

Aus dem physiologischen Institut, Dahlem  
der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# **Die Basalmembran-Proteine Entactin-1 und -2: Funktionsanalyse in der quergestreiften Muskulatur**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von  
Pinar Akman  
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Barbara Munz

2. Prof. Dr. Petra Knaus

3. Prof. Dr. med. Hanns Lochmüller

Datum der Promotion: 07.12.2007

...für meine Eltern...



## Abstract

Entactin-1 and -2 are two proteins in the extracellular matrix and are localized in all basal laminas. Recently they have been discussed to be involved in functional control within the differentiation of muscle cells. Their regulation during this process is shown to be diametral: whereas *entactin-1* is mainly expressed in proliferating cells *entactin-2* is expressed in differentiating cells. The aim of this study was to analyze the expression patterns of both genes in different types of muscle cell strains *in vitro* and *in vivo*. This confirmed a relationship between the ability of cells to differentiate on one hand and the expression level of the correspondent gene on the other hand. A possible feedback between both genes could be excluded after further examination, which included the analysis of overexpressing cell strains and later the repression of *entactin*-expression in C2C12-cells using siRNA. The latter approach could also show that both genes influence the proliferative rate of skeletal muscle cells. The effect of this repression on the expression patterns of some markers of muscle cell differentiation were inconsistent. These results suggest an involvement of both genes in certain but not all aspects of muscle cell differentiation. Tissue obtained from heart and muscles of dystrophic mice revealed a distinct expression pattern of *entactin-1*. Finally the data indicates that *entactin-1* and -2 function in a different mode during muscle cell differentiation. Furthermore their expression pattern seems to be connected to the potential for differentiation appearing in muscle cells. Additionally Entactin-1 might be involved in regenerative processes within the basal lamina of muscle cells.

Keywords:

Entactin, Nidogen, muscle cells, extracellular matrix, differentiation

## Abstract Deutsch

Die beiden ubiquitären Basalmembran-Proteine Entactin-1 und -2 gehören zu einer kleinen Proteinfamilie, die in jüngerer Zeit mit funktionellen Aufgaben innerhalb der Skelettmuskelzellendifferenzierung in Zusammenhang gebracht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass beide Isoformen während der Muskelzellendifferenzierung gegenläufig reguliert werden: Das *entactin-1*-Gen ist vermehrt in proliferierenden, das *entactin-2*-Gen in differenzierenden Zellen exprimiert. In dieser Arbeit wurden die Expressionsmuster beider Gene in verschiedenen Muskelzelltypen *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dabei konnte *in vitro* die Korrelation zwischen Differenzierungspotential von Skelettmuskelzellen und der Expression der jeweiligen *entactin*-Gene bestätigt und näher charakterisiert werden. Desweiteren konnte eine direkte *Crossregulation* der beiden *entactin*-Gene aufgrund von Untersuchungen an überexprimierenden Zelllinien und Studien mit *entactin*-spezifischer siRNA weitgehend ausgeschlossen werden. Untersuchungen zur Zellproliferationsrate nach Repression eines der Gene mittels siRNA-Technik konnten außerdem einen Einfluss beider Gene auf die Proliferationsfähigkeit von Myoblasten zeigen. Die Auswirkungen einer Hemmung der *entactin-1*-Expression auf verschiedene Differenzierungsmarker lieferte widersprüchliche Ergebnisse, die die Vermutung nahe legen, dass die beiden Entactine nur in bestimmte Aspekte der Muskelzellendifferenzierung eingreifen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *entactin-1* im geschädigten Herz- und Skelettmuskel der Maus differentiell exprimiert wird. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse an, dass Entactin-1 und -2 unterschiedliche Funktionen bei der Muskelzellendifferenzierung ausüben und in noch näher zu untersuchender Weise mit dem Differenzierungspotential dieses Zell-Typus assoziiert sind. Es wurden weiterhin Hinweise darauf erhalten, dass Entactin-1 bei reparativen Vorgängen innerhalb der muskulären Basalmembran beteiligt sein könnte.

Schlagwörter:

Entactin, Nidogen, Muskelzellen, Extrazelluläre Matrix, Differenzierung

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT DEUTSCH</b>	<b>6</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>11</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Die Basalmembran</b>	<b>13</b>
1.1.1 Aufbau und Struktur der Basalmembran	13
1.1.2 Funktionen der Basalmembran	13
1.1.3 Basalmembranproteine	14
<b>1.2 Skelettmuskelzellendifferenzierung</b>	<b>23</b>
<b>1.3 In dieser Arbeit verwendete Modellsysteme zur Untersuchung der <i>in vivo</i>-Funktion der Entactine in der Skelett- und Herzmuskulatur</b>	<b>24</b>
<b>1.4 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit</b>	<b>26</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>27</b>
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	27
2.1.2 Enzyme	28
2.1.3 Antikörper	29
2.1.4 Zytokin	29
2.1.5 Oligodesoxynukleotide	29
2.1.6 Plasmide	29
2.1.7 Vektoren	29
2.1.8 Kommerzielle Kits	29
2.1.9 Bakterienstämme	30
2.1.10 Mausstämme	30
2.1.11 Eukaryontische Zelllinien	30
2.1.12 Standardpuffer und Lösungen	31
2.1.13 Software	31

<b>2.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>32</b>
2.2.1	Kultivierung und Aufbewahrung eukaryontischer Zellen	32
2.2.2	Induktion der Differenzierung	34
2.2.3	Transfektion von small interfering RNA (siRNA)	34
<b>2.3</b>	<b>Mikrobiologische Methoden</b>	<b>35</b>
2.3.1	Anzucht und Aufbewahrung von E.coli-Stämmen	35
2.3.2	Herstellung transformationskompetenter E.coli-Stämme	36
<b>2.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>37</b>
2.4.1	Transformation von E.coli Zellen mit Plasmid-DNA	37
2.4.2	Reinigung von Nucleinsäuren über Phenolextraktion und Ethanolfällung	37
2.4.3	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	38
2.4.4	DNA-Präparation	38
2.4.5	In vitro-Reaktionen an DNA	39
2.4.6	RNA-Techniken	41
<b>2.5</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>45</b>
2.5.1	Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Zellen	45
2.5.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	45
2.5.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.5.4	Immunologische Methoden	47
<b>2.6</b>	<b>Arbeit mit Tieren</b>	<b>50</b>
2.6.1	Haltung der Tiere	50
2.6.2	Gewinnung von Gewebeproben	50
2.6.3	Coxsackie B3-Virus infizierte Mäuse und Kontrolltiere	50
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Herstellung und Test der <i>entactin-1</i>-Gensonde</b>	<b>51</b>
<b>3.2</b>	<b>Expression der <i>entactin</i>-Gene in Muskelzellen</b>	<b>52</b>
3.2.1	<i>entactin</i> -Expression in differenzierenden C2C12-Zellen	53
3.2.2	<i>entactin</i> -Expression in differenzierenden C2C12- und C2F3-Zellen	54
3.2.3	<i>entactin</i> -Expression in RD/12- und RD/18-Zellen	56
3.2.4	<i>entactin</i> -Expression in HL1-Zellen und HUVEC's	60

<b>3.3 Funktionelle Studien zur Regulation der <i>entactin</i>-Genexpression in Muskelzellen</b>	<b>62</b>
3.3.1 siRNA-Versuche	63
3.3.2 Optimierung der Bedingungen	64
3.3.3 Immunhistochemische Darstellung von Zellen nach siRNA-Behandlung	68
<b>3.4 Untersuchung einer möglichen <i>Crossregulation</i> zwischen <i>entactin-1</i> und <i>entactin-2</i></b>	<b>71</b>
3.4.1 Untersuchungen an C2C12-Zelllinien, die <i>entactin-1</i> oder <i>entactin-2</i> überexprimieren	71
3.4.2 Untersuchungen an Zellen, die mit siRNA behandelt wurden	73
<b>3.5 Einfluss der Hemmung der <i>entactin-1</i>- und <i>-2</i>-Genexpression auf das Proliferationsverhalten von C2C12-Zellen</b>	<b>75</b>
3.5.1 Einfluss einer Behandlung mit Ent-1 siRNA auf die Proliferationsrate von C2C12-Zellen	77
3.5.2 Einfluss einer Behandlung mit Ent-2 siRNA auf die Proliferationsrate von C2C12-Zellen	78
<b>3.6 Einfluss einer Ent-1 siRNA-Behandlung auf die Expression von Genen, die mit der Muskelzellendifferenzierung assoziiert sind</b>	<b>79</b>
3.6.1 Untersuchung der <i>p21</i> -Expression	79
3.6.2 Untersuchung der <i>rip2</i> -Expression	80
3.6.3 Untersuchung der <i>cyclinD1</i> -Expression	82
3.6.4 Untersuchung der <i>tis11b</i> -Expression	83
<b>3.7 Untersuchungen zur <i>entactin-1</i>-Expression <i>in vivo</i></b>	<b>84</b>
3.7.1 <i>entactin-1</i> -Expression im Herzmuskelgewebe Coxsackie B3-Virus infizierter Mäuse	84
3.7.2 <i>entactin-1</i> -Expression in der Muskulatur von <i>mdx</i> -Mäusen	87
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>90</b>
<b>4.1 Untersuchungen zur <i>entactin-1</i> und <i>-2</i>-Expression in Skelett- und Herzmuskelzellen</b>	<b>91</b>
4.1.1 C2C12-Zellen und C2F3-Zellen unterscheiden sich bezüglich ihrer <i>entactin-1</i> - und <i>entactin-2</i> -Expressionskinetik nach Induktion der Differenzierung	91
4.1.2 In Rhabdomyosarkomzellen wird die <i>entactin-1</i> -Expression während der Differenzierung kaum reprimiert	92

4.1.3	Herzmuskelzellen exprimieren ausschließlich <i>entactin-2</i> , <i>entactin-1</i> ist nicht nachweisbar	94
<b>4.2</b>	<b>Nach immunhistochemischer Färbung zeigen siRNA-behandelte Zellen eine diffusere Entactin-1-Verteilung als entsprechende Kontrollen</b>	<b>96</b>
<b>4.3</b>	<b>Überexpression bzw. Repression der <i>entactin-1</i> und <i>-2</i>-Expression in Skelettmuskelzellen</b>	<b>97</b>
<b>4.4</b>	<b>Eine Hemmung der <i>entactin-1</i>- und <i>entactin-2</i>-Expression hat Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Myoblasten</b>	<b>99</b>
<b>4.5</b>	<b>Eine Hemmung der <i>entactin-1</i>-Expression beeinflusst selektiv die Expression myogener Differenzierungsmarker</b>	<b>100</b>
4.5.1	<i>p21</i> wird durch eine Hemmung von <i>entactin-1</i> induziert	100
4.5.2	<i>rip2</i> und <i>cyclinD1</i> werden durch eine Hemmung von <i>entactin-1</i> induziert; auf <i>tis11b</i> hat weder <i>entactin-1</i> noch <i>entactin-2</i> einen Einfluss	101
<b>4.6</b>	<b>Das <i>entactin-1</i>-Gens wird bei der murinen Muskeldystrophie differentiell exprimiert</b>	<b>104</b>
4.6.1	Die Expression von <i>entactin-1</i> im Herzen wird durch eine Coxsackie B3-Virus Infektion nicht beeinflusst	104
4.6.2	<i>Mdx</i> -Mäuse zeigen in Abhängigkeit vom untersuchten Muskel vom Wildtyp abweichende Expressionsmuster für <i>entactin-1</i>	106
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>109</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>111</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>127</b>
	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>129</b>
	<b>LEBENS LAUF VON PINAR AKMAN</b>	<b>131</b>

## Abkürzungsverzeichnis

as	<i>antisense</i> , Gegensinn-Orientierung
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
cDNA	<i>complementary</i> DNA
cm	Zentimeter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleid acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alteres</i> ( und andere)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	fetal calf serum, Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	<i>hora</i> , Stunde
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Ktr	Kontrolle
Kb	Kilobasen
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
mRNA	<i>messenger</i> (Boten) – Ribonukleinsäure

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
RNAse	Ribonuklease
RNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	<i>sense</i> , Sinn-Orientierung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolettes Licht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktosid

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Basalmembran

Als Basalmembran wird die extrazelluläre Matrix verstanden, die alle parenchymatösen Gewebe umgibt und diese vom benachbarten Bindegewebe trennt. Ihre Bestandteile werden von den Zellen produziert, die sie umgibt (wie bei Muskel-, Fett- und Nervenzellen) bzw. denen sie einseitig unterliegt (wie bei Epithel und Endothel). Sie kommt ubiquitär vor und ist schichtartig organisiert. Dieser Aufbau ermöglicht ihre vielfältigen Funktionen (Junquera et al., 1996).

### 1.1.1 Aufbau und Struktur der Basalmembran

Der genaue Aufbau der Basalmembran konnte durch die Elektronenmikroskopie geklärt werden (Köpf-Maier und Merker, 1989). Es werden unterschieden:

- a) die Basallamina, bestehend aus Lamina lucida und Lamina densa entsprechend ihrem Aussehen im Elektronenmikroskop: diese ist direkt mit der Zellmembran verbunden
- b) die Lamina fibroreticularis, die in das darunterliegende Bindegewebe inseriert

Die Basalmembran besteht aus Kollagen Typ IV, Lamininen und verschiedenen anderen Proteinen, darunter auch das Entactin, auf die später näher eingegangen wird. Zum strukturellen Feinaufbau der Basalmembran wurde ein Modell entwickelt, in welchem Netzwerke aus Kollagen und verschiedenen Lamininen miteinander polymerisieren, wobei Entactin die Verbindung herstellt (Yurchenco und Schittny, 1990).

### 1.1.2 Funktionen der Basalmembran

Die Basalmembran hat viele und sehr verschiedene Funktionen, die in ihrer Bedeutung gewebsspezifisch differieren können. Daher werden im Rahmen dieser Einleitung nur die wichtigsten und generell gültigen kurz dargestellt (Aumailley et al., 1993; Iozzo, 2005; Timpl und Dziadek, 1986).

1. Die Basalmembran vermittelt die Adhäsion von Zellen an das sie umgebende Bindegewebe. Dabei werden einerseits spezifische und unspezifische Verbindungen zwischen Komponenten der Zellmembran und denen der Basalmembran eingegangen, andererseits entstehen Verbindungen zwischen der Basalmembran und dem Bindegewebe.
2. Die Basalmembran kann den Stoffaustausch zwischen den Kompartimenten, die sie trennt, steuern oder unterbinden. In manchen Organen ist dies die vorherrschende Funktion (z.B. in den Blut-Organ-Schranken).
3. Basalmembranen können Wachstumsfaktoren, Hormone und andere Botenstoffe binden. Sie tragen damit zu einer konstanten Konzentration dieser Substanzen an der Zellmembran bei und können auftretende Schwankungen schnell ausgleichen oder modulieren.
4. Basalmembranen beeinflussen das Wachstums- und Differenzierungsverhalten von Zellen. Sie können beispielsweise als Leitschiene bei der Migration und Adhäsion von Zellen oder Zellfortsätzen dienen. Die Kommunikation zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix wird in vielen Fällen durch so genannte Integrine vermittelt, einer Klasse von Proteinen, die durch sehr vielfältige Bindungsmöglichkeiten gekennzeichnet ist. Sie sind Bestandteil der Zellmembran und können intrazelluläre Signalkaskaden auslösen, aber auch Signalweiterleitung aus der Zelle heraus oder in sie hinein vermitteln.  
Die Proteine der Basalmembran werden schon sehr früh in der embryonalen Entwicklung gebildet; dies ist ein Hinweis auf ihre Bedeutung bei Entwicklungsprozessen (Godfrey und Gradall, 1998).

### 1.1.3 Basalmembranproteine

#### 1.1.3.1 Kollagene

Die Kollagene sind eine sehr vielfältige Gruppe von Strukturproteinen, die in allen mehrzelligen Organismen in großer Zahl vorkommen und das häufigste Protein des Menschen sind. Bis heute wurden allein 28 verschiedene Kollagentypen beschrieben. Nach ihrem Feinaufbau werden sie in fibrilläre, fibrillenassoziierte, retikuläre, verankernde, perlenkettenartige Kollagene und

zusätzlich Kollagene, die transmembrane Domänen tragen, unterteilt. Sie sind essentieller Bestandteil aller Stützgewebe wie Haut, Knochen und Knorpel und verleihen auch anderen Geweben mechanische Stabilität (Blutgefäße, Bindegewebe). Ihre Funktion ist nicht auf strukturgebende Aufgaben beschränkt (Ortega und Werb, 2002).

### 1.1.3.2 *Laminine*

Laminin ist ein relativ großes Glykoprotein, das sich aus drei Polypeptidketten ( $\alpha$ 1-5,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3) zusammensetzt, die zu einem Kreuz zusammengelagert sind. Es wurden bisher 15 Isoformen beschrieben. Allen gemein ist ihre große Flexibilität und die Tatsache, dass sie mehrere funktionelle Domänen aufweisen, die Verbindungen zu zahlreichen anderen Molekülen eingehen können. Eine davon bindet z.B. an Perlecan, andere an Laminin-Rezeptormoleküle auf Zelloberflächen oder an Entactine (Gersdorff et al., 2005). Laminine bilden selbstpolymerisierende Netzwerke und sind wichtig bei der Ausbildung und Formation von Basalmembranen während der embryonalen Entwicklung. Störungen in ihren Peptidketten führen zu schweren Missbildungen oder sogar zur Letalität (Miner et al., 2004).

### 1.1.3.3 *Proteoglykane*

Proteoglykane stellen einen Komplex aus einem Proteinkern mit kovalent daran gebundenen Glykosaminoglykanen dar. Das häufigste und größte Proteoglykan der Basalmembran ist das Perlecan. Es besteht aus einem 400 kDa schweren Kern und ist aus sechs globulären Regionen aufgebaut (Iozzo, 2005). Es verfügt über viele Bindungsmöglichkeiten und kann unter anderem eine Bindung zu Entactin eingehen (Hopf et al., 1999). Bei der Embryogenese der Maus ist es bereits im Zwei-Zell-Stadium nachweisbar und hier bedeutsam durch seine Fähigkeit, Wachstumsfaktoren zu binden (Erickson und Couchman, 2000).

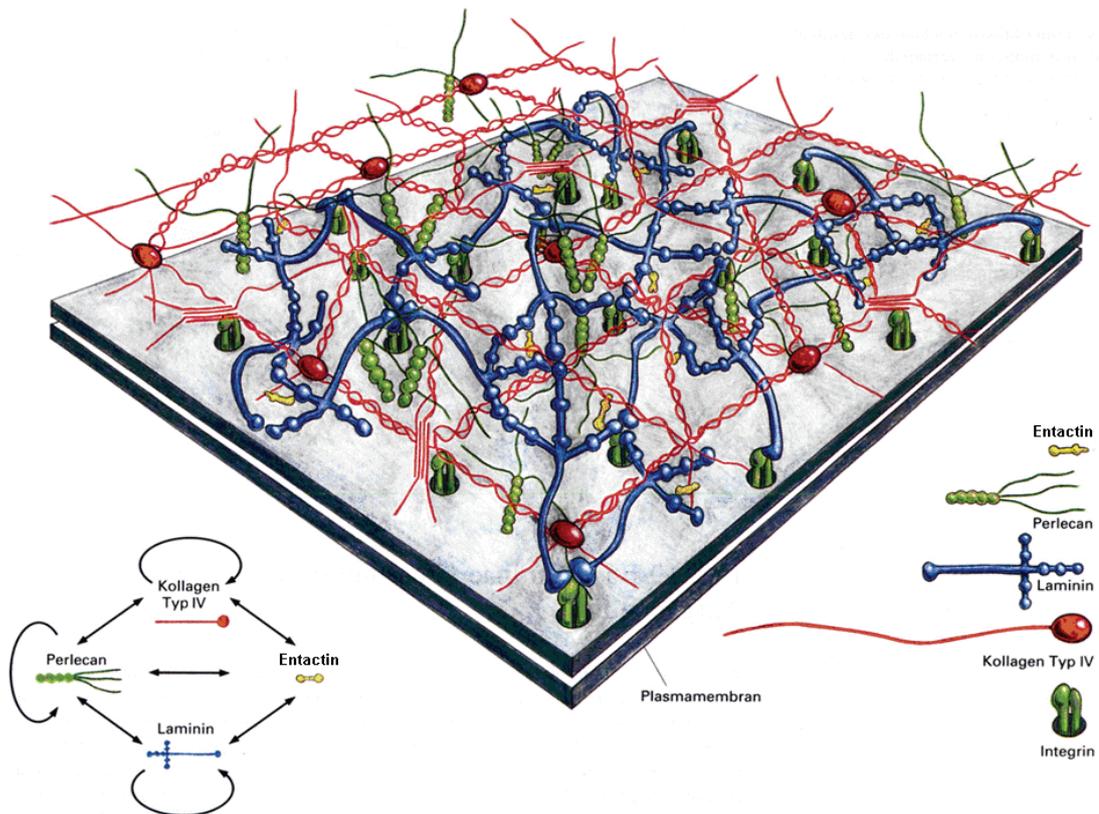


Abbildung 1: **Modell der molekularen Zusammensetzung von Basalmembranen.** Die Netzwerke aus Kollagen Typ IV und Laminin werden über Entactin miteinander verknüpft. Perlecan bindet sowohl an Kollagen Typ IV, Laminin und Entactin als auch an sich selbst (Timpl et al., 1984; Yurchenco und Schittny, 1990). Integrine vermitteln die Adhäsion an die Plasmamembran (entnommen aus (Böse, 2005)).

#### 1.1.3.4 Entactin/Nidogen

##### I. Sequenz- und Strukturdaten

Da das Protein Entactin Thema dieser Arbeit ist, wird hier ein ausführlicherer Überblick zu den bisher publizierten Daten gegeben. Bisher sind zwei Entactin-Isoformen bekannt:

Entactin-1 wurde erstmals 1977 in der extrazellulären Matrix der Mauslinie M1563-B3 entdeckt (Chung et al., 1977). 1983 wurde aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumor der Maus eine degradierte Form von Entactin isoliert, die zunächst für ein neues Protein gehalten und Nidogen genannt wurde (Timpl et al., 1983); das entsprechende Gen für *entactin-1* wurde 1988 (Durkin et al., 1988), das für *nidogen-1* praktisch zeitgleich von einer anderen

Arbeitsgruppe sequenziert (Mann et al., 1989; Nagayoshi et al., 1989). Obwohl Sequenzidentität der beiden Proteine festgestellt wurde, werden in der Literatur die Namen Entactin und Nidogen weiterhin nebeneinander verwendet. Das Gen für *entactin-2* wurde 1998 kloniert und sequenziert (Kimura et al., 1998). Entactin-1 und -2 sind ubiquitär in fast allen Basalmembranen vorkommende Proteine, deren spatiale Expressionsmuster beim Embryo zum großen Teil übereinstimmen, im adulten Organismus aber in manchen Organen bzw. Geweben deutliche Unterschiede zeigen (Dziadek und Timpl, 1985; Gersdorff et al., 2005; Kimura et al., 1998; Miosge et al., 2001; Salmivirta et al., 2002). Beide Entactine werden überwiegend in mesenchymalen Geweben exprimiert und treten sehr früh in der embryonalen Entwicklung auf (16-Zell-Stadium der Morula, ein Entwicklungszustand weit vor der Organogenese (Dziadek und Timpl, 1985).

Übersichtshalber sind nachfolgend einige Daten zu den beiden humanen und murinen Entactinen tabellarisch dargestellt (Tab.1).

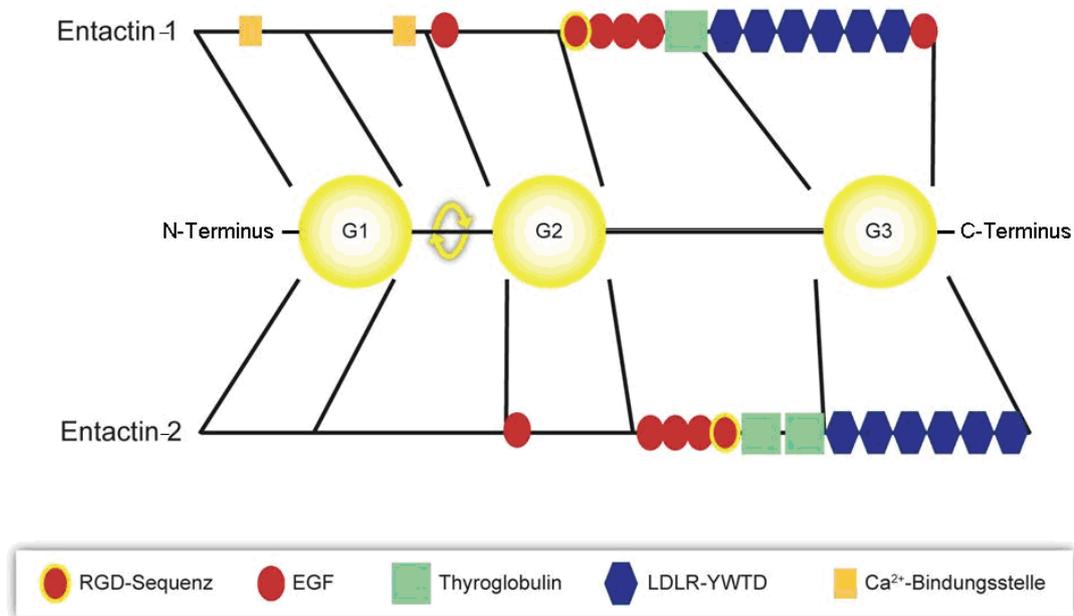
	humanes Entactin-1	humanes Entactin-2	murines Entactin-1	murines Entactin-2
Aminosäuren	1247	1375	1245	1403
Länge Protein	30 nm	40 nm	30 nm	40 nm
Molekulargewicht	148 kDA	200 kDA	148 kDA	180 kDa
mRNA linear	5903 bp	5063 bp	5959 bp	4913 bp
Chromosom	1	14	13	14

Tab.1: **Übersicht zu den humanen und murinen Entactin-1- und Entactin-2-Proteinen** (aus (NCBI, 2007)).

Die Aminosäure-Sequenzen von Entactin-1 bei Mensch und Maus stimmen zu 85% überein (Kimura et al., 1998). Schon bei Wirbellosen konnte Entactin nachgewiesen werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Gen in der Evolution gut konserviert wurde und schon sehr alt ist. Zwischen den beiden humanen *entactin*-Genen liegt eine Übereinstimmung von 46% vor, zwischen den beiden murinen *entactin*-Genen beträgt sie nur 27,4% (Kimura et al., 1998; Kohfeldt et al., 1998). Dennoch unterscheiden sie sich in ihrem Aufbau nur wenig. Sie liegen als Protein in Form einer einzelnen, mehrfach gefalteten Polypeptidkette mit zahlreichen Sulfat- und Glykosylresten vor.

Untersuchungen zum molekularen Aufbau zeigten drei globuläre Domänen (G1-G3), welche durch zwei längliche Domänen verbunden sind (Aumailley et al., 1993). Die Hauptdomänen tragen Module, die verschiedene Bindungsmöglichkeiten der Entactine repräsentieren. Diese Module sind wiederkehrende Elemente in zahlreichen Proteinen der extrazellulären Matrix (Hohenester und Engel, 2002).

Schematisch werden hier beide Entactine dargestellt:



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau von Entactin-1 und Entactin-2.** Die Proteinstruktur beider Entactine ist sehr ähnlich und unterscheidet sich geringfügig in der Anzahl der Module und der Länge. In eines der sechs bzw. fünf EGF-Module ist jeweils eine RGD-Sequenz zur Zellerkennung mittels Integrinen eingefügt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen fehlen Entactin-2, dafür besitzt es ein weiteres Thyroglobulin-ähnliches Modul. Beide Proteine haben eine Region mit hoher Homologie zum LDL-Rezeptor, die repetitive YWTD-Sequenzen enthält. Die G2-Domäne vermittelt die Bindung an Kollagen Typ IV und Perlecan, während die G3-Domäne u.a. an Laminin  $\gamma 1$  bindet. Die G1-Domäne kann um die G2-Domäne frei rotieren, während die G2- und die G3-Domäne starr miteinander verbunden sind.

## II. Bindungsmöglichkeiten der Entactine an andere Proteine

Über die genaue biologische Bedeutung der Entactine kann nach wie vor nur spekuliert werden. Während die Bindungen, die Entactin zu den Hauptbestandteilen der Basalmembran eingeht, vergleichsweise gut charakterisiert sind, ist über seine anderen Funktionen noch nicht viel bekannt.

Beide Entactine binden stark an Perlecan und Kollagen Typ IV. Laminin wird ebenfalls von beiden Proteinen gebunden, aber wesentlich stärker von Entactin-1 (Fox et al., 1991). Da Laminine und Kollagene selbstständig polymerisieren können, nicht aber miteinander, wurde für Entactin eine Rolle als räumlicher Organisator diskutiert, indem es über stabile jedoch nicht kovalente Bindungen eine Verknüpfung der Laminin-Netzwerke mit den Kollagen-Netzwerken vermittelt und so eine Bildung von Dreifachkomplexen ermöglicht (siehe Abbildung 1 (Aumailley et al., 1993; Yurchenco und Schittny, 1990)). Kultiviert man Muskelzellen auf einer Matrix aus extrazellulären Komponenten bis zur Kontraktionsreife und behandelt die Matrix dann mit Entactin-Antikörpern, können die Zellen nach Kontraktion nicht mehr an die Matrix binden (Funanage et al., 1992). Dies weist auf eine funktionelle Bedeutung der Entactine bei der Myogenese hin.

Beide Entactine sind sehr sensibel für Proteasen, was ein Hinweis auf modellierende Aufgaben in der Organisation der extrazellulären Matrix ist (Dziadek und Timpl, 1985; Timpl et al., 1987). Durch Bindung an Laminin wird die Laminin-Bindungsstelle des Entactins vor proteolytischem Abbau geschützt und das Netzwerk stabilisiert (Ekblom et al., 1994). Diese Bindung erfolgt Calcium-abhängig und ist daher vermutlich einer Regulation unterworfen (Paulsson, 1988; Yurchenco et al., 1985), ein Mechanismus, den auch andere Proteine der extrazellulären Matrix benutzen (Maurer et al., 1996). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Entactin-2 keine zusätzliche Bindungsstelle für Calcium besitzt.

Beide Entactine besitzen eine sogenannte RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp), die über zelluläre transmembrane Integrine Kontakt zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix vermitteln kann (Chakravarti et al., 1990; Kimura et al.,

1998; Yelian et al., 1993). Diese Sequenz wird von vielen verschiedenen Integrinen erkannt, um Bestandteile der extrazellulären Matrix zu binden. Eine zweite Zellbindungsstelle des Entactin-1 ist postuliert worden. Hierbei ist bemerkenswert, dass die Morphologie der Zellen stark variierte in Abhängigkeit von der eingenommenen Bindungsstelle des Entactin-1. Ein Einfluss der Zellbindungsmodule auf die Konfiguration des Cytoskeletts ist zu vermuten (Dong et al., 1995).

Ebenfalls über ein Integrin (*leukocyte response integrin*) wirkt Entactin-1 chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten (Gresham et al., 1996; Senior et al., 1992). Diese Zellen stehen am Anfang der Immunabwehr und wandern früh und massiv in zerstörtes oder infiziertes Gewebe ein.

Einige Proteine des Blutgerinnungssystems vermitteln über dasselbe Integrin Chemotaxis (Gresham et al., 1989). Mit mindestens drei dieser Proteine (Kollagen Typ IV, Fibronectin, Fibrinogen) kann Entactin-1 selbst eine Bindung eingehen (Chung et al., 1993; Wu und Chung, 1991; Wu et al., 1991).

Ob Entactin-2 dieselben Bindungsmöglichkeiten hat, ist nicht näher untersucht aber aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit anzunehmen. Entactin-2 kann außerdem exklusiv Tropoelastin und Endostatin binden. Eine Beteiligung bei der Angiogenese wird vermutet (Schymeinsky et al., 2002).

Beide Entactine haben mehrere EGF-ähnliche Epitope, deren Bindungspartner allerdings noch nicht bekannt sind. EGF ist ein ubiquitärer Wachstumsfaktor, der im Zusammenspiel mit Kofaktoren die Proliferation von Zellen fördert. Durch EGF selbst wiederum wird die Produktion von Entactin-1 im Mesenchym angeregt (Kadoya et al., 1997).

Ausserdem verfügen beide Entactine über ein Modul, das dem LDL-Rezeptor ähnelt, und ein weiteres Modul, das strukturelle Ähnlichkeit mit dem Schilddrüsenhormon Thyroglobulin hat (Durkin et al., 1988); von letzterem besitzt Entactin-2 zwei. Über ihre Bedeutung ist bisher nichts bekannt (Kimura et al., 1998; Kohfeldt et al., 1998).

### III. Expression der *entactin*-Gene im embryonalen und adulten Organismus

Beide Entactine werden von zahlreichen Organen und Geweben gebildet, sind aber exklusiv in Basalmembranen zu finden. Alle Ergebnisse darzustellen würde den Rahmen dieser Einleitung sprengen; daher soll hier auf die für diese Arbeit relevanten Daten eingegangen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den spatialen Expressionsmustern des *entactin-1*- und *-2*-Gens bei der adulten Maus konnten sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene vor allem in der Skelett- und Herzmuskulatur gefunden werden. Eine hohe Konzentration von Entactin-2 in der endothelialen Basalmembran und um Nervenfasern ist kennzeichnend für beide Organe, während in der muskulären Basalmembran kaum Entactin-2 nachweisbar ist. Entactin-1 dagegen ist mit deutlichem molaren Überschuß sowohl in der Basalmembran von Muskelzellen anzutreffen als auch um Gefäße und Nerven (Kohfeldt et al., 1998). Dies ist sehr bemerkenswert, da in anderen Organen bezüglich des räumlichen Expressionsmusters der beiden *entactin*-Gene keine derartigen Unterschiede gefunden wurden. Zusätzlich konnten während der Embryonalentwicklung abweichende Expressionsdaten für *entactin-1* im Bereich der Skelettmuskulatur gezeigt werden; hier unterscheiden sich aber vor allem die temporalen Expressionsmuster (Miosge et al., 2002). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass kürzlich von unserer Arbeitsgruppe auch bei der *in vitro*-Differenzierung von Myoblasten eine zeitlich gegenläufige Regulation der Expression beider *entactin*-Gene festgestellt wurde: Während die Expression von *entactin-2* nach Induktion der Differenzierung stark ansteigt, kommt es gleichzeitig zu einer Repression der *entactin-1*-Expression (Neu et al., 2006).

### IV. Transgene Mausmodelle zur Untersuchung der Funktionen der Entactine *in vivo*

Um Informationen über die Funktion der einzelnen Entactine zu erhalten, wurden *Knockout*-Mäuse generiert, denen jeweils eines der Entactine in ihrem Genom fehlte (Bader et al., 2005; Miosge et al., 2002; Murshed et al., 2000; Schymeinsky et al., 2002). Beide *Knockout*-Mäuse zeigten jedoch erstaunlicherweise keinen offensichtlichen Phänotyp. Sie waren nicht nur

lebensfähig, sondern auch fruchtbar und hatten keine anatomischen Missbildungen. Erst in späteren Untersuchungen fanden sich subtile neurologische Defekte (Dong et al., 2002; Kohling et al., 2006). In diesem Kontext ist es bedeutsam, dass die Ausschaltung des einzigen *entactin*-Gens bei *C.elegans* zu Störungen des Axonwachstums führt (Kim und Wadsworth, 2000) und die Empfindlichkeit für cholinerge Analoga beeinflusst (Ackley et al., 2003).

Untersuchungen zur Struktur der Basalmembran bei den *Knockout*-Tieren ließen keine Unterschiede in der Verteilung bedeutender Basalmembran-Proteine (Kollagen Typ IV, Laminin, Perlecan) zum Wildtyp erkennen. Es konnte allerdings in der Muskulatur von Entactin-1-*Knockout*-Mäusen vermehrt Entactin-2 nachgewiesen werden (Murshed et al., 2000). Im Herzen zeigte sich sogar ein Entactin-2-Überschuss, wenn man die Entactin-1-Gesamt mengen bei der Wildtyp-Maus als Referenz heranzieht (Miosge et al., 2002). Interessanterweise zeigten die Entactin-2-*Knockout*-Mäuse praktisch keine Unterschiede zum Wildtyp. Daraus wurde geschlossen, dass den Entactinen entweder gar keine relevante Aufgabe bei der Formation von Basalmembranen zukommt und daher auch kein kompensatorischer Bedarf bestand, oder aber dass sie selbst oder andere Proteine vollständig füreinander kompensieren können. Zur weiteren Klärung dieser beiden Hypothesen wurden die einfachen *Knockout*-Mäuse gekreuzt und Doppel-*Knockout*-Mäuse gezüchtet (Bader et al., 2005). Hierbei waren die doppelt homozygoten Tiere zwar nicht lebensfähig, starben jedoch erst nach der Geburt an respiratorischem Versagen. Eine Untersuchung von Herz und Lunge ergab, dass die Organe ausgebildet, aber teilweise nicht voll ausgereift waren. Sie zeigten unvollständige, aber immer noch funktionsfähige Basalmembranen. Im prinzipiell funktionsfähigen Herzen scheinen daher andere Komponenten der extrazellulären Matrix oder die *Disci intercalares* (herzspezifische Zell-Zell-Verbindungen) die Integrität der Basalmembran aufrechterhalten zu können. Es ist zu vermuten, dass den Entactinen im Herzen eine andere Aufgabe als die Formation der Basalmembran zukommt (Bader et al., 2005).

Auch in der Lunge kommt es erst Stunden nach der Geburt zum Kollaps aufgrund nicht entfalteter Alveolen. Hier jedoch scheint die vernetzende Funktion der Entactin-Laminin-Bindung die Ursache für die Störung zu sein. Dafür spricht auch, dass an Mäusen mit einer blockierten Entactin-Bindungsstelle der Laminin- $\gamma$ 1-Kette analoge Defekte beobachtet werden konnten (Willem et al., 2002).

Grundsätzlich war bei den transgenen Mäusen eine insgesamt geringere Menge an Basalmembran-Proteinen nachweisbar, was aber vermutlich nicht auf einer geringeren Synthese derselben, sondern auf einer herabgesetzten Retention der entsprechenden Proteine in der extrazellulären Matrix beruhte. Entactine spielen daher eventuell eher einer Rolle bei der Aufrechterhaltung einer intakten Basalmembran als bei ihrer Bildung. Außerdem lässt die morphologische Vielfalt der beobachteten Defekte bei den Doppel-*Knockout*-Tieren gewebsspezifisch unterschiedliche Funktionen der Entactine vermuten (Bader et al., 2005).

Hierfür spricht auch die Entdeckung einer speziellen Entactin-Isoform bei der Ratte, die exklusiv in der motorischen Endplatte zu finden ist (Chiu und Ko, 1994). Basierend darauf wurden zahlreiche Untersuchungen zur Verteilung und der Rolle von Basalmembran-Komponenten an der motorischen Endplatte durchgeführt. Diese legen nahe, dass Basalmembran-Komponenten und darunter auch das Entactin eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der neuromuskulären Verbindung spielen und hier eventuell auch funktionelle Aufgaben haben könnten. (Ackley et al., 2003; Arikawa-Hirasawa et al., 2002; Kim und Wadsworth, 2000; Kohling et al., 2006).

## **1.2 Skelettmuskelzellendifferenzierung**

Die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu reifer Skelettmuskulatur ist ein komplexer Vorgang, der hochgeordnet abläuft und fein reguliert wird. Während der Entwicklung des Embryos kommt es unter Beteiligung einer Vielzahl von Faktoren zu einer Transformation pluripotenter Stammzellen zunächst in determinierte Myoblasten, die sich weiter teilen, um

dann als proliferationsinkompetente Myozyten zu größeren, makroskopisch erkennbaren Muskelfaserbündeln zu fusionieren (Sabourin und Rudnicki, 2000). Ruhende Satellitenzellen (determinierte Myoblasten) in der adulten Muskulatur können zeitlebens der Differenzierung ähnliche Regenerationsprozesse und adaptives Wachstum vermitteln. Einige der Regulatoren dieses Prozesses sind bereits bekannt, beispielsweise die myogenen Transkriptionsfaktoren der MRF- und MEF-2-Familien, verschiedene Regulatoren von Signaltransduktionswegen, Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie Proteine der extrazellulären Matrix (Palmer und Rudnicki, 2002). Die Komplexität des gesamten Vorgangs lässt jedoch vermuten, dass bei weitem noch nicht alle beteiligten Faktoren identifiziert wurden (Delgado et al., 2003).

### **1.3 In dieser Arbeit verwendete Modellsysteme zur Untersuchung der *in vivo*-Funktion der Entactine in der Skelett- und Herzmuskulatur**

Erkrankungen der Skelett- und Herzmuskulatur gehen häufig mit einer aberranten Expression der Gene einher, die normalerweise den Differenzierungsprozess der beteiligten Muskelzellen in der Embryonalentwicklung, bei Skelettmuskelzellen auch im Zusammenhang mit regenerativen Prozessen, steuern (Greenberg et al., 2002; Tkatchenko et al., 2000). Nachdem in unserer Arbeitsgruppe vor Beginn dieser Arbeit Hinweise darauf erhalten worden waren, dass Entactine eine wichtige Rolle bei der Regulation der Skelettmuskelzellendifferenzierung *in vitro* spielen, sollte daher in dieser Arbeit untersucht werden, ob dies auch *in vivo*, insbesondere bei Skelett- und Herzmuskelerkrankungen, zutreffen könnte.

Allgemein stehen zur Untersuchung von Skelett- und Herzmuskelerkrankungen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung, wobei in dieser Arbeit jeweils ein Modellsystem für die Skelett- und die Herzmuskulatur verwendet wurde, worauf nachfolgend kurz eingegangen werden soll.

Zum einen handelte es sich um die *mdx*-Maus, ein Modellsystem für die kongenitale x-chromosomal rezessiv vererbte Duchenne-Muskeldystrophie, und zum anderen um die experimentell durch Coxsackie B3-Viren verursachte Myokarditis. Beide Modellsysteme entsprechen den jeweiligen menschlichen Krankheitsbildern.

Bei der relativ häufigen Duchenne-Muskeldystrophie (1 von 3500 neugeborenen Jungen) kommt es schon früh im Kindesalter zu fortschreitender Degeneration der Skelettmuskulatur mit anschließender bindegewebiger Auffüllung der zerstörten Areale. Grund ist ein Defekt in einem für ein wichtiges Strukturprotein, dem Dystrophin, kodierenden Gen. Die Krankheit verläuft stets tödlich, sobald sie die Atemwege erreicht (Deconinck und Dan, 2007). Die *mdx*-Maus hat denselben Gendefekt (Bulfield et al., 1984), wenngleich der Krankheitsverlauf hier weniger dramatisch als beim Menschen ist, da die regenerativen Leistungen der Maus wesentlich effektiver sind.

Die nach dem Ort ihrer erstmaligen Identifizierung, einem Vorort bei New York benannten Coxsackie-Viren können sowohl beim Menschen als auch bei der Maus eine Myokarditis auslösen (Kim et al., 2001). Dabei kommt es nach heftigen Entzündungsreaktionen im Herzmuskel zu einer Entfernung der zerstörten Zellen und einem Ersatz durch Bindegewebsstrukturen. Die Myokardidits verursacht u.a. Herzrhythmusstörungen und -insuffizienz, die sich in Leistungsschwäche äußern und letztendlich zu Herzversagen führen können.

## 1.4 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Die oben beschriebenen Ergebnisse deuten bereits an, dass eine genaue Kontrolle der Expressionsmuster der *entactin*-Gene in Skelett- und Herzmuskelzellen wichtig für die Funktion dieser Gewebe unter physiologischen und pathologischen Bedingungen sein könnte. Außerdem gab es vor Beginn dieser Arbeit wie beschrieben Hinweise aus der Literatur auf eine mögliche funktionelle Redundanz der beiden Entactine in vielen Geweben, eventuell aber nicht in der Skelett- und Herzmuskulatur.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollten daher insbesondere die beiden folgenden Fragen geklärt werden:

1. Wie ändert sich die Expression der *entactin*-Gene in Skelett- und Herzmuskelzellen unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen?

Um Antworten auf diese Frage zu finden, sollten die Expressionsmuster der beiden *entactin*-Gene in Skelett- und Herzmuskelzellen und –gewebe untersucht werden.

Als physiologisches Äquivalent sollte die Differenzierung bei verschiedenen Zelllinien induziert werden, die sich in ihrem Differenzierungspotential unterscheiden und anschließend auf ihre *entactin*-Expression hin untersucht werden.

Als pathologisches Äquivalent wurden maligne entartete Zellen sowie Gewebeproben von myopathischen Mäusen untersucht.

2. Gibt es eine Crossregulation der beiden *entactin*-Gene in Skelettmuskelzellen?

Dies wäre ein erster Hinweis auf funktionelle Redundanz.

Um diese Frage zu beantworten, sollten Genexpressionsstudien an Zellen durchgeführt werden, die entweder eines der beiden *entactin*-Gene überexprimierten oder in denen die Expression jeweils eines der beiden Gene mittels spezifischer siRNAs gehemmt worden war.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

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

Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Merck, Darmstadt
MOPS	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarcosine	Sigma, Steinheim
Norepinephrin-Bitartrat	Sigma, Steinheim
Oligo-Primer	BioTez, Berlin
PCR-Puffer, 10x	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenol	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Polaroid-Filme	Polaroid, St. Albans, UK
Röhrchen, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Roti-Mark Prestained	Roth, Karlsruhe
SDS/Natriumlaurylsulfat	Roth, Karlsruhe
Trichlormethan (Chloroform)	Roth, Karlsruhe
Tris-Hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
TRIzol®	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween20	Roth, Karlsruhe
Ultra Pure Water	Biochrom, Berlin
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	Nunc, Dänemark
Zellkulturschalen	TPP, Schweiz
Zellkultur-Testplatten	TPP, Schweiz

### 2.1.2 Enzyme

Restriktionsenzyme + Puffer	Roche, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
T7-RNA-Polymerase	Roche, Mannheim

### 2.1.3 Antikörper

anti-Nidogen-1, aus Kaninchen	Abcam, UK
anti-Digoxigenin-AP	Roche, Mannheim
Cy3-gekoppelter	
Ziege-anti-Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg
Esel-anti-Kaninchen IgG,	
Peroxidase-gekoppelt (ECL)	Amersham, Braunschweig

### 2.1.4 Zytokin

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )	Roche, Mannheim
--	-----------------

### 2.1.5 Oligodesoxynukleotide

#### 2.1.5.1 Primer zur Klonierung von *entactin-1*

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

zur Klonierung eines 501 bp-Fragmentes

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

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

#### 2.1.5.2 Primer zum Nachweis von *entactin-2* mittels PCR

*entactin-2*, Maus und Mensch (Kimura et al., 1998; Kohfeldt et al., 1998)

zur Amplifizierung eines 446 bp-Fragmentes

Ent-2(5'): 5'-CG CCCGG CATCT GTGGG CACCT TCCTG-3'

Ent-2(3'): 5'-CG AAGCTT GGAGC TTCTC TATTC CAGTC-3'

### 2.1.6 Plasmide

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

### 2.1.7 Vektoren

pBluescript SKII(-) (Transkriptionsvektor)	Stratagene, Heidelberg
--	------------------------

### 2.1.8 Kommerzielle Kits

BCA* Proteinbestimmungssystem	Pierce, Rockford, Illinois, USA
5-Bromo-2'-deoxy-uridine	Roche, Mannheim
Labeling and Detection Kit	

DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche, Mannheim
QIAGEN Plasmid Maxi/Midi Kits	Qiagen, Düsseldorf
RNeasy Kit	Qiagen, Düsseldorf
Silencer® siRNA Transfection II Kit	Ambion Inc., Huntington, UK

## 2.1.9 Bakterienstämme

E. coli XL1 Blue	Stratagene, Heidelberg
------------------	------------------------

## 2.1.10 Mausstämme

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

## 2.1.11 Eukaryontische Zelllinien

C2C12	Mäusemyoblasten, Helen Blau, Stanford University
C2C12-ent-1	Mäusemyoblasten, Barbara Munz und Helen Blau, Stanford University
C2C12-ent-1 <i>antisense</i>	Mäusemyoblasten, Barbara Munz und Helen Blau, Stanford University
C2C12-ent-2	Mäusemyoblasten, Barbara Munz und Helen Blau, Stanford University
C2C12-ent-2 <i>antisense</i>	Mäusemyoblasten, Barbara Munz und Helen Blau, Stanford University
C2C12-lacZ	Mäusemyoblasten, Barbara Munz und Helen Blau, Stanford University
HL1	Mäusekardiomyozyten, (Claycomb et al., 1998)
HUVEC	Humane, umbilikale, venöse Endothelzellen, (Yamaguchi et al., 1998)

RD12	Humane Rhabdomyosarkomzellen, (Lollini et al., 1991)
RD18	Humane Rhabdomyosarkomzellen, (Lollini et al., 1991)

### 2.1.12 Standardpuffer und Lösungen

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

### 2.1.13 Software

Photoshop CS2	Adobe©
Microsoft Office 2003	Microsoft©
IQ Easy Measure 1.4.1	INTEQ GmbH
WebCutter 2.0	Copyright by Max Heiman
NIH Image 1.62b	Copyright by Wayne Rasband
BLAST	NCBI

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung und Aufbewahrung eukaryontischer Zellen

Zellen der Linien C2 und RD Zellen wurden grundsätzlich in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit Penicillin/Streptomycin (je 100U/ml) sowie Serum vom fötalen Kalb (FKS) als Zusatz (20% für C2C12-Zellen, 10% für alle anderen Zellen) kultiviert. Dieses Kulturmedium wird in dieser Arbeit als Proliferationsmedium bezeichnet. Je nach Zelllinie wurde dem Medium soviel Serum beigefügt, dass eine 10 oder 20%ige Lösung entstand. Die Aufzucht erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>. Alle Zellen wurden vor Erreichen einer für die jeweilige Linie kritischen Konfluenz passagiert und ausgedünnt. Dazu wurden sie nach Abnahme des Kulturmediums mit sterilem PBS gewaschen und durch fünfminütige Inkubation im Brutschrank mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und weiterkultiviert.

DMEM/FKS (Proliferationsmedium):

FKS	10% (C2) bzw. 20% (RD)
Penicillin/Streptomycin	0,5%
L-Glutamin	1%

Trypsin/EDTA:

Trypsin (w/v)	0,05%
EDTA	0,02M
H <sub>2</sub> O dest.	1x

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

Einfriermedium:

DMEM	1x
FKS	10%
DMSO	10%

Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen schnell im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, mit viel DMEM gewaschen und mindestens 24 Stunden in Zellkulturflaschen in absoluter Ruhe belassen.

Kardiomyozyten der Linie HL-1 wurden in einem *Claycomb Medium* mit folgenden Zusätzen kultiviert.

Proliferationsmedium K:

<i>Claycomb Medium</i>	1x
FKS	10%
Norepinephrin	1%
Penicillin/Streptomycin	je 100U/ml
L-Glutamin	4mM

Die Zellen wurden in speziell beschichteten Kulturflaschen kultiviert. Dazu wurden die Böden der Flaschen mit 0,005% Gelatine und 25µg Fibronectin in 2ml sterilem Wasser überschichtet. Anschließend wurden die Flaschen über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde dann abgesaugt und die Flaschen mit sterilem PBS gespült. So vorbereitet konnten die Kulturflaschen sofort verwendet werden oder bei -20°C bis zu einem Monat gelagert werden.

HL-1-Zellen wurden analog zu dem Protokoll für C2-Zellen kultiviert und eingefroren, jedoch unter Verwendung eines modifizierten Einfriermediums:

HL-1-Einfriermedium:

Claycomb Medium	1x
FKS	10%
DMSO	5%

Die Induktion mittels Zytokinen erfolgte durch Zugabe nach Erreichen der kritischen Konfluenz. Während des Induktionsversuchs wurde serumfreies Medium verwendet, um eine Beeinflussung durch serumeigene Wachstumsfaktoren und Zytokine zu vermeiden.

HL-1-Hungermedium:

Claycomb Medium	1x
BSA	0,5%
Penicillin/Streptomycin	je 100U/ml
L-Glutamin	4mM

## 2.2.2 Induktion der Differenzierung

Um Zellen der Linien C2 und RD in die Differenzierung eintreten zu lassen, wurde ihnen Serum entzogen und stattdessen DMEM mit nur 2% Pferdeserum als Zusatz beigegeben. Dieses Kulturmedium wird in dieser Arbeit als Differenzierungsmedium bezeichnet.

DMEM/PS (Differenzierungsmedium):

Pferdeserum	2%
Penicillin/Streptomycin	0,5%
L-Glutamin	1%

## 2.2.3 Transfektion von small interfering RNA (siRNA)

Bei dieser Methode werden synthetisch hergestellte kleine RNA-Fragmente von ca. 22 Nukleotiden Länge in die Zelle transfiziert. Dort werden sie von einem Proteinkomplex (RNA-induced silencing complex) aufgenommen, der durch spezifische Bindung an die Ziel-mRNA diese abbaut und so zu einer verringerten Translation führt. Sowohl die Abnahme der entsprechenden mRNA als auch des Proteins können dann bei erfolgreicher Transfektion nachgewiesen werden.

Der in dieser Arbeit verwendete Transfektionskit der Firma Ambion wurde in Zusammenhang mit kommerziellen siRNAs derselben Firma zunächst gemäß dem Herstellerprotokoll angewendet. Da sich verschiedene Zelltypen unterschiedlich gut transfizieren lassen, mussten einige Parameter des Herstellerprotokolls variiert werden, um die optimalen Bedingungen für eine deutliche Suppression der Genexpression zu ermitteln. Zur Anwendung kamen je drei siRNA-Typen, die spezifisch für *entactin-1* bzw. *entactin-2* waren. Der Transfektionskit umfasste zwei verschiedene Transfektionsreagenzien. Die verwendete Zelllinie waren C2C12-Myoblasten. Zunächst wurde die Konzentration des Transfektionsmediums von sechs bis zehn Mikromol pro Vertiefung variiert. Die Konzentration der eingesetzten siRNA-Spezies wurde variiert von 50 bis 100 Nanomol pro Vertiefung. Schließlich stellte sich bei den folgenden Versuchen ein Protokoll als optimal heraus, bei dem eine zu 70-80 Prozent konfluente Zellkulturflasche von 75 Quadratzentimetern auf drei Zellkulturplatten mit jeweils sechs Vertiefungen verteilt wurde, nachdem die Zellen mit zehn Mikrolitern Transfektionsmedium siPORT Amine sowie einer siRNA mit einer Endkonzentration von 100 Nanomol pro Vertiefung versetzt worden waren. Als Nährmedium wurde den Zellen DMEM/20%FKS beigegeben, das für Differenzierungsversuche gegen DMEM/2%PS ausgetauscht wurde. Bei allen siRNA-Transfektionen wurde auf den Zusatz von Penicillin/Streptomycin verzichtet, um Interaktionen mit dem Transfektionsreagenz zu vermeiden.

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Anzucht und Aufbewahrung von E.coli-Stämmen

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

LB-Medium:

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

Antibiotika:

Ampicillin 100µg/ml

*E.coli* Kulturen wurden ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Herstellung der Platten wurde LB-Flüssigmedium vor dem Autoklavieren mit 1,5% (w/v) Agar versetzt, nach dem Autoklavieren auf ca. 50°C abgekühlt, bei Bedarf mit Antibiotika versetzt und in sterile Petrischalen gegossen. Die Platten wurden nach dem Erkalten bei 4°C aufbewahrt. Waren die Bakterien mit Plasmiden transformiert, die die Möglichkeit des „Blau/Weiß-Screenings“ zur Überprüfung der Klonierungseffizienz boten (z.B. pBluescript SK II (-)), wurden vor dem Ausstreichen der Bakterien zunächst 100µl X-Gal- und 40µl IPTG-Stammlösung pro LB-Ampicillin-Platte ausplattiert.

X-Gal-Stammlösung:

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

IPTG-Stammlösung:

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

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

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

Um rekombinante Plasmide zu vermehren, wurden diese in *E.coli* Zellen eingebracht. Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien des Stammes XL1 *Blue* wurde eine frische Übernachtskultur 1:100 mit LB-Medium verdünnt und unter Schütteln bei 37°C so lange inkubiert, bis eine Absorption von 0,4 bis 0,5 bei 620nm erreicht war. Nach Zentrifugation (10min bei 4°C und 2500 Upm) wurde das Sediment vorsichtig in einem Viertel des ursprünglichen Volumens in kalter, steriler 0,1M Magnesiumchloridlösung resuspendiert. Nach 30min Inkubation auf Eis wurde wie oben zentrifugiert und das Sediment in einem Fünfzigstel des ursprünglichen Volumens in kalter, steriler 0,1M Calciumchloridlösung resuspendiert. Nach 3-4h

Inkubation im Eisbad wurde steriles 87%iges Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 30% zugegeben. Aliquotiert konnten die Zellen dann über mehrere Monate hinweg bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Transformation von E.coli Zellen mit Plasmid-DNA

200 $\mu\text{l}$  transformationskompetenter E.coli Zellen ( siehe 2.3.2) wurden mit einer geeigneten Menge Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz versetzt, sofort vorsichtig gemischt und mindestens 30min im Eisbad inkubiert. Nach einem Wärmeschock (90sec bei  $42^{\circ}\text{C}$ ) wurde der Transformationsansatz sofort wieder auf Eis gebracht und nach weiteren 5min mit 600 $\mu\text{l}$  LB-Medium versetzt. Nach 30min Schütteln wurden die Bakterien auf LB-Ampicillin-Platten, die gegebenenfalls vorher mit X-Gal und IPTG behandelt worden waren (siehe Abschnitt 2.2.1), ausgestrichen und 16-20h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### 2.4.2 Reinigung von Nukleinsäuren über Phenolextraktion und Ethanolfällung

Um in Wasser gelöste Nukleinsäuren aufzureinigen, wurden sie mit Phenol/Chloroform gewaschen und anschließend mit Ethanol ausgefällt. Dazu wurden die Proben 1:1 mit der Phenol-Phase des Phenol-Chloroformansatzes versetzt und nach sehr gründlichem Vortexen zur Phasentrennung zentrifugiert (13.000Upm, 1min, RT). Im Folgenden wurden die in der wässrigen Phase enthaltenen Nukleinsäuren mit dem 2,5-fachen Volumen 100%igen Ethanols sowie dem 0,1-fachen Volumen 3M Natriumacetatlösung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  während einer halben Stunde gefällt. Schließlich wurde der Ansatz erneut zentrifugiert (13.000UpM, 15min, RT) und das Sediment nach einem weiteren Waschgang mit 70%igem Ethanol in einer entsprechenden Menge DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  wieder aufgenommen.

Phenol/Chloroform, pH 7,5:

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

### 2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

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

### 2.4.4 DNA-Präparation

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

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

#### 2.4.4.2 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach erwarteter Größe in 0,7-2,5%igen Agarosegelen in TAE Puffer; zur Auftrennung gesamtzellulärer RNA wurden 1%ige Gele verwendet. Standardmäßig wurden die Gele mit 1µg Ethidiumbromid pro ml Gel versetzt. Den Proben wurde eine geeignete Menge Auftragspuffer zugegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei 100V. Anschließend wurden die Gele im UV-Durchlicht betrachtet (256nm) und mit einer Polaroidkamera (Blende 16, 0,5sec; 3000 ASA; Rotfilter) fotografiert.

Auftragspuffer:

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

## 2.4.5 In vitro-Reaktionen an DNA

### 2.4.5.1 Polymerasekettenreaktion

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) können spezifische DNA-Fragmente aus einer DNA-Matrize selektiv amplifiziert werden. Die verwendete DNA-Polymerase stammt aus dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) und ist thermostabil. Dies ist notwendig, da die DNA auf 94°C erhitzt werden muss, damit sie sich entfalten kann. Bei der anschließenden Abkühlung auf 40-60°C lagern sich *Primer* an die einzelsträngigen DNA-Molekülen an. Sie sind kurze zu den Enden der gewünschten Sequenz komplementäre Oligonukleotide, die vorher synthetisch hergestellt wurden. Sie markieren die Startpunkte für die Polymerase, daher muss ihre Sequenz so ausgewählt werden, dass sie möglichst genau an den Enden des gewünschte DNA-Abschnitts binden. Die Anlagerung ist abhängig von der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer, die sich wiederum aus dem stöchiometrischen Verhältnis ihrer Nukleotidzusammensetzung ergibt.

Nach der Anlagerungsphase wird der Ansatz auf 72°C erhitzt, was etwas unter dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase liegt. Diese kann dann über die *Primer* an den DNA-Strang binden und aus den dem Reaktionsansatz beigegebenen Mononukleotiden die Sequenz zwischen den beiden *Primern* synthetisieren. Durch mehrmaliges Wiederholen dieses Temperaturzyklus kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Fragments.

Reaktionsansatz:

ddH <sub>2</sub> O	33,8 µl
10xPCR-Puffer	5,0 µl
dNTP-Mix (2,5 mM)	8,0 µl
5'-Primer (20 µM)	2,5 µl
3'-Primer (20 µM)	2,5 µl
cDNA	2,0 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (1U)	0,2 µl

Die Reaktion erfolgte in sterilen, DNase freien Reaktionsgefäßen mit einem Ansatz von 50 µl. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. cDNA und *Taq*-Polymerase wurden als letztes unmittelbar vor dem Erhitzen hinzugefügt. Um eventuelle Verunreinigungen ausschließen zu können, wurde ein Kontrollansatz mitgeführt, der alle Reagenzien außer der DNA-Matrize enthielt.

Die Reaktion wurde mit dem PCR-Gerät *Primus evolution 25/96* der Firma Clemens nach folgendem Schema durchgeführt.

4min	94°C	Denaturierung
2min	40-60°C	Anlagerung
30s - 2min	72°C	Synthese

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

#### 2.4.5.2 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsendonukleasen wurde den Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) gefolgt. Es wurden 0,5-1 Einheiten Restriktionsenzym pro µg DNA eingesetzt.

#### 2.4.5.3 Herstellung von RNA-Sonden aus rekombinanten Plasmiden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Digoxigenin-markierten *antisense*-RNA-Sonden wurden mit dem DIG RNA Labeling Kit (Roche, Mannheim) hergestellt.

Dazu wurde ein rekombinantes Plamid mit dem gewünschten *Insert* mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease linearisiert. Anschließend wurde die DNA-Matrize mit Phenol/Chloroform gewaschen, durch Ethanol gefällt und anschließend in RNasefreiem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die DNA-Matrize wurde durch *in vitro*-Transkription mit dem DIG RNA Labeling Kit nach Angaben des Herstellers in RNA umgeschrieben. Dafür

wurden 0,5-2µg der DNA-Matrize verwendet, die zuvor für 10min bei 65°C denaturiert worden war. Je nach Orientierung der Sequenz innerhalb des Plasmids wurde eine entsprechende RNA-Polymerase (T7, T3, SP6) verwendet. Es wurde den Angaben des Herstellers gefolgt.

## 2.4.6 RNA-Techniken

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

Bei der Arbeit mit RNA ist eine mögliche Verunreinigung mit RNAsen strikt zu vermeiden, die zur Degradation der RNA führen. Daher wurden ausschließlich sterile Plastik- oder gebackene Glasgefäße (200°C, 8h) verwendet und bei allen Arbeitsschritten Einmalhandschuhe getragen. Allen Lösungen wurde Diethylpyrocarbonat (DEPC) beigegeben und enthaltene RNAsen dadurch inaktiviert. Die Lösungen wurden dazu mit 0,1% (v/v) DEPC versetzt, mehrfach stark geschüttelt und mindestens 16h bei RT inkubiert. Zur anschließenden Inaktivierung des DEPC wurden die Lösungen autoklaviert. Tris-haltige Lösungen dürfen nicht mit aktivem DEPC in Berührung kommen werden und wurden daher in gebackenen Gefäßen mit DEPC-Wasser angesetzt.

### 2.4.6.2 *Isolierung gesamtzellulärer RNA*

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

### 2.4.6.3 *Isolierung von RNA mit TRIzol®*

Mit dem TRIzol®-Kit der Firma Invitrogen lassen sich DNA, RNA und Proteine aus einem Gesamtzell- oder Gewebelysat extrahieren.

Dazu wurden max. 100mg gefrorenes Gewebe in 1ml TRIzol®-Reagenz möglichst zügig durch Homogenisation gelöst. Diese erfolgte mit einem Ultra Turrax® T8 der Firma IKA. Die weiteren Schritte zur Extraktion der RNA folgten dem Herstellerprotokoll.

#### 2.4.6.4 Northern Blot

In DEPC-Wasser gelöste gesamtzelluläre RNA wurde auf eine einheitliche Menge von 0,5-8µg RNA pro Probe aliquotiert. Anschließend wurden die Proben mit 10µl Ladepuffer und einer entsprechenden Menge DEPC-Wasser versetzt, um ein einheitliches Probenvolumen zu erlangen. Vor dem Auftragen wurden die Proben zur Denaturierung der Nukleinsäuren für 1min im Heizblock auf 90°C erhitzt. Es wurde ein 1%iges, horizontales Agarosegel mit 1x MOPS-Puffer als Laufpuffer verwendet und die Elektrophorese dann bei 100-150V (40mA) für 1-2h durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit 20x SSC angefeuchtet und über Nacht mittels des Kapillarblotverfahrens auf eine Nylonmembran (N-Hybond) transferiert, die vorher mit DEPC und 20x SSC benetzt worden war. Als Puffer wurde 20x SSC verwendet sowie Chromatographie-Papiere in geeigneter Menge, um eine Kapillarwirkung zu erhalten. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran einige Minuten in 2x SSC gewaschen. Anschließend wurde die RNA durch 3min UV-Bestrahlung bei 120mJ auf der Membran fixiert. Das Anfärben der RNA erfolgte durch 1-2min Schwenken in Methylblau-Färbelösung. Im Folgenden wurde die Membran mit DEPC-Wasser entfärbt und die 18s- sowie die 28s-RNA-Bande markiert, um später einen Größenvergleich für die Banden zu erhalten. Die Membran wurde anschließend entweder zur weiteren Verwendung getrocknet und bei RT aufbewahrt oder sofort eingesetzt. In diesem Fall wurde die Vorhybridisierung in einem dichten Hybridisationsbeutel für 1h bei 68°C im Wasserbad unter Schütteln mit Hybridisationslösung durchgeführt. Die Hybridisierung mit der Gen-Sonde erfolgte dann in derselben Lösung. Die Sonde wurde dafür vorher in 100µl Hybridisationslösung im Heizblock für 10min auf 68°C erhitzt und dann in den Beutel hinein gegeben. Die Hybridisierung fand über Nacht und ebenfalls bei 68°C im Wasserbad statt. Im Anschluss erfolgten verschiedene Waschschriffe. Zunächst wurde die Membran bei RT 3x 5min auf dem Schüttler mit Waschlösung Nr.1 gewaschen, dann 2x 20min erneut im Wasserbad bei 68°C in Waschlösung Nr.2. Alle folgenden Schritte fanden bei RT statt. Die Membran wurde für 5 min auf dem Schüttler in Puffer 1 gewaschen und dann für 1h in 1% Blockingpuffer geschüttelt. Diesem wurde dann Anti-Digoxigenin-AP in

1:15000-facher Verdünnung zugegeben. Anschließend wurde die Membran für 1x 5min und 2x 15min in Puffer 1 plus 0,3% Tween 20 sowie 1x 5min in Puffer 3 gewaschen. Um eine Lumineszenz der RNA zu erwirken, wurde die Membran in Folie eingeschlagen und 5min mit Puffer 3 plus 1:100 CDP-Star inkubiert. Abschließend konnte ein Film zur Belichtung aufgelegt werden. Je nach Signalstärke betrug die Belichtungsdauer 10s bis 20min. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Spuren wurde das Signal auf die Methylenblaufärbung und/oder eine geeignete Ladekontrolle (z.B.  $\beta$ -Actin) normiert.

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

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

#### Ladepuffer (15ml):

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

#### RNA-Hybridisationslösung (50ml):

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

Waschlösung Nr.1:

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

Waschlösung Nr.2:

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

Puffer 1 (1l):

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

Puffer 3 (50ml), immer frisch angesetzt:

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

## 2.5 Proteinchemische Methoden

### 2.5.1 Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Zellen

Nach Abnahme des Mediums und zweimaligem Waschen mit PBS wurden 100-200 µl kaltgestellter Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren (Fa. Roche) in die Kulturschale gegeben. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis. Anschließend wurde die Schale leicht für 10 min geschwenkt. Das Lysat wurde mit einer Pipette abgesaugt, in ein Eppendorfbehältnis überführt und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.5.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur relativen Konzentrationsbestimmung wurde der Kit BCA\* Protein der Firma Pierce verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Absorption wurde im Photometer bei 562nm gemessen.

### 2.5.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde mit dem Puffersystem nach Laemmli gearbeitet, wobei die Elektrophorese in vertikaler Richtung in Gelen von ca. 1,5 mm Dicke erfolgte. Die Gele bestanden aus einem jeweils ca. 1,5 cm breiten Sammelgel sowie einem sich daran anschließenden ca. 5 cm breiten Trenngel. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit einem geeigneten Volumen Proben-Auftragspuffer (5x konz.) versetzt, anschließend 5 min im Heizblock auf 95°C erhitzt und unmittelbar danach auf das Gel aufgetragen. Ein geeigneter Größenmarker wurde ebenfalls aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei maximal 35 mA, bis die Lauffront das Gelende erreicht hatte (ungefähr 1 bis 1,5 Stunden).

#### Zusammensetzung des Trenngels:

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

#### Zusammensetzung des Sammelgels:

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

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

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

#### SDS-PAGE-Laufpuffer:

Tris	25mM
Glycin	192mM
SDS	0,1%

## 2.5.4 Immunologische Methoden

### 2.5.4.1 *Western Blot*

Dies ist eine Methode, die dem Nachweis von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen mit Hilfe von Antikörpern dient. Zunächst werden dabei die Proteine elektrisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert („geblottet“). Anschließend wird die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit einer hochkonzentrierten Proteinlösung und dann mit dem gegen das gesuchte Protein gerichteten primären Antikörper inkubiert. Die Detektion des Proteins erfolgt dann mit Hilfe eines an ein spezifisches Enzym gekoppelten sekundären Antikörpers, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Das Enzym katalysiert eine geeignete Nachweisreaktion, wodurch der Antikörper-Protein-Komplex darstellbar wird.

Transfer:

Auf die feucht gehaltene Anode der Blotapparatur wurden zuerst sechs Lagen in Anodenpuffer 1 (300mM Tris; 20% Ethanol) sowie vier Lagen in Anodenpuffer 2 (25mM Tris; 20% Methanol) getränkte Chromatographie-Papiere gelegt. Darauf wurden die in Anodenpuffer 2 getränkte Nitrozellulosemembran (Hybond P), das Trenngel sowie sechs Lagen in Kathodenpuffer (25mM Tris; 20% Methanol; 40mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure) getränkten Chromatographie-Papiers gebettet. Die ebenfalls feucht gehaltene Kathode wurde auf den Stapel gelegt, sodass ein Stromkreislauf entstand. Es wurde mit einer Stromstärke von 1mA/cm<sup>2</sup> geblottet. Die Membran wurde anschließend mit Ponceau S gefärbt und in 0,1% Essigsäure entfärbt. So konnte der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die Membran überprüft werden.

Inkubation mit den Antikörpern:

Absättigung	3% Milchpulver in TBS-T; 0,5h
1. Antikörper	geeignete Verdünnung in 3% Milchpulver/TBS-T; 1h
Waschen	3x5min in TBS-T
2. Antikörper	geeignete Verdünnung in 3% Milchpulver/TBS-T; 30-60min
Waschen	3x5min in TBS-T

Alle Inkubationschritte erfolgten unter leichtem Schwenken bei RT.

Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren wurde die Ponceau-Färbung verwendet.

TBS-T:

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

Entwicklung:

Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol (3-Aminophthalhydrazid) durch Wasserstoffperoxid, wodurch 3-Aminophthalsäure und Stickstoff entstehen. Bei dieser Reaktion wird Energie in Form von Licht mit einer Wellenlänge von 526nm freigesetzt (Lumineszenz). Dadurch wird eine Detektion anhand der Schwärzung eines Films möglich. Es wurde ein ECL-Kit der Firma Amersham verwendet.

#### 2.5.4.2 Immunzytochemie

Um Proteine intrazellulär nachzuweisen, wurden die Zellen für einen immunhistochemischen Nachweis vorbereitet. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Anschließend wurden sie mit einem auf -20°C abgekühlten 1:1-Gemisch aus Methanol und Aceton für 15min fixiert, das 1/1000 mit dem fluoreszierenden DNA-Farbstoff DAPI (Diamidino-2-phenylindol) versetzt wurde. Getrocknet konnten die Zellkultur-Schalen bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Vor der weiteren Verwendung wurden die Schalen fünf Minuten bei RT in PBS äquilibriert. Für den Immunfluoreszenz-Nachweis wurde der primäre Antikörper (Entactin-1) in einer 1:100-Verdünnung mit PBS-T angesetzt und in geeigneter Menge auf die getrockneten Schalen aufgetragen. Die Schalen wurden dann für 3h in den Kühlschrank zur Inkubation gestellt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der sekundäre Antikörper (Cy3) in einer 1:400-Verdünnung mit PBS+1%BSA auf die Schalen aufgetragen. Die

Schalen wurden in einer dunklen Feuchtkammer für 1h zur Inkubation in den 4°C-Kühlschrank gestellt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 5min wurden die Schalen mit Mounting-Medium bedeckt und der behandelte Ausschnitt unter einem Deckgläschen eingeschlossen. Im Anschluss wurden die Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop fotografiert und ausgewertet. In dieser Form können die Schalen für einige Wochen im Dunklen aufbewahrt werden, bevor sie die Leuchtkraft verlieren.

PBS-T:

NaCl	140mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,5mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5mM
KCL	30mM
Tween 20	0,05% (v/v)

#### 2.5.4.3 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin Markierung

Zur Proliferationsbestimmung kultivierter Zellen wurde ein Kit der Firma Roche verwendet. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass die zu untersuchenden Zellen während der Replikation das Analogon BrdU anstelle von Thymidin in ihr Genom einbauen. Die Zellen, die in diesem Zeitfenster proliferiert hatten, konnten dann anschliessend über einen monoklonalen Antikörper gegen BrdU und einen sekundären, mit Fluoreszin konjugierten Antikörper mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops visualisiert werden. Über eine Zählung aller BrdU-markierten Zellen und sämtlicher DAPI-markierter Zellen kann dann mittels Dreisatz die Proliferationsrate ermittelt werden.

## 2.6 Arbeit mit Tieren

### 2.6.1 Haltung der Tiere

Acht Mäuse vom Zuchtstamm C57BL/10ScSn-Dmd<sup>mdx</sup>J ("*mdx*-Mäuse") und acht weitere Kontrolltiere vom Zuchtstamm C57BL/10SnJ wurden im Alter von vier Wochen geliefert. Die Haltung erfolgte in Einzelkäfigen, die vor der Benutzung desinfiziert worden waren. Im Abstand von vier Wochen wurde je ein Paar *mdx*-Mäuse und ein Paar Kontrolltiere getötet und aufbereitet. Bis dahin erhielten sie eine Standarddiät und Wasser ad libitum in einer genormten Umgebung (20°C Umgebungstemperatur, Tag/Nacht-Rhythmus im Wechsel von 12 h).

### 2.6.2 Gewinnung von Gewebeproben

Alle Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Muskeln im Anschluss präpariert. Die entnommenen Gewebepreparate wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In dieser Form wurden sie bis zur weiteren Aufbereitung bei -80°C aufbewahrt.

### 2.6.3 Coxsackie B3-Virus infizierte Mäuse und Kontrolltiere

Für den Versuch wurden 20 Mäuse vom Zuchtstamm C57BL/6 und 20 Mäuse vom Zuchtstamm A.BY/SnL eingesetzt. Aus jeder Gruppe wurden jeweils zehn Tiere im Alter von drei Wochen mit dem Coxsackie B3-Virus infiziert. Die andere Hälfte der Tiere erhielt eine Placebo-Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung. Acht Tage nach Infektion wurden alle Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Herzen präpariert.

Da der Umgang mit infektiösem Material auf Labore mit einer S2-Ausweisung beschränkt ist, wurden die Tiere im Labor von PD Dr. Karin Klingel gehalten, infiziert, getötet und die Proben ebenfalls dort aufbereitet. Die isolierte RNA wurde anschließend überführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung und Test der *entactin-1*-Gensonde

Zu Beginn dieser Arbeit stand im Labor keine geeignete Sonde zum Nachweis der *entactin-1*-Genexpression zur Verfügung. Daher wurde sie im Verlauf dieser Arbeit hergestellt. Hierfür wurde ein Plasmid, welches die gesamte murine *entactin-1*-cDNA enthielt (zur Verfügung gestellt vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried), in Bakterien transformiert, amplifiziert und aufgereinigt. Das Plasmid diente dann nach Linearisierung als Matrize für die Transkription einer *antisense*-RNA-Sonde durch eine geeignete RNA-Polymerase. Um die Spezifität der *entactin-1*-Sonde zu überprüfen, wurde gesamtzelluläre RNA aus verschiedenen Zelllinien extrahiert, welche die beiden *entactin*-Gene in *sense*- und *antisense*-Orientierung überexprimieren. Die Generierung derselben wird in Abschnitt 3.4.1 näher erläutert. Im Anschluss daran wurde die RNA mittels Agarose-Gel aufgetrennt, mit dem *Northern-Blot*-Verfahren auf eine geeignete Membran transferiert und diese dann mit der zu testenden Sonde hybridisiert.

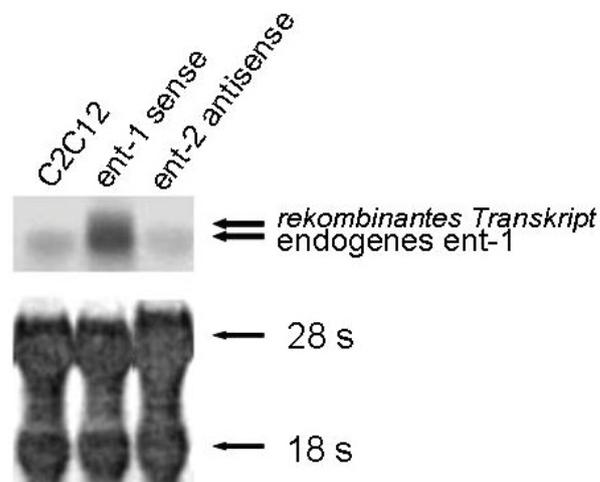


Abbildung 3: **Northern Blot-Analyse der *entactin-1*-Genexpression in verschiedenen C2C12-Zelllinien.** Es wurden jeweils 8 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-1* hybridisiert. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Spuren und die Intaktheit der RNA diente die Methylenblau-Färbung.

Deutlich zu sehen war hierbei das starke Signal in den Zellen, die das *entactin-1*-Gen in *sense*-Richtung überexprimierten (Abbildung 3). Diese

Zellen weisen zwei *entactin-1*-spezifische Transkripte auf: ein endogenes mit 5,9 kb und ein rekombinantes mit ca. 7 kb Länge.

Die Verlängerung des letzteren hängt mit der spezifischen Konstruktion des retroviralen Expressionsvektors zusammen, der zur Herstellung der Zelllinien verwendet worden war (siehe 3.3): In diesem wurde das *entactin-1*-Gen mit einem *neomycin*-Resistenzgen fusioniert, um die Selektion produktiv transduzierter Zellen zu ermöglichen. Eine zwischen dem *entactin-1*-Gen und dem *neomycin*-Gen liegende Ires (*internal ribosome entry site*) ermöglicht dabei eine separate Translation des *neomycin*-Resistenzgens, so dass die Zellen ausgehend von einem einzigen Transkript beide Proteine getrennt synthetisieren können. Als Promotor für die Transkription dient der virale LTR (*long terminal repeat*) am 5'-Ende des retroviralen Konstrukts.

Dadurch waren bei der *Northern Blot*-Analyse das rekombinante und das endogene Transkript aufgrund des Größenunterschiedes theoretisch voneinander zu unterscheiden. Praktisch ließen sie sich jedoch selten auftrennen, da das starke rekombinante Signal das endogene meist überlagerte. Die Auftrennung der beiden Transkripte könnte dabei durch Verwendung eines Gels mit geringerem Agarosegehalt sowie eine längere Gellaufstrecke verbessert werden. Praktisch sind beide Optionen jedoch limitiert.

In nicht modifizierten Zellen war lediglich das endogene Transkript von *entactin-1* als einzelne Bande darstellbar.

### **3.2 Expression der *entactin*-Gene in Muskelzellen**

Um Hinweise auf eine mögliche Rolle der Entactine bei der Muskelzeldifferenzierung zu erhalten, sollte zu Beginn dieser Arbeit das Expressionsmuster der *entactin*-Gene in Muskelzellen mit verschiedenem Differenzierungspotential verglichen werden. Im Anschluss daran sollten die beiden *entactin*-Gene in Myoblasten überexprimiert bzw. ihre Expression mittels spezifischer siRNAs gehemmt werden und der Einfluss dieser Manipulationen auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der

Zellen sowie auf die Expression des jeweils anderen *entactin*-Gens untersucht werden.

### 3.2.1 *entactin*-Expression in differenzierenden C2C12-Zellen

Zunächst wurde die *entactin*-Expression in der gut charakterisierten murinen Myoblasten-Zelllinie C2C12 untersucht. Der Ablauf der Differenzierung bei diesen Zellen ist vergleichbar mit der Muskeldifferenzierung während der Embryonalzeit. Daher stellt diese Zelllinie ein gutes *in vitro* Untersuchungssystem zur Muskeldifferenzierung dar.

Vor Beginn dieser Arbeit war unbekannt gewesen, wie das Expressionsmuster der beiden *entactin*-Gene nach längerer Kultur in Differenzierungsmedium, also in weitgehend vollständig ausdifferenzierten Myozyten und Myotuben, aussieht. Um diese Frage zu klären, wurden C2C12-Zellen in Kultur genommen und nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz über sieben Tage in Differenzierungsmedium kultiviert. Hierbei ließen sich im Lichtmikroskop zunächst spindelförmige Myozyten und später parallel angeordnete, mehrkernige Myotuben beobachten. Aus proliferierenden Zellen sowie im Abstand von 24h nach Induktion der Differenzierung wurde gesamtzelluläre RNA isoliert und die Expression der beiden *entactin*-Gene im *Northern Blot* analysiert.

Zunächst ist die *entactin-1*-Expression dargestellt.

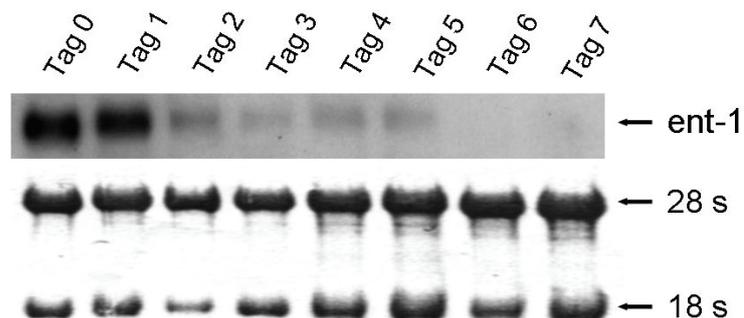


Abbildung 4: **Northern Blot-Analyse der Expression von *entactin-1* in differenzierenden C2C12-Zellen.** Es wurden jeweils 1µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *entactin-1* hybridisiert. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung der Spuren und der Intaktheit der RNA diente die Methylenblau-Färbung.

Hierbei zeigte sich, dass die *entactin-1*-Expression im Verlauf des Differenzierungsprozesses immer weiter abnahm und während späterer Differenzierungsstadien kaum noch nachweisbar war. Anschließend wurde die *entactin-2*-Expression untersucht.

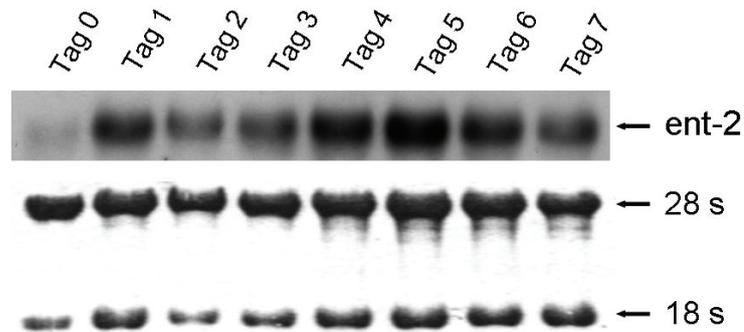


Abbildung 5: **Northern Blot-Analyse der Expression von *entactin-2* in differenzierenden C2C12-Zellen.** Es wurden jeweils 1µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *entactin-2* hybridisiert. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung der Spuren und der Intaktheit der RNA diente die Methyleneblau-Färbung.

Im Gegensatz zur Kinetik der *entactin-1*-Expression nahm die *entactin-2*-Expression während der ersten Tage nach Induktion der Differenzierung stark zu und blieb dann auf einem hohen Niveau, um dann erst gegen Ende des Untersuchungszeitraums wieder leicht abzusinken. In normalen differenzierenden C2C12-Zellen scheint daher eine reziproke Beziehung zwischen dem Expressionsmuster der beiden *entactin*-Gene zu bestehen.

### 3.2.2 *entactin*-Expression in differenzierenden C2C12- und C2F3-Zellen

Parallel zu obigen Versuchen wurden C2F3-Myoblasten in Kultur genommen, eine klonale Variante von C2C12-Zellen, die aber langsamer und weniger effizient als diese differenziert (H.M. Blau, Stanford University, persönliche Mitteilung). Aus proliferierenden Zellen sowie einen, zwei, drei und vier Tage nach Versuchsbeginn wurde aus Parallelkulturen die gesamtzelluläre RNA extrahiert. Die extrahierte RNA wurde dann mittels eines Agarose-Gels aufgetrennt und anschließend anhand des *Northern Blot*-Verfahrens auf eine

entsprechende Membran transferiert und mit spezifischen *antisense* RNA-Sonden hybridisiert.

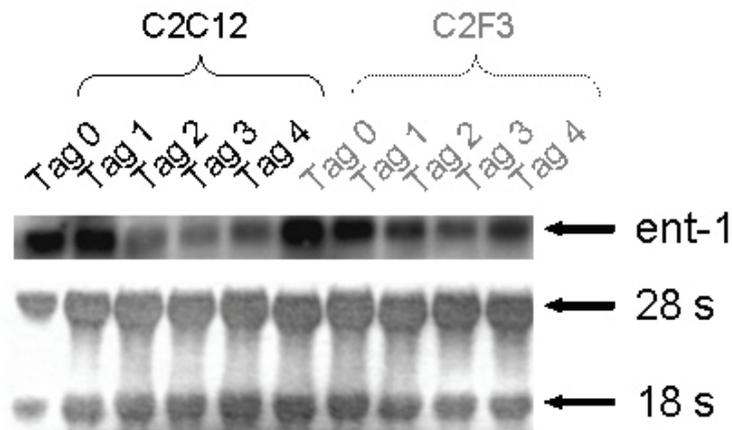


Abbildung 6: **Northern Blot-Analyse der Expression von *entactin-1* in differenzierenden C2C12 und C2F3-Zellen.** Es wurden jeweils 8µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *entactin-1* hybridisiert. Gut erkennbar ist die stärkere Repression der *entactin-1*-Expression in den C2C12- gegenüber den C2F3-Zellen.

Sowohl C2C12- als auch C2F3-Zellen zeigten zu Beginn des Versuchs eine maximale *entactin-1*-Expression, welche dann innerhalb eines Zeitraums von bis zu drei Tagen nach Versuchsbeginn stetig abnahm. Dies bestätigt frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (Neu et al., 2006; Neu, 2006). Auffällig war, dass die Repression der *entactin-1*-Expression in den C2F3-Zellen gegenüber den C2C12-Zellen verlangsamt war, was mit dem verminderten Differenzierungspotential dieser Zellen assoziiert sein könnte.

Im Anschluss wurden dieselben Proben auf ihre *entactin-2*-Expression hin untersucht.

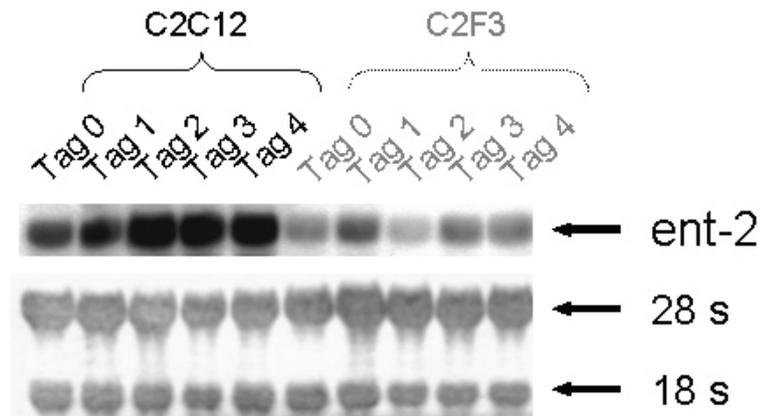


Abbildung 7: **Northern Blot-Analyse der Expression von *entactin-2* in differenzierenden C2C12 und C2F3-Zellen.** Es wurden jeweils 8µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit *antisense*-RNA-Sonden gegen *entactin-2* hybridisiert. Sehr deutlich wird die stärkere Induktion der *entactin-2*-Expression in den C2C12- gegenüber den C2F3-Zellen.

Bemerkenswert war hier, dass C2F3-Zellen im Gegensatz zu C2C12-Zellen keine Induktion der *entactin-2*-Genexpression nach Eintreten in die Differenzierungsphase zeigten. Möglicherweise korreliert auch diese Tatsache mit dem geringeren Differenzierungspotential von C2F3- gegenüber C2C12-Zellen.

Diese Daten zeigen, dass das Expressionsmuster der beiden *entactin*-Gene in Skelettmuskelzellen mit deren Differenzierungspotential korreliert.

### 3.2.3 *entactin*-Expression in RD/12- und RD/18-Zellen

Die im vorangehenden Abschnitt vorgestellten Ergebnisse warfen die Frage auf, ob eine aberrante Expression der *entactin*-Gene mit einem gestörten Differenzierungsprozess von Skelettmuskelzellen assoziiert sein könnte. Als Modellsystem diente hierbei das Rhabdomyosarkom, ein Tumor, der aus unzureichend differenzierten quergestreiften Muskelzellen hervorgeht (Merlino und Helman, 1999).

Im Zuge dieser Arbeit wurden die beiden Rhabdomyosarkomzelllinien RD/12 und RD/18 auf ihre *entactin*-Expression hin untersucht. Diese Zelllinien sind klonale Derivate einer einzigen Rhabdomyosarkomlinie. Dabei handelt es sich bei der Linie RD/12 um Zellen mit einem sehr geringen

Differenzierungspotential. Die Linie RD/18 besitzt dagegen noch die Fähigkeit, initiale Schritte des myogenen Differenzierungsprogramms zu durchlaufen.

Wie bereits für C2C12- und C2F3-Zellen beschrieben, wurden die Zellen in Kultur genommen und dann durch Serumentzug zur Differenzierung angeregt. Zu Versuchsbeginn und an den folgenden Tagen wurde gesamtzelluläre RNA extrahiert und mittels des *Northern-Blot*-Verfahrens auf die Expression der beiden *entactin*-Gene hin untersucht.

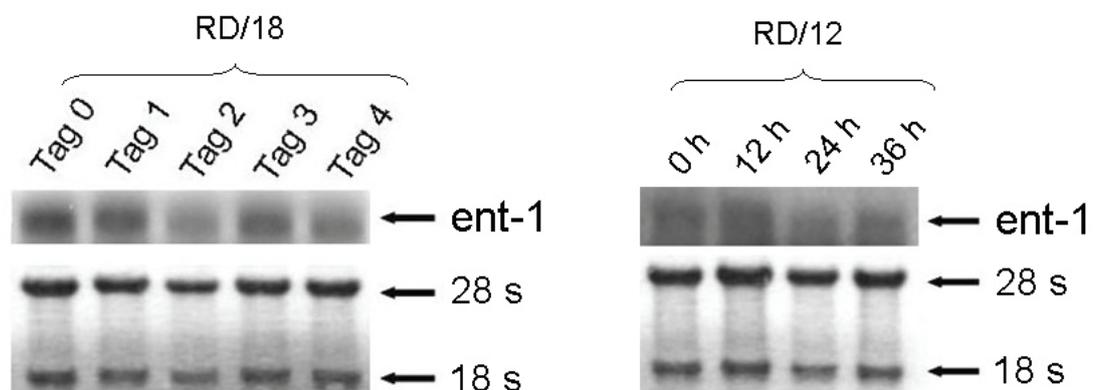


Abbildung 8: **Northern Blot-Analyse der *entactin-1* Genexpression bei RD/18 und bei RD/12-Zellen.** Es wurde jeweils 1 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-1* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Spuren diente die Methylenblaufärbung.

Da RD/12-Zellen eine sehr geringe Proliferationsrate aufweisen (Crocì et al., 2004), war es hier nicht möglich, genügend Material für längere Differenzierungskinetiken zu erhalten.

Dennoch wurde bei beiden Zelllinien im Vergleich zur Kinetik von normalen C2C12-Zellen deutlich, dass die Expression von *entactin-1* wesentlich langsamer als bei diesen abfällt, was in Zusammenhang mit dem geringen Differenzierungspotential von Rhabdomyosarkomzellen stehen könnte.

Auch bei diesen Zellen sollte die Expression von *entactin-2* überprüft werden.

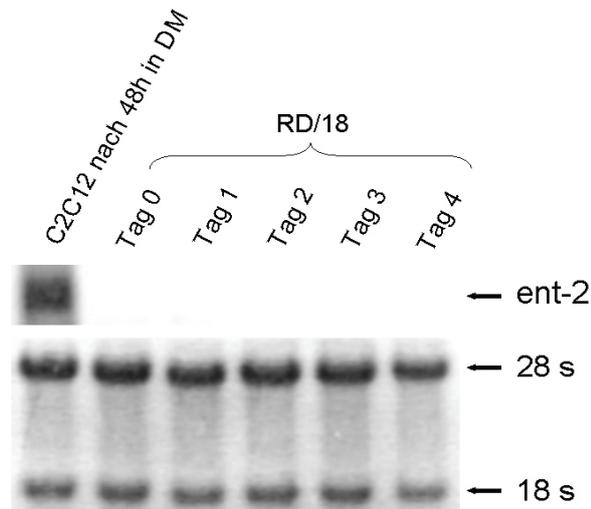


Abbildung 9: **Northern Blot-Analyse der *entactin-2* Genexpression bei RD/18-Zellen.** Es wurde jeweils 1 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-2* hybridisiert. Als Positivkontrolle wurde eine Probe von RNA aus differenzierten C2C12-Zellen mit aufgetragen. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren diente die Methylenblaufärbung.

Eine Expression des *entactin-2*-Gens war weder bei RD/18-Zellen noch bei RD/12-Zellen (Daten nicht gezeigt) nachweisbar.

Dadurch stellte sich die Frage, ob die RNA-Sonde die humane Sequenz eventuell nicht erkannte, da sie auf der Grundlage des murinen *entactin-2*-Gens hergestellt worden war. Es wurde daher mittels Sequenzvergleich die Homologie des zur Sonde komplementären Abschnitts zwischen Mensch und Maus ermittelt. Diese ergab eine ca. 84%ige Übereinstimmung, was normalerweise für eine Kreuzreaktivität ausreichend ist.

Um daher sicherzustellen, dass *entactin-2* tatsächlich weder in RD/18 noch in RD/12-Zellen exprimiert wird, wurde eine entsprechende RT-PCR durchgeführt, da diese Methode eine höhere Sensitivität als die *Northern Blot*-Analyse aufweist.

Hierbei wird die RNA der zu untersuchenden Zellen mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese kann dann mit sequenzspezifischen *Primern* in der PCR analysiert werden. Die *Primer* wurden dabei so ausgewählt, dass sie sowohl zu der Mensch- als auch zu der Maus-Sequenz 100% kompatibel waren. Dies war notwendig, da keine

geeignete cDNA humaner Zellen (d.h. mit sicher nachgewiesener *entactin-2*-Expression) als Positivkontrolle zur Verfügung stand.

Nach erfolgter Amplifizierung der PCR-Produkte wurden diese in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine spezifische Bande hin überprüft.

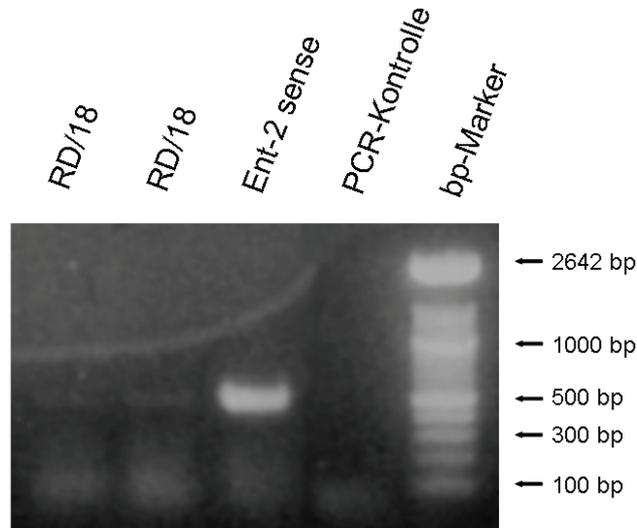


Abbildung 10: **Gelelektrophorese der PCR-Produkte von RD/18-Zellen bei Verwendung von *entactin-2* sequenzspezifischen Primern.** Für die PCR wurden zwei identische Ansätze mit cDNA humaner RD/18-Zellen und ein Ansatz mit cdNA muriner, *entactin-2* überexprimierender Zellen als Positivkontrolle mitgeführt. Ein Ansatz enthielt cDNA von RD/18-Zellen, deren Funktionalität mittels eines bereits getesteten Primers überprüft werden sollte (Daten nicht gezeigt). Ein Ansatz enthielt nur die PCR-Reagenzien ohne cDNA. Die amplifizierte DNA wurde anschliessend in einem 1%igen Ethidiumbromidgel aufgetrennt.

Allerdings konnte auch hier praktisch keine *entactin-2*-Expression in den RD/18-Zellen nachgewiesen werden. Diese Zellen scheinen daher im Gegensatz zu normalen Myoblasten *entactin-2* nur in sehr geringem Umfang oder überhaupt nicht zu exprimieren.

### 3.2.4 *entactin*-Expression in HL1-Zellen und HUVEC's

Vor Beginn dieser Arbeit war aus immunhistochemischen Untersuchungen an Herzschnitten und dem Nachweis der entsprechenden mRNA in Gesamtherz-Proben bekannt gewesen, dass sowohl das *entactin-1*-Gen als auch das *entactin-2*-Gen in diesem Gewebe exprimiert werden (Miosge et al., 2001; Salmivirta et al., 2002). Darauf aufbauend sollte nun geklärt werden, welche Zelltypen innerhalb des Herzens diese Gene exprimieren. Hierfür wurde RNA aus in Kultur gehaltenen murinen HL1-Zellen und HUVEC's gewonnen.

HL1-Zellen sind relativ authentische Herzmuskelzellen, d.h. sie zeigen zahlreiche biochemische und elektrophysiologische Eigenschaften, die diese Zellen auch *in vivo* aufweisen.

HUVEC's (*human umbilical vein endothelial cells*) sind Primärzellen aus dem Endothel der Vene in der menschlichen Nabelschnur. Sie wurden kultiviert und anschließend gesamtzelluläre RNA extrahiert.

HL-1-Zellen wurden mit Tumornekrosefaktor- $\alpha$  stimuliert, da dieses Zytokin ein wichtiger Mediator bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen ist und Hinweise darauf erhalten werden sollten, ob eine differentielle Expression der *entactin*-Gene bei diesen Krankheiten eine Rolle spielen könnte. Dafür wurden die Zellen einerseits in serumhaltigem Medium und andererseits nach Serumentzug mit dem Zytokin stimuliert.

Dargestellt ist die *entactin-1*-Expression in HL1-Zellen.

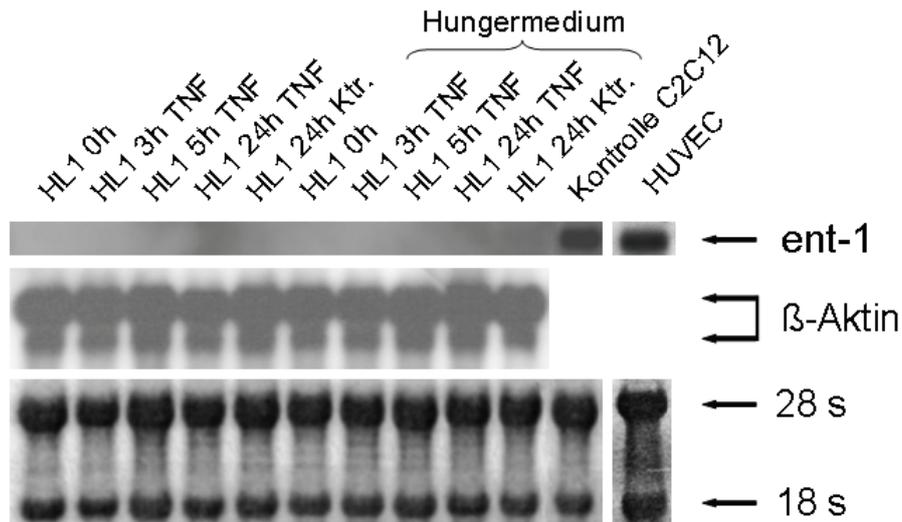


Abbildung 11: **Northern Blot-Analyse der Expression von *entactin-1* in HL1-Zellen und HUVEC's.** Es wurden jeweils 2 $\mu$ g gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-1* und nachfolgend mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen  $\beta$ -Aktin hybridisiert. Die Hybridisierung mit der  $\beta$ -Aktin-*antisense*-RNA-Sonde sowie die unten gezeigte Methylenblaufärbung dienten dabei dem Nachweis der Intaktheit der aus den HL1-Zellen isolierten RNA sowie einer gleichmäßigen Beladung der Spuren. Als Positivkontrolle für die Funktionalität der verwendeten *entactin-1*-Gensonde und als Größenmarker wurde zusätzlich RNA aus C2C12-Zellen aufgetragen.

Entgegen der Erwartung ließ sich keine *entactin-1*-Expression in den HL1-Kardiomyozyten nachweisen. Der in der Literatur beschriebene Nachweis von Entactin-1-Protein in Gesamtherz-Proben könnte daher auf eine Produktion dieses Proteins durch Endothelzellen zurückgehen, da HUVEC's eine deutliche *entactin-1*-Expression zeigten (Abbildung 11). Auch andere Zelltypen wie Fibroblasten könnten für die im Herzen beobachtete *entactin-1*-Expression verantwortlich sein.

Die *entactin-2*-Expression wurde ebenfalls untersucht.

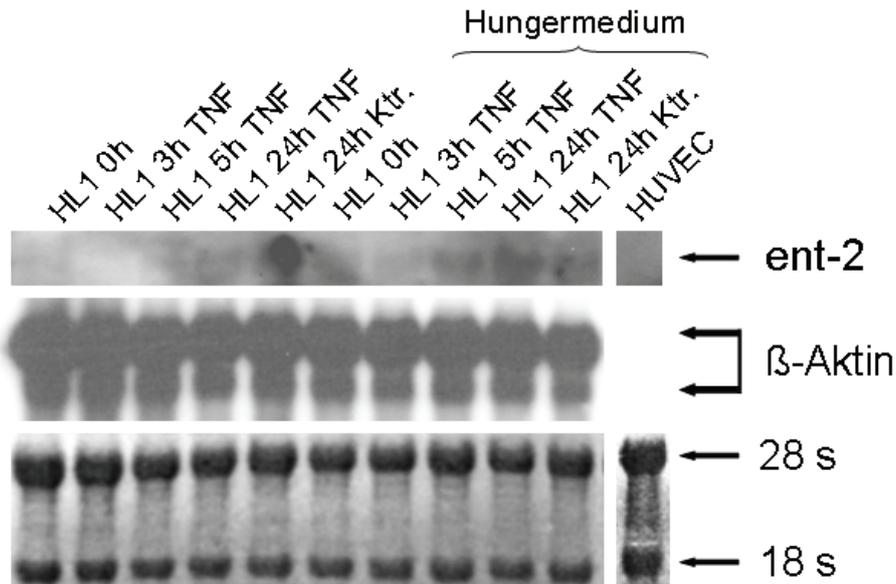


Abbildung 12: **Northern Blot-Analyse der Expression von *entactin-2* in HL1-Zellen und HUVEC's.** Es wurden jeweils 2µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-2* und nachfolgend mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen  $\beta$ -Aktin hybridisiert. Die Hybridisierung mit der  $\beta$ -Aktin-*antisense*-RNA-Sonde sowie die unten gezeigte Methylenblaufärbung dienten dabei dem Nachweis der Intaktheit der aus den HL1-Zellen isolierten RNA sowie einer gleichmäßigen Beladung der Spuren.

Eine schwache basale Expression von *entactin-2*, induziert durch TNF- $\alpha$ , war in den HL1-Kardiomyozyten nachweisbar. Dies legt nahe, dass im Gegensatz zum *entactin-1*-Gen das *entactin-2*-Gen im Herzen von Kardiomyozyten exprimiert wird. In den Endothelzellen (HUVEC's) hingegen war keine Expression von *entactin-2* nachweisbar.

Diese Ergebnisse deuten an, dass *entactin-1* und *entactin-2* im Herzmuskelgewebe von verschiedenen Zelltypen exprimiert werden.

### 3.3 Funktionelle Studien zur Regulation der *entactin*-Genexpression in Muskelzellen

*Knockout*-Studien in Bezug auf beide *entactin*-Gene führten zu der Annahme, dass beide Proteine füreinander kompensieren können (Bader et al., 2005; Schymeinsky et al., 2002).

Um daher die zweite eingangs gestellte Frage, nämlich die einer möglichen *Crossregulation* von *entactin-1* und -2, zu beantworten, wurden Systeme

eingesetzt, die sich durch eine Suppression bzw. Induktion der Expression jeweils eines der beiden Gene auszeichnen. Indem die Auswirkungen dieser Manipulationen auf das jeweils andere *entactin* untersucht wurden, sollte eine mögliche Redundanz bzw. *Crossregulation* festgestellt werden.

Dies waren zum einen C2C12-Zelllinien, die *entactin-1* bzw. -2 in *sense*- bzw. *antisense*-Orientierung überexprimierten. Diese Zelllinien waren bereits vor Beginn dieser Arbeit von B. Munz auf der Basis retroviraler Vektoren hergestellt worden (Neu et al., 2006). *Sense*-Richtung bedeutet hierbei, dass das entsprechende Gen in 5'-3'-Orientierung transkribiert wird, so dass ein funktionelles, mit dem endogenen identisches Protein gebildet werden kann. Aufgrund des starken retroviralen Promotors werden dabei große Mengen des rekombinanten Proteins gebildet. Die Überexpression der Gene in *antisense*-Orientierung führt dagegen zu mRNA, die sich komplementär zu der entsprechenden endogenen mRNA verhält. Da sich komplementäre Einzelstrang-Nukleinsäuren aneinanderlagern und ähnlich der DNA Doppelstränge ausbilden, ist eine Translation der endogenen mRNA dann nicht mehr möglich. Dadurch kommt es zu einer Repression der Genexpression.

Weiterhin wurde die Expression der beiden *entactin*-Gene in C2C12-Zellen mittels spezifischer siRNAs gehemmt. Das Prinzip ihrer Wirkungsweise wird im nächsten Abschnitt eingehender erläutert.

### 3.3.1 siRNA-Versuche

siRNA wurde zunächst in Pflanzen als regulatorisches Element zur Steuerung der Genexpression entdeckt. Nachdem bekannt wurde, dass sie auch in tierischen Zellen vorkommt, wurden bald ihre vielseitigen Einsatzmöglichkeiten in der experimentellen Molekularbiologie deutlich (Denli und Hannon, 2003).

siRNA besteht aus kurzen, genspezifischen Sequenzen von ca. 22 Nukleotiden. In der lebenden Zelle werden siRNA-Abschnitte von einem Proteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) erkannt, der dann gezielt an die zur siRNA komplementäre mRNA binden kann. Prinzipiell beruht also der Wirkmechanismus ähnlich der *antisense*-Technik auf der

Tatsache, dass sich komplementäre Nukleinsäuren aneinanderlagern. Nach erfolgter Anlagerung an die mRNA wird die Translation des Zielgens verhindert (siehe Abschnitt 2.2.3).

Aufgrund der Kürze und vergleichsweise hohen Stabilität von siRNA ist es möglich, sie direkt in die jeweiligen Zielzellen zu transfizieren. Diese müssen daher im Gegensatz zur Vorgehensweise bei *antisense*-Strategien nicht zunächst mit geeigneten Expressionsvektoren transfiziert werden. Zudem ist die siRNA-Methode deutlich effektiver. Mittlerweise ist eine grosse Anzahl von verschiedenen siRNA-Spezies kommerziell verfügbar.

Im Zuge dieser Arbeit sollten C2C12-Myoblasten mit *entactin-1* und *-2* spezifischer siRNA behandelt werden und der Einfluss dieser Manipulation auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zellen und auf die Expression des jeweils anderen *entactin*-Gens hin untersucht werden.

### 3.3.2 Optimierung der Bedingungen

Zunächst sollten die Bedingungen für eine effiziente Transfektion mit *entactin-1*-spezifischer siRNA (wird in dieser Arbeit als Ent-1 siRNA bezeichnet) ermittelt werden. Ein Protokoll zur Transfektion mit *entactin-2*-spezifischer siRNA (wird in dieser Arbeit als Ent-2 siRNA bezeichnet) stand vor Beginn dieser Arbeit bereits zur Verfügung (Neu, 2006).

Da jedoch für die Versuche in dieser Arbeit eine neue Charge C2C12-Zellen zum Einsatz kam, wurden die Bedingungen des Protokolls für eine Transfektion mit Ent-2 siRNA nochmals überprüft.

Für beide *entactin*-Gene wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll drei verschiedene siRNA-Spezies sowie zwei verschiedene Transfektionsreagenzien getestet, welche im Methodenteil genauer beschrieben werden. Eine *scrambled* siRNA ohne Homologie zu einem murinen Gen wurde ebenfalls bei allen Versuchen als Kontrolle mitgeführt, um die Spezifität der siRNA für die *entactine* zu überprüfen.

Zunächst wurden die Bedingungen für die Transfektion mit Ent-1 siRNA optimiert.

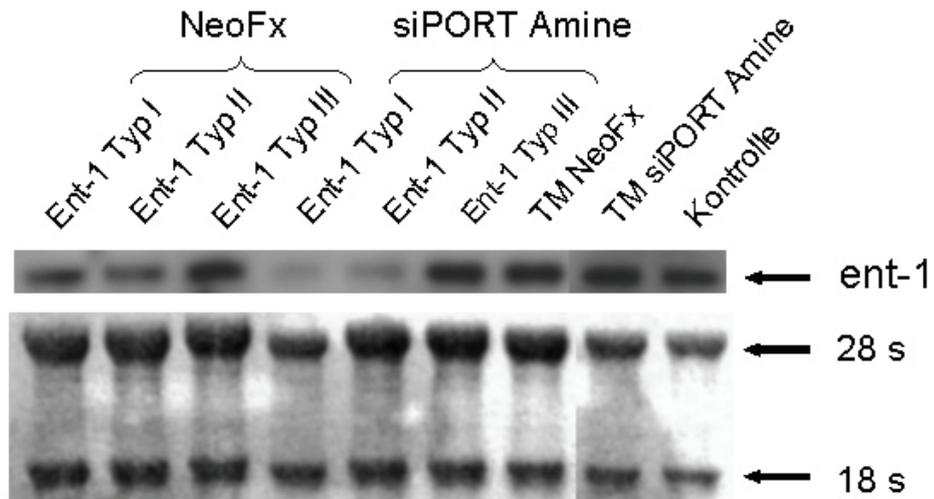


Abbildung 13: **Northern Blot-Analyse der *entactin-1* Genexpression bei siRNA-behandelten Zellen** Es wurde jeweils 1 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-1* hybridisiert. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Spuren diente die Methylenblaufärbung. Die Zellen wurden mit drei verschiedenen siRNA-Spezies und zwei verschiedenen Transfektionsreagenzien behandelt. Ein Teil der Zellen wurde nur den beiden Transfektionsreagenzien in Medium (TM NeoFX und TM siPORT Amine) ausgesetzt, nicht aber einer zusätzlichen siRNA. Hiermit sollte eine mögliche Beeinflussung durch das Reagenz ausgeschlossen werden. Die Ktr-Spur enthält RNA von Zellen, die gar nicht behandelt worden waren. Eine unspezifische (*scrambled*) RNA hatte keinen Effekt (nicht gezeigt).

Abbildung 13 zeigt, dass die siRNA-Spezies Typ I und Typ II in Kombination mit beiden Transfektionsmedien zur stärksten Repression der *entactin-1*-Genexpression führten. siRNA vom Typ III zeigte hingegen keinen oder kaum einen Effekt. siPORT Amine erwies sich als günstigeres Transfektionsreagenz, da es zusammen mit Ent-1 Typ I-siRNA zur stärksten Repression der *entactin-1*-Expression führte. Im Anschluss daran wurden die Bedingungen für die Transfektion mit Ent-2 siRNA optimiert.

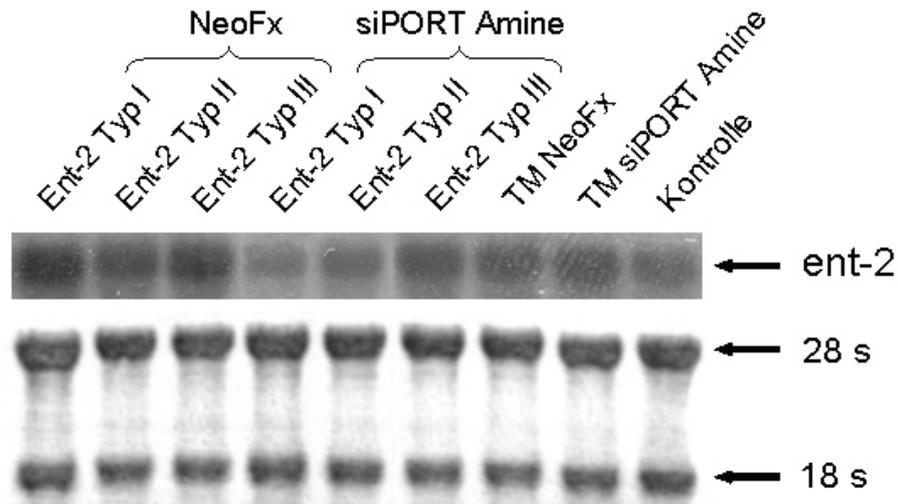


Abbildung 14: **Northern Blot-Analyse der *entactin-2* Genexpression bei siRNA-behandelten Zellen.** Es wurde jeweils 1 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-2* hybridisiert. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Spuren diente die Methylenblaufärbung. Man beachte die geringe Expression bei den mit siRNA Typ I behandelten Zellen in der siPORT Amine-Gruppe. Nicht mit siRNA behandelte Zellen sind in der Kontrollspur aufgetragen, nur dem jeweiligen Transfektionsmedium (TM siPORT Amine und TM NeoFX) ausgesetzte Zellen im Anschluss. Eine unspezifische (*scrambled*) RNA hatte keinen Effekt (nicht gezeigt).

Wie Abbildung 14 zeigt, führten auch in Bezug auf *entactin-2* die siRNAs vom Typ I und Typ II zu einer starken Repression der Genexpression. Weiterhin erwies sich auch hier siPORT Amine als das geeignetere Transfektionsreagenz – Transfektionen unter Verwendung von NeoFX hatten in Kombination mit keiner der siRNAs einen hemmenden Einfluss auf die *entactin-2*-Genexpression.

Behandlung mit den Transfektionsreagenzien alleine oder mit einer unspezifischen (*scrambled*) siRNA (nicht gezeigt) hatte in keinem der Fälle einen Einfluss auf die Expression der *entactin*-Gene.

Die bisher beschriebenen Optimierungsversuche waren ausschließlich an proliferierenden Zellen durchgeführt worden. Da im Verlauf dieser Arbeit jedoch vor allem auch die Funktion der Entactine in differenzierenden Zellen interessierte, sollte auch untersucht werden, ob sich die ermittelten Bedingungen auch auf diese Zellen übertragen ließen. Als

Transfektionsreagenz wurde in den nachfolgend beschriebenen Versuchen ausschließlich siPORT Amine verwendet.

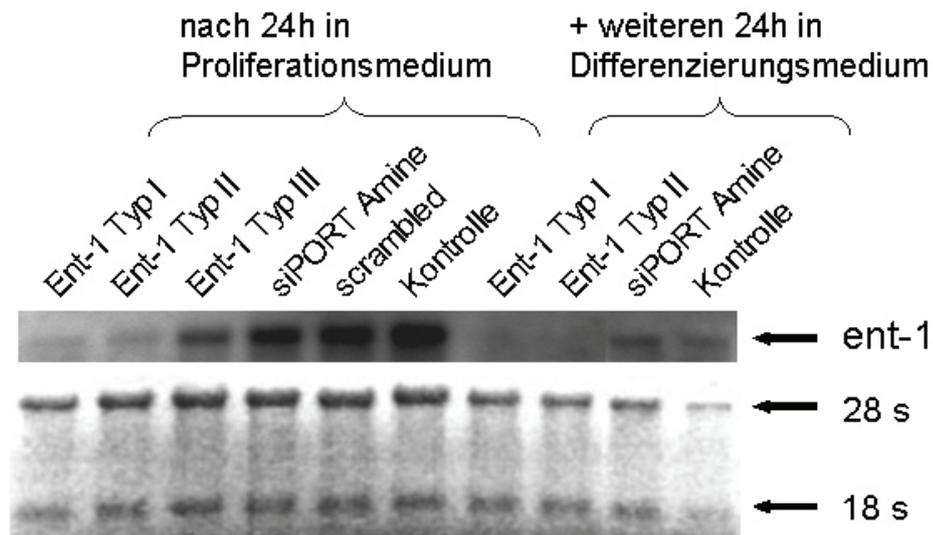


Abbildung 15: **Northern Blot-Analyse der *entactin-1*-Genexpression bei siRNA-behandelten Zellen in Proliferations- und Differenzierungsmedium.** Es wurde jeweils 1 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-1* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren diente die Methyleneblaufärbung. Ein Teil der Zellen war mit unspezifischer *scrambled*-siRNA in Transfektionsmedium behandelt worden. Die Kontrolle repräsentiert wieder gänzlich unbehandelte Zellen.

Wie Abbildung 15 zeigt, war sowohl bei proliferierenden als auch bei differenzierenden Zellen eine Hemmung der *entactin-1*-Genexpression durch siRNA Ent-1 Typ I+II zu beobachten. Zwischen den Kontrollzellen und den mit *scrambled* siRNA behandelten Zellen war kein Unterschied zu erkennen. Wie erwartet war nach Induktion der Differenzierung auch in unbehandelten Zellen eine Repression der *entactin-1* Genexpression zu beobachten (Neu et al., 2006). Jedoch war diese bei den behandelten Zellen deutlich stärker, wodurch die Effektivität der siRNA auch unter Differenzierungsbedingungen belegt wird.

Gleichzeitig wurden während dieses Versuches Protein-Proben gewonnen, um zu überprüfen, ob die Hemmung der Genexpression auch auf Proteinebene nachzuweisen war.

Dafür wurden zytosolische Proteinlysate aus den Zellen gewonnen. Von einer zusätzlichen Immunpräzipitation aus dem Kulturmedium, welche zur Analyse des sezernierten Entactin-1 notwendig gewesen wäre, musste abgesehen werden, da diese mit dem zur Verfügung stehenden kommerziellen Antikörper nicht durchzuführen war.

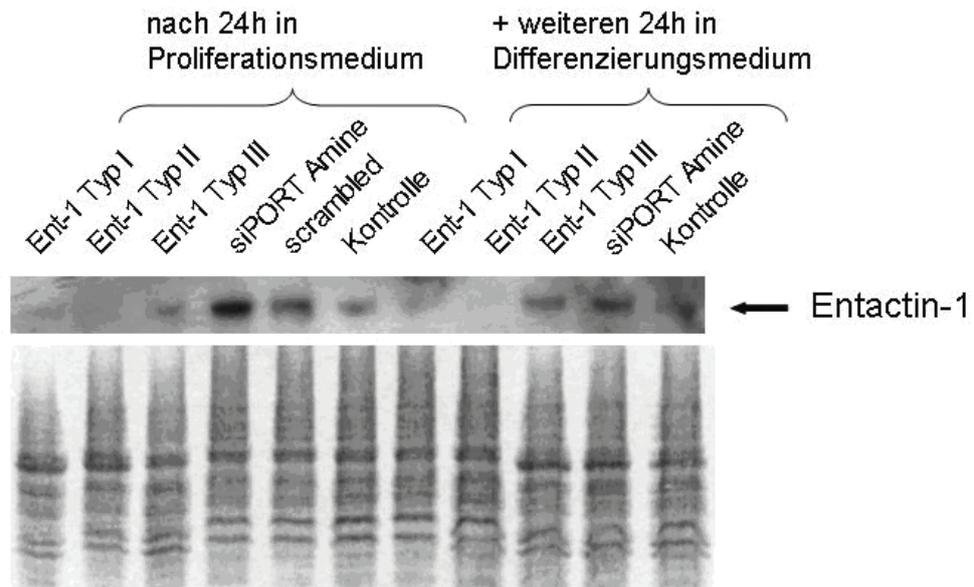


Abbildung 16: **Western Blot-Analyse der Entactin-1-Expression bei siRNA-behandelten Zellen in Proliferations- und Differenzierungsmedium.** Entactin-1 hat ein Molekulargewicht von 148 kDa. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren diente die Ponceaufärbung. Ein Teil der Zellen war mit unspezifischer *scrambled*-siRNA in Transfektionsmedium behandelt worden. Die Kontrolle repräsentiert die unbehandelten Zellen.

Die Analyse auf Proteinniveau bestätigte die für mRNA gewonnenen Daten.

### 3.3.3 Immunhistochemische Darstellung von Zellen nach siRNA-Behandlung

Um das Entactin-1-Protein auch direkt in den transfizierten Zellen nachweisen zu können, wurden diese auch für eine immunhistochemische Färbung fixiert, mit dem Entactin-1 Antikörper und im Anschluss daran mit einem sekundären, mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelten Antikörper behandelt. Die Präparate wurden mithilfe des Fluoreszenzmikroskops untersucht und repräsentative Bildausschnitte fotografiert.

Abbildung 17 zeigt eine Entactin-1-Immunfluoreszenz von transfizierten C2C12-Zellen und entsprechenden Kontrollen in Proliferationsmedium.

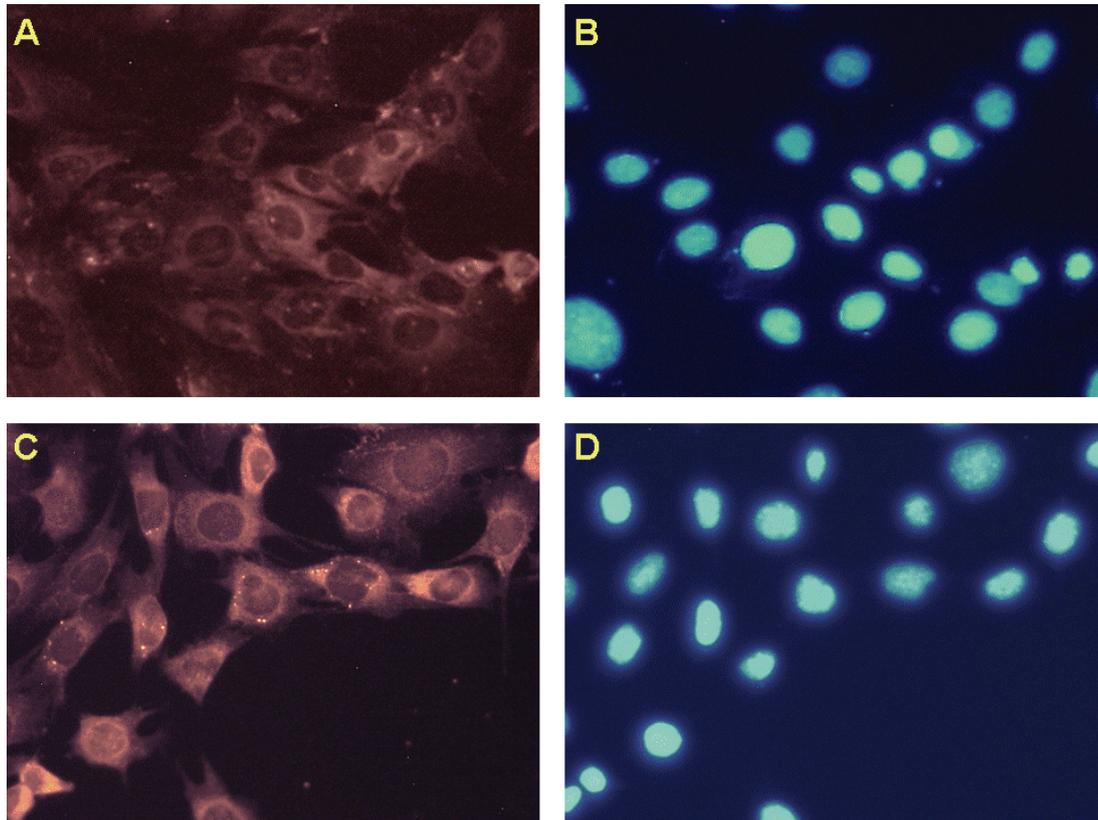


Abbildung 17: **Darstellung der Entactin-1-Verteilung in mit Ent-1 siRNA-behandelten Zellen in Proliferationsmedium nach immunhistochemischer Färbung mit einem Entactin-1-spezifischen primären und einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper.** Zusätzlich wurden alle Zellkerne mit DAPI angefärbt (B+D). Bild A zeigt Zellen nach Behandlung mit Ent-1 siRNA. Bild C zeigt entsprechende Kontrollzellen ohne Behandlung. Mit *scrambled*-siRNA behandelte Zellen unterschieden sich nicht von Kontrollen (Daten nicht gezeigt). Eine Färbung nur mit sek. AK ergab kein spezifisches Signal (Daten nicht gezeigt).

Gut zu sehen war hier, dass die mit Ent-1 siRNA behandelten Zellen ein sehr viel schwächeres und diffuseres Signal zeigten als die Kontrollgruppen. Außerdem war die Färbung heterogener – einige Zellen zeigten ein stärkeres Signal, in anderen war nur wenig Entactin-1 zu erkennen. Dies könnte auf die nicht vollständige Transfektion mit Ent-1 siRNA zurückgehen, die in der Regel nicht alle Zellen erfasst.

Anschließend wurde überprüft, wie sich die Zellen im Differenzierungsmedium darstellten.

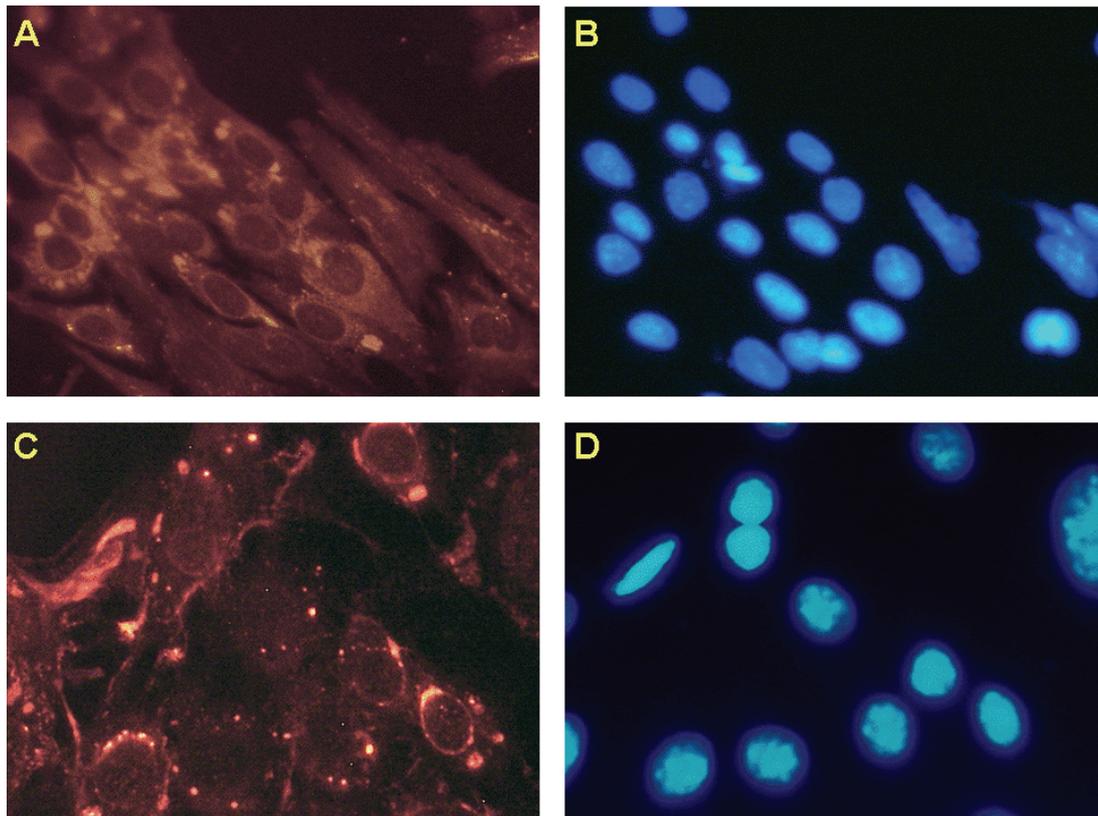


Abbildung 18: **Darstellung der Entactin-1-Verteilung in mit Ent-1 siRNA-behandelten Zellen in Differenzierungsmedium nach immunhistochemischer Färbung.** Zusätzlich zur spezifischen Färbung mit dem Entactin-1-Antikörper und einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper wurden alle Zellkerne mit DAPI angefärbt (B+D). Bild A zeigt Zellen nach Behandlung mit Ent-1 siRNA. Bild D zeigt nicht mit siRNA behandelte Zellen. Mit *scrambled*-siRNA behandelte Zellen unterschieden sich nicht von den Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt).

Zu erkennen war, dass die Zellen sich jetzt nicht mehr rund bis dreieckig, sondern eher länglich präsentierten. Dies wird besonders deutlich in Bild A. Hier kann man bereits erkennen, dass die Zellen begonnen hatten, sich parallel anzuordnen. Beides ist für differenzierende Muskelzellen typisch. Zu beachten ist die sehr diffuse Verteilung von Entactin-1 in den mit siRNA behandelten Zellen im Gegensatz zu der punktuellen Anreicherung in den Kontrollzellen. Morphologische Unterschiede zwischen den transfizierten und den nichttransfizierten Zellen waren jedoch nicht erkennbar. Auffällig war allerdings, dass die mit Ent-1 siRNA behandelten Zellen insgesamt weniger dicht waren und weniger hell leuchteten. Diese Unterschiede liessen sich fotografisch allerdings kaum darstellen, da mit der verwendeten Digitalkamera nur limitierte Ausschnitte zu fotografieren waren.

### 3.4 Untersuchung einer möglichen *Crossregulation* zwischen *entactin-1* und *entactin-2*

Um die eingangs gestellte Frage einer möglichen *Crossregulation* zwischen den beiden *entactin*-Genen zu beantworten, wurden Studien an C2C12-Zellen durchgeführt, die entweder eines dieser beiden Gene überexprimierten oder in denen mittels *antisense*- oder siRNA-Strategien die Expression der *entactin*-Gene gehemmt war.

#### 3.4.1 Untersuchungen an C2C12-Zelllinien, die *entactin-1* oder *entactin-2* überexprimieren

Aus Zellen, die aufgrund einer Infektion mit geeigneten retroviralen Vektoren jeweils eines der beiden *entactin*-Gene in *sense* oder *antisense*-Richtung überexprimierten (Neu et al., 2006), sowie Kontrollzellen, wurde zu Versuchsbeginn, 24h und 48h nach Induktion der Differenzierung gesamtzelluläre RNA gewonnen. Diese wurde im *Northern Blot* mit entsprechenden RNA-Sonden gegen *entactin-1* und *entactin-2* hybridisiert.

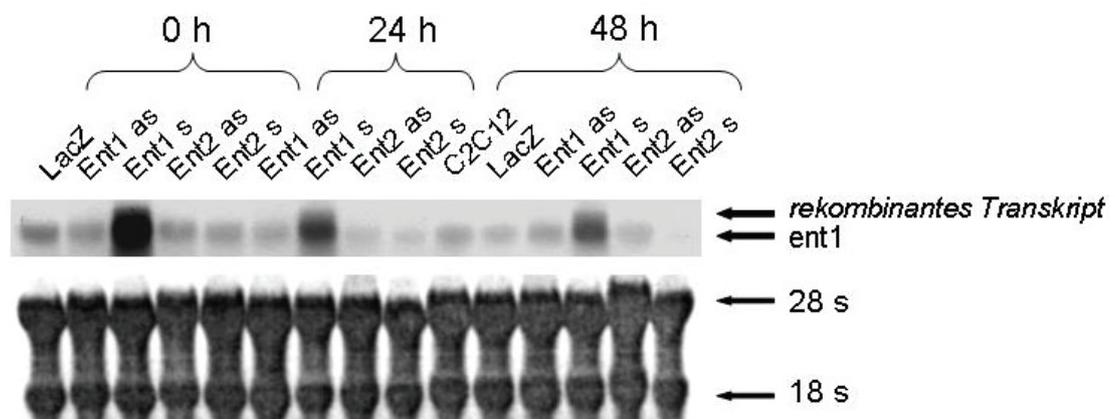


Abbildung 19: **Northern Blot-Analyse der *entactin-1*-Genexpression in verschiedenen C2C12-Zelllinien.** Es wurden jeweils 8 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-1* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methyleneblau-Färbung. Die Zelllinien exprimierten entweder das *entactin-1*- oder -2-Gen in *sense* (s) bzw. *antisense* (as) -Richtung verstärkt (rekombinantes Transkript). Die eingesetzten Kontrollzellen waren die ursprüngliche C2C12-Zelllinie selbst und eine Variante derselben (LacZ), die das für die bakterielle  $\beta$ -Galaktosidase kodierende Gen überexprimiert.

Wie bereits gezeigt (Neu et al., 2006) war das hohe Expressionsniveau des rekombinanten Gens in den das *entactin-1*-Gen in *sense*-Richtung überexprimierenden Zellen sehr deutlich. Auch nach Induktion der Differenzierung blieb das Niveau im Vergleich zu den Kontrollzellen relativ hoch. Die das *entactin-1*-Gen in *antisense*-Richtung überexprimierenden Zellen zeigten dagegen unter Proliferationsbedingungen wie erwartet ein niedrigeres Expressionsniveau als die entsprechenden Kontrollzellen.

Allerdings war die Expression des endogenen *entactin-1*-Gens in den mit dem *antisense*-Konstrukt infizierten Zellen kaum reprimiert. Dies ist ein häufiges Problem im Zusammenhang mit der Generierung speziell von *antisense*-RNA, weswegen in dieser Arbeit weitestgehend siRNA-Strategien zur Hemmung der Expression der beiden *entactin*-Gene eingesetzt wurden.

Im Laufe der Differenzierung nahm dann die Expression sowohl des rekombinanten als auch des endogenen Transkripts stark ab, was im Falle von ersterem auf ein *Silencing* des viralen LTR unter serumarmen Kulturbedingungen (C.R. Ozawa und B. Munz, unveröffentlichte Ergebnisse) zurückzuführen ist. Das endogene Transkript hingegen wird wie oben gezeigt von allen Myoblasten im Laufe der Differenzierung reprimiert.

Insgesamt zeigten die *entactin-2*-überexprimierenden Zellen keinen Unterschied bezüglich ihrer *entactin-1*-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen, was ein erster Hinweis ist, dass möglicherweise kein direkter Mechanismus zur *Crossregulation* der beiden Gene existiert.

In denselben Proben wurde nun auch die Expression des *entactin-2*-Gens unter Proliferations- und Differenzierungsbedingungen hin untersucht.

Hierfür wurde eine Abbildung aus der Veröffentlichung von (Neu et al., 2006) entnommen, um sie unter dem Aspekt einer möglichen *Crossregulation* auszuwerten, was vor Beginn dieser Arbeit noch nicht erfolgt war.

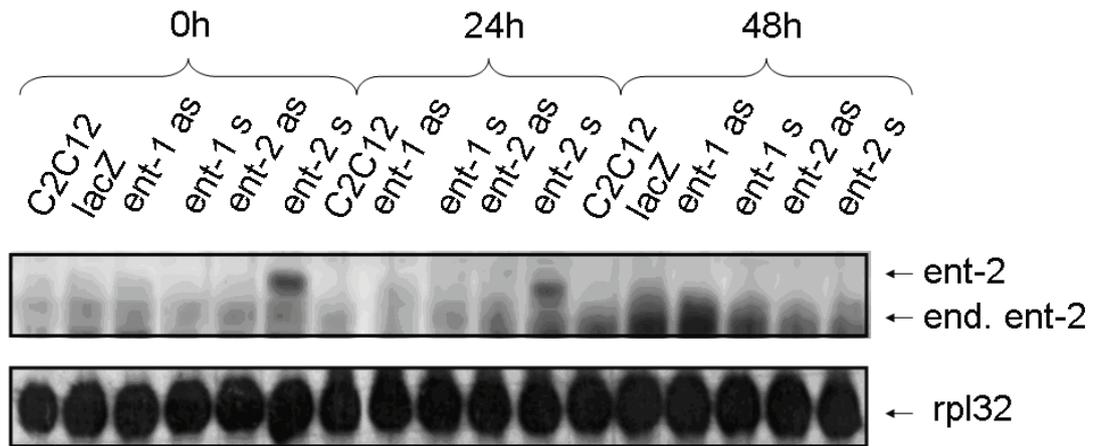


Abbildung 20: **Northern Blot-Analyse der *entactin-2*-Genexpression in verschiedenen C2C12-Zelllinien.** Es wurden jeweils 8 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-2* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Hybridisierung mit einer Sonde gegen die mRNA des ribosomalen Proteins rpl32. Die Zelllinien exprimierten entweder das *entactin-1*- oder *-2*-Gen in *sense* (s) bzw. *antisense* (as) -Richtung verstärkt (rekombinantes Transkript). Die eingesetzten Kontrollzellen waren die ursprüngliche C2C12-Zelllinie selbst und eine Variante derselben (LacZ), die das für die bakterielle β-Galaktosidase kodierende Gen überexprimiert.

Wie Abbildung 20 zeigt, wurde wieder die Induktion des endogenen *entactin-2*-Gens unter Differenzierungsbedingungen deutlich, während in Übereinstimmung zu den in Abschnitt 3.3 gemachten Aussagen zum *Silencing* des viralen LTR's das rekombinante Gen nach 48h nicht mehr nachweisbar war.

In Übereinstimmung zu den für das *entactin-1*-Gen erhaltenen Daten ergaben sich jedoch keine Hinweise auf eine Repression der *entactin-2*-Expression durch eine Überexpression von *entactin-1*. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse dafür, dass in Muskelzellen kein direkter Mechanismus zur Crossregulation der *entactin-1*- und der *entactin-2*-Expression existiert.

### 3.4.2 Untersuchungen an Zellen, die mit siRNA behandelt wurden

Nachdem der Einfluss einer Überexpression eines der *entactin*-Gene auf die Expression des jeweils anderen *entactin*-Gens untersucht worden war, sollten nun mögliche Wirkungen einer Hemmung der Expression analysiert werden. Hierzu wurden C2C12-Zellen einer siRNA-Behandlung unterzogen,

nach 24h in Proliferationsmedium gesamtzelluläre RNA extrahiert und eine Parallelkultur für weitere 24h in Differenzierungsmedium belassen. Anschließend wurde auch hier gesamtzelluläre RNA extrahiert und mit Hilfe des *Northern Blot*-Verfahrens die Expression der *entactin*-Gene untersucht.

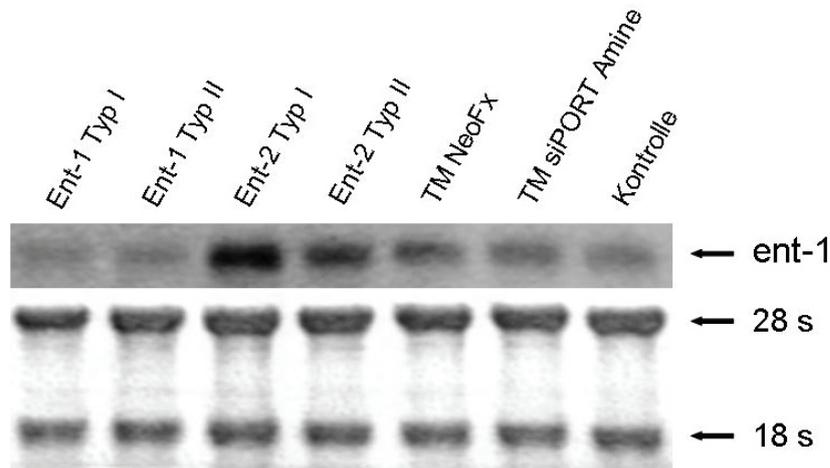


Abbildung 21: **Northern Blot-Analyse der *entactin-1*-Genexpression bei siRNA-behandelten Zellen in Differenzierungsmedium.** Es wurde jeweils 1 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-1* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren diente die Methylenblaufärbung. Die Zellen wurden jeweils mit Ent-1 siRNA und Ent-2 siRNA behandelt. Die Kontrollzellen wurden nicht behandelt.

Wie aus Abbildung 21 deutlich wird, zeigten die mit Ent-2 siRNA behandelten Zellen eine stärkere *entactin-1*-Expression als entsprechende Kontrollen. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch im umgekehrten Fall auftritt, ob also eine Hemmung der *entactin-1*-Expression einen Effekt auf die Expression des *entactin-2*-Gens hat, wurden dieselben Proben erneut aufgetragen und mit einer *antisense* RNA-Sonde gegen *entactin-2* hybridisiert.

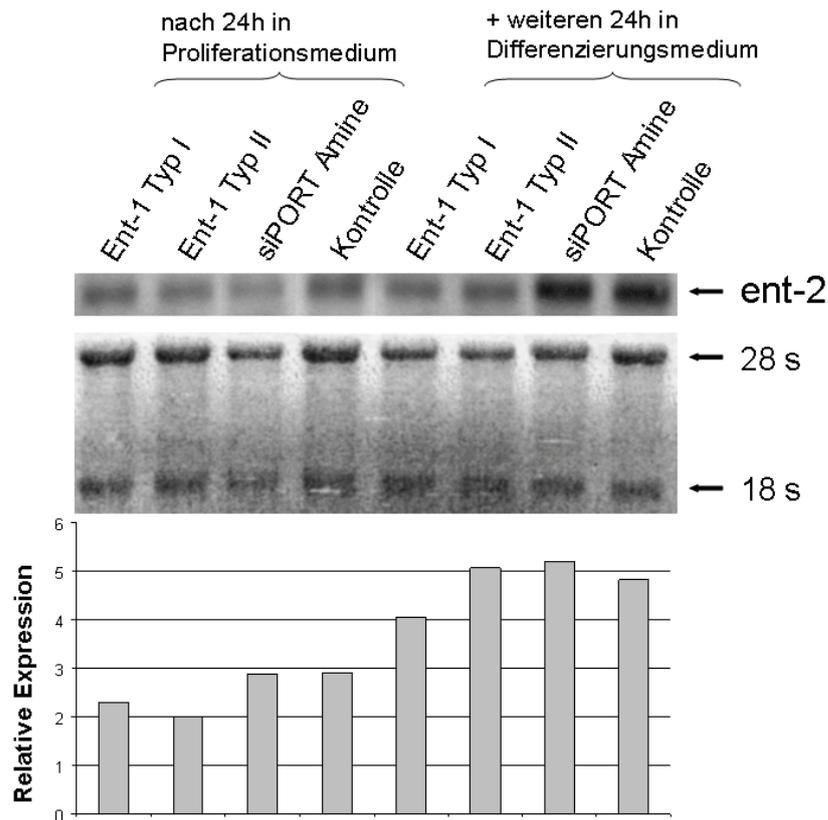


Abbildung 22: **Northern Blot-Analyse der entactin-2-Genexpression bei Ent-1 siRNA-behandelten Zellen.** Es wurde jeweils 0,5 µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-2* hybridisiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte C2C12-Zellen sowie C2C12-Zellen, die dem Transfektionsreagenz siPORT Amine ausgesetzt worden waren, verwendet. Wegen der ungleichmäßigen Beladung der Spuren wurde die Signalintensität auf die 28s RNA normiert und die Expressionsstärke grafisch und relativ dargestellt.

Ein äquivalenter Anstieg der *entactin-2*-Expression nach Ent-1 siRNA-Behandlung, wie sie im umgekehrten Fall aufgetreten war, konnte nicht festgestellt werden. Die *entactin-2*-Expression zeigte sich hier ähnlich im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrollzellen, allerdings leicht erniedrigt.

### 3.5 Einfluss der Hemmung der *entactin-1*- und *-2*-Genexpression auf das Proliferationsverhalten von C2C12-Zellen

Aus vorherigen Untersuchungen (Neu, 2006) war bereits vor Beginn dieser Arbeit bekannt gewesen, dass *entactin-1*-überexprimierende Zellen gegenüber Kontroll-Myoblasten eine erhöhte Proliferationsrate aufweisen.

Um daher zu untersuchen, inwieweit auch eine Repression der *entactin-1* oder *entactin-2*-Expression Einfluss auf die Proliferationsrate nimmt, wurden C2C12-Zellen in Kultur genommen und wie oben beschrieben mit spezifischen siRNAs behandelt. Nach einem Tag in Proliferationsmedium und einem weiteren in Differenzierungsmedium wurde die Proliferationsrate der Zellen mit der BrdU-Technik ermittelt.

Bei dieser Methode werden die Zellen für einen definierten Zeitraum 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin ausgesetzt, einem Analogon für das Nucleosid Thymidin. Das Analogon wird während der Teilung anstelle von Thymidin in das zelluläre Genom eingebaut und ermöglicht so den Nachweis von proliferierenden Zellen. Hierzu werden die Zellen nach der Markierung zunächst mit einem primären Antikörper gegen BrdU und anschließend mit einem sekundären, Fluorochrom-konjugierten Antikörper behandelt. Die markierten Zellkerne können dann im Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden.

Um die Gesamtzahl der Zellen im gewählten Bildausschnitt zu bestimmen und so den Prozentsatz der markierten Zellen berechnen zu können, wurden zusätzlich alle Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt.

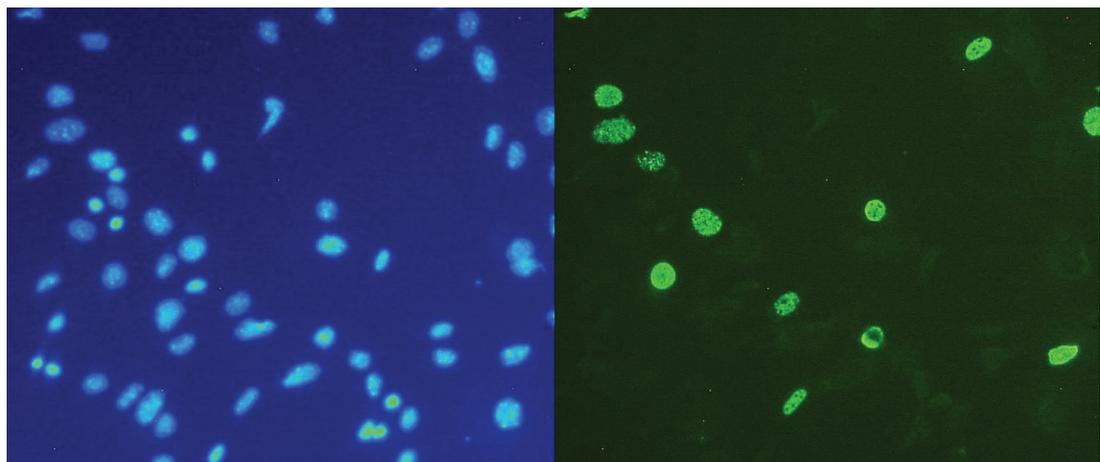


Abbildung 23: **Nachweis proliferierender Zellen mit der BrdU-Methode.** Links ist die DAPI-Färbung zu sehen, die alle Zellkerne des Bildausschnitts darstellt. Rechts wurden mit Hilfe eines BrdU-spezifischen, Fluorochrom-konjugierten Antikörpers nur diejenigen Kerne sichtbar gemacht, die sich während der BrdU-Exposition geteilt hatten.

Zur Auswertung wurden jeweils mindestens sechs repräsentative Gesichtsfelder unter dem Mikroskop ausgewählt und alle DAPI-gefärbten Zellkerne in dem jeweiligen Bereich gezählt. Anschließend wurden mit einer anderen Wellenlänge nur die Zellkerne sichtbar gemacht, die BrdU in ihre DNA eingebaut hatten und ebenfalls ausgezählt. Aus diesen Daten konnte dann die Proliferationsrate ermittelt werden.

### 3.5.1 Einfluss einer Behandlung mit Ent-1 siRNA auf die Proliferationsrate von C2C12-Zellen

Zunächst wurde die *entactin-1*-Expression in den C2C12-Zellen gehemmt und daraufhin die Proliferationsrate in dieser und der unbehandelten Kontrollpopulation ermittelt. Ein Teil der Zellen wurde mit *scrambled* siRNA behandelt (Daten nicht gezeigt).

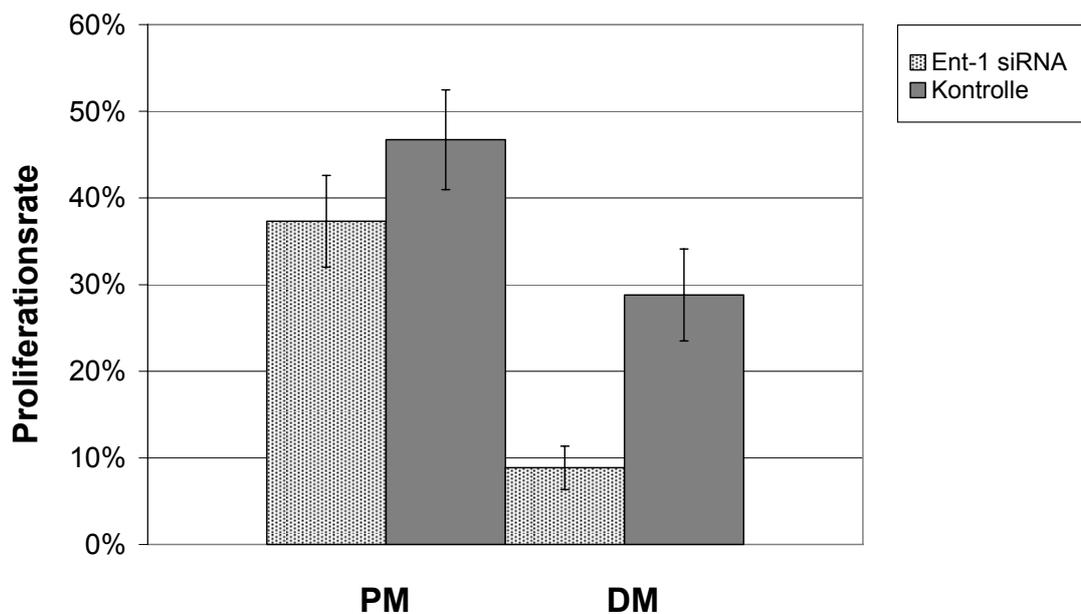


Abbildung 24: **Diagramm zum Proliferationsverhalten der mit Ent-1 siRNA behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten C2C12-Zellen.** Mit Hilfe des *BrdU-labeling-kits* wurde das Proliferationsverhalten der Zellen unter Proliferationsbedingungen (links) und Differenzierungsbedingungen (rechts) untersucht. Deutlich ist zu sehen, dass die mit Ent-1 siRNA behandelten Zellen eine niedrigere Proliferationsrate als die Kontrollzellen aufwiesen.

Im Diagramm

Abbildung 24 ist zu erkennen, dass die mit Ent-1 siRNA behandelten Zellen generell langsamer proliferierten als die Kontrollzellen. Besonders deutlich wurde das unter Differenzierungsbedingungen. Dies weist darauf hin, dass die Proliferationsrate von Myoblasten tatsächlich positiv von Entactin-1 beeinflusst wird.

### 3.5.2 Einfluss einer Behandlung mit Ent-2 siRNA auf die Proliferationsrate von C2C12-Zellen

Anschließend wurde mit derselben Versuchsanordnung die Proliferationsrate von Zellen ermittelt, die mit Ent-2 siRNA behandelt worden waren.

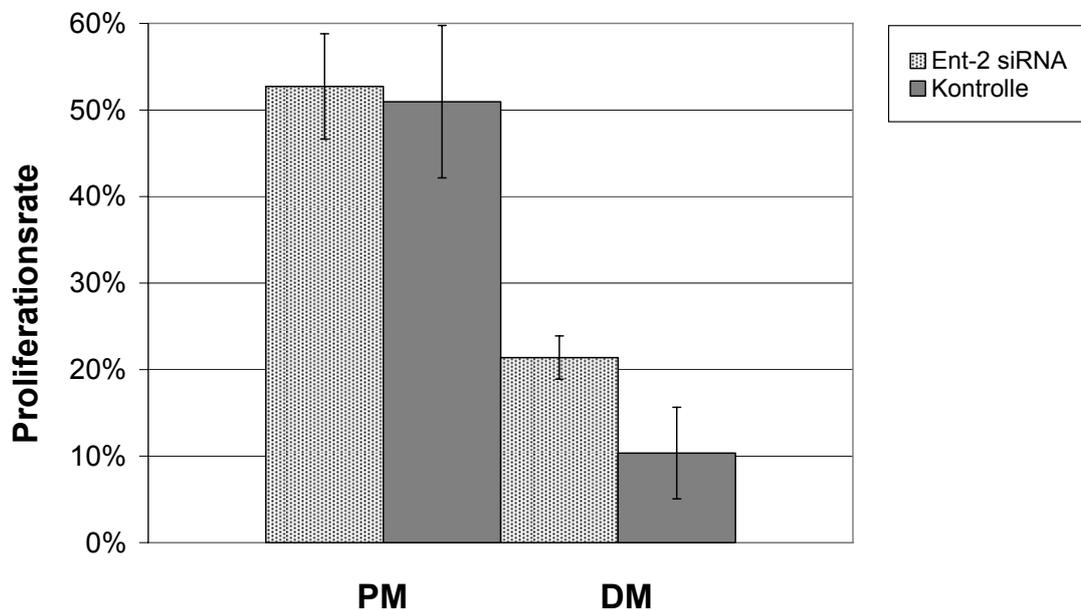


Abbildung 25: **Diagramm zum Proliferationsverhalten der mit Ent-2 siRNA behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten C2C12-Zellen.** Mit Hilfe des *BrdU-labeling-kits* wurde das Proliferationsverhalten der Zellen unter Proliferationsbedingungen (links) und Differenzierungsbedingungen (rechts) untersucht. Deutlich ist zu sehen, dass die mit Ent-2 siRNA behandelten Zellen eine höhere Proliferationsrate als die Kontrollzellen aufwiesen.

Zur Auswertung wurden dabei wiederum mindestens fünf Gesichtsfelder unter dem Mikroskop ausgewählt. Es zeigte sich, dass unter Proliferationsbedingungen eine Behandlung mit Ent-2 siRNA keinen Einfluss auf die Proliferationsrate hatte. Dies war zu erwarten, da *entactin-2* in

proliferierenden Zellen kaum oder gar nicht exprimiert wird und daher eine Repression auch keinen zusätzlichen Effekt haben sollte. Unter Differenzierungsbedingungen jedoch führte eine Behandlung mit Ent-2 siRNA im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einer stark erhöhten Proliferationsrate. Dies bestätigte sich auch für die mit *scrambled* siRNA behandelten Zellen (Daten nicht gezeigt). Dies ist ein Hinweis auf die Beteiligung von *entactin-2* bei der Regulation der Myoblastenproliferation.

### **3.6 Einfluss einer Ent-1 siRNA-Behandlung auf die Expression von Genen, die mit der Muskelzellendifferenzierung assoziiert sind**

Nachdem die Wirkung einer Behandlung mit *entactin-1*- und *entactin-2*-spezifischer siRNA auf das Proliferationsverhalten der Myoblasten untersucht worden war, sollte geklärt werden, inwieweit das Differenzierungsverhalten der Zellen von einer Hemmung der Expression dieser beiden Gene beeinflusst wird. Hierzu wurden mittels *Northern Blot*-Analyse das Expressionsmuster verschiedener Gene analysiert, die für myogene Differenzierungsmarker kodieren.

#### **3.6.1 Untersuchung der *p21*-Expression**

Das Protein p21 ist ein Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor und führt dadurch zum Austritt der Zellen aus dem Zellteilungszyklus (Löffler et al., 2006). Da seine Expression 24h nach Einleitung der Differenzierung ansteigt, ist es ein guter Differenzierungsmarker (Moran et al., 2002; Tomczak et al., 2004). Vor Beginn dieser Arbeit konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass eine Hemmung von *entactin-2* zu einer Repression der *p21*-Expression führt (Neu, 2006).

Es sollte nun der Einfluss einer Hemmung der *entactin-1*-Expression untersucht werden.

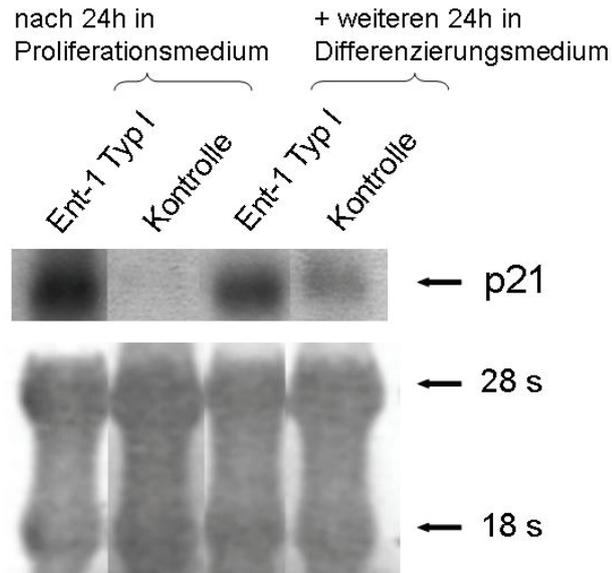


Abbildung 26: **Northern Blot-Analyse der *p21*-Genexpression bei Ent-1 siRNA-behandelten Zellen.** Es wurden jeweils 5µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *p21* hybridisiert. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung der Spuren und der Intaktheit der RNA diente die Methylenblau-Färbung. Nicht mit siRNA behandelte Zellen wurden in der Kontrollspur aufgetragen. Eine *scrambled*-siRNA hatte keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

Die Behandlung mit Ent-1 siRNA führte zu einer außerordentlich starken Induktion der *p21*-Expression sowohl unter Proliferations- als auch Differenzierungsbedingungen. Die Kontrollzellen zeigten die normalerweise beobachtete Kinetik mit einer sehr geringen Expression in den proliferierenden Zellen und einem Anstieg nach Induktion der Differenzierung.

Dies legt einen Zusammenhang zwischen der *entactin-1*- und *p21*-Expression nahe.

### 3.6.2 Untersuchung der *rip2*-Expression

RIP2 (*receptor interacting protein*) ist eine intrazelluläres Protein, das mit der zytoplasmatischen Domäne von Transmembran-Rezeptoren des TNF-Rezeptor- (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor)-Typs interagiert und so intrazelluläre Signaltransduktionswege anschaltet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des *rip2*-Gens in C2C12-Myoblasten effektiv die Muskelzeldifferenzierung hemmt (Munz et al., 2002). Darauf aufbauend

konnte unsere Arbeitsgruppe kürzlich nachweisen, dass eine Hemmung der Expression dieses Gens das Differenzierungspotential von C2C12- und RD/18-Rhabdomyosarkom-Zellen erhöht und einen negativen Einfluss auf die Proliferationsrate dieser Zellen hat (Ehlers et al.).

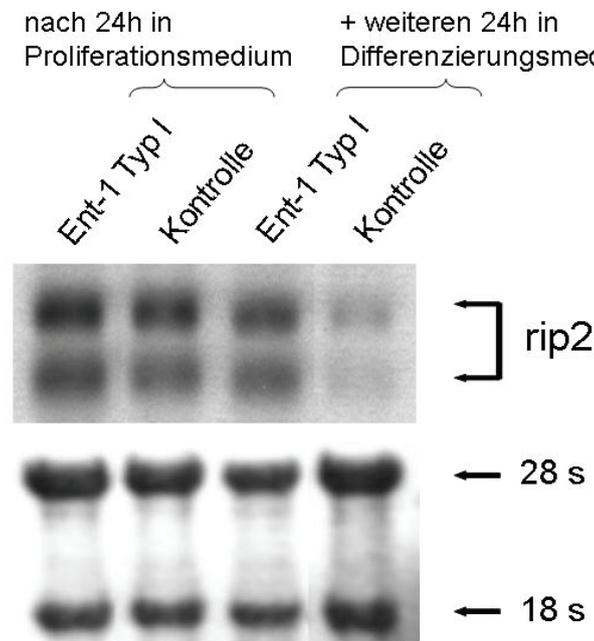


Abbildung 27: **Northern Blot-Analyse der *rip2*-Genexpression bei Ent-1 siRNA-behandelten Zellen.** Es wurden jeweils 2µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *rip2* hybridisiert. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung der Spuren und der Intaktheit der RNA diente die Methylenblau-Färbung. Nicht mit siRNA behandelte Zellen wurden in der Kontrollspur aufgetragen. Eine *scrambled*-siRNA hatte keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

Wie Abbildung 27 zeigt, war unter Proliferationsbedingungen kein Einfluss der Behandlung mit Ent-1-spezifischer siRNA auf die *rip2*-Expression zu erkennen. In Differenzierungsmedium waren demgegenüber deutliche Unterschiede sichtbar; allerdings zeigte sich nicht wie erwartet eine Abnahme der *rip2*-Expression nach Behandlung mit Ent-1-spezifischer siRNA, sondern überraschenderweise eine im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöhte Genexpression. Dies war deshalb erstaunlich, weil eine Hemmung der *entactin-1*-Expression wie oben gezeigt einen negativen Effekt auf die Proliferation von Zellen hatte.

### 3.6.3 Untersuchung der *cyclinD1*-Expression

CyclinD1 ist ein Aktivator zweier Kinasen des Zellteilungszyklus und dient daher als Proliferationsmarker (Löffler et al., 2006). Die Expression des entsprechenden Gens nimmt daher nach Induktion der Differenzierung stark ab. Somit stellt dieses Gen einen guten Marker dar, um den Differenzierungsprozess von Myoblasten verfolgen zu können.

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Expression dieses Gens bei den mit Ent-1-spezifischer siRNA behandelten Myoblasten analysiert.

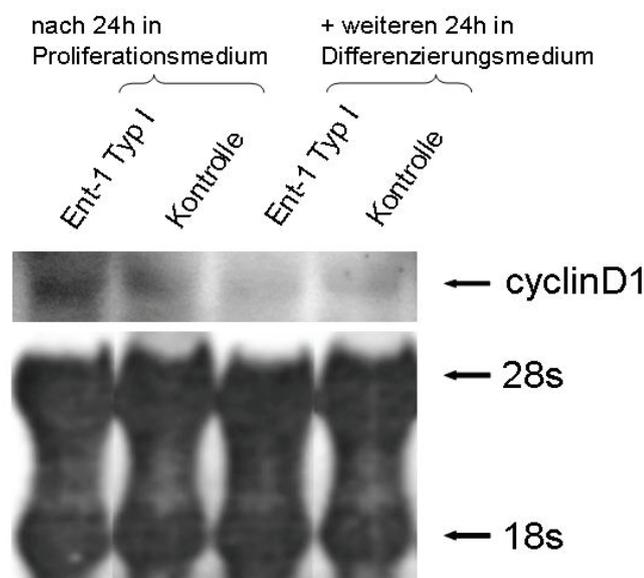


Abbildung 28: **Northern Blot-Analyse der *cyclinD1*-Genexpression bei Ent-1 siRNA-behandelten Zellen.** Es wurden jeweils 8µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *cyclinD1* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblau-Färbung. RNA aus nicht mit siRNA behandelte Zellen wurde in der Kontrollspur aufgetragen.

Die *cyclinD1*-Expression nahm wie erwartet nach Induktion der Differenzierung sowohl in behandelten als auch in unbehandelten C2C12-Zellen stark ab. Auffällig war demgegenüber eine erhöhte Expression von *cyclinD1* in proliferierenden mit Ent-1 siRNA behandelten Zellen, was überrascht, da auch hier zu erwarten war, dass eine Hemmung der *entactin-1*-Expression einen negativen Einfluss auf die Proliferation und damit auch auf entsprechende Marker haben würde.

### 3.6.4 Untersuchung der *tis11b*-Expression

*Tis11b* gehört zu einer Gruppe von hochkonservierten Genen (*TPA induced sequences*), die für Proteine kodieren, welche sich durch zwei gemeinsame Tandem-Zinkfinger-Motive auszeichnen. Diese Strukturen können an Nukleinsäuren binden und sind daher häufig in Proteinen zu finden, die als Transkriptionsfaktoren wirken oder sekundär über eine Bindung an mRNA die Expression der jeweiligen Gene beeinflussen. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich nachweisen, dass die Expression des *tis11B*-Gens bei der Myogenese sehr stark induziert wird (Busse et al., 2007). Daher stellt dieses Gen einen geeigneten Marker für das Fortschreiten des Differenzierungsprozesses dar.

Vor Beginn dieser Arbeit lagen keine Daten zum Einfluss von *entactin-2* auf *tis11b* vor, wie dies für *rip2* und *p21* der Fall ist (Neu, 2006).

Aus diesem Grund wurde hier zusätzlich ein Teil der Zellen mit Ent-2 siRNA behandelt.

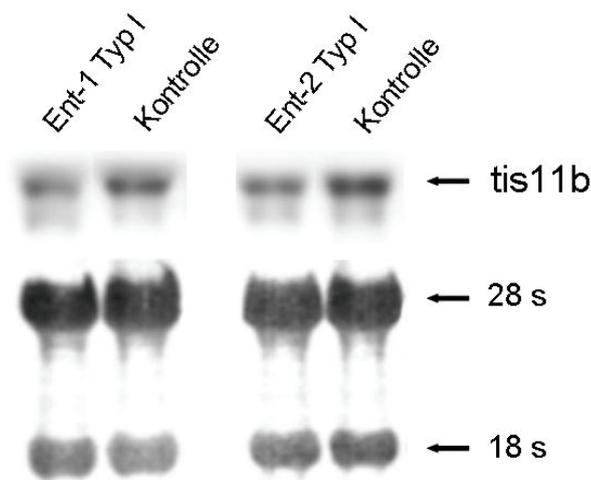


Abbildung 29: **Northern Blot-Analyse der *tis11b*-Genexpression bei Ent-1 und Ent-2 siRNA-behandelten Zellen unter Proliferationsbedingungen.** Es wurden jeweils 2µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *tis11b* hybridisiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Spuren und für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblau-Färbung. RNA aus nicht mit siRNA behandelten Zellen wurde in der Kontrollspur aufgetragen. Eine Transfektion mit einer unspezifischen *scrambled* siRNA hatte keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

Wie Abbildung 29 zeigt, konnte jedoch weder bei den Ent-1- noch bei den Ent-2 siRNA-behandelten Zellen ein signifikanter Einfluss auf die *tis11b*-Expression festgestellt werden. Eine differentielle *entactin*-Expression scheint daher lediglich die Expression einzelner, spezifischer Gene, die mit der Myoblastendifferenzierung assoziiert sind, zu beeinflussen.

### **3.7 Untersuchungen zur *entactin-1*-Expression *in vivo***

Die bisher vorgestellten Daten legen eine Funktion der beiden Entactine bei der Regulation der Muskelzellendifferenzierung nahe. Es sollte nun geklärt werden, ob auch eine Beteiligung bei der Muskelzellregeneration, also *in vivo*, wahrscheinlich ist. Um Hinweise darauf zu erhalten, wurde die *entactin-1*-Expression in murinem Skelett- und Herzmuskelgewebe unter physiologischen und pathologischen Bedingungen analysiert.

#### **3.7.1 *entactin-1*-Expression im Herzmuskelgewebe Coxsackie B3-Virus infizierter Mäuse**

Das Coxsackie-Virus gehört zur Familie der Picornaviren und löst bei ca. 1% seiner Wirte eine inflammatorische Kardiomyopathie aus, Viren des B-Stammes bei bis zu 4%. Immerhin ein Viertel aller inflammatorischen Kardiomyopathien gehen auf eine Infektion mit Coxsackie-Viren zurück (Kim et al., 2001).

Um gesunde Herzen mit erkranktem Gewebe vergleichen zu können, wurden zwei verschiedene Mausstämme dem Virus ausgesetzt. Während der eine Stamm (C57BL/6) über vollständige Immunkompetenz verfügt und es daher nur in etwa jedem hundertsten Fall zu einer Myokarditis kommt, entwickelt der andere untersuchte Stamm (A.BY/SnL) daraufhin regelmäßig eine Herzmuskelentzündung aufgrund einer genetischen Prädisposition. Die Hälfte der Tiere diente jeweils als nicht infizierte Kontrollen; ihnen wurde Kochsalzlösung injiziert. Alle Mäuse wurden im Alter von vier Wochen acht Tage nach erfolgter Infektion getötet und RNA aus Gesamtherz-Proben gewonnen. Diese wurde mittels des *Northern Blot*-Verfahrens auf eine differentielle *entactin-1*-Expression hin untersucht.

Stamm: C57BL/6

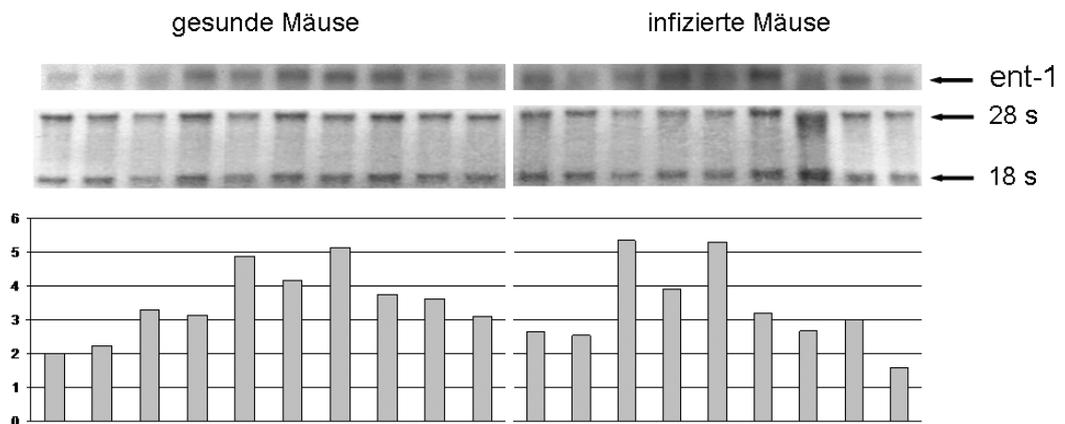


Abbildung 30: **Northern Blot-Analyse der *entactin-1*-Genexpression bei infizierten Mäusen und Kontrolltieren des Stammes C57BL/6.** Es wurden jeweils 2µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-1* hybridisiert. Als Kontrolle für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblau-Färbung. Wegen der ungleichmäßigen Beladung der Spuren wurde die Signalintensität auf die 28s RNA normiert und grafisch dargestellt. Die Expressionsunterschiede sind relativ.

Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den infizierten Tieren und den nicht infizierten Tieren. Auch nach quantitativer Auswertung waren relevante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nicht auszumachen. Einzelne Individuen untereinander unterschieden sich wohl in der *entactin-1*-Expression, allerdings sowohl in der infizierten Gruppe als auch der Kontrollgruppe.

Im Anschluss ist die *entactin-1*-Expression in dem Mausstamm mit erhöhter Prädisposition für eine Myokarditis dargestellt.

Stamm: *A.BY/SnL*

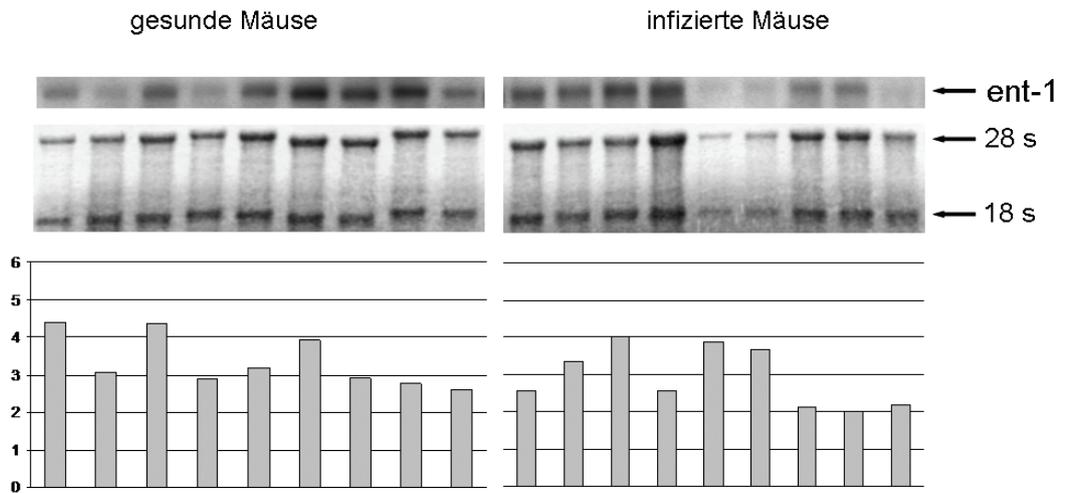


Abbildung 31 : **Northern Blot-Analyse der *entactin-1*-Genexpression bei infizierten Mäusen und Kontrolltieren des Stammes *A.BY/SnL*** Es wurden jeweils 2 $\mu$ g gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer *antisense*-RNA-Sonde gegen *entactin-1* hybridisiert. Als Kontrolle für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblau-Färbung. Wegen der ungleichmäßigen Beladung der Spuren wurde die Signalintensität auf die 28s RNA normiert und grafisch dargestellt. Die Expressionsunterschiede sind relativ.

Auch hier waren keine relevanten Unterschiede zwischen den infizierten und den nicht infizierten Tieren zu sehen. Tendenziell schienen die nicht infizierten Tiere mehr *entactin-1* zu exprimieren.

Ein Vergleich beider Mausstämme miteinander zeigte ebenfalls ein ähnliches Expressionsniveau; tendenziell war beim Wildtyp-Stamm eine höhere *entactin-1*-Expression zu beobachten.

### 3.7.2 *entactin-1*-Expression in der Muskulatur von *mdx*-Mäusen

*Mdx*-Mäuse stellen ein tierisches Modell zur humanen Duchenne-Muskeldystrophie dar. Wie beim Menschen liegt hierbei eine Mutation des *dystrophin*-Gens vor, die 1977 spontan auftrat und seitdem in dieser Mauslinie fortgeführt wird (Bulfield et al., 1984).

Dabei kommt es in der dritten Lebenswoche der *mdx*-Maus zu charakteristischen Veränderungen im Bereich der Muskulatur – diese degeneriert aufgrund der unzureichenden Stabilisierung durch Dystrophin. Im Gegensatz zum Menschen kann die *mdx*-Maus dies jedoch durch effektivere Regeneration gut kompensieren. Nach drei Monaten ist die Regeneration vollständig abgeschlossen, was dem Menschen nicht gelingt. Die *mdx*-Maus zeigt somit ein im Vergleich zum Menschen abgemildertes Krankheitsbild. Lediglich im Zwerchfell der Maus wird im Anschluss an die Zerstörung des Muskelgewebes eine dem Menschen vergleichbar starke Fibrose statt einer Regeneration der Muskelfasern beobachtet. Daher eignet sich das Zwerchfell besonders gut, um die Auswirkungen dieses Gendefekts auf die Muskulatur zu untersuchen. Weiterhin wurden das Herz und zwei periphere Muskeln des Beines (*M. gastrocnemius* und *M. quadriceps*) untersucht, die beim Menschen zuerst befallen werden.

Um einen möglichen Einfluss der Vorgänge in der betroffenen Muskulatur auf die *entactin-1*-Expression festzustellen, wurde Muskelgewebe aus Mäusen unterschiedlicher Altersgruppen auf RNA-Ebene untersucht; damit sollte sichergestellt werden, dass sowohl Phasen der Degeneration als auch der Regeneration erfasst wurden. Jede Altersgruppe umfasste je zwei *mdx*-Mäuse (Stamm:C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J) und zwei Wildtyp-Mäuse (Stamm:C57BL/10ScSnJ) beiderlei Geschlechts. Die weiblichen Mutanten waren homozygot, die männlichen Tiere hemizygot in Bezug auf das ausgeschaltete *dystrophin*-Gen.

Die Daten für das Zwerchfell werden hier exemplarisch dargestellt.

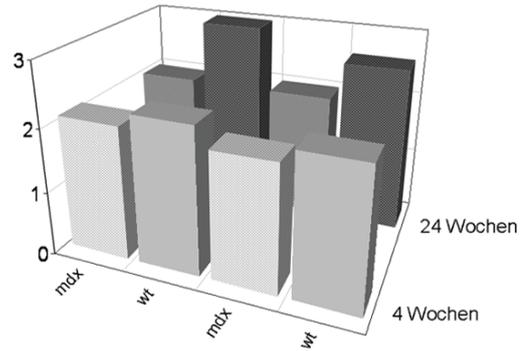
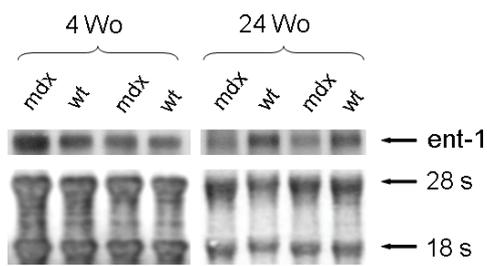


Abbildung 32: **Northern Blot-Analyse der entactin-1-Genexpression im Zwerchfell bei mdx und Wildtyp-Mäusen.** Es wurden jeweils 2µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer antisense-RNA-Sonde gegen *entactin-1* hybridisiert. Als Kontrolle für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblau-Färbung. Wegen der ungleichmäßigen Beladung der Spuren wurde die Signalintensität auf die 18s RNA normiert und grafisch dargestellt, wobei relative Werte gezeigt sind.

Sowohl die 4 als auch 24 Wochen alten *mdx*-Mäuse exprimierten weniger *entactin-1* als die Wildtyp-Tiere. Bei den älteren Mäusen war dieser Unterschied noch ausgeprägter.

Auch im *M. gastrocnemius* ließen sich zwischen *mdx*-Mäusen und Kontroll-Tieren unterschiedliche Expressionsmuster für *entactin-1* feststellen.

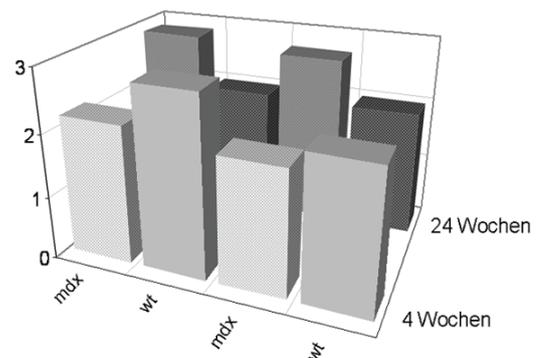
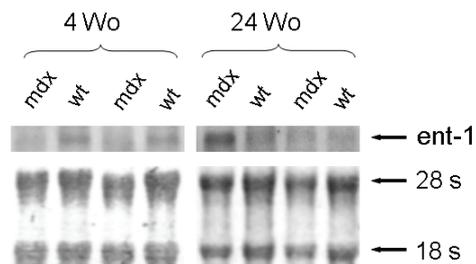


Abbildung 33: **Northern Blot-Analyse der entactin-1-Genexpression im M. gastrocnemius bei mdx- und Wildtyp- Mäusen.** Es wurden jeweils 2µg gesamtzelluläre RNA aufgetragen und mit einer antisense-RNA-Sonde gegen *entactin-1* hybridisiert. Als Kontrolle für die Intaktheit der RNA diente die Methylenblau-Färbung. Wegen der ungleichmäßigen Beladung der Spuren wurde die Signalintensität auf die 18s RNA normiert und grafisch dargestellt, wobei relative Werte gezeigt sind.

In diesem peripheren Muskel exprimierten die Wildtyptiere im Alter von vier Wochen noch mehr *entactin-1* als die *mdx*-Mäuse. Bei den 24 Wochen alten Tieren exprimierten dann allerdings die *mdx*-Mäuse mehr *entactin-1* als die entsprechenden Kontrolltiere.

Im Rahmen einer parallelen Untersuchung zur Rolle von TIS11B in der Muskulatur (Schwarzburger, 2007) wurden Teile der entnommenen Muskulatur für eine spätere histologische Färbung fixiert. Die Auswertung der Muskelschnitte zeigte in den meisten untersuchten Muskeln vereinzelte Anhäufungen von Granulozyten, die für lokale Entzündungen sprechen. Zeichen einer Fibrose lagen nicht vor. Nur im Zwerchfell der 24 Wochen alten *mdx*-Mäuse waren deutliche Bindegewebsstränge und ebenfalls Granulozyten zu erkennen.

Die *Northern-Blot*-Analyse des M. quadriceps und des Herzens ergab keine konsistenten Unterschiede weder zwischen den *mdx*-Mäusen und den Wildtyp-Tieren noch zwischen den einzelnen Altersgruppen (Daten nicht gezeigt).

Diese Daten sprechen dafür, dass in Abhängigkeit vom Alter und der Art des Muskels der bei der *mdx*-Maus vorliegende Defekt im *dystrophin*-Gen auch Auswirkungen auf die Regulation der *entactin-1*-Expression in den entsprechenden Muskeln hat.

Dabei sind die beobachteten Auswirkungen sehr unterschiedlich dahingehend, dass es sowohl zu einer Induktion als auch zu einer Repression der *entactin-1*-Expression kommen kann und dies offenbar vom untersuchten Muskel abhing.

Um die Ergebnisse zu validieren, sollte diese Untersuchung mit mehr Tieren wiederholt werden, damit interindividuelle Unterschiede nicht das Ergebnis verfälschen können.

## 4 Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt gewesen, dass die Expression der beiden *entactin*-Gene im Verlauf der Muskelzellendifferenzierung gegenläufig reguliert wird: Während die Expression des *entactin-1*-Gens nach Induktion der Differenzierung reprimiert wird, wird die des *entactin-2*-Gens induziert (Neu et al., 2006).

Außerdem konnte von zahlreichen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass für die beiden Entactin-Isoformen speziell in den Basalmembranen der Skelett- und Herzmuskulatur unterschiedliche spatiale und temporale Verteilungsmuster vorliegen, wohingegen in allen anderen Geweben sehr ähnliche Muster gefunden wurden (Dziadek und Timpl, 1985; Gersdorff et al., 2005; Kimura et al., 1998; Miosge et al., 2001; Salmivirta et al., 2002).

Untersuchungen an *entactin-1* und *-2 Knockout*-Mäusen führten zu der Erkenntnis, dass die beiden Entactine nicht wie angenommen essentiell für die Entwicklung der embryonalen Basalmembran sind. Es stellte sich jedoch heraus, dass es in Herz- und Skelettmuskulatur zu einer kompensatorischen Erhöhung der *entactin-2*-Expression bei *entactin-1 Knockout*-Mäusen kommt, nicht jedoch im umgekehrten Fall (Bader et al., 2005; Miosge et al., 2002; Murshed et al., 2000; Schymeinsky et al., 2002). Diese Daten lassen zum einen eine unterschiedliche Funktion der beiden Entactine bei der Muskelzellendifferenzierung vermuten. Zum anderen legen sie aber auch eine gewisse funktionelle Redundanz dieser beiden Proteine in der Skelett- und Herzmuskulatur nahe.

In dieser Arbeit sollte daher zunächst die Expressionskinetik beider *entactine* bei verschiedenen Myoblasten-Zelllinien untersucht werden, die sich in ihrem Differenzierungspotential unterscheiden, um eine mögliche Korrelation zwischen *entactin*-Genexpression und Differenzierungspotential aufzudecken.

Anschließend sollte analysiert werden, welchen Einfluss eine Überexpression bzw. Repression eines *entactin*-Gens auf das jeweils andere Gen einerseits

und auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Myoblasten andererseits nimmt.

Abschließend sollte geklärt werden, inwieweit eine differentielle *entactin*-Expression *in vivo* mit verschiedenen pathologischen Prozessen in der Skelett- und Herzmuskulatur assoziiert ist.

## **4.1 Untersuchungen zur *entactin-1* und *-2*-Expression in Skelett- und Herzmuskelzellen**

### **4.1.1 C2C12-Zellen und C2F3-Zellen unterscheiden sich bezüglich ihrer *entactin-1*- und *entactin-2*-Expressionskinetik nach Induktion der Differenzierung**

C2F3-Zellen, die eine langsamer differenzierende klonale Variante von C2C12-Zellen darstellen, zeigten nach Induktion der Differenzierung für beide *entactine* eine Expressionskinetik, die sich von der bei C2C12-Zellen beobachteten unterschied: Zwar war in proliferierenden Zellen die *entactin-1*-Expression in beiden Zelllinien ähnlich; die Repression der *entactin-1*-Expression nach Induktion der Differenzierung war jedoch in den C2F3-Zellen gegenüber den C2C12-Zellen stark abgeschwächt und verlangsamt. Dies könnte Ursache oder Folge des geringeren Differenzierungspotentials der C2F3-Zellen sein.

Auch die bei C2C12-Zellen beobachtete starke Induktion der *entactin-2*-Expression nach Einleitung der Differenzierung trat bei den C2F3-Zellen nur sehr schwach und verzögert auf. Auch dies könnte mit der allgemein verlangsamten Differenzierung dieser Zellen assoziiert sein.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass bei C2-Zellen ein hohes Differenzierungspotential mit einer starken und raschen Repression der *entactin-1*- und einer deutlichen Zunahme der *entactin-2*-Expression nach Induktion der Differenzierung assoziiert ist. Daraus ergab sich die Frage, ob dies auch auf Rhabdomyosarkomzellen zutreffen könnte. Dabei handelt es sich um Tumorzellen der quergestreiften Muskulatur, die sich allgemein durch

ein geringes Differenzierungspotential auszeichnen. Dies soll im nächsten Abschnitt behandelt werden.

#### 4.1.2 In Rhabdomyosarkomzellen wird die *entactin-1*-Expression während der Differenzierung kaum reprimiert

Aus der Literatur sind bereits zahlreiche Gene bekannt (Astolfi et al., 2001; Ehlers et al.), deren Expressionsmuster in Rhabdomyosarkomzellen sich von dem in normalen Myoblasten beobachteten unterscheidet. Es konnte ein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungspotential und der Malignität (Fähigkeit, Metastasen zu bilden) dieser Zellen hergestellt werden (Lollini et al., 1991).

Insbesondere die Tatsache, dass RD/12-Zellen, welche ein geringes Differenzierungspotential aufweisen, überwiegend Marker der frühen Differenzierung überexprimieren (bestimmte Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren), ist eine Bestätigung für die Hypothese, dass diese Tumorzellen in einem frühen Differenzierungsstadium verharren. Die klonale Variante RD/18-Zellen weist ein höheres Differenzierungspotential, exprimiert also in entsprechendem Medium verstärkt Gene der terminalen myogenen Differenzierungsphase; diese kodieren z.B. für Bestandteile des kontraktile Apparates der Muskelzelle (z.B. Myosin und Troponin). Vor allem zeigen diese Zellen bereits kurze Zeit nach Induktion der Differenzierung eine im Vergleich zu RD/12-Zellen 10x höhere Expressionsrate des *myogenin*-Gens, das einen essentiellen myogenen Transkriptionsfaktor darstellt (Astolfi et al., 2001).

Da Rhabdomyosarkome im Normalfall ausserhalb der Skelettmuskulatur angesiedelt sind und daher keine nichttransformierten Kontrollzellen des gleichen Donors existieren, wurde in dieser Arbeit die *entactin*-Genexpression zweier klonaler Varianten einer einzigen Rhabdomyosarkomzelllinie, welche sich bezüglich ihres Differenzierungspotentials unterscheiden, verglichen. Dadurch konnten Rückschlüsse darauf gezogen werden, inwieweit eine differentielle *entactin*-Genexpression mit dem Differenzierungspotential von Rhabdomyosarkomzellen korreliert.

Weiterhin konnte kürzlich in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass RD-Zellen anschließend besser differenzieren (Ehlers et al.), wenn bei ihnen die Expression des *rip-2*-Gens mittels spezifischer siRNAs gehemmt worden war. Das *rip2*-Gen kodiert für eine Komponente des TNF- $\alpha$ -Signaltransduktionswegs; seine Repression ist für die Myogenese unerlässlich (Munz et al., 2002).

Im Verlauf dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass auch die beiden *entactin*-Gene in den untersuchten RD-Zellen ein von normalen Myoblasten abweichendes Expressionsmuster zeigen. Dies äußerte sich als fehlende Induktion der *entactin-2*-Expression im Laufe der Differenzierung, die von einer verlangsamten Repression von *entactin-1* begleitet wird.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine aberrante *entactin*-Genexpression Ursache oder Folge des verminderten Differenzierungspotentials von Rhabdomyosarkomzellen ist. Denkbar wäre hierbei, dass durch die anhaltend hohe Expression von *entactin-1* auch in serumarmem Medium entweder die Zellproliferation gefördert wird – was wiederum den Differenzierungsprozess behindern würde – oder dass der Eintritt in die Differenzierungsphase selbst verzögert oder behindert wird. Die beobachtete Abweichung des *entactin*-Expressionsmuster nach Induktion der Differenzierung von dem bei normalen Myoblasten beobachteten könnte aber auch eine Folge von Prozessen sein, die ursprünglich zur Entartung der RD-Zellen führten.

Auch die bei Rhabdomyosarkomzellen fehlende Induktion des *entactin-2*-Gens – dieses wird in nichttransformierten Muskelzellen bereits kurze Zeit nach Einleitung der Differenzierungsphase hochreguliert – könnte mit dem geringen Differenzierungspotential der Rhabdomyosarkomzellen assoziiert sein. Es ist aber auch möglich, dass die Expressionsmuster beider *entactin*-Gene bei Maus und Mensch voneinander abweichen und in humaner Muskulatur sehr viel weniger *entactin-2* exprimiert wird als bei der Maus.

Von den vier Typen des Rhabdomyosarkoms, die auf einer histologischen Einteilung beruhen, sind der embryonale (ca. 60-70% aller Fälle) und der alveoläre Typ (ca. 20% aller Fälle) die häufigsten. Bei beiden wurden

spezifische Veränderungen des Genoms festgestellt, die so konsistent sind, dass eine Diagnose des Tumortyps aufgrund genetischer Unterschiede möglich ist (Parham, 2001; Scrable et al., 1989).

Für den embryonalen Typ, zu dem auch die verwendeten RD-Zellen gehören, wurde eine Deletion auf Chromosom 11 festgestellt (Besnard-Guerin et al., 1996; Visser et al., 1997). Obwohl dies die Existenz eines Tumorsuppressorgens nahelegt, wurde ein solches bisher nicht entdeckt. Allerdings liegt ein für den Wachstumsfaktor IGF-2 (*Insulin-like growth factor*) kodierendes Gen in diesem Bereich (El-Badry et al., 1990; Zhan et al., 1994). Das entsprechende Gen wird in den meisten Rhabdomyosarkomen überexprimiert (El-Badry et al., 1990; Minniti et al., 1994; Wang et al., 1998) und könnte eventuell eine unkontrollierte Proliferation auslösen (Merlino und Helman, 1999). Eine IGF-2-Überexpression ist mit zahlreichen Tumoren in Zusammenhang gebracht worden und aktiviert mehrere Signalkaskaden, unter anderem die PI3-Kinase und FOXO (Foulstone et al., 2005). Da nach wie vor unklar ist, auf welchem Weg die *entactin-1*-Expression induziert wird, könnte dies ein Ansatz für weitere Untersuchungen sein.

Spezifische Translokationen zwischen den Chromosom 1 oder 2 und 13 scheinen mit dem alveolären Typ verbunden zu sein (Barr et al., 1993). Eines der daraus resultierenden Proto-Onkogen PAX3-FKHR (Galili et al., 1993) ist somit Mitglied zweier Familien von Transkriptionsfaktoren (*Paired-box* und *Forkhead box* proteins), die normalerweise mit der Proliferation, Differenzierung und Lebensdauer von Zellen assoziiert sind und reprimiert beim Rhabdomyosarkom vermutlich das Tumorsuppressorgen PTEN (Li et al., 2007), das ebenfalls in den PI3-Weg mündet.

#### 4.1.3 Herzmuskelzellen exprimieren ausschließlich *entactin-2*, *entactin-1* ist nicht nachweisbar

Für die adulte Maus ist auf RNA-Ebene eine Expression beider *entactin*-Gene im Herzen belegt (Bader et al., 2005; Kimura et al., 1998; Salmivirta et al., 2002; Schymeinsky et al., 2002). Auf Proteinebene konnten ebenfalls beide Isoformen detektiert werden, hier allerdings mit einem exzessiven Überschuss von Entactin-1 gegenüber Entactin-2 (Bader et al., 2005;

Salmivirta et al., 2002). In der embryonalen Maus wurde sowohl auf RNA- (Salmivirta et al., 2002) als auch Proteinebene (Gersdorff et al., 2005) eine Expression beider *entactin*-Gene im Herzen nachgewiesen.

Es war daher überraschend, dass die von uns untersuchten murinen Kardiomyozyten kein *entactin-1* exprimierten. Da jedoch bis heute unklar ist, welche Zelltypen im Herzen dieses Gen exprimieren, ist es denkbar, dass im Herzen nicht die Kardiomyozyten selbst, sondern andere Zelltypen für die Produktion des dort nachgewiesenen Entactin-1 zuständig sind. In diesem Zusammenhang ist die Tatsache interessant, dass zumindest in allen Blutgefäßen des adulten Herzens beide Entactine reichlich nachgewiesen werden konnten (Salmivirta et al., 2002) und auch die von uns untersuchten Nabelschnur-Endothelzellen (HUVECs) *entactin-1* exprimierten. Somit ist denkbar, dass tatsächlich entweder die Endothelzellen oder noch weitere Zelltypen innerhalb des Herzens für die Entactin-1-Produktion zuständig sind.

Im Gegensatz zum *entactin-1*-Gen konnte in unseren Untersuchungen aber eine Expression des *entactin-2*-Gens in den Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Bemerkenswert war dabei, dass eine Stimulation mit Tumornekrosefaktor- $\alpha$  zur Induktion der *entactin-2*-Genexpression führte. Da dieses Zytokin eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Kardiomyopathien spielt, stellte sich die Frage, ob eine differentielle Expression des *entactin-2*-Gens auch bei entzündlichen Erkrankungen des Herzmuskels *in vivo* beobachtet werden kann, was im späteren Verlauf dieser Arbeit genauer untersucht wurde (siehe Abschnitt 3.7).

Eine *entactin-2*-Expression auch in den untersuchten Endothelzellen (HUVEC's) konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies ist insbesondere deshalb erstaunlich, da aufgrund ihrer exklusiven Bindungseigenschaften (Sasaki et al., 1999) und einer verstärkten Lokalisation innerhalb von endothelialen Basalmembranen für die Entactine im Allgemeinen und Entactin-2 im Besonderen eine Beteiligung bei der Angiogenese diskutiert wird (Nicosia et al., 1994).

Möglicherweise bedarf es zur *entactin-2*-Induktion in Endothelzellen noch weiterer Faktoren, die ein *in vitro*-Modell nicht liefern kann. Denkbar wäre

auch, dass diese Zellen im Verlauf ihrer Differenzierung nur über einen bestimmten Zeitraum hinweg *entactin-2* exprimieren und dieses Zeitfenster von unserem Experiment nicht erfasst wurde. Schließlich ist es möglich, dass das in Blutgefäßen nachgewiesene Entactin-2 nicht von den Endothelzellen selbst sondern von anderen Zelltypen, wie z.B. glatten Muskelzellen, produziert wird.

#### **4.2 Nach immunhistochemischer Färbung zeigen siRNA-behandelte Zellen eine diffusere Entactin-1-Verteilung als entsprechende Kontrollen**

In den mit Ent-1 siRNA behandelten Zellen war erkennbar, dass die Anfärbung von Entactin-1 diffuser und weniger stark ausfiel als in den entsprechenden Kontrollen. Dies spricht dafür, dass in zahlreichen aber nicht allen Zellen die Entactin-1-Proteinsynthese in der Tat unterdrückt worden war. Diese stellen vermutlich die produktiv transfizierte Zellpopulation dar. Die Unterschiede in der Anfärbung können allerdings nicht zu einer quantitativen Auswertung herangezogen werden, da zum einen keine Immunpräzipitation erfolgt war und daher keine Informationen darüber vorlagen, wieviel Protein bereits sezerniert worden war. Zum anderen war keine Normierung hinsichtlich graphischer Bildeigenschaften wie Helligkeit, Kontrast und Farbsättigung erfolgt.

Ein Vergleich der differenzierenden si-RNA-behandelten mit den unbehandelten Zellen zeigt, dass in den länglicheren und damit schon weiter in der Differenzierung fortgeschrittenen Zellen die Anfärbung von Entactin-1 noch schwächer und nicht mehr um die Kernmembran herum (im Endoplasmatischen Retikulum) konzentriert war. Eine solche Anfärbung war dagegen in den Kontrollzellen unter den gleichen Bedingungen noch sehr deutlich zu sehen, was dafür spricht, dass diese in der Tat auch in Differenzierungsmedium relativ mehr Entactin-1 produzieren.

### 4.3 Überexpression bzw. Repression der *entactin-1* und *-2*- Expression in Skelettmuskelzellen

Eine weitere zentrale Frage dieser Arbeit war, ob es eine direkte *Feedback*-Regulation der Expression der beiden *entactin*-Gene gibt, welche ihr weitgehend reziprokes Expressionsmuster bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung erklären könnte. Diese Hypothese wird von Daten aus den *Knockout*-Untersuchungen gestützt, die zumindest für die *entactin-1-Knockout*-Maus eine vermutlich kompensatorische Anreicherung von Entactin-2 in Herz- und Skelettmuskulatur belegen. Diese zunächst als Umverteilung interpretierte Anreicherung wurde genauer analysiert und konnte schließlich auf eine induzierte Expression von *entactin-2* zurückgeführt werden (Miosge et al., 2002).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu einer möglichen *Crossregulation* der beiden *entactin*-Gene in Skelettmuskelzellen auf der Basis *entactin-1*- und *entactin-2*-überexprimierender Zelllinien bzw. verschiedener siRNA-Strategien lieferten teilweise widersprüchliche Ergebnisse.

So konnte bei den *entactin-1*- und *entactin-2*-überexprimierenden Zelllinien kein Einfluss des jeweils rekombinant überexprimierten Gens auf die entsprechende endogene Form oder auf das jeweils andere *entactin*-Gen festgestellt werden. Dies könnte allerdings auf die schnell nachlassende Expression der jeweiligen rekombinanten Form aufgrund des *Silencing* des viralen LTRs zurückzuführen sein. Bereits 48h nach Induktion der Differenzierung war eine deutliche Induktion bzw. Repression von *entactin-2* respektive *entactin-1* nicht mehr festzustellen. Zumindest unter Proliferationsbedingungen wird aber das rekombinante Transkript noch exprimiert; allerdings war auch hier kein Einfluss auf die anderen Isoformen festzustellen.

Eine Überexpression sowohl von *entactin-1* als auch *entactin-2* scheint also zumindest *in vitro* nicht zu einer *Crossregulation*, also einer abgeschwächten Expression des für die andere Isoform kodierenden Gens zu führen.

*In vitro* hatte eine Hemmung der *entactin-1*-Expression keinen Einfluss auf die *entactin-2*-Expression. Damit widersprechen diese *in vitro*-Daten den *in vivo*-Ergebnissen, bei denen eine starke Induktion der *entactin-2*-Expression im Herz- und Skelettmuskelgewebe von *entactin-1-Knockout*-Mäusen nachgewiesen worden war (Miosge et al., 2002).

Im Gegensatz dazu führte eine Hemmung der *entactin-2*-Expression mittels spezifischer siRNAs zu einem starken Anstieg der *entactin-1*-Expression. Dies konnte bei der entsprechenden *Knockout*-Maus ebenfalls nicht nachvollzogen werden (Schymeinsky et al., 2002). Diese Diskrepanz könnte darauf zurückzuführen sein, dass die erhöhte Produktion von Entactin-2 in den *entactin-1-Knockout*-Mäusen auf einen anderen, nichtmuskulären Zelltyp zurückgeht. Zum Ursprung des Proteins liegen bisher keine Daten vor; bekannt ist lediglich, dass das *entactin-2*-Gen von zahlreichen Zellen mesenchymalen Ursprungs und auch von einigen epithelialen Zellen exprimiert wird (Dziadek und Timpl, 1985).

Der beobachtete Anstieg der *entactin-1*-Expression nach Hemmung von *entactin-2 in vitro* steht außerdem in Widerspruch zu den an *entactin-2-Knockout*-Mäusen gewonnenen *in vivo*-Daten, da hier keine kompensatorische Induktion der *entactin-1*-Expression zu beobachten war. Eine Erklärung könnte sein, dass sich dieser Effekt nur auf RNA-Ebene beobachten lässt. Möglicherweise findet keine umfassende Translation statt oder die Proteine können *in vivo* nicht in die extrazelluläre Matrix aufgenommen bzw. von dieser gebunden und dadurch stabilisiert werden. Ebenso könnte aber auch das *in vitro*-Modell einen unphysiologischen Zustand darstellen, da die hier aufgebaute extrazelluläre Matrix sich bezüglich ihrer Zusammensetzung und Struktur von der *in vivo*-Situation unterscheidet und Prozesse wie die Sekretion und nachfolgende Schritte wie der Einbau der Entactine in die EZM nicht mehr verfolgt werden können.

Denkbar ist schließlich in beiden Fällen, dass ein *Gen-Knockout* (die Entfernung eines spezifischen Gens aus dem Genom) nicht in jeder Hinsicht dieselben Auswirkungen hat wie eine Repression eines Gens mittels siRNA (vorübergehende Zerstörung spezifischer Transkripte), was die unterschiedlichen *in vivo*- und *in vitro*-Ergebnisse erklären würde.

#### **4.4 Eine Hemmung der *entactin-1*- und *entactin-2*-Expression hat Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Myoblasten**

Aufgrund der starken Abnahme der *entactin-1*- und der Zunahme der *entactin-2*-Expression nach Induktion der Differenzierung sowie der Tatsache, dass eine Grundvoraussetzung für die Differenzierung ein Austreten aus dem Zellzyklus ist, wurde vermutet, dass Entactin-1 einen proliferationsfördernden und Entactin-2 einen proliferationshemmenden Effekt haben könnte. In dieser Arbeit sollte daher mit Hilfe der BrdU-Methode geklärt werden, ob sich eine Hemmung der beiden Gene mittels siRNA auf die Proliferationsrate von C2C12-Zellen auswirkt. Für den Fall einer Überexpression von *entactin-1* konnte dabei bereits vor Beginn dieser Arbeit eine signifikant höhere Proliferationsrate der Zellen nachgewiesen werden (Neu, 2006).

In Wachstumsmedium wiesen Zellen, die weniger *entactin-1* exprimierten als entsprechende Kontrollzellen, eine etwas verringerte Proliferationsrate auf. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt allerdings bei differenzierenden Zellen: Hier proliferierten die Kontrollzellen etwa dreimal so schnell wie die behandelten Zellen. Denkbar wäre, dass durch die Hemmung von *entactin-1* auch andere proliferative Reize wegfallen und diese Effekte sich addieren. Ebenso könnte auch die Hemmung von *entactin-1* ein Signal darstellen, vermehrt differenzierungsfördernde Faktoren zu exprimieren, wodurch die Zellen noch schlechter proliferieren könnten.

Zellen, bei denen die *entactin-2*-Expression gehemmt worden war, proliferierten dagegen in Wachstumsmedium genauso schnell wie entsprechende Kontrollzellen. Nach Induktion der Differenzierung war ihre Proliferationsrate allerdings gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Weiterhin konnte eine erhöhte Expression des Proliferationsmarkers *cyclinD1* und eine reduzierte Expression des Differenzierungsmarkers *p21* festgestellt werden (Neu et al., 2006). Beide Ergebnisse würden die erhöhte Proliferationsrate der behandelten Zellen erklären. Auch der in diesem Versuch beobachtete Anstieg der *entactin-1*-Expression über das Niveau der Kontrollzellen (siehe Abschnitt 3.4.2) könnte die Proliferationsrate positiv beeinflusst haben.

## 4.5 Eine Hemmung der *entactin-1*-Expression beeinflusst selektiv die Expression myogener Differenzierungsmarker

### 4.5.1 *p21* wird durch eine Hemmung von *entactin-1* induziert

Das Protein p21 wird in der Zelle in Folge einer Signalkaskade vermehrt produziert, wenn der Zellzyklus aufgehalten werden muss. Aufgetretene Schäden an der DNA, andere physiologische Prozesse wie der Eintritt in die Differenzierungsphase oder irreversible Zellschädigungen, die in die Apoptose münden, können dies bedingen. Durch eine Inhibition Cyclin-abhängiger Kinasen verharret die Zelle dann in der G1-Phase des Zellteilungszyklus, wodurch die Replikation der beschädigten DNA verhindert bzw. Zeit für die Neusynthese anderer Proteine gewonnen wird (Gartel und Radhakrishnan, 2005).

In Skelettmuskelzellen wird die *p21*-Expression 24h nach Induktion der Differenzierung stark induziert (Moran et al., 2002). Aus diesem Grund eignet sich *p21* als Differenzierungsmarker.

Es gibt allerdings auch paradoxe Wirkungen und offenbar führt eine Repression bzw. Induktion der *p21*-Expression zelltypabhängig nicht immer zur selben Antwort (Kavurma und Khachigian, 2003).

Da das *p21*-Gen phylogenetisch sehr alt ist und von zahlreichen und sehr verschiedenartigen Faktoren beeinflusst wird, ist anzunehmen, dass viele Signalwege Einfluß auf die Expression dieses Gens nehmen (Sandy, 1998).

Die in dieser Arbeit beobachtete starke Induktion von *p21* nach Hemmung von *entactin-1* spricht dafür, dass die entsprechenden Zellen im Zellteilungszyklus arretiert wurden und nicht weiter proliferieren konnten. Insbesondere das hohe *p21*-Expressionsniveau bereits in den proliferierenden Zellen stützt diese Beobachtung. Die Tatsache, dass sowohl *entactin-1*-überexprimierende Zellen sowie auch Zellen, bei denen die *entactin-2*-Expression mittels spezifischer siRNAs gehemmt worden war (Neu, 2006), im Vergleich zu Kontrollzellen eine geringere *p21*-Expression zeigten, spricht ebenfalls dafür, dass es eine Wechselbeziehung zwischen der Expression beider *entactin*-Gene und der *p21*-Expression gibt. Unsere

Untersuchungen weisen dabei darauf hin, dass das *entactin-1*-Gen einen hemmenden, das *entactin-2*-Gen hingegen einen fördernden Einfluss auf die *p21*-Expression hat.

Für murine Fibroblasten konnte eine starke Aktivierung der *entactin-1* Expression durch Sp1 gezeigt werden (Zedlacher et al., 1999). Sp1 gehört zu einer Familie von etwa 20 Transkriptionsfaktoren (Sp/KLF-Familie), die über gegenseitige Feedbacks durch verschiedene Phosphorylierungszustände eine Feinabstimmung der Transkription ermöglichen und eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation spielen (Black et al., 2001; Chu und Ferro, 2005; Cook et al., 1999). P21 wird zelltypabhängig ebenfalls von Sp1 reguliert (Kavurma und Khachigian, 2004). Bei vaskulären glatten Muskelzellen wurde (sowohl) eine Repression (als auch Induktion) von *p21* durch Sp1 beobachtet (Kavurma und Khachigian, 2003; Santiago et al., 2007). Es wäre daher denkbar, dass die gehemmte Entactin-1-Produktion in der Zelle regulatorisch Einfluss auf die Aktivität des Sp1-Faktors hat und dadurch die *p21*-Expression beeinflusst. Diese Beeinflussung könnte allerdings wegen der vielen Wechselwirkungen nicht mehr sehr spezifisch sein.

#### 4.5.2 *rip2* und *cyclinD1* werden durch eine Hemmung von *entactin-1* induziert; auf *tis11b* hat weder *entactin-1* noch *entactin-2* einen Einfluss

Die RIP-Proteine stellen eine Klasse von Faktoren dar, denen eine Serin-Threonin-Kinase-Aktivität gemein ist und die sich durch weitere, unterschiedliche Domänen auszeichnen. Sie interagieren mit der intrazellulären Domäne von Rezeptoren des Tumor-Nekrose-Faktortyps und sind an sehr verschiedenen Prozessen wie Immunantwort aber auch Apoptose beteiligt (Meylan und Tschopp, 2005).

Bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung wurde festgestellt, dass die Expression von *rip2* im Rahmen dieses Programms herunterreguliert wird. Eine anhaltende Überexpression von *rip2* verhinderte die Differenzierung der Zellen auch dann, wenn andere differenzierungsfördernde Faktoren vorlagen (Munz et al., 2002). Analog dazu konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass

eine Hemmung von *rip2* in Rhabdomyosarkomzellen zu einer verminderten Proliferationsrate und außerdem einer Förderung der Differenzierung führte (Ehlers et al.).

Vor diesem Hintergrund war es eher erstaunlich, dass eine Hemmung von *entactin-1* nicht auch zu einer Hemmung von *rip2* führte, sondern im Gegenteil zu einer Induktion der Expression dieses Gens. Interessanterweise zeigte eine Überexpression von *entactin-2* denselben Effekt: Die *rip2*-Expression war induziert, obwohl *entactin-2* vermutlich differenzierungsfördernde Eigenschaften hat (Neu et al., 2006).

CyclinD1 bewirkt über eine Phosphorylierung von ihm selbst abhängiger Kinasen eine Kaskade, die zum Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellteilungszyklus führt. Damit kann die Replikation der DNA beginnen, was letztlich zur Mitose und damit Proliferation führt (Harbour und Dean, 2000; Löffler et al., 2006; Sherr und Roberts, 2004). Sogenannte E2F-Transkriptionsfaktoren sind wichtige Substrate der Cyclin-aktivierten Kinasen.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine *entactin-1*-Überexpression keinen Einfluß auf die *cyclinD1*-Expression hatte. Allerdings führte eine Hemmung der Genexpression von *entactin-2* zu einem Anstieg der *cyclinD1*-Expression (Neu et al., 2006); daher war es überraschend, dass eine Hemmung der *entactin-1*-Expression ebenfalls zu einem Anstieg führte. Offensichtlich ist, dass eine Hemmung der Expression beider *entactin*-Gene zu einer Induktion der *cyclinD1*-Expression im Rahmen der Muskelzellproliferation führt. Bei mesangialen Zellen wurde beobachtet, dass diese in Kultur in einem 3D-Kollagen-Netzwerk via E2F-Suppression im Zellzyklus arretieren – sie differenzieren dann aus (Tsuboi et al., 2000). Denkbar ist, dass auch andere Bestandteile der extrazellulären Matrix wie z.B. Entactin auf diese Weise Einfluss auf die mitotische Aktivität von Zellen nehmen. Ein Mangel an Entactin würde dann im Rahmen der Regulation auf Zellzyklusebene zu einer gesteigerten Proliferation führen und den Anstieg der *cyclinD1*-Expression erklären.

Es ist bereits länger bekannt, dass die Expression von *entactin-1* durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren induziert wird (Kadoya et al., 1997). Diese

sind essentiell für den Progress des Zellzyklus. Sie vermitteln unter anderem über die MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase) das Signal zur Proliferation in Richtung Zellkern und beeinflussen direkt CyclinD1 (Cabane et al., 2003; Hsu et al., 2006).

Zur genaueren Regulation dieser Vorgänge existieren zahlreiche Signaltransduktionswege, die sich sowohl verstärken als auch gegenseitig hemmen können. Ausserdem lösen sie jeweils auch unabhängig voneinander Kaskaden aus und sind in ihrer Komplexität noch nicht annähernd erfasst sind (Frederick et al., 2007; Halevy und Cantley, 2004).

Von unserer Arbeitsgruppe konnte bisher zumindest gezeigt werden, dass *entactin-2* und vermutlich auch *entactin-1* unabhängig von der p38-MAPK reguliert wird (Neu et al., 2006), für die eine Schlüsselrolle bei der Muskelzelldifferenzierung angenommen wird (Cabane et al., 2003; Cuenda und Cohen, 1999).

Möglicherweise spielen andere Signalwege eine Rolle, die einen Anstieg der *cyclinD1*-Expression im Zusammenhang mit einer Hemmung der *entactin*-Expression erklären können, wie etwa die PI3-Kinase (Phosphoinositol-3-Kinase), für die eine Beteiligung bei der Muskelzelldifferenzierung diskutiert wird (Li et al., 2001; Li et al., 2000; Tureckova et al., 2001; Wilson et al., 2004).

Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass die Expression von *tis11b* während der Muskelzelldifferenzierung stark induziert wird, was eine wichtige Funktion des entsprechenden Proteins bei der Myogenese vermuten lässt (Busse et al., 2007). In dieser Arbeit konnte allerdings kein Einfluss einer differentiellen *entactin*-Expression auf die Expression dieses Gens festgestellt werden.

Da keines der beiden Entactine einen Einfluss auf die *tis11b*-Expression hatte, ist anzunehmen, dass die Entactine selektiv nur bestimmte Differenzierungsmarker beeinflussen.

Auf die etablierten Differenzierungsmarker Aktin und Myogenin hatte eine Überexpression von *entactin-1* ebenfalls keinen Einfluss (Neu, 2006).

Dies würde bedeuten, dass die Entactine nur in bestimmte Aspekte der Muskelzellendifferenzierung eingreifen.

## **4.6 Das *entactin-1*-Gens wird bei der murinen Muskeldystrophie differentiell exprimiert**

### **4.6.1 Die Expression von *entactin-1* im Herzen wird durch eine Coxsackie B3-Virus Infektion nicht beeinflusst**

Bei der Coxsackievirus B3-induzierten inflammatorischen Kardiomyopathie kommt es durch eine T-+B-Zell-vermittelte Immunantwort zu einer Infiltration des myokardialen Gewebes mit zytotoxischen T-Zellen mit dem Ziel, vom Virus befallene Zellen zu eliminieren (Schultheiss und Kuhl, 2006). Das Myokard stellt allerdings nicht das einzige Reservoir für Viren dar (Klingel et al., 1996). Verschiedene Virulenzfaktoren dieser Virenfamilie besitzen eine unterschiedliche Pathogenität (Tam et al., 2003). Durch vermutlich vom Wirt abhängige Faktoren kann die Immunreaktion „entgleisen“ und in eine chronische Kardiomyopathie mit kontinuierlicher Destruktion des Myokards münden (Dörner et al., 2005; Kallwellis-Opara et al., 2007). Statt einer Elimination des Virus kommt es dann zur Persistenz. Der Mechanismus dieser Chronifizierung ist nicht sicher bekannt (Tam, 2006).

Da bei dieser Form der Kardiomyopathie ein entzündungsbedingter, degenerativ-regenerativer Vorgang mit Gewebeumbau zu beobachten ist, war eigentlich zu erwarten gewesen, dass Auswirkungen auf die Expression von *entactin-1* auftreten würden. Dies wurde für andere Proteine der extrazellulären Matrix bereits beschrieben (Towbin, 2006).

Der Abbau der extrazellulären Matrix, wie sie im Rahmen einer Entzündung zunächst auftritt, hätte eine differentielle Expression von *entactin-1* zumindest vermuten lassen (Baramova et al., 1989; Kassiri und Khokha, 2005). Durch den Einfluss von Matrix Metalloproteinasen (MMP) wird die strukturelle Integrität der EZM herabgesetzt (Pauschinger et al., 2004), indem sie Proteine, unter anderem auch das Entactin (d'Ortho et al., 1997), abspalten. Die Proteinase wiederum werden durch TIMP (*Tissue Inhibitors of Matrix*

*Metalloproteinases*) gehemmt. Dies dient normalerweise dem regulierten Umbau der Matrix (Malemud, 2006).

Bei der inflammatorischen Kardiomyopathie kommt es zu einer gesteigerten Produktion verschiedener MMP's; dies wurde als einer der Pathomechanismen dieses Typus der Myopathie identifiziert (Cheung et al., 2006; Rutschow et al., 2006). Versuche mit Inhibitoren der Matrix Metalloproteinasen stellen daher vielversprechende Ansätze bei der Therapie der Myokarditis dar (Heymans et al., 2006; Hu et al., 2007).

Trotz der vermutlich wesentlichen Rolle der EZM bei der Progredienz der Virus-induzierten Myokarditis liess sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein Unterschied bezüglich der *entactin-1*-Expression zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren feststellen. Möglicherweise tritt eine kompensatorische Expressionssteigerung in einem späteren Stadium der Regeneration auf, bleibt aber ohne entsprechende Zeitwerte spekulativ.

Da Entactin-1 chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt und diese bei jeder akuten Entzündung in grosser Zahl im betroffenen Gewebe anzutreffen sind, hätte man auch in diesem Zusammenhang einen Einfluss der CVB3-Infektion auf die *entactin-1*-Expression erwarten können (Senior et al., 1992). Eine der Subpopulationen der Lymphozyten, den Effektoren des Immunsystems, wurde funktionell mit Entactin-1 in Zusammenhang gebracht, (Schroen und Cheung, 1996) da es ihre Adhäsion, nicht aber Migration fördert; diese Eigenschaft scheint hier aber nicht von besonderer Bedeutung zu sein.

Offenbar wird die *entactin-1*-Expression im Gegensatz zu vielen für andere EZM-Proteine kodierenden Genen durch eine inflammatorische Kardiomyopathie nicht oder nur unwesentlich beeinflusst.

Der genetische Background scheint dabei sowohl entscheidend für die Entwicklung einer chronischen Verlaufsform zu sein (Tam und Messner, 1996) als auch die basale Expression von *entactin-1* zu beeinflussen. Zur Bestätigung der Daten müsste allerdings ein grösseres Kollektiv an Mäusen untersucht werden.

#### 4.6.2 *Mdx*-Mäuse zeigen in Abhängigkeit vom untersuchten Muskel vom Wildtyp abweichende Expressionsmuster für *entactin-1*

Bei den X-chromosomal vererbten Muskeldystrophien, der murinen X-chromosomalen Dystrophie (MDX) und der Duchenne Muskeldystrophie des Menschen (DMD) fehlt eine funktionsfähige Form des plasmamembranständigen Zytoskelett-Proteins Dystrophin. Grund hierfür ist eine oder mehrere Mutationen im *dystrophin*-Gen, dem mit 2300 kb längsten Gen des Menschen. Je nach Mutation und betroffener Domäne tritt ein vollständiger oder teilweiser Funktionsverlust des Dystrophin-Proteins auf. Bisher wurden fünf gewebsspezifische Isoformen von Dystrophin identifiziert (Ervasti, 2007). Dystrophin stabilisiert Aktin und vermittelt im Komplex mit Dystroglycan eine Verbindung des Zytoskeletts (kontraktiler Apparat) mit der extrazellulären Matrix (Ervasti und Campbell, 1993). Defekte in diesem DAPC-Komplex (*dystrophin-associated protein complex*) führen zu Muskelfasernekrose, Fibrose und Muskelschwäche (Ervasti und Campbell, 1993; Klietsch et al., 1993). Der Pathomechanismus der Dystrophin-Defizienz ist bis heute nicht vollständig geklärt, es wird jedoch vermutet, dass Dystrophin normalerweise die Plasmamembran gegen mechanischen Stress während der Muskelfaserkontraktion schützt und so vor Mikroläsionen bewahrt (Deconinck und Dan, 2007). Seine Funktionen werden teilweise von anderen Proteinen der extrazellulären Matrix und des DAPC-Komplexes kompensiert (Ervasti, 2007)

Generell befinden sich *mdx*-Mäuse mit 4 Wochen im Zustand der muskulären Degeneration: es kommt zur Atrophie, der mit etwa neun Wochen eine Nekrose folgt. Die zerstörten Areale werden bei der Maus suffizient regeneriert mit Ausnahme des Zwerchfells, in dem die für den Menschen für alle Skelettmuskeltypen typische Fibrosierung auftritt. Mit steigendem Alter nimmt daher die Schädigung des Zwerchfells bei der *mdx*-Maus zu (Übersicht bei (Tkatchenko et al., 2000).

Die von uns untersuchten *mdx*-Mäuse zeigten mit vier Wochen eine erniedrigte *entactin-1*-Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren. Zwar wurde festgestellt, dass Entactin-1 kein Bindungspartner des DAPC-

Komplexes ist (Ervasti, 2007; Ervasti und Campbell, 1993), aber verschiedene andere bedeutende Proteine der extrazellulären Matrix wie Laminin und Perlecan, deren Expression im Laufe der Muskelzelldifferenzierung wie auch die von *entactin-1* reprimiert wird, (Larrain et al., 1997) binden an den DAPC-Komplex (Klietsch et al., 1993) und vermitteln dadurch Adhäsion (Ervasti und Campbell, 1993; Schneider et al., 2006) und Zellpolarität (Peng et al., 1998). Beides ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Regeneration der Muskelzellen. Eventuell beeinflusst Entactin-1 positiv die Bindungswahrscheinlichkeit seiner eigenen Partner Perlecan und Laminin an den Dystrophin-Dystroglycan-Komplex und beschleunigt dadurch die Regeneration. Dies würde erklären, warum die *entactin-1*-Expression im M. gastrocnemius der 24 Wochen alten Mäuse bei den *mdx*-Tieren (nach langer Regeneration) höher als bei den Wildtyp-Tieren war. Eine hohe *entactin-1*-Expression könnte in diesem gut regenerierten Muskel die Moleküle in räumliche Nähe zueinander bringen, was ihre Reaktionswahrscheinlichkeit erhöhen würde. Dadurch wäre die Basalmembran stabilisiert und könnte die Defekte teilweise kompensieren oder eine Umstrukturierung erleichtern.

Die histologisch beobachtete Fibrosierung im Zwerchfell der adulten *mdx*-Mäuse unterstützt dieses Konzept, da sie das Versagen der reparativen Mechanismen im Sinne einer *restitio ad integrum* (funktionelle Wiederherstellung) widerspiegelt und in keinem anderen Muskel in dieser Form zu beobachten war.

Diese Hypothese würde auch die Befunde beim Zwerchfell erklären. Wie beim M. gastrocnemius exprimierten auch hier die *mdx*-Tiere in der akuten Phase der Degeneration weniger *entactin-1* als die Kontroll-Tiere. Mit 24 Wochen exprimierten sie allerdings noch weniger *entactin-1* als die Kontroll-Tiere; beim M. gastrocnemius hatte sich dieses Verhältnis dann umgekehrt.

Vor dem Hintergrund, dass im Zwerchfell keine effektive Regeneration vollzogen wird, würde die Hypothese von Entactin-1 als eine Art „Katalysator“ erklären, warum es im Zwerchfell im Gegensatz zu anderen murinen Muskeln zu umfassenden Destruktionen ohne erfolgreiche Reparatur kommt.

Um das Expressionsmuster zu verifizieren, müsste jedoch in jedem Fall ein grösseres Kollektiv an Mäusen untersucht werden, da in jeder Altersgruppe nur jeweils zwei Paare zur Verfügung standen. Außerdem wäre es interessant, die Muskulatur einer sehr viel älteren *mdx*-Maus mit einem Kontroll-Tier zu vergleichen, um festzustellen, ob die beobachteten Unterschiede zwischen Zwerchfell (regeneriert schlecht) und peripheren Muskeln (regenerieren gut) konsistent sind.

## 5 Zusammenfassung

Der Wissenszuwachs der letzten Jahre über die Interaktionen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix hat zunehmend das traditionelle Verständnis der Matrix als „Kitmasse“ im interzellulären Bereich aufgehoben und führte zu der Erkenntnis, dass die Proteine der Basalmembran zahlreiche funktionelle Aufgaben haben, zu denen auch die Beteiligung bei der Steuerung der embryonalen Entwicklung und Differenzierungsvorgängen im allgemeinen wie Wachstum und Regeneration gehört.

Die beiden in dieser Arbeit untersuchten ubiquitären Basalmembran-Proteine Entactin-1 und -2 gehören zu einer kleinen Proteinfamilie, für die bisher vor allem eine Rolle bei der Stabilisierung des Laminin-Kollagen-Netzwerks der Basalmembran angenommen wurde. Milde Phänotypen nach *Knockout* der Gene und Unterschiede in ihren räumlichen und zeitlichen Expressionsmustern führten zur Suche nach weiteren Funktionen. Es konnte gezeigt werden, dass beide Isoformen während der Muskelzelldifferenzierung gegenläufig reguliert werden: Das *entactin-1*-Gen ist vermehrt in proliferierenden, das *entactin-2*-Gen in differenzierenden Zellen exprimiert. Vor Beginn dieser Arbeit war jedoch unklar, ob die Entactine selbst eine negative Rückkopplung auf die jeweils andere Isoform ausüben.

In dieser Arbeit wurden die Expressionsmuster beider Gene in verschiedenen Muskelzelltypen *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dabei konnte *in vitro* die Korrelation zwischen Differenzierungspotential von Skelettmuskelzellen und der Expression der jeweiligen *entactin*-Gene bestätigt und näher charakterisiert werden. Desweiteren konnte eine direkte *Crossregulation* der beiden *entactin*-Gene aufgrund von Untersuchungen an *entactin-1*- und *entactin-2*-überexprimierenden Zelllinien und Studien mit *entactin-1*- und *entactin-2*-spezifischen siRNAs weitgehend ausgeschlossen werden. Untersuchungen zur Zellproliferationsrate nach Repression eines der Gene mittels siRNA-Technik konnten außerdem einen Einfluss beider Gene auf die Proliferationsfähigkeit von Myoblasten zeigen, die die zuvor erhaltenen Daten bestätigten. Die Auswirkungen einer Hemmung der *entactin-1*-Expression auf

verschiedene Differenzierungsmarker lieferte widersprüchliche Ergebnisse, die die Vermutung nahe legen, dass die beiden Entactine nur in bestimmte Aspekte der Muskelzellendifferenzierung eingreifen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *entactin-1* im geschädigten Herz- und Skelettmuskel differentiell exprimiert wird. Tiere mit einer angeborenen Myopathie bzw. mit Prädisposition für eine erworbene Kardiomyopathie wiesen eine erniedrigte *entactin-1*-Expression auf.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse an, dass Entactin-1 und -2 unterschiedliche Funktionen bei der Muskelzellendifferenzierung ausüben und in noch näher zu untersuchender Weise mit dem Differenzierungspotential dieses Zell-Typus assoziiert sind. Es wurden weiterhin Hinweise darauf erhalten, dass Entactin-1 bei reparativen Vorgängen innerhalb der muskulären Basalmembran beteiligt sein könnte.

## Literaturverzeichnis

- Ackley, B. D.; Kang, S. H.; Crew, J. R.; Suh, C.; Jin, Y. und Kramer, J. M. (2003): The basement membrane components nidogen and type XVIII collagen regulate organization of neuromuscular junctions in *Caenorhabditis elegans*, *J Neurosci* 23 [9], Seite 3577-87.
- Arikawa-Hirasawa, E.; Rossi, S. G.; Rotundo, R. L. und Yamada, Y. (2002): Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice, *Nat Neurosci* 5 [2], Seite 119-23.
- Astolfi, A.; De Giovanni, C.; Landuzzi, L.; Nicoletti, G.; Ricci, C.; Croci, S.; Scopece, L.; Nanni, P. und Lollini, P. L. (2001): Identification of new genes related to the myogenic differentiation arrest of human rhabdomyosarcoma cells, *Gene* 274 [1-2], Seite 139-49.
- Aumailley, M.; Battaglia, C.; Mayer, U.; Reinhardt, D.; Nischt, R.; Timpl, R. und Fox, J. W. (1993): Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components, *Kidney Int* 43 [1], Seite 7-12.
- Bader, B. L.; Smyth, N.; Nedbal, S.; Miosge, N.; Baranowsky, A.; Mokkalapati, S.; Murshed, M. und Nischt, R. (2005): Compound genetic ablation of nidogen 1 and 2 causes basement membrane defects and perinatal lethality in mice, *Mol Cell Biol* 25 [15], Seite 6846-56.
- Baramova, E. N.; Shannon, J. D.; Bjarnason, J. B. und Fox, J. W. (1989): Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases, *Arch Biochem Biophys* 275 [1], Seite 63-71.
- Barr, F. G.; Galili, N.; Holick, J.; Biegel, J. A.; Rovera, G. und Emanuel, B. S. (1993): Rearrangement of the PAX3 paired box gene in the paediatric solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma, *Nat Genet* 3 [2], Seite 113-7.
- Besnard-Guerin, C.; Newsham, I.; Winqvist, R. und Cavenee, W. K. (1996): A common region of loss of heterozygosity in Wilms' tumor and embryonal rhabdomyosarcoma distal to the D11S988 locus on chromosome 11p15.5, *Hum Genet* 97 [2], Seite 163-70.

- Black, Adrian R.; Black, Jennifer D. und Azizkhan-Clifford, Jane (2001): Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer, *Journal of Cellular Physiology* 188 [2], Seite 143-160.
- Böse, Kerstin (2005): Funktionale Charakterisierung von Nidogen anhand gewebespezifischer Entwicklungsvorgänge, Inaugural-Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität zu Köln, Köln.
- Bulfield, G.; Siller, W. G.; Wight, P. A. und Moore, K. J. (1984): X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse, *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 [4], Seite 1189-92.
- Busse, M.; Schwarzburger, M.; Berger, F.; Hacker, C. und Munz, B. (2007): Strong induction of the Tis11B gene in myogenic differentiation, *Eur J Cell Biol.*
- Cabane, C.; Englaro, W.; Yeow, K.; Ragno, M. und Derijard, B. (2003): Regulation of C2C12 myogenic terminal differentiation by MKK3/p38alpha pathway, *Am J Physiol Cell Physiol* 284 [3], Seite C658-66.
- Chakravarti, S.; Tam, M. F. und Chung, A. E. (1990): The basement membrane glycoprotein entactin promotes cell attachment and binds calcium ions, *J Biol Chem* 265 [18], Seite 10597-603.
- Cheung, Caroline; Luo, Honglin; Yanagawa, Bobby ; Leong, Hon Sing ; Samarasekera, Dinesh ; Lai, John C.K. ; Suarez, Agripina ; Zhang, Jingchun und McManus, Bruce M. (2006): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis, *Cardiovascular Pathology* 15 [2], Seite 63-74.
- Chiu, A. Y. und Ko, J. (1994): A novel epitope of entactin is present at the mammalian neuromuscular junction, *J Neurosci* 14 [5 Pt 1], Seite 2809-17.
- Chu, S. und Ferro, T. J. (2005): Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation, *Gene* 348, Seite 1-11.

- Chung, A. E.; Dong, L. J.; Wu, C. und Durkin, M. E. (1993): Biological functions of entactin, *Kidney Int* 43 [1], Seite 13-9.
- Chung, A. E.; Freeman, I. L. und Braginski, J. E. (1977): A novel extracellular membrane elaborated by a mouse embryonal carcinoma-derived cell line, *Biochem Biophys Res Commun* 79 [3], Seite 859-68.
- Claycomb, W. C.; Lanson, N. A., Jr.; Stallworth, B. S.; Egeland, D. B.; Delcarpio, J. B.; Bahinski, A. und Izzo, N. J., Jr. (1998): HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [6], Seite 2979-84.
- Cook, Tiffany; Gebelein, Brian und Urrutia, Raul (1999): Sp1 and Its Likes: Biochemical and Functional Predictions for a Growing Family of Zinc Finger Transcription Factors, *Ann NY Acad Sci* 880 [1], Seite 94-102.
- Croci, S.; Landuzzi, L.; Astolfi, A.; Nicoletti, G.; Rosolen, A.; Sartori, F.; Follo, M. Y.; Oliver, N.; De Giovanni, C.; Nanni, P. und Lollini, P. L. (2004): Inhibition of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression decreases the survival and myogenic differentiation of human rhabdomyosarcoma cells, *Cancer Res* 64 [5], Seite 1730-6.
- Cuenda, A. und Cohen, P. (1999): Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis, *J Biol Chem* 274 [7], Seite 4341-6.
- Deconinck, N. und Dan, B. (2007): Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses, *Pediatr Neurol* 36 [1], Seite 1-7.
- Delgado, I.; Huang, X.; Jones, S.; Zhang, L.; Hatcher, R.; Gao, B. und Zhang, P. (2003): Dynamic gene expression during the onset of myoblast differentiation in vitro, *Genomics* 82 [2], Seite 109-21.
- Denli, A. M. und Hannon, G. J. (2003): RNAi: an ever-growing puzzle, *Trends Biochem Sci* 28 [4], Seite 196-201.
- Dong, L.; Chen, Y.; Lewis, M.; Hsieh, J. C.; Reing, J.; Chaillet, J. R.; Howell, C. Y.; Melhem, M.; Inoue, S.; Kuszak, J. R.; DeGeest, K. und Chung, A. E.

- (2002): Neurologic defects and selective disruption of basement membranes in mice lacking entactin-1/nidogen-1, *Lab Invest* 82 [12], Seite 1617-30.
- Dong, L. J.; Hsieh, J. C. und Chung, A. E. (1995): Two distinct cell attachment sites in entactin are revealed by amino acid substitutions and deletion of the RGD sequence in the cysteine-rich epidermal growth factor repeat 2, *J Biol Chem* 270 [26], Seite 15838-43.
- Dörner, Andrea ; Kallwellis-Opara, Angela ; Pauschinger, Matthias; Kühl, Uwe und Schultheiss, Heinz-Peter (2005): Cardiac Autoantibodies in Viral Myocarditis, *Heart Failure Clinics* 1 [3], Seite 333-343.
- d'Ortho, M. P.; Will, H.; Atkinson, S.; Butler, G.; Messent, A.; Gavrilovic, J.; Smith, B.; Timpl, R.; Zardi, L. und Murphy, G. (1997): Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases, *Eur J Biochem* 250 [3], Seite 751-7.
- Durkin, M. E.; Chakravarti, S.; Bartos, B. B.; Liu, S. H.; Friedman, R. L. und Chung, A. E. (1988): Amino acid sequence and domain structure of entactin. Homology with epidermal growth factor precursor and low density lipoprotein receptor, *J Cell Biol* 107 [6 Pt 2], Seite 2749-56.
- Dziadek, M. und Timpl, R. (1985): Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells, *Dev Biol* 111 [2], Seite 372-82.
- Ehlers, Svenja; Landuzzi, Lorena; Lollini, Pier-Luigi und Munz, Barbara (eingereicht zur Veröffentlichung): Rip2 regulate growth and differentiation of normal myoblasts and of rhabdomyosarcoma cells.
- Ekblom, P.; Ekblom, M.; Fecker, L.; Klein, G.; Zhang, H. Y.; Kadoya, Y.; Chu, M. L.; Mayer, U. und Timpl, R. (1994): Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro, *Development* 120 [7], Seite 2003-14.
- El-Badry, O. M.; Minniti, C.; Kohn, E. C.; Houghton, P. J.; Daughaday, W. H. und 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 [7], Seite 325-31.
- Erickson, Anna C. und Couchman, John R. (2000): Still More Complexity in Mammalian Basement Membranes, *J. Histochem. Cytochem.* 48 [10], Seite 1291-1306.
- Ervasti, J. M. (2007): Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy, *Biochim Biophys Acta* 1772 [2], Seite 108-17.
- Ervasti, J. M. und Campbell, K. P. (1993): Dystrophin and the membrane skeleton, *Curr Opin Cell Biol* 5 [1], Seite 82-7.
- Ervasti, J. M. und Campbell, K. P. (1993): A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin, *J Cell Biol* 122 [4], Seite 809-23.
- Foulstone, E.; Prince, S.; Zaccheo, O.; Burns, J. L.; Harper, J.; Jacobs, C.; Church, D. und Hassan, A. B. (2005): Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer, *J Pathol* 205 [2], Seite 145-53.
- Fox, J. W.; Mayer, U.; Nischt, R.; Aumailley, M.; Reinhardt, D.; Wiedemann, H.; Mann, K.; Timpl, R.; Krieg, T.; Engel, J. und et al. (1991): Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV, *Embo J* 10 [11], Seite 3137-46.
- Frederick, T. J.; Min, J.; Altieri, S. C.; Mitchell, N. E. und Wood, T. L. (2007): Synergistic induction of cyclin D1 in oligodendrocyte progenitor cells by IGF-I and FGF-2 requires differential stimulation of multiple signaling pathways, *Glia*.
- Funanage, V. L.; Smith, S. M. und Minnich, M. A. (1992): Entactin promotes adhesion and long-term maintenance of cultured regenerated skeletal myotubes, *J Cell Physiol* 150 [2], Seite 251-7.
- Galili, N.; Davis, R. J.; Fredericks, W. J.; Mukhopadhyay, S.; Rauscher, F. J., 3rd; Emanuel, B. S.; Rovera, G. und Barr, F. G. (1993): Fusion of a fork

head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma, *Nat Genet* 5 [3], Seite 230-5.

Gartel, A. L. und Radhakrishnan, S. K. (2005): Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences, *Cancer Res* 65 [10], Seite 3980-5.

Gersdorff, N.; Kohfeldt, E.; Sasaki, T.; Timpl, R. und Miosge, N. (2005): Laminin gamma3 chain binds to nidogen and is located in murine basement membranes, *J Biol Chem* 280 [23], Seite 22146-53.

Gersdorff, N.; Muller, M.; Otto, S.; Poschadel, R.; Hubner, S. und Miosge, N. (2005): Basement membrane composition in the early mouse embryo day 7, *Dev Dyn* 233 [3], Seite 1140-8.

Godfrey, E. W. und Gradall, K. S. (1998): Basal lamina molecules are concentrated in myogenic regions of the mouse limb bud, *Anat Embryol (Berl)* 198 [6], Seite 481-6.

Greenberg, S. A.; Sanoudou, D.; Haslett, J. N.; Kohane, I. S.; Kunkel, L. M.; Beggs, A. H. und Amato, A. A. (2002): Molecular profiles of inflammatory myopathies, *Neurology* 59 [8], Seite 1170-82.

Gresham, H. D.; Goodwin, J. L.; Allen, P. M.; Anderson, D. C. und Brown, E. J. (1989): A novel member of the integrin receptor family mediates Arg-Gly-Asp-stimulated neutrophil phagocytosis, *J Cell Biol* 108 [5], Seite 1935-43.

Gresham, H. D.; Graham, I. L.; Griffin, G. L.; Hsieh, J. C.; Dong, L. J.; Chung, A. E. und Senior, R. M. (1996): Domain-specific interactions between entactin and neutrophil integrins. G2 domain ligation of integrin alpha3beta1 and E domain ligation of the leukocyte response integrin signal for different responses, *J Biol Chem* 271 [48], Seite 30587-94.

Halevy, O. und Cantley, L. C. (2004): Differential regulation of the phosphoinositide 3-kinase and MAP kinase pathways by hepatocyte growth factor vs. insulin-like growth factor-I in myogenic cells, *Exp Cell Res* 297 [1], Seite 224-34.

- Harbour, J. W. und Dean, D. C. (2000): Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis, *Nat Cell Biol* 2 [4], Seite E65-7.
- Heymans, Stephane; Pauschinger, Matthias; De Palma, Armando; Kallwellis-Opara, Angela; Rutschow, Susanne; Swinnen, Melissa; Vanhoutte, Davy; Gao, Fangye; Torpai, Raimund; Baker, Andrew H.; Padalko, Elisabeth; Neyts, Johan; Schultheiss, Heinz-Peter; Van de Werf, Frans; Carmeliet, Peter und Pinto, Yigal M. (2006): Inhibition of Urokinase-Type Plasminogen Activator or Matrix Metalloproteinases Prevents Cardiac Injury and Dysfunction During Viral Myocarditis, *Circulation* 114 [6], Seite 565-573.
- Hohenester, E. und Engel, J. (2002): Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins, *Matrix Biol* 21 [2], Seite 115-28.
- Hopf, M.; Gohring, W.; Kohfeldt, E.; Yamada, Y. und Timpl, R. (1999): Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin, *Eur J Biochem* 259 [3], Seite 917-25.
- Hsu, M. K.; Qiao, L.; Ho, V.; Zhang, B. H.; Zhang, H.; Teoh, N.; Dent, P. und Farrell, G. C. (2006): Ethanol reduces p38 kinase activation and cyclin D1 protein expression after partial hepatectomy in rats, *J Hepatol* 44 [2], Seite 375-82.
- Hu, J.; Van den Steen, P. E.; Sang, Q. X. und Opdenakker, G. (2007): Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases, *Nat Rev Drug Discov* 6 [6], Seite 480-98.
- Iozzo, R. V. (2005): Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 [8], Seite 646-56.
- Junquera, Luiz C.; Carneiro, J. und Schiebler, Theodor H. (1996): *Histologie* 4, Springer Lehrbuch, Springer.
- Kadoya, Y.; Salmivirta, K.; Talts, J. F.; Kadoya, K.; Mayer, U.; Timpl, R. und Ekblom, P. (1997): Importance of nidogen binding to laminin gamma1 for branching epithelial morphogenesis of the submandibular gland, *Development* 124 [3], Seite 683-91.

- Kallwellis-Opara, A.; Dorner, A.; Poller, W. C.; Noutsias, M.; Kuhl, U.; Schultheiss, H. P. und Pauschinger, M. (2007): Autoimmunological features in inflammatory cardiomyopathy, *Clin Res Cardiol*.
- Kassiri, Z. und Khokha, R. (2005): Myocardial extra-cellular matrix and its regulation by metalloproteinases and their inhibitors, *Thromb Haemost* 93 [2], Seite 212-9.
- Kavurma, M. M. und Khachigian, L. M. (2003): Sp1 inhibits proliferation and induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by repressing p21WAF1/Cip1 transcription and cyclin D1-Cdk4-p21WAF1/Cip1 complex formation, *J Biol Chem* 278 [35], Seite 32537-43.
- Kavurma, M. M. und Khachigian, L. M. (2004): Vascular smooth muscle cell-specific regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/Cip1) transcription by Sp1 is mediated via distinct cis-acting positive and negative regulatory elements in the proximal p21(WAF1/Cip1) promoter, *J Cell Biochem* 93 [5], Seite 904-16.
- Kim, K. S.; Hufnagel, G.; Chapman, N. M. und Tracy, S. (2001): The group B coxsackieviruses and myocarditis, *Rev Med Virol* 11 [6], Seite 355-68.
- Kim, S. und Wadsworth, W. G. (2000): Positioning of longitudinal nerves in *C. elegans* by nidogen, *Science* 288 [5463], Seite 150-4.
- Kimura, N.; Toyoshima, T.; Kojima, T. und Shimane, M. (1998): Entactin-2: a new member of basement membrane protein with high homology to entactin/nidogen, *Exp Cell Res* 241 [1], Seite 36-45.
- Klietsch, R.; Ervasti, J. M.; Arnold, W.; Campbell, K. P. und Jorgensen, A. O. (1993): Dystrophin-glycoprotein complex and laminin colocalize to the sarcolemma and transverse tubules of cardiac muscle, *Circ Res* 72 [2], Seite 349-60.
- Klingel, K.; Stephan, S.; Sauter, M.; Zell, R.; McManus, B. M.; Bultmann, B. und Kandolf, R. (1996): Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets, *J Virol* 70 [12], Seite 8888-95.

- Kohfeldt, E.; Sasaki, T.; Gohring, W. und Timpl, R. (1998): Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties, *J Mol Biol* 282 [1], Seite 99-109.
- Kohling, R.; Nischt, R.; Vasudevan, A.; Ho, M.; Weiergraber, M.; Schneider, T. und Smyth, N. (2006): Nidogen and nidogen-associated basement membrane proteins and neuronal plasticity, *Neurodegener Dis* 3 [1-2], Seite 56-61.
- Köpf-Maier, Petra und Merker, Hans-Joachim (1989): Atlas der Elektronenmikroskopie. Zellen, Gewebe, Organe, Blackwell Wissenschaft, Berlin.
- Larrain, J.; Alvarez, J.; Hassell, J. R. und Brandan, E. (1997): Expression of perlecan, a proteoglycan that binds myogenic inhibitory basic fibroblast growth factor, is down regulated during skeletal muscle differentiation, *Exp Cell Res* 234 [2], Seite 405-12.
- Li, H. G.; Wang, Q.; Li, H. M.; Kumar, S.; Parker, C.; Slevin, M. und Kumar, P. (2007): PAX3 and PAX3-FKHR promote rhabdomyosarcoma cell survival through downregulation of PTEN, *Cancer Lett.*
- Li, X.; Talts, U.; Talts, J. F.; Arman, E.; Ekblom, P. und Lonai, P. (2001): Akt/PKB regulates laminin and collagen IV isotypes of the basement membrane, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [25], Seite 14416-21.
- Li, Y.; Jiang, B.; Ensign, W. Y.; Vogt, P. K. und Han, J. (2000): Myogenic differentiation requires signalling through both phosphatidylinositol 3-kinase and p38 MAP kinase, *Cell Signal* 12 [11-12], Seite 751-7.
- Löffler, Georg; Petrides, Petro E. und Heinrich, P. C. (2006): Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, Springer Lehrbuch, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Lollini, P. L.; De Giovanni, C.; Landuzzi, L.; Nicoletti, G.; Scotlandi, K. und Nanni, P. (1991): Reduced metastatic ability of in vitro differentiated human rhabdomyosarcoma cells, *Invasion Metastasis* 11 [2], Seite 116-24.

- Malemud, C. J. (2006): Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview, *Front Biosci* 11, Seite 1696-701.
- Mann, K.; Deutzmann, R.; Aumailley, M.; Timpl, R.; Raimondi, L.; Yamada, Y.; Pan, T. C.; Conway, D. und Chu, M. L. (1989): Amino acid sequence of mouse nidogen, a multidomain basement membrane protein with binding activity for laminin, collagen IV and cells, *Embo J* 8 [1], Seite 65-72.
- Maurer, P.; Hohenester, E. und Engel, J. (1996): Extracellular calcium-binding proteins, *Curr Opin Cell Biol* 8 [5], Seite 609-17.
- Merlino, G. und Helman, L. J. (1999): Rhabdomyosarcoma--working out the pathways, *Oncogene* 18 [38], Seite 5340-8.
- Meylan, E. und Tschopp, J. (2005): The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress, *Trends Biochem Sci* 30 [3], Seite 151-9.
- Miner, J. H.; Li, C.; Mudd, J. L.; Go, G. und Sutherland, A. E. (2004): Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation, *Development* 131 [10], Seite 2247-56.
- Minniti, C. P.; Tsokos, M.; Newton, W. A., Jr. und Helman, L. J. (1994): Specific expression of insulin-like growth factor-II in rhabdomyosarcoma tumor cells, *Am J Clin Pathol* 101 [2], Seite 198-203.
- Miosge, N.; Holzhausen, S.; Zelent, C.; Sprysch, P. und Herken, R. (2001): Nidogen-1 and nidogen-2 are found in basement membranes during human embryonic development, *Histochem J* 33 [9-10], Seite 523-30.
- Miosge, N.; Sasaki, T. und Timpl, R. (2002): Evidence of nidogen-2 compensation for nidogen-1 deficiency in transgenic mice, *Matrix Biol* 21 [7], Seite 611-21.
- Moran, J. L.; Li, Y.; Hill, A. A.; Mounts, W. M. und Miller, C. P. (2002): Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling, *Physiol Genomics* 10 [2], Seite 103-11.

- Munz, B.; Hildt, E.; Springer, M. L. und Blau, H. M. (2002): RIP2, a checkpoint in myogenic differentiation, *Mol Cell Biol* 22 [16], Seite 5879-86.
- Murshed, M.; Smyth, N.; Miosge, N.; Karolat, J.; Krieg, T.; Paulsson, M. und Nischt, R. (2000): The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation, *Mol Cell Biol* 20 [18], Seite 7007-12.
- Nagayoshi, T.; Sanborn, D.; Hickok, N. J.; Olsen, D. R.; Fazio, M. J.; Chu, M. L.; Knowlton, R.; Mann, K.; Deutzmann, R.; Timpl, R. und et al. (1989): Human nidogen: complete amino acid sequence and structural domains deduced from cDNAs, and evidence for polymorphism of the gene, *DNA* 8 [8], Seite 581-94.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information (2007): Nucleotide Database, [www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed), 2007, Internet Database
- Neu, R.; Adams, S. und Munz, B. (2006): Differential expression of entactin-1/nidogen-1 and entactin-2/nidogen-2 in myogenic differentiation, *Differentiation* 74 [9-10], Seite 573-82.
- Neu, Ricarda (2006): Die Rolle von Entactin-1 und -2 bei der Skelettmuskelzellendifferenzierung, Medizinische Fakultät, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin.
- Nicosia, R. F.; Bonanno, E.; Smith, M. und Yurchenco, P. (1994): Modulation of angiogenesis in vitro by laminin-entactin complex, *Dev Biol* 164 [1], Seite 197-206.
- Ortega, N. und Werb, Z. (2002): New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens, *J Cell Sci* 115 [Pt 22], Seite 4201-14.
- Palmer, Claire M. und Rudnicki, Michael A. (2002): The myogenic regulatory factors, Sassoon, David A., *Stem cells and cell signalling in skeletal myogenesis* 11, 1. Auflage, Seite 1-32, Elsevier, Amsterdam.
- Parham, D. M. (2001): Pathologic classification of rhabdomyosarcomas and correlations with molecular studies, *Mod Pathol* 14 [5], Seite 506-14.

- Paulsson, M. (1988): The role of Ca<sup>2+</sup> binding in the self-aggregation of laminin-nidogen complexes, *J Biol Chem* 263 [11], Seite 5425-30.
- Pauschinger, M.; Chandrasekharan, K. und Schultheiss, H. P. (2004): Myocardial remodeling in viral heart disease: possible interactions between inflammatory mediators and MMP-TIMP system, *Heart Fail Rev* 9 [1], Seite 21-31.
- Peng, H. B.; Ali, A. A.; Daggett, D. F.; Rauvala, H.; Hassell, J. R. und Smalheiser, N. R. (1998): The relationship between perlecan and dystroglycan and its implication in the formation of the neuromuscular junction, *Cell Adhes Commun* 5 [6], Seite 475-89.
- Rutschow, S.; Li, J.; Schultheiss, H. P. und Pauschinger, M. (2006): Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease, *Cardiovasc Res* 69 [3], Seite 646-56.
- Sabourin, L. A. und Rudnicki, M. A. (2000): The molecular regulation of myogenesis, *Clin Genet* 57 [1], Seite 16-25.
- Salmivirta, K.; Talts, J. F.; Olsson, M.; Sasaki, T.; Timpl, R. und Ekblom, P. (2002): Binding of mouse nidogen-2 to basement membrane components and cells and its expression in embryonic and adult tissues suggest complementary functions of the two nidogens, *Exp Cell Res* 279 [2], Seite 188-201.
- Sandy, JR (1998): Signal transduction, *British Journal of Orthodontics* 25 [4], Seite 269-274.
- Santiago, Fernando S.; Ishii, Hideto; Shafi, Shahida; Khurana, Rohit; Kanellakis, Peter; Bhindi, Ravinay; Ramirez, Manfred J.; Bobik, Alexander; Martin, John F.; Chesterman, Colin N.; Zachary, Ian C. und Khachigian, Levon M. (2007): Yin Yang-1 Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Growth and Intimal Thickening by Repressing p21WAF1/Cip1 Transcription and p21WAF1/Cip1-Cdk4-Cyclin D1 Assembly, *Circulation Research*.

- Sasaki, T.; Gohring, W.; Miosge, N.; Abrams, W. R.; Rosenbloom, J. und Timpl, R. (1999): Tropoelastin binding to fibulins, nidogen-2 and other extracellular matrix proteins, FEBS Lett 460 [2], Seite 280-4.
- Schneider, M.; Khalil, A. A.; Poulton, J.; Castillejo-Lopez, C.; Egger-Adam, D.; Wodarz, A.; Deng, W. M. und Baumgartner, S. (2006): Perlecan and Dystroglycan act at the basal side of the Drosophila follicular epithelium to maintain epithelial organization, Development 133 [19], Seite 3805-15.
- Schroen, D. J. und Cheung, H. T. (1996): Interaction of mouse thymocytes and a thymocyte-like cell line with the ECM glycoprotein entactin, Cell Immunol 167 [1], Seite 141-9.
- Schultheiss, H. P. und Kuhl, U. (2006): Overview on chronic viral cardiomyopathy/chronic myocarditis, Ernst Schering Res Found Workshop [55], Seite 3-18.
- Schwarzburger, Max (2007): Expressionsmuster der *tis11*-Familie von *primary response*-Genen in der quergestreiften Muskulatur, Medizinische Fakultät, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin.
- Schymeinsky, J.; Nedbal, S.; Miosge, N.; Poschl, E.; Rao, C.; Beier, D. R.; Skarnes, W. C.; Timpl, R. und Bader, B. L. (2002): Gene structure and functional analysis of the mouse nidogen-2 gene: nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice, Mol Cell Biol 22 [19], Seite 6820-30.
- Scrabble, H.; Witte, D.; Shimada, H.; Seemayer, T.; Sheng, W. W.; Soukup, S.; Koufos, A.; Houghton, P.; Lampkin, B. und Cavenee, W. (1989): Molecular differential pathology of rhabdomyosarcoma, Genes Chromosomes Cancer 1 [1], Seite 23-35.
- Senior, R. M.; Gresham, H. D.; Griffin, G. L.; Brown, E. J. und Chung, A. E. (1992): Entactin stimulates neutrophil adhesion and chemotaxis through interactions between its Arg-Gly-Asp (RGD) domain and the leukocyte response integrin, J Clin Invest 90 [6], Seite 2251-7.
- Sherr, C. J. und Roberts, J. M. (2004): Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases, Genes Dev 18 [22], Seite 2699-711.

- Tam, P. E. (2006): Coxsackievirus myocarditis: interplay between virus and host in the pathogenesis of heart disease, *Viral Immunol* 19 [2], Seite 133-46.
- Tam, P. E. und Messner, R. P. (1996): Genetic determinants of susceptibility to coxsackievirus B1-induced chronic inflammatory myopathy: effects of host background and major histocompatibility complex genes, *J Lab Clin Med* 128 [3], Seite 279-89.
- Tam, P. E.; Weber-Sanders, M. L. und Messner, R. P. (2003): Multiple viral determinants mediate myopathogenicity in coxsackievirus B1-induced chronic inflammatory myopathy, *J Virol* 77 [21], Seite 11849-54.
- Timpl, R. und Dziadek, M. (1986): Structure, development, and molecular pathology of basement membranes, *Int Rev Exp Pathol* 29, Seite 1-112.
- Timpl, R.; Dziadek, M.; Fujiwara, S.; Nowack, H. und Wick, G. (1983): Nidogen: a new, self-aggregating basement membrane protein, *Eur J Biochem* 137 [3], Seite 455-65.
- Timpl, R.; Fujiwara, S.; Dziadek, M.; Aumailley, M.; Weber, S. und Engel, J. (1984): Laminin, proteoglycan, nidogen and collagen IV: structural models and molecular interactions, *Ciba Found Symp* 108, Seite 25-43.
- Timpl, R.; Paulsson, M.; Dziadek, M. und Fujiwara, S. (1987): Basement membranes, *Methods Enzymol* 145, Seite 363-91.
- Tkatchenko, A. V.; Le Cam, G.; Leger, J. J. und Dechesne, C. A. (2000): Large-scale analysis of differential gene expression in the hindlimb muscles and diaphragm of mdx mouse, *Biochim Biophys Acta* 1500 [1], Seite 17-30.
- Tomczak, K. K.; Marinescu, V. D.; Ramoni, M. F.; Sanoudou, D.; Montanaro, F.; Han, M.; Kunkel, L. M.; Kohane, I. S. und Beggs, A. H. (2004): Expression profiling and identification of novel genes involved in myogenic differentiation, *Faseb J* 18 [2], Seite 403-5.
- Towbin, J. A. (2006): Inflammatory cardiomyopathy: there is a specific matrix destruction in the course of the disease, *Ernst Schering Res Found Workshop* [55], Seite 219-50.

- Tsuboi, N.; Yoshida, H.; Kawamura, T.; Furukawa, Y.; Hosoya, T. und Yamada, H. (2000): Three-dimensional matrix suppresses E2F-controlled gene expression in glomerular mesangial cells, *Kidney Int* 57 [4], Seite 1581-9.
- Tureckova, J.; Wilson, E. M.; Cappalonga, J. L. und Rotwein, P. (2001): Insulin-like growth factor-mediated muscle differentiation: collaboration between phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-signaling pathways and myogenin, *J Biol Chem* 276 [42], Seite 39264-70.
- Visser, M.; Sijmons, C.; Bras, J.; Arceci, R. J.; Godfried, M.; Valentijn, L. J.; Voute, P. A. und Baas, F. (1997): Allelotype of pediatric rhabdomyosarcoma, *Oncogene* 15 [11], Seite 1309-14.
- Wang, W.; Kumar, P.; Epstein, J.; Helman, L.; Moore, J. V. und Kumar, S. (1998): Insulin-like growth factor II and PAX3-FKHR cooperate in the oncogenesis of rhabdomyosarcoma, *Cancer Res* 58 [19], Seite 4426-33.
- Willem, M.; Miosge, N.; Halfter, W.; Smyth, N.; Jannetti, I.; Burghart, E.; Timpl, R. und Mayer, U. (2002): Specific ablation of the nidogen-binding site in the laminin gamma1 chain interferes with kidney and lung development, *Development* 129 [11], Seite 2711-22.
- Wilson, E. M.; Tureckova, J. und Rotwein, P. (2004): Permissive roles of phosphatidyl inositol 3-kinase and Akt in skeletal myocyte maturation, *Mol Biol Cell* 15 [2], Seite 497-505.
- Wu, C. und Chung, A. E. (1991): Potential role of entactin in hemostasis. Specific interaction of entactin with fibrinogen A alpha and B beta chains, *J Biol Chem* 266 [28], Seite 18802-7.
- Wu, C.; Reing, J. und Chung, A. E. (1991): Entactin forms a complex with fibronectin and co-localizes in the extracellular matrix of the embryonal carcinoma-derived 4CQ cell line, *Biochem Biophys Res Commun* 178 [3], Seite 1219-25.
- Yamaguchi, H.; Ishii, E.; Tashiro, K. und Miyazaki, S. (1998): Role of umbilical vein endothelial cells in hematopoiesis, *Leuk Lymphoma* 31 [1-2], Seite 61-9.

- Yelian, F. D.; Edgeworth, N. A.; Dong, L. J.; Chung, A. E. und Armant, D. R. (1993): Recombinant entactin promotes mouse primary trophoblast cell adhesion and migration through the Arg-Gly-Asp (RGD) recognition sequence, *J Cell Biol* 121 [4], Seite 923-9.
- Yurchenco, P. D. und Schittny, J. C. (1990): Molecular architecture of basement membranes, *Faseb J* 4 [6], Seite 1577-90.
- Yurchenco, P. D.; Tsilibary, E. C.; Charonis, A. S. und Furthmayr, H. (1985): Laminin polymerization in vitro. Evidence for a two-step assembly with domain specificity, *J Biol Chem* 260 [12], Seite 7636-44.
- Zedlacher, M.; Schmoll, M.; Zimmermann, K.; Horstkorte, O. und Nischt, R. (1999): Differential regulation of the human nidogen gene promoter region by a novel cell-type-specific silencer element, *Biochem J* 338 ( Pt 2), Seite 343-50.
- Zhan, S.; Shapiro, D. N. und Helman, L. J. (1994): Activation of an imprinted allele of the insulin-like growth factor II gene implicated in rhabdomyosarcoma, *J Clin Invest* 94 [1], Seite 445-8.

## Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die exzellente Betreuung durch Prof. Dr. Barbara Munz ermöglicht; allen, die mir im Großen und Kleinen geholfen haben, möchte ich hiermit danken.

Meine Dankbarkeit gilt vor allem meiner Freundin Susanne Slotosch, die an guten Tagen stundenlang meinen Gedanken zur Genregulation folgen konnte und an schlechten Tagen dafür sorgte, dass ich dabei blieb und immer für mich da ist.

Frau Prof. Munz möchte ich für die Möglichkeit danken, dieses interessante Thema und seine Methodik kennengelernt zu haben: sie hat mir gezeigt, wieviel Spaß Wissenschaft machen kann.

Meiner Arbeitsgruppe möchte ich für das tolle Klima und all die Hilfe im allgemeinen und speziellen danken:

Dr. Christine Hacker: für die Revolutionierung der *Northern Blot*-Technik

Dr. Felicitas Berger: für phantastische Einblicke in die Molekularbiologie und die Wiederentdeckung der Kohlenhydrate

Max Schwarzburger: weil er so ein Zugpferd war

Melanie Busse: für viele geduldige Erklärungen und die Patenschaft der Zellen

Renate Noske-Reimers: für ihre unermüdliche Fürsorge um unsere Gruppe

Stephanie Adams: für zahllose „Päuschen“ draussen vorm Wein und dass sie für jedes Problem eine Lösung wusste

Svenja Ehlers: für professionelle Beratung in Haustierangelegenheiten und ihr äußerst nützliches Laborbuch

Tobias Mück: für exzellenten Kaffee und seine unglaubliche Zuverlässigkeit und Ricarda Neu für die Grundlagen, die sie geschaffen hat...

Frau Gabriela Beyer möchte ich danken für die Einführung in die Zellkultur und die Überlassung der HUVEC's.

Frau PD Dr. Karin Klingel danke ich ganz besonders für die Überlassung der Cocksackie-Mäuse sowie Frau Prof. Dr. Petra Knaus für ihre Hilfe bei den Myoblasten.

Unserem Nachbarn Prof. Dr. Karl Kirsch möchte ich für die anregenden Gespräche über die Raumfahrt und die neuesten Erkenntnisse dazu danken.

Außerdem vielen Dank an Luzie Lenzner für viele Stunden des wissenschaftlichen Austausches, viele Jahre der Freundschaft sowie an alle meine anderen Freunde...

... und schließlich danke ich meiner Familie, die mich in all meinen Unternehmungen immer unterstützt hat.

## Erklärung

„Ich, Pinar Akman, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Basalmembran-Proteine Entactin-1 und -2: Funktionsanalyse in der quergestreiften Muskulatur“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift



## Lebenslauf von Pinar Akman

21.09.1976	geboren in Berlin
1983 – 1987	Kronach Grundschule, Berlin
1987 – 1996	Gymnasium Steglitz, Berlin
1996 – 1997	Technische Universität Berlin, Studium der Elektrotechnik
1997 – 2002	Freie Universität Berlin, Studium der Zahnmedizin
Januar 2003	Approbation als Zahnärztin
Mai 2003 – Oktober 2003	Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis T. Melzer, Berlin
November 2003 – Dezember 2003	Famulatur für das Zahnärztliche Hilfsprojekt Brasilien in Recife, Brasilien
Februar 2004 – Februar 2005	Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis S. Marggraf, Berlin
März 2005 – Dezember 2005	Zahnärztin im öffentlichen Dienst in Lakselv, Norwegen
Juni 2006 – Dezember 2006	Assistenz Zahnärztin in der Praxis für Oralchirurgie Dr. M. Nitzschke, Berlin
April 2006 – Mai 2007	Gastwissenschaftlerin in der Arbeitsgruppe Molekularbiologie bei Prof. Dr. Munz im physiologischen Institut der Charité, Berlin
seit Juni 2007	Zahnärztin in der Avondale Dental Clinic in Grange-over-Sands, Grossbritannien