kotani, T., Ohashi, F., Sakuma, S. (1998): Urinary bladder rhabdomyosarcoma (sarcoma botryoides) in a young Newfoundland dog. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 619-621
- Ladds, P.W., Webster, D.R. (1971): Pharyngeal rhabdomyosarcoma in a dog. *Vet. Pathol.* 8: 256-259
- Lagrotta-Candido, J., Vasconcellos, R., Cavalcanti, M., Bozza, M., Savino, W., Quirico-Santos, T. (2002): Resolution of skeletal muscle inflammation in mdx dystrophic mouse is accompanied by increased immunoglobulin and interferon- $\gamma$  production. *Int. J. Exp. Path.* 83: 121-132
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., Kambadur, R. (2002): Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating myoD expression. *J. Biol. Chem.* 277: 49831-49840
- Lascelles, B.D.X., McInnes, E., Dobson, J.M., White, R.A.S. (1998): Rhabdomyosarcoma of the tongue in a dog. *J. Small Animal Practice.* 39: 587-591

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Lechner, C., Zahalka, M.A. Giot, J.F., Moller, N.P. Ullrich, A. (1996): ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93: 4355-4359
- Liu, S.F., Malik, A.B. (2006): NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 290: L622-L645
- Lollini, P.L., De Giovanni, C., Landuzzi, L., Nicoletti, G., Scotlandi, K., Nanni, P. (1991): Reduced metastatic ability of in vitro differentiated human rhabdomyosarcoma cells. *Invasion Metastasis.* 11: 118-124
- Madewell, B., Lund, J., Munn, R., Pino, M. (1988): Canine laryngeal rhabdomyosarcoma: an immunohistochemical and electron microscopic study. *Nippon Juigaku Zasshi.* 50: 1079-1084
- Maione, R., Amati, P. (1997): Interdependence between muscle differentiation and cell-cycle control. *Biochem. Biophys. Acta.* 1332: M19-30
- Mansouri, A., Goudreau, G., Gruss, P. (1999): Pax genes and their role in organogenesis. *Cancer Res.* 59: 1707s-1710s
- Matsui, T., Imai, T., Han, J.S., Awakura, T., Taniyama, H., Osame, S., Nakagawa, M., Ono, T. (1991): Bovine undifferentiated alveolar rhabdomyosarcoma and its differentiation in xenotransplanted tumors. *Vet. Pathol.* 28: 438-45
- McCarthy, J.V., Ni, J., Dixit, V.M. (1998): RIP2 is a novel NF-kappa B-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem.* 273: 16968-16975
- Merlino, G., Helman, L.J. (1999): Rhabdomyosarcoma – working out the pathways. *Oncogene* 18: 5340-5348
- Meylan, E., Martinon, F., Thome, M., Gschwendt, M., Tschopp, J. (2002): RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis. *EMBO Rep.* 3: 1201-1208
- Meylan, E., Tschopp, J. (2005): The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem. Science* 30:151-159
- Milasincic, D.J., Calera, M.R., Farmer, S.R., Pilch, P.F. (1996): Stimulation of C2C12 myoblast growth by fibroblast growth factor and insulin-like growth factor 1 can occur via mitogen-activated protein kinase-dependent and –independent pathways. *Mol. Cell. Biol.* 16: 5964-5973
- Minato, Y., Takada, H., Yamanaka, H., Wada, I., Takeshita, M., Okaniwa, A. (1983): Spontaneous rhabdomyosarcoma in a young rat. *Nippon. Juigaku. Zasshi.* 45: 837-842
- Minkus, G., Hillemanns, M. (1997): Botryoid-type embryonal rhabdomyosarcoma of liver in a Young Cat. *Vet. Pathol.* 34: 618-621

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- 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: 103-111
- Munz, B., Hildt, E., Springer, M.L., Blau, H.M. (2002): RIP2, a checkpoint in myogenic differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 22: 5879-5886
- Navas, T.A., Baldwin, D.T. Stewart, T.A. (1999): RIP2 Is a Raf1-activated mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 274: 33684-33690
- Necas, A., Rauser, P., Tichy, F., Kohout, P., Kecova, H. (2003) Retrobulbar rhabdomyosarcoma in a Hovawart. *Acta Vet Brno* 72: 399-404
- Newton, K., Sun, X., Dixit, V.M. (2004): Kinase RIP3 is dispensable for normal NF-kappa Bs, signaling by the B-Cell and T-Cell Receptors, Tumor Necrosis Factor Receptor 1, and Toll.Like Receptors 2 and 4. *Mol. Cell. Biol.* 24: 1464-1469
- Olwin, B.B., Bren-Mattison, Y., Cornelison, D.D.W., Fedorov, Y.V., Flanagan-Steet, H., Jones, N.C. (2002): Role of cytokines in skeletal muscle growth and differentiation. In *Stem cells and cell signalling in skeletal myogenesis*. D.A. Sassoon (Hrsg.) New York: Elsevier Science: 97-126
- Ontell, M., Ontell, M.P., Sopper, M.M., Mallonga, R., Lyons, G., Buckingham, M. (1993): Contractile protein gene expression in primary myotubes of embryonic mouse hindlimb muscles. *Development* 117: 1435-1444
- Ordahl, C.P., Le Douarin, N.M. (1992): Two myogenic lineages within the developing somite. *Development* 114: 339-353
- Otten, A.D., Firpo, E.J., Gerber, A.N., Brody, L.L., Roberts, J.M., Tapscott S.J. (1997): Inactivation of MyoD-mediated expression of p21 in tumor cell lines. *Cell. Growth Differ.* 8: 1151-1160
- Padzernik, N.J., Donner, D.B., Goebel, M.G., Harrington, M.A. (1999): Mouse receptor interacting protein 3 does not contain a caspase-recruitment or a death domain but induces apoptosis and activates NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* 19: 6500-6508
- Parker, M.H., Seale, P., Rudnicki, M.A. (2003): Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nature Reviews* 4: 495-505
- Patnaik, A.K., Lieberman, P.H., Erlandson, R.A., MacEwen, E.G., Hurwitz, A.I. (1986): A clinicopathologic and ultrastructural study of undifferentiated malignant tumors of the oral cavity in dogs. *Vet. Pathol.* 23: 170-175
- Pérez, J., Pérez-Rivero, A. Montoya, A., Paz Martin M., Mozos, E. (1998): Right-sided heart failure in a dog with primary cardiac rhabdomyosarcoma. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 34: 208-211
- Perry, R.L., Rudnicki, M.A. (2000): Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front. Biosci.* 5: D750-767

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Pletcher, J.M., Dalton, L. (1981): Botryoid rhabdomyosarcoma in the urinary bladder of a dog. *Vet. Pathol.* 18: 695-697
- Radi, Z.A. (2006): Auricular rhabdomyosarcoma in a rat. *J. Vet. Med.* A53: 246-248
- Raphael, B.L., Nguyen, H.T. (1980): Metastasizing rhabdomyosarcoma in a budgerigar. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177: 925-926
- Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J., Goeddel, D.V. (1994): A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* 78: 681-692
- Ruefli-Brasse, A.A., Lee, W.P., Hurst, S., Dixit, V.M. (2004): RIP2 participates in Bcl10 signaling and T-cell Receptor-mediated NF-kappa B activation. *J. Biol. Chem.* 279: 1570-1574
- Sabourin, L.A., Rudnicki, M.A. (2000): The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genet.* 57: 16-25
- Sakai, H., Marayama, M., Hirata, A., Yonemaru, K., Yanai, T., Masegi, T. (2004): Rhabdomyosarcoma in a ferret. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 95-96
- Sarnelli, R., Grassi, F., Romagnoli, S. (1994): Alveolar rhabdomyosarcoma of the greater omentum in a dog. *Vet. Pathol.* 31: 473-475
- Sassoon, D.A. (2002): Stem cells and cell signalling in skeletal myogenesis. First Edition Elsevier Science; ISBN 0-444-50663-2
- Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., Rudnicki, M.A. (2000): Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell.* 12: 777-786
- Sen, G.L., Blau, H.M. (2006): A brief history of RNAi: the silence of the genes. *FASEB J* 20: 1293-1299
- Senior, D.F., Lawrence, D.T., Gunson, C., Fox, L.E., Thompson, J.P., Buergelt, C.D. (1993): Successful treatment of botryoid rhabdomyosarcoma in the bladder of a dog. *J. Am. Animal Hosp. Ass.* 29: 386-390
- Stamps, P., Harris, D.L. (1968): Botryoid rhabdomyosarcoma of the urinary bladder of a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 153: 1064-1068
- Stanger, B.Z., Leder, P., Lee, T.-H., Kim, E., Seed, B. (1995): RIP: A novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell.* 81: 513-523
- Stünzi, H. Weiss, E. (1990): Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin. 8. Auflage, Blackwell Wissenschaftsverlag, ISBN 3-8263-2586-9
- Sun, X., Lee, J., Navas, T., Baldwin, D.T., Stewart, T.A., Dixit, V.M. (1999): RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase. *J. Biol. Chem.* 274: 16871-16875

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Sun, S.-C., Xiao, G. (2003): Deregulation of NF-kappa B and its upstream kinases in cancer. *Cancer and Metastasis Rev.* 22: 405-422
- Sundberg, J.P., Adkinson, D.L., Bedigian, H.G. (1991) Skeletal muscle rhabdomyosarcomas in inbred laboratory mice. *Vet. Pathol.* 28: 200-206
- Suzuki, K., Nakatani, K., Shibuya, H., Sato, T.(2006) Vaginal rhabdomyosarcoma in a dog. *Vet. Pathol.* 43: 186-188
- Tageldin, M.H., Gaffar Elamin, M.A. (1981): Observations on spontaneous rhabdomyosarcoma in a rat. *Laboratory Animals.* 15: 355-357
- Tajbakhsh, S., Borello, U., Vivarelli, E., Kelly, R., Papkoff, J., Duprez, D., Buckingham, M., Cossu, G. (1998): Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. *Development* 125: 4155-4162
- Tajbakhsh, S., Buckingham, M. (2000): The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr. Top. Dev. Biol.* 48: 225-268
- Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., Cossu, G., Buckingham, M. (1997): Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: PAX-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell.* 89: 127-138
- Takiguchi, M., Watanabe, T., Okada, H., Kudo, K., Yamada, K., Yasuda, J. Hashimoto, A. (2002): Rhabdomyosarcoma (botryoid sarcoma) of the urinary bladder in a maltese. *J. Sm. Anm. Pract.* 43: 269-271
- Tanaka, K., Stromberg, P.C. (1993): Embryonal rhabdomyosarcoma in a sheep. *Vet. Pathol.* 30: 396-399
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H., Goeddel, D.V. (1993): A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell.* 74: 845-53
- Thome, M., Hofmann, K., Burns, K., Martinon, F., Bodmer, J.-L., Mattmann, C., Tschopp, J. (1998): Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr. Biol.* 8: 885-888
- Torbeck, R.L., Kittleson, S.L., Leathers, C.W. (1980): Botryoid rhabdomyosarcoma of the uterus of a filly. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176: 914-916
- Turnquist, S.E., Pace L.W., Keegan, K., Andrews-Jones, L., Kreeger, J.M., Baily, K.L., Stogsdill, P.L., Wilson, H.A. (1993): Botryoid rhabdomyosarcoma of the urinary bladder in a filly. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 451-453
- Ueno, H, Kadosawa, T., Isomura, H., Okada, Y., Ochiai, K., Umemura, T., Okumura, M., Fujinaga, T.(2002): Perianal rhabdomyosarcoma in a dog. *J. Small Anim. Pract.* 43: 217-220

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- van Vechten, M., Goldschmidt, M.H., Wortman, J.A. (1990): Embryonal rhabdomyosarcoma of the urinary bladder in dogs. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 12: 783-793
- Vos, J.H., Borst, G.H.A., Martín de las Mulas, J, Ramaekers, F.C.S., van Mil, F.N., Molenbeek, R.F., Ivayi, D., van den Ingh, T.S.G.A.M. (1993): Rhabdomyosarcomas in young pigs in a swine breeding farm: a morphologic and immunohistochemical study. *Vet. Path.* 30. 271–279
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P. (2003): Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation* 10: 45-65
- Weyman, C.M., Wolfman A. (1998): Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) activity is required for inhibition of skeletal muscle differentiation by insulin-like growth factor 1 or fibroblast growth factor 2. *Endocrinology* 139: 1794-800
- Wiegmann, K., Schütze, S., Kampen, E., Himmler, A., Machleidt, T., Krönke, M. (1992): Human 55-kDa receptor for tumor necrosis factor coupled to signal transduction cascades. *J. Biol. Chem.* 267 (25): 17997-8001
- Xia, S.J., Pressey, J.G., Barr, F.G. (2002): Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma: *Cancer Biol. Ther.* 1: 97-104
- Yanoff, S.R., Fuentealba, C. Boothe, H.W., Rogers, K.S. (1996): Tracheal defect and embryonal rhabdomyosarcoma in a young dog. *Can. Vet. J.* 37: 172-173
- Yu, P.W., Huang, B.C.B., Shen, M., Quast, J., Chan, E., Xu, X., Nolan, G.P., Payan, D., Luo, Y. (1999): Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr. Biol.* 9: 539-542
- Zha, J., Zhou, Q., Xu, L.-G., Chen, D., Li, L., Zhai, Z., Shu, H.-B. (2004): RIP5 is a RIP-homologous inducer of cell death. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 319: 298-303

**PUBLIKATIONEN**

„RIP2 regulates growth and differentiation of normal myoblasts and of rhabdomyosarcoma cells“

Svenja Ehlers, Tobias Mueck, Stephanie Adams, Lorena Landuzzi, Pier-Luigi Lollini, Barbara Munz

European Journal of Cell Biology Volume 87, Issue 3 (2008): 163-172

### **DANKSAGUNG**

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Professor Dr. Barbara Munz für das Thema meiner Doktorarbeit und für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Sie hat diese Arbeit mit ihren Ideen, Geduld, Erfahrung und vielen fruchtbaren Diskussionen immer wieder vorangetrieben und stets ein offenes Ohr für alle anfallenden Probleme gehabt.

Großer Dank gilt auch den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme in ihr Team, die tatkräftige Unterstützung, die tolle Arbeitsatmosphäre und dafür, dass sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und außerdem dafür gesorgt haben, dass der Laboralltag nicht langweilig wurde.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium der Veterinärmedizin und diese Doktorarbeit ermöglichten; ohne ihre Unterstützung wäre es nicht möglich gewesen.

Zu danken habe ich auch dem Rest meiner Familie, die immer an mich geglaubt haben.



**SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

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

Reeßum, den 22. März 2009

Svenja Ehlers