

I INHALTSVERZEICHNIS

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

INHALTSVERZEICHNIS

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

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

INHALTSVERZEICHNIS

4.4	ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER <i>rip2</i> -GENREGULATION IN MUSKELZELLEN UND DIE AUSWIRKUNGEN AUF DIE MYOGENESE	82
5	ZUSAMMENFASSUNG	85
6	SUMMARY	86
7	LITERATURVERZEICHNIS	87
	EIGENE PUBLIKATIONEN.....	97
	DANKSAGUNG.....	98
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	99