

INHALT

I	ABKÜRZUNGEN	I
1	EINLEITUNG	1
1.1	Myogenese.....	1
1.2	Nascent polypeptide associated complex (NAC).....	5
1.2.1	α/β Nac-Komplex	7
1.2.2	skNAC	9
1.3	In dieser Arbeit verwendete myogene Differenzierungsmarker	13
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	α -Actinin	17
1.4	Coxsackieviren- induzierte inflammatorische Kardiomyopathie	18
1.5	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Material.....	22
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	22
2.1.2	Enzyme.....	25
2.1.3	Antikörper	25
2.1.3.1	<i>Primäre Antikörper</i>	25
2.1.3.2	<i>Sekundäre Antikörper</i>	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
2.2 Methoden	28
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	28
2.2.1.1 <i>Kultivierung und Kryokonservierung eukaryontischer Zellen</i>	28
2.2.1.2 <i>Induktion der Differenzierung der C2C12-Zellen</i>	30
2.2.1.3 <i>Induktion der Differenzierung der H9c2-Zellen</i>	30
2.2.1.4 <i>Transfektion der C2C12-Zellen mit siRNA</i>	31
2.2.2 Mikrobiologische Methoden	31
2.2.2.1 <i>Anzucht und Aufbewahrung von E.coli-Stämmen</i>	31
2.2.2.2 <i>Herstellung transformationskompetenter E.coli-Bakterien</i>	32
2.2.2.3 <i>Transformation von E.coli-Zellen mit Plasmid-DNA</i>	32
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.3.1 <i>DNA-Isolierung aus transformierten E.coli-Bakterien</i>	33
2.2.3.2 <i>In vitro-Reaktionen an DNA</i>	33
2.2.3.3 <i>Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren</i>	35
2.2.3.4 <i>Spaltung und Reinigung von DNA und Vektor</i>	36
2.2.3.5 <i>Ligation</i>	36
2.2.3.6 <i>Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren</i>	37
2.2.3.7 <i>RNA-Techniken</i>	37
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	41
2.2.4.1 <i>Herstellung von Proteinlysaten</i>	41
2.2.4.2 <i>Proteinkonzentrationsbestimmung</i>	41
2.2.4.3 <i>Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	41
2.2.4.4 <i>Immunologische Methoden</i>	43

3 ERGEBNISSE.....	48
3.1 Immunhistochemische Lokalisation des skNAC-Proteins im murinen Herzen unter physiologischen Bedingungen und bei der CVB3-induzierten inflammatorischen Kardiomyopathie	48
3.1.1 Optimierung der Antikörperkonzentration.....	48
3.1.2 Färbung der infizierten Mäuseherzen.....	52
3.2 Hemmung der skNAC-Expression in Skelettmuskelzellen mittels spezifischer siRNAs und Untersuchung des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens der transfizierten Zellen.....	61
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 α -Actinin.....	83

3.2.4.5 <i>Entactin-1</i>	84
3.2.4.6 <i>Untersuchung des housekeeping-Proteins α-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

5	ZUSAMMENFASSUNG	105
6	SUMMARY	107
7	ANHANG	109
8	LITERATURVERZEICHNIS	110
PUBLIKATIONEN		117
DANKSAGUNG		118
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG		119