

**Der skNAC-Smyd1-Komplex:
Ein multifunktionaler Regulator der Myogenese?**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Janine Berkholz
aus Berlin
2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2010 bis September 2014 am Institut für Physiologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, im Rahmen des Graduiertenkollegs GRK1631: Internationales Graduiertenkolleg für Myologie, unter Leitung von Frau Prof. Dr. Munz angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Barbara Munz

2. Gutachter: Prof. Dr. Sigmar Stricker

Disputation am 26.02.2015

.....für meine Eltern & Erik.....

Die vorliegende Doktorarbeit fasst meine Ergebnisse zur Untersuchung der Funktion des skNAC-Smyd1-Komplexes im Skelettmuskel zusammen und wurde als kumulative Arbeit eingereicht. Als Erstautorin habe ich bei allen beiliegenden Manuskripten an der Konzeption und speziell bei den Manuskripten 3, 4 und 5 an der Berichtabfassung mitgewirkt. Ich habe mit Ausnahme von Manuskript 1 ca. 90% der Experimente durchgeführt. Bei Manuskript 1 war ich etwa zu 50% an der Durchführung der Experimente beteiligt. Grundlage für die kumulative Promotion sind die folgenden veröffentlichten Publikationen:

Berger*, F., Berkholz*, J., Breustedt, T., Ploen, D., Munz, B.

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

Eur. J. Cell Biol. 2012, 91, 150-5.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.10.004>

* equal contribution

Berkholz, J., Zakrzewicz, A., Munz, B.

skNAC depletion stimulates myoblast migration and perturbs sarcomerogenesis by enhancing calpain 1 and 3 activity.

Biochem. J. 2013, 453, 303-10.

<http://dx.doi.org/10.1042/BJ20130195>

Berkholz, J., Orgeur M., Stricker S., Munz B.

skNAC and Smyd1 in transcriptional control.

Exp. Cell Res. 2015, 336, 182-91.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.06.019>

Berkholz, J., Michalick, L., Munz, B.

The E3 SUMO ligase Nse2 regulates sumoylation and nuclear-to-cytoplasmic translocation of skNAC-Smyd1 in myogenesis.

J. Cell Sci. 2014, 127, 3794-804.

<http://dx.doi.org/10.1242/jcs.150334>

Berkholz, J., Kuzyniak, W., Hoepfner, M., and Munz, B.

Overexpression of the *skNAC* gene in human rhabdomyosarcoma cells enhances their differentiation potential and inhibits tumor cell growth and spreading.

Clin. Exp. Metastasis, 2014, 31, 869-79.

<http://dx.doi.org/10.1007/s10585-014-9676-z>

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Aufbau des Skelettmuskels und Myogenese	1
1.1.1 Aufbau des Skelettmuskels	1
1.1.1.1 Fasertypen	2
1.1.2 Molekulare und zelluläre Grundlagen der Myogenese	4
1.1.2.1 <i>In vitro</i> -Modellsysteme zur Untersuchung der Myoblastendifferenzierung	5
1.1.2.2 Myofibrillogenese	6
1.2 Rhabdomyosarkome	8
1.2.1 Klassifikation	8
1.2.2 <i>In vitro</i> -Modellsysteme zur Untersuchung des Rhabdomyosarkoms	10
1.3 skNAC und Smyd1	10
1.3.1 NAC	11
1.3.1.1 α NAC	12
1.3.1.2 β NAC	12
1.3.2 Entdeckung von skNAC	13
1.3.2.1 Struktur von skNAC	13
1.3.2.2 Expression des <i>skNAC</i> -Gens	14
1.3.2.3 skNAC als Transkriptionsfaktor bzw. transkriptioneller Koaktivator	15
1.3.2.4 Einfluss des skNAC-Proteins auf Muskelentwicklung und - regeneration	15
1.3.2.5 Einfluss von skNAC auf die Myofibrillogenese	17
1.3.3 Der skNAC-Bindungspartner Smyd1	18
1.3.3.1 Struktur und Funktion der Smyd-Proteine	19
1.3.3.1.1 SET-Domäne	19

1.3.3.1.2 MYND-Domäne	20
1.3.3.1.3 Charakteristika spezifischer Smyd-Proteine	20
1.3.3.2 Expressionsmuster des <i>Smyd1</i> - und <i>skNAC</i> -Gens und intrazelluläre Lokalisation des Smyd1 und skNAC-Proteins	21
1.3.3.3 Regulation der <i>Smyd1</i> -Expression	22
1.3.3.4 Einfluss von Smyd1 auf die Herz- und Skelettmuskelentwicklung	23
1.3.3.5 Einfluss von Smyd1 auf die Sarkomerogenese	24
1.3.3.6 Smyd1 als Transkriptionsfaktor bzw. Chromatin-remodelling Faktor	25
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	27
2. Ergebnisse	29
2.1 Manuskript: “Skeletal muscle-specific variant of nascent polypeptide associated complex alpha (skNAC): Implications for a specific role in mammalian myoblast differentiation”	29
2.1.1 Zusammenfassung	29
2.1.2 Manuskript	30
2.2 Manuskript: “skNAC depletion stimulates myoblast migration and perturbs sarcomerogenesis by enhancing calpain 1 and calpain 3 activity”	31
2.2.1 Zusammenfassung	31
2.2.2 Manuskript	33
2.3 Manuskript: “skNAC and Smyd1 in transcriptional control”	33
2.3.1 Zusammenfassung	33
2.3.2 Manuskript	35
2.4 Manuskript: “The E3 SUMO ligase Nse2 regulates sumoylation and nuclear-to-cytoplasmic translocation of skNAC-Smyd1 in myogenesis”	35
2.4.1 Zusammenfassung	35
2.4.2 Manuskript	37
2.5 Manuskript: “Overexpression of the <i>skNAC</i> gene in human rhabdomyosarcoma cells enhances their differentiation potential and inhibits tumor cell growth and spreading”	37
2.5.1 Zusammenfassung	37
2.5.2 Manuskript	39

3. Diskussion	40
3.1 Regulation der <i>skNAC</i>-Expression	40
3.1.1 Die <i>skNAC</i> -Expression wird auf transkriptioneller Ebene unter Beteiligung des p38 MAPK-Signalweges reguliert	41
3.2 Funktion von <i>skNAC</i> und <i>Smyd1</i> im Skelettmuskel	42
3.2.1 Inhibierung von <i>skNAC</i> hat keinen Effekte auf die Expression myogener Differenzierungsmarker oder die Bildung von Myozyten und Myotuben	43
3.2.2 <i>skNAC</i> übt im murinen System, ähnlich wie im Zebrafisch-Modellsystem, einen Einfluss auf die Sarkomerogenese aus	44
3.2.3 <i>skNAC</i> übt keinen signifikanten Einfluss auf die Expression spezifischer Gene aus, welche für molekulare Chaperone oder Ubiquitin-Ligasen kodieren	44
3.2.4 <i>skNAC</i> beeinflusst über Regulation der Calpain-Aktivität die Sarkomerogenese	46
3.2.5 Existieren weitere Mechanismen, auf deren Basis <i>skNAC</i> und <i>Smyd1</i> die Sarkomerogenese beeinflussen könnten?	46
3.2.6 <i>skNAC</i> reguliert auch die Myoblastenmigration dabei sind ebenfalls Calpaine beteiligt	48
3.2.7 Die Regulation der Calpainexpression durch <i>skNAC</i> - <i>Smyd1</i> erfolgt zumindest zum Teil auf der Basis von Histon-Modifikationen	49
3.2.8 Mithilfe eines cDNA- <i>Microarrays</i> ließen sich neue mögliche Zielgene des <i>skNAC</i> -Proteins identifizieren	51
3.2.9 <i>skNAC</i> beeinflusst die Myoglobin-Expression und die Fasertypspezifizierung	53
3.2.10 Eine Hemmung der <i>skNAC</i> -Expression beeinflusst die Expression metabolischer Markergene in Skelettmuskelzellen	54
3.2.11 Depletion von <i>skNAC</i> beeinflusst die Expression von Genen, die für spezifische Zytokine kodieren	55
3.2.12 <i>skNAC</i> - ein myogener Transkriptionsfaktor?	57
3.3 Regulation des <i>skNAC</i>-<i>Smyd1</i>-Komplexes durch Sumoylierung	57
3.3.1 Die SUMO-Ligase Nse2, der neu identifizierte Interaktionspartner	

des skNAC-Smyd1-Komplexes, beeinflusst die Expression myogener Differenzierungsmarker in C2C12-Zellen und übt - ähnlich wie skNAC und Smyd1 - einen Einfluss auf die Sarkomerogenese aus	58
3.3.2 Hemmung der globalen Sumoylierung reduziert das Differenzierungspotential von C2C12-Zellen	59
3.3.3 Hemmung der Nse2-Expression führt zu einem Verbleib von skNAC und Smyd1 in nukleären PML-Körperchen und damit zu einem gestörten Kern-Austransport des skNAC-Smyd1-Komplexes im Verlauf der Myogenese	59
3.3.4 Smyd1 stellt im skNAC-Smyd1-Komplex das Sumoylierungssubstrat dar	61
3.3.5 Beeinflusst Sumoylierung weitere Funktionen von skNAC und Smyd1?	62
3.4 Spielt skNAC eine Rolle bei der Pathogenese des Rhabdomyosarkoms?	63
3.4.1 Das <i>skNAC</i> -Expressionsmuster einer spezifischen Rhabdomyosarkom Zelllinie korreliert nicht mit deren histologischen Subtyp oder Differenzierungspotential	63
3.4.2 Überexpression des <i>skNAC</i> -Gens inhibiert die Proliferation und steigert gleichzeitig die Apoptose bei Rh30-Rhabdomyosarkomzellen	64
3.4.3 Überexpression des <i>skNAC</i> -Gens fördert die myogene Differenzierung von Rh30-Rhabdomyosarkomzellen	65
3.4.4 Überexpression des <i>skNAC</i> -Gens verringert das Metastasierungspotential von Rh30-Rhabdomyosarkomzellen	66
4. Zusammenfassung	68
5. Summary	70
6. Literaturverzeichnis	73
7. Selbstständigkeitserklärung	94
8. Lebenslauf	95
9. Danksagung	96

ANHANG der veröffentlichten Publikationen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Skelettmuskulatur und der mit dieser assoziierten Strukturen.

Abbildung 2: Darstellung des Zusammenwirkens von Sarkomer-spezifischen Chaperonen und Ubiquitin-Ligasen.

Abbildung 3: Schematische Darstellung des skNAC-Proteins in verschiedenen Organismen.

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur der Smyd-Proteinfamilie in Säugetieren.

Abbildung 5: Hypothetisches Modell über die Funktionen von skNAC und Smyd1 in Skelettmuskelzellen.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Metabolische, kontraktile und morphologische Charakteristika der verschiedenen Fasertypen im Skelettmuskel.

Abkürzungsverzeichnis

ALLN	N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>
BMPs	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BTF3	<i>Basic transcription factor 3</i>
cDNA	<i>copy</i> oder <i>complementary</i> DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CHIP	<i>C terminus of Hsc70-interacting protein</i>
CIITA	<i>Major histocompatibility complex (MHC) class II transactivator</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDG1	<i>Endothelial differentiation gene 1</i>
EGD1	<i>Enhancer of GAL4 DNA binding</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBX4	<i>F-box protein 4</i>
FIAT	<i>Factor inhibiting ATF4-mediated transcription</i>
FHL	<i>Four and a half LIM domain</i>
FKHR	<i>Forkhead in rhabdomyosarcoma</i>
FoxO1	<i>Forkhead box protein O1</i>
Hand	<i>Heart and neural crest derivatives expressed</i>
HDACs	<i>Histone deacetylases</i>
HMTase	<i>Histone methyltransferase</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
IGF2	<i>Insulin growth factor 2</i>
IL	Interleukin
INF γ	<i>Interferon gamma</i>
Irx	<i>Iroquois Homeobox Protein</i>
kDA	Kilodalton

LGMD2a	<i>Limb girdle muscular dystrophy 2a</i>
LSD1	<i>Lysin-specific demethylase-1</i>
MARCKS	<i>Myristoylated alanine rich C kinase substrate</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
Mef	<i>Myocyte enhancer factor</i>
MICAL	<i>Microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing</i>
MRFs	<i>Myogenic regulatory factors</i>
Mrf5	<i>Myogenic factor 5</i>
Msx1	<i>Msh Homeobox 1</i>
MuRF	<i>Muscle RING-finger protein</i>
MyHC	<i>Myosin heavy chain</i>
μM	mikromolar
NAC	<i>Nascent polypeptide associated complex</i>
Nedd4	<i>Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4</i>
p38 MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
PAX	<i>Paired box</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PGC1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α</i>
PIAS1	<i>Protein inhibitor of activated STAT-1</i>
PML	<i>Promyelocytic leukemia</i>
qPCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
tRNA	Transfer-RNA
SDH	Succinat-Dehydrogenase
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
Shox2	<i>Short stature homeobox 2</i>
siRNAs	<i>short-interfering-RNAs</i>
Sirt1	<i>Sirtuin 1</i>
skNAC	<i>skeletal and heart muscle-specific variant of nascent polypeptide-associated complex</i>
Smyd	<i>SET and MYND domain containing</i>
SNF1	<i>Sucrose non-fermenting 1</i>

SnoN	<i>Ski-related novel protein N</i>
SRF	<i>Serum response factor</i>
SRP	<i>Signal recognition particle</i>
SUMO	<i>Small ubiquitin related modifier</i>
TCP1	<i>T-complex protein 1</i>
UCP3	<i>Mitochondrial uncoupling protein 3</i>
UFD2	<i>Ubiquitin fusion degradation protein 2</i>
TBP	TATA Box-Bindungs-Protein
TSA	Trichostatin A
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VEGFR1	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 1</i>

1. Einleitung

1.1 Aufbau des Skelettmuskels und Myogenese

Ein wesentliches Kennzeichen von Lebewesen ist aktive Bewegung. Diese wird bei allen Tieren mit Hilfe von Muskelzellen, die sich bei komplexeren Organismen zu Muskeln zusammenschließen, ermöglicht.

Muskeln lassen sich aufgrund morphologischer und funktioneller Eigenschaften in zwei Haupttypen einteilen: glatte und quergestreifte Muskeln.

Der Skelettmuskel zählt neben dem Herzmuskel aufgrund seiner lichtmikroskopisch sichtbaren, charakteristischen Anordnung der Myofibrillen zur quergestreiften Muskulatur. Im Gegensatz zur Herz- und auch zur glatten Muskulatur, welche ausschließlich vegetativ gesteuert werden, ist für die Reizauslösung im Skelettmuskel das somatische Nervensystem verantwortlich. Er unterliegt damit dem Konzept der bewussten Steuerung und dient der willkürlichen, aktiven Bewegung.

1.1.1 Aufbau des Skelettmuskels

Die Skelettmuskulatur von Vertebraten besteht aus zahlreichen gebündelten, vielkernigen Muskelfasern, deren Länge zwischen wenigen Millimetern und mehreren Zentimetern variiert. Dabei werden zunächst mehrere Muskelfasern von einer Bindegewebsmembran (Perimysium) umschlossen und bilden ein sogenanntes Faser- oder Primärbündel. Aus mehreren Primärbündeln entstehen wiederum die Sekundärbündel, die von Bindegewebe (Epimysium) und einer zusätzlichen elastischen Muskelhülle (Muskelfaszie) umgeben sind. Diese, aus mehreren Fasergruppen bestehenden Bündel, stellen dann die eigentlichen Skelettmuskeln dar, die durch feste Bindegewebsbänder, die Sehnen, an den Knochen verankert werden. Die Muskelfasern selbst sind durch Verschmelzen vieler Muskelvorläuferzellen, den sogenannten Myoblasten, während der Embryonalentwicklung entstanden. Sie enthalten zahlreiche randständige Zellkerne, die sich direkt unter der Zellmembran (Sarkolemma) befinden. Die vielkernigen Muskelfasern werden daher auch als Synzytium bezeichnet. Sie sind von einer Hülle aus Bindegewebe (Endomysium) umgeben. Das Zellplasma (Sarkoplasma) jeder Muskelfaser enthält fadenförmige Myofibrillen. Die parallele Anordnung der Muskelfibrillen bewirkt die charakteristische Querstreifung des Skelettmuskels und ermöglicht letztendlich die Muskelkontraktion. Die kleinste funktionelle Einheit des kontraktiven Apparats wird als Sarkomer bezeichnet (Übersicht bei Clark *et al.*, 2002). Den Hauptbestandteil des Sarkomers bilden die zwei kontraktile Proteine Aktin und Myosin, die sich gemeinsam mit weiteren Proteinen zu den sogenannten dünnen (Aktin-) bzw. dicken (Myosin-) Filamenten zusammenlagern. Die dünnen

Filamente sind in den Z-Scheiben verankert, welche die Sarkomere seitlich voneinander abgrenzen. Das von dem Motorprotein Myosin und assoziierten Proteinen gebildete System dicker Filamente ist mit seinen Schwänzen in der M-Bande verankert, die sich in der Mitte des Sarkomers befindet. Die Kopfbereiche ragen dagegen in den Bereich der dünnen Filamente hinein. Durch Ineinandergleiten der dicken und dünnen Myofilamente kommt es zur Muskelkontraktion, wobei sich das Sarkomer verkürzt. Ein drittes Filamentsystem des Muskels, dessen Hauptkomponente Titin darstellt, gewährleistet die elastische Verknüpfung von Z-Scheibe und M-Bande (Wang *et al.*, 1984, 1991).

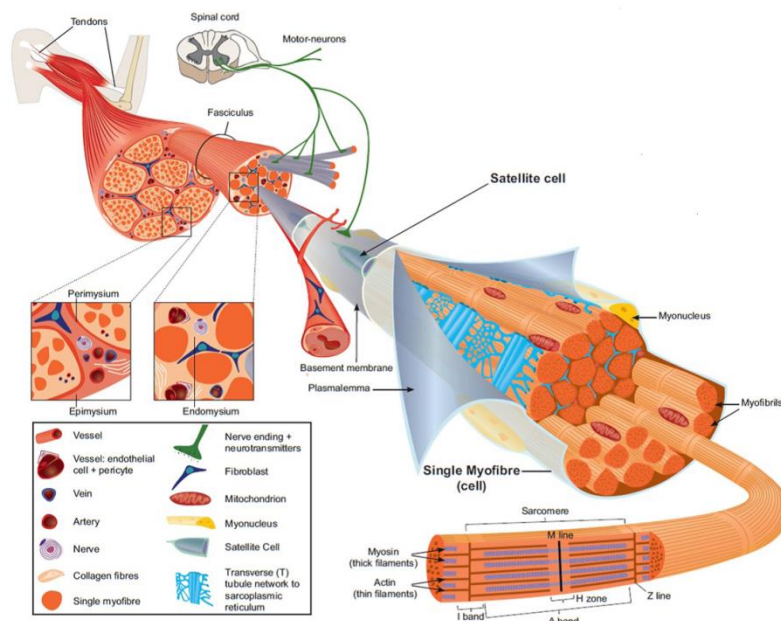


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Skelettmuskulatur und der mit dieser assoziierten Strukturen.

Die Verankerung des Skelettmuskels an die Knochen erfolgt über die Sehnen. Skelettmuskeln bestehen aus Bündeln von Muskelfasern, die über Motorneurone mit dem Zentralnervensystem verbunden sind. Zwischen der Plasma- und Basalmembran einer Muskelfaser können sich Muskelstammzellen (Satellitenzellen) befinden. Eine einzelne Muskelfaser beinhaltet wiederum eine Vielzahl von Myofibrillen, die sich über die gesamte Länge des Muskels erstrecken. Die Myofibrillen enthalten in einer hochorganisierten Anordnung dünne Aktin- und dicke Myosinfilamente, welche in funktionellen Einheiten, den Sarkomeren, angeordnet sind. Abbildung modifiziert nach Tajbakhsh, 2009.

1.1.1.1 Fasertypen

Skelettmuskeln zeigen eine breite Diversität, da jeder Muskel an seine spezielle Aufgabe im Körper angepasst ist. Die strukturellen und funktionellen Eigenschaften einzelner Muskeln können sich zudem u.a. auch in Antwort auf körperliches Training (Baumann *et al.*, 1987; Adams *et al.*, 1993; Caiozzo *et al.*, 1996; Egan und Zierath, 2013) verändern bzw. anpassen. Dieser Vorgang wird als Plastizität bezeichnet (Übersicht bei Harridge, 2007).

Mittlerweile ist bekannt, dass die Heterogenität der Skelettmuskulatur in der Vielfalt ihrer Muskelfasern begründet ist. Die Klassifizierung der Fasertypen hat sich im Laufe der letzten 40 Jahre stark weiterentwickelt. Die ursprüngliche Differenzierung basierte auf der unterschiedlichen Färbung der Fasern - man unterschied rote (hoher Myoglobingehalt) und weiße (niedriger Myoglobingehalt) Fasern -, sowie auf deren unterschiedlichen kontraktile Eigenschaften. Diese grundlegende Einteilung entwickelte sich auf Basis der immunhistochemischen Detektion spezifischer metabolischer Enzyme weiter. Danach werden die Muskelfasern in schnelle glykolytische (FG, *fast glykolytic*), schnelle oxidative glykolytische (FOG, *fast oxidative glykolytic*) und langsame oxidative Fasern (SO, *slow oxidative*) unterteilt (Barnard *et al.*, 1971; Peter *et al.*, 1972). Eine weitere Klassifizierung beruht auf der charakteristischen Myosin-ATPase-Aktivität der jeweiligen Fasern (Guth und Samaha, 1969; Brooke und Kaiser, 1970; Staron und Pette, 1986; Gorza, 1990), wobei sich die Skelettmuskelfasern von Säugetieren in Typ I, Typ IIA und Typ IIX (Reihenfolge geordnet nach zunehmender Kontraktionsgeschwindigkeit) klassifizieren lassen. Vornehmlich in Nagetieren kann auch noch eine weitere Fasertyp, Typ IIB, detektiert werden. Da die Myosin-ATPase-Aktivität von den schweren Myosinketten (*Myosin-Heavy-Chain*; MyHC) bestimmt wird, können den Fasern die definierten MyHC-Isoformen – MyHC I, MyHC IIA, MyHC IIX und MyHC IIB - zugeordnet werden (Lutz *et al.*, 1979; Staron und Pette, 1986; Gorza, 1990). Zusätzlich zu den vier adulten MyHC-Isoformen gibt es darüber hinaus noch eine embryonale (MyHC-emb) und eine neonatale (MyHC-neo) Isoform, die gewöhnlich in Skelettmuskelfasern während der embryonalen und der frühen postnatalen Entwicklung in Säugetieren gebildet werden. Aufgrund der Tatsache, dass Myosin zum einen als molekulares Motorprotein eine zentrale Rolle zukommt und zum anderen die bekannten MyHC-Isoformen charakteristisch für die verschiedenen Fasertypen sind, werden heutzutage Fasertypen vor allem auf Grundlage der MyHC-Isoformen klassifiziert. Einzelfasern bestehen jedoch nicht immer nur aus einer MyHC-Isoform, sondern können auch mehrere unterschiedliche MyHC-Isoformen enthalten. Solche Fasern werden als Hybridfasern bezeichnet und werden überwiegend während Muskelfaserumwandlungen gefunden (Wada *et al.*, 1996; Brummer *et al.*, 2013). Die Transformation der MyHC-Isoformen stellt einen der wichtigsten Mechanismen bei der muskulären Anpassung an veränderte Bedingungen dar. So kommt es beispielsweise bei Ausdauertraining zu einer vermehrten Expression von langsamem MyHC I. Krafttraining führt dagegen zur Zunahme der schnellen oxidativen Isoform MyHC IIA (Übersicht bei Pette und Staron, 1997, 2000, 2001; Harridge, 2007). Obwohl der entsprechende Mechanismus noch stark diskutiert wird und klare Beweise fehlen (Booth *et al.*, 2010), geht man davon aus, dass dabei die schweren Myosinketten in einer geordneten Reihenfolge ausgetauscht werden, so dass schnelle Muskelfasern in langsamere umgewandelt werden oder umgekehrt. Dabei wird vor allem der „schnell-zu-langsam“ Übergang kontrovers diskutiert, da es in vielen untersuchten Studien mit unterschiedlichen Trainingssituationen, speziell auch bei solchen, bei

denen vor allem die Schnellkraft trainiert wird, zu einer Abnahme von MyHC IIX kommt (Pette und Staron, 1997; Häkkinen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2003).

Eine Auflistung aller genannten adulten MyHC-Isoformen im Skelettmuskel mit der Zuordnung zu Fasern und deren charakteristischen Eigenschaften ist in Tabelle 1 dargestellt (Übersicht bei Scott *et al.*, 2001; Schiaffino and Reggiani, 2011; Greising *et al.*, 2012; Egan und Zierath, 2013).

Fasertyp	I	IIA	IIX	IIB
Vorkommen	Mensch/ Nagetier	Mensch/ Nagetier	Mensch/ Nagetier	Nagetier
MyHC-Isoform	I	Ila	IIX	IIB
Kontraktionstyp	langsam	schnell	schnell	sehr schnell
Ermüdbarkeit	niedrig	mittel	hoch	sehr hoch
Myoglobingehalt	hoch	mittel	gering	gering
Kapillardichte	hoch	mittel	gering	gering
Mitochondriendichte	hoch	mittel	gering	gering
Oxidative Kapazität	hoch	hoch	mittel	niedrig
Glykolytische Kapazität	niedrig	mittel	hoch	hoch
Fettstoffwechsel	hoch	mittel	niedrig	niedrig

Tabelle 1: Metabolische, kontraktile und morphologische Charakteristika der verschiedenen Fasertypen im Skelettmuskel.

1.1.2 Molekulare und zelluläre Grundlagen der Myogenese

Unabhängig von den aufgeführten spezifischen Eigenschaften der einzelnen Muskelfasern haben alle Skelettmuskelzellen ihren Ursprung im Mesoderm. Die Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen zur fertigen Skelettmuskelfaser wird als Myogenese bezeichnet und kann in zahlreiche unterschiedliche Phasen unterteilt werden (Tajbakhsh, 2009). Der gesamte Prozess ist hochkomplex; es bedarf einer temporal und spatial hierarchisch genau koordinierten Interaktion vieler verschiedener Transkriptionsfaktoren, regulatorischer RNA-Moleküle, Chromatin-modellierender Faktoren sowie verschiedener Mediatoren von Signaltransduktionsprozessen. Signalmoleküle aus dem umliegenden Gewebe, wie Sonic hedgehog (Shh) und Mitglieder der Wnt Familie, können dabei die Expression von Genen, die für verschiedene Regulationsfaktoren kodieren, induzieren (Übersicht bei Brand-Saberi, 2005; Bryson-Richardson und Currie, 2008; von Maltzahn *et al.*, 2012). Weiterhin wird die Myogenese maßgeblich durch den Notch- und den Bmp-Signalweg kontrolliert (Übersicht bei Buas und Kadesch, 2010; Sartori *et al.*, 2014). Als essentielle Transkriptionsfaktoren hat sich die Gruppe der myogenen Regulationsfaktoren (*myogenic regulatory factors* = MRFs), welche sich aus

den basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Proteinen MyoD, Myf5, MRF4 und Myogenin zusammensetzt, herauskristallisiert (Weintraub, 1993; Olson und Klein, 1994). Diese können dabei durch ihr namensgebendes Strukturmotiv an DNA binden. Hervorzuheben sind des Weiteren die Mef2-Proteine, die zur Familie der MADS-Box-Proteine gehören und als Homo- oder Heterodimere an DNA binden können (Yu *et al.*, 1992; Shore und Sharrocks, 1995; Olson *et al.* 1995). Zudem stellen die *paired box*-Transkriptionsfaktoren PAX3 und PAX7 wichtige Regulatoren dar (Buckingham und Relaix, 2007). Diese sind an der frühen Muskelentwicklung, während der die mesenchymalen, pluripotenten Zellen in ihrem Entwicklungspotential sukzessive eingeschränkt werden, ursächlich beteiligt. Dieser Vorgang wird als Determinierung bezeichnet. Die Präsenz von PAX3 und PAX7 in myogenen Vorläuferzellen fördert durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Myf5 und MyoD die Determinierung zu Myoblasten. Am Ende der Determinierung haben sich aus myogenen Vorläuferzellen irreversibel spezifizierte, aber noch nicht differenzierte, proliferierende und migrierende Myoblasten entwickelt. Unter dem Einfluss des myogenen Regulationsfaktors Myogenin wird anschließend die Differenzierung der Myoblasten zu Myozyten vorangetrieben. Die Differenzierung der Myoblasten geht dabei mit dem Ende ihrer Proliferationsfähigkeit einher und führt zur Expression muskelspezifischer Gene. Die differenzierten Myoblasten fusionieren schließlich miteinander zu langgestreckten, vielkernigen Zellen, den sogenannten Synzytien. Im Anschluss bilden sich aus diesen primären Muskelfasern durch Fusion mit weiteren Myoblasten die sekundären Fasern, die letztendlich zu großen Muskelfasern reifen. An dieser Maturation ist maßgeblich der myogene Regulationsfaktor MRF4 beteiligt. Neben den erwähnten Transkriptionsfaktoren sind in späteren Entwicklungsphasen eine Vielzahl weiterer Faktoren an der Regulation der Myogenese beteiligt, wie z.B. verschiedene Wachstumsfaktoren. Erwähnenswert ist schließlich, dass nicht alle Muskelvorläuferzellen den eben beschriebenen Prozess durchlaufen. Einige verbleiben als Stammzellreservoir unter der Basallamina von Muskelfasern. Diese als Satellitenzellen bezeichnete Zellpopulation besitzt die Fähigkeit, zu einem späteren Zeitpunkt erneut zu proliferieren und zu neuen Muskelfasern zu differenzieren. Sie gewährleistet somit die Regenerationsfähigkeit der Skelettmuskulatur (Übersicht bei Bentzinger *et al.*, 2012; Relaix und Zammit, 2012; Yin *et al.*, 2013).

1.1.2.1 *In vitro*-Modellsysteme zur Untersuchung der Myoblastendifferenzierung

Zur Generierung von funktionalen Muskelfasern *in vitro* können verschiedene Myoblastenzelllinien und auch primäre Myoblasten dienen. Dabei entstehen nach Induktion der Differenzierung aus *in vitro* kultivierten und expandierten Myoblasten durch Fusion und Reifung vielkernige Muskelfasern. Verschiedene Stimuli sind dabei beschrieben worden, die diesen Vorgang *in vitro* steuern können. Bei immortalisierten Zelllinien, wie der C2C12-Zelllinie, und bei primären, nicht expandierten Zellen, kann

das Differenzierungsprogramm durch eine Reduktion des Serumanteils im Kulturmedium von normalerweise 10-20% fötalen Kälberserum auf 2% Pferdeserum gestartet werden. Die in diesen Zellen bei der Differenzierung ablaufenden Vorgänge spiegeln dabei mechanistisch in etwa die *in vivo* ablaufenden Prozesse wider. Als *in vitro*-Modellsystem wurde in der vorliegenden Arbeit vor allem die skelettale Myoblastenzelllinie C2C12, welche ursprünglich aus einem Maus-Inzuchtstamm isoliert wurde, verwendet (Yaffe und Saxel, 1977). Während der myogenen Differenzierung fusionieren C2C12-Zellen und bilden nach etwa vier Tagen kontraktile Myotuben (Blau *et al.*, 1985). Im Vergleich zu Primärkulturen von Muskelzellen differenzieren C2C12-Zellen aber langsamer und nicht zu 100% zu Myozyten.

1.1.2.2 Myofibrillogenese

Während der Myogenese verändert sich nicht nur die äußere Zellmorphologie, sondern auch die Organisation des Zytoskeletts. Dieser Vorgang, der sehr ähnlich im Skelett- und Herzmuskel verläuft, wird als Myofibrillogenese bezeichnet. Die Myofibrillogenese führt letztendlich zur Entstehung der oben beschriebenen hochgeordneten, zur Kontraktion befähigten Sarkomerstruktur. Das Sarkomer stellt dabei auch einen sehr dynamischen Multiproteinkomplex dar, der sich als Antwort auf mechanische und metabolische Einflüsse, im Speziellen nach Training und Verletzung, adaptieren kann. An dem Prozess der Myofibrillogenese sind eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine beteiligt, die für die exakte Koordination von Faltung und Zusammenlagerung sowie dem Abbau der fibrillären Proteine verantwortlich sind (Übersicht bei Willis *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008). Dabei lassen sich die Proteine, die gemeinsam ein Qualitätskontrollsystem bilden, hauptsächlich zwei Gruppen zuordnen: (1.) den molekularen Chaperonen und (2.) dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Molekulare Chaperone sind in der Lage, entfaltete Proteine zu erkennen, zu binden, und auf diese Weise vor Aggregation zu schützen. Als wichtige Chaperone im Zusammenhang mit der Faltung und dem Zusammenbau von Aktin sind die synergistisch wirkenden Proteine Prefoldin und TCP-1 zu nennen. An der Assemblierung von Myosin sind zahlreiche Chaperone beteiligt, hervorzuheben sind dabei vor allem UNC45 und Hsp90. UNC45 agiert sowohl als Chaperon für Myosin als auch als Ko-Chaperon für Hsp90. Das stark konservierte Hitzeschockprotein Hsp90 ist verantwortlich für die Faltung und Aktivierung vieler Substratproteine. Die Hsp90-abhängige Faltung von Myosin wird dabei durch UNC45 aktiviert (Liu *et al.*, 2008). Erst kürzlich konnte die mechanische Funktion von UNC45 genauer gezeigt werden: Gazda *et al.*, 2013, beschreiben, dass UNC45 dabei wie ein zelluläres Fließband funktioniert und Myosin periodisch anordnet. Diese Myosin-Anordnung wird interessanterweise auch im vollständig ausgebildeten Muskelfilament beibehalten, so dass angenommen wird, dass UNC45 nicht nur als Chaperon, sondern auch als eine Art Gerüsthalter dient, der die spätere Struktur

bestimmt (Gazda *et al.*, 2013). Die Regulation von UNC45 selbst unterliegt dem UPS und wird durch die Ubiquitin-Ligasen UFD-2 und CHIP vermittelt. Zahlreiche weitere publizierte Daten, wie beispielsweise auch die Regulation des kleinen Hitzeschockproteins α Bcrystallin, welches u.a. als Faltungshelfer für das intermediäre Filament Desmin dient, durch ein Protein namens FBX4, das Ubiquitin-Ligase-Aktivität aufweist, können den direkten und genau gesteuerten *Crosstalk* zwischen Chaperonen und dem UPS belegen. Das UPS erkennt und kennzeichnet spezifische Proteine durch enzymatische Anheftung von mehreren Ubiquitin-Proteinen zum Abbau durch das 26S Proteasom. Die Spezifität wird dabei durch die Ubiquitin-Ligasen vermittelt. Zahlreiche Ubiquitin-Ligasen die eine Rolle bei der Myofibrillogenese spielen, wurden bereits beschrieben. Dabei sind neben dem bereits erwähnten CHIP-Protein vor allem die Ligasen aus der MuRF-Familie sowie Atrogin-1 und MDM2 zu nennen.

Obwohl der Prozess der Myofibrillogenese über die letzten 100 Jahre intensiv untersucht wurde, sind nach wie vor noch viele Details unklar. Es existieren mehrere Modelle, zusammengefasst in Sanger *et al.*, 2005, mit deren Hilfe die Entstehung einer Myofibrille beschrieben werden kann. Ein ganz neu beschriebenes Modell für die Muskelfibrillenbildung basiert auf einer selbständigen und gleichzeitigen Anordnung der einzelnen Sarkomerbausteine, die spannungsabhängig gesteuert wird (Weitkunat *et al.*, 2014).

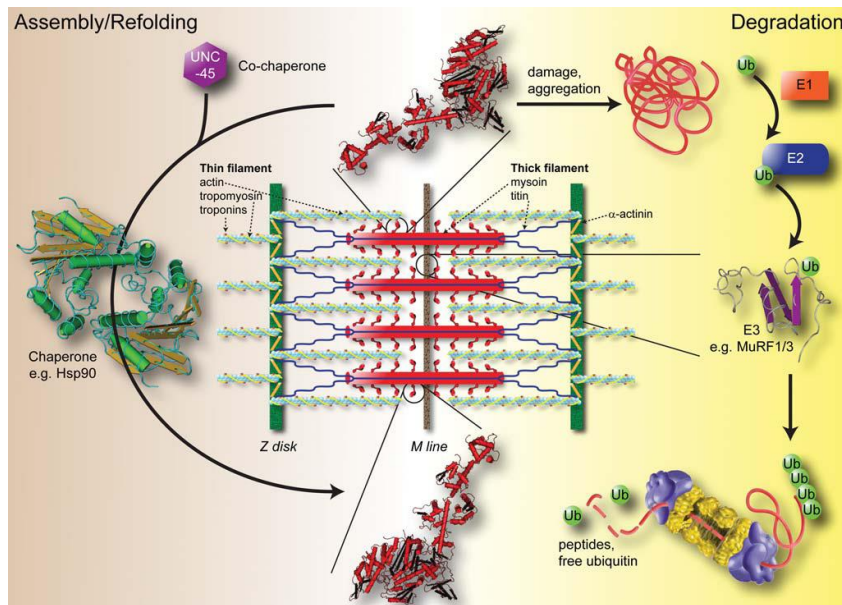


Abbildung 2: Darstellung des Zusammenwirkens von Sarkomer-spezifischen Chaperonen und Ubiquitin-Ligasen.

Molekulare Chaperone und das UPS bilden gemeinsam ein Qualitätskontrollsystem, welches essentiell für die korrekte Anordnung und den Abbau von Sarkomerproteinen im Verlauf der Myofibrillogenese ist. Die Abbildung illustriert beispielhaft, dass an der korrekten Faltung von Myosin die beiden Ko-Chaperone UNC45 und Hsp90 beteiligt sind, während der Abbau durch das 26S Proteasom mit Hilfe des UPS, genauer durch die beiden Ubiquitin-Ligasen MuRF1 und MuRF3, bewerkstelligt wird. Abbildung nach Willis *et al.*, 2009.

1.2 Rhabdomyosarkome

Rhabdomyosarkome stellen eine Gruppe von Weichteilsarkomen dar, die vorwiegend im Kindes- und Jugendalter auftreten. Jährlich entwickeln vier bis sieben von einer Million Kindern unter 15 Jahren ein Rhabdomyosarkom. Rhabdomyosarkome gehören daher bis zum Jugendalter zu den häufigsten bösartigen Tumortypen und sind die am häufigsten auftretenden Weichgewebstumore in dieser Altersgruppe (Paulino und Okcu, 2008). Wie alle anderen Sarkom-Arten sind sie mesenchymalen Ursprungs, grenzen sich von anderen Sarkomen aber dadurch ab, dass sie auf partiell differenziertes, pluripotentes embryonales Skelettmuskelgewebe zurückzuführen sind (Merlino und Helman, 1999; Hayes-Jordan und Andrassy, 2009). Rhabdomyosarkome sind nicht auf die Skelettmuskulatur beschränkt, sondern können prinzipiell überall dort entstehen, wo mesenchymales Gewebe vorhanden ist (Liu *et al.*, 2007a). Aufgrund ihrer Morphologie, als auch dadurch, dass sie myogene Differenzierungsmarker wie MyoD, Myogenin und Desmin exprimieren (Davicioni *et al.*, 2009), ähneln Rhabdomyosarkomzellen unreifen Muskelzellen. Allerdings ist der Differenzierungsgrad der Zellen gering; sie verharren auf einer frühen Stufe des myogenen Differenzierungsprogramms (Merlino *et al.*, 1999; Astolfi *et al.*, 2001; Keller und Guttridge, 2013).

1.2.1 Klassifikation

In den häufigsten Fällen wird das Rhabdomyosarkom, basierend auf internationalen Klassifizierungskriterien, in die Subtypen embryonal, alveolär und pleomorph eingeteilt, wobei der zuletzt genannte Subtyp nur zu einem Prozent im Kindesalter vorkommt (Imbach, 2004). Die Tumore der drei Subtypen weisen unter anderem Unterschiede in Bezug auf die Lokalisation und die Häufigkeit ihres Auftretens in verschiedenen Altersstufen auf und sind, zumindest zum Teil, auf unterschiedliche genetische Veränderungen zurückzuführen (Übersicht bei Xia *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2012; Parham und Barr, 2013).

Embryonale Rhabdomyosarkome machen mit einem Anteil von rund 80% der diagnostizierten Tumore den größten Teil der Rhabdomyosarkome aus. Sie treten meist bis zum 10. Lebensjahr auf und manifestieren sich häufig an Kopf und Hals, im Urogenitaltrakt oder im Bereich der Augenhöhle. Beim embryonalen Rhabdomyosarkom kommt es häufig zu einem Allelverlust innerhalb der chromosomalen Region 11p15.5, welche den *IGF2* (*Insulin growth factor 2*)-Lokus betrifft. Die dadurch hervorgerufene Überexpression des für den Wachstumsfaktor *IGF2* kodierenden Gens erhöht dabei die Tumorigenität der Zellen (El Badry *et al.*, 1990; Loh *et al.*, 1992).

Das alveoläre Rhabdomyosarkom stellt mit circa 20% die zweithäufigste Subgruppe dar. Dieses tritt meist im Jugendalter auf. Bei diesem Typus sind die Tumore in der Regel an Extremitäten oder am Rumpf lokalisiert. Die Bezeichnung beruht auf der morphologischen Ähnlichkeit der Tumore zu

Lungenalveolen. Kennzeichnend für die Tumore der alveolären Subgruppe sind spezifische, reziproke chromosomale Translokationen, welche man bei 70% aller alveolären Rhabdomyosarkome findet (Barr *et al.*, 1992; Xia *et al.*, 2002). Diese führen zu einem Fusionsprodukt aus einem Pax-Transkriptionsfaktor, und dem *FKHR* (*Forkhead in rhabdomyosarcoma; FoxO1*)-Gen auf Chromosom 13. Die häufigste Translokation ist dabei die zwischen PAX3 und FKHR (ca. 50%). Seltener kommt dagegen die PAX7-FKHR-Translokation (ca. 20%) vor (Barr, 2001; Sorensen *et al.*, 2002). Die aus der Fusion hervorgegangenen chimären Fusionsproteine weisen im Vergleich zu den natürlich vorkommenden Proteinen PAX3 und PAX7 eine stärkere DNA-Bindungs- und transkriptionelle Aktivatorfunktion in Bezug auf PAX3- und PAX7-Zielgene auf und sind dadurch zumindest zum Teil an der Tumorentstehung beteiligt (Fredericks *et al.*, 1995; Xia *et al.*, 2002; De Giovanni *et al.*, 2009). Zusätzlich zu den beschriebenen Mutationen wurden sowohl beim embryonalen als auch beim alveolären Rhabdomyosarkom genetische Abweichungen in einer Vielzahl von anderen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen nachgewiesen, welche über unterschiedliche Mechanismen an der Tumorentstehung beteiligt sind (Übersicht bei Xia *et al.*, 2002; Durbin *et al.*, 2009; Lanzano *et al.*, 2014).

Auch wenn bereits spezifische und charakteristische genetische Veränderungen, welche häufig in Rhabdomyosarkomzellen auftreten und die Tumorentstehung begünstigen, bekannt sind, so ist über den genauen Ursprung der Rhabdomyosarkomzellen sowie über Risikofaktoren dagegen bisher wenig bekannt. So ist beispielsweise noch unbekannt, ob auch andere Faktoren, wie zum Beispiel eine aberrante Lokalisation von Muskelvorläuferzellen, ursächlich beteiligt sein könnten (Parham und Ellison, 2006).

Obwohl sich die Gesamt-5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit Rhabdomyosarkomen in den letzten 40 Jahren enorm verbessert hat, gibt es deutliche Unterschiede bezüglich der Prognose zwischen den einzelnen Rhabdomyosarkom-Subtypen. Die Chance auf Heilung ist für Patienten mit alveolärem Rhabdomyosarkom deutlich schlechter als für die mit einem Tumor des embryonalen Subtyps, da alveoläre Rhabdomyosarkome tendenziell frühzeitig und großräumig metastasieren. Embryonale Rhabdomyosarkome zeigen dagegen meist nur eine geringe Metastasierungstendenz. Auffällig ist hierbei zudem, dass ein höherer Differenzierungsstatus von Rhabdomyosarkomzellen häufig mit einem Verlust der Metastasierungsfähigkeit einhergeht (Lollini *et al.*, 1991). Bei der prognostischen Einschätzung spielen zudem weitere Faktoren, wie die Lokalisation des Primärtumors und das Alter des Patienten bei der Diagnosestellung eine Rolle. Der Erfolg vieler Therapien, bei denen idealerweise die chirurgische Komplettresektion zur Anwendung kommt und die zumeist eine Kombination aus Strahlen- und Polychemotherapie beinhalten, wird oft auch durch Chemotherapie-Resistenzen der Rhabdomyosarkomzellen verhindert. Daher wird nach wie vor intensiv geforscht, um spezifischere, effektivere und weniger toxische Behandlungsformen zu entwickeln.

1.2.2 *In vitro*-Modellsysteme zur Untersuchung des Rhabdomyosarkoms

Rhabdomyosarkomzellen können wie nichttransformierte Myoblasten *in vitro* expandiert und in unterschiedlichem Ausmaß auch differenziert werden. In der vorliegenden Studie wurde mit den embryonalen Rhabdomyosarkomzelllinien RD/12, RD/18 und CCA, sowie mit der alveolären Zelllinie Rh30 gearbeitet. Die Charakteristika der vier Zelllinien sind in einer Tabelle in Manuskript 5 zusammengefasst.

Bei RD/12- und RD/18-Zellen handelt es sich um Subklone der gleichen Zelllinie, die ursprünglich einem humanen embryonalen Rhabdomyosarkom entnommen wurden. Die beiden Subklone unterscheiden sich vorwiegend in Bezug auf ihr unterschiedliches Differenzierungsverhalten (Lollini *et al.* 1991; Astolfi *et al.*, 2001): RD/12-Zellen zeigen morphologisch kaum Differenzierungsanzeichen, während RD/18-Zellen sogar fusionieren und mehrkernige, myotubenähnliche Strukturen bilden. Auch die Expressionsmuster myogener Differenzierungsmarker spiegeln diese Unterschiede wider: Von RD/12-Zellen werden während des Differenzierungsvorganges nur solche Gene exprimiert, die typisch für mesenchymale Zellen oder mit der frühen Determinierung assoziiert sind. Bei RD/18-Zellen kann dagegen auch die Expression von Genen, die im Zusammenhang mit der myogenen Differenzierung stehen, nachgewiesen werden. Beide Subklone unterscheiden sich nicht nur in Bezug auf ihr Differenzierungspotential, sondern auch in Bezug auf ihre Malignität: RD/18-Zellen weisen ein deutlich geringes Potenzial zur Metastasenbildung auf als RD/12-Zellen. CCA-Zellen sind wie die zuvor beschriebenen RD12- und RD18-Zellen humane embryonale Rhabdomyosarkomzellen. Ähnlich wie RD12-Zellen sind sie nicht in der Lage, mehrkernige Strukturen auszubilden, exprimieren ebenfalls nur sehr frühe myogene Differenzierungsmarker und besitzen die Fähigkeit, Metastasen zu bilden (De Giovanni *et al.*, 1989).

Rh30-Zellen gehören im Gegensatz zu den anderen in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien dem aggressiveren alveolären Subtyp an (Douglass *et al.*, 1987). Daher besitzt diese Zelllinie eine relativ starke Metastasierungstendenz. Dennoch sind diese Zellen im Vergleich zu RD/12- und CCA-Zellen durch ein relativ hohes Differenzierungspotential gekennzeichnet: Wie RD18-Zellen fusionieren Rh30-Zellen. Sie bilden dabei vielkernige, myotubenähnliche Strukturen und exprimieren auch spätere myogene Differenzierungsmarker (Thulasi *et al.*, 1996).

1.3 skNAC und Smyd1

Bei skNAC und Smyd1 handelt es sich um Herz- und Skelettmuskel-spezifische Proteine, die etwa zeitnah von Gottlieb *et al.* (1995, 1997) und Yotov und St-Arnaud (1996a) entdeckt wurden und

dessen Interaktion in Muskelzellen einige Jahre später beschrieben wurde. In den nachfolgenden Abschnitten werden die im Vorfeld dieser Arbeit bereits ermittelten Forschungsergebnisse über die Entdeckung, Regulation, Expression sowie Funktionen der beiden Proteine zusammenfassend dargestellt.

1.3.1 NAC

NAC ist eine Abkürzung für *nascent polypeptide associated complex*. Dieses Protein wurde 1994 von der Gruppe um Martin Wiedmann identifiziert. Der Name des Proteins steht mit der Tatsache in Verbindung, dass NAC an neu synthetisierte und gerade aus dem Ribosom austretende Polypeptidketten binden kann. Es handelt sich bei NAC um einen hochkonservierten, heterodimeren Proteinkomplex, der in Eukaryoten aus einer 33kDa α - und einer 21kDa β -Untereinheit besteht und vermutlich in allen Zelltypen und Geweben vorkommt (Übersicht bei Kogan und Gvozdev, 2013).

Wiedmann *et al.* postulierten, dass NAC als ribosomenassoziiertes Faktor neben SRP (*Signal recognition particle*) als zweiter zytosolischer Faktor für die korrekte Zielsteuerung der Proteine zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) notwendig ist (Wiedmann *et al.*, 1994; Lauring *et al.*, 1995b,c). Weitere Studien konnten ebenfalls belegen, dass beide Untereinheiten des heterodimeren NAC-Komplex mit der wachsenden Proteinkette schon ab einer Kettenlänge von 17aa quervernetzt werden können (Beatrix *et al.*, 2000; Plath and Rapoport, 2000; Raden and Gilmore, 1998; Reimann *et al.*, 1999; Lauring *et al.*, 1995a,b; Powers and Walter, 1996; Moeller *et al.*, 1998; Wiedmann and Prehn, 1999). Für die spezifische Bindung ans Ribosom benötigt NAC die β -Untereinheit. Diese ist für sich in der Lage, spezifisch ans Ribosom zu binden, während α NAC keine Affinität zu Ribosomen zeigt (Beatrix *et al.*, 2000).

NAC ist dabei wahrscheinlich der erste Faktor, der die wachsende Polypeptidkette kontaktiert (Wiedmann *et al.*, 1994; Gautschi *et al.*, 2003; Raue *et al.*, 2007; Berndt *et al.*, 2009). Eine Vielzahl an weiteren Studien folgte, um die genaue Interaktion mit den Ribosomen, das Wechselspiel mit SRP, sowie die genaue Funktion von NAC in Translokations-, Translations- und Faltungsprozessen zu untersuchen (Powers and Walter, 1996; Raden and Gilmore, 1998; Wiedmann and Prehn, 1999; Bukau *et al.*, 2000; Wegrzyn and Deuerling, 2005; Koplín *et al.*, 2010; Pech *et al.*, 2010; del Alamo *et al.*, 2011; Arsenovic *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Preissler and Deuerling, 2012). In einer der neuesten Veröffentlichungen wird NAC als ein wichtiger Regulator der Proteostase beschrieben (Kirstein-Miles *et al.*, 2013).

Unter physiologischen Bedingungen liegt der Hauptteil von NAC als zytosolischer heterodimerer Komplex in einer Konzentration von 3-10 μ M in Säugetieren vor (Moeller *et al.*, 1998; Beatrix *et al.*, 2003). Die monomeren Untereinheiten kommen in sehr geringer Konzentration auch individuell in

den Zellen vor (Rospert *et al.*, 2002). Ihnen werden weitere Funktionen, insbesondere in der Genregulation, zugeschrieben. Hierauf wird in den nächsten beiden Abschnitten näher eingegangen.

1.3.1.1 α NAC

Erste Anhaltspunkte dafür, dass das 33kDa große α NAC-Protein neben seiner Funktion bei der Translation auch als transkriptioneller Regulator fungiert, wurden von der Arbeitsgruppe um St-Arnaud präsentiert (Yotov und St-Arnaud, 1996a,b,c; Moreau *et al.*, 1998; Yotov *et al.*, 1998). Die Arbeitsgruppe postulierte dabei, dass α NAC als ein Knochen-spezifischer transkriptioneller Koaktivator wirken kann. So konnte zum einen eine Interaktion zwischen α NAC und dem Transkriptions-Aktivator c-Jun sowie dem TATA Box-Bindungs-Protein (TBP) festgestellt werden (Moreau *et al.*, 1998; Yotov *et al.*, 1998). Zum anderen konnte eine spezifische Bindung von α NAC an DNA nachgewiesen werden (Yotov *et al.*, 1996a). Gegen eine sequenzspezifische α NAC-Bindung an DNA sprechen aber die Ergebnisse einer anderen Studie, die nachweisen konnte, dass die Bindung unabhängig von der DNA-Sequenz erfolgt und dass auch RNA, z.B. rRNA oder tRNA, an α NAC bindet (Beatrix *et al.*, 2000). Viele weitere Studien der Gruppe um St-Arnaud folgten, wobei vor allem die Funktion des α NAC-Proteins als transkriptioneller Koaktivator in Osteoblasten untersucht wurde (St-Arnaud and Quèlo, 1998; Quèlo *et al.*, 2002; Akhouayri *et al.*, 2005; Akhouayri and St-Arnaud, 2007; Meury *et al.*, 2010). Kürzlich veröffentlichte Arbeiten derselben Gruppe zeigen zudem, dass α NAC mit Histon-Deacetylasen interagiert und auch selbst posttranslationalen Modifikationen, wie Phosphorylierung und Sumoylierung, unterliegt, welche sowohl die subzelluläre Lokalisation des Proteins als auch seine transkriptionellen Eigenschaften beeinflussen (Quèlo *et al.*, 2004a,b; Quèlo *et al.*, 2005; Jafarov *et al.*, 2012; Hekmatnejad *et al.*, 2014).

1.3.1.2 β NAC

Die β -Untereinheit des heterodimeren NAC wurde bereits vor der Identifikation des α/β -NAC-Komplexes (Wiedmann *et al.*, 1994) aus HeLa Zellen isoliert (Zheng *et al.*, 1987) und ursprünglich als BTF3 (Basic transcription factor 3) bezeichnet. Das *BTF3*-Gen kodiert für zwei Spleissvarianten: *BTF3a* (β 2-NAC) und das am N-Terminus um 44 Aminosäuren verkürzte *BTF3b* (β 1-NAC) (Zheng *et al.*, 1990; Kanno *et al.*, 1992). Beide Spleissvarianten gelten als evolutionär hochkonserviert und können stabile Komplexe mit α NAC bilden, wobei der α/β 2 Komplex bislang noch nicht weiter *in vitro* charakterisiert wurde. Zunächst wurde β NAC als Faktor beschrieben, der selbst nicht an DNA binden kann, jedoch einen Komplex mit RNA-Polymerase II bildet (Zheng *et al.*, 1987). Es wurde daher angenommen, dass er die RNA Polymerase II-abhängige Gentranskription initiieren kann (Zheng *et al.*, 1987; Zheng *et al.*,

1990). Spätere Studien widersprechen dieser Annahme und schreiben der Interaktion zwischen β NAC und der RNA Polymerase II keine Signifikanz zu (Flores *et al.*, 1992). In Hefe konnte aber etwa zeitgleich gezeigt werden, dass EGD1, das Hefehomolog zu β NAC, eine hohe Affinität zum Transkriptionsfaktor GAL4 besitzt (Parthun *et al.*, 1992). *In vivo*-Studien an Mäusen, Fadenwürmern und Fruchtfliegen verdeutlichen die essenzielle Bedeutung von β NAC in höheren Eukaryoten (Deng und Behringer, 1995; Markesich *et al.*, 2000; Bloss *et al.*, 2003). Dort führten Mutationen des β NAC-Gens zu embryonal letalen Phänotypen.

1.3.2 Entdeckung von skNAC

1996, zwei Jahre nach der Entdeckung von NAC, wurde von Yotov und St-Arnaud ein weiteres Transkript des α NAC-Gens beschrieben. Dieses 7kb große Transkript konnte ausschließlich im Herz- und Skelettmuskel detektiert werden. Mithilfe von *Immuno-Blot-Analysen* konnten die Autoren nachweisen, dass dieses deutlich längere Transkript für ein 220kDa großes Protein, eine Isoform von α NAC, kodiert. Aufgrund des spezifischen Vorkommens im quergestreiften Muskel wurde es als skNAC (*skeletal and heart muscle-specific variant of nascent polypeptide-associated complex*) bezeichnet. An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass eigentlich keine Gen-Bezeichnung für skNAC existiert, sondern, dass skNAC korrekterweise durch das *Naca*-Gen kodiert wird. Innerhalb dieser Arbeit wird aber der Einfachheit halber vom skNAC-Gen gesprochen.

1.3.2.1 Struktur von skNAC

Die Klonierung und anschließende Sequenzierung der 7kb langen skNAC-cDNA zeigte, dass das skNAC-Transkript eine Spleissvariante des α NAC-Transkripts darstellt (Yotov and St-Arnaud, 1996a). Diese entsteht durch differentielles Einspleissen eines mit 6kb sehr großen Exons zwischen die α NAC-spezifischen Exons 2 und 3. Die ersten 23 und die letzten 192 Aminosäuren des skNAC-Proteins sind dabei identisch mit der α NAC-Isoform. Das eingespleisste Exon 3 kodiert für eine prolinreiche Domäne, welche keine signifikanten Homologien zu bekannten Proteinen aufweist. Mithilfe von bioinformatischen Datenbanken wurden die Struktur und die Expression des skNAC-Gens in verschiedenen Organismen untersucht (Li *et al.*, 2009a). Diese Analysen zeigten, dass die Expression von skNAC, im Gegensatz zum ubiquitär exprimierten α NAC, auf Vertebraten beschränkt zu sein scheint. Zudem konnte ein skNAC-Transkript nicht bei allen niederen Vertebraten identifiziert werden. So kommt skNAC beim Zebrafisch, nicht aber in der Fruchtfliege vor. Sowohl die Länge, als auch die eigentliche Sequenz des skNAC-spezifischen Exons variieren zudem stark zwischen den verschiedenen Arten mit der Tendenz, dass höher entwickelten Vertebraten eine längere Spleissvariante besitzen. So

besitzt Exon 3 in Säugetieren etwa eine Größe von 6kb, im Zebrafisch dagegen nur 3kb. Im Gegensatz dazu scheinen Länge und Sequenz der α NAC-Exons im Laufe der Evolution hoch konserviert worden zu sein. Diese zeigen beispielsweise zwischen Maus und Zebrafisch 96,3% Übereinstimmung. Allen skNAC-Transkriptvarianten der verschiedenen Arten ist aber gemein, dass sie einen hohen Anteil an Prolinresten aufweisen, der zwischen 9% im Tetraodon- und 23% im humanen Protein ausmacht. Zudem scheint die Position der Prolinreste zumindest zwischen Maus und Mensch hoch konserviert zu sein. Schließlich weist die Sequenz von Exon 3 viele repetitive Sequenzen auf, welche oft ein Kennzeichen von prolinreichen Regionen darstellen (Williamson, 1994; Kay *et al.*, 2000). Weitere konservierte Motive innerhalb der repetitiven Elemente konnten jedoch nicht identifiziert werden. Die biologische Signifikanz der prolinreichen Sequenz von skNAC ist bisher unbekannt.

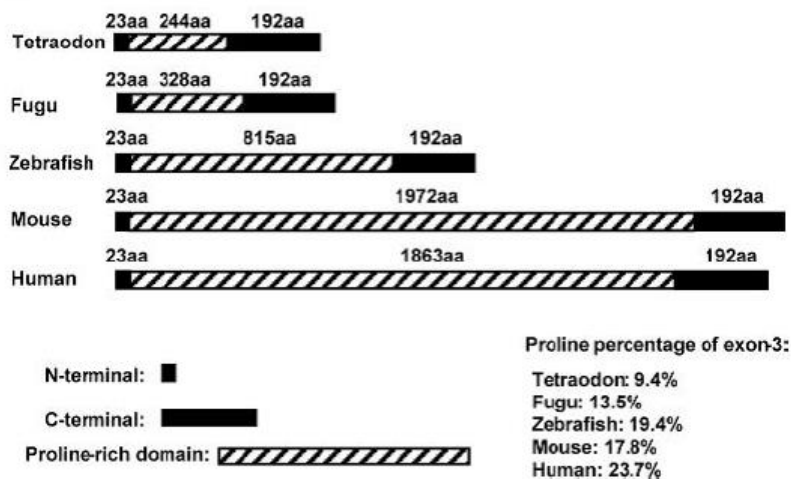


Abbildung 3: Schematische Darstellung des skNAC-Proteins in verschiedenen Organismen.

Illustriert sind die translatierten Aminosäuresequenzen des skNAC-Proteins, die auf Sequenzstudien in verschiedenen Organismen beruhen. Die N- und C-terminalen Sequenzen, die auch in der α NAC-Isoform vorkommen, wurden im Laufe der Evolution hoch konserviert. Dagegen scheint der durch das skNAC-spezifische Exon 3 kodierte Proteinabschnitt, welcher eine sehr prolinreiche Domäne darstellt, drastisch bezüglich Länge und Anteil an Prolinresten zwischen den unterschiedlichen Arten zu variieren. Abbildung nach Li *et al.*, 2009a.

1.3.2.2 Expression des skNAC-Gens

Yotov und St-Arnaud, 1996, konnten nicht nur zeigen, dass das skNAC-Gen ausschließlich in der quergestreiften Muskulatur exprimiert wird, sondern auch, dass nur differenzierte Myozyten, nicht aber undifferenzierte Myoblasten, dieses Gen exprimieren. Genauere Expressionstudien während der Differenzierung von murinen C2C12-Zellen veranschaulichten, dass skNAC-Transkripte ab ca. 24 bis 30 Stunden nach Differenzierungsinduktion nachzuweisen sind (Munz *et al.*, 1999). Ein Expressionsmaximum wird dabei nach ca. 48 Stunden erreicht, danach nimmt die skNAC-Expression wieder ab.

Weitere Expressionsstudien folgten einige Jahre später im Kontext mit dem Herz- und Skelettmuskel-spezifischen Protein Smyd1. Hierauf wird in einem späteren Abschnitt (1.3.3.2) eingegangen.

1.3.2.3 skNAC als Transkriptionsfaktor bzw. transkriptioneller Koaktivator

Vor dem Hintergrund, dass prolinreiche Domänen häufig bei Transkriptionsfaktoren zu finden sind, gingen Yotov und St-Arnaud (1996a) der Frage nach, ob skNAC sequenzspezifisch an DNA binden kann. Mithilfe von *phage display*-Bindungsstudien konnten sie in der Tat eine DNA-Bindungs-Konsensussequenz für skNAC identifizieren, an die aber erstaunlicherweise auch α NAC band. Reporter $genassays$ konnten dann jedoch zeigen, dass nur skNAC die Transkription durch Bindung an dieses Konsensusmotiv initiieren kann. Auf der Suche nach natürlichen Promotoren, die die skNAC-spezifische Bindungssequenz aufweisen, wurde der *Myoglobin*-Promotor identifiziert. Dieser weist drei mögliche skNAC-Bindungsstellen auf. Yotov und St-Arnaud, 1996, konnten zudem mit Hilfe von Reporter $genassays$ demonstrieren, dass skNAC tatsächlich die Transkription vom Myoglobin-Promotor aus aktivieren kann. Das Einführen gezielter Mutationen innerhalb der spezifischen skNAC-Bindungssequenz führte hingegen zum vollständigen Verlust der Expression. Folglich lag die Hypothese nahe, dass skNAC ein Transkriptionsfaktor oder ein Transkriptionsfaktor-assoziiertes Protein sein könnte. Weitere eindeutige Hinweise hierfür konnten aber bisher nicht erbracht werden.

1.3.2.4 Einfluss des skNAC-Proteins auf Muskelentwicklung und -regeneration

Um eine mögliche Funktion von skNAC bei der Myogenese zu untersuchen, wurden das *skNAC*- und das α NAC-Gen in der Maus Myoblasten Zelllinie C2C12 überexprimiert (Yotov und St-Arnaud, 1996a). Diese Untersuchungen zeigten, dass beide Proteine den Differenzierungsverlauf gegensätzlich beeinflussen: Überexpression von α NAC hatte eine Inhibierung der Zellfusion und Differenzierung der C2C12-Zellen zur Folge. Dagegen führte die Überexpression von *skNAC* dazu, dass C2C12-Zellen frühzeitig zu gigantischen, vielkernigen, „hypertrophierten“ Myotuben (*myosacs*) fusionierten. Eine Überexpression von *skNAC* in C3H10T1/2-Fibroblasten hatte in der Studie dagegen keinen Einfluss auf den Phänotyp der Zellen. Diese Daten sprechen dafür, dass skNAC eine Rolle bei der Regulierung des myogenen Differenzierungsprogramms spielt, selbst aber nicht in der Lage ist, dieses zu starten, wie beispielsweise die Mitglieder der Familie der myogenen Regulationsfaktoren (MRFs).

Um erstmals die Funktion von skNAC während der Muskelentwicklung *in vivo* zu untersuchen, schalteten Li *et al.*, 2009a, mithilfe von Morpholino-*antisense*-Oligonukleotiden die Expression von *skNAC* in Zebrafisch-Embryonen aus. Die so generierten *knockdown*-Tiere wiesen starke Herz- und Skelettmuskeldefekte auf, die sich u.a. im Auftreten von Herzödemen, kaum vorhandener

Muskelkontraktion und Paralysen, sowie ungeordneten Myofilamenten äusserten. Die Embryonen starben bereits zwischen Tag 5 und 6. Die Expression von Genen, die für myogene Marker wie *MyoD* und Myogenin kodieren, wurde jedoch durch Ausschalten von skNAC nicht beeinflusst.

Eine neuere *in vivo*-Studie von Park *et al.*, 2010, an skNAC-*knockout*-Mäusen untersuchte den Effekt von skNAC auf die Herz- und Muskelentwicklung von Säugetieren. Viele Mäuseembryonen starben bereits zwischen E10,5 und E12,5. Mäuse, die diese Zeitspanne überlebten, waren aber lebensfähig, vergleichsweise genauso aktiv wie Wildtypmäuse und fruchtbar. Bei der Suche nach den Ursachen für die embryonale Letalität fand die Gruppe zwar bei einigen Tieren eine leicht verzögerte frühe Embryonalentwicklung, bei vielen Tieren erschien jedoch die Entwicklung bis E10,5 normal. Etwa die Hälfte der Embryonen wiesen nach diesem Tag typische Anzeichen einer kardialen Dysfunktion auf, die sich u.a. durch perikardiale Ödeme zeigte. Histologische Analysen unterstützten diesen Befund, indem sie nachweisen konnten, dass skNAC(-/-)-Mäuseembryonen Anzeichen einer ventrikulären Hypoplasie zeigten. Nachfolgende Versuche konnte dabei zeigen, dass die ventrikuläre Hypoplasie durch Proliferationsdefekte der Herzmuskelzellen und nicht durch deren Apoptose verursacht wird. In einem cDNA-*Microarray*, der an Herzen von Mäuseembryonen (E10,5) durchgeführt wurde, wurden im Vergleich zwischen Wildtyp- und *knockout*-Tieren 17 differentiell exprimierte Gene identifiziert. Darunter befanden sich die Gene *Irx4* (*iroquois homeobox protein 4*) und *Shox2* (*short stature homeobox 2*), welche kritische Faktoren für eine normale Physiologie des Herzens darstellen. Interessanterweise konnte auch Myoglobin als eines der am stärksten reprimierten Gene im *Array* nachgewiesen werden, was die von Yotov und St.-Arnaud, 1996, am *in vitro*-System gewonnenen Ergebnisse unterstützt.

Aufgrund der starken Herzdefekte und dem dadurch verursachten frühen Tod der meisten skNAC(-/-)-Embryonen konnten Untersuchungen zur Auswirkung des *knockouts* auf die Skelettmuskulatur nur an den wenigen überlebenden Mäusen durchgeführt werden. Auffällig war, dass die überlebenden skNAC(-/-)-Mäuse bereits etwa eine Woche nach der Geburt im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren deutlich im Wachstum zurückblieben. Diese Größenunterschiede hielten dann bis ins Erwachsenenalter an. Histologische Vergleichsstudien zwischen Kontroll- und skNAC(-/-)-Mäusen zeigten, dass Mäuse ohne skNAC eine geringere Muskelmasse in der Wadenmuskulatur aufwiesen, obwohl die Anzahl der individuellen Myofasern die gleiche war, wie bei den Kontrolltieren. Darüber hinaus kommt es bei Ausschalten von skNAC im Soleusmuskel zu einer veränderten Muskelfasertyp-Verteilung, gekennzeichnet durch einen geringeren Anteil an oxidativen und einen höheren Anteil an glykolytischen Fasern. Getestet wurde dabei das Expressionsniveau der für die MyHC-Isoformen *MyHC I*, *MyHC IIA* und *MyHC IIB* kodierenden Gene. Übereinstimmend zeigte die Skelettmuskulatur der skNAC(-/-)-Mäuse ein verringertes oxidatives Potential, gemessen mittels eines Succinat-Dehydrogenase (SDH)-Aktivitätstests. Aufgrund der Tatsache, dass postnatales Muskelwachstum

hauptsächlich durch Aktivierung von Satellitenzellen erreicht wird, untersuchten Park *et al.* (2010) zusätzlich, ob *skNAC* auch während der Regeneration nach Verletzung eine Rolle spielen könnte. Dafür injizierten sie Cardiotoxin, ein speziell auf das Herz wirkendes Gift, das in diesem Fall zur Nekrose des Muskelgewebes führt, in den Wadenmuskel von zwei- bis dreimonatigen Kontroll- und *skNAC(-/-)*-Mäusen. 12 Tage nach der Injektion zeigten histologische Untersuchungen, dass bei *skNAC(-/-)*-Mäusen die Regeneration signifikant gestört war. Dabei konnte Myonekrose, Infiltrierung von mononukleären Zellen, sowie eine abnormale Fettansammlung beobachtet werden, die auch noch ein Monat nach Verletzung vorhanden waren. Bei Wildtyp-Mäusen waren dagegen zu diesem Zeitpunkt die verletzten Muskeln nicht mehr von den unverletzten zu unterscheiden. Muskelquerschnitte zeigten außerdem, dass zu diesem Zeitpunkt die Fasern in den *skNAC(-/-)*-Mäusen bezüglich ihrer Querschnittsfläche deutlich kleiner waren als bei den Kontrolltieren. Daher gelangten Park und Kollegen zu der Annahme, dass Satellitenzellen in den *skNAC(-/-)*-Mäusen zwar den Regenerationsprozess initiieren, ihn aber nicht vollenden können. Mithilfe von FACS-Analysen isolierten sie daher Satellitenzellen und konnten zeigen, dass kein signifikanter Unterschied bezüglich des Proliferationsverhaltens zwischen den Kontroll- und den *skNAC(-/-)*-Zellen zu beobachten war; jedoch war bei letzteren der Anteil an apoptotischen Zellen höher, was nahelegt, dass *skNAC* für das Überleben von Satellitenzellen wichtig sein könnte. Bereits 1999 konnten Munz *et al.* zudem zeigen, dass *skNAC* auch eine Rolle bei der postnatalen Muskelregeneration zu spielen scheint: Nach kutaner Verwundung von Mäusen konnte eine Induktion von *skNAC* in Skelettmuskelzellen des *panniculus carnosus*, einem Skelettmuskel in der Haut von Nagetieren, nachgewiesen werden. Dabei war eine erhöhte *skNAC*-Expression vor allem in Zellen im Bereich des Wundrandes zu beobachten, die möglicherweise Muskelfasern oder aktivierte Satellitenzellen darstellen. Während *skNAC* bereits 12 Stunden nach Verwundung stark überexprimiert wurde, konnte für *αNAC* nur eine geringe Zunahme und für *βNAC* keine Induktion festgestellt werden. Die frühe und starke Expression von *skNAC* nach Verwundung, sowie die Ergebnisse der Regenerationsstudien von Park *et al.*, 2010, lassen daher vermuten, dass *skNAC* eine wichtige Rolle bei Regenerationsprozessen im quergestreiften Muskel spielt.

1.3.2.5 Einfluss von *skNAC* auf die Myofibrillogenese

Der Einfluss von *skNAC* auf die Myofibrillogenese wurde vor Beginn der vorliegenden Arbeit bisher nur von einer Arbeitsgruppe an Zebrafisch-Embryonen untersucht (Li *et al.*, 2009a). Dabei wurde, wie bereits oben erwähnt, die Expression des *skNAC*-Gens mit Hilfe von Morpholino-*antisense*-Oligonukleotiden gehemmt. Neben den durch *skNAC-knockdown* ausgelösten und zuvor beschriebenen Effekten auf die Herz- und Skelettmuskelentwicklung, zeigten die Embryonen starke

Defekte bezüglich der Organisation der dicken (Myosin-) und der dünnen (Aktin-)Sarkomerfilamente. Immunfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen α -Aktin und MyHC zeigten dabei zerstörte dicke und wenige bis keine dünnen Filamente. Außerdem enthielten die betroffenen Muskelfasern einen großen Kern im Zentrum, welcher als Charakteristikum für unreife Fasern gilt. Dagegen war die Organisation der Z-Scheibe und der M-Bande nicht durch die Ausschaltung der *skNAC*-Expression beeinflusst. Der molekulare Mechanismus, durch den *skNAC* die Myofibrillogenese beeinflusst, ist noch unklar. Li *et al.*, 2009a, stellten die Vermutung an, dass *skNAC* als eine Art Chaperon für Sarkomerproteine fungieren könnte, in Analogie zum α/β NAC-Komplex, welcher ja auch als eine Art Chaperon für naszierende Polypeptidketten wirkt. Die Grundlage dafür bildete die Beobachtung, dass die *skNAC-knockout*-Embryonen einen geringeren Myosin-Proteingehalt aufwiesen, obwohl die Konzentration der entsprechenden Transkripte mit der in Wildtyp-Embryonen vergleichbar war. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass *skNAC* entweder für die MyHC-Translation oder als Chaperon für die MyHC-Faltung, den Einbau des Proteins ins Sarkomer oder die Stabilisierung von MyHC benötigt wird.

1.3.3 Der *skNAC*-Bindungspartner *Smyd1*

Im Jahr 2002 konnten Sims *et al.* mithilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems zeigen, dass *skNAC in vivo* mit einem Protein namens *Smyd1* (in der Maus oft auch als m-Bop bezeichnet) interagiert. *Smyd1* wurde erstmals von Hwang und Gottlieb (1995, 1997) in zytotoxischen T-Zellen (t-Bop) und im Herz- und Skelettmuskel (m-Bop) entdeckt. Bei der Durchführung des Hefe-2-Hybrid-Screens fusionierten Sims *et al.* *Smyd1* mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne und nutzten eine Skelettmuskel-cDNA-Bibliothek, um Gene zu identifizieren, die für Proteine kodieren, welche mit dem gewünschten Protein einen Komplex bilden. Die dabei identifizierten Klone kodierten für Polypeptide, die dem carboxyterminalen Ende von *skNAC* entsprachen. Interessanterweise scheint dabei die α NAC-Region keine Rolle zu spielen, da auch an *Smyd1* gebundene *skNAC*-Klone identifiziert werden konnten, die keine α NAC-Reste aufwiesen. Um die so gefundenen Bindungspartner zu verifizieren, wurden zusätzlich Immunopräzipitationsassays durchgeführt. Diese zeigten, dass auch in Säugerzellen eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen stattfindet. Auch in diesem Fall war ein Vorhandensein der ebenfalls in α NAC vorkommenden Sequenzabschnitte nicht für die Bindung notwendig. Essentiell war dagegen das carboxy-terminale PXLXP-Motiv innerhalb des *skNAC*-spezifischen Exons. Auch die Studie von Park *et al.*, 2010, bestätigt die Interaktion von *skNAC* und *Smyd1* mittels eines Hefe-2-Hybrid-Systems: Auf Grundlage einer cDNA-Expressionsbibliothek von Herzen aus Mausembryonen (E11,5) wurde neben einigen bis dato unbekanntem möglichen Interaktionspartnern *skNAC* als spezifischer Bindungspartner von *Smyd1* während der Kardiogenese gefunden.

1.3.3.1 Struktur und Funktion der Smyd-Proteine

Smyd1 ist ein Mitglied der Smyd-Proteinfamilie, die aus insgesamt fünf Proteinen besteht, welche als Charakteristikum die namensgebenden SET- und MYND-Domänen enthalten (Gottlieb *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2006). Ein besonderes Kennzeichen dieser Proteine ist dabei, dass die SET-Domäne durch die MYND-Domäne und weitere Sequenzen in zwei Segmente unterteilt wird, auf die eine sogenannte cysteinreiche *post*-SET-Domäne folgt.

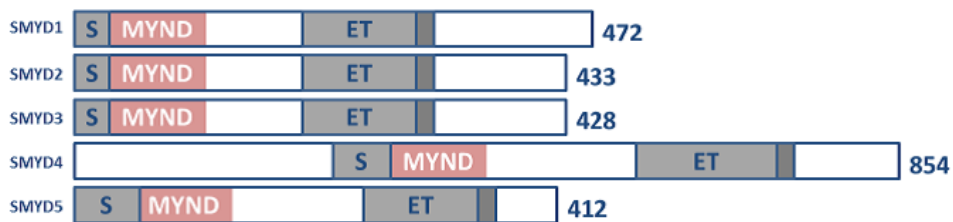


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur der Smyd-Proteinfamilie in Säugtieren.

Alle fünf Mitglieder der Smyd-Proteinfamilie enthalten sowohl eine MYND-, als auch eine SET-Domäne. Als weiteres Charakteristikum dieser Familie zählt, dass dabei die SET-Domäne durch die MYND-Domäne gespalten wird. Der als *post*-SET-Domäne bezeichnete Abschnitt ist in dunkelgrau dargestellt. Abbildung nach Leinhart und Brown, 2011.

1.3.3.1.1 SET-Domäne

Die SET-Domäne wurde nach den drei Proteinen Su(var)3-9, *Enhancer of Zeste* und *Trithorax*, in denen sie ursprünglich entdeckt wurden, benannt (Jones and Gelbart, 1993; Tschiersch *et al.*, 1994; Stassen *et al.*, 1995; Jenuwein *et al.*, 1998). Die Kristallstrukturanalyse von Smyd1, die von Sirinpong *et al.*, 2010, publiziert wurde, illustriert, dass beide Segmente der SET-Domäne trotz Unterbrechung zusammenkommen, um eine konservierte SET-Domänen-Struktur auszubilden (*split SET domain*). Die SET-Domäne ist circa 130 Aminosäuren lang und stellt das katalytische Motiv dar, welches für die Methylierung von unacetylierten Lysinresten an Histonen verantwortlich ist (Rea *et al.*, 2000; Nakayama *et al.*, 2001; Jenuwein und Allis, 2001). Bisher konnte für Smyd 1, 2 und 3 eine katalytische Aktivität der SET-Domänen gezeigt werden. Diese Aktivität kann durch das Chaperon Hsp90 signifikant stimuliert werden (Hamamoto *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2006; Abu-Farha *et al.*, 2008). In den letzten Jahren konnten mehr als 50 SET-Domänen-beinhaltende Proteine identifiziert werden, und zahlreiche Publikationen weisen darauf hin, dass SET-Domänen-Proteine auch an der Regulation der Muskeldifferenzierung beteiligt sind (Kubicek und Jenuwein, 2004; Dillon *et al.*, 2005; Diehl *et al.*, 2010; Eom *et al.*, 2011). Beispielsweise wurde beschrieben, dass das *Polycomb*-Protein Ezh2, welches eine SET-Domäne enthält, durch transkriptionelle Repression die Expression von muskelspezifischen Genen beeinflusst (Caretti *et al.*, 2004).

1.3.3.1.2 MYND-Domäne

Die MYND Domäne stellt, wie die SET-Domäne, eine konservierte Proteindomäne dar, die ebenfalls nach den Proteinen benannt wurde, in denen sie ursprünglich entdeckt wurde: *Myeloid*, *Nervy*, and *DEAF-1* (Gross und McGinnis, 1996; Lutterbach *et al.*, 1998a,b; Spadaccini *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007b; Matthews *et al.*, 2009). Sie besteht aus einem Cluster von Cystein- und Histidinresten, die ein konserviertes Zink-Finger-Motiv ausbilden. Viele verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie das leukämische Fusionsprotein AML1/ETO und der Tumorsuppressor BS69 (Wang *et al.*, 1998; Lutterbach *et al.*, 1998a/b; Gelmetti *et al.*, 1998; Masselink und Bernardis, 2000), weisen eine MYND-Domäne auf. MYND-Domänen stellen oft Motive für Protein-Protein-Bindungen an prolinreichen Sequenzen dar. Beispielsweise fungiert die MYND-Domäne des Transkriptionsfaktors ETO als Protein-Protein-Interaktionsdomäne und ermöglicht dadurch u.a. die Bindung von Histon-Deacetylasen (HDACs) (Wang *et al.*, 1998; Lutterbach *et al.*, 1998a,b; Gelmetti *et al.*, 1998). Auch die Bindung von *skNAC* und *Smyd1* wird u.a. durch die *Smyd1*-MYND-Domäne vermittelt. Röntgenstrukturanalysen konnten dabei die strukturelle Basis für die Rolle der MYND-Domäne als Protein-Protein-Bindungsstelle verdeutlichen (Sirinupong *et al.*, 2010).

1.3.3.1.3 Charakteristika spezifischer *Smyd*-Proteine

Smyd-Proteine sind an der Regulation einer Vielzahl unterschiedlicher biologischer Prozesse während der Embryonalentwicklung beteiligt, außerdem scheinen sie eine Rolle bei der Tumorentstehung zu spielen. Auf die spezifischen Funktionen der einzelnen Proteine soll im folgenden Abschnitt kurz eingegangen werden (Übersicht bei Leinhart und Brown, 2011; Du *et al.*, 2014).

Das Gen, welches für *Smyd1*, das erste identifizierte *Smyd*-Protein, kodiert, wird genau wie das *skNAC*-Gen spezifisch im Herzen und im Skelettmuskel exprimiert (Hwang und Gottlieb, 1995; Hwang und Gottlieb, 1997). Die Ergebnisse verschiedener *in vitro*- und *in vivo*-Versuche, die in den nächsten Abschnitten näher beschrieben werden, demonstrieren, dass *Smyd1* durch seinen grundlegenden Einfluss auf die Kardiogenese und die Myogenese essentiell für die Embryogenese ist (Gottlieb *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2006; Just *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2014).

Brown *et al.* publizierten 2006 die Entdeckung und Charakterisierung von *Smyd2*. Im Gegensatz zu *Smyd1* wird das *Smyd2*-Gen in vielen Geweben exprimiert, mit besonders starker Expression im Herzen und im Hypothalamus. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *Smyd2* einen Einfluss auf die transkriptionelle Genregulation via Methylierung und Beeinflussung von Histon-Deacetylasen ausübt (Brown *et al.*, 2006). Beispielsweise reprimiert *Smyd2* die Expression von *p53* durch Methylierung und agiert auf diese Weise als Tumorsuppressor (Huang *et al.*, 2006).

Auch für Smyd3 konnte eine Funktion als transkriptioneller Regulator gezeigt werden. Es stellt das erste Mitglied der Smyd-Familie dar, für das eine katalytische Aktivität der SET-Domäne demonstriert werden konnte: Diese Domäne weist Histon-Methyltransferaseaktivität auf, wobei Histon 3 an Lysin 4 methyliert wird (Hamamoto *et al.*, 2004). Eine Überexpression von *Smyd3* konnte in verschiedenen Karzinomen gefunden werden, wie beispielsweise in kolorektalen Karzinomen, und scheint dort an der Tumorentstehung beteiligt zu sein (Hamamoto *et al.*, 2004, 2006; Silva *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013b; Sponziello *et al.*, 2014).

Smyd4 und 5 sind bisher kaum näher charakterisiert. Sequenzanalysen der einzelnen Smyd-Familienmitglieder deuten jedoch darauf hin, dass bei diesen beiden Smyd-Proteinen die SET- und MYND-Domänen weniger gut konserviert sind als bei Smyd1-3.

1.3.3.2 Expressionsmuster des *Smyd1*- und *skNAC*-Gens und intrazelluläre Lokalisation des *Smyd1* und *skNAC*-Proteins

Aufbauend auf den Ergebnissen des Hefe-2-Hybrid-Screens untersuchten Sims *et al.*, 2002, auch die temporalen und spatialen Expressionsmuster des *skNAC*- und des *Smyd1*-Gens in differenzierenden Muskelzellen. Die Studie zeigte, dass das *skNAC*- und das *Smyd1*-Gen eine ähnliche Expressionskinetik in differenzierenden C2C12-Zellen aufweisen. Dabei scheint jedoch *Smyd1* etwas früher nach Differenzierungsinduktion und auch über einen längeren Zeitraum exprimiert zu werden als *skNAC*. 24 Stunden nach Überführen von C2C12-Zellen in Differenzierungsmedium kann das *Smyd1*-Transkript bereits nachgewiesen werden. Nach 48 Stunden nimmt die Expression zwar langsam ab, ist aber auch nach zwei Wochen noch detektierbar. Dagegen ist die Expression von *skNAC* 24 Stunden nach Induktion der Differenzierung noch sehr schwach, erreicht aber wie die *Smyd1*-Expression einen Höhepunkt nach etwa 48 Stunden, und ist nur bis zum sechsten Tag nach Differenzierungsbeginn noch deutlich nachweisbar. Die gleiche Studie zeigte zudem, dass beide Proteine im Verlauf der myogenen Differenzierung von C2C12-Myoblasten kolokalisieren, wobei beide eine Kern-zu-Zytosol Translokation im Verlauf der Differenzierung durchlaufen: 24 Stunden nach Induktion der Differenzierung konnten *skNAC* und *Smyd1* sowohl im Kern als auch im Zytoplasma detektiert werden. Nach 96 Stunden in Differenzierungsmedium befanden sich beide Proteine dagegen fast ausschließlich im Zytoplasma. Im Kern waren zu diesem Zeitpunkt *skNAC* und *Smyd1* fast nicht mehr nachweisbar (Sims *et al.*, 2002).

Interessanterweise unterscheiden sich Zebrafisch- und Maus-*skNAC* nicht nur, wie in einem vorherigen Abschnitt beschrieben, bezüglich ihrer Transkriptlänge und -sequenz, sondern auch, wie durch Li *et al.*, 2009a gezeigt, in ihrer subzellulären Lokalisation. Im Zebrafisch war *skNAC* sowohl in Myoblasten als auch in Myotuben nur im Zytoplasma nachweisbar (Li *et al.*, 2009a).

In Mausembryonen wird *Smyd1* bereits in Herzvorläuferzellen (E8) und in den myotomalen Kompartimenten der Somiten gebildet. Danach wird die *Smyd1*-Expression im Herzschlauch und in allen vier Herzkammern aufrechterhalten. Zumindest im differenzierenden Skelettmuskel ist ein Nachweis von *Smyd1* ebenfalls möglich. Auch im adulten humanen System wird *Smyd1* ausschließlich im Herz- und Skelettmuskel exprimiert (Li *et al.*, 2009b).

Bezüglich einer möglichen fasertypspezifischen Lokalisation des *Smyd1*-Proteins im Skelettmuskel konnte durch Tan *et al.*, 2006, mittels *in situ*-Hybridisierungs-Techniken am Zebrafisch-Modell gezeigt werden, dass *Smyd1* sowohl im Herzen als auch in den beiden Skelettmuskelfasertypen *slow* and *fast* exprimiert wird. Dem widerspricht jedoch die Studie von Just *et al.* (2011): Die Autoren konnten *Smyd1* zwar auch im Zebrafisch-Herzen, aber im Skelettmuskel nur in *fast twitch*-Fasern detektieren. Genauere Lokalisationsstudien derselben Gruppe an murinen Herzen ergaben zudem, dass neben Lokalisation des *Smyd1*-Proteins im Kern auch eine signifikante Menge an *Smyd1*-Protein im Zytoplasma an der sarkomerischen M-Linie von Kardiomyozyten nachweisbar ist, wo es mit Myosin interagiert. Außerdem konnte die Gruppe zeigen, dass diese subzelluläre Lokalisation sehr dynamisch ist: Während der Myofibrillogenese ist *Smyd1* mit der A-Bande assoziiert, wo es mit Myosin kolokalisiert. Später, nach Beendigung des Sarkomeraufbaus, ist es mit der M-Linie assoziiert. Eine Assoziation von *Smyd1* mit der M-Linie konnte im selben Jahr auch durch die Gruppe um Li (2011), ebenfalls am Zebrafisch-Modell, im Skelettmuskel gezeigt werden. Als Erklärungsansatz für die unterschiedlichen publizierten Verteilungsmuster von *Smyd1* in den Muskelfasertypen werden die verschiedenen analysierten Entwicklungszeitpunkte diskutiert (Du *et al.*, 2014).

1.3.3.3 Regulation der *Smyd1*-Expression

Aufgrund ähnlicher Phänotypen der Mäuse, bei denen die Expression von *Mef2c*, *Hand2* und *Smyd1* ausgeschaltet wurde (Srivastava *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997; Gottlieb *et al.*, 2002), untersuchten Phan *et al.*, 2005, einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen Transkriptionsfaktoren. *Southern-Blot*-Analysen und *in situ*-Hybridisierungsstudien zeigten dann, dass die *Smyd1*-Expression im sich entwickelnden Herzen von *Mef2c*-defizienten Mäusen signifikant vermindert ist. Mithilfe von biologischen Datenbanken und durch Verwendung von transgenen *lacZ-Smyd1*-Konstrukten ließen sich regulatorische Regionen im *Smyd1*-Gen identifizieren, darunter auch ein *Mef2c*-Bindungselement, welches die Expression von *Smyd1* im anterioren Herzbereich während der Embryonalentwicklung kontrolliert. Gel-Mobilitäts-*Shift-Assays* belegten dann eine reale Bindung von *Mef2* an das gefundene Element. Interessanterweise ist dieses Element aber nicht notwendig für die Expression von *Smyd1* im Skelettmuskel.

Auch Li *et al.* (2009b) untersuchten die Frage, wie die herz- und skelettmuskelspezifische Expression des *Smyd1*-Gens zustande kommt. Beim Vergleich der Promotorregionen des Mensch-, des Maus- und des Ratten-*Smyd1*-Gens fielen zwei konservierte Bindungsstellen für myogene Transkriptionsfaktoren auf: ein SRF (*Serum response factor*)-bindendes Element und eine E-box3. E-Boxen stellen Promotorsequenzen dar, an die u.a. myogene Regulationsfaktoren (MRFs) binden können, wodurch die Transkription von spezifischen *Targetgenen* während der Myogenese aktiviert werden kann (Aurade *et al.*, 1994; Olson and Klein, 1994; Berkes und Tapscott, 2005). Die Autoren konnten im Anschluss zeigen, dass SRF, ein Transkriptionsfaktor, der die Expression muskelspezifischer Gene reguliert (Mohun *et al.*, 1991; Papadopoulos und Crow, 1993; Mack *et al.*, 2000; McDonald *et al.*, 2006), direkt an das SRF-bindende Element und dass Myogenin an das E-box-Element im *Smyd1*-Promotor bindet. Das Vorhandensein beider Transkriptionsfaktoren verstärkt dabei die *Smyd1*-Promotoraktivität. Die daraus resultierende Annahme, dass es sich bei *Smyd1* um ein direktes Zielgen von SRF und Myogenin handelt, wurde durch weitere experimentelle Ergebnisse unterstützt. Diese zeigten u.a., dass Überexpression von *SRF* und Myogenin in C2C12-Zellen zu einer gesteigerten *Smyd1*-Expression führt und dass eine Deletion von SRF in den Herzen von Mäusen dagegen das Expressionslevel von *Smyd1* vermindert.

1.3.3.4 Einfluss von *Smyd1* auf die Herz- und Skelettmuskelentwicklung

Gezieltes Ausschalten von *Smyd1* in Mäusen zeigte, dass *Smyd1* eine essentielle Rolle bei der Kardiogenese spielt (Gottlieb *et al.*, 2002). *Smyd1*(-/-)-Mäuse sterben bereits an E10,5 intrauterin. Untersuchungen an den Embryonen zeigten u.a. das völlige Fehlen der rechten Herzkammer, starke Veränderungen im linken Ventrikel, sowie große Mengen an extrazellulärer Matrix im gesamten Herzmuskel (*cardiac jelly*). Bei der Untersuchung verschiedener Kardiomyozyten-Differenzierungsmarker zeigte sich, dass die Expression von *Hand1*, einem Marker für die linke Herzkammer, durch Ausschalten von *Smyd1* nicht beeinflusst wird, aber im Gegensatz dazu die Expression von *Hand2*, einem Marker für die rechte Herzkammer, stark reprimiert ist. Auch die Expression des *lrx4*-Gens, welches für ein Ventrikel-spezifisches Homeobox-Protein kodiert, war vermindert. Dieser Phänotyp ähnelt in vielerlei Hinsicht dem der oben beschriebenen *skNAC*(-/-)-Mäuse (Park *et al.*, 2010).

Der Effekt von *Smyd1* auf die Skelettmuskelentwicklung wurde zunächst im Zebrafisch-System untersucht (Tan *et al.*, 2006). Nach Ausschalten der Expression beider Isoformen wurde Letalität am Tag 5 der Embryonalentwicklung beobachtet. Wenngleich die Embryonen makroskopisch normal erschienen, ließen sich zwei unterschiedliche, funktionell-pathologische Phänotypen unterscheiden: Die Embryonen des Phänotyps 1 konnten keinerlei Schwimmbewegungen mehr ausführen und

reagierten nicht auf Berührung, während die Embryonen des Phänotyps 2 keinen messbaren Herzschlag aufwiesen, obwohl das Herz morphologisch normal erschien. Weitere Versuche zeigten, dass das Ausschalten beider Isoformen notwendig ist, um die *Smyd1*-Expression komplett zu inhibieren und damit die beschriebenen Phänotypen zu beobachten. Die Expression von Genen, die für frühe myogene Differenzierungsmarker kodieren, sowie von Genen, die für die Ausbildung von *slow*- und *fast*-Muskeln wichtig sind, war jedoch nach *in-situ*-Hybridisierung von 24 hpf-Embryonen unverändert, was vermuten lässt, dass *Smyd1* zumindest im Zebrafisch keinen Einfluss auf die Myoblastenspezifikation und frühe Differenzierung besitzt, sondern vermutlich eher eine Funktion bei späteren Differenzierungsvorgängen und der Muskelfaserreifung ausübt (Du *et al.*, 2014). *Smyd1*-Überexpressionsstudien in murinen Skelettmuskelzellen zeigten dabei eine beschleunigte Differenzierung, was dafür spricht, dass *Smyd1* das Differenzierungspotential der Zellen steigert (Li *et al.*, 2009b).

1.3.3.5 Einfluss von *Smyd1* auf die Sarkomerogenese

Obwohl in *Smyd1*-defizienten Zebrafischen zunächst kein Effekt auf die Expression von Genen, die für verschiedene myogene Marker kodieren, zu beobachten war, zeigten jedoch Immunfärbungen mit einem anti-Myosin-Antikörper, dass die Ausbildung der Myofibrillen in den *slow*-Myofasern gestört war (Tan *et al.*, 2006). Dagegen waren die Sarkomer-assoziierten Proteine Titin und Nebulin regulär angeordnet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen verdeutlichten, dass der *knockdown* von *Smyd1* in Zebrafischembryonen den Einbau der Myofibrillen in die Sarkomere und dadurch auch die Sarkomerausbildung selbst stört (Tan *et al.*, 2006). Fünf Jahre später wurde bei der Untersuchung der Zebrafisch-Mutante *flatline* (Warren und Fishman, 1998), die zahlreiche Herz- und Skelettmuskeldefekte aufweist, interessanterweise eine Mutation im *Smyd1*-Gen identifiziert, welche für den gezeigten Phänotyp verantwortlich ist. Eine gestörte Sarkomerogenese war hier ebenfalls zu beobachten. Um zu untersuchen, ob die Transkription von Genen, welche für Sarkomerproteine kodieren, in der *flatline*-Mutante gestört ist, wurde die Expression zahlreicher Gene analysiert, welche für myofibrilläre Proteine im Bereich der dicken und der dünnen Filamente kodieren. Interessanterweise war jedoch keines dieser Gene in der *flatline*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp über- oder unterexprimiert, mit Ausnahme von Myosin. Dessen Konzentration war in der *flatline*-Mutante vermindert, obwohl das Transkriptionslevel unbeeinflusst erschien. Im Kontext mit Myosin konnte außerdem eine Induktion der Gene, die für die Myosin-assoziierten Chaperone Hsp90 und UNC45b kodieren, in der *flatline*-Mutante und in *Smyd1-knockout*-Embryonen beobachtet werden. Interessanterweise ist in Hsp90- und UNC45b-defizienten Zebrafischembryonen *Smyd1* induziert (Just *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse deuten auf eine Koregulation dieser drei Proteine während der

Sarkomerogenese hin. Unterstützt wurde diese Annahme dadurch, dass Smyd1 mit Hsp90 und UNC45b koimmunopräzipitiert werden konnte (Just *et al.*, 2011). Daher wird weiterhin angenommen, dass der bei den *Smyd1b*-defizienten Zebrafisch-Embryonen und auch bei der *flatline*-Mutante beobachtete verminderte Myosin Gehalt bei gleichbleibender Transkriptionsrate durch das Zusammenwirken von Smyd1 mit myosinspezifischen Chaperonen zustande kommen könnte, welche an der Faltung, dem Abbau oder dem Einbau von Myosin in die Sarkomere beteiligt sind. Eine andere Hypothese nimmt dagegen an, dass an dem Prozess die HMTase (*Histone methyltransferase*)-Aktivität von Smyd1 beteiligt ist, da zum einen gezeigt werden konnte, dass Smyd1 physikalisch mit Myosin interagiert und zum anderen eine verminderte Myosinmethylierung in Smyd1-defizienten Zebrafischen nachgewiesen werden konnte (Just *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013).

Auch wenn der genaue Mechanismus noch unklar ist, konnte eine Beteiligung der beiden Smyd1-Isoformen an der Sarkomerogenese zudem durch zwei weitere Publikationen untermauert werden (Li *et al.* 2013; Gao *et al.*, 2014). Überraschenderweise wird in einer der beiden kürzlich erschienenen Studien - kontrovers zu den anderen Studien - außerdem auch ein Effekt von Smyd1 auf den Aufbau der Z-Scheibe und M-Bande beschrieben (Li *et al.*, 2013).

1.3.3.6 Smyd1 als Transkriptionsfaktor bzw. Chromatin-remodelling Faktor

Die in allen Smyd-Proteinen vorhandenen SET- und MYND-Domänen, die an Histon-Methylierungsprozessen bzw. der Rekrutierung von HDACs beteiligt sind, lassen darauf schließen, dass Mitglieder dieser Familie eine Rolle bei der transkriptionellen Kontrolle über Chromatinmodifikationen spielen (Rice and Allis, 2001).

In der Tat konnten Tan *et al.*, 2006, erstmals die Lysin-Methyltransferaseaktivität von Smyd1 nachweisen, wobei Histon 3 an Lysin 4 methyliert wird. Außerdem konnten die Autoren mithilfe von Mutationsstudien nachweisen, dass hierfür die Smyd1-SET-Domäne essentiell ist. Durch Zugabe von Hsp90 konnte die Methyltransferase-Aktivität gesteigert werden. Hsp90 kann somit als möglicher Kofaktor für die Histonmethylierung angesehen werden. Interessanterweise sind mutierte Smyd1-Proteine mit defizienter HMTase-Aktivität nicht dazu fähig, die durch einen Smyd1-*knockdown* verursachten Myofibrillogenese-Defekte in Zebrafisch-Embryonen zu kompensieren, was dafür spricht, dass die Smyd1-HMTase-Aktivität für die Ausreifung der Myofibrillen essentiell ist (Tan *et al.*, 2006). Zu dieser Hypothese im Widerspruch steht jedoch die Studie von Just *et al.*, 2011, die Daten präsentiert, welche dafür sprechen, dass auch durch ektopische Expression einer HMTase-defizienten *Smyd1*-Mutante, der Aufbau der Myofibrillen wiederhergestellt werden kann. Diese Gruppe stellte vielmehr die Hypothese auf, dass Smyd1 an der M-Linie des Sarkomers als Methyltransferase wirkt, und dass seine Substrate M-Linien-Proteine sind. Die Methylierung von Nicht-Histonproteine konnte

bereits für andere Mitglieder der Smyd-Familie gezeigt werden: So methyliert Smyd2 beispielsweise direkt p53 (Huang *et al.*, 2006) und Smyd3 den *Vascular endothelial growth factor receptor 1* (VEGFR1) (Kunizaki *et al.*, 2007). Kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass Smyd2 Hsp90 methyliert und dabei eine kritische Rolle bei der Sarkomer-Organisation spielt (Abu-Farha *et al.*, 2011; Donlin *et al.*, 2012; Voelkel *et al.*, 2013). Da Just *et al.*, 2011, wie bereits beschrieben, nicht nur eine Lokalisation des Smyd1-Proteins an der M-Linie des Sarkomers, sondern auch eine Smyd1-Bindung an MyHC zeigen konnten, ist in diesem Zusammenhang auch interessant, dass bereits seit über vierzig Jahren eine Methylierung von Myosin selbst bekannt ist. Die Funktion dieser Modifikation ist aber noch unklar ist (Huszar und Elzinga, 1972). Kürzlich konnte zudem von Li und Kollegen, 2013, gezeigt werden, dass MyHC in Zebrafischembryonen methyliert ist und dass der Methylierungsstatus des Proteins drastisch abnimmt, wenn *Smyd1* in den Embryonen durch *antisense*-Oligonukleotide ausgeschaltet wird, was ebenfalls zu der Vermutung führte, dass Smyd1 durch Myosin-Methylierung die Myofibrillogenese beeinflussen könnte.

Im Jahr 2002 konnte erstmals gezeigt werden, dass Smyd1, ähnlich wie der ebenfalls MYND-Domänen enthaltende Transkriptionsfaktor ETO (Lutterbach *et al.*, 1998), durch Hinzuziehen von HDACs als transkriptioneller Repressor fungieren kann (Gottlieb *et al.*, 2002). Ein weiterer Mechanismus durch den Smyd1 seine Funktion in Muskelzellen ausüben könnte. Mithilfe von Luciferase-Reporter-Gen-Assays wurde nachgewiesen, dass Smyd1 aktiv als Transkriptionsrepressor wirken kann. Unter Verwendung des HDAC-Inhibitors Trichostatin A (TSA) konnte demonstriert werden, dass dieser reprimierende Effekt auf die Genexpression durch Hinzuziehen von HDACs vermittelt wird. Immunpräzipitationsstudien zeigten außerdem, dass Smyd1 direkt mit allen drei Klasse I-HDACs, sowie mit HDAC 4 & 5, welche zu den Klasse II-HDACs gehören, assoziieren kann. Im Jahr 2006 konnte weiterhin gezeigt werden, dass Smyd1 durch Interaktion mit *Irx5*, einem Protein das u.a. den ventrikulären Repolarisationsgradienten im Herzen herstellt, und dem Rekrutieren von HDACs, die Expression eines für einen Kaliumkanal kodierenden Gens, *Kcnd2*, reprimiert (Costantini *et al.*, 2005). Die beiden Gene *Hand2* und *Irx4*, die für das ventrikuläre Kardiomyozytenwachstum und die Kardiomyozytendifferenzierung benötigt werden, konnten bisher als spezifische Zielgene des Smyd1-Proteins identifiziert werden (Gottlieb *et al.*, 2002). Sowohl die Aufklärung des genauen molekularen Mechanismus, durch den Smyd1 die Expression der beiden Gene reguliert, als auch die Entdeckung weiterer Zielgene, steht aber bislang noch aus.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Forschungsergebnisse sprechen für eine Rolle des *skNAC*- und des *Smyd1*-Proteins bei der Skelettmuskelentwicklung. Insbesondere könnten die beiden Proteine als transkriptionelle Modulatoren und/oder als Regulatoren der Sarkomerogenese wirken. Die Beobachtung, dass beide Proteine im Verlauf der Myogenese eine Translokation vom Zellkern ins Zytoplasma durchlaufen, unterstützt dabei die Annahme, dass sie unterschiedliche Funktionen im Kern und im Zytoplasma haben könnten. Dieser Hypothese sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden. Dabei lag der Schwerpunkt auf der funktionellen Charakterisierung des *skNAC*-Proteins. Zudem sollte die physiologische Funktion des *skNAC*-Proteins bei der Regulation der myogenen Differenzierung exemplarisch am Beispiel des Rhabdomyosarkoms genauer analysiert werden.

Insgesamt ergaben sich daher zu Beginn der Arbeit folgende Fragen:

1. Wie wird die *skNAC*-Expression in Skelettmuskelzellen reguliert?

Um diese Frage beantworten zu können, sollte zunächst untersucht werden, auf welcher Genregulationsebene die *skNAC*-Expression gesteuert wird, um dann weiterhin zu testen, ob dabei spezifische Signalwege, denen eine Rolle bei der Skelettmuskeldifferenzierung zukommt, einen Einfluss besitzen.

2. Wie beeinflusst *skNAC* das Differenzierungsverhalten von Skelettmuskelzellen? Gibt es einen Einfluss auf die Regulation von Transkriptionsvorgängen? Sind Effekte auf die Sarkomerogenese zu beobachten?

Mittels spezifischer siRNAs sollte die Expression des *skNAC*-Gens in murinen Myoblasten gehemmt werden, um zu überprüfen, ob die Beeinflussung der Genexpression von *skNAC* das Differenzierungsverhalten bzw. die Sarkomerogenese beeinflusst. Um einen ersten Hinweis auf mögliche Zielgene und damit auf transkriptionelle Regulatorfunktionen von *skNAC* zu erhalten, sollte außerdem nach Inhibierung der *skNAC*-Expression, ein cDNA-*Microarray* durchgeführt werden.

3. Wie wird die Translokation des *skNAC*-*Smyd1*-Komplexes vom Zellkern ins Zytosol gesteuert?

Ein im Vorfeld der Arbeit durchgeführter Hefe-2-Hybrid-Screen der Arbeitsgruppe gab Hinweise darauf, dass *skNAC* eine potentielle Interaktion mit einer E3-SUMO-Ligase namens *Nse2* eingehen kann. Da ein Zusammenhang zwischen Sumoylierung, einer posttranslationalen Proteinmodifikation,

bei der durch drei enzymatische Schritte kleine SUMO-Proteine kovalent an Zielproteine geknüpft werden, und Kerntransportprozessen bekannt ist, sollte diese Bindung verifiziert werden. Darauf aufbauend sollte untersucht werden, ob ein möglicher Einfluss der identifizierten SUMO-Ligase auf den Transportvorgang des skNAC-Smyd1-Komplexes besteht.

4. Spielt skNAC eine Rolle bei der Pathogenese des Rhabdomyosarkoms?

Zur Beantwortung dieser Frage sollte die *skNAC*-Expression sowie die Funktion des skNAC-Proteins in verschiedenen Rhabdomyosarkomzelllinien analysiert werden.

2. Ergebnisse

2.1 Manuskript 1: Skeletal muscle-specific variant of nascent polypeptide associated complex alpha (skNAC): Implications for a specific role in mammalian myoblast differentiation

2.1.1 Zusammenfassung

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war über die spezifische Funktion des skNAC-Proteins bei der Skelettmuskeldifferenzierung erst wenig bekannt. Zu diesem Zeitpunkt existierten drei Veröffentlichungen, die Hinweise darauf gaben, dass skNAC ein positiver Regulator der Myogenese sein könnte und an Regenerationsprozessen nach Verletzung der quergestreiften Muskulatur beteiligt ist (Yotov und St-Arnaud, 1996a; Munz *et al.*, 1999; Sims *et al.*, 2002). Weiterhin erschien im Jahr 2009 eine Publikation, die zeigte, dass skNAC im Zebrafischmodellsystem einen Einfluss auf die Sarkomerogenese hat (Li *et al.*, 2009a). Das Ziel der oben genannten Studie bestand daher zunächst darin, zu testen, ob und welche Effekte skNAC auf die Myogenese ausübt und im Speziellen, ob auch im murinen System der Aufbau der Myofibrillen durch skNAC beeinflusst wird. Dabei wurde mit der murinen Myoblastenzelllinie C2C12 gearbeitet.

Zunächst wurde die Regulation der Expression des *skNAC*-Gens analysiert. Durch Behandlung von C2C12-Zellen mit Actinomycin D und anschließender Differenzierungsinduktion konnte dabei gezeigt werden, dass *skNAC* auf transkriptioneller Ebene reguliert ist. Der Einsatz des Translationshemmers Cycloheximid verdeutlichte des Weiteren, dass für die Expression des *skNAC*-Gens *de novo*-Proteinsynthese notwendig ist und dass dieses Gen demnach nicht zu den sogenannten *primary response*-Genen zählt. Um Signalwege zu erforschen, welche für die starke Induktion von *skNAC* im Verlauf der myogenen Differenzierung verantwortlich sein könnten, wurden die Zellen mit verschiedenen p38 MAPK (p38 *mitogen-activated protein kinase*-) Inhibitoren behandelt, wodurch die *skNAC*-Induktion im Verlauf der Myogenese fast vollständig ausblieb. Diese Ergebnisse verdeutlichen eine wichtige Rolle der p38 MAPK-Kaskade bei der Regulation der *skNAC*-Expression.

Um den Einfluss des skNAC-Proteins auf das Differenzierungsverhalten von Säugetier-Myoblasten zu untersuchen, wurde mit Hilfe spezifischer siRNAs (*short-interfering-RNAs*) die Expression des *skNAC*-Gens in C2C12-Zellen unterdrückt. Dabei zeigte sich, dass das Ausschalten von *skNAC* weder die Expression früher myogener Differenzierungsmarker, wie Myogenin, noch die später Marker, wie *MyHC*, beeinflusst. Zudem war die Morphologie der *skNAC*-siRNA-transfizierten Zellen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen nicht verändert, was dafür spricht, dass skNAC keinen Einfluss auf die Myozytenfusion ausübt. Um einen möglichen Effekt des skNAC-Proteins auf die Sarkomerogenese zu testen, wurden siRNA-transfizierte Zellen 96 Stunden nach Induktion der Differenzierung fixiert und

die intrazelluläre Lokalisation des Sarkomerproteins MyHC mittels Immunfluoreszenz untersucht. Hierbei ergab sich ein auffälliges Muster: Die Myosin-Färbung erschien deutlich schwächer und diffuser als bei den Kontrollen. Dies war zunächst überraschend, hatten doch wie oben erwähnt Expressionsanalysen ergeben, dass der Gehalt an MyHC-Protein in den transfizierten Zellen nicht verändert war. Konfokale Aufnahmen illustrierten jedoch, dass die transfizierten Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen häufig durch eine charakteristische starke MyHC-Färbung nahe der Zytoplasmamembran und im Gegensatz dazu einer geringen Färbeintensität im Zentrum der Zellen gekennzeichnet waren. Ein solches MyHC-Färbemuster scheint typisch für differenzierende Myoblasten zu sein, bei denen die Myofibrillogenese und/oder die Sarkomerogenese gestört sind (McGrath *et al.*, 2006). Kontrollzellen wiesen dagegen eine homogene, aus vielen kleinen Foci bestehende Färbung im Zytoplasma auf. Diese Strukturen sind charakteristisch für sich neu formierende Sarkomere (Srikakulam und Winkelmann, 2004; Kontrogianni-Konstantopoulos *et al.*, 2006; McGrath *et al.*, 2006). Interessanterweise wurde ein ähnliches immunfluorimetrisches Färbemuster mit einem anti- α -Aktin Antikörper detektiert, während bei Verwendung eines anti- α -Aktinin Antikörpers keine Unterschiede zu Kontrollzellen beobachtet wurden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass skNAC wichtig für die Organisation der dicken und dünnen Filamente im Sarkomer ist, während es wohl für die Formierung der Z-Scheiben nicht notwendig ist. In ihren Grundzügen stimmen diese Daten mit dem überein, was zuvor am Zebrafisch-Modellsystem gezeigt werden konnte: Auch hier war der Einbau von MyHC und Aktin, nicht aber der von α -Aktinin, durch Inhibierung von skNAC beeinträchtigt (Li *et al.*, 2009a). Zusammengefasst deuten die Ergebnisse folglich darauf hin, dass skNAC sowohl im murinen, als auch im Zebrafisch-System, wichtig für die Organisation der dicken und dünnen Filamente im Sarkomer ist.

2.1.2 Manuskript

Berger*, F., Berkholtz*, J., Breustedt, T., Ploen, D., Munz, B.

Skeletal muscle-specific variant of nascent polypeptide associated complex alpha (skNAC):

Implications for a specific role in mammalian myoblast differentiation.

Eur. J. Cell Biol. 2012, 91, 150-5.

doi: 10.1016/j.ejcb.2011.10.004

* equal contribution

2.2. Manuskript 2: skNAC depletion stimulates myoblast migration and perturbs sarcomerogenesis by enhancing calpain 1 and calpain 3 activity

2.2.1 Zusammenfassung

Aufgrund der Hypothese, dass skNAC möglicherweise den Einbau, die Faltung bzw. den Abbau von Sarkomerproteinen wie MyHC und Aktin beeinflusst, wurde das Expressionsmuster von Genen die an diesen Prozessen beteiligt sind, in den mit skNAC-spezifischer siRNA-transfizierten Zellen untersucht. Unter den getesteten Genen befanden sich insbesondere solche, die für Chaperone kodieren, welche für die Faltung myofibrillärer Proteine und deren Einbau ins Sarkomer notwendig sind, wie UNC45b, Hsp90, α -Crystallin, Prefoldin und TCP1 (Berkholz und Munz, unveröffentlichte Daten). Außerdem wurde das Expressionsmuster von Genen analysiert, welche für Proteine kodieren, die an Sarkomer-Abbauprozessen beteiligt sind, wie Atrogin1, Murf1, Nedd4, CHIP, UFD2 (Berkholz und Munz, unveröffentlichte Daten). Interessanterweise zeigte sich nur für UNC45b und Nedd4 auf-RNA Ebene eine leichte Induktion in den skNAC-siRNA-transfizierten Zellen. Die Expression aller anderer Gene wurde durch die Hemmung der skNAC-Expression nicht beeinflusst, was dafür spricht, dass die Funktion dieses Proteins bei der Sarkomerogenese nicht primär in einer transkriptionellen Kontrolle der Expression von Genen besteht, welche für Sarkomer-assoziierte molekulare Chaperone kodieren. Auf der Suche nach weiteren möglichen Zielgenen, die für den Einfluss des skNAC-Proteins auf die Sarkomerogenese verantwortlich sein könnten, wurde in der vorliegenden Arbeit das Calpain 1-Gen identifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten von skNAC zu einer Steigerung der Calpain 1-Expression und der Calpain 3-Expression führt. Calpaine sind zytosolische Kalzium-abhängige Cystein-Proteasen, die an der Regulation einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie beispielsweise Signaltransduktion, Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose, beteiligt sind. Zusätzlich war vor Beginn dieser Arbeit zumindest für das skelettmuskelspezifische Calpain 3 bekannt, dass es die Zellmigration und den Abbau von myofibrillären Proteinen beeinflusst (Dedieu *et al.*, 2003; Dedieu *et al.*, 2004; Leloup *et al.*, 2006; Beckmann und Spencer, 2008). Ein Calpain-Aktivitätsassay verdeutlichte dann auch, dass es nach Hemmung der skNAC-Expression nicht nur zu einem Anstieg der Calpain 1 und -3-Expression kommt, sondern dass auch die enzymatische Calpain-Aktivität in den skNAC-defizienten Zellen verstärkt ist. Umgekehrt führte eine Überexpression des skNAC-Gens zu einer verminderten Calpain 1- und Calpain 3-Expression. Schließlich konnte gezeigt werden, dass vermutlich aufgrund erhöhter Calpain-Aktivität, eine Hemmung der skNAC-Expression auch die Gesamt-Proteinmenge des bekannten Calpain-Substrates MARCKS (*myristoylated alanine rich C kinase substrate*) vermindert. MARCKS kann durch die Proteinkinase C phosphoryliert werden und ist vor allem an der Vernetzung von Aktinfilamenten beteiligt, aber auch eine Mitwirkung an der

Regulation der Myoblastenmigration wurde beschrieben (Dedieu *et al.*, 2003; Dedieu *et al.*, 2004; Mazères *et al.*, 2006; Louis *et al.*, 2008).

Aufgrund des Zusammenhangs zwischen Calpainen und dem Aufbau der Myofibrillen in Skelettmuskelzellen wurde untersucht, ob der durch skNAC-Depletion verursachte, im ersten Manuskript beschriebene Phänotyp der unvollständig ablaufenden Sarkomerogenese in Zusammenhang mit der ebenfalls nach skNAC-Depletion beobachteten erhöhten Calpain-Aktivität steht. Hierfür wurden C2C12-Zellen mit dem zellpermeablen Calpaininhibitor ALLN (N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal), der vorwiegend Calpain 1 hemmt, behandelt. In der Tat ergab sich dabei, dass nach Behandlung mit dem Calpain-Inhibitor die Sarkomerogenese auch in skNAC-defizienten Zellen wieder weitgehend normal ablief, dass also der Sarkomerogenese-Defekt dieser Zellen durch Calpain-Hemmung kompensiert wurde: Sowohl die Aktin-Färbung als auch die MyHC-Färbung waren von der bei Wildtyp-Zellen beobachteten Färbung nicht mehr zu unterscheiden. Dieses Ergebnis legt nahe, dass skNAC die Sarkomerogenese über eine Regulation der Calpain-Expression und damit der Calpain-Aktivität beeinflusst.

Darüber hinaus wurde der Frage nachgegangen, ob eine Hemmung der skNAC-Expression und die damit verbundene erhöhte Calpain-Aktivität auch einen Einfluss auf die Myoblastenmigration hat, da Calpaine, wie erwähnt, neben der Sarkomerogenese auch die Myoblastenmigration regulieren (Dedieu *et al.*, 2003; Dedieu *et al.*, 2004; Leloup *et al.*, 2006). Für die Untersuchung von Migrationsvorgängen wurde ein von der Firma Roche entwickeltes System verwendet, welches unter Verwendung einer speziellen Zellkammer die Echtzeitmessung von Zellmigration ermöglicht. Zunächst wurde dabei untersucht, ob skNAC grundsätzlich einen Einfluss auf die Migration von Myoblasten ausübt. Dabei zeigte sich, dass die mit der spezifischen skNAC-siRNA behandelten Zellen ein höheres Migrationspotential und im Umkehrschluss skNAC-überexprimierende Zellen ein verringertes Migrationspotential als Kontrollzellen aufwiesen. Wie bereits bei den vorherigen Experimenten zur Untersuchung der Sarkomerogenese wurden transfizierte Zellen zusätzlich mit dem Calpain-Inhibitor ALLN behandelt und die Migration analysiert. Hierbei ergab sich, dass die gesteigerte Myoblastenmigration nach skNAC-Depletion tatsächlich das Resultat einer gesteigerten Calpain-Aktivität ist, da nach Hemmung der Calpain-Aktivität keine gesteigerte Migrationsrate dieser Zellen mehr zu beobachten war. Diese Ergebnisse liefern Hinweise dafür, dass skNAC über eine Beeinflussung der Expression von Calpain-Genen und damit der Calpain-Aktivität nicht nur die Sarkomerogenese, sondern auch die Migration von Myoblasten reguliert.

2.2.2 Manuskript

Berkholz, J., Zakrzewicz, A., Munz, B.

skNAC depletion stimulates myoblast migration and perturbs sarcomerogenesis by enhancing calpain 1 and 3 activity.

Biochem. J. 2013, 453, 303-10.

doi: 10.1042/BJ20130195

2.3 Manuskript 3: The skNAC-Smyd1-complex as a transcriptional regulator

2.3.1 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, ein besseres Verständnis für die durch den skNAC-Smyd1-Komplex vermittelte transkriptionelle Regulation spezifischer Gene im Verlauf der Myogenese zu erlangen. Für beide Proteine wird aufgrund im Vorfeld dargestellter Daten eine Rolle als Transkriptionsfaktoren oder zumindest als transkriptionelle Koaktivatoren angenommen (Yotov und St-Arnaud, 1996a; Gottlieb *et al.*, 2002). Für das Smyd1-Protein konnte zudem gezeigt werden, dass es als epigenetischer Faktor durch seine Funktion als Histonmethyltransferase bzw. durch das Rekrutieren von Histondeacetylasen an Genregulationsprozessen beteiligt ist (Gottlieb *et al.*, 2002; Costantini *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2006). In Bezug auf die Modifizierung von Histonen konnte bisher nachgewiesen werden, dass Smyd1 Methylgruppen an Lysin 4 von Histon 3 knüpfen kann, wobei noch nicht eindeutig geklärt ist, wie viele Methylgruppen bei diesem Prozess tatsächlich übertragen werden (Tan *et al.*, 2006).

Zu Beginn der Studie wurde zunächst mithilfe eines *Microarrays* das Expressionsprofil des gesamten Mausgenoms nach Inhibierung der *skNAC*-Expression in kultivierten, differenzierenden Myoblasten analysiert. 100 Gene wiesen dabei eine *Foldchange* von über 2,9 auf. Die nähere Untersuchung der differentiell exprimierten Gene ergab, dass eine Vielzahl der identifizierten Gene für Proteine, die im Zusammenhang mit der Immunabwehr stehen, für *Carrier*- und Tunnelproteine, aber auch für viele bisher nicht näher charakterisierte Proteine kodieren. Für Gene, die als besonders relevant im Kontext der Myogenese angesehen wurden und die im Zuge der Arbeit detaillierter untersucht wurden, wurde die differentielle Expression mittels qPCR (*quantitative real-time PCR*)- oder *Northern Blot*-Analyse verifiziert.

Da im *Microarray* eine Vielzahl von Proteinen nachgewiesen werden konnte, die im Zusammenhang mit der Immunantwort stehen, darunter auch Interleukin 17B und CIITA, welches eine essentielle Rolle bei der Expression der MHC-Klasse II Gene besitzt, wurde die Expression weiterer für Zytokine

kodierender Gene nach Hemmung der *skNAC*-Expression getestet. Hierbei zeigte sich auch für *IL4*, *IL6* und *INF γ* eine *skNAC*-abhängige Regulation.

Weiterhin erfolgte die Expressionsanalyse von Genen, die im Zusammenhang mit metabolischen Muskeleigenschaften und Fasertypspezifikation stehen, da mehrere Publikationen Hinweise darauf lieferten, dass *skNAC* an diesen Prozessen beteiligt sein könnte (Yotov und St-Arnaud, 1996a; Park *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu den im Vorfeld publizierten Daten, die demonstrierten, dass die Überexpression von *skNAC* in murinen Myoblasten bzw. die Hemmung der *skNAC*-Expression in murinen Herzen die Promotoraktivität des Myoglobingens induzieren kann bzw. die Myoglobinexpression vermindert, konnte in der vorliegenden Studie kein negativer Effekt auf die Expression des Myoglobingens nach Unterdrückung der *skNAC*-Expression in murinen Myoblasten nachgewiesen werden. Ebenso zeigte die Analyse der Fasertypverteilung nach Hemmung der *skNAC*-Expression in C2C12-Zellen keine Transformation hin zu mehr glykolytischen Fasern, wie nach *knockout* von *skNAC* in Mäusen am Soleusmuskel beobachtet. Vielmehr ließ sich durch Expressionstudien auf RNA- und Proteinebene nachweisen, dass es in C2C12-Zellen nach Hemmung der *skNAC*-Genexpression eher zu einem *Shift* hin zu einem mehr oxidativen Phänotyp kommt. Dieser Befund wurde dahingehend weiter untermauert, als dass auch eine erhöhte Expression verschiedener mitochondrialer Markergene nachgewiesen werden konnte.

Um der Frage nachzugehen, ob für die Transkriptionskontrolle des *skNAC*-Smyd1-Komplexes möglicherweise die durch die SET-Domäne von Smyd1 vermittelte Methylierung von Histonen verantwortlich sein könnte, wurde das globale H3K4me2-Methylierungsmuster nach Hemmung der Expression beider Gene untersucht. Es wurde zunächst die Untersuchung des H3K4me2-Methylierungsmuster ausgewählt, da im Vorfeld dieser Arbeit publizierte Daten eher dafür sprachen, dass zumindest Smyd3 die Übertragung von zwei bzw. drei Methylgruppen katalysiert (Kim *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2011; Foreman *et al.*, 2011). Der verwendete ELISA zeigte, dass nach Inhibierung von *Smyd1* und auch von *skNAC* die globale H3K4me2-Methylierung vermindert war. *Western Blot*-Analysen mit spezifischen H3K4me1-, H3K4me2- und H3K4me3-Antikörper lieferten weitere Hinweise darauf, dass tatsächlich Histonmodifikationen bei der Smyd1-assoziierten Regulation der Genexpression eine Rolle spielen könnten, da vor allem für H3K4me2 und H3K4me3 eine verminderte Expression in den Smyd1-siRNA-transfizierten Zellen beobachtet werden konnte. Aufbauend auf die bisher erwähnten Daten wurden Chromatin-Immunopräzipitations (ChIP)-Analysen mit H3K4me2- und H3K4me3-spezifischen Antikörpern an den Promotoren ausgewählter *skNAC*- und *Smyd1*-Zielgene durchgeführt. Diese Analysen zeigten, dass es bei einigen der untersuchten Gene, wie beispielsweise bei Calpain 1, nach Repression oder Überexpression von Wildtyp-*Smyd1* und von *Smyd1*, welches eine Mutation innerhalb der für die Methylierungsfunktion wichtigen SET-Domäne beinhaltet, tatsächlich zu einer Veränderung des Methylierungsmusters kommt. Während nach

Hemmung der *Smyd1*-Expression bei beiden ChIP-Analysen (H3K4me2 und H3K4me3) ein ähnlicher Effekt auf den entsprechenden Methylierungsstatus zu beobachten war, zeigten die Ergebnisse der Überexpressionsstudien dagegen keine signifikanten Effekte in Bezug auf den H3K4me3-Status bei allen untersuchten Promotorregionen. Auch wenn weitere Versuche folgen müssen, lieferten diese Untersuchungen erstmals einen Hinweis darauf, dass *Smyd1*, zumindest in Säugetieren, durch Modifizierung der Histonmethylierung direkt die Expression von Genen beeinflussen könnte. Außerdem zeigte ein zusätzlich durchgeführter HDAC-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), dass vermutlich auch dieser epigenetische Mechanismus an der durch *Smyd1* vermittelten Genregulation beteiligt ist, da eine Unterdrückung der *Smyd1*-Expression in C2C12-Zellen die globale HDAC-Aktivität zu senken scheint.

2.3.2 Manuskript

Berkholz, J., Orgeur M., Stricker S., Munz B.

skNAC and *Smyd1* in transcriptional control.

Exp. Cell Res. 2015, 336, 182-91.

doi: 10.1016/j.yexcr.2015.06.019

2.4 Manuskript 4: The E3 SUMO ligase Nse2 regulates sumoylation and nuclear-to-cytoplasmic translocation of skNAC-*Smyd1* in myogenesis

2.4.1 Zusammenfassung

Im Jahr 2002 konnten Sims und Kollegen erstmals demonstrieren, dass skNAC eine Interaktion mit dem SET- und MYND-Domänen beinhaltenden Protein *Smyd1* eingeht. Das *skNAC*- und das *Smyd1*-Gen zeigen während der Differenzierung muriner Myoblasten eine ähnliche Expressionskinetik; weiterhin translozieren sowohl skNAC als auch *Smyd1* im Verlauf der Differenzierung vom Nukleus ins Zytosol (Sims *et al.*, 2002): Während in frühen Myozyten skNAC und *Smyd1* hauptsächlich im Kern vorkommen, befindet sich ein Großteil der Proteine in reifen Myozyten im Zytoplasma. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie dieser Transport aus dem Kern reguliert wird. Dabei zeigte sich, dass „Sumoylierung“ hier eine entscheidende Rolle spielt. Der Begriff Sumoylierung bezeichnet spezielle posttranslationale Modifikationen, bei denen kleine Proteine, sogenannte SUMOs (*small ubiquitin related modifier*), in drei enzymatischen Schritten kovalent an Lysinreste von Proteine geknüpft werden. Im Gegensatz zur Ubiquitinierung werden Proteine dabei nicht zum Abbau im Proteosom markiert, sondern können eine Reihe von biologischen Prozessen beeinflussen. SUMO-

Reste können auch durch spezifische Proteasen wieder entfernt werden. Neben einer Beeinflussung von Genexpression und Proteinstabilität spielt Sumoylierung vor allem auch bei Transportprozessen in und aus dem Zellkern eine Rolle (Garcia-Dominguez und Reyes, 2009; Hannoun *et al.*, 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zunächst *in vitro* gezeigt werden, dass skNAC eine Bindung mit der E3-SUMO-Ligase Nse2 eingeht. Nse2 stellt das Säugerhomologe des Hefeproteins MMS21 dar, das bereits recht gut charakterisiert ist. So ist MMS21 an DNA-Reparaturprozessen, an der DNA-Rekombination, an der Schwesterchromatid-Kohäsion und an der Integrität der Telomere beteiligt (Potts, 2009; Stephan *et al.*, 2011). Über mögliche Funktionen des Homologs Nse2, speziell in Skelettmuskelzellen, war jedoch vor Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Daher wurden zunächst die Regulation der Nse2-Expression, die intrazelluläre Lokalisation des Nse2-Proteins, sowie sein Einfluss auf die Myogenese in murinen Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Nse2-Expression im Laufe der Myoblastendifferenzierung abnimmt, dass Nse2, ähnlich wie der skNAC-Smyd1-Komplex, im Verlauf der Myogenese aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert wird, und dass die Expression spezifischer myogener Markergene bei Inhibierung von Nse2 reprimiert wird. Außerdem konnte eine Hemmung der Expression spezifischer skNAC-Zielgene nachgewiesen werden, darunter Calpain 1. Ähnlich wie in skNAC-defizienten Zellen konnten auch in Nse2-defizienten Zellen Störungen der Sarkomerogenese beobachtet werden, welche durch zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem Calpaininhibitor ALLN kompensiert wurden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Effekte auf die Sarkomerogenese - wie nach einer Hemmung der skNAC - oder der Smyd1-Expression - vor allem das Resultat einer überschießenden Calpain-Produktion sind. Zudem führte das Ausschalten von Nse2 zu einer verminderten Translokation sowohl von skNAC als auch von Smyd1 aus dem Zellkern ins Zytosol während späterer Differenzierungsstadien. Ferner war auffällig, dass Nse2 im Zellkern in immunfluorimetrisch anfärbbaren fokalen Strukturen (etwa 6-10 Punkte pro Zellkern) lokalisiert war, wobei eine Kolokalisation mit skNAC/Smyd1 beobachtet wurde. Durch Koimmunfluoreszenzstudien konnte demonstriert werden, dass es sich bei diesen Strukturen um sogenannte PML (*Promyelocytic Leukemia*)-Körperchen handelt. PML-Körperchen stellen subnukleäre Multiproteinkomplexe dar, welche verschiedene nukleäre Funktionen, wie Replikation, Transkription, DNA-Reparaturprozesse und epigenetische Veränderungen beeinflussen (Lallemand-Breitenbach und de Thé, 2010). Weiterhin stellen sie Bereiche dar, an denen Sumoylierungsvorgänge stattfinden. Neben PML selbst und Sp100 stellt SUMO1 ein konstitutives Protein innerhalb dieses Komplexes dar. Insgesamt sprechen die Daten dafür, dass eine Nse2-abhängige Sumoylierung des skNAC-Smyd1-Komplexes wichtig für den Transport der beiden Proteine aus dem Kern ins Zytosol ist. In Einklang damit konnte eine Inhibition des Kern-Austransports von skNAC und Smyd1 auch nach Hemmung der globalen Sumoylierung gezeigt werden. Dafür wurde zum einen das bisher einzige bekannte SUMO-konjugierende E2-Enzym Ubc9 mithilfe von spezifischen siRNAs ausgeschaltet und zum anderen die

Zellen mit Ginkgolsäure, einem generellen Sumoylierungs-Inhibitor, behandelt. Eine globale Inhibierung der Sumoylierung führte weiterhin zu einer Hemmung der Myogenese allgemein, gekennzeichnet durch eine verminderte Menge an vielkernigen Myozyten und einer verringerten Expression vieler myogenen Differenzierungsmarker. Bei der Suche nach dem möglichen Zielsubstrat der E3-SUMO-Ligase Nse2 innerhalb des skNAC-Smyd1-Komplexes zeigte sich anhand von Sequenzstudien, dass Smyd1, im Gegensatz zu skNAC, ein charakteristisches Sumoylierungs-Konsensus-Motiv (LKDD) aufweist. Mittels Koimmunopräzipitationsexperimenten und speziellen Sumoylierungsassays konnte gezeigt werden, dass in Skelettmuskelzellen tatsächlich sumoyliertes Smyd1 vorkommt und dass dessen Konzentration durch Inhibierung der Nse2-Expression oder durch Koexpression des für die SUMO-Protease *SuPr1* kodierenden Gens gesenkt wird. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Smyd1 Nse2-abhängig sumoyliert wird, was wesentlich für die Translokation des skNAC-Smyd1-Komplexes vom Zellkern ins Zytosol zu sein scheint.

2.4.2 Manuskript

Berkholz, J., Michalick, L., Munz, B.

The E3 SUMO ligase Nse2 regulates sumoylation and nuclear-to-cytoplasmic translocation of skNAC-Smyd1 in myogenesis.

J. Cell Sci. 2014, 127, 3794-804.

doi: 10.1242/jcs.150334

2.5 Manuskript 5: Overexpression of the *skNAC* gene in human rhabdomyosarcoma cells enhances their differentiation potential and inhibits tumor cell growth and spreading

2.5.1 Zusammenfassung

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, zu untersuchen, ob skNAC bei der Pathogenese des Rhabdomyosarkoms eine Rolle spielt. Rhabdomyosarkome sind vornehmlich im Kindesalter auftretende Tumorerkrankungen, die auf partiell differenziertes Muskelgewebe zurückzuführen sind. In der vorliegenden Studie wurde daher mit verschiedenen Rhabdomyosarkomzelllinien gearbeitet, darunter die bereits gut charakterisierten drei embryonalen Zelllinien RD/12, RD/18 und CCA und die ebenfalls weitreichend untersuchte alveolaere Zelllinie Rh30.

Um erste Daten zu den *skNAC*-Expressionsmustern in den untersuchten Zelllinien zu erhalten, wurde bei diesen zunächst *in vitro* die Differenzierung initiiert. Dabei ist anzumerken, dass der Begriff der Differenzierung hier nur bedingt zutrifft, da Rhabdomyosarkomzellen zwar initiale Schritte der Differenzierung durchlaufen, aber normalerweise nicht mehr die Fähigkeit besitzen vollständig

terminal zu differenzieren. Um den ordnungsgemäßen Ablauf des Differenzierungsprozesses zu überprüfen, wurde dieser lichtmikroskopisch und anhand der Expression spezifischer Differenzierungsmarker kontrolliert. Daran anschließend erfolgte die Untersuchung der *skNAC*-Expression in den differenzierenden Rhabdomyosarkomzelllinien. Interessanterweise zeigte sich, dass die *skNAC*-Expression in den Zelllinien RD/12 und RD/18, ähnlich wie in nichttransformierten C2C12-Muskelzellen, nach etwa 48 Stunden induziert wird, wohingegen diese Induktion bei den anderen beiden Zelllinien, CCA und Rh30, ausblieb. Bei diesen Zelllinien konnte zudem nahezu keine Basalexpression von *skNAC* nachgewiesen werden. Aufgrund dieses Befundes und der bereits beschriebenen Annahme, dass es sich bei *skNAC* um einen Faktor handelt, der die myogene Differenzierung steuert, entwickelte sich die Hypothese, dass eine Überexpression des *skNAC*-Gens möglicherweise das Differenzierungspotential von CCA- und Rh30-Zellen steigern könnte. Daher wurde das *full-length-skNAC*-Gen in diesen beiden Zelllinien überexprimiert. Dabei zeigte sich, dass *skNAC*-überexprimierende Zellen nach circa 48 Stunden eine deutlich geringere Zelldichte aufwiesen als Kontrollzellen, obwohl gleich viele Zellen am Anfang des Experimentes ausgesät worden waren. Um die Teilungsrate der Zellen zu überprüfen, wurde die BrdU (Bromdesoxyuridin)-Methode angewandt, die zeigte, dass die *skNAC*-überexprimierenden Zellen tatsächlich eine deutlich verminderte Proliferationsrate im Vergleich zu den Kontrollzellen aufwiesen. Zudem konnte eine gesenkte Expression des Proliferationsmarker Ki-67 in den Zellen beobachtet werden. Zellzyklus-Untersuchungen untermauerten dieses Ergebnis, da diese darstellten, dass die *skNAC*-überexprimierenden Zellen durch eine verminderte Expression des für das Zellzyklus-Protein Cyclin D2-kodierenden Gens und eine gesteigerte Expression des *p21*-Gens, welches für einen Zellzyklus-Inhibitor kodiert, gekennzeichnet sind. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass auch eine gesteigerte Apoptoserate dazu beiträgt, da ein Caspase-3-Aktivitäts-Assay eine um 50% erhöhte Caspase-Aktivität in den mit dem *skNAC*-Expressionskonstrukt transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen dokumentierte. Trotz der geringeren Zelldichte fiel bereits lichtmikroskopisch auf, dass die *skNAC*-überexprimierenden Rh30-Zellen, in deutlich höherem Ausmaß als die Kontrollen, nach einigen Tagen im Differenzierungsmedium lange, spindelförmige, mehrkernige Strukturen bildeten. Die Analyse myogener Differenzierungsmarker deutete ferner darauf hin, dass durch Überexpression von *skNAC* das Differenzierungspotential von Rh30-Zellen gesteigert werden kann. Aufgrund des engen inversen Zusammenhangs zwischen Differenzierungspotential und der Befähigung zur Metastasierung bei Rhabdomyosarkomzellen (Lollini *et al.*, 1991), wurde in einem *Softagar*assay die Malignität der *skNAC*-überexprimierenden Zellen untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass diese deutlich weniger als entsprechende Kontrollen dazu befähigt waren, im *Softagar* zu wachsen und Kolonien zu bilden. Dies spricht dafür, dass ihr Metastasierungspotential tatsächlich eingeschränkt ist. Insgesamt zeigen die Daten der Studie, dass Überexpression von *skNAC*

das Differenzierungspotenzial bestimmter Rhabdomyosarkomzelllinien steigern kann und dabei gleichzeitig deren Fähigkeit zur Metastasenbildung verringert. Diese Ergebnisse könnten somit einen ersten Schritt in Richtung eines neuen therapeutischen Ansatzes darstellen.

2.5.2 Manuskript

Berkholz, J., Kuzyniak, W., Hoepfner, M., and Munz, B.

Overexpression of the *skNAC* gene in human rhabdomyosarcoma cells enhances their differentiation potential and inhibits tumor cell growth and spreading.

Clin. Exp. Metastasis, 2014, 31, 869-79.

doi: 10.1007/s10585-014-9676-z

3. Diskussion

Die Myogenese, der Vorgang, bei dem aus mesenchymalen Vorläuferzellen differenzierte Muskelfasern entstehen, wird durch eine Vielzahl von Faktoren genau koordiniert (Übersicht bei Bentzinger *et al.*, 2012). Im Laufe der letzten 100 Jahre wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, die maßgeblich zum Verständnis dieses komplexen Vorgangs beigetragen haben. Mittlerweile sind eine Vielzahl von myogenen Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen als Regulatoren der Myogenese bekannt, doch noch immer werden permanent neue Moleküle entdeckt, die eine Rolle bei der Skelettmuskelentwicklung spielen. Die Herz- und Skelettmuskel-spezifischen Proteine Smyd1 und skNAC wurden von Hwang und Gottlieb (1995, 1997) und Yotov und St-Arnaud (1996a) etwa zeitgleich entdeckt. Einige Jahre später wurde dann die Interaktion beider Proteine in Muskelzellen beschrieben (Sims *et al.*, 2002). Die im Vorfeld dieser Arbeit publizierten Studien zu skNAC und Smyd1 lieferten bereits Hinweise darauf, dass beiden Proteinen eine entscheidende Funktion bei der Muskelentwicklung zukommt. Die zugrundeliegenden Mechanismen waren jedoch völlig unbekannt und wurden daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

3.1 Regulation der skNAC-Expression

Über die Regulation der skNAC-Expression war vor Beginn dieser Arbeit nichts bekannt gewesen. Allerdings konnte für das *Smyd1*-Gen, welches für den skNAC-Interaktionspartner Smyd1 kodiert, im Vorfeld dieser Arbeit bereits eine Regulation auf transkriptioneller Ebene durch den myogenen Regulationsfaktor Myogenin sowie durch den *Serum response factor* (SRF), einem weiteren wichtigen Transkriptionsfaktor der Myogenese, nachgewiesen werden (Phan *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009b). Sowohl bei der Regulation der skNAC- als auch der *Smyd1*-Expression spielt interessanterweise neben der transkriptionellen Kontrolle noch ein anderer Regulationsmechanismus eine Rolle: Das alternative Spleissen. Dieser Vorgang führt zu der Expression gewebsspezifischer Varianten. Alternatives Spleissen ist im Muskel kein ungewöhnlicher Vorgang, so existieren beispielsweise drei Isoformen des FHL (*Four and a half LIM domain*)-Proteins, die durch alternatives Spleissen des Primärtranskripts entstehen und in unterschiedlichen Geweben, so auch dem Skelettmuskel, vorkommen. Weitere bekannte Beispiele für alternatives Spleissen von für Muskelproteine kodierende Transkripte sind: Tropomyosin, Troponin und Titin (Übersicht bei Schiaffino und Reggiani, 1996). Wie genau das alternative Spleissen von skNAC und Smyd1 reguliert wird, das im Fall von skNAC zu dem Einspleissen eines relativ großen, 6kb langen Exons führt, ist bisher unklar. Interessant ist, dass sowohl α NAC als auch β NAC zusätzlich zu der Herz- und Skelettmuskel-spezifischen Spleissvariante skNAC im

quergestreiften Muskel existieren und zumindest α NAC im Skelettmuskel eher eine hemmende Wirkung auf die Myogenese ausübt (Yotov und St-Arnaud, 1996a).

3.1.1 Die *skNAC*-Expression wird auf transkriptioneller Ebene unter Beteiligung des p38 MAPK-Signalweges reguliert

Für *skNAC* konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit, wie bereits für *Smyd1* im Vorfeld gezeigt, eine Regulation auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden (Phan *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009b). Im Gegensatz zu *Smyd1* wurden jedoch innerhalb des *skNAC*-Gens bisher keine regulatorischen DNA-Sequenzen beschrieben, an die myogene Transkriptionsfaktoren binden könnten. Im Zuge der vorliegenden Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass der p38 MAPK-Signalweg an der transkriptionellen Regulation der *skNAC*-Expression beteiligt ist. Dieser Signalweg ist für den regelgerechten Ablauf der Skelettmuskeldifferenzierung essentiell, wie im Vorfeld dieser Arbeit bereits mehrfach beschrieben wurde (Übersichten bei Keren *et al.*, 2006; Lluís *et al.*, 2006; Perdiquero *et al.*, 2007). Verschiedene Studien belegen dabei, dass die Aktivität der p38-Kinase im Verlauf der Myogenese zunimmt und für die vollständige Ausdifferenzierung und Fusion der Muskelzellen notwendig ist (Cuenda and Cohen, 1999; Zetser *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000). Dabei scheint p38 vor allem für den ordnungsgemäßen Ablauf späterer Stadien der Muskeldifferenzierung wichtig zu sein, insbesondere durch Einfluss auf die Expression muskelspezifischer Gene (Keren *et al.*, 2006). Daher reguliert *skNAC*, als p38-Zielgen, vermutlich eher spätere Differenzierungsstadien. Die während dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen jedoch keine Schlussfolgerung darüber zu, ob die *skNAC*-Expression direkt oder indirekt durch den p38 MAPK-Signalweg beeinflusst wird. Um dies feststellen zu können, müssten weitere Untersuchungen folgen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *skNAC* bei der myogenen Differenzierung nicht zu den sogenannten *primary response*-Genen gehört, dass also die *de novo*-Synthese von Proteinen wie z.B. von Transkriptionsfaktoren erforderlich ist, um die *skNAC*-Expression zu induzieren. Auch dieses Ergebnis passt gut zu einem Denkmodell, bei dem *skNAC* nicht an der Regulation der initialen Schritte der Differenzierung beteiligt ist, sondern eher spätere Phasen der Myogenese koordiniert. Unterstützt wird diese Annahme auch durch den Befund, dass eine Überexpression von *skNAC* in C3H10T1/2-Fibroblasten keinen Einfluss auf den Phänotyp der Zellen hat (Yotov und St-Arnaud, 1996a) und somit *de novo* selbst nicht in der Lage ist das myogene Differenzierungsprogramm zu initiieren, wie es beispielsweise den Mitglieder der Familie der myogenen Regulationsfaktoren (MRFs) möglich ist (Übersicht bei Olson und Klein, 1994; Rudnicki *et al.*, 2008).

3.2 Funktion von skNAC und Smyd1 im Skelettmuskel

Für skNAC und auch für Smyd1 konnte im Verlauf der Myogenese eine Translokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma der Muskelzellen nachgewiesen werden (Sims *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Tatsache wird angenommen, dass die beiden Proteine während verschiedener Stadien der Myogenese unterschiedliche Aufgaben innerhalb dieser beiden subzellulären Kompartimente erfüllen. Frühere Studien unterstützen diese Hypothese dahingehend, als dass sie zum einen für eine Rolle der beiden Proteine als Transkriptionsfaktoren bzw. transkriptionelle Koaktivatoren sprechen – eine potentielle nukleäre Funktion - und zum anderen auch einen Einfluss sowohl von skNAC als auch von Smyd1 auf die Sarkomerogenese beschreiben, welche im Zytoplasma abläuft (Yotov und St-Arnaud, 1996a; Gottlieb *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009a,b; Just *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2014). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher zum einen genauer untersucht, welche Funktionen skNAC und Smyd1 in Skelettmuskelzellen haben, zum anderen wurde die Translokation der beiden Proteine vom Nukleus ins Zytoplasma mechanistisch analysiert.

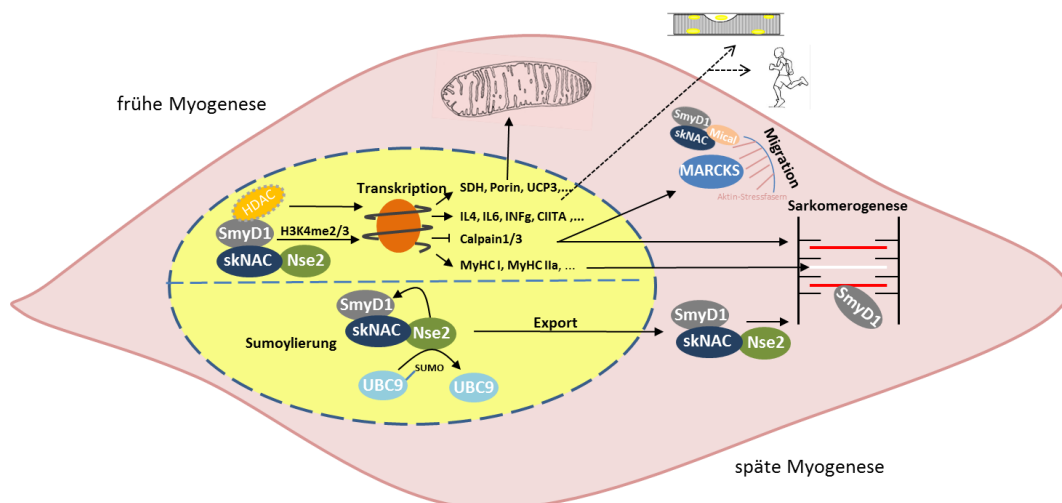


Abbildung 5: Hypothetisches Modell über die Funktionen von skNAC und Smyd1 in Skelettmuskelzellen.

skNAC und Smyd1 durchlaufen im Zuge der Myogenese einen Transportprozess aus dem Kern in das Zytoplasma. Es wird daher vermutet, dass diese duale Funktionen innerhalb der verschiedenen Kompartimente erfüllen. Im Kern steuern sie möglicherweise als transkriptionelle Modulatoren die Expression spezifischer Gene. Dabei könnte vor allem der SET- und der MYND-Domäne von Smyd1 eine wichtige Rolle zukommen, wobei erstere als Histon-Methyltransferase wirken und letztere HDACs rekrutieren kann. Durch skNAC regulierte Gene sind z.B. die Calpaingene, verschiedene fasertypspezifische Gene, metabolische Markergene und Gene, die für Zytokine kodieren. Somit könnte skNAC Prozesse wie Sarkomerogenese, Migration, Fasertypspezifität, Energiehaushalt, Regeneration nach Verletzung oder Trainingsanpassung beeinflussen. Der zu einem späteren Differenzierungszeitpunkt stattfindende Transport des skNAC-Smyd1-Komplexes aus dem Zellkern wird vermutlich durch Sumoylierung von Smyd1 kontrolliert. Diese Modifikation wird maßgeblich durch die E3-SUMO-Ligase Nse2 gefördert. Im Zytoplasma interagiert Smyd1 physikalisch mit Myosin und könnte dadurch möglicherweise direkt an der Regulation der Sarkomerogenese beteiligt sein. Abbildung modifiziert nach Berkholtz *et al.*, 2014a.

3.2.1 Inhibierung von *skNAC* hat keinen Effekte auf die Expression myogener Differenzierungsmarker oder die Bildung von Myozyten und Myotuben

Die Daten der ersten zu *skNAC* publizierten Studie (Yotov und St-Arnaud, 1996a) lieferten einen Hinweis darauf, dass *skNAC* ein positiver Regulator der Myogenese sein könnte. Als Grundlage dieser Hypothese dienten Überexpressionsstudien des *skNAC*-Gens in C2C12-Zellen, wobei die Überexpression zu einer frühzeitigen Fusion der Zellen und zur Ausbildung sogenannter *Myosacs*, d.h. sehr breiter, vielkerniger Myotuben, führte. Daher wurde im Verlauf dieser Arbeit zunächst getestet, inwieweit eine Hemmung der *skNAC*-Expression in C2C12-Zellen unter Verwendung spezifischer siRNAs das Differenzierungspotential dieser Zellen beeinflusst. Erstaunlicherweise konnte weder morphologisch noch in Bezug auf die Expression bekannter myogener Differenzierungsmarker, wie beispielsweise Myogenin und *MyHC*, ein Effekt des *skNAC-knockdowns* beobachtet werden. Die transfizierten- und die Kontrollzellen wiesen zudem ähnliche Fusions- und Differenzierungsindizes auf. Dies zeigt, dass auch spätere Phasen der Myogenese nicht beeinträchtigt waren. Interessanterweise wurden im Vorfeld der Arbeit analoge Ergebnisse in Bezug auf Untersuchungen an *Smyd1* erhalten: Überexpression von *Smyd1* in C2C12-Zellen lieferte Hinweise darauf, dass *Smyd1* als ein Induktor der Myogenese fungiert (Li *et al.*, 2009b), während eine Hemmung der *Smyd1*-Expression mittels eines *antisense*-Oligonukleotid-vermittelten Ansatzes keinen Effekt auf die Expression zumindest früher myogener Regulationsfaktoren hatte (Tan *et al.*, 2006). An dieser Stelle muss aber darauf hingewiesen werden, dass *knockdown*-Studien von *Smyd1* bisher nur im Zebrafischmodellsystem durchgeführt wurden und daher nur bedingt mit den *skNAC*-Daten vergleichbar sind. Jedoch deuten neuere unveröffentlichte Studien (Berkholz und Munz) an C2C12-Zellen an, dass auch eine Hemmung der *Smyd1*-Expression in Säugetieren keinen Einfluss auf die Expression myogener Differenzierungsmarker ausübt. Eine mögliche Ursache für den Befund, dass sowohl in Bezug auf *skNAC* als auch auf *Smyd1* eine Hemmung der Genexpression im Gegensatz zu einer Überexpression keinen Effekt auf das Differenzierungsverhalten der Zellen zeigt, könnte darin begründet liegen, dass die Hemmung mittels siRNA, aber auch Morpholino Oligos, meist nicht ganz vollständig verläuft. Dadurch sind die entsprechenden Proteine immer noch in geringen Konzentrationen in der Zelle vorhanden, was möglicherweise ausreichen könnte, damit diese ihre spezifische Funktion erfüllen können.

3.2.2 skNAC übt im murinen System, ähnlich wie im Zebrafisch-Modellsystem, einen Einfluss auf die Sarkomerogenese aus

Ein erster Hinweis darauf, dass skNAC, ähnlich wie Smyd1, an der Regulation der Sarkomerogenese beteiligt sein könnte, ergab sich aus einer Studie an Zebrafisch-Embryonen. Bei dieser wurde die *skNAC*-Expression mittels genspezifischer Morpholino Oligos gehemmt: Die *skNAC*-defizienten Tiere wiesen keine organisierten Sarkomere auf (Li *et al.*, 2009a). Da sich Zebrafisch- und Säuger-skNAC jedoch sehr stark unterscheiden und auch Unterschiede bezüglich der subzellulären Lokalisation der beiden Proteine beschrieben wurden (Sims *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2009a), wurde der Frage nachgegangen, ob skNAC auch in Säugetieren einen Einfluss auf die Sarkomerogenese ausübt (Berger *et al.*, 2010). Vergleichbar zum Zebrafischmodell konnte in der vorliegenden Arbeit auch in murinen Zellen eine kritische Rolle des skNAC-Proteins bei der Organisation der dicken und dünnen Filamente, jedoch kein oder nur ein geringer Einfluss auf die Organisation der Z-Scheibe und der M-Bande beobachtet werden. Bei Immunfluoreszenz-Untersuchungen in Hinblick auf die dünnen und dicken Filamente Aktin und Myosin fiel auf, dass die typische homogene, aus vielen kleinen Foci bestehende Färbung der Kontrollzellen, welche charakteristisch für sich neu formierende Sarkomere ist, in Zellen, welche mit skNAC-spezifischer siRNA transfiziert worden waren, fast vollständig ausblieb. Die transfizierten Zellen waren dagegen durch eine auffällig starke Färbung nahe der Zytoplasmamembran und eine nur schwache Färbung des Zytosols gekennzeichnet. Ein ähnliches Aktin- und Myosin-Färbemuster wurde bereits in anderen Kontexten beschrieben und ist wahrscheinlich für eine gestörte Inkorporation der Filamente in das Sarkomer charakteristisch (Srikakulam und Winkelmann, 2004; Kontrogianni-Konstantopoulos *et al.*, 2006; McGrath *et al.*, 2006). Aufbauend auf diese Ergebnisse wäre es in Zukunft aufschlussreich, zu untersuchen, ob noch weitere Sarkomer- oder Sarkomer-assoziierte Proteine, wie beispielsweise das wichtige Strukturprotein Titin, nach Hemmung der *skNAC*-Expression nicht mehr korrekt ins Sarkomer inkorporiert werden können. Vor diesem Hintergrund ist zudem interessant, dass eine kürzlich erschienene Publikation neben den bereits bekannten Effekt des Smyd1-Proteins auf den Aufbau der dicken und dünnen Filamente auch beschreibt, dass die Z-Scheibe und M-Bande in Smyd1(b)-defizienten Zebrafisch-Embryos betroffen sind (Li *et al.*, 2013).

3.2.3 skNAC übt keinen signifikanten Einfluss auf die Expression spezifischer Gene aus, welche für molekulare Chaperone oder Ubiquitin-Ligasen kodieren

Der molekulare Mechanismus, der hinter dem Einfluss von skNAC auf Myofibrillogenese und Sarkomerogenese steht, war vor Beginn dieser Arbeit noch völlig unklar. Li *et al.*, 2009a, vermuteten,

dass skNAC, ähnlich wie der α/β NAC-Komplex, als eine Art molekulares Chaperon fungiert, welches für die Faltung bzw. die Stabilisation neusynthetisierter Sarkomerproteine, speziell Myosin, und deren Einbau ins Sarkomer, wichtig ist, oder aber bereits die Translation dieser Proteine beeinflusst (Li *et al.*, 2009a). Unterstützt wurde diese Hypothese durch den Befund, dass eine Hemmung der *skNAC*-Expression in Zebrafisch-Embryonen zu einem verminderten MyHC-Proteingehalt führt, obwohl die Transkriptionsrate des entsprechenden Gens mit der in Wildtyp-Embryonen vergleichbar war (Li *et al.*, 2009a). Ähnliche Befunde ergaben sich auch in *Smyd1-knockout*-Embryonen (Li *et al.*, 2013). Bei den in dieser Arbeit als Modellsystem verwendeten murinen Myoblasten war die absolute Menge an Myosin-Protein dagegen nach Hemmung der *skNAC*-Expression nicht reduziert. Es wurden dagegen eher leicht erhöhte Myosin-Proteinmengen beobachtet, wobei die Konzentration des *MyHC*-Transkripts durch den *skNAC*-knockdown nicht beeinflusst wurde. Die erhöhte Myosinkonzentration spiegelt dabei möglicherweise einen kompensatorischen Mechanismus wider, der durch den fehlerhaften Einbau oder den verstärkten Abbau von Myosinfilamenten ausgelöst wird. Diese Daten sprechen insgesamt dagegen, dass skNAC für die Transkription von Genen, die für Sarkomerproteine kodieren, oder aber für die Translation der entsprechenden Transkripte erforderlich ist. Daher wurde in einem nächsten Schritt der ursprünglich schon von Li *et al.*, 2009a, aufgrund der am Zebrafisch-Modellsystem erhaltenen Daten aufgestellten Hypothese nachgegangen, dass skNAC entweder selbst ein molekulares Chaperon für Sarkomerproteine oder Sarkomer-assoziierte Proteine ist oder die Konzentration solcher Chaperone in der Zelle reguliert. Da die erste Teilhypothese, also die Annahme, dass skNAC selbst ein solches Chaperon ist, experimentell schwierig zu beweisen ist, wurde zunächst der Frage nachgegangen, ob skNAC die Expression von Genen beeinflusst, die für bekannte Sarkomer-assoziierte Chaperone kodieren. Hierfür wurde sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene die Expression einer Vielzahl solcher Gene in den mit skNAC-spezifischer siRNA-transfizierten Zellen untersucht. Dabei konnte kein Effekt des *skNAC-knockdowns* nachgewiesen werden. Lediglich für das *UNC45b*-Gen und das *Nedd4*-Gen, welche für einen „Myosinfaltungshelfer“ bzw. eine Ubiquitin-Ligase kodieren, konnte eine leicht verstärkte Expression auf RNA-Ebene registriert werden. Interessanterweise konnte eine gesteigerte Expression des *UNC45b*-Gens sowie auch des *Hsp90*-Gens, welches zu den Hitzeschockproteinen zählt und für ein essentielles molekulares Chaperon kodiert, kürzlich auch in *Smyd1*-defizienten Zebrafisch-Embryonen beobachtet werden (Li *et al.*, 2013). Hier führten die Ergebnisse verschiedener Experimente zu der Annahme, dass *Smyd1*, *UNC45b* und *Hsp90* einen trimeren Komplex bilden, welcher die Faltung des Myosinproteins und den Sarkomeraufbau reguliert. Ob ein ähnlicher Mechanismus in Säugerzellen besteht, ist noch unklar. Im Fall von skNAC sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aufgrund der geringen Effekte der *skNAC*-Depletion auf die *UNC45b*-Expression und der fehlenden Effekte auf die *Hsp90*-Expression jedoch eher gegen eine direkte funktionelle Assoziation mit diesen beiden Chaperonen.

3.2.4 skNAC beeinflusst über Regulation der Calpain-Aktivität die Sarkomerogenese

Auf der Suche nach weiteren mechanistischen Ansätzen, mit deren Hilfe eine mögliche Funktion von skNAC und Smyd1 bei der Sarkomerogenese erklärt werden könnte, ergab sich der experimentelle Befund, dass die Expression der für die Kalzium-abhängigen Proteasen Calpain 1 und 3 kodierenden Gene in den mit skNAC-spezifischer siRNA-transfizierten C2C12-Zellen erhöht war, was erwartungsgemäß mit einer erhöhten Calpain-Aktivität einherging. Zumindest für Calpain 3 ist in dem Zusammenhang bekannt, dass es auch Sarkomer- oder Sarkomer-assoziierte Proteine durch Spaltung beeinflusst (Duguez *et al.*, 2006; Beckmann und Spencer, 2008). Ein bekanntes Calpain 3-Substrat ist dabei das Sarkomerprotein Titin (Beckmann und Spencer, 2008). Aufbauend auf diese Daten konnte in der vorliegenden Arbeit durch zusätzliche Verwendung eines Calpain-Inhibitors gezeigt werden, dass der Einfluss des skNAC-Proteins auf die Sarkomerogenese Calpain-abhängig ist. Da der verwendete Calpain-Inhibitor ALLN zwar vorwiegend Calpain 1, aber auch Calpain 2, Cathepsin B und L sowie andere neutrale Cysteinproteasen und das Proteasom hemmt, kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass auch die proteolytische Aktivität dieser Proteine bzw. Proteinkomplexe eine Rolle bei der Regulierung der Sarkomerogenese durch skNAC spielt. Ähnliches gilt auch für den im nächsten Abschnitt beschriebenen, Calpain-vermittelten positiven Effekt einer skNAC-Depletion auf die Myoblastenmigration. Der Mechanismus, nach dem skNAC die transkriptionelle Expression von Calpain 1 und 3 reguliert, ist dabei noch nicht geklärt. Es gibt allerdings einige Hypothesen, denen im Zuge der vorliegenden Arbeit auch bereits zum Teil nachgegangen wurde und auf die in einem späteren Abschnitt (3.2.7) eingegangen wird.

3.2.5 Existieren weitere Mechanismen, auf deren Basis skNAC und Smyd1 die Sarkomerogenese beeinflussen könnten?

Auf der Basis des Befunds, dass die Regulation der Sarkomerogenese durch skNAC zumindest zum Teil über transkriptionelle Regulation, nämlich der Expression von Calpaingenen, erfolgt, ergibt sich die Frage, ob das Protein auch direkt einen Einfluss auf die Sarkomerogenese ausüben kann, insbesondere aufgrund der zytosolischen skNAC-Lokalisation während späterer Stadien der Myogenese. Zumindest für Smyd1 konnte darüber hinaus im Zebrafisch-Modellsystem eine Sarkomerassoziation demonstriert werden (Just *et al.*, 2011). Dabei war Smyd1 zunächst während früher Phasen der Sarkomerogenese im Bereich der A-Bande, kolokalisiert mit Myosin, zu finden. Später, nach Beendigung des Sarkomeraufbaus, konnte das Protein im Bereich der M-Linie gefunden werden. Weitere Experimente lieferten Hinweise darauf, dass Smyd1 und Myosin direkt miteinander interagieren und dass Smyd1 möglicherweise direkt durch Methylierung von Sarkomerproteinen wie

Myosin die Sarkomerogenese beeinflusst (Just *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). Aus diesem Grund wäre es interessant zu untersuchen, ob auch skNAC eine Sarkomer-assoziierte Lokalisation aufweist. Dies wäre durchaus denkbar, da eine Kolo­kalisierung von Smyd1 und skNAC während der Myogenese bereits gezeigt wurde (Sims *et al.*, 2002). Die erzielten Ergebnisse bezüglich der sarkomerischen Lokalisation des Smyd1-Proteins einerseits und der Kolo­kalisierung von skNAC und Smyd1 andererseits stammen aber aus unterschiedlichen Modellsystemen und sind daher möglicherweise nicht übertragbar. Bei C2C12-Zellen vergehen beispielsweise einige Tage, bis die Zellen *in vitro* vollständig differenziert sind, wohingegen im Zebrafisch-Embryo dieser Prozess nur einige Stunden dauert. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die intrazelluläre Lokalisation von skNAC im Zebrafisch und in murinen Myoblasten nicht identisch ist: Im Zebrafisch konnte skNAC nur im Zy­tosol nachgewiesen werden (Li *et al.*, 2009a), wohingegen skNAC in murinen Myoblasten aus dem Kern ins Zy­tosol transloziert (Sims *et al.*, 2002). Ähnliches konnte auch in Bezug auf den subzellulären Aufenthaltsort des Smyd1-Proteins beobachtet werden (Li *et al.*, 2011). Dabei wurde aber die Vermutung angestellt, dass der Nachweis von Smyd1 im Nukleus der Zebrafisch-Embryonen bisher nicht gelang, weil die Smyd1-Konzentration hier zu gering sein könnte, um detektiert werden zu können (Li *et al.*, 2011). Um dies zu testen, wurde das für die Zebrafisch-Smyd1-Isoform Smyd1b kodierende Gen in C2C12-Zellen überexprimiert. Bei diesen Experimenten ließ sich das Zebrafisch-Smyd1 in der Tat im Kern nachweisen, insbesondere dann, wenn zusätzlich ein Kerntransport-Inhibitor (Leptomycin B) zugegeben wurde. Schließlich konnten Just und Kollegen, im Widerspruch zu anderen Publikationen (Tan *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009b, Li *et al.*, 2013), Smyd1 nur in *fast-twitch*-Fasern, nicht aber in *slow-twitch*-Fasern nachweisen (Just *et al.*, 2011). Einige dieser kontroversen Befunde bezüglich der subzellulären Lokalisation des Smyd1-Proteins könnten möglicherweise neben der bereits angesprochenen Verwendung unterschiedlicher Modellsysteme, auch darin begründet sein, dass nicht immer die gleiche(n) Smyd1-Isoform(en) analysiert wurden. Grundsätzlich kann aber natürlich auch nicht ausgeschlossen werden, dass skNAC und Smyd1 im Zebrafisch und in Säugern eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation und möglicherweise auch Funktion besitzen. Dafür würde auch die geringe Konservierung zumindest der skNAC-Sequenz in den verschiedenen Spezies sprechen. Für eine funktionelle Redundanz der beiden Proteine spricht dagegen aber zumindest im Fall von Smyd1 das Ergebnis einer neuen Studie, wonach die durch *knockdown* von Smyd1b verursachten Muskeldefekte in Zebrafisch-Embryonen durch Einbringen des murinen Smyd1 kompensiert werden können (Gao *et al.*, 2014).

In weiteren Studien sollte ferner der Einfluss des skNAC-Proteins auf die Sarkomerogenese genauer analysiert werden. Dabei könnten in Zukunft elektronenmikroskopische Aufnahmen hilfreich sein, wobei es möglicherweise sinnvoll wäre, primäre Säugerm­yoblasten oder besser noch Gewebeschnitte zu verwenden, bei denen bekanntermaßen eine detailliertere Sarkomerstruktur ersichtlich ist als bei

Myoblasten-Zelllinien (Tagawa *et al.*, 2008; Rui *et al.*, 2010; Sander *et al.*, 2013, Franke *et al.*, 2014). Für ein besseres Verständnis der Smyd1-Funktion bei der Sarkomerogenese müssten zunächst Studien in Säugerzellen durchgeführt werden, um insbesondere auch die Frage zu beantworten, inwieweit eine Übertragbarkeit der Zebrafischdaten auf höhere Vertebraten gegeben ist. Aufbauend darauf sollte analysiert werden, ob skNAC und Smyd1 gemeinsam - hierfür sprechen die Bindung der beiden Proteine aneinander, ihre Kolokalisation und die ähnlichen Phänotypen der Zebrafisch-skNAC- und *Smyd1-knockdown*-Embryonen - die Sarkomerogenese beeinflussen.

3.2.6 skNAC reguliert auch die Myoblastenmigration - dabei sind ebenfalls Calpaine beteiligt

Für skNAC konnte in dieser Arbeit nicht nur ein Einfluss auf die Sarkomerogenese, sondern auch auf die Myoblastenmigration beschrieben werden. Dieser Befund ergab sich auf der Grundlage, dass Calpaine als potentielle Induktoren der Myoblastenmigration gelten (Dedieu *et al.*, 2003; Dedieu *et al.*, 2004), wobei jedoch etwas widersprüchlich ist, dass durch dieselbe Gruppe auch gezeigt werden konnte, dass Überexpression der Calpaingene zu einer Hemmung der Migration führt (Leloup *et al.*, 2006). Mechanistisch scheint eine Beeinflussung der Myoblastenmigration durch Calpaine hauptsächlich über eine regulierte Spaltung des Calpain-Substrates MARCKS zu erfolgen (Dedieu *et al.*, 2003). Dabei konnte gezeigt werden, dass es bei einem verminderten Expressionsniveau der Calpain 1- und 2-Gene zu einer Akkumulation von MARCKS an der Plasmamembran kommt, einhergehend mit einer erniedrigten Migrationsrate der C2C12-Zellen. An der Plasmamembran ist MARCKS an der Vernetzung von Aktinfilamenten und an der Anbindung dieser Filamente an die Zellmembran beteiligt (Thelen *et al.*, 1991; Hartwig *et al.*, 1992). Um den Zusammenhang zwischen der Ansammlung von MARCKS an der Plasmamembran und der Migration zu untersuchen, wurde *MARCKS* in den Zellen überexprimiert, was eine geringere Migration der Zellen zur Folge hatte (Dedieu *et al.*, 2003). Intaktes MARCKS scheint also tatsächlich die Myoblastenmigration zu hemmen, während eine Spaltung dieses Proteins, vermutlich zumindest u.a. durch Calpaine, die Zellmigration fördert. In mit skNAC-spezifischer siRNA-transfizierten Zellen, die, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, eine erhöhte Calpain-Aktivität und eine verminderte MARCKS-Proteinkonzentration aufweisen, konnte eine gesteigerte Migrationsrate im Gegensatz zu den Kontrollzellen beobachtet werden. Dieses erhöhte Migrationspotenzial war nach Verwendung des Calpain-Inhibitors ALLN nicht mehr vorhanden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass skNAC durch seinen Effekt auf die Calpainexpression nicht nur die Sarkomerogenese, sondern auch die Myoblastenmigration beeinflusst. Ein weiteres Protein, dem auch eine Beteiligung an der Regulation der Myoblastenmigration zukommen könnte, ist MICAL1. Dieses konnte erst kürzlich in einem Hefe-2-Hybrid-System als möglicher Bindungspartner des Smyd1-Proteins identifiziert werden (Park *et al.*,

2010). Es war im Zuge der vorliegenden Arbeit außerdem mittels Koimmunopräzipitationsexperimenten möglich, eine Interaktion von skNAC und MICAL1 in Mausmyoblasten nachzuweisen (Berkholz und Munz, unveröffentlichte Daten). Bisher ist wenig über die Funktion von MICAL1 in Säugetieren bekannt, jedoch weiß man, dass dieses Protein bei der Fruchtfliege eine wichtige Funktion als Regulator der Formation von Aktin-Stressfasern hat (Giridharan *et al.*, 2012). Weitere Versuche müssten folgen, um die genaue Funktion dieses Proteins in Myoblasten zu klären.

Zudem ist der Calpain-abhängige Effekt von skNAC auf die Myoblastenmigration auch im Kontext mit der publizierten Expression von *skNAC* nach Verwundung der quergestreiften Muskulatur und der damit einhergehenden Reparatur des Muskels interessant (Munz *et al.*, 1999). Der Skelettmuskel ist bei Reparaturprozessen auf die Migration von aktivierten Satellitenzellen (Myoblasten) angewiesen (Übersicht bei Goetsch *et al.*, 2013). Dabei konnte zum einen gezeigt werden, dass eine intakte Aktivität der Calpaine für die Wundheilung notwendig zu sein scheint und zum anderen beschreiben andere Publikationen auch einen Zusammenhang zwischen der Funktion von Satellitenzellen und dem Vorhandensein von Calpainen (Nassar *et al.*, 2012; Dargelos *et al.*, 2010; Stuelsatz *et al.*, 2010). Weiterhin konnten Park *et al.*, 2010, zeigen, dass *skNAC(-/-)*-Mäuse auch durch *Survival*-Defekte von Satellitenzellen gekennzeichnet waren. Auch hierbei könnten Calpaine eine Rolle spielen.

3.2.7 Die Regulation der Calpainexpression durch skNAC-Smyd1 erfolgt zumindest zum Teil auf der Basis von Histon-Modifikationen

Um der Frage nachzugehen, welcher Mechanismus der transkriptionellen Kontrolle der Calpaingene durch skNAC zugrunde liegt, wurde zunächst untersucht, ob ein Effekt auf die Calpainexpression auch nach *knockdown* der *Smyd1*-Expression in C2C12-Zellen zu beobachten ist. Dies war zumindest 72 Stunden nach Induktion der Differenzierung der Fall. Daher wurde spekuliert, dass möglicherweise die Fähigkeit des Smyd1-Proteins, mithilfe seiner SET-Domäne, Histonmodifizierungen durchzuführen, eine Rolle bei der Regulation der Transkription durch den skNAC-Smyd1-Komplex spielen könnte. Sowohl in Abhängigkeit davon, welche Lysinreste oder Argininreste an Histonen modifiziert werden, als auch davon, welche genaue Anzahl an Methylgruppen übertragen wird, kann durch eine Histonmethylierung die Transkription von Genen positiv oder negativ reguliert werden. Im Vorfeld dieser Arbeit war nur sicher bekannt gewesen, dass Smyd1 Methylgruppen auf das Lysin 4 von Histon 3 transferieren kann, nicht aber, wieviele Methylgruppen dabei übertragen werden (Tan *et al.*, 2006; Sirinupong *et al.*, 2010). Da zumindest für Smyd3 bereits im Vorfeld dieser Arbeit bekannt gewesen war, dass das Protein zwei bzw. drei Methylgruppen auf Lysin überträgt (Hamamoto *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2011, Foreman *et al.*, 2011), wurde im Rahmen der Arbeit zunächst ein H3K4me2-spezifischer ELISA durchgeführt, bei dem das globale H3K4me2-

Histonmethylierungsmuster von skNAC- und Smyd1-defizienten Zellen mit dem von Kontrollzellen verglichen wurde. Die anfängliche Hypothese einer Regulation der H3K4-Dimethylierung durch skNAC-Smyd1 wurde dabei durch die Ergebnisse des ELISAs unterstützt, da dieser zeigte, dass durch *knockdown* der *Smyd1*-Expression und auch in einem etwas geringeren Maße der *skNAC*-Expression, die globale H3K4me2-Methylierung in den Zellen gehemmt wird. Dies spricht, gemeinsam mit *Western Blot*-Ergebnissen, bei denen spezifische, gegen die verschiedenen H3K4-Methylgruppen gerichtete Antikörper verwendet wurden, dafür, dass Smyd1, möglicherweise in Zusammenarbeit mit skNAC, vor allem die Histon-Di- und -Tri-Methylierung katalysiert. Allerdings werden sowohl H3K4me2 als auch H3K4me3 eher mit aktiver Transkription als mit transkriptioneller Repression assoziiert, so dass die beobachtete Steigerung der Calpain 1- und auch die der *SRF*-Expression nach *knockdown* der *skNAC*- und *Smyd1*-Expression zunächst widersprüchlich erscheinen. Allerdings sind die Effekte von Histonmethylierungen bisher nur unzureichend verstanden und es ist wahrscheinlich, dass identische Methylierungsmuster in verschiedenen Kontexten unterschiedliche Effekte haben können (Deb *et al.*, 2014). Um die aufgestellte Hypothese einer transkriptionellen Kontrolle durch den skNAC-Smyd1-Komplex via Histonmodifizierung intensiver zu analysieren, wurden außerdem Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)-Experimente durchgeführt. Hierbei wurde insbesondere die Calpain 1-Promotorregion auf Veränderungen bezüglich des H3K4me2-Methylierungsmusters nach Hemmung der *Smyd1*-Expression bzw. nach Überexpression eines für Wildtyp-Smyd1 kodierenden Vektors und eines Vektors, welcher für eine Smyd1-Mutante, welche eine inaktivierende Mutation innerhalb der SET-Domäne aufweist, hin untersucht. Weiterhin wurden auch die Promotorregionen des *SRF*-, des *skNAC*- und des Calpain 3-Gens getestet. Dabei zeigten sich ähnliche Ergebnisse für die Calpain 1- und *SRF*-Promotorregionen: Hier konnte eine geringere H3K4-Di-Methylierung nach *knockdown* der *Smyd1*-Expression bzw. nach Überexpression des für die HMTase-defiziente *Smyd1*-Mutante kodierenden Gens registriert werden. An der Calpain 3-Promotorregion konnten dagegen nur minimale Effekte festgestellt werden, auch die Effekte auf den Methylierungsgrad der skNAC-Promotorregion waren gering. Zusätzlich wurde ein ChIP-Experiment mit einem H3K4me3-spezifischen Antikörper durchgeführt. Hierbei ergaben sich zum Teil ähnliche, zum Teil aber auch abweichende Ergebnisse im Vergleich zur H3K4me2-Analyse: So hatte beispielsweise weder eine Überexpression des unmutierten, noch des mutierten *Smyd1*-Gens einen Effekt auf die H3K4me3-Methylierung im Bereich der untersuchten Promotorregionen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der Grad der Überexpression bzw. die Sensitivität des Assays nicht ausreichen, um hier Effekte zu sehen. Allgemein müssten weitere Untersuchungen folgen, um die beobachteten Effekte detaillierter zu analysieren und zu bestätigen, insbesondere, da die gefundenen Unterschiede bezüglich der Methylierungsmuster für die meisten der untersuchten Promotoren relativ gering waren. Allerdings muss hier angemerkt werden, dass in einer vergleichbaren Studie, bei der das *LSD1* (*Lysin-specific*

demethylase-1)-Gen mittels RNA-Interferenz ausgeschaltet wurde, signifikante Effekte auf das H3K4-Methylierungsmuster im Bereich einer ähnlichen Größenordnung lagen (Hino *et al.*, 2012). Folglich kann man annehmen, dass die erwartbaren Unterschiede voraussichtlich nicht besonders groß sind. Ansonsten wäre es auch denkbar, dass Smyd1 noch weitere Lysine an Histon 3 methylieren kann, vielleicht sogar in höherem Maße als Lysin 4. Möglicherweise wäre es zudem sinnvoll, in Zukunft einen H3K27-ChIP-Assay durchzuführen, da eine kürzlich erschienene Studie zeigt, dass eine Vielzahl an muskelspezifischen-Promotoren, wie der Myogenin- und der Ckm (*Creatine kinase, muscle*)-Promotor, bivalente Stellen für H3K4me3 und H3K27 aufweisen (Bernstein *et al.*, 2006; Seenundun *et al.*, 2010; Gu und Lee, 2013; Liu *et al.*, 2013a). Es ist außerdem nicht auszuschließen, dass Smyd1 auch direkt Zielproteine methyliert, wie es bereits für andere Mitglieder der Smyd-Familie gezeigt werden konnte (Huang *et al.*, 2006; Kunizaki *et al.*, 2007; Abu-Farha *et al.*, 2011; Donlin *et al.*, 2012; Voelkel *et al.*, 2013) Interessant in diesem Zusammenhang ist insbesondere, dass für Smyd1 Hinweise darauf bestehen, dass Myosin ein Methylierungssubstrat darstellt (Li *et al.*, 2013).

Interessant ist zudem, dass Smyd1, wie bereits in der Einleitung erwähnt, neben der SET-Domäne noch eine MYND-Domäne aufweist, und dadurch die Fähigkeit besitzt, HDACs zu rekrutieren (Gottlieb *et al.*, 2002; Costanini *et al.*, 2005), so dass der skNAC-Smyd1-Komplex die Transkription seiner Zielgene auch auf diesem Wege steuern könnte. Ein im Zuge dieser Arbeit durchgeführter HDAC-ELISA, mit dessen Hilfe die Gesamt-HDAC-Aktivität der untersuchten Zellen quantifiziert wurde, zeigte, dass eine Hemmung der *skNAC*- und der *Smyd1*-Expression auch zur einer Verminderung der HDAC-Aktivität in Muskelzellen führt. Daher lässt sich nicht ausschließen, dass skNAC und Smyd1 auch über eine Beeinflussung von Histon-Acetylierungsmustern Prozesse der Genexpression steuern.

3.2.8 Mithilfe eines cDNA-Microarrays ließen sich neue mögliche Zielgene des skNAC-Proteins identifizieren

Bei einem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten cDNA-Microarray, der dazu dienen sollte, neue Zielgene des skNAC-Proteins zu identifizieren, wurden differenzierende Kontroll-Myoblasten mit solchen Zellen verglichen, bei denen die Expression des *skNAC*-Gens mittels spezifischer siRNA gehemmt worden war. Hierbei konnten 100 Gene identifiziert werden, die eine *Foldchange* zwischen 2,9 und 21,5 aufwiesen. 51 Gene waren in den Zellen induziert, in denen die *skNAC*-Expression gehemmt worden war, 49 Gene dagegen reprimiert. Auffällig war, dass eine Reihe von Genen identifiziert werden konnte, die normalerweise bei der Immunantwort aktiviert werden. Darunter befanden sich solche, die für eine T-Zell-spezifische GTPase (*Tgtp1*), das transkriptionsregulierende Protein CIITA (*Major histocompatibility complex (MHC) class II transactivator*) oder das Zytokin Interleukin IL17B kodieren. Desweiteren wurde eine Vielzahl von Genen identifiziert, die für *Carrier*-

und Tunnelproteine (z.B. *Accn3*, *Slc30a3*) sowie bisher unbeschriebene Gene (z.B. *GM14316*) kodieren. Für eine Vielzahl der im *Microarray* regulierten Gene wurden die *Array*-Daten mit Hilfe von semiquantitativen-RT-PCR- und *Northern Blot*-Analysen verifiziert.

Eines der im *Microarray* mit am stärksten regulierten Gene war das bereits erwähnte *CIITA*, welches für einen Transkriptionsmodulator kodiert. Dieses Gen, bzw. das Protein CIITA, spielt eine Schlüsselrolle bei einer Vielzahl von Pathologien, darunter Arteriosklerose, Lungenfibrose, Sklerodermie und Krebs (Wu *et al.*, 2009). In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die *CIITA*-Expression durch das proinflammatorische Zytokin INF γ stimuliert wird und CIITA so einen Mediator für viele durch INF γ vermittelte transkriptionelle Effekte darstellt (Morris *et al.*, 2002; Piskurich, 1999; Piskurich *et al.*, 1998). CIITA selbst fehlt DNA-Bindungsaffinität, das Protein kann jedoch durch Interaktion mit DNA-bindenden Faktoren an Promotoren rekrutiert werden (DeSandro *et al.*, 2000; Masternak *et al.*, 2000; Scholl *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2000). Dabei wird *CIITA* konstitutiv in B-Zellen exprimiert, die Expression des Gens wird aber auch als Antwort auf eine INF γ -Stimulation in zahlreichen Zelltypen induziert, darunter auch im Skelettmuskel (Buttice *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2004). Ferner wurde gezeigt, dass CIITA die Myogenese durch Unterdrückung der Myogenin-Aktivität hemmen kann (Londhe und Davie, 2012). Zudem kann INF γ in Abhängigkeit von CIITA die Expression des *Sirt1*-Gens hemmen, wobei CIITA die Promotorregion von *Sirt1* deacetyliert (Li *et al.*, 2011). Da es sich bei *Sirt1* um eine Klasse II-Histon-Deacetylase handelt, die durch Deacetylierung vieler wichtiger metabolischer Marker als eine Art Sensor fungiert, führt eine Hemmung der *Sirt1*-Expression zu einer Veränderung der muskulären Stoffwechselaktivität und des Energieumsatzes (Liang *et al.*, 2009). CIITA stellt somit im Kontext mit der Skelettmuskulatur ein durchaus interessantes Gen dar, dessen mögliche Regulation durch skNAC weiter untersucht werden sollte.

Als ein weiteres Resultat des im Zuge dieser Arbeit durchgeführten *Microarrays* ist außerdem festzuhalten, dass erstaunlicherweise keine Übereinstimmungen zu dem zuvor an Herzmuskelgewebe von *skNAC(-/-)*-Embryonen durchgeführten *Microarray* gefunden wurden (Park *et al.*, 2010). Dies könnte zum einen an gewebsspezifischen Unterschieden zwischen Herz- und Skelettmuskel liegen, zum anderen ist es wahrscheinlich, dass bei den *knockout*-Tieren bereits im Vorfeld der Analyse verschiedene Gene in komplexer Art und Weise kompensatorisch induziert oder reprimiert wurden, was bei dem in dieser Arbeit analysierten *in vitro*-Versuchsaufbau zwar durchaus auch möglich, aber weniger wahrscheinlich ist. Um kompensatorische Effekte zu minimieren, wäre es daher in Zukunft interessant, mit einem induzierbaren *in vivo*- oder *in vitro*-System zu arbeiten.

3.2.9 skNAC beeinflusst die Myoglobin-Expression und die Fasertypspezifizierung.

Yotov und St-Arnaud konnten 1996 eine skNAC-abhängige Stimulation der Myoglobin-Promotoraktivität nachweisen. Daher wäre bei der in dieser Arbeit durchgeführten siRNA-vermittelten Hemmung der skNAC-Expression eine Verminderung der Konzentration Myoglobinspezifischer Transkripte zu erwarten gewesen. Eine solche Hemmung der Myoglobin-Expression konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, obwohl die gleiche Zelllinie wie in der erwähnten Publikation verwendet worden war. Es kam dagegen nach Hemmung der skNAC-Expression sogar zu einer leichten Induktion der Myoglobinexpression. Für diese zunächst widersprüchlichen Ergebnisse gibt es grundsätzlich drei Erklärungsmöglichkeiten: (1.) Yotov und St-Arnaud überprüften die Myoglobin-Promotoraktivität, nicht aber die Gesamtmenge an Myoglobin-Transkripten und Myoglobinprotein wie in der vorliegenden Arbeit; (2.) Es handelt sich um zwei verschiedene Herangehensweisen, wobei in einem Fall skNAC überexprimiert wurde und im anderen Fall die Expression dieses Gens durch RNA-Interferenz ausgeschaltet wurde; und (3.) Es ist möglich, dass weitere Faktoren an der Regulation der Myoglobin-Transkription beteiligt sind und dass skNAC möglicherweise nur als zusätzlicher Faktor unter bestimmten Bedingungen die Transkription vom Myoglobin-Promotor aus verstärken kann, so dass eine Verminderung der skNAC-Menge nicht unbedingt Auswirkungen auf die absolute Myoglobinmenge haben muss.

Zumindest die erste und die zweite Hypothese sind dabei eher unwahrscheinlich, da neuere *in vivo*-Daten (Park *et al.*, 2010) ein vermindertes Myoglobin-Transkriptlevel in den Herzen skNAC-defizienter muriner Embryonen zeigten. Zudem konnte die Gruppe nachweisen, dass es im oxidativen Soleusmuskel von skNAC(-/-)-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren zu einer Verschiebung hin zu einem eher glykolytischen Phänotyp kommt. Dagegen zeigten die in dieser Arbeit analysierten, mit skNAC-spezifischer siRNA-transfizierten C2C12-Zellen, nicht etwa eine Veränderung hin zu eher glykolytischen Typ II-Fasern, was aufgrund der oben beschriebenen Literaturdaten zu erwarten gewesen wäre, sondern eher einen *Shift* hin zu einem mehr oxidativen Phänotyp. Dieses Ergebnis stimmt zumindest mit den im Zuge dieser Arbeit gewonnenen und oben beschriebenen Myoglobindaten nach Hemmung der skNAC-Expression in C2C12-Zellen überein, da oxidative Fasern durch einen hohen Myoglobingehalt gekennzeichnet sind. Um die dritte Hypothese zu analysieren und dabei insbesondere zu testen, ob skNAC in roten, eher oxidativen Fasern andere Funktionen als in weißen, eher glykolytischen Fasern hat, wurden Experimente an einer weiteren Zelllinie, den Sol8-Zellen, durchgeführt. Sol8-Zellen sind dabei eher oxidativ, da sie ursprünglich aus Primärkulturen des vornehmlich oxidativen Soleusmuskels von C3H-Mäusen stammen. Bei der Analyse dieser Zelllinie konnte beobachtet werden, dass es im Gegensatz zu den an C2C12-Zellen gewonnenen Daten zu einer verminderten Expression von *MyHC I* in den siRNA-transfizierten Zellen kommt und die

Expression von *MyHC IIx* sogar leicht erhöht war. Daher können die kontroversen Effekte des skNAC-Proteins auf die Faserspezifität und damit auf die Myoglobinkonzentration möglicherweise tatsächlich darauf zurückzuführen sein, dass skNAC Teil eines komplexen Regulationsmechanismus ist, dessen Effekte von den metabolischen Eigenschaften der jeweiligen Muskelzelle abhängen.

Im Zusammenhang mit der Fasertypspezifität und den in dieser Arbeit ermittelten Effekten des skNAC-Proteins auf die Calpainexpression ist schließlich interessant, dass in der Literatur auch bereits eine Rolle der Calpaine bei der Skelettmuskel-Fasertypspezifikation beschrieben wurde (Sultan *et al.*, 2001; Tidball *et al.*, 2002; McMillan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Muroya *et al.*, 2012). Eine kürzlich erschienene Studie spricht dafür, dass Calpain 3 den CaMKII-Signalweg beeinflusst, der wiederum an der Transformation von glykolytischen Muskelfasern hin zu einem mehr oxidativen Phänotypus beteiligt ist (Kramerova *et al.*, 2012). Zudem zeigen Patienten mit LGMD2a (*Limb girdle muscular dystrophy 2a*), welche durch eine Mutation im Calpain 3-Gen verursacht wird, eine höhere Anzahl an Typ I-Fasern (Kramerova *et al.*, 2012).

3.2.10 Eine Hemmung der *skNAC*-Expression beeinflusst die Expression metabolischer Markergene in Skelettmuskelzellen

Aufgrund der Tatsache, dass die verschiedenen Muskelfasertypen charakteristische Unterschiede bezüglich ihres Stoffwechsels aufweisen und zudem in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass es nach Hemmung der *skNAC*-Expression zu einer Verschiebung hin zu mehr oxidativen Fasern kommt, wurde weiterhin untersucht, ob auch die Expression von bekannten metabolischen Markern durch Unterdrückung der *skNAC*-Expression beeinflusst wird. Dabei zeigten alle getesteten Markergene, die als charakteristisch für oxidative Stoffwechselwege angesehen werden können, darunter *SDH* (*Succinate dehydrogenase*), *PGC1 α* (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α*) und *UCP-3* (*Mitochondrial uncoupling protein 3*), eine verstärkte Expression nach Hemmung der *skNAC*-Expression. *SDH* ist ein mitochondriales Membranprotein, welches im Zitratzyklus die Umwandlung von Succinat in Fumarat katalysiert. Bei *UCP-3* handelt es sich auch um ein mitochondriales Protein, das zu einer Gruppe von Anionen-Transportern zählt. *PGC1 α* spielt als transkriptioneller Koaktivator eine positive Rolle als Hauptkoordinator der mitochondrialen Biosynthese und kann dabei den oxidativen Zellstoffwechsel steigern (Übersicht bei Austin und St-Pierre, 2012). Dadurch stellt *PGC1 α* einen Faktor dar, der maßgeblich an der Regulation der Transformation von Skelettmuskelfasern hin zu einem eher oxidativen Phänotyp beteiligt ist (Lin *et al.*, 2002; Schuler *et al.*, 2006; Handschin *et al.*, 2007). Die Expression des *FoxO1* (*Forkhead box protein O1*)-Gens, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert, der maßgeblich die Glykogensynthese und die Glykolyse steuert, war dagegen reprimiert (Übersicht bei Sanchez *et al.*,

2014). Für FoxO1 ist, wie für PGC1 α , eine direkte Funktion beim Fasertypswitching bekannt. FoxO1 steuert allerdings eher den *Shift* in Richtung auf glykolytische, schnelle Fasern (Kamei *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2011).

Weiterhin wurde die Proteinkonzentration des mitochondrialen Porin Proteins, welches ein porenformendes Membranprotein in der äußeren Mitochondrienmembran darstellt, bestimmt. Zudem wurde ein im Zuge dieser Arbeit für die Zellkultur entwickelter SDH-Aktivitätsassay durchgeführt, um das oxidative Potential der Zellen zu untersuchen. Dabei zeigte sich sowohl eine erhöhte Porinmenge in den mit skNAC-spezifischer siRNA-transfizierten Zellen, als auch eine leicht gesteigerte Succinat-Dehydrogenase Aktivität. Diese Ergebnisse unterstützen somit die oben beschriebenen Markeranalysen, welche dafür sprechen, dass die Unterdrückung der skNAC-Genexpression zu einer Erhöhung der oxidativen Stoffwechselaktivität in C2C12-Zellen führt.

Auch wenn die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse in Bezug auf die Fasertypspezifizierung zum Teil den Ergebnissen früherer Studien widersprechen, kann festgehalten werden, dass diese zumindest in den untersuchten C2C12-Zellen stimmig sind. Dort führt ein *knockdown* der skNAC-Expression insgesamt zu einer Verschiebung hin zu Fasern mit einem eher oxidativen Metabolismus, einem hohen Myoglobingehalt und einer hohen Mitochondriendichte.

3.2.11 Depletion von skNAC beeinflusst die Expression von Genen, die für spezifische Zytokine kodieren

Da verschiedene Stoffwechselwege in Skelettmuskelzellen über proinflammatorische Zytokine moduliert werden und der Skelettmuskel dabei auch selbst Zytokine produzieren kann (Henriksen *et al.*, 2012), wurde in den mit skNAC-spezifischer siRNA-transfizierten Zellen die Expression verschiedener Gene untersucht, die für proinflammatorische Zytokine kodieren. Dabei zeigte sich 72 Stunden nach Induktion der Differenzierung nicht nur eine Induktion des bereits mittels *Microarray* als skNAC-Zielgen identifizierten *IL17B*, sondern auch eine verstärkte Expression der Interleukingene *IL4* und *IL6*. *IL6* wurde erstmals als B-Zell-stimulierender Faktor beschrieben (Übersicht bei Kishimoto und Hirano, 1988). Später konnte gezeigt werden, dass *IL6* außerdem eine wichtige Rolle als Regulator der Skelettmuskelplastizität in Antwort auf Ausdauertraining besitzt, aber auch die Insulinwirkung beeinflusst, was im Zusammenhang mit der Pathogenese des *Diabetes mellitus* interessant ist (Übersicht bei Pedersen und Febbraio, 2008; Pedersen, 2012; Muñoz-Cánoves *et al.*, 2013). Der Befund einer Regulation der *IL6*-Expression durch skNAC könnte daher von klinischer Relevanz sein. Aufgrund der Tatsache, dass das SRF-Protein einen wichtigen Regulator im Kontext mit der Zytokinproduktion im Skelettmuskel darstellt (Charvet *et al.*, 2006; Guerci *et al.*, 2012), wurde ferner auch die Expression des *SRF*-Gens in den skNAC-defizienten-Zellen untersucht. Speziell im späteren

Differenzierungsverlauf konnte dabei eine deutlich gesteigerte *SRF*-Expression auf RNA- und Proteineebene registriert werden, welche möglicherweise direkt im Zusammenhang mit der gesteigerten Zytokinproduktion nach Unterdrückung der *skNAC*-Expression stehen könnte. Interessanterweise konnte während der frühen Phase des Differenzierungsvorgangs keine verstärkte Expression des *IL4*- und *IL6*-Gens nach Hemmung der *skNAC*-Expression beobachtet werden, im Fall von *IL4* führte diese Hemmung sogar zu einer verminderten Expression.

Weiterhin wurde auch der *INF γ* -Proteingehalt im Medium der transfizierten Zellen untersucht, da bekannt ist, dass *INF γ* die Expression des mittels *Microarray* identifizierten *skNAC*-Zielgens *CIITA* beeinflusst, so dass *INF γ* ein Mediator der *skNAC*-vermittelten Regulation der *CIITA*-Expression sein könnte. Dabei zeigte sich, dass eine Hemmung der *skNAC*-Expression 24 Stunden nach Auslösung des Differenzierungsprogramms tatsächlich zu einer verminderten *INF γ* -Sekretion durch die Muskelzellen führt. Dies spricht dafür, dass dieses Zytokin tatsächlich die Regulation der *CIITA*-Expression durch *skNAC* vermitteln könnte. Ähnlich wie für die durch *skNAC* vermittelte Regulation der *IL4*-Expression gezeigt, führte die Hemmung der *skNAC*-Expression auch zu einer biphasischen Regulation der *INF γ* -Produktion, da ermittelt werden konnte, dass zu späteren Zeitpunkten der Differenzierung eine deutlich vermehrte *INF γ* -Sekretion stattfindet. Interessant wäre es daher, in einem weiteren Schritt zu untersuchen, ob während späterer Stadien des Differenzierungsvorgangs auch ein gegenläufiger Effekt in Bezug auf die *CIITA*-Expression auftritt. Die Expression des *Sirt1*-Gens, welche, wie bereits erwähnt, durch *INF γ* in Abhängigkeit von *CIITA* gehemmt werden kann, war, wie aufgrund der genannten Zusammenhänge anfänglich vermutet, eher während früherer Phasen der Myogenese vermindert, wobei die beobachteten Effekte nicht sehr ausgeprägt waren.

Interessanterweise deutet eine kürzlich erschienene Publikation an, dass auch α NAC die Expression von *IL17* und *INF γ* induzieren kann - dabei wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs= *peripheral blood mononuclear cells*) analysiert - sowie die vermehrte Sekretion von *IL6* in Monozyten bewirkt (Hradetzky *et al.*, 2013; Hradetzky *et al.*, 2014). Diese Befunde deuten an, dass sowohl α NAC als auch *skNAC* Regulatoren der Zytokinproduktion sein könnten. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass bereits erwähnte Daten von Munz *et al.*, 1999, eine Beteiligung des *skNAC*-Proteins an der Regeneration der Skelettmuskulatur nach Verwundung nahelegen. Dabei handelt es sich um einem Prozess, der in hohem Maße über proinflammatorische Zytokine reguliert wird. Dies wurde insbesondere im Zusammenhang mit *IL6* gut untersucht (Kami und Senba, 1998, Kami *et al.*, 2000; Tidball und Villalta, 2010; Zhang *et al.*, 2013b).

3.2.12 skNAC - ein myogener Transkriptionsfaktor?

Für α NAC und auch für β NAC wird eine Funktion als Koaktivator bei der transkriptionellen Kontrolle angenommen (Zheng *et al.*, 1987; Zheng *et al.*, 1990; St-Arnaud and Quèlo, 1998; Quèlo *et al.*, 2002; Akhouayri *et al.*, 2005; Akhouayri and St-Arnaud, 2007; Meury *et al.*, 2010). Für skNAC wurde lediglich durch Yotov und St-Arnaud, 1996, eine Stimulierung der Transkription vom Myoglobin-Promotor aus nachgewiesen. Weitere Belege dafür, dass skNAC direkt an der Regulation der Transkription, möglicherweise nicht als eigentlicher Transkriptionsfaktor, aber als ein Koaktivator, z.B. von Smyd1, beteiligt ist, konnten bisher nicht gefunden werden. Es wäre daher denkbar, dass Smyd1 innerhalb des skNAC-Smyd1-Komplexes die eigentliche transkriptionsregulierende Aktivität aufweist, während skNAC eine eher modulierende Funktion hat. Es wäre folglich interessant zu untersuchen, ob skNAC und Smyd1 unter gleichen Versuchsbedingungen ein identisches Spektrum an Zielgenen regulieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zumindest nachgewiesen werden, dass die Calpaingene Zielgene beider Faktoren in Skelettmuskelzellen sind. Zudem konnte bereits im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide im Herzen einen Einfluss auf die Transkription von *Irx4*, einem Transkriptionsfaktor, der bei der Entwicklung und für die Funktion des Herzens eine essentielle Rolle spielt (Bruneau *et al.*, 2001), ausüben (Gottlieb *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2010). An dieser Stelle muss jedoch einschränkend erwähnt werden, dass bisher auch für Smyd1 eine direkte Rolle als Transkriptionsfaktor nicht eindeutig gezeigt werden konnte. Wie in Abschnitt 3.2.7 ausgeführt, sprechen die Daten der vorliegenden Arbeit - auch im Zusammenhang mit verschiedenen, von anderen Autoren veröffentlichten Ergebnissen - eher dafür, dass Smyd1 die Funktion eines Chromatin-Remodelling-Faktors haben könnte (Tan *et al.*, 2006; Gottlieb *et al.*, 2002; Costantini *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2013).

3.3 Regulation des skNAC-Smyd1-Komplexes durch Sumoylierung

Auf der Suche nach Regulationsmechanismen, die für den Transport des skNAC-Smyd1-Komplexes vom Kern ins Zytosol während des Differenzierungsverlauf von Muskelzellen verantwortlich sein könnten, konnte in der vorliegenden Arbeit eine E3-SUMO-Ligase identifiziert werden, die an diesen Komplex bindet. Diese ursprünglich mittels eines Hefe-2-Hybrid-Systems identifizierte Ligase namens Nse2 ist Bestandteil einer aus drei Enzymen bestehenden, ATP-abhängigen Enzymkaskade. Diese kann durch Anheftung von kleinen SUMO-Proteinen die Aktivität, Stabilität, die Wechselwirkung mit anderen Proteinen und die intrazelluläre Lokalisation ihrer Zielsubstrate posttranslational beeinflussen (Übersicht bei Geiss-Friedlander und Melchior, 2007; Zhao, 2007). Bei Nse2 handelt es sich dabei um das Endglied der Enzymkette, welches in einem letzten Schritt substratspezifisch die

Verknüpfung des SUMO-Proteins an das Zielprotein bewerkstelligt (Zhao und Blobel, 2005; Potts und Yu, 2007). Die im Rahmen dieser Arbeit mittels Koimmunopräzipitation verifizierte Interaktion von Nse2 mit dem skNAC-Smyd1-Komplex legt aufgrund der bekannten Funktionen von Sumoylierungsvorgängen die Vermutung nahe, dass eine Nse2-abhängige Sumoylierung an der Regulation der Translokation des skNAC-Smyd1-Komplexes vom Zellkern ins Zytoplasma beteiligt sein könnte. Zudem wäre es möglich, dass Nse2 einen Einfluss auf die Funktion von skNAC und Smyd1, speziell auf deren transkriptionsregulierende Aktivität, ausübt, oder dass Nse2 Aktivitäten der beiden Proteine bei der Regulation der Sarkomerogenese und/oder der Myoblastenmigration beeinflusst. Die Bindung von skNAC an Nse2 könnte wiederum aber auch dessen Aktivität als SUMO-Ligase oder die Nse2-Bindung an andere Proteine beeinflussen.

3.3.1 Die SUMO-Ligase Nse2, der neu identifizierte Interaktionspartner des skNAC-Smyd1-Komplexes, beeinflusst die Expression myogener Differenzierungsmarker in C2C12-Zellen und übt - ähnlich wie skNAC und Smyd1 - einen Einfluss auf die Sarkomerogenese aus.

Da vor Beginn dieser Arbeit kaum Informationen über die Expression von *Nse2* in höheren Eukaryoten vorlagen, wurden im Verlauf der Arbeit verschiedene Expressionsstudien durchgeführt. Bei der Untersuchung unterschiedlicher Mausgewebe konnte dabei nachgewiesen werden, dass *Nse2* in der Leber, im Gehirn, in der Haut, im Herzen und auch im Skelettmuskel etwa gleich stark exprimiert wird. Im Skelettmuskel ist *Nse2* sowohl in Myoblasten als auch in Myozyten vorhanden, die Konzentration sowohl der RNA als auch des Proteins nimmt aber im Verlauf der Entwicklung ab. Weitere Expressionsstudien verdeutlichten, dass *Nse2*, wie bereits für skNAC und Smyd1 gezeigt, während der Myogenese aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert wird. Dieser Befund lässt den Rückschluss zu, dass alle drei Proteine einen Komplex bilden und in einem gemeinsamen Signalweg die Myogenese beeinflussen. Unterstützt wird diese Hypothese zusätzlich dadurch, dass gezeigt werden konnte, dass *Nse2*, ähnlich wie skNAC und Smyd1, Calpain-abhängig die Sarkomerogenese beeinflusst. Im Gegensatz zu den Effekten, die nach Hemmung der *skNAC*- und der *Smyd1*-Expression beobachtet wurden, führte die siRNA-vermittelte Hemmung der *Nse2*-Expression jedoch zu einer Reihe von differentiell exprimierten myogenen Differenzierungsmarkern. Zu nennen sind diesbezüglich vor allem *MyoD*, *Myf5* und *MyHC*, deren Expression durch Hemmung der *Nse2*-Expression beeinflusst wurde. Diese Ergebnisse sprechen deutlich für eine nicht nur physikalische, sondern auch eine funktionelle Assoziation des *Nse2*-Proteins mit dem skNAC-Smyd-Komplex.

3.3.2 Hemmung der globalen Sumoylierung reduziert das Differenzierungspotential von C2C12-Zellen.

Aufgrund der Tatsache, dass im Vorfeld dieser Arbeit über die Funktion von Sumoylierungsvorgängen in Muskelzellen erst sehr wenig bekannt gewesen war, wurde zunächst analysiert, welche Effekte eine globale Hemmung der zellulären Sumoylierung auf das Differenzierungsverhalten von C2C12-Zellen hat. Hierfür wurden zwei Ansätze gewählt: Zum einen wurden die Zellen mit Ginkgolsäure, einem ubiquitären Inhibitor der Sumoylierung, behandelt (Fukuda *et al.*, 2009), zum anderen wurde die Expression des für das einzige E2-SUMO-konjugierende Enzym *Ubc9* kodierenden Gens mittels siRNA-Transfektion gehemmt. In beiden Fällen war eine deutliche Hemmung der myogenen Differenzierung zu beobachten. Im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen entwickelten sich signifikant weniger vielkernige Myotuben. Eine ähnliche Hemmung der terminalen Differenzierung durch Ausschalten von *Ubc9* in C2C12-Zellen wurde bereits durch eine andere Arbeitsgruppe im Jahr 2006 dokumentiert (Riquelme *et al.*, 2006). Zudem konnte auch eine Hemmung der Expression verschiedener myogener Differenzierungsmarker gezeigt werden. Ähnlich wie nach Inhibierung der *Nse2*-Expression führte die Unterdrückung der globalen Sumoylierung weiterhin zu einer gesteigerten Calpainexpression, welche mit Sarkomerogenese-Defekten assoziiert war. Dieser Befund spricht dafür, dass bei der Regulation der Calpainexpression auch Sumoylierung eine Rolle spielt, möglicherweise durch Beeinflussung der HMTase-Aktivität von *Smyd1*. Weiterhin deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Sumoylierung wichtig für die Differenzierung von Muskelzellen ist, wobei vermutlich neben *Nse2* noch weitere SUMO-Ligasen eine Rolle spielen.

3.3.3 Hemmung der *Nse2*-Expression führt zu einem Verbleib von *skNAC* und *Smyd1* in nukleären PML-Körperchen und damit zu einem gestörten Kern-Austransport des *skNAC-Smyd1*-Komplexes im Verlauf der Myogenese

Die in den vorangehenden Abschnitten beschriebenen Experimente konnten nicht nur eine ähnliche intrazelluläre Lokalisation von *skNAC*, *Smyd1* und *Nse2* während verschiedener Differenzierungsstadien zeigen, sondern zudem auch verdeutlichen, dass die Translokation des *skNAC-Smyd1*-Komplexes ins Zytoplasma vom Vorhandensein des *Nse2*-Proteins abhängig ist. Für Hefezellen konnte bereits gezeigt werden, dass das *Nse2*-Hefehomolog *MMS21* die intrazelluläre Lokalisation eines Importins namens *Kap114* und dessen Aktivität bezüglich des Transports von Proteinsubstraten in den Kern, sowie dessen Freisetzung im Nukleus, reguliert (Rothenbusche *et al.*, 2012, Werner und Melchior, 2012). Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch das Säugerhomolog *Nse2* die Translokation von Proteinen zwischen Zellkern und Zytoplasma modulieren könnte. In der Tat

zeigen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten, dass nach Hemmung der *Nse2*-Expression eine hohe Menge an skNAC und Smyd1 im Kern verbleibt, auch zu späteren Zeitpunkten nach Induktion der Differenzierung, wo normalerweise bereits ein Großteil der skNAC- und Smyd1-Proteine aus dem Kern in Zytoplasma transportiert worden ist. Charakteristisch für diese Zellen ist, dass das kernständige skNAC- und Smyd1-Protein in kleinen, punktförmigen Strukturen zu finden ist, ähnlich wie es auch zu frühen Zeitpunkten der Myogenese, wenn skNAC und Smyd1 noch vorwiegend im Kern lokalisiert sind, der Fall ist. Durch Koimmunfluoreszenzstudien konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei diesen subnukleären Strukturen um sogenannte PML-Körperchen handelt. Diese stellen Multiproteinkomplexe dar, deren Name sich von der akuten Promyelozyten-Leukämie ableitet, in deren Verlauf sie – wie auch bei verschiedenen Virusinfektionen - zerstört werden (Übersicht bei Lallemand-Breitenbach und de Thé, 2010). Die Funktion dieser Kernkörperchen ist noch nicht eindeutig geklärt. Eine Lokalisation von MMS21/Nse2 in PML-Körperchen konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden (Potts und Yu, 2007; Brouwer *et al.*, 2009, Chung *et al.*, 2011), nicht aber für skNAC oder Smyd1. Zudem war es im Verlauf dieser Arbeit möglich, auch eine Kolokalisation von skNAC und SUMO1 in diesen subnukleären Strukturen nachzuweisen. SUMO1 stellt dabei neben PML und SP100 eine Hauptkomponente der PML-Körperchen dar. Viele der in PML-Körperchen gefundenen Proteine unterliegen einer Modifikation durch SUMO, darunter auch PML selbst, welche essentiell für die Ausbildung dieser Strukturen ist (Boddy *et al.*, 1996; Duprez *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2000). Diese Daten sprechen dafür, dass eine Hemmung der *Nse2*-Genexpression einen Verbleib von skNAC und Smyd1 in PML-Körperchen nach sich zieht und damit die Translokation des Komplexes ins Zytoplasma gestört wird. Auch nach Inhibierung der globalen Sumoylierung konnte eine ähnliche Hemmung des Kernaustransports des skNAC- und des Smyd1-Proteins wie nach Hemmung der *Nse2*-Expression gezeigt werden. Diese Ergebnisse indizieren, dass Sumoylierung die intrazelluläre Translokation dieser beiden Proteine reguliert. Der Verbleib von skNAC und Smyd1 in PML-Körperchen bei Hemmung der *Nse2*-Expression auch während späterer Stadien der Differenzierung eröffnet die Frage, welcher genaue Mechanismus die Grundlage dafür bildet, dass diese Proteine sumoyliert werden und dadurch ihre spezifische subzelluläre Lokalisation beeinflusst wird.

Außerdem lässt die anscheinend generelle Kolokalisation von skNAC, Smyd1 und Nse2 in PML-Körperchen während früher Stadien der Myogenese eine spezifische Funktion dieses trimeren Proteinkomplexes in dieser Phase vermuten. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass für das Protein CIITA, welches bei dem in dieser Arbeit durchgeführten cDNA-Microarray als nach *skNAC*-Hemmung stark reprimiert detektiert werden konnte, eine Rekrutierung an PML-Körperchen gezeigt werden konnte (Ulbricht *et al.*, 2012). Die Bindungsdauer an diese Strukturen wird dabei durch IFN γ verlängert (Ulbricht *et al.*, 2012), wobei die Expression des *IFN γ* -Gens in Zellen, bei denen die *skNAC*-Expression gehemmt war, ebenfalls reprimiert war. Es könnte daher interessant sein, zu untersuchen,

ob auch ein Zusammenhang zwischen skNAC und der Interaktion von CIITA mit PML-Körperchen besteht und ob möglicherweise an diesem Prozess auch Sumoylierungsvorgänge beteiligt sind.

3.3.4 Smyd1 stellt im skNAC-Smyd1-Komplex das Sumoylierungssubstrat dar

Um der Frage nachzugehen, welches Protein im skNAC-Smyd1-Komplex als potentielles Sumoylierungssubstrat in Betracht kommt, wurden Sequenzanalysen durchgeführt. Die genaue Betrachtung der Primärsequenz von Smyd1 in verschiedenen Spezies führte dabei zur Identifikation eines hoch konservierten SUMO-Konsensus-Motivs (ψ KxE). Mithilfe eines speziellen Sumoylierungsassays und Koimmunopräzipitationsexperimenten ließ sich dann auch tatsächlich sumoyliertes Smyd1 nachweisen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Menge an sumoyliertem Smyd1 durch Überexpression des für die SUMO-Protease *SuPR1* kodierenden Gens sowie durch Hemmung der *Nse2*-Expression vermindert wird. *Nse2* scheint demnach für die Sumoylierung von Smyd1 wichtig zu sein, eventuell sogar dahingehend, dass Smyd1 ein direktes *Nse2*-Substrat ist. Während jedoch mit Ubc9 nur ein einziges SUMO-E2-konjugierendes Enzym bekannt ist, existieren mehr als zehn E3-SUMO-Ligasen in Säugetieren (Übersicht bei Wang und Dasso, 2009). Obwohl diese E3-Ligasen die relative Substratspezifität des Sumoylierungsvorgangs vermitteln, ist es durchaus möglich, dass neben *Nse2* auch andere E3-SUMO-Ligasen an der Sumoylierung von Smyd1 beteiligt sind. In Zukunft wäre es daher interessant, mittels ortsgerechter Mutagenese zu untersuchen, ob es sich bei der hypothetischen Sumoylierungsstelle innerhalb der Smyd1-Aminosäuresequenz tatsächlich um ein Sumoylierungsmotiv handelt. Weiterhin ließe sich mit Hilfe einer solchen Mutante die spezifische Funktion der Sumoylierung von Smyd1 in Muskelzellen klären.

Bei der Analyse der skNAC cDNA-Sequenz ließ sich dagegen kein offensichtliches, konserviertes Sumoylierungs-Motiv finden. Interessanterweise beschreibt eine kürzlich erschienene Publikation jedoch die Sumoylierung von α NAC in Osteoblasten und die damit einhergehende Interaktion mit dem transkriptionellen Repressor FIAT (*Factor inhibiting ATF4-mediated transcription*) (Hekmatnejad *et al.*, 2014). Dieser reprimiert die Expression der Osteocalcin-Gene und inhibiert die Osteoblasten-Aktivität durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor ATF4 (*Activating transcription factor 4*), dem eine wichtige Rolle bei der Osteoblastendifferenzierung zukommt. Da auch skNAC dieses entdeckte Sumo-Motiv aufweist, wäre es möglicherweise sinnvoll, in Zukunft zu untersuchen, ob auch skNAC während der Myogenese auf diese Weise posttranslational modifiziert wird.

3.3.5 Beeinflusst Sumoylierung weitere Funktionen von skNAC und Smyd1?

Als Resultat der hier beschriebenen Untersuchungen konnte die Sumoylierung als notwendig für die Regulation des intrazellulären Transportes des skNAC-Smyd1-Komplex identifiziert werden. Damit könnte eine Regulation durch Sumoylierung auch das relative Ausmaß möglicher unterschiedlicher Aktivitäten des Komplexes in Kern und Zytosol steuern. Für diese Annahme spricht der Befund, dass eine Hemmung der Nse2-Expression den ordnungsgemäßen Ablauf der Sarkomerogenese stört, eventuell aufgrund einer geringeren Translokation des skNAC-Smyd1-Komplexes ins Zytoplasma. Es ist aber ebenso möglich, dass Sumoylierung die Funktion des Proteinkomplexes als transkriptioneller Regulator beeinflusst, was z.B. eine veränderte Calpainexpression und damit eine Störung der Sarkomerogenese zur Folge haben könnte. Da die Aktivität sehr vieler Transkriptionsfaktoren durch Sumoylierung modifiziert wird, liegt diese Vermutung nahe (Übersicht bei Girdwood *et al.*, 2004; Johnson, 2004; Gill, 2005). Beispielsweise konnte bei zwei für die Myogenese wichtigen Transkriptionsfaktoren, SnoN und Sharp-1, bereits gezeigt werden, dass sie sumoyliert werden müssen, um tatsächlich als transkriptionelle Modulatoren zu fungieren (Hsu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2013). Sumoylierung von SnoN kontrolliert dabei unter anderem die Transkription des Myogenin-Gens (Hsu *et al.*, 2006), während sumoyliertes Sharp-1 die transkriptionelle Aktivität von MyoD beeinflusst (Wang *et al.*, 2013). Zudem konnte im Fall von Sharp1 eine kritische Rolle der SUMO-Modifikation bei der Bindung des Korepressors G9a, einer Histonmethyltransferase, nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2013). Ferner kann im Falle von α NAC die Sumoylierung desselben eine Interaktion mit HDAC2, einem HDAC der Klasse I, vermitteln. Hierdurch wird dann im Komplex mit dem Transkriptionsfaktor FIAT die durch ATF4-vermittelte Genrepression beeinflusst (Hekmatnejad *et al.*, 2014). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für sumoyliertes Smyd1 denkbar. Dieses besitzt neben der SET-Domäne auch eine MYND-Domäne, für die bereits gezeigt werden konnte, dass sie die Rekrutierung von HDACs vermittelt (Gottlieb *et al.*, 2002; Costantini *et al.*, 2005). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass bereits vor einigen Jahren eine Stabilisierung von HDACs durch Sumoylierung beschrieben wurde (Garcia-Dominguez und Reyes, 2009). Eine Nse2-abhängige Sumoylierung könnte auch bei der Modulation metabolischer Prozesse im Skelettmuskel von Bedeutung sein: Simpson-Lavy und Johnston konnten kürzlich nachweisen, dass das Nse2-Hefehomolog MMS21 das SNF1-Protein sumoyliert und dadurch dessen katalytische Aktivität inhibieren kann (Simpson-Lavy und Johnston, 2013). SNF1 ist das Säugetierhomolog der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK). AMPK ist im Skelettmuskel von Säugetieren ein zentraler Regulator von Muskelmetabolismus und Fasertypspezifität, indem es die Expression und Aktivität zahlreicher Gene beeinflusst, die in diese Signalwegen involviert sind (Übersicht bei Sanchez *et al.*, 2012). Sollte die AMPK-Aktivität in Säugerzellen also analog über Nse2-abhängige Sumoylierung reguliert werden,

läge damit ein Zusammenhang zwischen skNAC-Smyd1 und Fasertypspezifizierung nahe, was ein interessanter Ansatz für eine Erklärung der aberranten Fasertypverteilung bei *skNAC-knockout*-Mäusen sein könnte.

Schließlich muss der Tatsache Beachtung geschenkt werden, dass eine Bindung an eine SUMO-Ligase auch dann regulatorisch wirken kann, wenn es nicht zu einer Sumoylierung des Bindungspartners kommt: Im Fall des Homeobox-Transkriptionsfaktors Msx1 ist beispielsweise eine Interaktion mit der E3-SUMO-Ligase PIAS1 essentiell, um die Expression von Genen, die für myogene Regulatoren wie *MyoD* kodieren, zu unterdrücken (Lee *et al.*, 2006).

3.4. Spielt skNAC eine Rolle bei der Pathogenese des Rhabdomyosarkoms?

Rhabdomyosarkome zählen bei Kindern und Jugendlichen zu den häufigsten Weichteiltumoren. Sie leiten sich vermutlich von entarteten Vorläuferzellen des Muskelgewebes ab. Obwohl in den letzten Jahren ein kontinuierlicher Fortschritt bei der Ursachenerkennung und Behandlung zu registrieren war und die Sterberate deutlich zurückgegangen ist, sind nach wie vor noch viele Details und Zusammenhänge unklar, die dazu beitragen könnten, neue therapeutische Optionen zu eröffnen. Aufbauend auf frühere Arbeiten, welche zeigten, dass *skNAC* während der Muskelentwicklung einer starken Induktion unterliegt und in Anbetracht der Tatsache, dass im Vorfeld dieser Arbeit veröffentlichte Studien einen Hinweis darauf lieferten, dass *skNAC* an der Regulation der Myogenese beteiligt sein könnte (Yotov und St-Arnaud, 1996a; Munz *et al.*, 1998; Sims *et al.*, 2002), wurde zu Beginn dieser Arbeit die Hypothese formuliert, dass das geringe Differenzierungspotential von Rhabdomyosarkomzellen möglicherweise mit einem nicht regelgerechten *skNAC*-Expressionsmuster zusammenhängen könnte.

3.4.1 Das *skNAC*-Expressionsmuster einer spezifischen Rhabdomyosarkom-Zelllinie korreliert nicht mit deren histologischen Subtyp oder Differenzierungspotential

Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zelllinien entstammen humanen Rhabdomyosarkomen. RD/12-, RD/18- und CCA-Zellen zählen dabei aufgrund histopathologischer Befunde zum embryonalen Typus, während Rh30-Zellen histologisch und molekulargenetisch dem alveolären Typus zugeordnet werden (Übersicht bei Hinson *et al.*, 2013). Alle Zelllinien sind gängig und gut charakterisiert. Wie für Rhabdomyosarkomzellen kennzeichnend, verläuft die Muskeldifferenzierung bei allen vier Zelllinien unvollständig, obwohl alle - in unterschiedlichem Ausmaß - noch die Fähigkeit besitzen, initiale Schritte des myogenen Differenzierungsprogramms zu durchlaufen. In Bezug auf die *skNAC*-Expression belegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass alle vier Zelllinien eine relativ

geringe Basalexpression dieses Gens aufweisen, welche sich in CCA- und Rh30-Zellen durch Induktion der Differenzierung kaum steigern ließ, während RD/12- und RD/18-Zellen eine starke *skNAC*-Induktion nach Differenzierung zeigten, ähnlich der, die auch in nichttransformierten Skelettmuskelzellen beobachtet wird (St-Arnaud und Yotov, 1996a; Munz *et al.*, 1999; Sims *et al.*, 2002; Berger *et al.*, 2012). Die beiden zuletzt genannten Zelllinien sind klonale Varianten, die sich deutlich in ihrem Differenzierungspotential unterscheiden: RD/12-Zellen exprimieren zwar in hoher Konzentration frühe Determinierungsmarker, aber, im Gegensatz zu RD/18-Zellen, kaum Differenzierungsmarker wie Myogenin. Das kann als Anzeichen dafür angesehen werden, dass diese Zellen auf einer frühen Stufe des Differenzierungsprogramms verbleiben und daher ein geringeres Differenzierungspotential als RD/18-Zellen aufweisen. Da nun *skNAC* in beiden Zelllinien ähnlich exprimiert wird, kann angenommen werden, dass die Regulation der Expression dieses Gens zumindest nicht streng mit dem Differenzierungspotential einer bestimmten Rhabdomyosarkomzelllinie korreliert. Außerdem deuten die erzielten Ergebnisse an, dass die Kinetik der *skNAC*-Expression nach Initiieren der myogenen Differenzierung auch nicht oder wenig mit dem jeweiligen histopathologischen Rhabdomyosarkom-Subtyp korreliert, da sowohl bei der embryonalen CCA- als auch bei der alveolären Rh30-Zelllinie kaum eine Induktion der *skNAC*-Expression im Verlauf der Differenzierung zu beobachten war. Alveoläre Rhabdomyosarkome weisen molekulargenetisch in 70-80% der Fälle eine reziproke chromosomale Translokation zwischen den Chromosomen 1 und 13 bzw. 2 und 13 auf (Xia *et al.*, 2002; Barr *et al.*, 1992). Bei Rh30-Zellen liegt dabei das besonders häufige PAX3/FKHR-Fusionsprotein vor (Fredericks *et al.*, 1995). Es ist somit möglich, dass die ausbleibende *skNAC*-Induktion nach Einleiten der Differenzierung eine direkte oder indirekte Folge der aberranten Transkriptionssteuerung durch das Fusionsprotein ist. Daher könnte es in Zukunft interessant sein, zusätzlich andere alveoläre Rhabdomyosarkomzelllinien wie die RMZ-C2-Zelllinie, zu untersuchen, die eine andere, seltenere Translokation besitzen, welche zu einem PAX7/FKHR-Fusionsprotein führt. Zum Mechanismus, durch den es zur Fehlsteuerung der *skNAC*-Expression bei der embryonalen Zelllinie CCA kommt, gibt es dagegen noch keine Hypothesen.

3.4.2 Überexpression des *skNAC*-Gens inhibiert die Proliferation und steigert gleichzeitig die Apoptose bei Rh30-Rhabdomyosarkomzellen

Rhabdomyosarkomzellen sind meist auch nach Induktion der myogenen Differenzierung durch eine hohe Proliferationsrate gekennzeichnet, welche auf eine fehlende Induktion von Genen, die für Zellzyklusinhibitoren kodieren, zurückzuführen ist (Xia *et al.*, 2002). Das normalerweise für den Differenzierungsvorgang typische Ausscheiden der Zellen aus dem Zellzyklus bleibt damit aus und die Zellen vermehren sich unentwegt weiter. Da die in dieser Arbeit untersuchten *skNAC*-

überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollen nach Induktion des Differenzierungsprogramms eine geringere Zelldichte aufwiesen, wurde zunächst getestet, ob dies das Resultat einer verminderten Proliferationsrate sein könnte. Dies war in der Tat der Fall. Zudem war die Expression von Genen, die mit einem Voranschreiten des Zellzyklus' assoziiert sind, vermindert, während das Gegenteil für Gene der Fall war, die für Zellzyklus-Inhibitoren kodieren, so dass davon ausgegangen werden kann, dass *skNAC* den Zellzyklus verlangsamt oder ein Ausscheiden der Zellen aus demselben fördert. Interessanterweise wurde dagegen nach Hemmung der *skNAC*-Expression in nichttransformierten C2C12-Zellen kein Effekt auf deren Proliferationsrate beobachtet (Berger *et al.*, 2012). Bei der Klärung dieser zunächst kontroversen Ergebnisse könnten unterschiedliche Ansätze zum Tragen kommen: Zum einen könnte dies in erster Linie auf die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien zurückzuführen sein, die sich nicht nur darin unterscheiden, dass es sich um transformierte bzw. nichttransformierte Zellen handelt, sondern auch, dass sie unterschiedlichen Spezies (Maus versus Mensch) entstammen. Zum anderen handelt es sich um entgegengesetzte Versuchsaufbauten, die in einem Fall darauf ausgelegt waren die Expression des *skNAC*-Gens zu hemmen und im anderem Fall darauf, eine Überexpression des *skNAC*-Gens zu bewirken.

Zudem zeigen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten, dass eine Überexpression des *skNAC*-Gens in Rhabdomyosarkomzellen auch zu einer Stimulation apoptotischer Vorgänge führt. Dieser Punkt ist besonders interessant, da ein großes Problem bei der Behandlung von Rhabdomyosarkomen nach wie vor darin besteht, dass oftmals eine Resistenz gegen die apoptose-induzierende Wirkung der verabreichten Medikamente entsteht (Übersicht bei Fulda, 2008). Daher sollte eine mögliche Funktion des *skNAC*-Proteins bei der Induktion apoptotischer Vorgänge in Rhabdomyosarkomzellen in Zukunft auf jeden Fall weiter untersucht werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass für die *skNAC*-Isoform α NAC bereits eine Assoziation mit der Regulation apoptotischer Prozesse gezeigt werden konnte: Dieses Protein reguliert die Funktion von FADD, einem Apoptoseregulator (Stilo *et al.*, 2005). Auch für β NAC ist eine Assoziation mit apoptotischen Vorgängen bekannt: Dieser Faktor scheint ein Apoptoseinhibitor und/oder ein konserviertes Caspase-Substrat zu sein (Thiede *et al.*, 2001; Bloss *et al.*, 2003; Creagh *et al.*, 2012).

3.4.3 Überexpression des *skNAC*-Gens fördert die myogene Differenzierung von Rh30-Rhabdomyosarkomzellen

Wie weiter oben dargestellt, zeichnen sich Rhabdomyosarkomzellen durch ein geringes Differenzierungspotential aus, welches zu einem Verharren der Zellen auf einer frühen Stufe des myogenen Differenzierungsprogramms führt. Rh30-Zellen verfügen dabei im Vergleich zu anderen

RMS-Zelllinien über ein noch relativ hohes Differenzierungspotential und exprimieren einen Großteil der frühen und auch einige spätere myogene Differenzierungsmarker wie *MyHC*. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten zeigen dennoch, dass durch Rekonstitution der *skNAC*-Expression in Rh30-Zellen maßgeblich deren Differenzierungspotential erhöht werden kann, ersichtlich aus einer früheren und verstärkten Expression verschiedener Differenzierungsmarker und einer geringeren Expression von Genen, deren Expression üblicherweise im Verlauf der Differenzierung reprimiert wird. Interessant ist dabei insbesondere, dass die Expression des Gens, das für die Klasse 3-Histondeacetylase *Sirt1* kodiert, in den *skNAC*-überexprimierenden Rh30-Zellen reprimiert war. Dieses Resultat ist vor allem vor dem Hintergrund bemerkenswert, dass zum einen, wie bereits weiter oben erwähnt, in einem cDNA-Microarray *CIITA* als durch *skNAC* positiv reguliertes Gen nachgewiesen werden konnte, wobei bekannt ist, dass *CIITA* die *Sirt1*-Expression inhibieren kann. Zum anderen konnte kürzlich gezeigt werden, dass *CIITA* in Rhabdomyosarkomen durch epigenetische Mechanismen ausgeschaltet wird (Londhe *et al.*, 2012). Aufbauend auf diese Ergebnisse kann die Hypothese aufgestellt werden, dass *skNAC*, *CIITA* und *Sirt1* zumindest zum Teil in einem gemeinsamen Signalweg agieren, der in Rhabdomyosarkomen gestört ist. Ein in diesem Zusammenhang zusätzlich interessanter Befund, der möglicherweise auch bei der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien von Bedeutung sein könnte, wurde von Kim *et al.*, 2013, publiziert: Eine hohe *Sirt1*-Expression ist bei Weichgewebssarkomen mit einer schlechten Prognose assoziiert. Daher sollte in Zukunft insbesondere die Funktion des *Sirt1*-Proteins in Rhabdomyosarkomzellen genauer untersucht werden.

3.4.4 Überexpression des *skNAC*-Gens verringert das Metastasierungspotential von Rh30-Rhabdomyosarkomzellen

Lollini *et al.* konnten 1991 zeigen, dass in Rhabdomyosarkomzellen ein höherer Differenzierungsstatus zu einem Verlust der Metastasierungsfähigkeit führt. So verlieren beispielsweise die RD/18-Zellen im Zuge der Differenzierung ihre Fähigkeit, Metastasen zu bilden, während bei RD/12-Zellen, die ein deutlich geringeres Differenzierungspotential aufweisen, die Metastasierungsfähigkeit auch nach Induktion der Differenzierung erhalten bleibt (Lollini *et al.*, 1991). Rh30-Zellen zählen, wie bereits weiter oben ausgeführt, zum alveolären Rhabdomyosarkom-Subtypus, welcher im Vergleich zum embryonalen Typus meist mit einer höheren Aggressivität und einem verstärkten Metastasierungspotential einhergeht. In Einklang mit diesen Befunden konnte im Vorfeld dieser Arbeit bereits durch mehrere Studien belegt werden, dass Rh30-Zellen, trotz vergleichsweise hohem Differenzierungspotential, auch nach Induktion der Differenzierung (Hu *et al.*, 2013) zur Bildung von Metastasen befähigt sind (Fredericks *et al.*, 2000; Raimondi *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013a). Daher

wurde diese Zelllinie ausgewählt, um der Frage nachzugehen, ob eine Rekonstitution der *skNAC*-Expression das Metastasierungspotential von Rhabdomyosarkomzellen vermindern kann. Hierfür wurde ein *Softagar-Assay* verwendet, welcher ein *in vitro*-Modell für Metastasierung darstellt, wobei das Anheftungs-unabhängige Wachstum (*anchorage-independent growth*) von transformierten Zellen geprüft wird: Nur maligne, transformierte Zellen sind in der Lage, ohne festen Untergrund, in diesem Fall Weichagar, zu proliferieren und Kolonien zu bilden. Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass Rh30-Zellen nach Überexpression von *skNAC* weniger Kolonien bilden als Kontrollzellen, was als erster Hinweis darauf dienen kann, dass diese Zellen ihre Malignität verlieren. Darauf aufbauend müsste in der Zukunft auch ein entsprechender *in vivo*-Nachweis erfolgen, z.B. über eine Xenotransplantation der entsprechenden Zellen in Nacktmäuse, ein etabliertes Modellsystem für Metastasierungsanalysen bei Rhabdomyosarkomzellen (Übersicht bei O'Brien *et al.*, 2012). Bezüglich des Mechanismus, über den *skNAC* die Metastasierung von Rhabdomyosarkomzellen hemmt, ist die Tatsache interessant, dass 2010 ein Zusammenhang zwischen der Migration und Metastasierung von Rhabdomyosarkomzellen und deren Calpainexpression entdeckt wurde: Dabei führte eine Hemmung der Calpaingene zu einer verminderten Migrationsrate der Zellen, welche mit einem Rückgang des Metastasierungspotentials und einem gestörten Zytoskelett-Aufbau der Zellen einherging (Roumes *et al.*, 2010). Dieser Zusammenhang zwischen Calpainexpression und Migration/Metastasierung ist besonders bemerkenswert, da im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits demonstriert werden konnte, dass bei nichttransformierten Myoblasten eine Hemmung der *skNAC*-Expression zu einer gesteigerten Expression von Calpaingenen führt, wodurch die migratorische Aktivität der Zellen steigt. Auch für Rh30-Rhabdomyosarkomzellen konnte dann konsistent nachgewiesen werden, dass eine Überexpression des *skNAC*-Gens in einer verminderten Calpainexpression resultiert. Dies legt nahe, dass in Rh30-Zellen und möglicherweise auch in anderen Rhabdomyosarkomzellen die fehlende Induktion der *skNAC*-Expression im Verlauf der myogenen Differenzierung möglicherweise eine gleichbleibend hohe Calpainexpression bewirkt, welche wiederum das Migrationspotential und die Metastasierungsaktivität auch nach Induktion der Differenzierung erhält. Auch dieser Befund könnte interessante therapeutische Impulse liefern, insbesondere vor dem Hintergrund, dass eine Inhibition von Calpainen relativ spezifisch über verschiedene niedermolekulare Inhibitoren wie das im Zuge dieser Arbeit verwendete ALLN, gelingt.

4. Zusammenfassung

Die Skelett- und Herzmuskel spezifische Variante der α -Untereinheit des *Nascent-associated-complex* (skNAC) sowie dessen Interaktionspartner, das SET- und MYND-Domänen enthaltene Smyd1-Protein werden ausschliesslich im quergestreiften Muskel exprimiert. Beiden Proteinen wird dabei aufgrund im Vorfeld der Arbeit veröffentlichten Publikationen eine entscheidene Rolle bei der Myogenese zugeschrieben. Dabei handelt es sich um einen komplexen und hoch organisierten Prozess, durch den während der Embryonalentwicklung oder auch durch spätere äußere Einflüsse, wie beispielsweise nach Verletzung, differenzierte Muskelfasern, mit streng strukturierten Sarkomeren, entstehen und der durch eine Vielzahl von Proteinen genau zeitlich und räumlich gesteuert wird. Um die implizierten Funktionen von skNAC und Smyd1 im Skelettmuskel sowie deren eigentlichen Mechanismus detaillierter in Säugetieren zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit eine Reihe an unterschiedlichen Experimenten durchgeführt.

In einem ersten Schritt konnte gezeigt werden, dass skNAC, wie bereits im Vorfeld für Smyd1 demonstriert, auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, wobei der p38-Signalweg dabei eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Interessanterweise konnte nach Hemmung der skNAC-Expression in murinen Myoblasten kein Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Zellen nachgewiesen werden, dargestellt durch die Analyse bekannter Differenzierungsmarker auf RNA, als auch auf Proteinebene. Jedoch konnte nach *knockdown* der skNAC-Expression, ähnlich wie bereits für skNAC und Smyd1 im Zebrafischmodellsystem gezeigt, ein Effekt auf die Sarkomerogenese in den verwendeten Säugetierzellen beobachtet werden. Dieser war gekennzeichnet durch eine gestörte Anordnung der dicken (Myosin-) und dünnen (Aktin-) Filamente.

Auf der Suche nach dem Mechanismus der für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sein könnte, wurde das Expressionsmuster einer Reihe von Chaperonen und Ubiquitin-Ligasen nach Hemmung der skNAC-Expression untersucht, deren Funktionen im Zusammenhang mit der Myofibrillogenese bereits bekannt sind. Dabei konnten das Calpain 1- und 3-Gen als mögliche Kandidaten identifiziert werden. Deren Transkript- als auch Aktivitätslevel waren nach Unterdrückung der skNAC-Expression vor allem für Calpain 1 signifikant erhöht. Eine Behandlung der skNAC-siRNA-transfizierten Zellen mittels eines spezifischen Calpaininhibitors verdeutlichte, dass tatsächlich Calpaine eine Rolle bei den beobachteten Effekten spielen könnten, da die Behandlung dazu führte, dass skNAC-defiziente Zellen nicht mehr von Wildtyp-Zellen zu unterscheiden waren. Da zudem ein Zusammenhang zwischen Calpainen und Migrationsvorgängen bekannt ist, wurde außerdem untersucht, ob möglicherweise auch skNAC-defiziente Zellen ein verändertes Migrationspotential

aufweisen. Dies war tatsächlich zu beobachten. Auch in diesem Fall konnte durch die Zugabe des Calpaininhibitors ein Migrationspotential wiederhergestellt werden, dass dem der Kontrollzellen entsprach.

Aufgrund vorangegangener Publikationen wird angenommen, dass sowohl skNAC als auch Smyd1 als Transkriptionsfaktoren bzw. zumindest als transkriptionelle Aktivatoren agieren. Bisher konnten diese Annahme jedoch noch nicht eindeutig belegt werden. Ferner sind auch nur wenige spezifischen Targetgene beider Proteine beschrieben. Um potentielle Zielgene von skNAC zu identifizieren, wurde daher ein cDNA-Microarray nach Inhibierung der *skNAC*-Expression in kultivierten, differenzierenden Myoblasten durchgeführt. Unter den analysierten Genen befanden sich dabei auffällig viele Gene, die vor allem im Kontext mit der Immunantwort bekannt sind. Überraschenderweise konnte das Myoglobin-Gen nicht als differentiell exprimiertes Gen ermittelt werden. Überraschend aufgrund der Tatsache, dass vorherige Studien u.a. darlegen, dass skNAC die Myoglobin-Promotoraktivität stimulieren kann. Insgesamt weisen die in den C2C12-Zellen gewonnenen Daten nach Inhibierung der *skNAC*-Expression, zum Teil kontrovers zu vorherigen Publikationen, darauf hin, dass skNAC die Verschiebung hin zu Fasern mit einem eher glykolytischen Metabolismus fördert.

Des Weiteren liefert die Studie erstmals Hinweise darauf, dass als möglicher molekulare Mechanismus, durch den der skNAC-Smyd1-Komplex die Expression spezifischer Gene beeinflusst, Histonmethylierungen und Acetylierungen in Frage kommen könnten.

Die bisher dargestellten Daten verdeutlichen, dass skNAC und Smyd1 unterschiedliche Funktionen in der Zelle erfüllen. Auch die Tatsache, dass beide Proteine im Verlauf der Differenzierung eine Translokation aus dem Kern ins Zytosol durchlaufen, untermauert, dass es sich bei diesen vermutlich um multifunktionale Proteine handelt. Über den Mechanismus der die Translokation beider Proteine steuert, war vor Beginn der vorgelegten Studie noch nichts bekannt. Erste Anhaltspunkte wurden dabei durch die Ergebnisse eines Hefe-2-Hybrid-Screens erlangt, bei dem neben anderen potentiellen Interaktionspartnern eine E3-SUMO-Ligase namens Nse2 identifiziert werden konnte. Diese ist Bestandteil eines aus drei enzymatischen Schritten bestehenden posttranslationalen Modifizierungsprozesses, welcher als Sumoylierung bezeichnet wird. Eine wichtiger Vorgang in der Zelle, der durch Sumoylierung gesteuert wird, stellt der Transportprozess in und aus dem Zellkern dar. Tatsächlich führte die Unterdrückung der *Nse2*-Expression, neben Hemmung des Differenzierungspotentials der C2C12-Zellen, zu einem gestörten Transport von Smyd1 und skNAC aus dem Nukleus in das Zytosol. Ein ähnliches Phänomen konnte im weiteren Verlauf auch nach Hemmung der globalen Sumoylierung beobachtet werden. Ferner konnte in der Studie demonstriert werden, dass Smyd1 im Skelettmuskel ein Sumoylierungssubstrat darstellt. Sumoylierung spielt somit

vermutlich eine wichtige Rolle bei der Steuerung der nuklearen und zytosolischen Funktionen von skNAC und Smyd1.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, skNAC im Kontext mit muskulären Erkrankungen, speziell im Zusammenhang mit der Pathogenese von Rhabdomyosarkomen, zu untersuchen. Rhabdomyosarkome stellen die häufigsten Weichteiltumore im Kindesalter dar und leiten sich hauptsächlich von entarteten Vorläuferzellen des Muskelgewebes ab. Als Ausgangsmaterial der Studie dienten verschiedene bereits gut charakterisierte Rhabdomyosarkomzelllinien, die sich aufgrund ihres Ursprungs, ihrer genetischen Aberrationen, ihres Differenzierungsverhalten und bezüglich ihrer Malignität unterscheiden lassen. Interessanterweise zeigten die Ergebnisse der Studie zum einen, dass die skNAC-Expression nicht in allen untersuchten Rhabdomyosarkomzellen induziert wird, wie es normalerweise in nichttransformierten Myoblasten der Fall ist. Zum anderen konnten sie darstellen, dass bei solchen Zelllinien, die kein hohes Basallevel an skNAC nach Initiieren des Differenzierungsvorganges aufweisen, ein Einbringen von skNAC zu einer Steigerung des Differenzierungspotentials führt, welches parallel mit einer gehemmten Proliferation einhergeht. Zudem konnte nach Rekonstitution von skNAC ein Verlust der Malignität in solchen Zellen beobachtet werden, ein wichtiger Befund, der möglicherweise einen neuen therapeutischen Ansatz impliziert.

5. Summary

Skeletal and heart muscle-specific variant of the α subunit of nascent polypeptide associated complex (skNAC) and its interaction partner, the SET and MYND domain containing Smyd1 protein are exclusively found in striated muscle cells. Prior to this study, several reports had demonstrated that both proteins regulate myogenesis i.e. the process of new muscle formation, either during embryonic development or in response to injury. Myogenesis is a complex and tightly organized process during which, in response to external stimuli, differentiated muscle fibers with structured sarcomeres develop.

The aim of this study was to mechanistically analyze the function of skNAC and Smyd1 in myogenesis.

Initially, it was shown that *skNAC*, like *Smyd1* expression, is regulated at the transcriptional level during differentiation of cultured myoblasts, with the p38 MAPK signal transduction pathway playing an important role. However, after inhibition of *skNAC* expression in these cells, no effect on their differentiation behaviour could be observed. Nevertheless - similar to findings of others in the zebrafish system – it could be demonstrated that knockdown of *skNAC* expression has an effect on sarcomerogenesis, i.e. the formation and development of new sarcomeres. This effect was

characterized by a disturbed assembly of thick (myosin) and thin (actin) filaments in the *skNAC*-deficient cells.

In search of the mechanisms which could be responsible for this phenotype, the expression levels of various genes encoding proteins known to be involved in sarcomerogenesis were analyzed after inhibition of *skNAC* expression. And indeed, upregulation of calpain 1 and calpain 3 gene expression could be observed after inhibition of *skNAC* expression. Consistently, treatment of *skNAC*-knockdown cells with a specific calpain inhibitor revealed that *skNAC* controls sarcomere architecture in a calpain-dependent manner. Since calpains are known to be potent inducers of myoblast migration, it was furthermore tested whether manipulation of *skNAC* gene expression affects myoblast migration. This was de facto the case: *skNAC*-deficient cells were characterized by strongly enhanced myoblast migration rates when compared to control cells, which was - like the effects on sarcomerogenesis - a consequence of the elevated calpain activity seen in these cells.

In other previous publications a function of *skNAC* and *Smyd1* as transcription factors or at least as transcriptional co-activators had been suggested prior to this study. However, their mechanism of action in regulating transcription and also probably most of their target genes were largely enigmatic at the beginning of this study.

Thus, to identify novel *skNAC* target genes, we carried out cDNA microarray analysis after inhibiting *skNAC* expression in cultured, differentiating myoblasts. Remarkably, a high proportion of the differentially expressed genes that were identified corresponded to genes encoding regulators of inflammation. Surprisingly, however, no negative effect on myoglobin gene expression could be observed, although earlier studies had demonstrated that *skNAC* can stimulate transcription from the myoglobin promoter. Consistently, we also observed upregulation of other genes associated with an oxidative myofiber phenotype in the *skNAC*-depleted cells. Thus, our data, contradictory to previously published results, indicate that *skNAC* promotes fiber type changes directed towards a more glycolytic metabolism.

In addition, with regard to a potential mechanism of transcriptional control by the *skNAC*-*Smyd1* complex, we provide evidence indicating that the two proteins might modulate histone methylation and histone (de)acetylation patterns in myoblasts.

These data suggested that *skNAC* and *Smyd1*, potentially as a complex, might act as multifunctional proteins. In addition, the fact that both proteins undergo nuclear-to-cytoplasmic translocation during myogenesis supports the idea that they fulfill specific functions in both subcellular compartments. However, the mechanism that controls this translocation was largely unknown at the beginning of

this study. Interestingly it could be shown that skNAC binds to the E3 SUMO ligase Nse2, which was initially identified via a yeast-two-hybrid screen using a C-terminal skNAC fragment as a bait. E3 SUMO ligases catalyze the attachment of a small SUMO protein to a target protein. This post-translational modification, called sumoylation, is known to be involved in various cellular processes, including the regulation of nucleocytoplasmic shuttling.

Indeed, knockdown of *Nse2* expression in cultured, differentiating myoblasts led to a partial blockade of the nuclear-to cytoplasmic-translocation of the skNAC-Smyd1 complex, accompanied by inhibition of specific aspects of myogenic differentiation. Consistently, a similar effect could be observed after inhibition of global protein sumoylation. In addition, we could show that Smyd1 is a sumoylation substrate in skeletal muscle cells. These data suggest that sumoylation might play an important role in regulating skNAC-Smyd1 functions by controlling the balance between nuclear and cytosolic localization of this protein complex.

Finally, another aim of this study was to investigate a potential role of skNAC in skeletal muscle diseases, specifically a possible link between skNAC and the pathogenesis of rhabdomyosarcoma. Rhabdomyosarcoma is the most common sporadic soft-tissue sarcoma of childhood. It is assumed that the respective tumors might originate from mesenchymal stem cells of the myogenic lineage. In this study, selected, well-characterized rhabdomyosarcoma cell lines, which differ in their origin, their genetic aberrations, their differentiation behavior and their metastatic potential, were used to analyze *skNAC* expression after the induction of myogenic differentiation. Interestingly on the one hand, we could demonstrate that in contrast to normal, non-transformed myoblasts, some of the tested rhabdomyosarcoma cell lines lack inducible *skNAC* expression. Furthermore, we could show that overexpression of *skNAC* in specific rhabdomyosarcoma cell lines leads to upregulation of specific myogenic differentiation markers, accompanied by a reduced cell proliferation and a loss of metastatic potential, a finding which might have important therapeutic implications in the future.

6. Literaturverzeichnis

- Abu-Farha, M., Lambert, J. P., Al-Madhoun, A. S., Elisma, F., Skerjanc, I. S. and Figeys, D.** (2008) The tale of two domains: proteomics and genomics analysis of SMYD2, a new histone methyltransferase. *Mol. Cell Proteomics* **7**, 560-72.
- Abu-Farha, M., Lanouette, S., Elisma, F., Tremblay, V., Butson J., Figeys, D., Couture, J. F.** (2011) Proteomic analyses of the SMYD family interactomes identify HSP90 as a novel target for SMYD2. *J. Mol. Cell Biol.* **3**, 301-8.
- Adams, G. R., Hather, B. M., Baldwin, K. M., Dudley, G. A.** (1993) Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *J. Appl. Physiol.* **74**, 911-5.
- Akhouayri, O., Quélo, I., St-Arnaud, R.** (2005) Sequence-specific DNA binding by the alphaNAC coactivator is required for potentiation of c-Jun-dependent transcription of the osteocalcin gene. *Mol. Cell Biol.* **25**, 3452-60.
- Akhouayri, O., St-Arnaud, R.** (2007) Differential mechanisms of transcriptional regulation of the mouse osteocalcin gene by Jun family members. *Calcif. Tissue Int.* **80**, 123-31.
- Arsenovic, P. T., Maldonado, A. T., Colleluori, V. D., Bloss, T. A.** (2012) Depletion of the *C. elegans* NAC engages the unfolded protein response, resulting in increased chaperone expression and apoptosis. *PLoS One* **7**, e44038.
- 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.
- Aurade, F., Pinset, C., Chafey, P., Gros, F., Montarras, D.** (1994) Myf5, MyoD, myogenin and MRF4 myogenic derivatives of the embryonic mesenchymal cell line C3H10T1/2 exhibit the same adult muscle phenotype. *Differentiation* **55**, 185-192.
- Austin, S., St-Pierre, J.** (2012) PGC1 α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J. Cell Sci.* **125**, 4963-71.
- Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Furukawa, T., Peter, J. B.** (1971) Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. *Am. J. Physiol.* **220**; 410-4.
- Barr, F. G., Holick, J., Nycum, L., Biegel, J.A., Emanuel, B. S.** (1992) Localization of the t(2;13) breakpoint of alveolar rhabdomyosarcoma on a physical map of chromosome 2. *Genomics* **13**, 1150-6.
- Barr, F. G.** (2001) Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* **20**, 5736-46.
- Baumann, H., Jäggi, M., Soland, F., Howald, H., Schaub, M. C.** (1987) Exercise training induces transitions of myosin isoform subunits within histochemically typed human muscle fibres. *Pflügers Arch.* **409**, 349-60.
- Beatrix, B., Sakai, H., Wiedmann, M.** (2000) The alpha and beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions. *J. Biol. Chem.* **275**, 37838-37845.

- Beckmann, J.S., Spencer, M.** (2008) Calpain 3, the "gatekeeper" of proper sarcomere assembly, turnover, and maintenance. *Neuromuscul. Disord.* **18**, 913-921.
- Bentzinger, C. F., Wang, Y. X., Rudnicki, M. A.** (2012) Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **4**, pii, a008342.
- Berger, F., Berkholz, J., Breustedt, T., Ploen, D., Munz, B.** (2012) Skeletal muscle-specific variant of nascent polypeptide associated complex alpha (skNAC): Implications for a specific role in mammalian myoblast differentiation. *Eur. J. Cell Biol.* **91**, 150-5.
- Berkes, C. A., Tapscott, S. J.** (2005) MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 585-595.
- Berkholz, J., Michalick, J., Munz, B.** (2014a) The E3 SUMO ligase Nse2 regulates sumoylation and nuclear-to-cytoplasmic translocation of skNAC-Smyd1 in myogenesis. *J. Cell Sci.* **127**, 3794-804.
- Berndt, U., Oellerer, S., Zhang, Y., Johnson, A. E., Rospert, S.** (2009) A signal-anchor sequence stimulates signal recognition particle binding to ribosomes from inside the exit tunnel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **106**, 1398-403.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K.** (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315–326.
- Blau, H. M., Pavlath, G. K., Hardeman, E.C., Chiu, C. P., Silberstein, L., Webster, S. G., Miller, S. C., Webster, C.** (1985) Plasticity of the differentiated state. *Science* **230**, 758-66.
- Bloss, T. A., Witze, E. S., Rothman, J. H.** (2003) Suppression of CED-3-independent apoptosis by mitochondrial betaNAC in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424**, 1066–1071
- Boddy, M.N., Howe, K., Etkin, L. D., Solomon, E., Freemont, P.S.** (1996) PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* **13**, 971–982.
- Booth, F. W., Laye, M.J., Spangenburg, E. E.** (2010) Gold standards for scientists who are conducting animal-based exercise studies. *J. Appl. Physiol.* **108**, 219-21.
- Brand-Saberri, B.** (2005) Genetic and epigenetic control of skeletal muscle development. *Ann Anat.* **187**, 199-207.
- Brooke, M. H., Kaiser, K. K.** (1970) Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.* **18**, 670-2.
- Brouwer, A. K., Schimmel, J., Wiegant, J. C., Vertegaal, A. C., Tanke, H. J. and Dirks, R. W.** (2009) Telomeric DNA mediates de novo PML body formation. *Mol. Biol. Cell* **20**, 4804-4815.
- Brown, M. A., Sims, R. J. 3rd, Gottlieb, P. D., and Tucker, P. W.** (2006) Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone H3 lysine 36-specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex. *Mol. Cancer* **28**, 5:26.
- Brummer, H., Zhang, M. Y., Piddoubny, M., Medler, S.** (2013) Hybrid fibers transform into distinct fiber types in maturing mouse muscles. *Cells Tissues Organs* **198**, 227-36.

- Bruneau, B. G., Bao, Z. Z., Fatkin, D., Xavier-Neto, J., Georgakopoulos, D., Maguire, C. T., Berul, C. I., Kass, D.A., Kuroski-de Bold, M.L., de Bold, A. J., Conner, D. A., Rosenthal, N., Cepko, C. L., Seidman, C. E., Seidman, J. G.** (2001) Cardiomyopathy in *Irx4*-deficient mice is preceded by abnormal ventricular gene expression. *Mol. Cell Biol.* **21**, 1730-6.
- Bryson-Richardson, R. J., Currie, PD.** (2008) The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 632-46.
- Buas, M. F., Kadesch, T.** (2010) Regulation of skeletal myogenesis by Notch. *Exp. Cell Res.* **316**: 3028-33.
- Buckingham, M., Relaix, F.** (2007) The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 645-73.
- Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., Craig, E. A.** (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**, 119–122.
- Butticè, G., Miller, J., Wang, L., Smith, B. D.** (2006) Interferon-gamma induces major histocompatibility class II transactivator (CIITA), which mediates collagen repression and major histocompatibility class II activation by human aortic smooth muscle cells. *Circ. Res.* **98**, 472-9.
- Caiozzo, V. J., Haddad, F., Baker, M. J., Baldwin, K. M.** (1996) Influence of mechanical loading on myosin heavy-chain protein and mRNA isoform expression. *J. Appl. Physiol.* **80**, 1503-12.
- Caretti, G., Di Padova, M., Micales, B., Lyons, G. E., Sartorelli, V.** (2004) The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* **18**, 2627-38.
- Charvet, C., Houbron, C., Parlakian, A., Giordani, J., Lahoute, C., Bertrand, A., Sotiropoulos, A., Renou, L., Schmitt, A., Melki, J., Li, Z., Daegelen, D., and Tuil, D.** (2006) New role for serum response factor in postnatal skeletal muscle growth and regeneration via the interleukin 4 and insulin-like growth factor 1 pathways. *Mol. Cell Biol.* **26**, 6664-74.
- Chung, I., Leonhardt, H. and Rippe, K.** (2011) De novo assembly of a PML nuclear subcompartment occurs through multiple pathways and induces telomere elongation. *J. Cell Sci.* **124**, 3603-3618.
- Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M. C., Gregorio, C. C.** (2002) Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 637-706.
- Costantini, D. L., Arruda, E. P., Agarwal, P., Kim, K. H., Zhu, Y., Zhu, W., Lebel, M., Cheng, C. W., Park, C. Y., Pierce, S.A., Guerchicoff, A., Pollevick, G.D., Chan, T. Y., Kabir, M.G., Cheng, S.H., Husain, M., Antzelevitch, C., Srivastava, D., Gross, G. J., Hui, C. C., Backx, P. H., Bruneau, B. G.** (2005) The homeodomain transcription factor *Irx5* establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell* **123**, 347-58.
- Creagh, E. M., Brumatti, G., Sheridan, C., Duriez, P. J., Taylor, R. C., Cullen, S. P., Adrain, C., Martin, S. J.** (2009) Bicaudal is a conserved substrate for *Drosophila* and mammalian caspases and is essential for cell survival. *PLoS One* **4**, e5055.
- Cuenda, A., Cohen, P.** (1999) Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 4341-6.

- Dargelos, E., Brulé, C., Stuelsatz, P., Mouly, V., Veschambre, P., Cottin, P., Poussard, S.** (2010) Up-regulation of calcium-dependent proteolysis in human myoblasts under acute oxidative stress. *Exp. Cell Res.* **316**, 115-125.
- Davicioni, E., Anderson, M. J., Finckenstein, F. G., Lynch, J.C., Qualman, S.J., Shimada, H., Schofield, D. E., Buckley, J.D., Meyer, W.H., Sorensen, P.H., Triche, T. J.** (2009) Molecular classification of rhabdomyosarcoma--genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children's Oncology Group. *Am. J. Pathol.* **174**, 550-64.
- Deb, M., Kar, S., Sengupta, D., Shilpi, A., Parbin, S., Rath, S. K., Londhe, V. A., and Patra, S. K.** (2014) Chromatin dynamics: H3K4 methylation and H3 variant replacement during development and in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 3439-63.
- Dedieu, S., Mazères, G., Poussard, S., Brustis, J. J., Cottin, P.** (2003) Myoblast migration is prevented by a calpain-dependent accumulation of MARCKS. *Biol. Cell* **95**, 615-623.
- De Giovanni, C., Nanni, P., Nicoletti, G., Ceccarelli, C., Scotlandi, K., Landuzzi, L., Lollini, P-L.** (1989) Metastatic ability and differentiative properties of a new cell line of human embryonal rhabdomyosarcoma (CCA). *Anticancer Res.* **9**, 1943-1949.
- De Giovanni, C., Landuzzi, L., Nicoletti, G., Lollini, P-L., Nanni, P.** (2009) Molecular and cellular biology of rhabdomyosarcoma. *Fut. Oncol.* **5**, 1449-1475.
- Dedieu, S., Poussard, S., Mazères, G., Grise, F., Dargelos, E., Cottin, P., Brustis, J. J.** (2004) Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. *Exp. Cell Res.* **292**, 187-200.
- del Alamo, M., Hogan, D. J., Pechmann, S., Albanese, V., Brown, P.O., Frydman, J.** (2011) Defining the specificity of cotranslationally acting chaperones by systematic analysis of mRNAs associated with ribosome-nascent chain complexes. *PLoS Biol.* **9**, e1001100.
- Deng, J. M., Behringer, R. R.** (1995) An insertional mutation in the BTF3 transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice. *Transgenic Res.* **4**, 264-9.
- DeSandro, A. M., Nagarajan, U.M., Boss, J. M.** (2000) Associations and interactions between bare lymphocyte syndrome factors. *Mol. Cell Biol.* **20**, 6587-99.
- Diehl, F., Brown, M.A., van Amerongen, M.J., Novoyatleva, T., Wietelmann, A., Harriss, J., Ferrazzi, F., Böttger, T., Harvey, R.P., Tucker, P.W., Engel, F.B.** (2010) Cardiac deletion of Smyd2 is dispensable for mouse heart development. *PLoS One* **5**, e9748.
- Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C., Cheng, X.** (2005) The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol.* **6**, 227.
- Dong, Y., Rohn, W. M., Benveniste, E. N.** (1999) IFN-gamma regulation of the type IV class II transactivator promoter in astrocytes. *J. Immunol.* **162**, 4731-9.
- Donlin, L. T., Andresen, C., Just, S., Rudensky, E., Pappas, C.T., Kruger, M., Jacobs, E.Y., Unger, A., Zieseniss, A., Dobenecker, M. W., Voelkel, T., Chait, B.T., Gregorio, C. C., Rottbauer, W., Tarakhovsky, A., Linke, W. A.** (2012) Smyd2 controls cytoplasmic lysine methylation of Hsp90 and myofilament organization. *Genes Dev.* **26**, 114-9.

- Douglass, E. C., Valentine, M., Etcubanas, E., Parham, D., Webber, B.L., Houghton, P.J., Houghton, J.A., Green, A. A.** (1987) A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma. *Cytogenet. Cell Genet* **45**, 148-155.
- Du, S.J., Tan, X., Zhang, J.** (2014) SMYD proteins: key regulators in skeletal and cardiac muscle development and function. *Anat. Rec. (Hoboken)* **297**, 1650-62.
- Duguez, S., Bartoli, M., Richard, I.** (2006) Calpain 3: a key regulator of the sarcomere? *FEBS J.* **273**, 3427-3436.
- Duprez, E., Saurin, A.J., Desterro, J.M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M.N., Solomon, E., de Thé, H., Hay, R.T., Freemont, P.S.** (1999) SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J. Cell Sci.* **112**, 381–393.
- Durbin, A.D., Hannigan, G.E., Malkin, D.** (2009) Oncogenic ILK, tumor suppression and all that JNK. *Cell Cycle* **8**, 4060-6.
- Egan, B., Zierath, J. R.** (2013) Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *PLoS One* **8**, e74098.
- El-Badry, O. M., Minniti, C., Kohn, E.C., Houghton, P.J., Daughaday, W.H., Helman, L. J.** (1990) Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors. *Cell Growth Differ.* **1**, 325-31.
- Eom, G. H., Kim, K. B., Kim, J. H., Kim, J. Y., Kim, J. R., Kee, H. J., Kim, D. W., Choe, N., Park, H.J., Son, H. J., Choi, S. Y., Kook, H., Seo, S.B.** (2011) Histone methyltransferase SETD3 regulates muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* **286**, 34733-42.
- Flores, O., Lu, H., Reinberg, D.** (1992) Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Identification and characterization of factor IIH. *J. Biol. Chem.* **267**, 2786-93.
- Foreman, K.W., Brown, M., Park, F., Emtage, S., Harriss, J., Das, C., Zhu, L., Crew, A., Arnold, L., Shaaban, S., Tucker, P.** (2011) Structural and functional profiling of the human histone methyltransferase SMYD3. *PLoS One* **6**, e22290.
- Franke, B., Gasch, A., Rodriguez, D., Chami, M., Khan, M. M., Rudolf, R., Bibby, J., Hanashima, A., Bogomolovas, J., von Castelmur, E., Rigden, D.J., Uson, I., Labeit, S., Mayans, O.** (2014) Molecular basis for the fold organization and sarcomeric targeting of the muscle atrogin MuRF1. *Open Biol.* **4**, 130172.
- Fredericks, W. J., Galili, N., Mukhopadhyay, S., Rovera, G., Bennicelli, J., Barr, F. G., Rauscher, F. J. 3rd.** (1995) The PAX3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas is a more potent transcriptional activator than PAX3. *Mol. Cell Biol.* **15**, 1522-35.
- Fredericks, W. J., Ayyanathan, K., Herlyn, M., Friedman, J. R., Rauscher, F. J. 3rd.** (2000) An engineered PAX3-KRAB transcriptional repressor inhibits the malignant phenotype of alveolar rhabdomyosarcoma cells harboring the endogenous PAX3-FKHR oncogene. *Mol. Cell Biol.* **20**, 5019-31.
- Fukuda, I., Ito, A., Hirai, G., Nishimura, S., Kawasaki, H., Saitoh, H., Kimura, K., Sodeoka, M., Yoshida, M.** (2009) Ginkgolic acid inhibits protein SUMOylation by blocking formation of the E1-SUMO intermediate. *Chem. Biol.* **16**, 133-40.

- Fulda, S.** (2008) Targeting apoptosis resistance in rhabdomyosarcoma. *Curr. Cancer Drug Targets* **8**, 536-544.
- Gao, J., Li, J., Li, B. J., Yagil, E., Zhang, J., Du, S. J.** (2014) Expression and functional characterization of Smyd1a in myofibril organization of skeletal muscles. *PLoS One* **9**, e86808.
- Garcia-Dominguez, M. and Reyes, J. C.** (2009). SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control. *Biochim. Biophys. Acta* **1789**, 451-459.
- Gautschi, M., Just, S., Mun, A., Ross, S., Rücknagel, P., Dubaquié, Y., Ehrenhofer-Murray, A., Rospert, S.** (2003) The yeast N(alpha)-acetyltransferase NatA is quantitatively anchored to the ribosome and interacts with nascent polypeptides. *Mol. Cell Biol.* **23**, 7403-14.
- Gazda, L., Pokrzywa, W., Hellerschmied, D., Löwe, T., Forné, I., Mueller-Planitz, F., Hoppe, T., Clausen, T.** (2013) The myosin chaperone UNC-45 is organized in tandem modules to support myofilament formation in *C. elegans*. *Cell* **152**, 183-95.
- Geiss-Friedlander, R., Melchior, F.** (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 947-56.
- Gelmetti, V., Zhang, J., Fanelli, M., Minucci, S., Pelicci, P. G., Lazar, M. A.** (1998) Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. *Mol. Cell Biol.* **18**, 7185-91.
- Gill, G.** (2005) Something about SUMO inhibits transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 536-41.
- Giridharan, S. S., Rohn, J. L., Naslavsky, N., Caplan, S.** (2012) Differential regulation of actin microfilaments by human MICAL proteins. *J. Cell Sci.* **125**, 614-24.
- Girdwood, D. W., Tatham, M. H., Hay, R. T.** (2004) SUMO and transcriptional regulation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 201-10.
- Goetsch, K.P., Myburgh, K. H., Niesler, C. U.** (2013) In vitro myoblast motility models: investigating migration dynamics for the study of skeletal muscle repair. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **34**, 333-47.
- Gorza, L.** (1990) Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* **38**, 257-65.
- Gottlieb, P. D., Pierce, S. A., Sims, R.J., Yamagishi, H., Weihe, E. K., Harriss, J. V., Maika, S. D., Kuziel, W. A., King, H. L., Olson, E. N., Nakagawa, O., Srivastava, D.** (2002) Bop encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis. *Nat. Genet.* **31**, 25-32.
- Greising, S. M., Gransee, H. M., Mantilla, C. B., Sieck, G. C.** (2012) Systems biology of skeletal muscle: fiber type as an organizing principle. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **4**, 457-73.
- Gross, C. T., McGinnis, W.** (1996) DEAF-1, a novel protein that binds an essential region in a Deformed response element. *EMBO J.* **15**, 1961-70.
- Gu, B., Lee, M. G.** (2013) Histone H3 lysine 4 methyltransferases and demethylases in self-renewal and differentiation of stem cells. *Cell Biosci.* **3**, 39.

- Guerci, A., Lahoute, C., Hébrard, S., Collard, L., Graindorge, D., Favier, M., Cagnard, N., Batonnet-Pichon, S., Précigout, G., Garcia, L., Tuil, D., Daegelen, D., and Sotiropoulos, A.** (2012) Srf-dependent paracrine signals produced by myofibers control satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell. Metab.* **15**, 25-37.
- Guth, L., Samaha, F. J.** (1969) Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp Neurol.* **25**, 138-52.
- Häkkinen, K., Newton, R. U., Gordon, S. E., McCormick, M., Volek, J. S., Nindl, B. C., Gotshalk, L.A., Campbell, W. W., Evans, W.J., Häkkinen, A., Humphries, B. J., Kraemer, W.J.** (1998) Changes in muscle morphology, electromyographic activity, and force production characteristics during progressive strength training in young and older men. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **53**, B415-23.
- Hamamoto, R., Furukawa, Y., Morita, M., Iimura, Y., Silva, F. P., Li, M., Yagyu, R., and Nakamura, Y.** (2004) SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat. Cell Biol.* **6**, 731-40.
- Hamamoto, R., Silva, F. P., Tsuge, M., Nishidate, T., Katagiri, T., Nakamura, Y., Furukawa, Y.** (2006) Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. *Cancer Sci.* **97**, 113-8.
- Hannoun, Z., Greenhough, S., Jaffray, E., Hay, R. T. and Hay, D. C.** (2010). Post-translational modification by SUMO. *Toxicology* **278**, 288-293.
- Harridge, S. D.** (2007) Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. *Exp. Physiol.* **92**, 783-97.
- Hartwig, J. H., Thelen, M., Rosen, A., Janmey, P. A., Nairn, A. C., Aderem, A.** (1992) MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* **356**, 618-22.
- Hayes-Jordan, A., Andrassy, R.** (2009) Rhabdomyosarcoma in children. *Curr. Opin. Pediatr.* **21**, 373-8.
- Hekmatnejad, B., Akhouayri, O., Jafarov, T., St-Arnaud, R.** (2014) SUMOylated α NAC potentiates transcriptional repression by FIAT. *J. Cell Biochem.* **115**, 866-73.
- Henriksen, T., Green, C., and Pedersen, B. K.** (2012) Myokines in myogenesis and health. *Recent Pat. Biotechnol.* **6**, 167-71.
- Hino, S., Sakamoto, A., Nagaoka, K., Anan, K., Wang, Y., Mimasu, S., Umehara, T., Yokoyama, S., Kosai, K., and Nakao, M.** (2012) FAD-dependent lysine-specific demethylase-1 regulates cellular energy expenditure. *Nat. Commun.* **3**, 758.
- Hinson, A. R., Jones, R., Crose, L. E., Belyea, B. C., Barr, F. G., Linaudic, C. M.** (2013) Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls. *Front Oncol.* **3**, 183.
- Hradetzky, S., Balaji, H., Roesner, L. M., Heratizadeh, A., Mittermann, I, Valenta, R., Werfel, T.** (2013) The human skin-associated autoantigen α -NAC activates monocytes and dendritic cells via TLR-2 and primes an IL-12-dependent Th1 response. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 2289-92.
- Hradetzky, S., Roesner, L. M., Balaji, H., Heratizadeh, A., Mittermann, I, Valenta, R., and Werfel, T.** (2014) Cytokine effects induced by the human autoallergen α -NAC. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 1570-8.

- Hsu, Y. H., Sarker, K. P., Pot, I., Chan, A., Netherton, S. J. and Bonni, S.** (2006) Sumoylated SnO1 represses transcription in a promoter-specific manner. *J. Biol. Chem.* **281**, 33008-33018.
- Hu, Q., Yuan, Y., Wang, C.** (2013) Structural and functional studies of FKHR-PAX3, a reciprocal fusion gene of the t(2;13) chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *PLoS One* **8**, e68065.
- Huang, J., Perez-Burgos, L., Placek, B. J., Sengupta, R., Richter, M., Dorsey, J.A., Kubicek, S., Opravil, S., Jenuwein, T., Berger, S.L.** (2006) Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature* **444**, 629-32.
- Huszar, G., Elzinga, M.** (1972) Homologous methylated and nonmethylated histidine peptides in skeletal and cardiac myosins. *J. Biol. Chem.* **247**, 745-53.
- Hwang, I., Gottlieb, P. D.** (1995) The Bop gene adjacent to the mouse CD8b gene encodes distinct zinc-finger proteins expressed in CTLs and in muscle. *J Immunol.* **158**, 1165-74.
- Hwang, I., Gottlieb, P. D.** (1997) Bop: a new T-cell-restricted gene located upstream of and opposite to mouse CD8b. *Immunogenetics* **42**, 353-61.
- Ianzano, M. L., Croci, S., Nicoletti, G., Palladini, A., Landuzzi, L., Grosso, V., Ranieri, D., Dall'Ora, M., Santeramo, I., Urbini, M., De Giovanni, C., Lollini, P. L., Nanni, P.** (2014) Tumor suppressor genes promote rhabdomyosarcoma progression in p53 heterozygous, HER-2/neu transgenic mice. *Oncotarget.* **5**, 108-19.
- Imbach, P., Kühne, T.**, Kompendium Kinderonkologie, 2. Auflage, Heidelberg: Springer, 2004; 179
- Jafarov, T., Alexander, J.W., St-Arnaud, R.** (2012) α NAC interacts with histone deacetylase corepressors to control Myogenin and Osteocalcin gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.* **1819**, 1208-16.
- Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R., Reuter, G.** (1998) SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol. Life Sci.* **54**, 80-93.
- Jenuwein, T., Allis, C. D.** (2001) Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-80.
- Johnson, E. S.** (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev. Biochem.* **73**, 355-82.
- Jones, R. S., Gelbart, W. M.** (1993) The Drosophila Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax. *Mol. Cell Biol.* **13**, 6357-66.
- Just, S., Meder, B., Berger, I. M., Etard, C., Trano, N., Patzel, E., Hassel, D., Marquart, S., Dahme, T., Vogel, B., Fishman, M. C., Katus, H. A., Strähle, U., Rottbauer, W.** (2011) The myosin-interacting protein SMYD1 is essential for sarcomere organization. *J. Cell Sci.* **124**, 3127-36.
- Kamei, Y., Miura, S., Suzuki, M., Kai, Y., Mizukami, J., Taniguchi, T., Mochida, K., Hata, T., Matsuda, J., Aburatani, H., Nishino, I., Ezaki, O.** (2004) Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J. Biol. Chem.* **279**, 41114-23.
- Kami, K., Senba, E.** (1998) Localization of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 messenger ribonucleic acids in regenerating rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* **21**, 819-22.

- Kami, K., Morikawa, Y., Sekimoto, M., Senba, E.** (2000) Gene expression of receptors for IL-6, LIF, and CNTF in regenerating skeletal muscles. *J. Histochem. Cytochem.* **48**, 1203-13.
- Kanno, M., Chalut, C., Egly, J. M.** (1992) Genomic structure of the putative BTF3 transcription factor. *Gene* **117**, 219-28.
- Keller, C., Guttridge, D. C.** (2013) Mechanisms of impaired differentiation in rhabdomyosarcoma. *FEBS J.* **280**, 4323-34.
- Keren, A., Tamir, Y., Bengal, E.** (2006) The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. *Mol. Cell Endocrinol.* **252**, 224-30.
- Kim, H., Heo, K., Kim, J. H., Kim, K., Choi, J. and An, W.** (2009) Requirement of histone methyltransferase SMYD3 for estrogen receptor-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **284**, 19867-77.
- Kim, J., Löwe, T., Hoppe, T.** (2008) Protein quality control gets muscle into shape. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **5**, 478-85.
- Kim, J. R., Moon, Y. J., Kwon, K. S., Bae, J. S., Wagle, S., Yu, T. K., Kim, K. M., Park, H. S., Lee, J-H., Moon, W. S., Lee, H., Chung, M. J., Jang, K. Y.** (2013) Expression of SIRT1 and DBC1 is associated with poor prognosis of soft tissue sarcomas. *PLoS ONE* **8**, e74738.
- Kirstein-Miles, J., Scior, A., Deuerling, E., Morimoto, R. I.** (2013) The nascent polypeptide-associated complex is a key regulator of proteostasis. *EMBO J.* **32**, 1451-68.
- Kishimoto, T., Hirano, T.** (1988) Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annu Rev. Immunol.* **6**, 485-512.
- Kogan, G. L., Gvozdev, V. A.** (2014) Multifunctional nascent polypeptide-associated complex (NAC). *Molecular Biology* **48**, 189-196.
- Kontogianni-Konstantopoulos, A., Catino, D. H., Strong, J. C., Sutter, S., Borisov, A.B., Pumplin, D. W., Russell, M. W., Bloch, R. J.** (2006) Obscurin modulates the assembly and organization of sarcomeres and the sarcoplasmic reticulum. *FASEB J.* **20**, 2102-2111.
- Koplin, A., Preissler, S., Ilina, Y., Koch, M., Scior, A., Erhardt, M., Deuerling, E.** (2010) A dual function for chaperones SSB-RAC and the NAC nascent polypeptide-associated complex on ribosomes. *J. Cell Biol.* **189**, 57-68.
- Kramerova, I., Kudryashova, E., Ermolova, N., Saenz, A., Jaka, O., López de Munain, A., Spencer, M. J.** (2012) Impaired calcium calmodulin kinase signalling and muscle adaptation response in the absence of calpain 3. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 3193-3204.
- Kubicek, S., Jenuwein, T.** (2004) A crack in histone lysine methylation. *Cell* **119**, 903-6.
- Kunizaki, M., Hamamoto, R., Silva, F. P., Yamaguchi, K., Nagayasu, T., Shibuya, M., Nakamura, Y., Furukawa, Y.** (2007) The lysine 831 of vascular endothelial growth factor receptor 1 is a novel target of methylation by SMYD3. *Cancer Res.* **67**, 10759-65.
- Lallemand-Breitenbach, V. and de Thé, H.** (2010) PML nuclear bodies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000661.

- Lauring, B., Sakai, H., Kreibich, G., Wiedmann, M.** (1995a) Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5411–5415.
- Lauring, B., Wang, S., Sakai, H., Davis, T. A., Wiedmann, B., Kreibich, G., Wiedmann, M.** (1995b) Nascent-polypeptide-associated complex: a bridge between ribosome and cytosol. *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol.* **60**, 47-56.
- Lauring, B., Kreibich, G., Weidmann, M.** (1995c) The intrinsic ability of ribosomes to bind to endoplasmic reticulum membranes is regulated by signal recognition particle and nascent-polypeptide-associated complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9435-9.
- Lee, H., Quinn, J. C., Prasanth, K. V., Swiss, V. A., Economides, K. D., Camacho, M. M., Spector, D. L. and Abate-Shen, C.** (2006) PIA1 confers DNA-binding specificity on the Msx1 homeoprotein. *Genes Dev.* **20**, 784-794.
- Leinhart, K., Brown, M.** (2011) SET/MYND Lysine Methyltransferases Regulate Gene Transcription and Protein Activity. *Genes (Basel)* **2**, 210-8.
- Leloup, L., Mazères, G., Daury, L., Cottin, P., Brustis, J. J.** (2006) Involvement of calpains in growth factor-mediated migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 2049-2063.
- Li, D., Niu, Z., Yu, W., Qian, Y., Wang, Q., Li, Q., Yi, Z., Luo, J., Wu, X., Wang, Y., Schwartz, R. J., Liu, M.** (2009b) SMYD1, the myogenic activator, is a direct target of serum response factor and myogenin. *Nucl. Acids Res.* **37**, 7059-71.
- Li, H., Randall, W. R. and Du, S. J.** (2009a) skNAC (skeletal Naca), a muscle-specific isoform of Naca (nascent polypeptide-associated complex alpha), is required for myofibril organization. *FASEB J.* **23**, 1988-2000.
- Li, H., Xu, J., Bian, Y. H., Rotllant, P., Shen, T., Chu, W., Zhang, J., Schneider, M., Du, S. J.** (2011) Smyd1b_tv1, a key regulator of sarcomere assembly, is localized on the M-line of skeletal muscle fibers. *PLoS One* **6**, e28524.
- Li, H., Zhong, Y., Wang, Z., Gao, J., Xu, J., Chu, W., Zhang, J., Fang, S., Du, S. J.** (2013) Smyd1b is required for skeletal and cardiac muscle function in zebrafish. *Mol. Biol. Cell.* **24**, 3511-21.
- Li, P., Zhao, Y., Wu, X., Xia, M., Fang, M., Iwasaki, Y., Sha, J., Chen, Q., Xu, Y., Shen, A.** (2012) Interferon gamma (IFN- γ) disrupts energy expenditure and metabolic homeostasis by suppressing SIRT1 transcription. *Nucl. Acids Res.* **40**, 1609-20.
- Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C., Olson, E. N.** (1997) Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* **276**, 1404-7.
- Lin, Y-M., Furukawa, Y., Tsunoda, T., Yue, C-T., Yang, K-C., Nakamura, Y.** (2002) Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas. *Oncogene* **21**, 4120-4128.
- Liu, A. X., Zhou, J. H., Jin, H. M., Zhu, C. K., Cheng, X. D.** (2007a) Primary rhabdomyosarcoma of urethra in a 5-year-old girl: case report and literature review. *Urology* **69**, 1208.e17-9.

- Liu, C., Wang, C., Wang, K., Liu, L., Shen, Q., Yan, K., Sun, X., Chen, J., Liu, J., Ren, H., Liu, H., Xu, Z., Hu, S., Xu, D., Fan, Y.** (2013b) SMYD3 as an oncogenic driver in prostate cancer by stimulation of androgen receptor transcription. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 1719-28.
- Liu, L., Cheung, T. H., Charville, G. W., Hurgo, B. M., Leavitt, T., Shih, J., Brunet, A., Rando, T. A.** (2013a) Chromatin modifications as determinants of muscle stem cell quiescence and chronological aging. *Cell Rep.* **4**, 189-204.
- Liu, L., Srikakulam, R., Winkelmann, D. A.** (2008) Unc45 activates Hsp90-dependent folding of the myosin motor domain. *J. Biol. Chem.* **283**, 13185-93.
- Liu, Y., Lormes, W., Reissnecker, S., Steinacker, J. M.** (2003) Effects of high intensity resistance and low intensity endurance training on myosin heavy chain isoform expression in highly trained rowers. *Int. J. Sports Med.* **24**, 264-70.
- Liu, Y., Chen, W., Gaudet, J., Cheney, M. D., Roudaia, L., Cierpicki, T., Klet, R. C, Hartman, K., Laue, T. M., Speck, N. A., Bushweller, J. H.** (2007b) Structural basis for recognition of SMRT/N-CoR by the MYND domain and its contribution to AML1/ETO's activity. *Cancer Cell.* **11**, 483-97.
- Lluís, F., Perdiguero, E., Nebreda, A. R., Muñoz-Cánoves, P.** (2006) Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases. *Trends Cell Biol.* **16**, 36-44.
- Loh, W. E. Jr, Scrabble, H. J., Livanos, E., Arboleda, M. J., Cavenee, W. K., Oshimura, M., Weissman, B. E.** (1992) Human chromosome 11 contains two different growth suppressor genes for embryonal rhabdomyosarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1755-9.
- 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. *Inv. Metast.* **11**, 116-124
- Londhe, P., Davie, J.** (2011) Gamma interferon modulates myogenesis through the major histocompatibility complex class II transactivator, CIITA. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2854-66.
- Londhe, P., Zhu, B., Abraham, J., Keller, C., Davie, J.** (2012) CIITA is silenced by epigenetic mechanisms that prevent the recruitment of transactivating factors in rhabdomyosarcoma cells. *Int. J. Cancer* **131**, E437-E448.
- Louis, M., Zanou, N., Van Schoor, M., Gailly, P.** (2008) TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. *J. Cell Sci.* **121**, 3951-3959.
- Lutterbach, B., Sun, D., Schuetz, J., Hiebert, S. W.** (1998) The MYND motif is required for repression of basal transcription from the multidrug resistance 1 promoter by the t(8;21) fusion protein. *Mol. Cell Biol.* **18**, 3604-11.
- Lutterbach, B., Westendorf, J. J., Linggi, B., Patten, A., Moniwa, M., Davie, J. R., Huynh, K. D., Bardwell, V. J., Lavinsky, R. M., Rosenfeld, M. G., Glass, C., Seto, E., Hiebert, S. W.** (1998) ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors. *Mol. Cell Biol.* **18**, 7176-84.
- Lutz, H., Weber, H., Billeter, R., Jenny, E.** (1979) Fast and slow myosin within single skeletal muscle fibres of adult rabbits. *Nature* **281**, 142-4.

- Mack, C. P., Thompson, M. M., Lawrenz-Smith, S., Owens, G. K.** (2000) Smooth muscle alpha-actin CARG elements coordinate formation of a smooth muscle cell-selective, serum response factor-containing activation complex. *Circ. Res.* **86**, 221-32.
- Markesich, D. C., Gajewski, K. M., Nazimiec, M. E., Beckingham, K.** (2000) bicaudal encodes the *Drosophila* beta NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery*. *Development* **127**, 559-72.
- Masselink, H., Bernards, R.** (2000) The adenovirus E1A binding protein BS69 is a corepressor of transcription through recruitment of N-CoR. *Oncogene* **19**, 1538-46.
- Masternak, K., Muhlethaler-Mottet, A., Villard, J., Zufferey, M., Steimle, V., Reith, W.** (2000) CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev.* **14**, 1156-66.
- Matthews, J. M., Bhati, M., Lehtomaki, E., Mansfield, R. E., Cubeddu, L., Mackay, J. P.** (2009) It takes two to tango: the structure and function of LIM, RING, PHD and MYND domains. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 3681-96.
- Mazères, G., Leloup, L., Daury, L., Cottin, P., Brustis, J. J.** (2006) Myoblast attachment and spreading are regulated by different patterns by ubiquitous calpains. *Cell Motil. Cytoskeleton* **63**, 193-207.
- McDonald, O. G., Wamhoff, B. R., Hoofnagle, M. H., Owens, G. K.** (2006) Control of SRF binding to CARG box chromatin regulates smooth muscle gene expression in vivo. *J. Clin. Invest.* **116**, 36-48.
- McGrath, M. J., Cottle, D. L., Nguyen, M. A., Dyson, J. M., Coghill, I. D., Robinson, P. A., Holdsworth, M., Cowling, B. S., Hardeman, E. C., Mitchell, C. A., Brown, S.** (2006) Four and a half LIM protein 1 binds to myosin-binding protein C and regulates myosin filament formation and sarcomere assembly. *J. Biol. Chem.* **281**, 7666-7683.
- McMillan, E. M., Quadrilatero, J.** (2011) Differential apoptosis-related protein expression, mitochondrial properties, proteolytic enzyme activity, and DNA fragmentation between skeletal muscles. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300**, R531-543.
- Merlino, G., Helman, L. J.** (1999) Rhabdomyosarcoma--working out the pathways. *Oncogene* **18**, 5340-8.
- Meury, T., Akhouayri, O., Jafarov, T., Mandic, V., St-Arnaud, R.** (2010) Nuclear alpha NAC influences bone matrix mineralization and osteoblast maturation in vivo. *Mol. Cell Biol.* **30**, 43-53.
- Mohun, T. J., Chambers, A. E., Towers, N., Taylor, M. V.** (1991) Expression of genes encoding the transcription factor SRF during early development of *Xenopus laevis*: identification of a CARG box-binding activity as SRF. *EMBO J.* **10**, 933-40.
- Moller, I., Beatrix, B., Kreibich, G., Sakai, H., Luring, B., Wiedmann, M.** (1998) Unregulated exposure of the ribosomal M-site caused by NAC depletion results in delivery of non-secretory polypeptides to the Sec61 complex. *FEBS letters* **441**, 1-5.
- Morris, A. C., Beresford, G. W., Mooney, M. R., Boss, J. M.** (2002). Kinetics of a gamma interferon response: expression and assembly of CIITA promoter IV and inhibition by methylation. *Mol. Cell Biol.* **22**, 4781-91.

- Moreau, A., Yotov, W. V., Glorieux, F. H., St-Arnaud, R.** (1998) Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Mol. Cell Biol.* **18**, 1312-21.
- Muñoz-Cánoves, P., Scheele, C., Pedersen, B. K., Serrano, A.L.** (2013) Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword?. *FEBS J.* **280**, 4131–48.
- Munz, B., Wiedmann, M., Lochmüller, H., Werner, S.** (1999) Cloning of novel injury-regulated genes. Implications for an important role of the muscle-specific protein skNAC in muscle repair. *J. Biol. Chem.* **274**, 13305-10.
- Muroya, S., Neath, K. E., Nakajima, I., Oe, M., Shibata, M., Ojima, K., Chikuri, K.** (2012) Differences in mRNA expression of calpains, calpastatin isoforms and calpain/calpastatin ratios among bovine skeletal muscles. *Anim. Sci.* **83**, 252-259.
- Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D., Grewal, S. I.** (2001) Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* **292**, 110-3.
- Nassar, D., Letavernier, E., Baud, L., Aractingi, S., Khosrotehrani, K.** (2012) Calpain activity is essential in skin wound healing and contributes to scar formation. *PLoS One* **7**, e37084.
- O'Brien, D., Jacob, A. G., Qualman, S. J., Chandler, D.S.** (2012) Advances in pediatric rhabdomyosarcoma characterization and disease model development. *Histol. Histopathol.* **27**, 13-22.
- Okabe, H., Satoh, S., Kato, T., Kitahara, O., Yanagawa, R., Yamaoka, Y., Tsunoda, T., Furukawa, Y., Nakamura, Y.** (2001) Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray ; Identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Research* **61**, 2129-2137.
- Olson, E. N., Klein, W. H.** (1994) bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev.* **8**, 1-8.
- Olson, E. N., Perry, M., Schulz, R. A.** (1995) Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev. Biol.* **172**, 2-14.
- Papadopoulos, N., Crow, M. T.** (1993) Transcriptional control of the chicken cardiac myosin light-chain gene is mediated by two AT-rich cis-acting DNA elements and binding of serum response factor. *Mol. Cell Biol.* **13**, 6907-6918.
- Park, C. Y., Pierce, S. A., von Drehle, M., Ivey, K. N., Morgan, J. A., Blau, H. M., Srivastava, D.** (2010) skNAC, a Smyd1-interacting transcription factor, is involved in cardiac development and skeletal muscle growth and regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 20750-5.
- Parham, D. M., Ellison, D.A.** (2006) Rhabdomyosarcomas in adults and children: an update. *Arch Pathol. Lab Med.* **130**, 1454-65.
- Parham, D. M., Barr, F. G.** (2013) Classification of rhabdomyosarcoma and its molecular basis. *Adv. Anat. Pathol.* **20**, 387-97.
- Parthun, M. R., Mangus, D. A., Jaehning, J. A.** (1992) The EGD1 product, a yeast homolog of human BTF3, may be involved in GAL4 DNA binding. *Mol. Cell Biol.* **12**, 5683-9.

- Paulino, A. C., Okcu, M. F.** (2008) Rhabdomyosarcoma. *Curr. Probl. Cancer* **32**, 7-34.
- Pech, M., Spreter, T., Beckmann, R., Beatrix, B.** (2010) Dual binding mode of the nascent polypeptide-associated complex reveals a novel universal adapter site on the ribosome. *J. Biol. Chem.* **285**, 19679-87.
- Pedersen, B. K., and Febbraio, M. A.** (2008) Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol. Rev.* **88**, 1379-406.
- Pedersen, B. K.** (2012) Muscular interleukin-6 and its role as an energy sensor. *Med. Sci. Sports Exerc.* **44**, 392-6.
- Perdiguero, E., Ruiz-Bonilla, V., Serrano, A. L., Muñoz-Cánoves P.** (2007) Genetic deficiency of p38alpha reveals its critical role in myoblast cell cycle exit: the p38alpha-JNK connection. *Cell Cycle* **6**, 1298-303.
- Peter, J. B., Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Gillespie, C. A., Stempel, K. E.** (1972) Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry.* **11**, 2627-33.
- Pette, D., Staron, R. S.** (1997). Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int. Rev. Cytol.* **170**, 143-223.
- Pette, D., Staron, R. S.** (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc. Res. Tech.* **50**, 500-9.
- Pette, D., Staron, R. S.** (2001) Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem. Cell Biol.* **115**, 359-72.
- Phan, D., Rasmussen, T. L., Nakagawa, O., McAnally, J., Gottlieb, P. D., Tucker, P. W., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., Olson, E. N.** (2005) BOP, a regulator of right ventricular heart development, is a direct transcriptional target of MEF2C in the developing heart. *Development* **132**, 2669-78.
- Piskurich, J. F., Wang, Y., Linhoff, M. W., White, L. C., Ting, J. P.** (1998) Identification of distinct regions of 5' flanking DNA that mediate constitutive, IFN-gamma, STAT1, and TGF-beta-regulated expression of the class II transactivator gene. *J. Immunol.* **160**, 233-40.
- Piskurich, J. F., Linhoff, M. W., Wang, Y., Ting, J. P.** (1999) Two distinct gamma interferon-inducible promoters of the major histocompatibility complex class II transactivator gene are differentially regulated by STAT1, interferon regulatory factor 1, and transforming growth factor beta. *Mol. Cell Biol.* **19**, 431-40.
- Plath, K., Rapoport, T. A.** (2000) Spontaneous release of cytosolic proteins from posttranslational substrates before their transport into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **151**, 167-78.
- Potts, P. R. and Yu, H.** (2007) The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 581-590.
- Potts, P. R.** (2009) The Yin and Yang of the MMS21-SMC5/6 SUMO ligase complex in homologous recombination. *DNA Repair* **8**, 499-506.
- Powers, T., Walter, P.** (1996) The nascent polypeptide-associated complex modulates interactions between the signal recognition particle and the ribosome. *Curr. Biol.* **6**, 331-338.

Preissler, S., Deuerling, E. (2012) Ribosome-associated chaperones as key players in proteostasis. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 274-83.

Quèlo, I., Hurtubise, M., St-Arnaud, R. (2002) alphaNAC requires an interaction with c-Jun to exert its transcriptional coactivation. *Gene Expr.* **10**, 255-62.

Quélo, I., Gauthier, C., Hannigan, G. E., Dedhar, S., St-Arnaud, R. (2004a) Integrin-linked kinase regulates the nuclear entry of the c-Jun coactivator alpha-NAC and its coactivation potency. *J. Biol. Chem.* **279**, 43893-9.

Quélo, I., Akhouayri, O., Prud'homme, J., St-Arnaud, R. (2004b) GSK3 beta-dependent phosphorylation of the alpha NAC coactivator regulates its nuclear translocation and proteasome-mediated degradation. *Biochemistry* **43**, 2906-14.

Quélo, I., Gauthier, C., St-Arnaud, R. (2005) Casein kinase II phosphorylation regulates alphaNAC subcellular localization and transcriptional coactivating activity. *Gene Expr.* **12**, 151-63.

Raden, D., Gilmore, R. (1998) Signal recognition particle-dependent targeting of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum in the absence and presence of the nascent polypeptide-associated complex. *Mol. Biol. Cell* **9**, 117–130.

Raimondi, L., Ciarapica, R., De Salvo, M., Verginelli, F., Gueguen, M., Martini, C., De Sio, L., Cortese, G., Locatelli, M., Dang, T. P., Carlesso, N., Miele, L., Stifani, S., Limon, I., Locatelli, F., Rota, R. (2012) Inhibition of Notch3 signalling induces rhabdomyosarcoma cell differentiation promoting p38 phosphorylation and p21(Cip1) expression and hampers tumour cell growth in vitro and in vivo. *Cell Death Differ.* **19**, 871-81.

Raue, U., Oellerer, S., Rospert, S. (2007) Association of protein biogenesis factors at the yeast ribosomal tunnel exit is affected by the translational status and nascent polypeptide sequence. *J. Biol. Chem.* **282**, 7809–7816.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D., Jenuwein, T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593-9.

Reimann, B., Bradsher, J., Franke, J., Hartmann, E., Wiedmann, M., Prehn, S., Wiedmann, B. (1999) Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast. *Yeast* **15**, 397–407.

Relaix, F., Zammit, P. S. (2012) Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development* **139**, 2845-56.

Rice, J. C., Allis, C. D. (2001) Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 263-73.

Riquelme, C., Barthel, K. K. B., Qin, X-F. and Liu, X. (2006) Ubc9 expression is essential for myotube formation in C2C12 cells. *Exp. Cell Res.* **312**, 2132-2141.

Rospert, S., Dubaquié, Y., Gautschi, M. (2002) Nascent-polypeptide-associated complex. *Cell Mol. Life Sci.* **59**, 1632-9.

- Rothenbusch, U., Sawatzki, M., Chang, Y., Caesar, S. and Schlenstedt, G.** (2012) Sumoylation regulates Kap114-mediated nuclear transport. *EMBO J.* **31**, 2461-2472.
- Roumes, H., Leloup, L., Dargelos, E., Brustis, J-J., Daury, L., Cottin, P.** (2010) Calpains: Markers of tumor aggressiveness? *Exp. Cell Res.* **316**, 1587-1599.
- Rudnicki, M.A., Le Grand, F., McKinnell, I., Kuang, S.** (2008) The molecular regulation of muscle stem cell function. *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol.* **73**:323-31.
- Rui, Y., Bai, J., Perrimon, N.** (2010) Sarcomere formation occurs by the assembly of multiple latent protein complexes. *PLoS Genet* **6**, e1001208.
- Sanchez, A. M., Candau, R. B., Csibi, A., Pagano, A. F., Raibon, A., Bernardi, H.** (2012) The role of AMP-activated protein kinase in the coordination of skeletal muscle turnover and energy homeostasis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **303**, C475-85.
- Sanchez, A. M., Candau, R. B., Bernardi, H.** (2014) FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. *Cell Mol. Life Sci.* **71(9)**, 1657-71.
- Sanger, J. W., Kang, S., Siebrands, C. C., Freeman, N., Du, A., Wang, J., Stout, A. L., Sanger, J. M.** (2005) How to build a myofibril. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **26**, 343-54.
- Sander, V., Suñe, G., Jopling, C., Morera, C., Izpisua Belmonte, J. C.** (2013) Isolation and in vitro culture of primary cardiomyocytes from adult zebrafish hearts. *Nat. Protoc.* **8**, 800-9.
- Sartori, R., Gregorevic, P., Sandri, M.** (2014) TGF β and BMP signaling in skeletal muscle: potential significance for muscle-related disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 464-471.
- Schiaffino, S., Reggiani, C.** (1996) Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.* **76**, 371-423.
- Scholl, T., Mahanta, S. K., Strominger, J. L.** (1997) Specific complex formation between the type II bare lymphocyte syndrome-associated transactivators CIITA and RFX5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**, 6330-4.
- Scott, W., Stevens, J., Binder-Macleod, S. A.** (2001) Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys. Ther.* **81**, 1810-6.
- Seenundun, S., Rampalli, S., Liu, Q. C., Aziz, A., Palii, C., Hong, S., Blais, A., Brand, M., Ge, K., Dilworth, F. J.** (2010) UTX mediates demethylation of H3K27me3 at muscle-specific genes during myogenesis. *EMBO J.* **29**, 1401-11.
- Shore, P., Sharrocks, A. D.** (1995) The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* **229**, 1-13.
- Silva, F. P., Hamamoto, R., Kunizaki, M., Tsuge, M., Nakamura, Y., Furukawa, Y.** (2008) Enhanced methyltransferase activity of SMYD3 by the cleavage of its N-terminal region in human cancer cells. *Oncogene* **27**, 2686-92.
- Simpson-Lavy, K. J. and Johnston, M.** (2013) SUMOylation regulates the SNF protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 17432-17437.

- Sims, R. J. 3rd, Weihe, E. K., Zhu, L., O'Malley, S., Harriss, J. V., Gottlieb, P. D.** (2002) m-Bop, a repressor protein essential for cardiogenesis, interacts with skNAC, a heart- and muscle-specific transcription factor. *J. Biol. Chem.* **277**, 26524-29.
- Sirinupong, N., Brunzelle, J., Ye, J., Pirzada, A., Nico, L., and Yang, Z.** (2010) Crystal structure of cardiac-specific histone methyltransferase SmyD1 reveals unusual active site architecture. *J. Biol. Chem.* **285**, 40635-44.
- Sorensen, P. H., Lynch, J. C., Qualman, S. J., Tirabosco, R., Lim, J. F., Maurer, H. M., Bridge, J. A., Crist, W. M., Triche, T. J., Barr, F. G.** (2002) PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *J. Clin. Oncol.* **20**, 2672-9.
- Spadaccini, R., Perrin, H., Bottomley, M. J., Ansieau, S., Sattler, M.** (2006) Structure and functional analysis of the MYND domain. *J. Mol. Biol.* **358**, 498-508.
- Sponziello, M., Durante, C., Boichard, A., Dima, M., Puppini, C., Verrienti, A., Tamburrano, G., Di Rocco, G., Redler, A., Lacroix, L., Bidart, J. M., Schlumberger, M., Damante, G., Russo, D., Filetti, S.** (2014) Epigenetic-related gene expression profile in medullary thyroid cancer revealed the overexpression of the histone methyltransferases EZH2 and SMYD3 in aggressive tumours. *Mol. Cell Endocrinol.* **392**, 8-13.
- Srikakulam, R., Winkelmann, D. A.** (2004). Chaperone-mediated folding and assembly of myosin in striated muscle. *J. Cell Sci.* **117**, 641-652.
- Srivastava, D., Thomas, T., Lin, Q., Kirby, M. L., Brown, D., Olson, E. N.** (1997) Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat. Genet.* **16**, 154-60.
- St-Arnaud, R., Quèlo, I.** (1998) Transcriptional coactivators potentiating AP-1 function in bone. *Front Biosci.* **3**, d838-48.
- Staron, R. S., Pette, D.** (1986) Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers. *Histochemistry* **86**, 19-23.
- Stassen, M. J., Bailey, D., Nelson, S., Chinwalla, V., Harte, P. J.** (1995) The *Drosophila* trithorax proteins contain a novel variant of the nuclear receptor type DNA binding domain and an ancient conserved motif found in other chromosomal proteins. *Mech. Dev.* **52**, 209-23.
- Stephan, A. K., Kliszczak, M. and Morrison, C. G.** (2011) The Nse2/Mms21 SUMO ligase of the Smc5/6 complex in the maintenance of genome stability. *FEBS Lett.* **585**, 2907-2913.
- Stilo, R., Liguoro, D., di Jeso, B., Leonardi, A., Vito, P.** (2003) The alpha-chain of the nascent polypeptide-associated complex binds to and regulates FADD function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**, 1034-41.
- Stuelsatz, P., Pouzoulet, F., Lamarre, Y., Dargelos, E., Poussard, S., Leibovitch, S., Cottin, P., Veschambre, P.** (2010) Down-regulation of MyoD by calpain 3 promotes generation of reserve cells in C2C12 myoblasts. *J. Biol. Chem.* **285**, 12670-12683.
- Sultan, K. R., Dittrich, B. T., Leisner, E., Paul, N., Pette, D.** (2001) Fiber type-specific expression of major proteolytic systems in fast-to-slow-transforming rabbit muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, C239-247.

- Tajbakhsh, S.** (2009) Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J. Intern. Med.* **266**, 372-89.
- Tan, X., Rotlland, J., Li, H., De Deyne, P., Du, S. J.** 2006. Smyd1, a histone methyltransferase, is required for myofibril organization and muscle contraction in zebrafish embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 2713-18.
- Tagawa, M., Ueyama, T., Ogata, T., Takehara, N., Nakajima, N., Isodono, K., Asada, S., Takahashi, T., Matsubara, H., Oh, H.** (2008) MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**, C490-8.
- Thelen, M., Rosen, A., Nairn, A. C., Aderem, A.** (1991) Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* **351**, 320-2.
- Tiede, B., Dimmler, C., Siejak, F., Rudel, T.** (2001) Predominant identification of RNA-binding proteins in Fas-induced apoptosis by proteome analysis. *J. Biol. Chem.* **276**, 26044-50.
- Tidball, J. G., Spencer, M. J.** (2002) Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during muscle disuse. *J. Physiol.* **545**, 819-828.
- Tidball, J. G., Villalta, S. A.** (2010) Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**, R1173-87.
- Thulasi, R., Dias, P., Houghton, P. J., Houghton, J. A.** (1996) Alpha 2a-interferon-induced differentiation of human alveolar rhabdomyosarcoma cells: correlation with down-regulation of the insulin-like growth factor type I receptor. *Cell Growth Diff.* **7**, 531-541
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G., Reuter, G.** (1994) The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J.* **13**, 3822-31.
- Ulbricht, T., Alzrigat, M., Horch, A., Reuter, N., von Mikecz, A., Steimle, V., Schmitt, E., Krämer, O. H., Stamminger, T., Hemmerich, P.** (2012) PML promotes MHC class II gene expression by stabilizing the class II transactivator. *J. Cell Biol.* **199**, 49-63.
- Voelkel, T., Andresen, C., Unger, A., Just, S., Rottbauer, W., Linke, W. A.** (2013) Lysine methyltransferase Smyd2 regulates Hsp90-mediated protection of the sarcomeric titin springs and cardiac function. *Biochim. Biophys. Acta.* **1833**, 812-22.
- von Maltzahn, J., Chang, N. C., Bentzinger, C. F., Rudnicki, M. A.** (2012) Wnt signaling in myogenesis. *Trends Cell Biol.* **22**, 602-9.
- Wada, M., Okumoto, T., Toro, K., Masuda, K., Fukubayashi, T., Kikuchi, K., Niihata, S., Katsuta, S.** (1996) Expression of hybrid isomyosins in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **271**, C1250-5.
- Wang, J., Hoshino, T., Redner, R. L., Kajigaya, S., Liu, J. M.** (1998) ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA* **95**, 10860-5.
- Wang, K., Ramirez-Mitchell, R., Palter, D.** (1984) Titin is an extraordinarily long, flexible, and slender myofibrillar protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3685-9.

- Wang, K., McCarter, R., Wright, J., Beverly, J., Ramirez-Mitchell, R.** (1991) Regulation of skeletal muscle stiffness and elasticity by titin isoforms: a test of the segmental extension model of resting tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7101-5.
- Wang Y, Dasso M.** (2009) SUMOylation and deSUMOylation at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 4249-52.
- Wang, Y., Shankar, S. R., Kher, D., Ling, B. M. T. and Taneja, R.** (2013) Sumoylation of the basic helix-loop-helix transcription factor Sharp-1 regulates recruitment of the histone methyltransferase and function in myogenesis. *J. Biol. Chem.* **288**, 17654-17662.
- Warren, K. S. and Fishman, M. C.** (1998) "Physiological genomics": mutant screens in zebrafish. *Am. J. Physiol.* **275**, H1-H7.
- Wegrzyn, R. D., Deuerling E.** (2005) Molecular guardians for newborn proteins: ribosome-associated chaperones and their role in protein folding. *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 2727-38.
- Weintraub, H.** (1993) The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* **75**, 1241-4.
- Weitkunat, M., Kaya-Çopur, A., Grill, S. W., Schnorrer, F.** (2014) Tension and force-resistant attachment are essential for myofibrillogenesis in *Drosophila* flight muscle. *Curr. Biol.* **24**:705-16.
- Werner, A. and Melchior, F.** (2012). SUMO unloads the Kap114 cab. *EMBO J.* **31**, 2439-2440.
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T. A., Wiedmann, M.** (1994) A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* **370**, 434-40.
- Wiedmann, B., Prehn, S.** (1999) The nascent polypeptide-associated complex (NAC) of yeast functions in the targeting process of ribosomes to the ER membrane. *FEBS Lett.* **458**, 51-54
- Willis, M. S., Schisler, J. C., Portbury, A. L., Patterson, C.** (2009) Build it up-Tear it down: protein quality control in the cardiac sarcomere. *Cardiovasc. Res.* **81**, 439-48.
- Wu, Z., Woodring, P. J., Bhakta, K. S., Tamura, K., Wen, F., Feramisco, J. R., Karin, M., Wang, J. Y., Puri, P. L.** (2000) p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Mol. Cell Biol.* **20**, 3951-64.
- Wu, X., Kong, X., Luchsinger, L., Smith, B. D., Xu, Y.** (2009). Regulating the activity of class II transactivator by posttranslational modifications: exploring the possibilities. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5639-5644.
- Xia, S. J, Pressey, J. G, Barr, F. G** (2002) Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Biol. Ther.* **1**, 97-104.
- Xu, S., Zhong, C., Zhang, T., Ding, J.** (2011a) Structure of human lysine methyltransferase Smyd2 reveals insights into the substrate divergence in Smyd proteins. *J. Mol. Cell Biol.* **3**, 293-300.
- Xu, Y., Wang, L., Buttice, G., Sengupta, P. K., Smith, B. D.** (1994) Major histocompatibility class II transactivator (CIITA) mediates repression of collagen (COL1A2) transcription by interferon gamma (IFN-gamma). *J. Biol. Chem.* **279**, 41319-32.

- Yaffe, D., Saxel, O.** (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**, 725-7.
- Yin, H., Price, F., Rudnicki, M. A.** (2013) Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* **93**, 23-67.
- Yotov, W. V., St-Arnaud, R.** (1996a) Differential splicing-in of a proline-rich exon converts alphaNAC into a muscle-specific transcription factor. *Genes Dev.* **10**, 1763-72.
- Yotov, W. V., St-Arnaud, R.** (1996b) Cloning and functional expression analysis of the alpha subunit of mouse ATP synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**, 142-8.
- Yotov, W. V., St-Arnaud, R.** (1996c) Mapping of the human gene for the alpha-NAC/1.9.2 (NACA/1.9.2) transcriptional coactivator to Chromosome 12q23-24.1. *Mamm. Genome* **7**, 163-4.
- Yotov, W. V., St-Arnaud, R.** (1996d) Fine mapping of the alpha-NAC gene (Naca) to the distal end (D2-D3) of mouse chromosome 10. *Mamm. Genome.* **7**, 240.
- Yotov, W. V., Moreau, A., St-Arnaud, R.** (1998) The alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex functions as a transcriptional coactivator. *Mol. Cell Biol.* **18**, 1303-11.
- Yu, Y. T., Breitbart, R. E., Smoot, L. B., Lee, Y., Mahdavi, V., Nadal-Ginard, B.** (1992) Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev.* **6**, 1783-98.
- Yuan, Y., Shi, X. E., Liu, Y. G., Yang, G. S.** (2011) FoxO1 regulates muscle fiber-type specification and inhibits calcineurin signaling during C2C12 myoblast differentiation. *Mol. Cell Biochem.* **348**, 77-87.
- Zetser, A., Gredinger, E., Bengal, E.** (1999) p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *J. Biol. Chem.* **274**, 5193-200.
- Xu, S., Zhong, C., Zhang, T., Ding, J.** (2011a) Structure of human lysine methyltransferase Smyd2 reveals insights into the substrate divergence in Smyd proteins. *J. Mol. Cell Biol.* **3**, 293-300.
- Zhang, C., Li, Y., Wu, Y., Wang, L., Wang, X., Du, J.** (2013b) Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration. *J. Biol. Chem.* **288**, 1489-99.
- Zhang, M., Truscott, J., Davie, J.** (2013a) Loss of MEF2D expression inhibits differentiation and contributes to oncogenesis in rhabdomyosarcoma cells. *Mol. Cancer* **12**, 150.
- Zhang, Y., Berndt, U., Golz, H., Tais, A., Oellerer, S., Wolfle, T., Fitzke, E., Rospert, S.** (2012a) NAC functions as a modulator of SRP during the early steps of protein targeting to the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **23**, 3027–3040.
- Zhang, Z. R., Jiang, X. S., Du, H. R., Zhu, Q., Li, X. C., Yang, C. W., Liu, Y. P.** (2012b) Characterization of the expression profiles of calpastatin (CAST) gene in chicken. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 1839-1843.
- Zhao, X., Blobel, G.** (2005) A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102**, 4777-82.
- Zhao, J.** (2007) Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 3017-3033.

Zheng, X. M., Moncollin, V., Egly, J. M., Chambon, P. (1987) A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B (II). *Cell* **50**, 361-8.

Zheng, X. M., Black, D., Chambon, P., Egly, J. M. (1990) Sequencing and expression of complementary DNA for the general transcription factor BTF3. *Nature* **344**, 556-9.

Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P. S., Dejean, A., Pandolfi, P. P. (2000) Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* **95**, 2748–2752.

Zhu, X. S., Linhoff, M. W., Li, G., Chin, K. C., Maity, S. N., Ting, J. P. (2000) Transcriptional scaffold: CIITA interacts with NF- κ B, RFX, and CREB to cause stereospecific regulation of the class II major histocompatibility complex promoter. *Mol. Cell Biol.* **20**, 6051-61.

7. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur angegebene Hilfsmittel verwendet zu haben. Die aus anderen Quellen übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Hochschule zur Promotion vorgelegt.

Berlin, Oktober 2014

Janine Berkholz

8. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

9. Danksagung

Mein größter und ganz besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Barbara Munz. Durch sie hatte ich die Möglichkeit, an solch einem spannenden Thema und unter einer tollen Betreuung, die gleichzeitig viel Freiraum für eigene Ideen ließ, zu arbeiten. Trotz einiger Kilometer Distanz, konnte ich in jeder Situation auf sie zählen und ihre Begeisterung für das Thema war jederzeit bis nach Berlin spürbar und sehr ansteckend.

Ich möchte mich auch bei Prof. Dr. Sigmar Stricker dafür bedanken, dass er sich ohne zu zögern dazu bereit erklärt hat, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen.

Ein ganz herzlicher Dank geht zudem an alle Mitglieder des Instituts für die freundliche Aufnahme, die angenehme Arbeitsatmosphäre und allseits wahrnehmbare Hilfsbereitschaft.

Kristina, Laura, Weronika, Björn und Gustav möchte ich außerdem für die netten und manchmal auch notwendigen ablenkenden Mittagspausen danken. Ein großes Dankeschön geht darüberhinaus an Björn, der mir tatkräftig bei allen aufkommenden technischen Problemen weitergeholfen hat.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an meine „Labor-WG-Mitbewohnerin“ und Freundin Laura, mit der ich viele lustige und unvergessliche Tage im Labor verbracht habe.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanke ich mich für das gewährte Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs „Myograd- Internationales Graduiertenkolleg für Myologie“ und für die Finanzierung mehrerer Kongresse. Ferner sei Susanne Wissler gedankt, die mir als Vermittlerin aller administrativen Angelegenheiten immer sehr hilfreich zur Seite stand.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für die liebevolle Unterstützung bedanken, ohne welche diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre. Meinem Bruder Philipp danke ich sehr für das Korrekturlesen des Manuskripts. Dabei geht nochmals ein ganz besonderer Dank an meine Mama, die mir eine große Hilfe bei der Fertigstellung der schriftlichen Arbeit war. Neben meinen Eltern möchte ich meine Doktorarbeit auch meinem kleinen Erik widmen. Ich hoffe, dass ich ihm etwas von meinem „Forschergeist“, den ich auch schon oft beobachten konnte (u.a. wenn er mit Handschuhen und Eisschale im Labor unterwegs war), und meinem Ziel, trotz noch so großer Neugier und Faszination, niemals den Respekt vor jeglichen Lebewesen zu verlieren, mit auf den Weg geben kann.