

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| 1 FRAGESTELLUNG UND ZIELE DIESER ARBEIT | 1 |
| 2 EINLEITUNG | 3 |
| 2.1 Myoblastendifferenzierung..... | 3 |
| 2.1.1 Physiologische Myoblastendifferenzierung | 3 |
| 2.1.1.1 Molekulare Mechanismen der Myogenese. | 3 |
| 2.1.1.2 In vitro-Modellsysteme zur Untersuchung der physiologischen Myoblastendifferenzierung | 5 |
| 2.1.2 Pathologische Myoblastendifferenzierung | 5 |
| 2.1.2.1 Rhabdomyosarkome | 5 |
| 2.1.2.2 In vitro-Modellsysteme zur Untersuchung des Rhabdomyosarkoms | 7 |
| 2.1.3 Zusammenfassung der verwendeten Modellsysteme | 8 |
| 2.2 NF-κB..... | 9 |
| 2.2.1 Der NF-κB-Signalweg | 9 |
| 2.2.2 NF-κB und Skelettmuskelzellendifferenzierung | 11 |
| 2.2.3 NF-κB und Tumorigenese | 13 |
| 2.3 TRAF6 | 14 |
| 2.3.1 TRAF6 und Skelettmuskelzellendifferenzierung | 14 |
| 2.3.2 TRAF6 und Tumorigenese | 15 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN..... | 16 |
| 3.1 Material..... | 16 |
| 3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien | 16 |
| 3.1.2 Antikörper | 19 |
| 3.1.3 Sonden | 19 |
| 3.1.4 Kommerzielle Kits | 19 |
| 3.1.5 Eukaryontische Zelllinien..... | 19 |
| 3.2 Methoden..... | 20 |
| 3.2.1 Zellbiologische Methoden | 20 |
| 3.2.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung eukaryontischer Zellen | 20 |
| 3.2.1.2 Induktion der myogenen Differenzierung | 21 |
| 3.2.1.3 Behandlung der Zellen mit Lactacystin..... | 21 |
| 3.2.1.4 Behandlung der Zellen mit Curcumin..... | 21 |
| 3.2.2 Molekularbiologische Methoden | 22 |
| 3.2.2.1 Allgemeine Richtlinien für das Arbeiten mit RNA | 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 <i>traf6</i>-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-κB-Aktivität und <i>traf6</i> -Expression bei der Differenzierung | 34 |
| 4.2.1.2 Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF-κB-Aktivität | 34 |
| 4.2.2 <i>Untersuchung der Rhabdomyosarkomzelllinie RD/18</i> | 48 |
| 4.2.2.1 NF-κB-Aktivität und <i>traf6</i> -Expression bei der Differenzierung | 48 |
| 4.2.2.2 Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF-κB-Aktivität | 54 |
| 4.2.3 <i>Untersuchung der Rhabdomyosarkomzelllinie RD/12</i> | 63 |
| 4.2.3.1 NF-κB-Aktivität und <i>traf6</i> -Expression bei der Differenzierung | 63 |
| 4.2.3.2 Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF-κB-Aktivität | 69 |
| 4.2.4 <i>Untersuchung der Rhabdomyosarkomzelllinie CCA</i> | 75 |
| 4.2.4.1 NF-κB-Aktivität und <i>traf6</i> -Expression bei der Differenzierung | 75 |
| 4.2.4.2 Differenzierungsverhalten bei Hemmung der NF-κB-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 <i>traf6</i>-Gens in unbehandelten, nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen</i> | 90 |
| 4.3.4 <i>Auswirkung der Hemmung der NF-κB-Aktivität auf die <i>traf6</i>-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-κB-Aktivität sinkt im Differenzierungsverlauf von nichttransformierten Myoblasten ab | 93 |
| 5.1.2.2 Die NF-κB-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-κB-Aktivität durch Curcumin wirkt in C2C12-Zellen differenzierungshemmend | 97 |
| 5.2.1.2 Die Hemmung der NF-κB-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-κB-Aktivität durch Lactacystin wirkt in C2C12-Zellen differenzierungshemmend | 100 |
| 5.2.2.2 Die Hemmung der NF-κB-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 Welche Auswirkung hat die Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Curcumin auf die <i>traf6</i>-Expression in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen? | 105 |
| 5.4.1.1 Die Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Curcumin hat in Rhabdomyosarkomzellen keine Auswirkungen auf die <i>traf6</i>-Expression | 105 |
| 5.4.2 Welche Auswirkung hat die Hemmung der NF-κB-Aktivität durch Lactacystin auf die <i>traf6</i>-Expression in nichttransformierten Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen? | 106 |
| 5.4.2.1 Die Hemmung der NF-κB-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 |