

INHALTSVERZEICHNIS

1 FRAGESTELLUNG UND ZIELE DIESER ARBEIT	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Myoblastendifferenzierung	3
2.1.1 <i>Physiologische Myoblastendifferenzierung</i>	3
2.1.1.1 Molekulare Mechanismen der Myogenese	3
2.1.1.2 <i>In vitro</i> -Modellsysteme zur Untersuchung der physiologischen Myoblastendifferenzierung	5
2.1.2 <i>Pathologische Myoblastendifferenzierung</i>	5
2.1.2.1 Rhabdomyosarkome	5
2.1.2.2 <i>In vitro</i> -Modellsysteme zur Untersuchung des Rhabdomyosarkoms	7
2.1.3 <i>Zusammenfassung der verwendeten Modellsysteme</i>	8
2.2 NF-κB	9
2.2.1 <i>Der NF-κB-Signalweg</i>	9
2.2.2 <i>NF-κB und Skelettmuskelzellendifferenzierung</i>	11
2.2.3 <i>NF-κB und Tumorigenese</i>	13
2.3 TRAF6	14
2.3.1 <i>TRAF6 und Skelettmuskelzellendifferenzierung</i>	14
2.3.2 <i>TRAF6 und Tumorigenese</i>	15
3 MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 Material	16
3.1.1 <i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i>	16
3.1.2 <i>Antikörper</i>	19
3.1.3 <i>Sonden</i>	19
3.1.4 <i>Kommerzielle Kits</i>	19
3.1.5 <i>Eukaryontische Zelllinien</i>	19
3.2 Methoden	20
3.2.1 <i>Zellbiologische Methoden</i>	20
3.2.1.1 <i>Kultivierung und Aufbewahrung eukaryontischer Zellen</i>	20
3.2.1.2 <i>Induktion der myogenen Differenzierung</i>	21
3.2.1.3 <i>Behandlung der Zellen mit Lactacystin</i>	21
3.2.1.4 <i>Behandlung der Zellen mit Curcumin</i>	21
3.2.2 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	22
3.2.2.1 <i>Allgemeine Richtlinien für das Arbeiten mit RNA</i>	22

3.2.2.2	Isolierung gesamtzellulärer RNA	22
3.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	22
3.2.2.4	<i>Northern Blot</i>	22
3.2.3	<i>Proteinchemische Methoden</i>	25
3.2.3.1	Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Zellen	25
3.2.3.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	25
3.2.3.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
3.2.3.4	Immunologische Methoden	26
4	ERGEBNISSE	30
4.1	Vergleich der basalen NF-κB-Aktivität sowie der basalen Expression des für den NF-κB-Aktivator TRAF6 kodierenden Gens in nichttransformierten Myoblasten und in Rhabdomyosarkomzellen	30
4.1.1	<i>Vergleich der basalen NF-κB-Aktivität der einzelnen Zelllinien</i>	30
4.1.2	<i>Vergleich der basalen traf6-Expression der einzelnen Zelllinien</i>	32
4.2	NF-κB-Aktivität und Differenzierungsverhalten: Untersuchungen an nichttransformierten Myoblasten und an verschiedenen Rhabdomyosarkomzelllinien	34
4.2.1	<i>Untersuchung der nichttransformierten Myoblastenzelllinie C2C12</i>	34
4.2.1.1	NF- κ B-Aktivität und <i>traf6</i> -Expression bei der Differenzierung	34
4.2.1.2	Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF- κ B-Aktivität	34
4.2.2	<i>Untersuchung der Rhabdomyosarkomzelllinie RD/18</i>	48
4.2.2.1	NF- κ B-Aktivität und <i>traf6</i> -Expression bei der Differenzierung	48
4.2.2.2	Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF- κ B-Aktivität	54
4.2.3	<i>Untersuchung der Rhabdomyosarkomzelllinie RD/12</i>	63
4.2.3.1	NF- κ B-Aktivität und <i>traf6</i> -Expression bei der Differenzierung	63
4.2.3.2	Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF- κ B-Aktivität	69
4.2.4	<i>Untersuchung der Rhabdomyosarkomzelllinie CCA</i>	75
4.2.4.1	NF- κ B-Aktivität und <i>traf6</i> -Expression bei der Differenzierung	75
4.2.4.2	Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF- κ B-Aktivität	81
4.3	Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	85
4.3.1	<i>NF-κB-Aktivität in unbehandelten, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen</i>	85
4.3.2	<i>Auswirkung der Hemmung der NF-κB-Aktivität auf die Differenzierung von nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen</i>	87
4.3.3	<i>Expression des traf6-Gens in unbehandelten, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen</i>	90
4.3.4	<i>Auswirkung der Hemmung der NF-κB-Aktivität auf die traf6-Expression in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen</i>	91

5 DISKUSSION	92
5.1 Wie verhält sich die NF-κB-Aktivität in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?	92
5.1.1 <i>Wie verhält sich die NF-κB-Aktivität in proliferierenden, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?</i>	92
5.1.2 <i>Wie verhält sich die NF-κB-Aktivität in differenzierenden, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?</i>	93
5.1.2.1 Die NF- κ B-Aktivität sinkt im Differenzierungsverlauf von nichttransformierten Myoblasten ab	93
5.1.2.2 Die NF- κ B-Aktivität bleibt im Differenzierungsverlauf von Rhabdomyosarkomzellen unverändert	95
5.2 Welche Auswirkungen hat eine Hemmung der NF-κB-Aktivität auf die Differenzierung von nichttransformierten Muskelzellen und Rhabdomyosarkomzellen?	97
5.2.1 <i>Wie wirkt sich die Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Curcumin auf den Differenzierungsprozess von nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen aus?</i>	97
5.2.1.1 Die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Curcumin wirkt in C2C12-Zellen differenzierungshemmend	97
5.2.1.2 Die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Curcumin wirkt in Rhabdomyosarkomzellen differenzierungshemmend	99
5.2.2 <i>Wie wirkt sich die Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Lactacystin auf den Differenzierungsprozess von nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen aus?</i>	100
5.2.2.1 Die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Lactacystin wirkt in C2C12-Zellen differenzierungshemmend	100
5.2.2.2 Die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Lactacystin wirkt in Rhabdomyosarkomzellen differenzierungshemmend	102
5.3 Findet in nichttransformierten Myoblasten eine Repression der <i>traf6</i>-Expression nach Induktion der Differenzierung statt? Verhält sich die <i>traf6</i>-Expression in Rhabdomyosarkomzellen abweichend davon?	103
5.3.1 <i>Wie verhält sich die <i>traf6</i>-Expression in proliferierenden, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?</i>	103
5.3.2 <i>Wie verhält sich die <i>traf6</i>-Expression in differenzierenden, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?</i>	104
5.3.2.1 Die <i>traf6</i> -Expression steigt im Differenzierungsverlauf von Rhabdomyosarkomzellen an	104

5.4 Unterliegt die Expression des <i>traf6</i>-Gens der Regulation durch NF-κB? Gibt es Unterschiede bezüglich dieser Regulation zwischen nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?	105
5.4.1 <i>Welche Auswirkung hat die Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Curcumin auf die <i>traf6</i>-Expression in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?</i>	<i>105</i>
5.4.1.1 Die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Curcumin hat in Rhabdomyosarkomzellen keine Auswirkungen auf die <i>traf6</i> -Expression	105
5.4.2 <i>Welche Auswirkung hat die Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Lactacystin auf die <i>traf6</i>-Expression in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen?</i>	<i>106</i>
5.4.2.1 Die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Lactacystin hat in Rhabdomyosarkomzellen keine Auswirkungen auf die <i>traf6</i> -Expression	106
6 ZUSAMMENFASSUNG	107
7 SUMMARY.....	109
8 LITERATURVERZEICHNIS	111
9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	118
PUBLIKATIONEN	120
DANKSAGUNG	121
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	122