

## INHALT

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>I</b>   | <b>ABKÜRZUNGEN .....</b>   | <b>I</b>  |
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Myogenese.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.2</b> | <b>Nascent polypeptide associated complex (NAC) .....</b>                | <b>5</b>  |
| 1.2.1      | $\alpha/\beta$ Nac-Komplex .....   | 7         |
| 1.2.2      | skNAC .....  | 9         |
| <b>1.3</b> | <b>In dieser Arbeit verwendete myogene Differenzierungsmarker .....</b>  | <b>13</b> |
| 1.3.1      | Myogenin .....   | 14        |
| 1.3.2      | p21 .....  | 14        |
| 1.3.3      | Myosin-Heavy-Chain .....   | 14        |
| 1.3.4      | Desmin .....   | 16        |
| 1.3.5      | Caveolin-3 .....   | 17        |
| 1.3.6      | Entactin-1 .....   | 17        |
| 1.3.7      | $\alpha$ -Actinin .....  | 17        |
| <b>1.4</b> | <b>Coxsackieviren- induzierte inflammatorische Kardiomyopathie .....</b> | <b>18</b> |
| <b>1.5</b> | <b>Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....</b>                    | <b>21</b> |
| <b>2</b>   | <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>                                       | <b>22</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Material.....</b>   | <b>22</b> |
| 2.1.1      | Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....                              | 22        |
| 2.1.2      | Enzyme.....  | 25        |
| 2.1.3      | Antikörper .....   | 25        |
| 2.1.3.1    | Primäre Antikörper .....   | 25        |
| 2.1.3.2    | Sekundäre Antikörper.....  | 25        |
| 2.1.4      | Oligodesoxynukleotide.....   | 25        |
| 2.1.5      | Accession number der MyHC-Sequenz .....                                  | 26        |
| 2.1.6      | Oligonukleotide (siRNAs).....  | 26        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.1.7      | Vektor.....  | 26        |
| 2.1.8      | Kommerzielle „Kits“.....   | 26        |
| 2.1.9      | Histologische Schnitte.....  | 27        |
| 2.1.10     | Bakterienstämme.....   | 27        |
| 2.1.11     | Eukaryontische Zelllinien .....  | 27        |
| 2.1.12     | RNA .....  | 27        |
| 2.1.13     | Wasser.....  | 27        |
| 2.1.14     | Standardpuffer und Lösungen .....  | 28        |
| <b>2.2</b> | <b>Methoden .....</b>  | <b>28</b> |
| 2.2.1      | Zellbiologische Methoden.....  | 28        |
| 2.2.1.1    | <i>Kultivierung und Kryokonservierung eukaryontischer Zellen .....</i>       | <i>28</i> |
| 2.2.1.2    | <i>Induktion der Differenzierung der C2C12-Zellen.....</i>                   | <i>30</i> |
| 2.2.1.3    | <i>Induktion der Differenzierung der H9c2-Zellen.....</i>                    | <i>30</i> |
| 2.2.1.4    | <i>Transfektion der C2C12-Zellen mit siRNA .....</i>                         | <i>31</i> |
| 2.2.2      | Mikrobiologische Methoden .....  | 31        |
| 2.2.2.1    | <i>Anzucht und Aufbewahrung von E.coli-Stämmen .....</i>                     | <i>31</i> |
| 2.2.2.2    | <i>Herstellung transformationskompetenter E.coli-Bakterien .....</i>         | <i>32</i> |
| 2.2.2.3    | <i>Transformation von E.coli-Zellen mit Plasmid-DNA.....</i>                 | <i>32</i> |
| 2.2.3      | Molekularbiologische Methoden.....   | 33        |
| 2.2.3.1    | <i>DNA-Isolierung aus transformierten E.coli-Bakterien .....</i>             | <i>33</i> |
| 2.2.3.2    | <i>In vitro-Reaktionen an DNA.....</i>                                       | <i>33</i> |
| 2.2.3.3    | <i>Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....</i>                      | <i>35</i> |
| 2.2.3.4    | <i>Spaltung und Reinigung von DNA und Vektor.....</i>                        | <i>36</i> |
| 2.2.3.5    | <i>Ligation .....</i>  | <i>36</i> |
| 2.2.3.6    | <i>Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren.....</i>                          | <i>37</i> |
| 2.2.3.7    | <i>RNA-Techniken.....</i>  | <i>37</i> |
| 2.2.4      | Proteinbiochemische Methoden .....   | 41        |
| 2.2.4.1    | <i>Herstellung von Proteinlysaten.....</i>                                   | <i>41</i> |
| 2.2.4.2    | <i>Proteinkonzentrationsbestimmung.....</i>                                  | <i>41</i> |
| 2.2.4.3    | <i>Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....</i> | <i>41</i> |
| 2.2.4.4    | <i>Immunologische Methoden .....</i>   | <i>43</i> |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>3</b>   | <b>ERGEBNISSE.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Immunhistochemische Lokalisation des skNAC-Proteins im murinen Herzen unter physiologischen Bedingungen und bei der CVB3-induzierten inflammatorischen Kardiomyopathie .....</b>       | <b>48</b> |
| 3.1.1      | Optimierung der Antikörperkonzentration.....  | 48        |
| 3.1.2      | Färbung der infizierten Mäuseherzen.....  | 52        |
| <b>3.2</b> | <b>Hemmung der skNAC-Expression in Skelettmuskelzellen mittels spezifischer siRNAs und Untersuchung des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens der transfizierten Zellen.....</b> | <b>61</b> |
| 3.2.1      | Transfektion von C2C12-Zellen mit skNAC-spezifischer siRNA.....   | 61        |
| 3.2.1.1    | Optimierung der Transfektionsbedingungen.....   | 61        |
| 3.2.1.2    | Untersuchung des Transfektionserfolgs auf RNA-Ebene im zeitlichen Verlauf.....  | 64        |
| 3.2.1.3    | Untersuchung des Transfektionserfolgs auf Proteinebene.....   | 67        |
| 3.2.1.4    | Histologische Untersuchung der skNAC-siRNA-transfizierten Zellen.....   | 68        |
| 3.2.1.5    | Analyse des Proliferationsverhaltens der transfizierten Zellen in Proliferationsmedium .....  | 68        |
| 3.2.1.6    | Analyse des Proliferationsverhaltens der transfizierten Zellen in Differenzierungsmedium.....   | 70        |
| 3.2.2      | Analyse des Differenzierungsverhaltens der transfizierten Zellen .....  | 71        |
| 3.2.2.1    | Untersuchung des Einflusses der Hemmung der skNAC-Expression auf die MyHC-1-Expression auf RNA-Ebene.....   | 71        |
| 3.2.3      | Untersuchung weiterer Differenzierungsmarker .....  | 76        |
| 3.2.3.1    | Untersuchung des Einflusses der Hemmung der skNAC-Expression auf die MyHC-Expression auf Protein-Ebene .....  | 76        |
| 3.2.3.2    | Untersuchung des Einflusses der Hemmung der skNAC-Expression auf die Myogenin-Expression auf RNA-Ebene .....  | 78        |
| 3.2.4      | Untersuchung weiterer Differenzierungsmarker auf Proteinebene .....   | 79        |
| 3.2.4.1    | Desmin.....   | 79        |
| 3.2.4.2    | P21 .....   | 80        |
| 3.2.4.3    | Caveolin-3 .....  | 82        |
| 3.2.4.4    | $\alpha$ -Actinin.....  | 83        |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 3.2.4.5 | <i>Entactin-1</i> .....   | 84  |
| 3.2.4.6 | <i>Untersuchung des housekeeping-Proteins <math>\alpha</math>-Tubulin</i> .....   | 86  |
| 3.2.5   | Immunzytochemische Untersuchungen der <i>MyHC</i> -Expression von mit <i>skNAC</i> -spezifischer siRNA transfizierten C2C12-Zellen.....                       | 88  |
| 3.2.5.1 | <i>Immunhistochemie</i> .....   | 88  |
| 3.2.5.2 | <i>Bestimmung des Differenzierungsindex</i> .....   | 89  |
| 3.2.5.3 | <i>Bestimmung des Fusionsindex</i> .....  | 90  |
| 3.3     | Untersuchung der Expression von <i>skNAC</i> in H9c2-Zellen .....   | 92  |
| 4       | DISKUSSION.....   | 95  |
| 4.1     | Coxsackievirus-B3-Infektion und Verteilungsmuster von <i>skNAC</i> in der Herzmuskulatur .....  | 95  |
| 4.1.1   | Es lassen sich immunhistochemisch keine deutlichen Unterschiede zwischen den Mäusestämmen ausmachen.....  | 96  |
| 4.2     | Welche Auswirkungen hat eine <i>skNAC</i> -Repression in C2C12-Zellen auf deren Proliferations- und Differenzierungsverhalten? .....                          | 97  |
| 4.2.1   | Die <i>skNAC</i> -Expression in C2C12-Zellen lässt sich durch siRNA-Transfektion hemmen .....   | 97  |
| 4.2.2   | Eine Hemmung der <i>skNAC</i> -Expression führt nicht zu einer veränderten Morphologie der C2C12-Zellen .....   | 98  |
| 4.2.3   | Eine Hemmung der <i>skNAC</i> -Expression führt zu keiner signifikant veränderten Proliferationsrate der C2C12-Zellen .....                                   | 98  |
| 4.2.4   | Eine Hemmung der <i>skNAC</i> -Expression führt nicht zu einer Verminderung der <i>MyHC</i> -Expression .....   | 99  |
| 4.2.5   | Eine Repression der <i>skNAC</i> -Expression hat keinen Einfluss auf die Expression von für verschiedene myogene Differenzierungsmarker kodierende Gene ..... | 100 |
| 4.2.6   | <i>skNAC</i> könnte bei der Myofibrillogenese und der Sarkomerbildung eine Rolle spielen.....   | 102 |
| 4.3     | <i>skNAC</i> wird auch in differenzierenden H9c2-Kardiomyozyten induziert .....   | 103 |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| <b>5</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>              | <b>105</b> |
| <b>6</b> | <b>SUMMARY .....</b>                     | <b>107</b> |
| <b>7</b> | <b>ANHANG.....</b>                       | <b>109</b> |
| <b>8</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>         | <b>110</b> |
|          | <b>PUBLIKATIONEN.....</b>                | <b>117</b> |
|          | <b>DANKSAGUNG.....</b>                   | <b>118</b> |
|          | <b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b> | <b>119</b> |