

**Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin I
Leiter: Prof. Dr. med. Thomas Seufferlein**

Die Proteinkinase D2 als kritischer Parameter während der Skelettmuskeldifferenzierung

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.) der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

Vorgelegt von
Christiane Johanna Loebnitz
Geboren in Sulz a.N.
Ulm
2012

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1: Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Seufferlein

2. Berichterstatter: PD Stefan Liebau

Tag der Promotion: 13.02.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung	1
1.1. Stammzellklassen	3
1.2. Stammzellnische	5
1.3. Skelettmuskelstammzellen.....	6
1.4. Myogenese.....	7
1.5. Proteinkinasen	11
1.6. Fragestellung	16
2. Materialien und Methoden	18
2.1. Reagenzien	18
2.2. Verwendetes Laborequipment	18
2.3. Zellkultur	18
2.4. Reagenzien für den Dual Luziferase Reporter Assay	21
2.5. Reagenzien zur Immunfluoreszenzfärbung.....	21
2.6. Reagenzien zur Isolierung zellulärer Ribonukleinsäure (RNA) mittels QiagenRNeasy Mini Kit.....	22
2.7. Reagenzien zur quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	22
2.8. Reagenzien für den lentiviralen Knock-down	23
2.9. Reagenzien für Western Blots.....	24
2.10. Zellkultur	26
2.11. Reporter Assays.....	28
2.12. Prinzip der lentiviralen shRNA-Übertragung und Generierung stabiler C2C12-Zelllinien	31
2.13. Immunfluoreszenzfärbungen.....	32
2.14. Quantitative Polymerasekettenreaktion.....	34
2.15. Proteinbiochemische Analysen	37
3. Ergebnisse	41
3.1. C2C12 als Modell zur Skelettmuskelstammzellendifferenzierung.....	41
3.2. Expression von PKDs in C2C12-Zellen und im adulten Skelettmuskel	42
3.3. Sphingosin-1-Phosphat (S1P) phosphoryliert PKDs in C2C12-Zellen	44
3.4. PKD2 wird bei der Einleitung der Differenzierung phosphoryliert.....	46
3.5. Die pharmakologische Inhibition von PKCs und PKDs hemmt die Muskelstammzellendifferenzierung <i>in vitro</i>	50

3.6. PKD2-Knock-down hemmt die Muskelstammzellendifferenzierung <i>in vitro</i>	54
3.7. PKD2 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von C2C12-Zellen	57
3.8. PKD1 und PKD3 haben im Vergleich zu PKD2 eine eher untergeordnete Bedeutung für die C2C12-Muskelstammzellendifferenzierung	59
3.9. Ektope Expression von PKD2 führt zu einer Zunahme der Muskelstammzellendifferenzierung in C2C12-Zellen.....	61
3.10. Pharmakologische PKC/PKD-Inhibition in primären Satellitenzellen hemmt deren Differenzierung	64
3.11. PKD2 induziert die Aktivierung von Mef2D	66
3.12. PKD2 hemmt die transkriptionelle Aktivität von Pax3.....	66
3.13. Schematische Darstellung des möglichen PKD2-Signalwegs.....	69
4. Diskussion	70
4.1. PKD-Expression in C2C12-Zellen	70
4.2. Wirkung der PKDs in Muskelvorläuferzellen	72
4.3. PKD1 und PKD3	75
4.4. Upstream gelegene Signalwege der PKD-vermittelten Skelettmuskeldifferenzierung.....	76
4.5. Mef2D und Pax3 - „Ying und Yang“ der PKD-vermittelten Skelettmuskeldifferenzierung.....	78
5. Zusammenfassung	81
6. Literatur.....	83
7. Danksagung.....	90
8. Lebenslauf	91
9. Veröffentlichung.....	92

Abkürzungsverzeichnis

ACK	Aktivierte 921cdc42Hs-Kinase
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
AT1	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
ATP	Adenosin-5-triphosphat
β-ME	β-Mercapto-Ethanol
BSA	Bovines Serum Albumin
bHLH-Domäne	Basic Helix-loop-helix (basale Helix-Schleifen-Helix–Einheit)
CAMK	Calcium/ Calmodulin dependent Kinases (Kalzium/Kalmodulin-abhängige Kinasen)
CAT	Chloramphenicol Azetyltransferase
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin-dependent Kinase (Cyklin-abhängige Kinase)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Crossing Point
CRD	Cysteine rich zinc finger domain (zysteinreiche Zinkfingerdomäne)
DAG	Diazylglyzerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DM	Differenzierungsmedium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium high Glucose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-di-amintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol–bis-tetraessigsäure
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GM	Growth Medium (Wachstumsmedium)
HS	Horse Serum (Pferdeserum)
HDAC	Histondeazetylase

Abkürzungen

ICM	Inner Cell Mass (innere Zellmasse der Blastozyste)
ID	Inhibitor of Differentiation
Ig	Immunglobulin
I ₃ P	Inositol 1,4,5-Trisphosphat
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilo Dalton
Lin.	Lineage
mHMBS	Murine Hydroxymethylbilane Synthase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Mef	Murine embryonale Fibroblasten
MEF	Myocyte Enhancer Factor
Mef2D	Myocyte enhancer factor 2D
MHC	Myosin Heavy Chain (Myosinschwerkette)
MOI	Multiplicity Of Infection
MRF	Myogenic Regulatory Factor (myogener Regulationsfaktor)
NaCl	Natriumchlorid
nAch	Nikotinischer Acetylcholinrezeptor
PAX	Paired box gene
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pc.	Post conceptionem
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PH	Pleckstrin Homology (domain)
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PMA	Phorbol-12, 13-Myristatazetat
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
S1P	Sphingosin-1-Phosphat

Abkürzungen

TBS	Tris- gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
TGF β	Tumor Wachstumsfaktor β
TGN	<i>Trans</i> -Golgi-Netzwerk
TNF α	Tumor Nekrosefaktor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
WNT-Signalproteine	Wingless-Int1-Signalproteine
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Die Entwicklung jedes multizellulären Organismus von der befruchteten Oozyte bis zu seinem charakteristischen dreidimensionalen Aussehen und seiner Größe ist das Ergebnis komplex koordinierter Genfunktionen. Diese Genfunktionen steuern Wachstum, Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose auf Einzelzellebene. Die Fähigkeit der Zelle auf externe Signale (z.B. Wachstumsfaktoren und Liganden) durch geeignete Signaltransduktionskaskaden zu reagieren und zu kommunizieren, ist dabei von essenzieller Bedeutung. Diese Signale werden auf intrazelluläre Signalkaskaden integriert und vermitteln über das An- und Ausschalten von Genen die jeweilige biologische Funktion. Eine besondere Rolle bei der intrazellulären Signalvermittlung spielen Proteinkinasen.

Die Skelettmuskeldifferenzierung beginnt mit einem Proliferationsstop der normalerweise proliferierenden Myoblasten, die anschließend nach Elongation der Zellstruktur und Ausrichtung der Zellpolarität zu multinukleären Myotuben fusionieren. Dieser Prozess wird auf molekularer Ebene durch die Interaktion myogener Transkriptionsfaktoren gesteuert (Arnold u. Braun 2000), deren Transkription unter anderem über Feedbackschleifen aufrechterhalten wird (Olson et al. 1995, Ohkawa et al. 2006, Du et al. 2008, Nebbioso et al. 2009).

Dies führt zu einer Expression myofibrillärer Proteine wie Myosin Heavy Chain (MHC) (Weintraub 1993, Olson et al. 1995, Molkentin u. Olson 1996, Yun u. Wold 1996).

Neben den Transkriptionsfaktoren sind auch Proteinkinasen wie die p38-MAP-Kinase (Wang et al. 2008), Phospholipase D (Yoon u. Chen 2008) und Mitglieder der Proteinkinase C (PKC)-Familie (Czifra et al. 2006, Gaboardi et al. 2010) für die Regulation der Skelettmuskeldifferenzierung von Bedeutung.

Bis dato im Zusammenhang mit der Skelettmuskeldifferenzierung wenig erforschte Kinasen sind die Mitglieder der Proteinkinase D-Familie. Bei den 3 Proteinkinase D-Isoformen (PKD), PKD1, 2 und 3, handelt es sich um Serin/Threonin Kinasen, die Kalzium/Kalmodulin-abhängig reguliert werden (Ryx et al. 2003). Sie werden durch eine Vielzahl an Stimuli aktiviert, zu welchen Phorbolester, G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) und reaktive Sauerstoffspezies gehören (Ryx et al. 2003). PKDs sind außerdem wichtige Substrate der Proteinkinasen C (PKCs) (Waldron u. Rozenfurt 2003, von Blume et al. 2007). Neben der Regulation von Sekretion, Proteintransport, Migration und Proliferation gibt es Hinweise, dass

PKDs auch eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von Geweben spielen (Fielitz et al. 2008, Kim et al. 2008, Geng et al. 2009). Unklar bleibt jedoch die Rolle der PKDs für die Skelettmuskeldifferenzierung.

Die Entwicklung und Regeneration der Skelettmuskulatur hängt im Wesentlichen von einer kleinen, dort angesiedelten Zellgruppe ab, den Satellitenzellen. Diese Zellen sind für die terminale Differenzierung während dieser Vorgänge zuständig.

Die vorliegende Arbeit untersucht daher die Funktion von PKDs bei der Differenzierung myogener Satellitenzellen. Als Modellsystem myogener Stammzellen wurden murine C2C12-Myoblasten verwendet (Yaffe u. Saxel 1977), für welche bereits mehrfach gezeigt werden konnte, dass sie sich als *bona fide* Modell für die Untersuchung der Differenzierung von Vorläuferzellen zu terminal differenzierten Skelettmuskelzellen eignen.

Unter Verwendung dieses Zellmodells konnte gezeigt werden, dass C2C12-Zellen hauptsächlich PKD2 und PKD3 exprimieren, wobei PKD2 während der Differenzierung katalytisch aktiv ist (Kleger et al. 2011). Eine pharmakologische Hemmung der PKCs oder PKDs, sowie eine selektive Depletion von PKD2 durch spezifische short hairpin Ribonukleinsäuren (shRNAs) führt zu einer deutlich reduzierten Differenzierung von C2C12-Zellen zu Skelettmuskelzellen (Kleger et al. 2011). Die ektopische Expression von aktivem PKD2 führte zu einer vermehrten Transkriptionsaktivität von Myocyte enhancer factor 2D (Mef2D) in diesen Zellen. Insgesamt beschreibt die vorliegende Arbeit die essenzielle Bedeutung von PKD2 für die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Skelettmuskelzellen. Dies eröffnet möglicherweise neue Behandlungsstrategien für die *in vivo* Muskelregeneration (Kleger et al. 2011).

1.1. Stammzellklassen

Stammzellen durchlaufen während der Embryogenese eine zunehmende Spezialisierung. Aus der befruchteten Eizelle entstehen bis zu 200 verschiedene terminal differenzierte Zellarten in einem Organismus. Die zunehmende Spezialisierung geht mit dem Verlust des Differenzierungspotentials einher. Dies ermöglicht eine Einteilung der Stammzellen in drei verschiedene Klassen: Totipotente Stammzellen, pluripotente Stammzellen und multipotente Stammzellen (Edwards 2004).

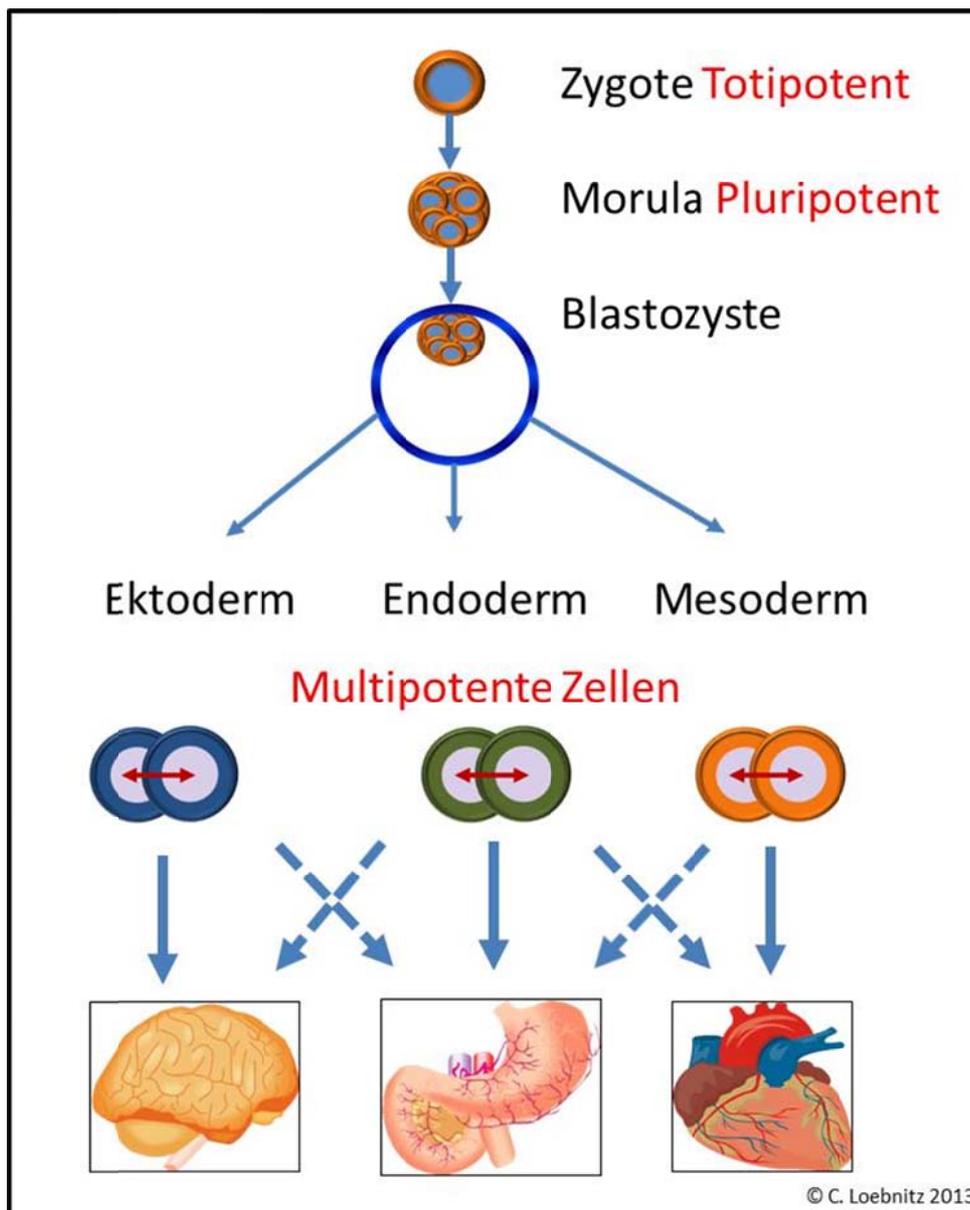


Abbildung 1: Stammzellhierarchie in embryonalen und adulten Stammzellen. Entwicklung der totipotenten Zygote zu den pluripotenten Zellen der Morula, welche sich zu den multipotenten Zellen der drei Keimblätter entwickeln. Diese Zellen entwickeln sich zu den Effektorzellen der jeweiligen Organe, wobei diese Zellen mit den Entsprechenden Signalen auch zu Effektorzellen der anderen Keimblätter transdifferenzieren können.

1.1.1. Totipotente Stammzellen

Als totipotente bzw. omnipotente Stammzellen werden die Zygote *per se* sowie die Blastomeren bis zum 8-Zellstadium bezeichnet. Der Begriff beschreibt, dass jede einzelne Zelle dazu in der Lage ist, einen vollständigen Organismus mit den entsprechenden Geweben und Organen zu bilden (Ziomek u. Johnson 1980).

1.1.2. Pluripotente Stammzellen

Im Rahmen der weiteren Zellteilung der Blastomeren findet der erste Differenzierungsschritt zur Ausbildung der Blastozyste statt. Diese lässt sich in eine äußere Zellmasse, den späteren Trophoblast und in eine innere Zellmasse (ICM)– den späteren Embryoblast einteilen. Der spätere Trophoblast vermittelt dann bei der Nidation die Versorgung des sich entwickelnden Embryos. Die innere Zellmasse besteht aus naiv-pluripotenten Zellen, aus denen sich später der gesamte Embryo entwickelt. Dies bedeutet, dass jede Zelle der ICM in der Lage ist, sich zu Zellen der drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm, Mesoderm) zu entwickeln, ohne dabei aber für sich alleine einen kompletten lebensfähigen Organismus bilden zu können (Ziomek u. Johnson 1980).

1.1.3. Multipotente oder adulte Stammzellen

Nach Differenzierung der ICM zum Epiblasten beginnt mit der Gastrulation die Entwicklung der drei Keimblätter: Endoderm, Ektoderm und Mesoderm. Das Endoderm differenziert sich in Epithelien des Verdauungs-, Atmungs- und Harntrakts. Das Ektoderm bildet die spätere Epidermis, das Nervensystem und die Sinnesorgane. Das Mesoderm entwickelt sich neben Knochen und Blutgefäßen auch zu glatter und quer gestreifter Muskulatur.

Im adulten Organismus persistiert in den Geweben ein Pool von Gewebstammzellen, die über multipotente Eigenschaften verfügen. Es wird angenommen, dass mit Hilfe dieser Zellen Regenerationsvorgänge in den diversen Geweben durchgeführt werden, die Ähnlichkeit mit der Organbildung während der Embryonalentwicklung haben. Bei dieser Regeneration entstehen aus einer Stammzelle eine identische Tochterzelle und eine Vorläuferzelle. Die Tochterzelle sichert dabei das Fortbestehen des Zellpools. Die Vorläuferzelle hingegen kann sich zu einer spezialisierten Körperzelle entwickeln (Lovell-Badge 2001).

Beispiele dafür sind die Satellitenstammzellen im Muskelgewebe (Kleger et al. 2011) sowie die hämatopoetischen Stammzellen. Die Letzteren können sich zu sämtlichen im Blut vorkommenden Zellarten differenzieren (McKay 2000). Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass diese Stammzellen auch in Leber- (Roskams 2006, Dabeva u. Shafritz 2003), Nerven- (Hsu et al. 2007) und Netzhautgewebe (Bhatia et al. 2010), im Zahnmark (Riccio et al. 2010) und sogar im Fettgewebe (De Girolamo et al. 2008) vorkommen. Durch diese Zellen ist die Möglichkeit gegeben, verschiedene Gewebe, wie z.B. Lebergewebe zu regenerieren (Mallet u. Gilgenkrantz 2005).

1.2. Stammzellnische

Als Stammzellnische wird die Gesamtheit der extrazellulären Matrix, der Zellen mit ihren Oberflächenmarkern und der lokalen Wachstumsfaktoren, die eine Stammzelle *in vivo* umgeben, bezeichnet. Das Zusammenspiel dieser Faktoren prägt die Funktion und Selbsterneuerung der Zellen. Die Adhäsion zwischen Stammzellen und unterstützenden Stromazellen oder extrazellulärer Matrix sorgt einerseits für die lokale Integration von Umgebungssignalen auf die Stammzellen, andererseits führt ein enger Kontakt der Stammzellen mit anderen Zellen zu einer Polarisierung der Ersteren und somit zu asymmetrischer Zellteilung zum gleichzeitigen Erhalt des Stammzellpools sowie differenzierter Progenitoren (Spradling et al. 2001). Eine solche Stammzellnische findet sich typischerweise in der Skelettmuskulatur mit den Skelettmuskelstammzellen, die auch als Satellitenzellen bezeichnet werden. Diese Zellen befinden sich zwischen der Basalmembran und den Zellmembranen der einzelnen Muskelfasern. Sie können differenzieren, bereits bestehende Muskelfasern vergrößern und neue Muskelfasern bilden. Zusammen mit ihrer Umgebung repräsentieren sie das älteste bekannte Beispiel für eine Stammzellnische und sind sowohl wichtig für normales Zellwachstum als auch für die Regeneration nach Verletzungen und Krankheit. Bei mechanischer Beanspruchung beginnen diese Zellen außerdem zu Muskelzellen zu differenzieren. Die genauen Einflüsse anderer Faktoren auf die Differenzierung, wie z. B. Transkriptionsfaktoren, werden zurzeit noch erforscht (Li u. Xie 2005).

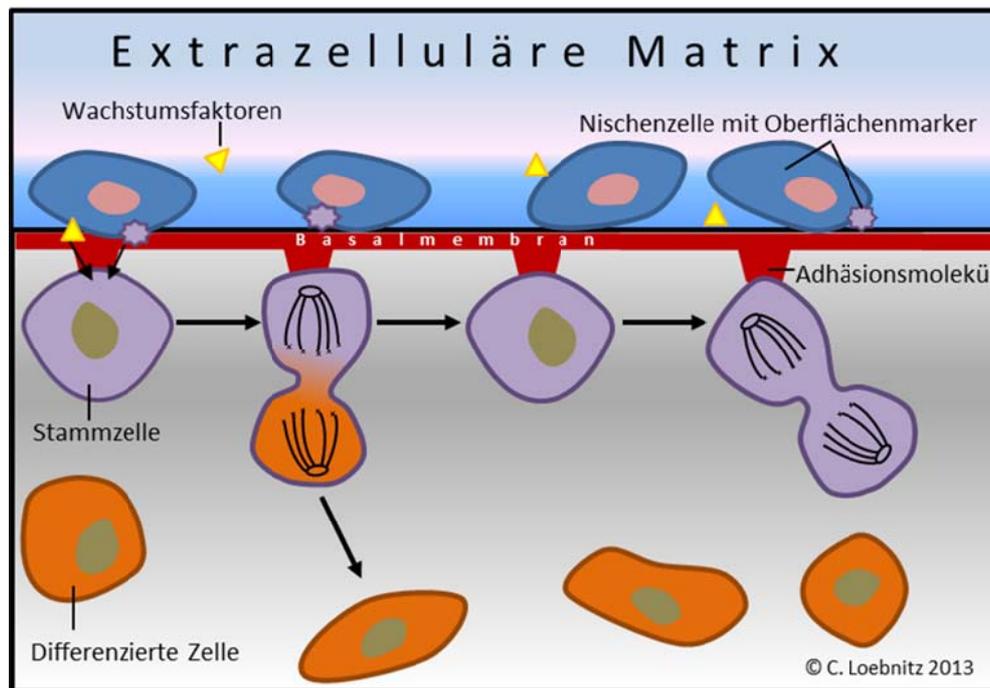


Abbildung 2: Stammzellnische von adulten Stammzellen. Durch Umgebungssignale aus der Stammzellnische wie Oberflächenmarker oder Wachstumsfaktoren kommt es durch eine asymmetrische Teilung der Stammzelle zur Entwicklung einer ausdifferenzierten Progenitorzelle und einer Stammzelle. Hierdurch wird differenziertes Gewebe erneuert und gleichzeitig der Stammzellpool erhalten.

1.3. Skelettmuskelstammzellen

Zu den Skelettmuskelstammzellen gehören die embryonalen Myoblasten und die Satellitenzellen. Die Myoblasten sind die myogenen Vorläuferzellen im Embryo, welche sich aus den Prämyoblasten entwickeln. Durch die Fusion der einzelnen Myoblasten entsteht die mehrkernige Myotube. Die Prämyoblasten haben ihren Ursprung im paraaxialen Anteil des intraembryonalen Mesoderms, welches sich aufgrund der Signale benachbarter Strukturen wie der Chorda dorsalis, dem Neuralrohr und dem dorsalen Ektoderm zu Somiten entwickelt. Die Somiten befinden sich parallel entlang der Neuralplatte. Sie bilden Sklerotome, welche das spätere Achsenskelett bilden, und Dermatomyotome. Die Dermatomyotome lassen sich weiter in Dermatome, welche das spätere subkutane Gewebe repräsentieren, und Myotome, welche die spätere Skelettmuskulatur bilden, einteilen (Sadler 2008).

Die Satellitenzellen werden durch ihre Position neben der Basalmembran der Muskulatur im adulten Organismus und ihrer Fähigkeit, sich zu

Skelettmuskelzellen zu entwickeln definiert. Sie sind in der Lage, auch größere muskuläre Schäden zu regenerieren (Cossu u. Biressi 2005).

Neuere Analysen ergaben, dass Satellitenzellen aus derselben Zellpopulation aus dem Dermomyotom entstammen wie embryonale Myoblasten (Gros et al. 2005).

Die Zelllinie C2C12 wurde aus einem Subklon einer Satellitenzelllinie generiert, die von D. Yaffe und O. Saxel (1977) nach Verletzung des Beinmuskels einer adulten Maus aus dem sich regenerierenden Muskel gewonnen wurde. Die in den verletzten Muskel einwandernden Satellitenzellen wurden isoliert und konsequent *in vitro* passagiert (Yaffe u. Saxel 1977). Dadurch wurde ein immortalisiertes *in vitro* Analogon zu Satellitenzellen geschaffen, welche in der Lage sind, innerhalb einer Woche zu kontraktile Myotuben zu differenzieren. Hierbei exprimieren sie sämtliche charakteristische Muskelproteine und Differenzierungsfaktoren, wodurch sie sich hervorragend als Muskeldifferenzierungsmodell, sowohl für quer gestreifte als auch für kardiale Muskulatur eignen (McMahon et al. 1994).

1.4. Myogenese

1.4.1. Entstehung und Weiterentwicklung der Somiten

Kurz nach der Gastrulation entstehen aus der dünnen Mesodermschicht das paraaxiale Mesoderm, das intermediäre Mesoderm und die Seitenplatte. Aus der Seitenplatte und dem paraaxialen Mesoderm entwickelt sich der Skelettmuskel (Sadler 2008). Bei der Maus beginnt an Tag 8 die Aufgliederung des paraaxialen Mesoderms zu beiden Seiten des Neuralrohrs in die einzelnen Segmente, die als Somiten bezeichnet werden. Die myogene Differenzierung beginnt vornehmlich in den dorsalen Anteilen der Somiten, dem Dermatome und dem darunter liegenden Myotome, welche zusammen das Dermomyotom bilden (Boyd et al. 1960, Sadler 2008), und schreitet im lateralen Mesoderm nach ventral fort. Die Vorläuferzellen aus dem Dermomyotom wandern in die Extremitätenknospen. Die Chorda dorsalis entwickelt sich durch eine Einstülpung im Bereich des Primitivknotens und dient als Leitstruktur zur Bildung der Wirbelsäule. Hier und in der Bodenplatte des Neuralrohres werden nun Wingless Int-1 (WNT)-Signalproteine exprimiert, welche die Bildung der Elemente des Achsenskeletts, des Sklerotoms, aktivieren.

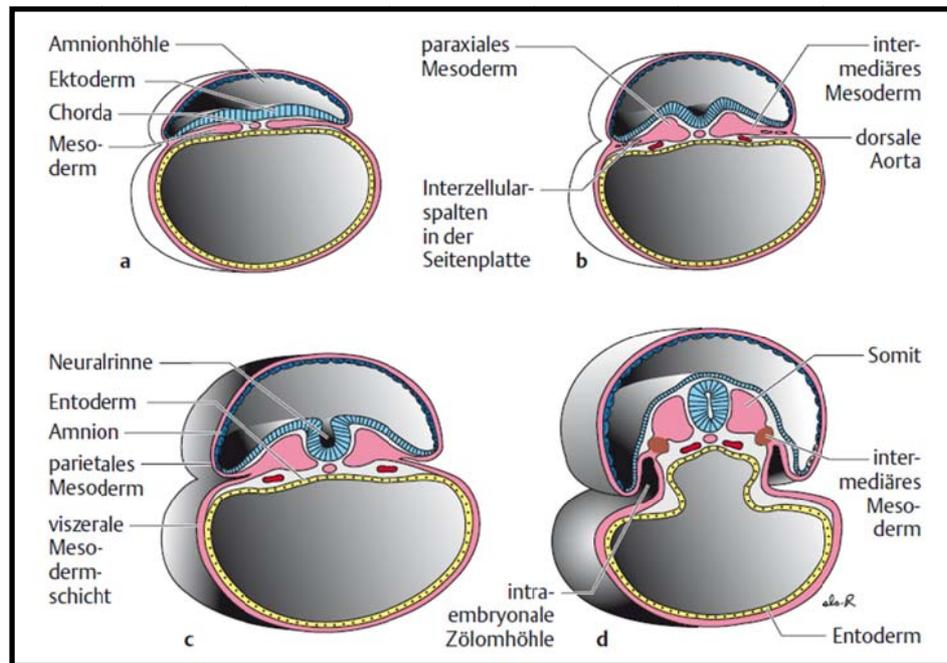


Abbildung 3: Entwicklung des mittleren Keimblatts beim Menschen während der Embryogenese. Querschnitte. Aus dem Mesoderm (pink), zwischen Ektoderm (blau) und Entoderm (gelb) gelegen, entwickeln sich die Somiten, in welchen die myogene Differenzierung beginnt. **a** 17. Tag, **b** 19. Tag, **c** 20. Tag, **d** 21. Tag. (Sadler 2008, S 100).

1.4.1.1. Myogene Regulationsfaktoren

Die Bildung der WNT-Signalproteine führt zu einer Expression von myogenen Regulationsfaktoren (MRFs). Dazu gehören MyoD und Myf5, sowie die später exprimierten Faktoren Myogenin und MRF4 (auch Myf6 genannt) (Olson et al. 1995). Die MRFs besitzen alle eine basic Helix–Loop–Helix (bHLH)-Domäne. Die bHLH-Domäne besteht aus zwei α -Helices, die durch eine Schleifendomäne verbunden sind, welche typischerweise an die sogenannte E-box, ein für die Initiation der Transkription zuständiges DNA-Motiv, bindet. Zusätzlich wird durch die bHLH-Transkriptionsfaktoren die Promotorregion der Myocyte Enhancer Factors (MEF) aktiviert. Die MEFs gehören zur Familie der MADS-Box-Transkriptionsfaktoren, welche nach den ersten 4 Faktoren MCM1, AG, DEFA und Serum response factor (SRF) benannt wurde, bei welchen diese Domäne ursprünglich identifiziert worden war (Shore u. Sharrocks 1995). Sie vermitteln die DNA-Bindung. Durch die bHLH-vermittelte Aktivierung der MEFs kommt es zu einer verstärkten Expression von Myocyte enhancer factor 2 (Mef2), welche wiederum zu einer vermehrten Induktion der bHLH-Faktoren und somit zu einer Verstärkung beider Transkriptionsfaktoren führt. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung von Muskelstrukturgenen (Olson et al. 1995, Lin et al. 2002).

Zusätzlich kommt es durch die Expression von WNT-Signalproteinen während der Bildung des Achsenskeletts zu einer vermehrten Bildung von Pax3, einem Transkriptionsfaktor, der zu der Familie der „paired box“-enthaltenden Gene gehört. Dabei handelt es sich um eine Familie mit 9 verschiedenen Mitgliedern, welche die Expression von zellspezifischen Transkriptionsfaktoren regulieren (Wehr u. Gruss 1996). Pax3 und Pax7 sind im paraaxialen Mesoderm vor der Bildung der Somiten detektierbar und werden in den späteren Dermatomyotomen, Myotomen und Myoblasten exprimiert (Goulding et al. 1994). Hier vermitteln sie unter anderem die Selbsterneuerung und das Populationswachstum der undifferenzierten Myoblasten. Eine Überexpression von Pax3 in C2C12-Zellen führt zu einer Verstärkung der Proliferationskapazität der Zellen, verzögert die myogene Differenzierung und hemmt somit die Differenzierung (Collins et al. 2009, Epstein et al. 1995, Young u. Wagers 2010). Es wird außerdem vermutet, dass Pax3 sowohl für eine dauerhafte Expression der MRFs und die Muskelzellendifferenzierung, als auch für das Wachstum der Zellpopulation zuständig ist (Collins et al. 2009).

1.4.1.2. Chronologie der Myogenese

Die Orientierung mesodermaler Zellen in Richtung des muskulären Differenzierungswegs während der Entwicklung der Somiten, das sogenannte „Commitment“, wird von Pax3, MyoD und Myf5 kontrolliert. Im Gegensatz dazu wird die Differenzierung über Myogenin reguliert (Rudnicki u. Jaenisch 1995, Venuti et al. 1995). In Myogenin-Knock-out-Mäusen wird kein suffizienter Skelettmuskel gebildet und die wenigen Muskelfasern, die gebildet werden, gehen zugrunde (Hasty et al. 1993). Das in Mausembryonen am frühesten während der Myogenese exprimierte Gen ist Myf5. Es kann ab Tag 8 post conceptionem (E8) detektiert werden. Eine Steigerung der Myogenintranskription kann ab Tag E8,5 beobachtet werden, gefolgt von einer vorübergehenden Expression von Myf6 von Tag E9,5 bis E11 und einer MyoD-Expression ab Tag E10,5. Myf6 tritt im fötalen Muskel wieder ab Tag E15,5 auf und bleibt auf einem hohen Level weiter im adulten Muskel bestehen.

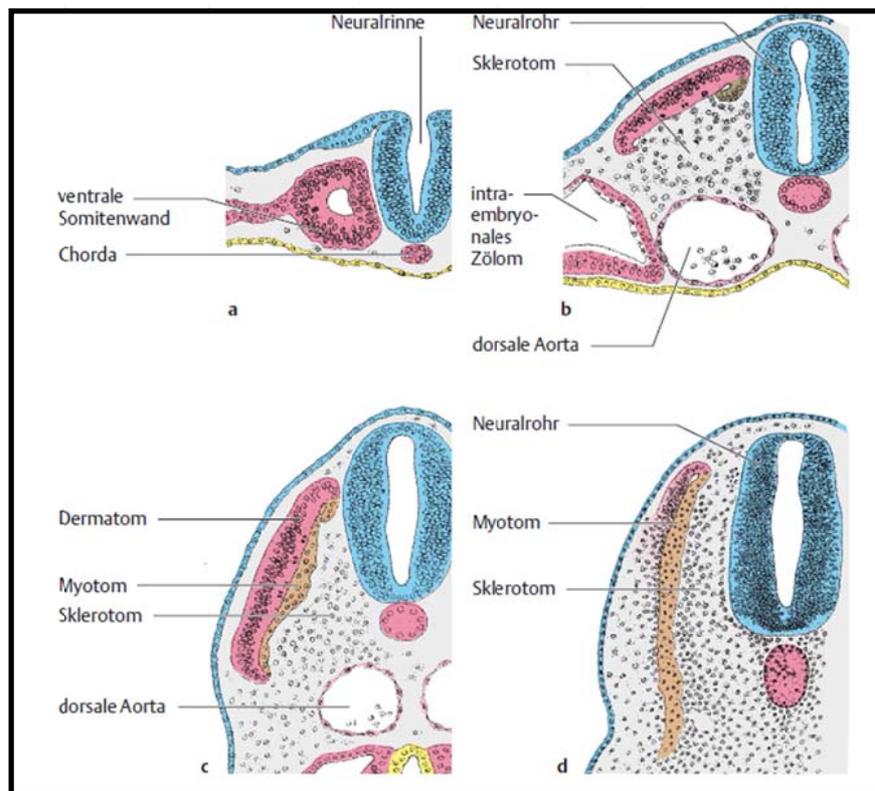


Abbildung 4: Entwicklung der Somiten während der Embryonalentwicklung des Menschen. Querschnitte ab der vierten Embryonalwoche. Aus den dorsalen Anteilen der Somiten entsteht das Dermatomyotom, bestehend aus Dermatom (pink) und Myotom (braun). Aus dem Myotom entwickelt sich die spätere Skelettmuskulatur. Die Zellen des Dermatomyotoms wandern später in die Extremitätenknospen (Sadler 2008, S 103).

1.4.2. Zellkulturmodelle der Myogenese

Die Entwicklung von Skelettmuskelzellen *in vitro* und *in vivo* unterscheiden sich kaum. Beide Vorgänge werden durch dieselben Regulationsfaktoren, MyoD, Myf5, Myogenin und MRF4 (auch Myf6 genannt) gesteuert. Als Modellsystem myogener Stammzellen bzw. der *in vitro* Myogenese können zum Beispiel murine C2C12-Myoblasten oder auch die Rattenmyoblastenzelllinie L6 verwendet werden. Für beide Modellsysteme wurde bereits mehrfach gezeigt, dass sie sich als *bona fide* Modell für die Untersuchung der Differenzierung von Vorläuferzellen zu terminal differenzierten Skelettmuskelzellen eignen (Yaffe u. Saxel 1977, Alexander et al. 2010). An beiden Zellmodellen lässt sich der Vorgang in zwei zeitlich getrennte Prozesse aufteilen. Zunächst erfolgten die Proliferation der Muskelzellen, und anschließend die Expression von Regulationsfaktoren, sowie ein Rückzug der Zellen aus dem Zellzyklus. Danach kommt es zur Bildung kontraktiler Muskelproteine und der Fusion mononukleärer Myoblasten zu terminal

differenzierten mehrkernigen Muskelfasern. Die mononukleären Myoblasten, die MyoD und Myf5 exprimieren, sind auf die Muskelzellentwicklung festgelegt, „committet“, und proliferieren *in vitro* unter mitogenen und serumreichen Bedingungen. Durch Entzug von Serum wird in den Zellen die Transkription von Myogenin aktiviert, wodurch es zu einem irreversiblen Zellzyklusarrest kommt. Durch die Induktion von muskelspezifischen Genen und der Fusion von Myoblasten zu Myotuben erfolgt die terminale Differenzierung der Muskelzellen (Moran et al. 2002).

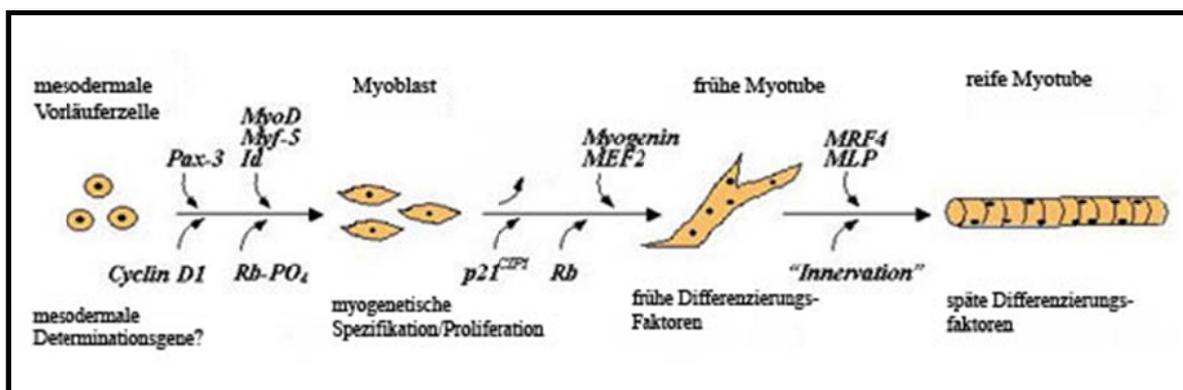


Abbildung 5: Entwicklung der mesodermalen Vorläuferzelle unter dem Einfluss mesodermaler Determinationsgene wie Cyclin D1, Retinoblastom-Protein (Rb-PO₄), Pax3, MyoD, Myf5 und Id (negativer Regulator, der mit der basic Helix-Loop-Helix-Domäne (bHLH) interagiert) zu Myoblasten. Nach der myogenetischen Spezifikation erfolgt nach Aktivierung durch Protein p21, welches mit dem Zellzyklus interagiert, Rb, Myogenin und Myocyte Enhancer Factor (MEF) 2 die Proliferation der Myoblasten. Es entwickelt sich die frühe Myotube, welche sich unter Einfluss von Myogenic Regulation Factor (MRF) 4 und Muskel-LIM-Protein (MLP), was die Muskeldifferenzierung mit beeinflusst, zu einer reifen Myotube entwickelt. Modifiziert nach (Ludolph u. Konieczny 1995).

1.5. Proteinkinasen

Die Aktivierung oder Hemmung von Proteinen, wie zum Beispiel die Phosphorylierung im Rahmen der Signaltransduktion ist insbesondere bei Vorgängen wie der Muskelzelldifferenzierung von Bedeutung. Dies wird unter anderem durch Proteinkinasen vermittelt (Manning et al. 2002). Sie sind essenziell für die Weiterleitung, Modulation und Verarbeitung von Signalkaskaden. Bei den Proteinkinasen handelt es sich um Enzyme, die in der Lage sind, den Transfer von Phosphatgruppen – meist wirkt ATP als Donor – auf die Seitenkettenhydroxylgruppe einer Aminosäure zu katalysieren. Die Proteinkinasen sind sie in der Lage, über 30% des Proteoms zu phosphorylieren und damit die

Lokalisierung, Affinität und Aktivität der Substrate zu beeinflussen. Sie steuern dabei vor allem die Signaltransduktion und Koordination komplexer Signalwege (Manning et al. 2002). Neuere Daten belegen, dass Proteinkinasen der PKD-Familie eine wichtige Rolle bei der Regulation von Prozessen im Zusammenhang mit der Entwicklung von Muskelzellen spielen (Kleger et al. 2011). In dieser Arbeit wurden der Zusammenhang zwischen den verschiedenen Funktionen von PKD1, 3 und insbesondere PKD2 und der Muskelzellendifferenzierung *in vitro*, sowie mögliche Signalwege von PKD1, 3 und insbesondere PKD2 in diesem Kontext untersucht.

1.5.1. Die Proteinkinase D-Familie

Die Familie der Proteinkinase D besteht aus drei Isoformen: PKD1 (PKC μ), PKD2, und PKD3 (PKC ν). Es handelt sich um Serin/Threoninkinasen, die zur Familie der Kalzium/Kalmodulin-abhängigen Kinasen gehören (Calcium/Calmodulin-dependent Kinases, CAMK-Familie) (Rykx et al. 2003). Die PKD-Familie ist in eine Reihe wichtiger biologischer Prozesse, wie die Organisation des Golgi-Apparates, der Abspaltung von Vesikeln vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) (Liljedahl et al. 2001) und die Proliferation und Apoptose der Zellen eingebunden (Rykx et al. 2003) und wird während der Embryogenese differenziell exprimiert (Oster et al. 2006). Untersuchungen über die PKD-Expression während der Embryonalentwicklung haben ergeben, dass PKD1, 2 und 3 zwischen Tag E8,5 bis E14,5 differenziell in Mausembryonen exprimiert werden: PKD1 kann in allen Stadien der Embryogenese nachgewiesen werden. Zunächst ist es ubiquitär im Embryo lokalisiert. An Tag E9,5 kommt es zu einer Zunahme von PKD1 in den Extremitätenknospen. Passend dazu wird PKD1 an Tag E14,5 im Bereich des Achsenskeletts verstärkt exprimiert. PKD2 wird vermehrt ab Tag E14,5 in Geweben des zentralen Nervensystems und der Lunge, aber auch in quergestreifter Muskulatur der Zunge exprimiert. Davor kann es an Tag E9,5 nur in Spuren in den Extremitätenknospen und im mandibulären Branchialbogen detektiert werden (Oster et al. 2006). PKD3 wird in geringen Mengen an Tag E8,5 und E10,5 in Mittel- und Frontalhirn exprimiert und kann von Tag E10 bis E16,5 in sich entwickelndem Herzmuskel, sowie ab Tag E12,5 in Nervenzellen, Bindegewebe und Skelettmuskelzellen nachgewiesen werden (Ellwanger et al. 2008).

1.5.2. Struktur von PKD1, 2 und 3

PKD1, 2 und 3 haben eine gemeinsame Grundstruktur, die aus einer N-terminalen regulatorischen Domäne und einer C-terminalen Kinasedomäne besteht. Der N-Terminus von PKD1 und PKD2 beginnt mit einer apolaren Alanin und/oder Prolin-reichen Region, welche PKD3 nicht aufweist. Alle drei Isoformen besitzen zwei Cystein-reiche Zinkfingerdomänen (CRD), die auch C1a und C1b genannt werden. Zwischen diesen Zinkfingerdomänen liegt eine außergewöhnlich lange Verbindungsregion. Diese Verbindungsregion enthält bei PKD2 einen Serin-reichen Abschnitt. Bei allen drei Isoformen gehen den CRD eine Region, die negativ geladene Aminosäuren enthält, und eine Pleckstrin homology domain (PH-Domäne) vom N-Terminus ausgehend voraus. Die Kinasedomäne enthält eine katalytische Schleife, in welcher sich bei PKD1 die Serinreste Ser⁷⁴⁴ und Ser⁷⁴⁸, bei PKD2 Ser⁷⁰⁶ und Ser⁷¹⁰, und bei PKD3 Ser⁷³¹ und Ser⁷³⁵ befinden, welche bei einer Phosphorylierung zu einer Aktivierung der Kinase führen (Rykx et al. 2003).

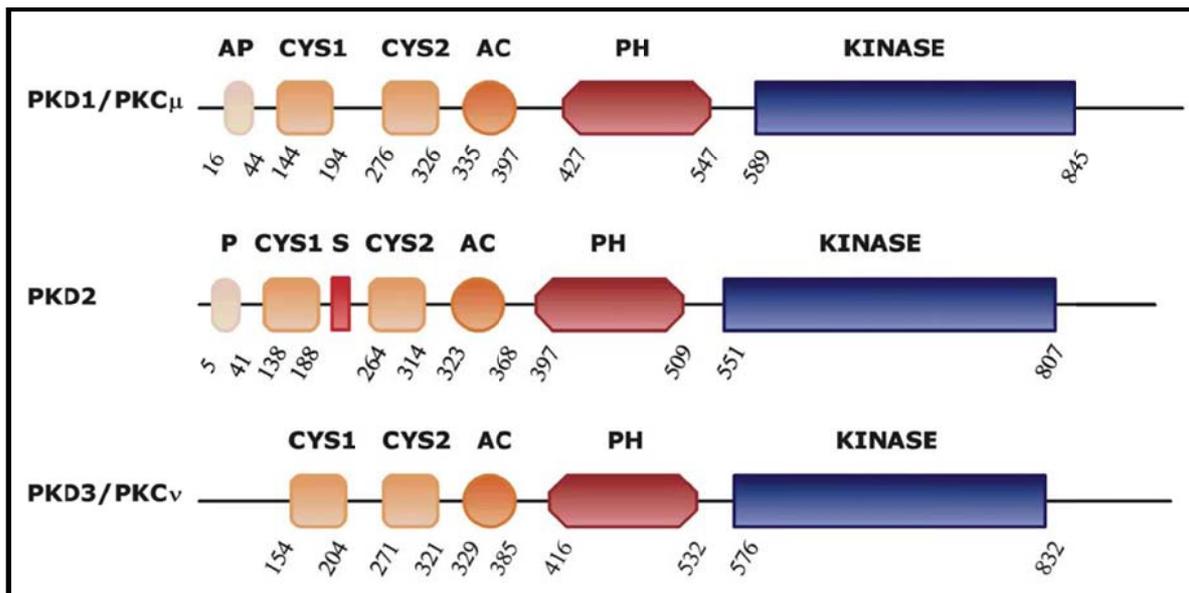


Abbildung 6: Struktur von Proteinkinase D (PKD) 1, 2 und 3. Alle drei Isoformen bestehen aus einer regulatorischen Einheit am N-Terminus und einer Kinasedomäne am C-Terminus des Proteins. Während PKD1 und PKD2 über eine Alanin/Prolin-reiche Region an ihrem N-Terminus verfügen, fehlt diese Domäne bei PKD3. Alle drei Isoformen enthalten zwei Zystein-reiche Domänen (CRDs), welche durch eine mit Aminosäuren beladenen Verbindungsregion (AC) und der Pleckstrin Homology-Domäne (PH) voneinander getrennt sind.

1.5.3. Regulation von PKD1, 2 und 3

Die Aktivität von PKD1, 2 und 3 kann durch verschiedene extra- und intrazelluläre Stimuli aktiviert werden. Dazu gehören Phorbolster, Phospholipase D (PLD), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) (Rykx et al. 2003), reaktive Sauerstoffspezies (Storz et al. 2005), Diazylglyzerol (DAG) (Baron u. Malhotra 2002), oder auch Peptidhormone wie zum Beispiel Gastrin oder Cholezystokinin, die alle letztlich über eine Aktivierung des PKC-Signalweges zur PKD-Aktivierung führen.

Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass PKD2 durch eine Aktivierung des CCKB/Gastrin-Rezeptors über PKC α , PKC ϵ und PKC η in menschlichen gastralen Tumorzellen stimuliert wird (Sturany et al. 2002). Eine Aktivierung des B- und T-Zell-Crosslinks oder ein IgE- und Antigenstimulus in Mastzellen kann ebenfalls zu einer Aktivierung von PKD1 führen (Rykx et al. 2003). *In vivo* kann PKD2 von Neuropeptiden oder Phorbolestern aktiviert werden, die z.B. das Tumorstadium fördern (Sturany et al. 2002).

Die molekulare Regulation von PKD2 erfolgt über mehrere Faktoren. Die PKCs aktivieren PKD1, 2 und 3 direkt über eine Phosphorylierung an den oben genannten Serinresten innerhalb der Aktivierungsschleife der katalytischen Einheit (von Blume et al. 2007, Waldron et al. 2001). Eine Stimulation der GPCRs bewirkt eine Aktivierung von Phospholipasen, was zu einer Inositol-3-Phosphat (I₃P)-vermittelten Kalzium²⁺-Mobilisierung und DAG-induzierten Stimulation der PKCs und damit indirekten Aktivierung, oder zu einer direkten Bindung von DAG an PKD innerhalb der Cystein-reichen Domäne und damit zu einer Aktivierung der PKDs führt (Waldron u. Rozenfurt 2003).

Die PH-Domäne von PKD2 ist ein negativer Regulator der PKD1-Kinaseaktivität, daher führt eine Deletion der PH-Domäne zu einer konstitutiven Aktivierung des Enzyms. Eine Deletion der gesamten CRD-Region von PKD2 führt allerdings nur zu einer geringen Zunahme der basalen katalytischen Aktivität (Auer et al. 2005).

Die jeweiligen Funktionen von PKD1, 2 und 3 hängen nicht nur vom jeweiligen Stimulus, sondern auch von der subzellulären Lokalisation der spezifischen Substrate und/oder der Bindungsmoleküle ab. Außerdem reguliert sich die Funktion von PKD1, 2 und 3 auch durch die subzelluläre Lokalisation der PKDs per se, da, wie insbesondere für PKD2 gezeigt werden konnte, kompartimentspezifisch verschiedene Funktionen ausgeführt werden (Pusapati et

al. 2010, von Blume et al. 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Funktion von PKD1 durch seine Lokalisation an der Plasmamembran reguliert wird: In ruhenden Zellen befindet sich PKD1 vorwiegend im Zytoplasma. Nach einer Aktivierung durch einen Antigen-Rezeptor-Mechanismus wandert es zur Plasmamembran, wo es katalytisch aktiv wird und sich nach einer Phosphorylierung an der Aktivierungsschleife wieder löst. Anschließend steigt die PKD1-Konzentration im Zellkern (Waldron et al. 2001, Oancea et al. 2003). PKD2 ist normalerweise im Zytoplasma lokalisiert, wobei die Kinase konstant ihre Lokalisation zwischen Zytoplasma und Zellkern wechselt, was mit einer kombinierten Aktivität zweier Signale innerhalb der Kinase erklärt wird; ein Signal, welches innerhalb der Verbindungsregion zwischen der C1a- und C1b-Domäne liegt und die Lokalisation innerhalb des Zellkerns vermittelt, und ein Signal, welches in der C1a-Domäne liegt und den nukleären Export vermittelt (von Blume et al. 2007). Eine Akkumulation von PKD2 im Zellkern wird durch eine Phosphorylierung an spezifische Serin-Bindungsstellen innerhalb der Aktivierungsschleife an Ser⁷⁰⁶ und Ser⁷¹⁰ und einem Serin-Rest in der Zinkfingerdomäne von PKD2 vermittelt. Hierdurch erfolgt eine Phosphorylierung von nukleärer Histondeazetylase 7 (HDAC7) durch PKD2, was zu der Ausschleusung von HDAC7 aus dem Zellkern und einer Aktivierung von Genen führt, welche durch HDAC7 supprimiert werden. Dadurch wird die Transkription von MEF-Zielgenen aktiviert (von Blume et al. 2007). Analog zur Aktivierung von PKD1 kann PKD3 an der Plasmamembran detektiert werden, sobald es beispielsweise durch Phorbol-12, 13-Myristatazetat (PMA) aktiviert/phosphoryliert ist (Matthews et al. 2003).

1.5.4. Funktionen der PKDs

Die Mitglieder der PKD-Familie spielen eine Rolle in der Beweglichkeit, Migration und Invasion verschiedener Zellen (Jackson et al. 2006). Darüber hinaus regulieren sie den Proteintransport, indem sie die Abspaltung der Vesikel vom Trans-Golgi-Apparat induzieren (Prigozhina u. Waterman-Storer 2004, Yeaman et al. 2004, von Wichert et al. 2008, Eiseler et al. 2009). Neuere Daten belegen, dass die Mitglieder der PKD-Familie, wie z.B. PKD1, auch eine wichtige Funktion bei der Regulation von Prozessen in Skelett- und Herzmuskelzellen sowie in glatter Muskulatur besitzen: PKD1 hat *in vivo* eine Schlüsselfunktion für den Umbau von

Herzmuskelzellen unter Stressbedingungen (Remodeling). Durch die stressbedingte, PKD1-vermittelte Phosphorylierung der Klasse II HDACs kommt es zu einer Dissoziation der HDACs von MEFs, wodurch es zur Aktivierung von Myocyte enhancer factor 2 (Mef2)-Zielgenen und einem anschließenden Remodeling kommt. PKD1-defiziente Mäuse entwickelten weniger Remodeling mit sekundär besserer Herzmuskelfunktion (Kim et al. 2008, Fielitz et al. 2008). Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Aktivierung des Angiotensin II-Rezeptor 1 (AT1)/PKC/PKD-Signalweges über eine Phosphorylierung von Extrazellulär Signal-regulierte Kinase 5 (ERK5) zu einer Aktivierung von Angiotensin II und somit zur Hypertrophie der aortalen glatten Muskulatur führt (Geng et al. 2009). Des Weiteren ist bekannt, dass PKD1 über die Stimulation von MEF den Muskelaufbau von Typ I-Muskelfasern stimuliert. PKD1 wird dabei vor allem in Typ I-Muskelfasern exprimiert, wobei die PKD1-Überexpression in Typ II-Muskelfasern zu deren Transformation zu langsamen und ausdauernden Typ I-Muskelfasern führt. Passend zu diesen Daten führt die Deletion von PKD1 zu schnellerer Ermüdbarkeit (Kim et al. 2008). Außerdem werden PKDs durch Insulin-like-growth factors (IGFs) aktiviert, welche als bedeutende Regulatoren für die Muskelzellendifferenzierung gelten (Schiaffino u. Mammucari 2011, Czifra et al. 2006 Wakioka et al. 2001). Damit liegt eine essenzielle Funktion der verschiedenen PKD-Isoformen bei der Myogenese nahe.

1.6. Fragestellung

Neben einer Vielzahl von Funktionen der PKD-Familie durch die Beeinflussung der Signaltransduktion zeichnet sich eine bedeutende Rolle dieser Kinasefamilie für die Funktion der verschiedenen Muskeltypen ab. Dies beinhaltet das HDAC-vermittelte kardiale Remodeling und die Hypertrophie glatter Muskulatur. Beides sind jedoch Prozesse des adulten Organismus, die letztlich nur indirekte Rückschlüsse auf die Rolle der PKDs während der Differenzierung und Regeneration von Muskelgewebe zulassen. Die differenzielle Expression der drei Isoformen während der Embryonalentwicklung lassen jedoch eine entscheidende Rolle der PKDs für diese Prozesse vermuten.

Unter Verwendung von C2C12-Zellen als *in vitro* Modell untersuchte die vorliegende Arbeit die Funktion der PKD-Isoformen 1, 2 und 3 für die embryonale

Skelettmyogenese und die Skelettmuskelstammzellendifferenzierung. Durch die Kombination dieses Modellsystems mit lentiviralem Gen- und short hairpin Ribonukleinsäure (shRNA)-Transfer, biochemisch funktionellen Analysen und quantitativen Analysen der Gen- und Proteinexpression wurde die Fragestellung untersucht (i) ob und in welchen Mengen PKDs in C2C12-Zellen exprimiert werden und ob eine der PKD-Isoformen während der Differenzierung katalytisch aktiv ist. (ii) Führt ein „Loss of Function“ oder ein „Gain of function“ von PKDs zu einer Veränderung der Differenzierung von C2C12-Zellen und primären Satellitenzellen? (iii) Wenn ja, wie wird diese Veränderung reguliert?

Zusammengefasst liefert die vorliegende Arbeit eine umfassende Charakterisierung der funktionellen Rolle der drei PKD-Isoformen mit einem besonderen Schwerpunkt auf die Isoform PKD2.

2. Materialien und Methoden

2.1. Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen Qiagen, Roche, Merck, Fluka, Roth, Sigma, Invitrogen/GIBCO, PAA oder BioRad bezogen und besaßen den Reinheitsgrad ‚pro analysi‘. Andere Bezugsquellen sind bei der Beschreibung der jeweiligen Methode erwähnt.

2.2. Verwendetes Laborequipment

- 1) Gewebskulturschalen (Nunc): 100mm, 60mm, 35mm
- 2) 6-Well und 24-Multiwell Platten (Nunc)
- 3) Kryoröhrchen (Nunc) zum Einfrieren der C2C12-Zellen
- 4) 6-Well-Platten mit sterilisierten Deckgläschen für Immunfluoreszenzanalysen
- 5) Gewebskulturinkubator (Heraeus): 37°C und 5% CO₂
- 6) Biophotometer Eppendorf für RNA-, DNA-, und Proteinbestimmung
- 7) Westernblotsystem (BioRad)
- 8) Chemi-Smart Chemilumineszenz-System (PeqLab)
- 9) Phasenkontrastmikroskop (Olympus)
- 10) Fluoreszenz Mikroskop (Carl Zeiss)
- 11) Lightcycler® System (Roche)
- 12) FACS-Gerät LSRII

2.3. Zellkultur

2.3.1. Verwendete Zellen

Der Einfluss von Proteinkinase D (PKD) auf die Muskelzelldifferenzierung wurde anhand von C2C12-Zellen untersucht. Die Zellen wurden über die European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK) bezogen. Für den Vergleich der PKD1-, 2- und 3-Expression wurden NIH3T3-Zellen und einmal passagierte, primäre embryonale Mausfibroblasten verwendet. Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293, und die humanen AGS-Magenkarzinomzellen wurden über ATCC bezogen.

2.3.2. Medien und Medienzusätze

Wachstumsmedium C2C12-Zellen:

- Duplecco's Modified Eagle Medium high Glucose-Basismedium (DMEM, GIBCO Invitrogen)
- 4,5g/l Glucose und L-Glutamin
- 20% fötales Kälberserum (FCS, PAA)
- 1% Penicillin G und Streptomycinsulfat (GIBCO)

Differenzierungsmedium C2C12-Zellen:

- DMEM mit 5% Pferdeserum
- 1% Penicilin/Steptomycin
- 1% Glutamax

Wachstumsmedium von AGS-Zellen:

- DMEM
- 10% FCS
- 1% Penicillin G und Streptomycinsulfat

2.3.3. Für die Zellkultur verwendete Substanzen

Penicillin–Streptomycin (GIBCO):

- 0,85% PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)
- 10000Units/ml Penicillin G
- 10000µg/ml Streptomycinsulfat

Glutamax (GIBCO)

- 200mM Stocklösung
- 0,85% NaCl

Gefriermedium

- 90% FCS
- 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma)

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

- NaCl 10g/l
- KCl 0,25g/l
- Na₂HPO₄ 1,44g/l
- KH₂PO₄ x 2H₂O 0,25g/l

Zelldissoziationslösung:

- 100ml 10xTrypsin (GIBCO)
- 900ml PBS

2.3.4. Additiva

Inhibitoren bestimmter Signalwege:

PKC-Inhibitoren

Die Inhibitoren Gö6976 und Gö6983 wurden von der Firma Calbiochem bezogen und in DMSO gelöst.

Der Inhibitor Gö6976 ist bekannt als Inhibitor der Proteinkinase C (PKC) und hemmt selektiv PKC α -Isoenzyme und PKC β . Die Aktivität der Kinasen PKC δ , ϵ und ζ wird nicht beeinflusst (Wang et al. 1998, Stempka et al. 1997, Gschwendt et al. 1996)

Gö6983 ist ein potenter Hemmstoff der Proteinkinase C, der die diversen Isoenzyme PKC α , β , γ , δ und ζ hemmt. Er hemmt nicht PKC μ und kann somit dazu verwendet werden, PKC μ von den anderen Proteinkinasen zu unterscheiden.

Für die Versuche wurde eine 10mM Lösung des Inhibitors mit DMSO (Dimethylsulfoxid) angesetzt, wie in Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Inhibitoren. Für die Zielkonzentration von 10mM wurden bei Gö6976 132 μ l DMSO (Dimethylsulfoxid) hinzugefügt, bei Gö6983 113 μ l.

Inhibitor	Gö6976, 500 μ g	Gö6983, 500 μ g
Molekulargewicht	378,4g	442,5g
Zielkonzentration	10mM	10mM
DMSO-Zusatz	132 μ l	113 μ l

Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA)

PMA wurde von der Firma Cell Signaling akquiriert und lag 200 μ M in DMSO gelöst vor. PMA gilt als potenter Verstärker der Phosphorylierung der Aktivierungsschleife und damit der katalytischen Aktivität von PKCs und PKDs (Rykx et al. 2003).

2.4. Reagenzien für den Dual Luziferase Reporter Assay

- Luciferase Assay Reagent II, (LAR II) für das Lumineszenzsignal. 1 Phirole Substrat wurde mit 10ml LAR II-Puffer gemischt, aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.
- Stop & Glo®-Reagenz für das Renilla-Signal. Das 50x Stop&Glo-Substrat wurde 1:50 in Stop&Glo-Puffer verdünnt und sofort verwendet.
- 5x Passive Lysis Buffer (PLB) zur Lyse adhärenter Zellen, 1ml PLB auf 4ml ddH₂O

2.5. Reagenzien zur Immunfluoreszenzfärbung

1) Methanol/Aceton Fixierlösung

- 70% Methanol
- 30% Aceton

2) Formaldehyd (37%, Roth)

- 3,7% Fixierlösung
- 10% Succhrose
- 1ml 37% Formaldehyd und 1ml 100% Succhrose auf 8ml ddH₂O

3) 50mM Ammoniumchlorid (NH₄Cl)

- Molekulargewicht 53,49g
 - 1M → 53,49g
 - 50mM → 53,49x5/100
 - 50mM → 2,6g auf 1l ddH₂O

4) 0,1% Triton-X (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

5) 0,1% Goat Serum (Sigma) +1% Fish Skin Gelatine in PBS

6) Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories Inc., USA)

7) Antikörper

Tabelle 2: Antikörper zur Immunfluoreszenzfärbung. Dargestellt sind die verschiedenen Zielstrukturen und die Verdünnungsfaktoren der Immunfluoreszenzantikörper.

Antikörper	Zielstruktur	Verdünnungsfaktor	Hersteller
Anti-MF20	Myotuben	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa
Anti-Phalloidin (568- oder 488-konjugiert)	Aktin	1:50	Invitrogen
4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI	Zellkerne	1:20 000	Millipore
Anti-Pax7-Antikörper	Pax7	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa

2.6. Reagenzien zur Isolierung zellulärer Ribonukleinsäure (RNA) mittels Qiagen RNeasy Mini Kit

- 1) Trypsin
- 2) PBS
- 3) RLT-Puffer (aus Kit) + 10µl β-Mercaptoethanol pro 1ml RLT-Puffer. Enthält Guanidin und Thiocyanat für die Denaturierung und Inaktivierung von RNAsen, um die Aufreinigung intakter RNA zu gewährleisten.
- 4) RW1-Puffer für die Aufreinigung der RNA (Kit)
- 5) RPE-Puffer für die Aufreinigung der RNA (Kit)
- 6) H₂O
- 7) 70% Ethanol absolut für die Bindung der RNA an die Säule

2.7. Reagenzien zur quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR)

- 1) QuantiTect SYBR Green RT-PCR-Master Mix:
HotStarTaq® DNA Polymerase
QuantiTect SYBR Green RT-PCR-Puffer mit TrisCl, KCl, (NH₄)₂SO₄,
5mM MgCl₂, pH 8.7
dNTP Mix mit dUTP
SYBR Green I
ROX für stabile basale Fluoreszenz, die ins Verhältnis zu SYBR-Green Fluoreszenz gesetzt wird

- 2) QuantiTect RT Mix (rekombinante heterodimere Enzyme aus E.coli):
Omniscript® Reverse Transkriptase
Sensiscript® Reverse Transkriptase
- 3) RNase-freies Wasser
- 4) Primer: Es wurden die Primer für Pax7, MyoD, Myogenin, nAch, PKD1, 2 und 3 benutzt.

Als House-Keeping-Gen wurde die murine Hydroxymethylbilansynthase (mHMBS) benutzt. Bei sämtlichen verwendeten Primern handelte es sich um QuantiTect primer Assays (Qiagen).

2.8. Reagenzien für den lentiviralen Knock-down

2.8.1. pLKO.1-puro (MISSION® shRNA; Sigma)

Es handelt sich um einen lentiviralen Vektor in dem die short hairpin Ribonukleinsäure (shRNA) gegen Proteinkinase D2 (PKD2) sowie eine Puromycin-Resistenz exprimiert werden. Die 4 Einzelkonstrukte gegen PKD2 wurden aus der uns vorliegenden Mission shRNA-Bibliothek (Sigma) entnommen, wo sie als Glycerolstock vorliegen. Nach Animpfen des Glycerolstocks auf 200ml LB-Medium und Kultur über Nacht wurde die Plasmid-Desoxyribonukleinsäure (DNA) Kit-basiert aus den Bakterien isoliert und aufgereinigt. Die Konzentration der pLKO-1-puro-shRNA-PKD2-Plasmide lag um 1µg/µl.

2.8.2. pCMV-dR8.91 (www.addgene.com)

Kodiert für die Gag und Pol Komponente des Virions und wird zusammen mit VSV-G als Verpackungsplasmid zur Herstellung lentiviraler Partikel benötigt.

2.8.3. pCMV-VSV-G (www.addgene.com)

Kodiert für die VSV-G Komponente des Virions und wird zusammen mit Gag und Pol als Verpackungsplasmid zur Herstellung lentiviraler Partikel benötigt.

2.8.4. Retrovirale pSM2 shRNA-Bibliothek (Open Biosystems, Huntsville, USA)

Die shRNA-Konstrukte gegen PKD1 und 3 wurden aus dieser Bibliothek wie oben beschrieben als Glycerolstock entnommen. Mittels Restriktionsverdau des Plasmids mit Mlu1 und Xho1 wurde die ca. 350 Basenpaare (Bp) lange mir30-

Kassette zusammen mit dem entsprechenden shRNA-hairpins isoliert und in den mit denselben Enzymen geschnittenen pGIPZ-Vektor über Nacht ligiert.

2.8.5. pGipz (Open Biosystems, Huntsville, USA)

Es handelt sich um einen lentiviralen Vektor in dem die shRNA gegen PKD1 bzw. 3 sowie eine Turbo-Green Fluorescent Protein (GFP)-Kassette und eine Puromycinresistenz exprimiert werden.

2.8.6. MSCV (Clontech)

Es handelt sich dabei um einen retroviralen Vektor zur Expression von copy Desoxynukleinsäuren (cDNAs) und einer Neomycinkassette zur Zellaufreinigung. Über die EcoR1-Schnittstelle wurde die PKD2-Kassette aus dem pcDNA3-Vektor in den MSCV-Vektor kloniert. Die richtige Orientierung wurde über Finanzierung geprüft.

2.8.7. Polybren (Sigma-Aldrich)

Polykation, welches durch eine Abschirmung von Ladungen auf der Zellmembranoberfläche das Eindringen von Viren in die Zelle zu erleichtert.

2.9. Reagenzien für Western Blots

2.9.1. Lysepuffer für die Proteingewinnung

1) PKD2-Lysepuffer

- 50mM Tris/HCl pH 7,6
- 2mM Ethylenglycol-bis-tetraessigsäure (EGTA)
- 2mM Ethylen-di-amintetraessigsäure (EDTA)
- 1% Triton x-100
- 2mM Dithiothreitol (DTT)
- Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Roche)

2) MF20-Lysepuffer

- 100mM Tris, pH 6,8
- 2% Sodiumdodecylsulfat (SDS)
- 10% Glycerol
- 0,05% Phenol Rot

100mM DTT

Protease Inhibitor Cocktail Tablette

2.9.2. Polyacrylamidgele zur Proteintrennung

Tabelle 3: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele. Dargestellt ist die Zusammensetzung des 4%igen Sammelgels und der 8- und 10%igen Trenngele. Doppelt destilliertes H₂O entspricht ddH₂O, Sodiumdodecylsulfat entspricht SDS, Ammoniumpersulfat entspricht APS, N,N,N,N,N'-Tetramethylethylen-diamin entspricht TEMED.

Komponenten	Sammelgel (4%)	Trenngel (8%)	Trenngel (10%)
Acrylamid (30%)	1,3ml	5,35ml	6,6ml
Tris HCl pH 6,8 0,5M	2,5ml	-	-
Tris HCl pH 8,8 1,5M	-	5ml	5ml
ddH ₂ O	6,2ml	9,32ml	8,2ml
SDS 20%	50µl	100µl	100µl
APS 10%	50µl	100µl	100µl
TEMED	10µl	20µl	20µl

2.9.3. 10x Running Buffer

151,1g Tris (Sigma)

720,6g Glycin

50g SDS

10x Running Buffer wurde zum Gebrauch 1:10 verdünnt.

2.9.4. 10x TBS T-Waschlösung

121g Tris

400g NaCl

5000ml H₂O

pH 7,6

Zu 100ml 10x TBS wurden 900ml H₂O und 1ml Tween gegeben.

Western Blot Antikörper:

Tabelle 4: Western Blot Antikörper. Dargestellt sind die Zielstrukturen der Western Blot-Antikörper, die verschiedenen verwendeten Verdünnungsfaktoren und die jeweiligen Hersteller. PKD entspricht Protein Kinase D, MHC entspricht Myosin Heavy Chain.

Antikörper	Zielstruktur	Verdünnungs-faktor	Hersteller
pPKD Ser744/748	phosphoryliertes PKD	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-PKD1	PKD1	1:1000	Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, USA
Anti-PKD2	PKD2	1:1000	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA
Anti-PKD3	PKD3	1:1000	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA
Anti- Myogenin	Myogenin	1:500	University of Iowa, Iowa City, USA
Anti-MHC	Myosin heavy chain	1:500	University of Iowa, Iowa City, USA
Anti-MyoD	MyoD	1:500	Santa Cruz Inc.
Anti-β-Aktin	Aktin	1:1000	Sigma Aldrich

2.10. Zellkultur

2.10.1. Zellkulturbedingungen

Alle Arbeiten wurden mit sterilen Lösungen unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in Zellkulturflaschen (Nunc) im oben genannten Nährmedium. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 60-70% erreicht hatten, wurden sie passagiert, um eine Differenzierung zu vermeiden und die Selbsterneuerung der Zellen zu aktivieren. Die Differenzierung der C2C12-Zellen wurde durch eine Aussaat am Vortag von 3x10⁵ Zellen/Well auf 6-Well-Schalen erreicht. Damit erreichten sie am Tag des Mediumwechsels, Tag 0 der Differenzierung, eine Dichte von 80-90%. Die Konfluenz der Zellen sowie der Mediumwechsel von Wachstumsmedium mit 20% FCS auf Hungermedium mit 5% Pferdeserum (HS) führten zu einer Induktion der Differenzierung. Die morphologische Beurteilung der Zellen erfolgte während der

Differenzierung mit lichtmikroskopischen Aufnahmen oder nach Aussaat der Zellen auf Deckgläschen über Immunfluoreszenzfärbungen.

2.10.2. Passagieren der Zellen

Bei einer Konfluenz der Zellen zwischen 60 und 70% mussten die Zellen passagiert werden, um die Zellqualität beibehalten zu können. Dazu wurden die Zellen in PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin–EDTA inkubiert. Die dadurch von der Zellkulturflasche gelösten Zellen wurden in DMEM aufgenommen und in verschiedenen Verhältnissen von 1/10 bis 1/30 der Gesamtmenge in frische Zellkulturflaschen überführt. Zellen anderer Zelllinien wurden ab einer Konfluenz von 80-90% entsprechend mit Verhältnissen von 1/3 bis 1/5 passagiert.

2.10.3. Kryokonservierung der C2C12-Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die C2C12-Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin–EDTA inkubiert. Die dadurch von der Zellkulturflasche gelösten Zellen wurden in DMEM aufgenommen und bei 1000U/min. für 5min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Das Zellpellet von zwei bis drei 50ml-Flaschen wurde in 5ml Gefriermedium aufgenommen. Es wurde zügig in auf Eis gelagerte Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden 2-3 Tage bei -80° gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff transferiert.

2.10.4. Auftauen der C2C12-Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten C2C12-Zellen, die in 1-1,5ml Gefriermedium gelöst sind, wurden kurz auf Eis gelagert und danach in der Hand angetaut. Anschließend wurde unter ständigem Auf- und Abpipettieren warmes Medium auf die Zellen gegeben. Sobald alle Zellen aufgetaut waren, wurden sie auf eine 25ml-Falcon Kulturflasche ausgesät.

2.10.5. Transiente DNA-Transfektion adhärenter Zellen

Die Transfektion wurde mit Lipofectamin 2000 (Fa. Invitrogen) durchgeführt. Für eine DNA-Transfektion wurden die Zellen am Vortag auf eine Dichte von etwa 60% in 6-Well-Schalen ausgesät, was einer Zellzahl von 1×10^5 entspricht. 24h später wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben. Hier wurden für jede 6-Well-Schale 2µg DNA mit 4µl Lipofectamin verwendet. Sowohl DNA als auch

Lipofectamin wurden zunächst mit jeweils 500µl Optimem vermengt. Nach 5 Minuten Inkubationszeit bei RT wurden beide Reagenzien miteinander vermischt. Nach weiteren 20 Minuten Inkubationszeit wurde das Reagenz auf die Zellen gegeben. 24h später wurde die DNA-haltige Lösung von den Zellen entfernt.

2.11. Reporter Assays

Die C2C12-Zellen wurden mit Lipofectamin transfiziert wie oben beschrieben. Es wurden die PKD2-Konstrukte PKD2-WT, PKD2-SE, und PKD2-DA, sowie pcDNA3 mit Mef2D oder Mef2D mutiert und Renilla transfiziert. Nach 24h erfolgte ein Mediumwechsel mit Wachstumsmedium. 12 weitere Stunden später wurden die Zellen geerntet und mit Dual Luciferase Assay Kit (Promega, Mannheim, Germany) ausgewertet. Die relativen Lichteinheiten (RLU) wurden über die Firefly-Luziferaseaktivität ausgewertet, welche mit der Renillaluziferaseaktivität eines kotransfizierten pRL-TK-Plasmids ins Verhältnis gesetzt wurde.

2.11.1. Transfektionsschema der Reporterassays

Alle Proben wurden mit 50ng Renilla transfiziert. Die vier Bedingungen wurden mit 100ng des Mef2D-Reporters, die anderen vier Bedingungen mit 100ng des mutierten Mef2D-Reporterkonstrukts transfiziert. Die Zellen wurden mit 2µg der drei PKD2-Konstrukte oder pcDNA3 jeweils für Mef2D und Mef2D mut. inkubiert.

Tabelle 5: Transfektionsschema des Mef2D Reporterassays

Bedingungen 1-8 entsprechen den verschiedenen Transfektionskombinationen, nach denen die C2C12-Zellen transfiziert worden sind. In allen Bedingungen wurden die Zellen mit Renilla kotransfiziert, die Zellen der Bedingungen 1-4 alle mit Myocyte enhancer factor 2D (Mef2D) und die Zellen der Bedingungen 5-8 mit dem mutierten Mef2D-Vektor. In 1 und 5 wurde zusätzlich pcDesoxyribonukleinsäure (DNA3) kotransfiziert, in 2 und 6 Proteinkinase D 2 Wildtyp (PKD2-WT), in 3 und 7 PKD2-2SE (konstitutiv aktives PKD2 mit Mutation des S^{706/710}), in 4 und 8 katalytisch inaktives PKD2 (PKD2-DA).

Bedingung	1	2	3	4	5	6	7	8
Renilla	+	+	+	+	+	+	+	+
pcDNA3	+	-	-	-	+	-	-	-
PKD2-WT	-	+	-	-	-	+	-	-
PKD2-2SE	-	-	+	-	-	-	+	-
PKD2-DA	-	-	-	+	-	-	-	+
Mef2D	+	+	+	+	-	-	-	-
Mef2D mutiert	-	-	-	-	+	+	+	+

2.11.2. Modifiziertes Dual Luziferase Assay Kit-Protokoll

- 1) Waschen der Zellen mit PBS
- 2) Zugabe von 200µl Passive Lysis Buffer, kurze Einwirkzeit, anschließend Abschrapen der Zellen
- 3) Einfrieren der Zellen für mindestens eine Stunde bei -80°C
- 4) Vorlage von 50µl LAR II
- 5) Vorbereitung von Renilla 1:50 in Stop&Glo Puffer
- 6) Zentrifugation des Proteins bei 14 000U/min.
- 7) Entfernung von 10µl Überstand, Zugabe zu LARII
- 8) Messung
- 9) Zugabe von 50µl Renilla
- 10) Messung

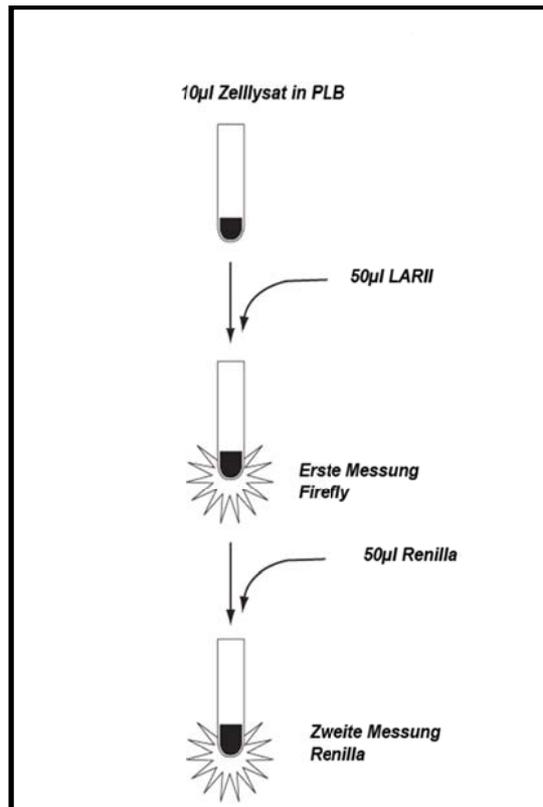


Abbildung 7: Schema des Luciferaseassays. Das durch das Kit gewonnene Zelllysate wurde mit 50µl Luciferase Assay Reagent (LAR)II versetzt. Die erste Lumineszenzmessung wurde durchgeführt. Anschließend wurden 50µl Renilla zu dem Lysat gegeben und die zweite Lumineszenzmessung durchgeführt (aus Dual-Luciferase Reporter Assay Quick Protokoll, Promega, Reproduktion mit Erlaubnis der Promega Corporation).

2.11.3. Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT)-Enzyme Assay

Der in dieser Arbeit verwendete CAT-Enzyme Assay wurde bei Promega akquiriert und gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Die Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) wird von einem bakteriellen Resistenzgen kodiert, inaktiviert Chloramphenicol durch eine Azetylierung und ist in Eukaryonten nicht vorhanden, so dass hier keine basale CAT-Aktivität gemessen wird, weshalb es sich für Reporter Assays in Säugetierzellen sehr gut eignet. Die möglichen regulatorischen Einheiten wurden mit dem passenden pCATR3-Reporter-Vektor kombiniert und anschließend in die Zellen transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und die CAT-Aktivität anschließend mit zwei durch Promega etablierte Methoden verifiziert.

2.11.4. Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen

Für die Bestimmung der vitalen Zellen in den jeweiligen Untersuchungsbedingungen wurde das CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay von Promega verwendet, welches die Anzahl der vitalen Zellen auf Basis der Menge des produzierten ATPs bestimmt. Das Reagenz reagiert mit dem ATP der vitalen Zellen und entwickelt eine Luziferaseaktivität, die mit der Vitalität der Zellen proportional ist. Die Zellen wurden dazu in gleichen Dichten ausgesät, für 48h kultiviert und anschließend mit dem Cell Titer Glow Assay behandelt und die Lumineszenz gemessen.

2.11.5. Zellzyklusanalysen

Für die Zellzyklusanalyse der PKD2-Knock-down- und Kontroll-C2C12-Zellen wurden die Zellen 48h inkubiert und anschließend mit eiskaltem Ethanol fixiert. 24h später wurden die Zellen mit Propidium Jodid gefärbt und mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) wurde die DNA-Menge quantifiziert. Mithilfe der Software ModFit LT (Verify Software House, Topsham, MA, USA) wurden die Zellzyklusprofile erstellt und die Anzahl an Zellen in Synthese- (S), Gap1 (G1)- und Gap2 (G2)-Phase bestimmt. In Zusammenarbeit mit PD Dr. Cornelia Brunner, Institut für physiologische Chemie Universität Ulm)

2.12. Prinzip der lentiviralen shRNA-Übertragung und Generierung stabiler C2C12-Zelllinien

Die folgenden Experimente wurden ausschließlich in einem zertifizierten S2-Labor durchgeführt. Die für die virale Hülle kodierenden Vektoren pCMV-dR8.91 und pCMV-VSV wurden zusammen mit dem Expressionsplasmid MSCV-PKD2-WT nach der Calciumphosphat-Methode in 293T-Zellen kotransfiziert. Nach 48-72h wurde der Überstand, der die Viruspartikel enthält, abgenommen und mit 0,2µm Filtern gereinigt. Der Überstand wurde im Verhältnis 1:1 mit Wachstumsmedium gemischt um damit für 12h die C2C12-Zellen zu infizieren. Dieser Vorgang wurde innerhalb von 48h insgesamt viermal mit den in Kultur wachsenden Zellen durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in Wachstumsmedium weiter kultiviert und durch die Zugabe von 500µg/ml und anschließend 1g/ml Neomycin auf gereinigt.

Die shRNA-Vektoren gegen PKD2 wurden von Sigma-Aldrich kommerziell als Bestandteil der Mission Kinase Bibliothek® erworben. Die vier shRNA-Vektoren waren jeweils gegen verschiedene Zielsequenzen von PKD2 gerichtet. Für die Generierung lentiviraler Partikel wurden die Vektoren pLKO-shRNA-PKD2-1,2,3 oder 4 (3µg), pCMV-dR8.91 (2,7µg) und pCMV-VSV-G (0,3µg) in 293T-Zellen mit Fugene 6 (Roche) in 7ml Medium auf einer 10cm-Schale transfiziert. Der Überstand der 293T-Zellen wurde abgenommen. Damit wurden die Zellen in zwei Durchgängen für 24-48h mit Hilfe von 8µg/ml Polybren transduziert. Anschließend wurden die Zellen für 5 Tage in Wachstumsmedium mit 3µg/ml Puromycin aufgereinigt.

Für den Knock-down von PKD1 und 3 wurde die shRNA-Kassette zusammen mit der mir30-Sequenz aus der retroviralen pSM2-whole genome-Bibliothek geschnitten und in den pGipzy-Vektor kloniert. Drei verschiedene shRNAs gegen PKD1 bzw. PKD3 wurden anschließend gepoolt. Die lentiviralen Partikel wurden mit der Calciumphosphat-Methode in 293T-Zellen generiert, wobei die folgenden Verhältnisse verwendet wurden: p-Gipzy-shRNA-PKD1 oder 3 (15µg), pCMV-dR8.91 (10µg) und pCMV-VSV (5µg). Nach 48-72h wurde der Überstand, der die Viruspartikel enthält, abgenommen und mit Filtern mit einer Porengröße von 0,2µm gereinigt. Der Überstand wurde im Verhältnis 1:1 mit Wachstumsmedium gemischt um damit für 12h die C2C12-Zellen zu infizieren. Dieser Vorgang wurde innerhalb von 48h insgesamt viermal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in Wachstumsmedium weiter kultiviert. Die infizierten Zellen wurden dann für 5 Tage mit 3µg/ml Puromycin aufgereinigt. Ein pGipz-Vector mit Scramble-shRNA diente als Kontrolle.

2.13. Immunfluoreszenzfärbungen

2.13.1. Färbeprotokoll

- 1) Medium absaugen, 3x mit PBS waschen, anschließend 37° warmes 3,7% Paraformaldehyd (PFA)+10% Succhrose dazugeben. 10min. bei Raumtemperatur (RT) inkubieren.
- 2) PFA absaugen, 3x mit PBS waschen, anschließend 50mM NH₄Cl auf die Zellen geben, 10min. bei RT inkubieren
- 3) NH₄Cl absaugen, 3x mit PBS waschen, anschließend 0,1% Triton-X dazugeben.

- 4) Triton-X absaugen, 3x mit PBS waschen, anschließend Goat Serum 0,1% + Fish Skin Gelatine auf die Deckgläschen geben, für 45min. in feuchter Kammer inkubieren.
- 5) Goat Serum 0,1% und Fish Skin Gelatine absaugen, 3x mit PBS waschen, anschließend 1.-Antikörper in Blocklösung bzw. PBS in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C.
- 6) 1.-Antikörper absaugen, 3x mit PBS waschen, anschließend 2.-Antikörper dazugeben, 30min. bei RT inkubieren.
- 7) Nach 30min. Phalloidin 1:50 auftropfen, weitere 15min. inkubieren
- 8) 2.-Antikörper und Phalloidin absaugen, 3x mit PBS waschen. Auf die Deckgläschen 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) geben, für 3-5min. bei RT inkubieren.
- 9) Zweimal mit PBS waschen, einmal mit destilliertem Wasser, anschließend vorsichtig abtropfen lassen. Einen kleinen Tropfen Mountingmedium auf den Objektträger geben. Kante des Deckgläschens auf Tropfen stellen und langsam absinken lassen.

2.13.2. Pax7-Färbung primärer Satellitenzellen

Die Arbeiten mit den primären Satellitenzellen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Tümpel und Dr. Anett Illing, Institut für Molekulare Medizin und Max-Planck-Forschungseinrichtung für Stammzellalterung, Universität Ulm durchgeführt.

- 1) Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Sortierung der Zellen auf Glasobjektträger
- 2) Trocknen der Zellen bei RT
- 3) Fixierung mit 4% PFA in PBS
- 4) Block mit MOM Kit (Vector Labs)
- 5) Permeabilisierung mit Triton-X
- 6) Inkubation mit Pax7-Antikörper über Nacht bei 4°C
- 7) 3x mit PBS waschen, Inkubation mit Zweitantikörper mit Alexa 488-anti-Maus-IgG-Antikörper für 1h bei 37°C

2.13.3. Quantifizierung von Myotuben

Die Zellen wurden mit Myosin heavy chain (Anti-MF20)-Antikörpern und die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt, wobei 10 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder pro Bedingung in drei voneinander unabhängigen Experimenten fotografiert wurden. Jede MHC-positive Zelle pro Gesichtsfeld wurde gezählt und als Myotube definiert. Anschließend wurde der Fusionsindex gebildet, indem die Zellkerne der MHC-positiven Zellen gezählt und in folgende Gruppen eingeteilt wurden: Myotuben mit einem Zellkern, Myotuben mit 2-3 Zellkernen, Myotuben mit mehr als drei Zellkernen.

2.13.4. Messung von Zelllänge- und Breite

Für die Messung von Zelllänge und Breite wurden die Zellen gegen MHC gefärbt und die absoluten Längen und Breiten über ImageJ ausgemessen. Für die Messung der Zelllänge der PKD2-überexprimierenden Zellen wurden 30 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder lichtmikroskopisch abfotografiert und die Zelllänge jeder abgrenzbaren Zelle pro Gesichtsfeld ausgemessen. Der Prozentsatz der Zellen wurde mit den absoluten Zahlen berechnet

2.14. Quantitative Polymerasekettenreaktion

2.14.1. Wirkprinzip der RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mithilfe des RNeasy Mini-Kits von Qiagen. Dabei können bis zu 100µg RNA isoliert werden. Das Wirkprinzip beruht auf einer Kombination der spezifischen Bindungseigenschaften einer Silikagel-Membran mit der Geschwindigkeit bei der „Mikrospin-Technologie“. Durch ein spezielles Salzpuffersystem werden RNA-Fragmente selektiv ab einer Länge von ca. 200 Basenpaaren durch Bindung an die Membran isoliert. Damit werden ribosomale– (5.8SrRNA und 5SrRNA) und transfer–RNA (tRNA), die etwa einen Anteil von 15–20% der gesamten RNA ausmachen, selektiv ausgeschlossen.

2.14.2. RNA-Extraktionsprotokoll

- 1) Waschen der Zellen mit PBS, absaugen
- 2) Zugabe von RLT-Puffer zur Lyse und Homogenisierung der Probe.
- 3) Probe auf „Qia-Shredder“ zur Denaturierung der Zellen laden.
Zentrifugation für 2min. bei 14 000U/min., Eluat NICHT verwerfen!

- 4) Zugabe von 350µl 70% Ethanol absolut zum Eluat für die Bindung der RNA auf die Membran. Gut mischen. Auf RNeasy-Säule laden, 1min. bei 14 000U/min. zentrifugieren, Eluat verwerfen.
- 5) Zugabe von 700µl RW1-Puffer, anschließend 1min. bei 14 000U/min. zentrifugieren, Eluat verwerfen
- 6) Zugabe von 500µl RPE-Puffer, anschließend 1min. bei 14 000U/min. zentrifugieren, Eluat verwerfen
- 7) Letzten Schritt wiederholen
- 8) Säule 2min. bei 14 000U/min. trocken zentrifugieren und in frisches Cup überführen
- 9) 30-50µl RNase-freies Wasser auf die Membran tropfen. 1min. bei 14 000U/min. Für höhere RNA-Menge eventuell letzten Schritt wiederholen.
- 10) Eluat bei -80° lagern.

2.14.3. Quantitative Real Time-PCR

Für die Expressionsanalysen der Muskeldifferenzierungsmarker wurden Real-Time-PCR-Analysen durchgeführt. Dazu wurden das QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR-Kit zusammen mit dem Lightcycler® von Roche benutzt. Für diesen Versuch werden die Reagenzien in dünnwandige Glaskapillaren pipettiert, wodurch ein schnellerer Temperaturwechsel in der Probe ermöglicht wird, der die PCR-Reaktion erleichtert. Die Glaskapillaren sind in einem motorbetriebenen Karussell kreisförmig angeordnet. Pro Lightcyclerlauf können in diesem Gerät maximal 32 Proben analysiert werden. Am Ende eines jeden PCR-Zyklus wird die Fluoreszenz des an doppelsträngige DNA bindenden Farbstoffes SYBRGreen™ gemessen.

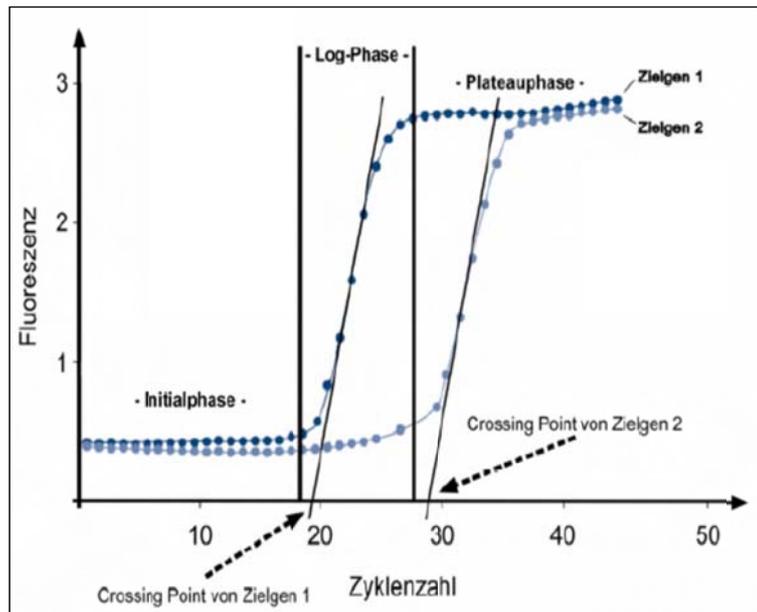


Abbildung 8: Darstellung der „Crossing Points“ in Abhängigkeit zur Fluoreszenz. Zielgen 1 hatte eine höhere Ausgangsmenge an RNA als Zielgen 2, der Crossing point liegt bei 20 Zyklen (aus „quantitative one-step PCR“, Qiagen).

2.14.3.1. qPCR-Protokoll

Für jede Probe wurden

- 7,8µl Wasser
- 1µl Primer
- 10µl SYBR-Green
- 0,2µl RT-Mix

verwendet. Dementsprechend wurden die Werte mit der Anzahl der Proben multipliziert. Es wurde alles auf Eis pipettiert und die Glaskapillaren in einem bei 4°C vorgekühlten Kühlblock gekühlt.

- 1) SYBR-Green auf Eis auftauen, gut vortexen
- 2) Primer, SYBR-Green und Wasser zusammenpipettieren
- 3) Zuletzt RT-Mix dazugeben
- 4) 1µl RNA in die Glaskapillare vorlegen
- 5) 19µl des Mastermix dazu geben
- 6) 1min. bei 1000U/min. zentrifugieren

2.14.3.2. Verwendetes Lightcyclerprogramm

- 1) Reverse Transkription für 20min. bei 50°C
- 2) Aktivierung der Hot-StartTAQ-Polymerase für 15min. bei 95°C
- 3) PCR-Zyklen
 - a. Denaturierungsphase für 15sec. bei 94 °C

- b. Annealingphase für 20sec. bei 55°C
 - c. Elongationsphase für 17sec. bei 72°C
 - d. Fluoreszenzmessung am Ende jedes Zyklus
- 4) Schmelzkurvenanalyse
- a. Temperaturerhöhung von 65°C auf 95°C um jeweils 1°C mit kontinuierlicher Fluoreszenzmessung
- 5) Kühlung des Reaktionsansatzes für 2min. bei 40°C

2.14.3.3. Berechnung der Mengen der Zielgene

Für die relative Quantifizierung der Menge der Zielgene wurde das Verhältnis zwischen der vorhandenen Menge des Zielgens und dem so genannten „House-Keeping“-Gen berechnet. Unter House-Keeping-Genen versteht man eine Reihe von Genen die für Proteine kodieren, die essentiell für den Erhalt wichtiger zellulärer Funktionen sind. Man geht davon aus, dass sich daher die Expression dieser Gene trotz der Veränderungen verschiedener Faktoren wie Zellzyklus oder Differenzierung nicht verändert. Daher eignen sich diese Gene als Referenzgene, vor allem bei der Untersuchung von Expressionsprofilen. In dieser Arbeit wurde als House-Keeping-Gen die murine Hydroxymethylbilansynthase (mHMBS) verwendet. In die Berechnung der absoluten Menge von RNA gehen der Crossing Point und die Steigung der Regressionsgeraden des Zielgens mit ein.

2.15. Proteinbiochemische Analysen

2.15.1. Herstellung von Gesamtzelllysaten

2.15.1.1. Proteingewinnung mit Lysepuffer für PKD-Detektion

- 1) Reinigung der adhärenen Zellen mit eiskaltem PBS
- 2) Abschrapen der Zellen von der Schale
- 3) Aufnahme in 1ml PBS, Zentrifugation bei 1200U/min. für 4min.
- 4) Entnahme des Überstands
- 5) Lösung des Pellets in 1ml PBS, dann Zentrifugation für 1min. bei 14 000U/min.
- 6) Entnahme des Überstands, Position des Zellpellets auf Eis
- 7) Zugabe von Lysepuffer (3x Pelletvolumen)
- 8) Mechanische Zellyse
- 9) 10min. Inkubation auf Eis

- 10) Mechanische Zellyse
- 11) Zentrifugation für 10min. bei 14 000U/min.
- 12) Überführen des Überstands in neues Tube

2.15.1.2. Proteingewinnung mit Lysepuffer für die Detektion von myogenem Myosin Heavy Chain (MF20)

- 1) Bis Schritt 7 identisches Protokoll wie bei 2.15.1.1
- 2) Zugabe von 5x Pelletvolumen, gut mischen
- 3) Mechanische Zellyse
- 4) Inkubation unter Rotation bei 4° für 1h
- 5) Mechanische Zellyse
- 6) Proteinbestimmung, anschließend Zugabe von DTT

Proteinbestimmung mittels Bradford Reagenz

2.15.1.3. Bestimmung der Standardreihe:

- 1) 5x Bradford Reagenz (BioRad) 1:5 mit Wasser verdünnen.
- 2) 0, 2, 4, 6, 8 und 10µg bowines Serumalbumin (BSA), 1µg/µl, im Abstand von 30sec. in 1ml Bradford geben
- 3) mischen, 4min. inkubieren lassen
- 4) Mithilfe des BioRad Photometer Proteinmenge im Abstand von 30sec. messen

2.15.1.4. Proteinbestimmung

- 1) 1:5 verdünntes Bradford Reagenz in Photometereppis vorlegen
- 2) 30sec.-Takt jeweils 2µl Protein dazugeben
- 3) mischen, 4min. inkubieren
- 4) Nach Ablauf von 4min. messen
- 5) Berechnung der benötigten Menge an Protein in Abhängigkeit von der Konzentration

2.15.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

- 1) Gel nach oben genanntem Rezept gießen. 8% für PKD2 und MHC, für andere Proteine 10%-Gele. 1 Rezept reicht für 4 Gele.
- 2) Über Nacht in feuchter Kammer auspolymerisieren lassen

- 3) SDS Puffer (950 μ l+50 μ l β -ME) herstellen. Davon 1/3 zum Protein geben, gut mischen, bei 99° für 5min. aufkochen
- 4) Protein auf Gel laden
- 5) Marker (SDS-Page-Marker von BioRad) und Protein auftragen. 1,5h bei ca. 150mV laufen lassen
- 6) Transfer des Gels auf PVDF-Membran (Millipore Corporation, Bedford, USA)
- 7) Transferhalterung schließen und in mit Transferpuffer gefüllte Kammer stellen
- 8) 3h bei 400mA laufen lassen
- 9) Membran aus Transferkammer entnehmen und in 5% Milchpulver oder BSA (pPKD-Antikörper) in TBS-T für 30min. blocken.
- 10) Inkubation mit 1.-Antikörper über Nacht bei 4°C (β -Aktin 1h bei RT)
- 11) 3x 15min. in TBS-T waschen
- 12) Inkubation mit 2.-Antikörper für 1h
- 13) 3x 15min. in TBS-T waschen
- 14) Membran für 5min. mit 1:1 Chemilumineszenz Detection Kit inkubieren
- 15) Chemilumineszenz mit Chemi Smart messen.

2.15.3. Dichteanalyse

Die Dichteanalyse wurde mithilfe von BioProfil BIO-1D Software, Version 12.04 (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Germany) durchgeführt. Die relative Bandenintensität jeder Bedingung wurde gemessen und entweder mit PKD2 oder β -Aktin ins Verhältnis gesetzt.

2.15.4. Immunpräzipitation

- 1) Sepharose A Beads waschen
 - a. 750 μ l (abhängig von Zahl der Reaktionen) bei 1000U/min. 1min. zentrifugieren
 - b. Überstand abnehmen, verwerfen
 - c. Ca 700 μ l Lysis Buffer dazugeben, bei Schritt a) weiter machen (insgesamt 3x)
 - d. Am Ende 450 μ l Lysis Buffer dazu geben, leicht schütteln

2) Aufreinigungsschritt

- a. 2000µg Protein in PKD2-Lysepuffer+ 20µl Protein Sepharose A Beads → ½ h bei 4° rotieren lassen
- b. Bei 1000U/min. 1min. zentrifugieren
- c. Überstand vorsichtig abnehmen, in frisches Tube überführen

3) Präzipitationsschritt

- a. 2µg Antikörper auf Überstand geben (PKD2 oder IgG, Santa Cruz Inc.) → 1h rotieren lassen
- b. 80µl A-Beads dazugeben → 1h rotieren lassen
- c. 1min. bei 1000U/min.
- d. Überstand abnehmen

4) Reinigungsschritt

- a. 1ml Lysis Buffer dazugeben, in der Hand schütteln
- b. 1min. bei 1000U/min.
- c. Überstand verwerfen
- d. Insgesamt 4x durchführen

5) Endschrift

- a. 30µl 2x Lämmli Buffer dazu geben
- b. 10min. bei 95° kochen → Auf Gel laden (10%)

2.15.5. Statistische Analysen

Alle Versuche wurden mit C2C12-Zellen gleicher Qualität und Passage durchgeführt. Die Zellen wurden stets über die Neubauer Zählkammer ausgezählt und in den verschiedenen Versuchen angepassten gleichen Zellzahlen ausgesät. Die morphologischen Auswertungen, die Western Blot-Analysen und deren Quantifizierungen, sowie die quantitativen PCR-Analysen wurden in mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt.

Wenn keine anderen Angaben vorliegen, wurden für die Abbildungen dieser Arbeit der Standardfehler (Standard Errors of the Mean, SEM.) dargestellt und die *p*-Werte durch den Student *t*-Test berechnet. $P < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) wurden als Signifikanzniveau angenommen. Für den Einfluss des RNA-vermittelten PKD-Knock-downs auf die Entwicklung von MHC-positiven Zellen während der C2C12-Zelldifferenzierung wurde der Wilcoxon-Test als parameterfreie Statistik verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. C2C12 als Modell zur Skelettmuskelstammzellendifferenzierung

Erstes Ziel dieser Doktorarbeit war die Etablierung und Standardisierung der C2C12-Zellkulturbedingungen. Ein wesentliches Problem der C2C12-Zellen ist die frühzeitige und nicht kontrollierte Differenzierung bei nicht optimalen Kulturbedingungen. Daher wurden verschiedene Beschichtungen, Kulturschalen und Zellmengen/cm² ausgetestet. Unter Verwendung von nicht beschichteten NUNC-Zellkulturschalen und -Flaschen sowie einer Aussaat von 5×10^4 Zellen in eine 10cm²-Schale oder 1×10^5 in einer 75cm³-Flasche konnten optimale Kulturbedingungen für undifferenzierte C2C12-Zellen geschaffen werden (**Abbildung 9A-D**). Im nächsten Schritt wurde die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Myotuben standardisiert. Dazu wurden 3×10^5 Zellen einen Tag vor Beginn der Differenzierung ausgebracht. Diese Zellzahl ergab eine ca. 80 % Konfluenz an Tag 0, wobei bereits einzelne Zell-Zell Kontakte vorlagen. Durch Serumentzug (20% fötales Kälberserum (FCS) auf 2% Pferdeserum (HS)) wurde die Differenzierung eingeleitet, wobei einige Zellteilungen noch stattfanden, die dann das 100% konfluente Zellbild an Tag 2 ergeben. Sichtbar war an Tag 2 bereits die Ausrichtung der Myoblasten in eine Richtung (**Abbildung 9B**). Auf diesen Prozess folgte die sogenannte Zellfusion, die zur Ausbildung kleiner Myotuben führte (**Abbildung 9C**). Nach 5-6 Tagen fanden sich vollständig ausgebildete Myotuben, die sich in Größe und Form unterschieden. Von besonderem Interesse war dabei die Anzahl an Zellkernen pro Myotube, anhand derer der sogenannte Fusionsindex kalkuliert werden kann (**Abbildung 9D**). Damit konnte ein standardisiertes Zellkulturmodell zur Untersuchung von Differenzierungsvorgängen in einem Modellsystem für Skelettmuskelstammzellen etabliert werden, wodurch Proteine wie die Proteinkinasen D in ihrer Wirkung auf diesen Prozess genauer untersucht werden können.

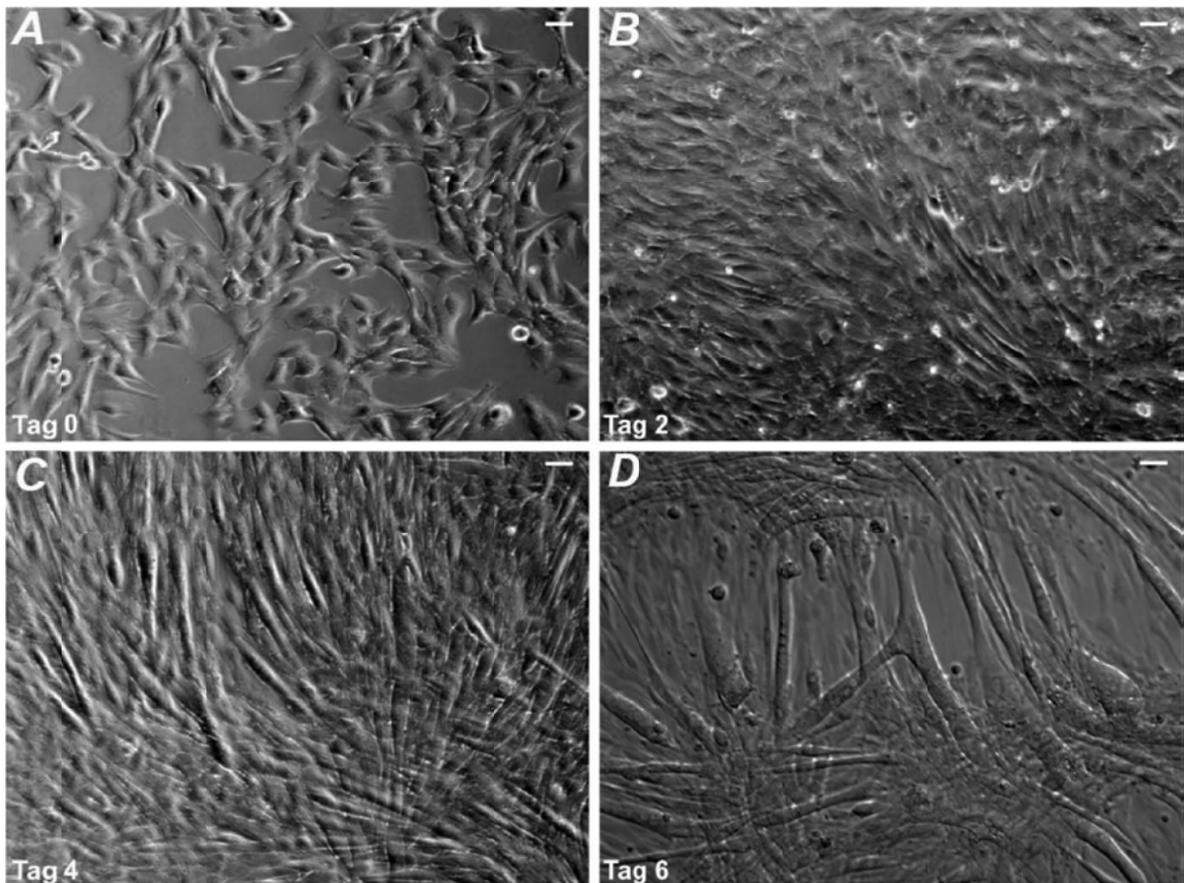


Abbildung 9A-D: Die Differenzierung von C2C12-Zellen rekapituliert die Myogenese in vitro. 3×10^5 Zellen/Well eines Sixwells wurden an T -1 ausgebracht, um eine Dichte von etwa 70% an Tag 0 zu erreichen (A). Die Differenzierung wird durch einen Mediumwechsel von Wachstumsmedium auf Differenzierungsmedium induziert. (B) Dichte der Zellen an Tag 2 (100%) mit Ausrichtung der Zellen in Reihen. (C) Zunehmende Myotubenfusion mit Bildung überwiegend multinukleärer Zellen. (D) Größenzunahme und Verzweigung der einzelnen Myotuben. Der Größenbalken entspricht $100 \mu\text{m}$. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus sechs voneinander unabhängigen identischen Experimenten.

3.2. Expression von PKDs in C2C12-Zellen und im adulten Skelettmuskel

Die verschiedenen Proteinkinase D (PKDs) werden differenziell in der Skelettmuskulatur des sich entwickelnden Mausembryo exprimiert (Oster et al. 2006). Um festzustellen, ob die verschiedenen PKD-Isoformen eine Rolle bei der Differenzierung von Skelettmuskelstammzellen spielen, wurde die qualitative Expression der drei Isoformen in der murinen Myoblastenzelllinie C2C12 als Modellsystem der Skelettmuskelentwicklung untersucht. PKD2 und PKD3 sind beide stark in undifferenzierten C2C12-Zellen exprimiert, wohingegen PKD1 kaum exprimiert wird (**Abbildung 10A**). Embryonale Mausfibroblasten (Mefs) bzw. 3T3

Zellen dienten als Positivkontrollen. Ein ähnliches Bild findet sich im terminal differenzierten Skelettmuskel (**Abbildung 10B**). Im nächsten Schritt wurde die Expression der drei Isoformen quantitativ mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) in sich differenzierenden C2C12-Zellen untersucht. **Abbildung 10C** bestätigt die geringe basale PKD1-Expression in undifferenzierten C2C12-Zellen. Interessanterweise wird auch PKD1 nicht differenziell reguliert (**Abbildung 10C**). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Expression von PKD2 ein bis zu 6facher Anstieg von PKD2 einen Tag nach Beginn der Differenzierung, gefolgt von deutlich niedrigeren PKD2-messenger-Ribonukleinsäuren (mRNA)-Mengen während der terminalen Stadien der Differenzierung (**Abbildung 10D**). Ein komplementäres Expressionsprofil zeigt hingegen PKD3, dessen Expression zu Beginn und während den Zwischenstadien relativ stabil bleibt, wohingegen die Expression an Tag 6 stark ansteigt (**Abbildung 10E**). Damit liegen unterschiedliche Funktionen der drei PKD-Isoformen bei der C2C12-Zelldifferenzierung nahe, wobei PKD2 für die Initiierung und PKD3 für den Erhalt der Differenzierung von Bedeutung zu sein scheint.

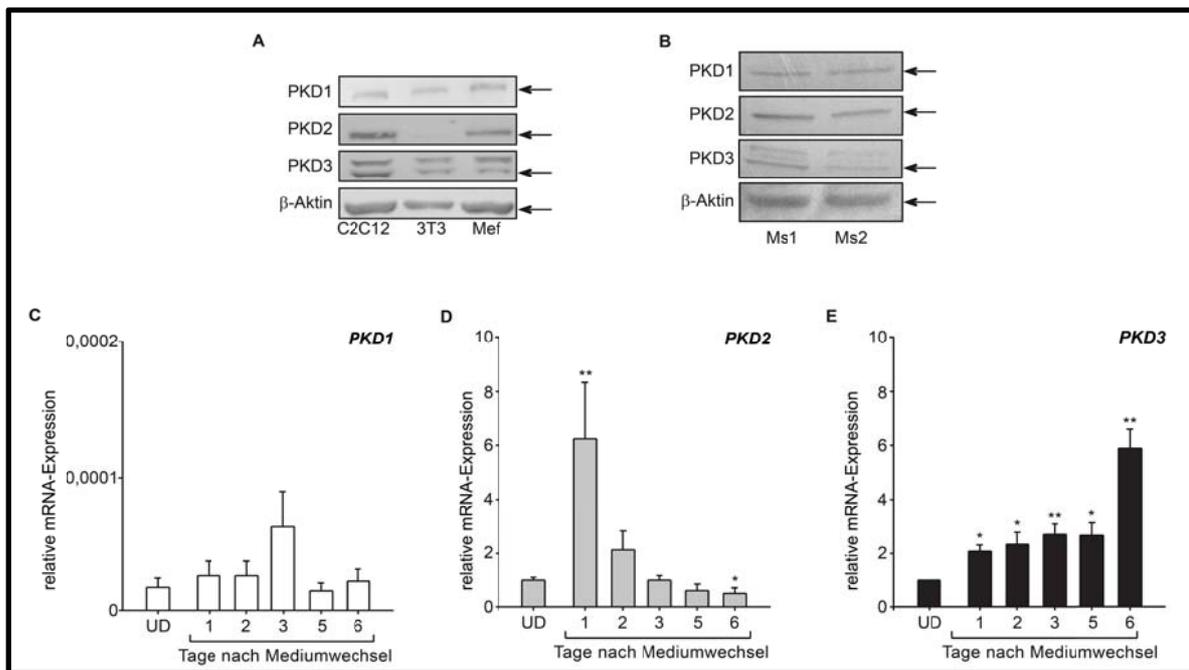


Abbildung 10A und B: (A) **Proteinkinase D2 (PKD2) ist die vorherrschende Isoform in undifferenzierten und differenzierten C2C12-Zellen.** Western Blot von PKD1, 2, und 3 in undifferenzierten C2C12-Zellen unter Wachstumsbedingungen. NIH3T3-Fibroblasten und murine embryonale Fibroblasten (Mefs) dienen als Positivkontrolle. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. (B) **PKD-Expression im terminal differenzierten murinen Skelettmuskel.** Western Blot von PKD1, 2, und 3 mit Zelllysaten aus dem rechten und linken M. tibialis anterior zweier Mäuse (Ms1, Ms2). (C-E): **Expressionsprofil von PKD1, 2, und 3 während der Muskelzellendifferenzierung.** Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)-Analyse von PKD1 (C), PKD2 (D) und PKD3 (E) in undifferenzierten (UD) und differenzierenden C2C12-Zellen an Tag 1-6 nach Induktion von Differenzierung durch Serumentzug. Die relativen messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Mengen sind auf der Ordinate abgebildet und werden als Verhältnis von PKD1, 2 und 3 zum „Housekeeping“-Gen murine Hydroxymethylbilansynthase (mHMBS) ausgedrückt. Es wurden drei unabhängige Experimente \pm Standard Error of Means (SEM) untersucht und mit dem Student *t*-Test auf Signifikanz geprüft. $P < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**).

3.3. Sphingosin-1-Phosphat (S1P) phosphoryliert PKDs in C2C12-Zellen

Proteinkinasen werden durch zahlreiche extrazelluläre Signalproteine nach Bindung an deren Rezeptoren und anschließender Aktivierung der Signalkaskade phosphoryliert und somit aktiviert. Daher interessierte uns an dieser Stelle, welche für die Differenzierung von Skelettmuskelzellen wichtigen Signalproteine auch PKDs aktivieren können. Insulin-like growth factors (IGFs) gelten als wichtige Regulatoren der Muskelzellendifferenzierung und Myogenese *in vivo* (Schiaffino u.

Mammucari 2011, Czifra et al. 2006). Außerdem konnte in menschlichen Skelettmuskelzellen und in C2C12-Zellen gezeigt werden, dass IGF über eine Aktivierung von PKC zu einer vermehrten Proliferation und Fusion führt (Schiaffino u. Mammucari 2011, Czifra et al. 2006). Daher wurde zunächst untersucht, ob eine Inkubation von C2C12-Zellen mit IGF zu einer Phosphorylierung und somit Aktivierung von PKD führte. Dies ließ sich bei einer Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von IGF jedoch nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Ligand, dessen Bindung an seine Rezeptorfamilie, die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) (LPAR₁₋₅, S1PR₁₋₅, OGR1, GPR4 und GPR12 (Pyne u. Pyne 2000)) über die Steigerung der Expression von Differenzierungsfaktoren wie Myogenin, Myosin heavy chain und Caveolin-3 zu einer beschleunigten Differenzierung von C12C12-Zellen führt, ist das bioaktive Lipid S1P. In **Abbildung 11A** ist abgebildet, dass eine Inkubation von C2C12-Zellen mit S1P zu einer deutlich gesteigerten Phosphorylierung von PKD führte. Dieser Effekt war bereits nach 5, bzw. 10 Minuten nachweisbar und zeigte sich dosisabhängig: Eine höhere Konzentration von S1P führte zu einer vermehrten Phosphorylierung. Die Quantifizierung des phospho-PKD-Signals mittels Densitometrie (**Abbildung 11B**) ergab eine 1,5-fache Erhöhung der Phosphorylierungsaktivität nach 10 Minuten Inkubation mit 10µM S1P im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Somit konnte gezeigt werden, dass PKDs durch einen bekannten Aktivator der Muskelstammzellendifferenzierung aktiviert werden können.

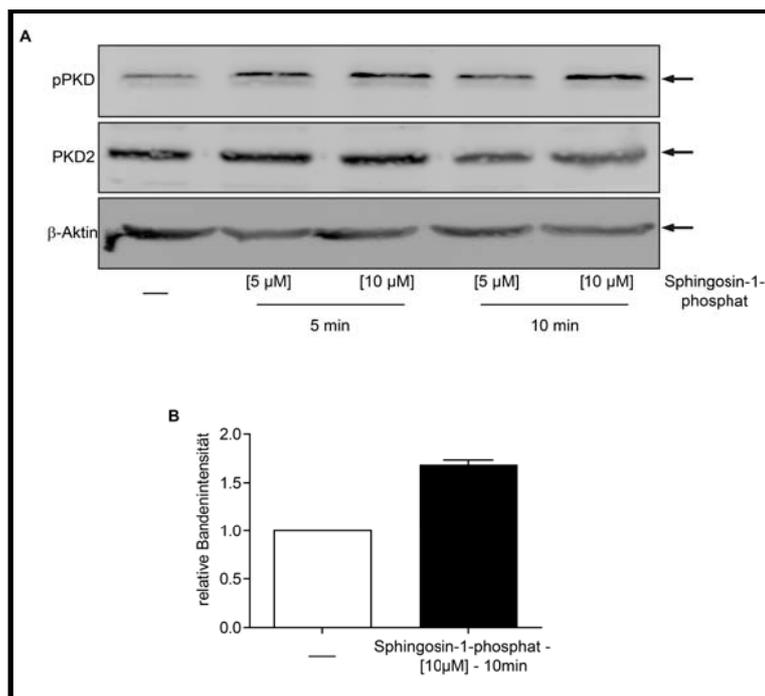


Abbildung 11A-B: (A) Sphingosin-1-Phosphat (S1P) phosphoryliert/aktiviert Proteinkinase D (PKD) in C2C12-Zellen. Dargestellt sind im Western Blot die Phosphorylierung von PKD (Ser 744/748) sowie das PKD2-Protein. Undifferenzierte C2C12-Zellen wurden entweder mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt (-), oder mit S1P, 5 μ M und 10 μ M für jeweils 5 und 10 Minuten und lysiert. **(B) Quantifizierung der PKD-Phosphorylierung nach S1P-Stimulation.** Die Menge von phosphoryliertem PKD ohne Behandlung (-) und nach Inkubation mit 10 μ M S1P wurde mittels Bandendensitrometrie gemessen und in Verhältnis zur PKD2-Expression gesetzt. Dargestellt sind jeweils die Werte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm SEM.

3.4. PKD2 wird bei der Einleitung der Differenzierung phosphoryliert

Die bisherigen Daten zeigen, dass PKD2 und 3 die dominanten PKD-Isoformen in C2C12-Zellen sind, wobei in den ersten Tagen der Differenzierung (Tag 1 und 2) vorwiegend PKD2 exprimiert wird. Der folgende Abschnitt beschäftigt sich daher mit der Aktivierung der PKDs während der Differenzierung.

Im ersten Schritt wurde die Expression physiologischer Markerproteine der Myogenese untersucht (**Abbildung 12A**). Wie in der Literatur zu C2C12-Zellen beschrieben, exprimierten undifferenzierte C2C12-Zellen MyoD, welches mit der Einleitung der Differenzierung hochreguliert wurde, um gegen Ende der Differenzierung wieder abzufallen. Die geringe Ausprägung dieser Hochregulation ist durch die sehr hohe basale MyoD-Expression in C2C12-Zellen zu erklären. Gefolgt von der MyoD-Expression wurde Myogenin exprimiert, welches für die

Expression von Sarkomerproteinen wie Myosin Heavy Chain (MHC) von Bedeutung ist. Passend dazu konnte ab Tag 2 die kontinuierliche Zunahme der MHC-Expression im Zellkulturmodell nachgewiesen werden. Die gezeigten Expressionsprofile waren in zahlreichen Experimenten reproduzierbar. Damit konnte gezeigt werden, dass das etablierte Zellmodell nicht nur morphologisch sondern auch auf molekularer Ebene die Skelettmuskelstammzellendifferenzierung rekapituliert.

Die gezeigten mRNA-Expressionsprofile legen nahe, dass besonders PKD2 für die Einleitung der Differenzierung wichtig zu sein scheint. Die Proteinexpression im Western Blot für PKD2 spiegelte die Expressionsprofile auf mRNA-Ebene wieder, mit einem Anstieg um Tag 1 und 2, gefolgt von einem Abfall gegen Ende der Differenzierung (**Abbildung 12A**). Anschließend wurde die Phosphorylierung von PKDs im Rahmen der Differenzierung untersucht. Zur Verwendung kam ein phosphospezifischer Antikörper, der die Phosphorylierung von PKD 1, 2 und 3 an den Serinresten 744/748 detektiert. Mithilfe dieses Antikörpers kann im konventionellen Western Blot nur eine Aktivierung aller drei PKD-Isoformen innerhalb der Aktivierungsschleife, welche katalytische Aktivität anzeigt, detektiert werden, nicht jedoch die Aktivierung einer bestimmten PKD-Isoform. Undifferenzierte C2C12-Zellen zeigten eine basale PKD-Phosphorylierung. Diese stieg nach Serumentzug bei Einleitung der Differenzierung an Tag 1 und 2 signifikant an. Die densitometrische Quantifizierung der Bandenintensität im Western Blot ergab eine bis zu zweifach gesteigerte Aktivität von PKD (**Abbildung 12 A, B**). Um zu bestätigen, dass es sich hierbei um Phosphorylierung von PKD2 handelt, wurde eine Immunopräzipitation von PKD2 an T0 und T1 der Differenzierung durchgeführt. Immunpräzipitierte PKD2 wurde im Phospho-PKD (pPKD)-Western Blot weiter untersucht (**Abbildung 12C**). Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der PKD2-Phosphorylierung an Tag1 der Differenzierung. Die Spezifität des in dieser Arbeit verwendeten PKD2-Antikörpers ist aus **Abbildung 13** ersichtlich. Hier wurde nach Überexpression der PKD-Isoformen in HEK 293-Zellen nur PKD2 detektiert, es zeigte sich keine Kreuzreaktion mit PKD1 und 3. Somit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von PKD2 eng mit zwei bedeutenden Schritten für die Initiation der Muskelzellendifferenzierung, dem Serumentzug und der Zunahme der Zelldichte auf über 90%, zusammenhängt (**Abbildung 12A-C**). Darüber hinaus konnte gezeigt werden,

dass eine Inkubation nicht konfluenten, undifferenzierter C2C12-Zellen mit dem Phorbol-ester PMA, einem potenten Aktivator von PKCs und PKDs, zu einer vermehrten Phosphorylierung von PKD in der Aktivierungsschleife und somit zu einer vermehrten katalytischen Aktivität von PKD (**Abbildung 12D**) führt.

Die Familie der PKCs gehört zu den Hauptregulatoren der PKD-Aktivität in verschiedenen Zellsystemen. Der Inhibitor Gö6983 hemmt vor allem die katalytische Aktivität der "klassischen" und "neuen" PKCs, wohingegen der Inhibitor Gö6976 vor allem die "klassische" PKC α und die PKDs hemmt. Eine Inkubation der C2C12-Zellen mit Gö6983 in einer Konzentration von 5 μ M unterdrückte sowohl die basale als auch die durch PMA stimulierte Aktivierung von PKD. Dies bedeutet, dass die PKCs auch in C2C12-Zellen zu den Hauptregulatoren von PKD gehören (**Abbildung 12D**). Die selektive Hemmung von PKD über Gö6976 (5 μ M) führte ebenfalls zu einer reduzierten PKD-Phosphorylierung in C2C12-Zellen. Der Effekt beider Inhibitoren auf die PMA-induzierte Phosphorylierungsaktivität von PKD war konzentrationsabhängig mit einer maximalen Hemmwirkung zwischen 5 und 10 μ M (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob die beiden Inhibitoren auch die physiologisch induzierte PKD-Phosphorylierung/-Aktivierung im Rahmen der Einleitung der Differenzierung unterdrücken können. Dazu wurden 3×10^5 C2C12-Zellen an Tag -2 auf 10cm²-Schalen ausgesät und an Tag -1 mit beiden Inhibitoren inkubiert. Die Behandlung mit PMA erfolgte an Tag 1 der Differenzierung. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass PKDs in nicht konfluenten, undifferenzierten C2C12-Zellen konstitutiv in der Aktivierungsschleife phosphoryliert werden und dass dies durch PKCs vermittelt wird. Die Aktivierung der PKDs im Zusammenhang mit der Muskelzelldifferenzierung kann durch die chemischen Inhibitoren Gö6983 und Gö6976 gehemmt werden (**Abbildung 12E und F**).

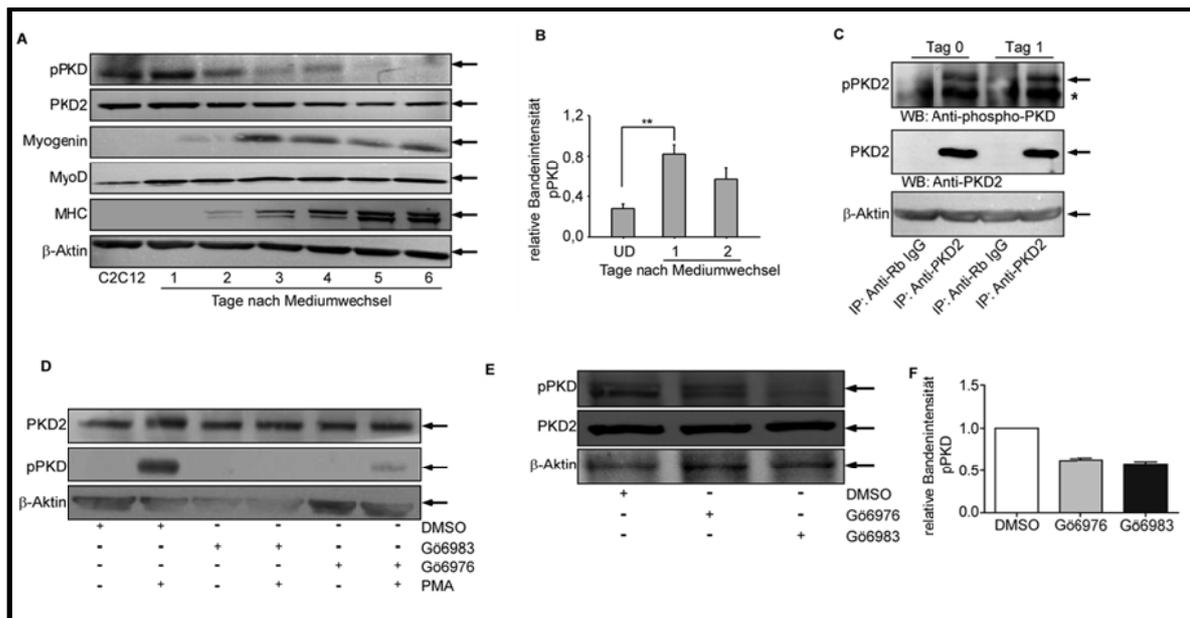


Abbildung 12A-F: Proteinkinase D2 (PKD2)-Aktivierung während der Muskelstammzellendifferenzierung. (A) Western Blot von PKD2 und phosphoPKD (pPKD) während der C2C12-Zellendifferenzierung. Western Blots mit Myogenin, MyoD und Myosin Heavy Chain (MHC) in undifferenzierten C2C12-Zellen und an Tag 1 bis 6 nach Mediumwechsel. **(B) Quantifizierung der PKD-Phosphorylierung.** Bandendensitometrische Auswertung der pPKD-Expression an Tag 0 (UD), 1 und 2 im Verhältnis zur basalen PKD2-Proteinexpression. **(C) Spezifische Phosphorylierung der Isoform PKD2 während der C2C12-Zellendifferenzierung.** Immunpräzipitation (IP) von PKD2 mit anschließendem Western Blot mit pPKD und PKD2 an Tag 0 und Tag 1. **(D) Inhibierung der PMA-induzierten Aktivierung von PKD durch die Inhibitoren Gö6976 und Gö6983.** Western Blot mit PKD2 und pPKD. Undifferenzierte C2C12-Zellen wurden 1h mit Dimethylsulfoxid (DMSO), 5µM Gö6976 oder 5µM Gö6983 behandelt, danach 10 Minuten mit Phorbol-12, 13-Myristatazetat (PMA) inkubiert und mittels Western Blot analysiert. **(E) Chemische Hemmung der PKD-Phosphorylierung im Rahmen der Differenzierung.** Inkubation der Zellen einen Tag vor Induktion der Differenzierung mit 5µM Gö6967, 5µM Gö6983 und DMSO als Kontrolle. Western Blot mit pPKD und PKD2 von Tag 1. **(F) Quantifizierung der PKD-Phosphorylierung im Rahmen der Differenzierung unter chemischer Proteinkinase C (PKC)/PKD-Inhibition.** Bandendensitometrische Auswertung der Menge von pPKD an Tag 1 nach Behandlung mit DMSO, Gö6976 und Gö6983 im Verhältnis zur PKD2-Expression. Alle Abbildungen entsprechen den Mittelwerten dreier voneinander unabhängiger Experimente \pm SEM, Statistische Analyse mit dem Student *t*-Test $p < 0,01$ (**). β -Aktin diente in allen Blots als Ladekontrolle.

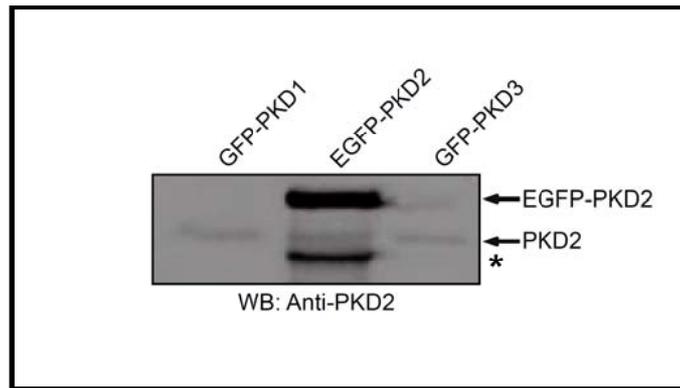


Abbildung 13: Spezifität des Proteinkinase D2 (PKD2)-Antikörpers. Hek-293T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren transfiziert, welche Green Fluorescent Protein (GFP)-Fusionsproteine der entsprechenden PKD-Isoformen enthielten. Anschließend erfolgte ein Western Blot mit PKD2. Die obere Bande entspricht dem EGFP-PKD2-Fusionsprotein. Kein Signal erscheint bei den mit GFP-PKD1 und GFP-PKD3-transfizierten Zellen. (*) beschreibt eine unspezifische Bande. Die PKD2-Bande auf 96kD entspricht der endogenen PKD2-Expression von Hek293-Zellen.

3.5. Die pharmakologische Inhibition von PKCs und PKDs hemmt die Muskelstammzellendifferenzierung *in vitro*

Es konnte bereits gezeigt werden, dass es während der Einleitung der Muskelstammzellendifferenzierung zu einer Expressions- und Aktivitätssteigerung von PKD2 kommt. Diese physiologische Aktivierung kann durch pharmakologisch wirksame und spezifische Inhibitoren unterbunden werden. Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche Rolle die Aktivierung/Expressionssteigerung von PKD2 für die Myogenese spielt. Dazu wurden C2C12-Zellen während der Muskelzellendifferenzierung mit den chemischen Inhibitoren Gö6976 und Gö6983 behandelt, um die Aktivität von PKC oder PKD zu hemmen. An Tag 3 und Tag 5 wurden die Kulturen fixiert und mit einem Antikörper gegen das Sarkomerprotein Myosin Heavy Chain (MHC) und f-Aktin (Darstellung der Zellmorphologie) gefärbt. Deutlich wird, dass die Anzahl MHC-positiver Strukturen (Zellen und fusionierte Myotuben) nach Behandlung mit einem der beiden Inhibitoren deutlich reduziert ist. Die Zellen der Kontrollgruppe zeigen jedoch keinerlei Veränderungen bei der Differenzierung (**Abbildung 14A** und **15A**). Dieser Eindruck spiegelt sich auch in der Quantifizierung nach Auszählen der Menge MHC-positiver Strukturen pro Gesichtsfeld an Tag 3 (**Abbildung 14B**) und an Tag 5 (**Abbildung 15B**) wider. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Inhibitoren bereits zu Beginn der Differenzierung eine Wirkung auf die Muskelzellendifferenzierung haben, da sich in

der MHC-Färbung nur differenzierte Myoblasten anfärben, die myofibrilläre Proteine wie MHC exprimieren. Um den Effekt der pharmakologischen PKD-Inhibition genauer zu charakterisieren, wurde zur Festlegung des Grads der Differenzierung der Fusionsindex gebildet. Der Fusionsindex ist durch die Bestimmung der Zahl der Kerne pro Myotube ein Maß für die Stärke der myotubulären Fusion. Die pharmakologische Inhibition von PKD durch Behandlung der C2C12-Zellen mit einem der beiden Inhibitoren führte zu einer starken Reduktion des Fusionsindex aller Gruppen (**Abbildung 14C** und **15C**). Bei einer Konzentration von 10mM führte Gö6976 jedoch außerdem zu vermehrtem Zelltod. Gö6983 führte im Vergleich dazu bei derselben Konzentration zu weniger Zelltod (Daten nicht gezeigt) bei gleichzeitig weniger stark ausgeprägter Reduktion des Fusionsindex (**Abbildung 14C** und **15C**). Auffällig war, dass sich die Morphologien der Myotuben beider Zellgruppen deutlich unterschieden: Myotuben, die mit Gö6983 behandelt wurden, zeigten ein signifikant vermindertes Verhältnis von Länge zu Breite, wohingegen die Zellen unter Behandlung mit Gö6976 im Vergleich zur Kontrollgruppe ein erhöhtes Längen-zu-Breitenverhältnis an Tag 3 und 5 aufwiesen (**Abbildung 16**). Unter dem Aspekt, dass Gö6983 eher PKCs und Gö6976 eher PKDs inhibiert, implizieren diese Ergebnisse, dass PKDs, abgesehen davon, dass sie als Substrate der PKCs wirken, noch eine weitere Rolle bei der Muskelstammzellendifferenzierung spielen. Beide chemischen Inhibitoren reduzierten reproduzierbar die Expression des kontraktilen Proteins MHC signifikant und hemmen infolgedessen die Differenzierung von C2C12-Zellen (**Abbildung 14D**). Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Inhibition von PKCs und PKDs die Differenzierung von C2C12-Zellen reduziert und daher die PKC/PKD-Aktivität einen positiven Effekt auf die Ausreifung von Muskelstammzellen hat.

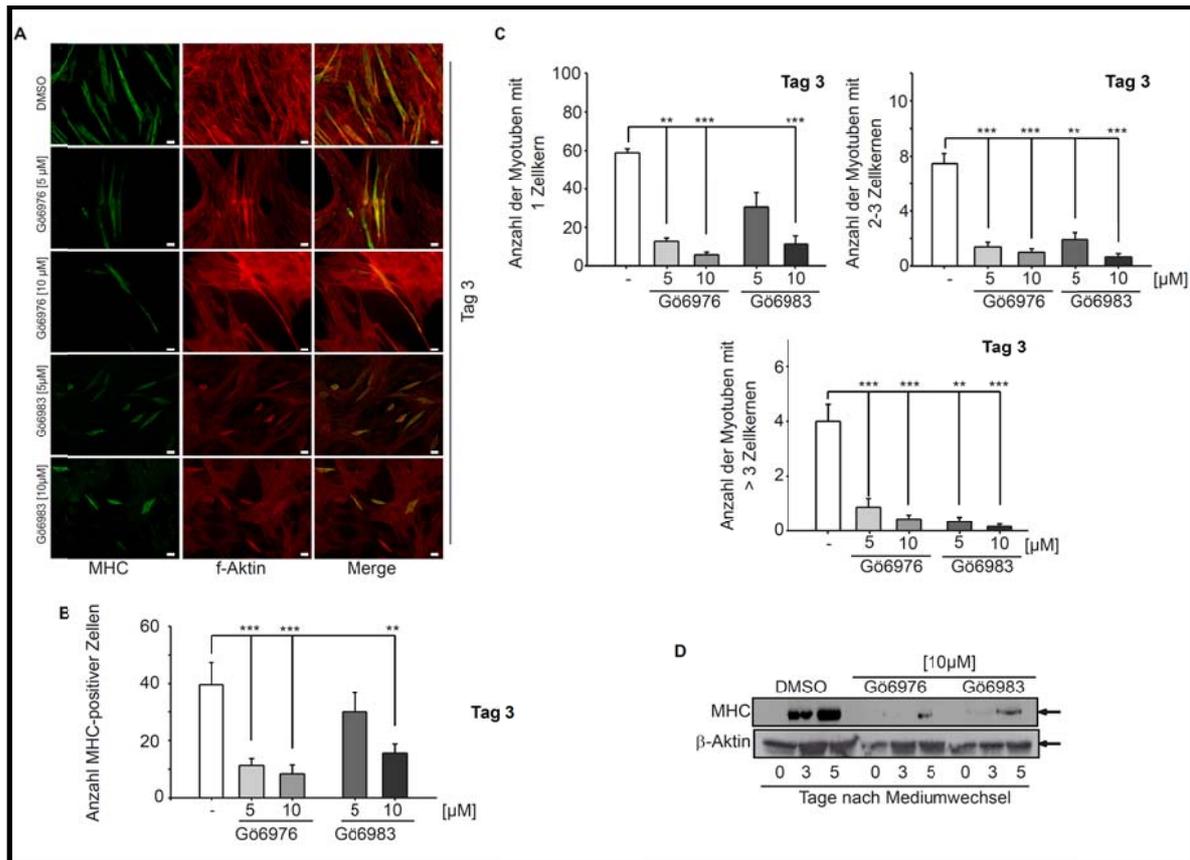


Abbildung 14A-D: Die pharmakologische Hemmung von Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase D (PKD) reduziert die Muskelstammzellendifferenzierung *in vitro*. (A) Immunfluoreszenzfärbung von C2C12-Zellen an Tag 3 nach Behandlung mit PKC/PKD-Inhibitoren. Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, mit Dimethylsulfoxid (DMSO, Kontrolle), Gö6976 5µM, bzw. 10µM bzw. Gö6983 5µM, bzw. 10µM behandelt und ausdifferenziert. Es erfolgten Färbungen mit Myosin Heavy Chain (MHC, grün) bzw. mit Alexa-568-konjugiertem Phalloidin gegen F-Aktin (Zellstruktur, rot). Die Abbildungen sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente. Der Größenbalken entspricht 20µm. (B) Anzahl der Myotuben pro Gesichtsfeld an Tag 3 nach Behandlung mit PKC/PKD-Inhibitoren. In drei voneinander unabhängigen Versuchen wurden jeweils zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder pro Bedingung fotografiert, MHC-positive Zellen als Myotuben definiert und ausgezählt. (C) Fusionsindizes an Tag 3 nach Behandlung mit PKC/PKD-Inhibitoren. Der Fusionsindex wurde definiert als die Anzahl der Zellkerne pro Myotube und eingeteilt in 1 Zellkern pro Myotube (oben links), 2-3 Zellkerne pro Myotube (oben rechts) und mehr als 3 Zellkerne pro Myotube (unten) und mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder wurden ausgezählt. (D) Die MHC-Expression von C2C12-Zellen wird durch pharmakologische Hemmung von PKC/PKDs reduziert. Western Blot mit MHC in differenzierenden C2C12-Zellen an den Tagen 0, 3 und 5, welche entweder mit DMSO, 10µM Gö6976 oder Gö6983 behandelt wurden. β-Aktin dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von zwei Western Blots. Signifikanzprüfung mit dem Student *t*-Test. $P < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), und $p < 0,001$ (***)

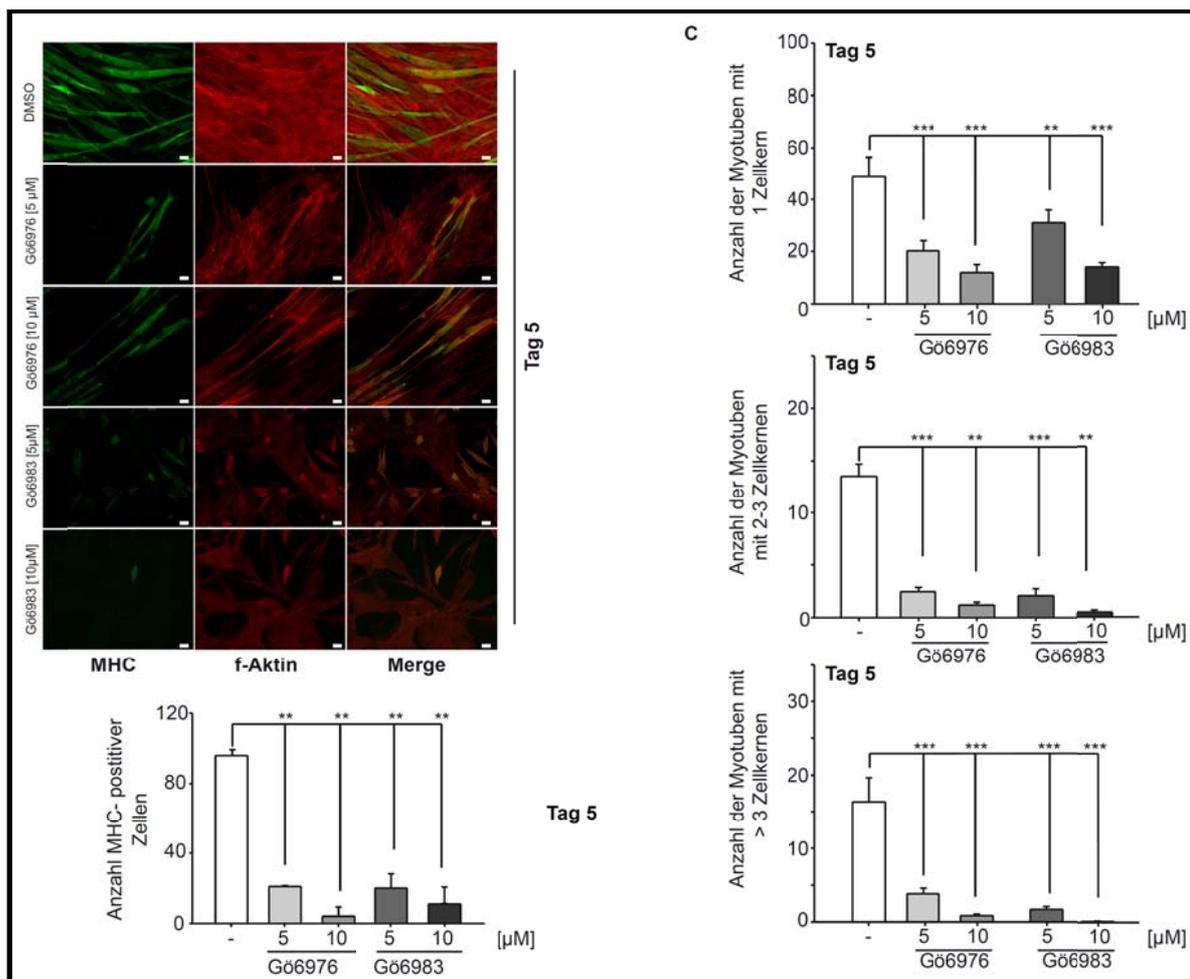


Abbildung 15A-C: Die pharmakologische Hemmung von Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase D (PKD) reduziert die Muskelstammzellendifferenzierung *in vitro*. (A) Immunfluoreszenzfärbung von C2C12-Zellen an Tag 5 der Differenzierung nach Behandlung mit PKC/PKD-Inhibitoren. Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, mit Dimethylsulfoxid (DMSO, Kontrolle), Gö6976 5µM, bzw. 10µM bzw. Gö6983 5µM, bzw. 10µM behandelt und ausdifferenziert. Anschließend erfolgten Immunfluoreszenzfärbungen mit Myosin Heavy Chain (MHC, grün) bzw. mit Alexa-568 konjugiertem Phalloidin gegen F-Aktin (rot). Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt (nicht gezeigt). Die Abbildungen sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente. Der Größenbalken entspricht 20µm. (B) **Anzahl der Myotuben pro Gesichtsfeld.** In drei voneinander unabhängigen Versuchen wurden zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder pro Bedingung fotografiert, die MHC-positiven Zellen in jedem Feld als Myotuben definiert und ausgezählt, wie in der Abbildung dargestellt. (C) **Fusionsindizes an Tag 5 der Differenzierung nach Behandlung mit PKC/PKD-Inhibitoren.** Fusionsindizes der mit Gö6976 oder Gö6983 behandelten MHC-positiven Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Der Fusionsindex wurde definiert als die Anzahl der Zellkerne pro Myotube und eingeteilt in 1 Zellkern pro Myotube (oben), 2-3 Zellkerne pro Myotube (Mitte) und mehr als 3 Zellkerne pro Myotube (unten). Zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder wurden ausgezählt. Signifikanzprüfung mit dem Student *t*-Test. P<0,05 (*), p<0,01 (**), und p<0,001 (***).

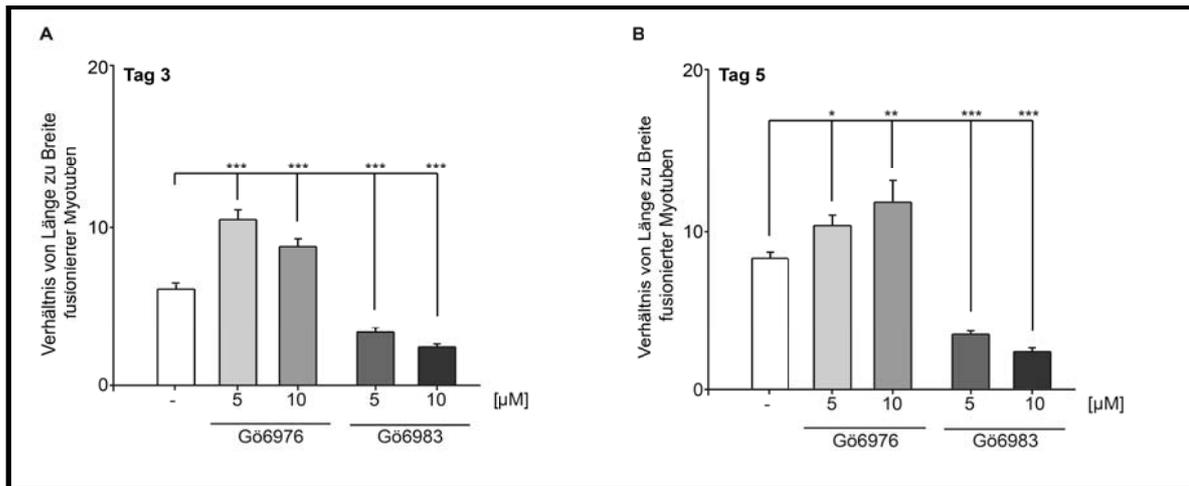


Abbildung 16A und B: Die Inhibitoren von Proteinkinase D (PKD) und Proteinkinase C (PKC) Gö6976 und Gö6983 verändern die Morphologie der Myotuben unterschiedlich. Länge und Breite der Myotuben wurden über ImageJ ausgemessen. Das Verhältnis von Länge zu Breite wurde berechnet und die Mittelwerte für Tag 3 (**A**) und Tag 5 (**B**) wie abgebildet dargestellt. Es wurden zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder untersucht. Statistische Analyse mit dem Student-t-Test. $P < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***).

3.6. Knock-down von PKD2 hemmt die Muskelstammzellendifferenzierung *in vitro*

Die bisherigen Daten legen aufgrund der Wirkung der unselektiven pharmakologischen Hemmung der Proteinkinasefamilien PKC bzw. PKD eine wichtige Funktion dieser Proteine für die Skelettmuskeldifferenzierung nahe. Darüber hinaus zeigen diese Daten, dass insbesondere die Phosphorylierung von PKD2 für die Einleitung der Muskelzellendifferenzierung von Bedeutung zu sein scheint. Um die Funktion von PKD2 spezifischer charakterisieren zu können, wurde die Expression von PKD2 mittels lentiviral exprimierten „short hairpin Ribonukleinsäuren (shRNA)-Interferenz-Oligos“ reduziert. Dazu wurden zunächst vier stabile Zelllinien mit voneinander unabhängigen, gegen PKD2 gerichteten shRNAs generiert und im Western Blot für die Expression von PKD2 untersucht. Eine Zelllinie, welche mit einem Green Fluorescent Protein (GFP)-exprimierenden Kontrollvirus infiziert war, diente als Negativkontrolle. Die verschiedenen shRNAs verminderten die Menge des PKD2-Proteins in den Zellen um bis zu 50% (#PKD2-2) bzw. bis zu 90% (#PKD2-4). Die shRNAs #PKD2-1 und #PKD2-3 zeigten keinen relevanten Knock-down (**Abbildung 17A**). Die Expression der Isoformen PKD1 und 3 wurde durch die für PKD2 spezifische shRNA nicht verändert (Daten nicht

gezeigt). Nach dem Knock-down von PKD2 mit anschließender Differenzierung zeigten sich eine veränderte Morphologie der Zellen, sowie eine verminderte Anzahl von Myotuben (**Abbildung 17B**).

Im Western Blot für das Sarkomerprotein MHC zeigte sich ebenfalls eine signifikant verminderte MHC-Expression während der Differenzierung von Kontrollzellen bzw. PKD2-Knock-down-Zellen (**Abbildung 17C** und **D**). Im nächsten Schritt wurden die Kulturen an Tag 3 und 5 mittels Immunocytochemie gegen das MHC-Protein vergleichbar zu den Experimenten zur pharmakologischen Inhibition von PKD und PKC untersucht und die Anzahl der Myotuben pro Gesichtsfeld und die Fusionsindizes bestimmt (**Abbildung 17E**). Hierbei ergab sich eine signifikante Reduktion der absoluten Myotubenzahl bei den PKD2-Knock-down-Zellen (**Abbildung 17F**), sowie eine erhöhte Anzahl einkerniger Myozyten. Dies deutet darauf hin, dass entscheidende Schritte für eine adäquate Zellfusion nach einem Knock-down von PKD2 gestört sind. Zusätzlich waren in der Gruppe der PKD2-depletierten Zellen deutlich weniger multinukleäre Myotuben, was zusätzlich auf eine Einschränkung der Myotubenbildung hindeutet (**Abbildung 17G**). Die Aktivierung von Satellitenzellen ist mit einer initialen und simultanen Stimulation der Pax7- und MyoD-Expression verbunden, wodurch eine Art Startsignal für die Differenzierung der Zellen gebildet wird (Halevy et al. 2004). Nach 72h Differenzierung konnte in den Kontrollzellkulturen bereits der vorbeschriebene Expressions-Peak von Pax7 beobachtet werden (**Abbildung 18A**), gefolgt von einem Anstieg von MyoD (**Abbildung 18B**) und Myogenin, (**Abbildung 18C**). Anschließend zeigt sich eine Zunahme von Myocyte enhancer factor 2D (Mef2D) (**Abbildung 18D**), gefolgt von dem zu erwartenden kontinuierlichen Anstieg des Reifemarkers der Muskelzellendifferenzierung, dem nikotinischen cholinergen Acetylcholinrezeptor (nAch) (**Abbildung 18E**). Im Gegensatz dazu entwickelten die PKD2-depletierten Zellkulturen eine deutlich reduzierte Expression aller oben erwähnten Marker. Die zeitliche Aufeinanderfolge der Marker blieb jedoch unbeeinträchtigt (**Abbildung 18A-E**). Damit wird bestätigt, dass die Expression von PKD2 einen entscheidenden Faktor für die korrekte Abfolge der myogenen Differenzierung darstellt.

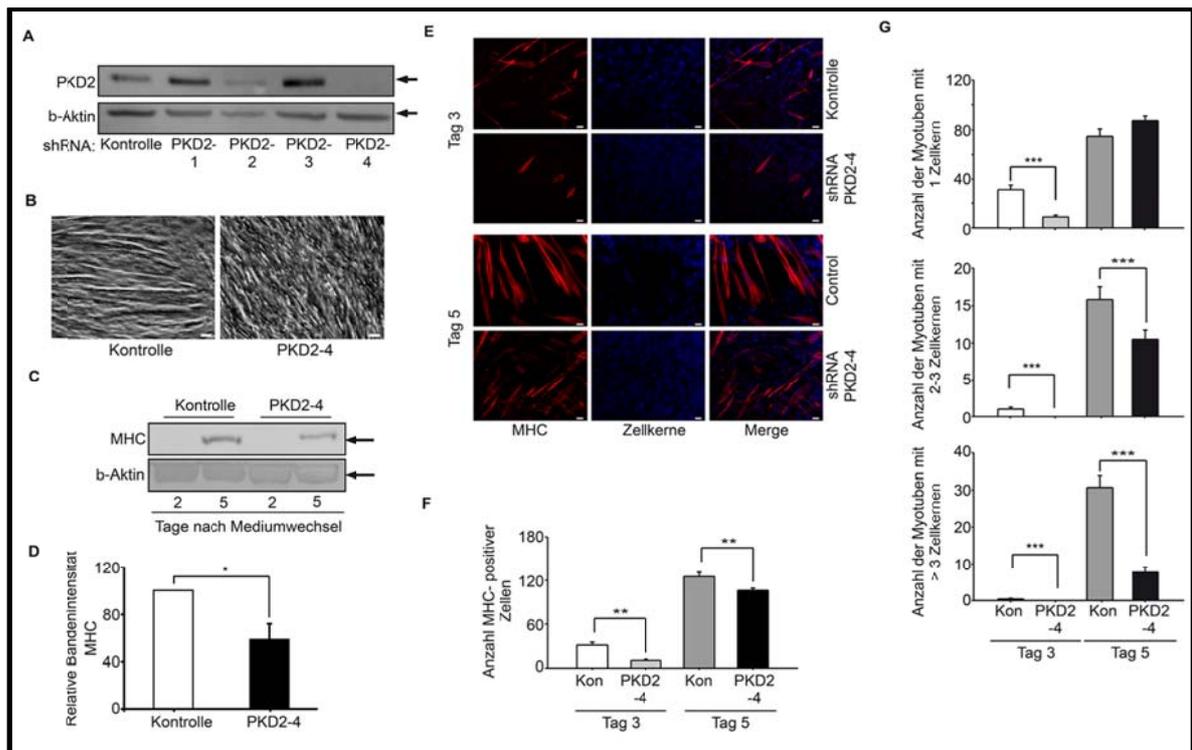


Abbildung 17A-G: Bedeutung der Proteinkinase D2 (PKD2)-Expression für die C2C12-Zell-Differenzierung. (A) **Lentiviraler PKD2-Knock-down.** Repräsentativer Western Blot aus drei voneinander unabhängigen Experimenten mit PKD2 und β -Aktin in stabilen C2C12-Zelllinien, die mit den vier shRNA-Konstrukten PKD2-1, PKD2-2, PKD2-3 und PKD2-4 in pLKO.1-puro-Vektor gegen PKD2 transduziert wurden. (B) **Morphologie-Änderungen während der C2C12-Zelldifferenzierung nach PKD2-Knock-down.** Repräsentative Phasenkontrastmikroskopie der Kontrollzelllinie und der Knock-down-Zelllinie (PKD2-4) an Tag 5. Der Größenbalken entspricht in (B) und (E) $20\mu\text{m}$. (C) und (D) **Reduktion der Myosin Heavy Chain (MHC)-Expression während der Differenzierung nach PKD2-Knock-down.** Repräsentativer Western Blot von drei voneinander unabhängigen Experimenten mit MHC und β -Aktin in Kontroll- und Knock-down-Zelllinie (PKD2-4) an Tag 2 und 5. (D) Densitometrische Auswertung der MHC-Expression von Tag 5 der drei voneinander unabhängigen Blots. (E) **Immunfluoreszenzdarstellung von differenzierenden Kontroll- und PKD2-Knock-down-C2C12-Zellen.** Repräsentative Färbung beider Zelllinien aus drei voneinander unabhängigen Experimenten mit MHC (rot) und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) für die Zellkerne (blau) an Tag 3 und 5. Statistische Analyse in (D) und (E) durch Student-t-Test. $P < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). (F) **Anzahl MHC-positiver Zellen pro Gesichtsfeld an Tag 3 und 5 nach PKD2-Knock-down.** In zehn zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern pro Bedingung wurden MHC-positive Zellen als Myotuben definiert und ausgezählt. Kontrolle (Kon), PKD2-Knock-down (PKD2-4). Statistische Analyse durch Wilcoxon Test. $P < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**). (G) **Reduktion des Fusionsindex nach PKD2-Depletion.** Die Fusionsindizes beider stabiler Zelllinien wurden an Tag 3 und 5 über die Anzahl der Zellkerne pro Myotube gebildet und eingeteilt wie oben dargestellt.

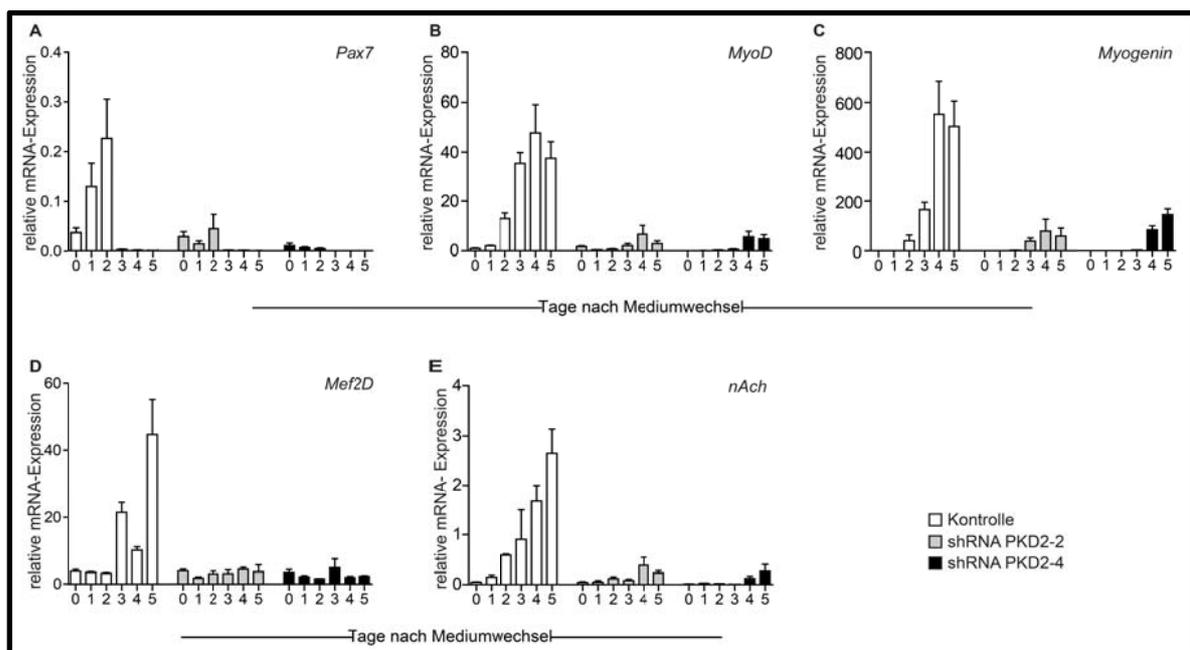


Abbildung 18A-E: Proteinkinase D2 (PKD2)-Knock-down-Zellen zeigen eine reduzierte Expression myogener Marker während der Differenzierung. Quantitative Polymerasekettenreaktion (pPCR)-Expressionsanalysen für Pax7 (A), MyoD (B), Myogenin (C) Myocyte enhancer factor 2D (Mef2D) (D) und den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAch) (E). Dargestellt sind die Expressionsprofile der Kontrollzelllinie und von zwei verschiedenen PKD2-Knock-down-Zelllinien short hairpin Ribonukleinsäure (shRNA)-Lentivirus #PKD2-2- und shRNA Lentivirus #PKD2-4). Die Zellen wurden durch Serumentzug und konfluentes Wachstum zur Differenzierung angeregt. Bis Tag 5 wurden täglich RNA-Proben entnommen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.7. PKD2 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von C2C12-Zellen

Die pharmakologische Hemmung von PKCs und PKDs über die chemischen Inhibitoren Gö6976 und Gö6983 führte in einigen Experimenten und ab einer gewissen Konzentration zu vermehrtem Zelltod in den differenzierenden Zellkulturen. Um zu unterscheiden, ob es sich hierbei um die Folge einer verminderten PKD-Aktivität handelt, oder ob dies die Folge von unspezifischen Effekten der Inhibitoren war, wurde der Effekt der PKD2-Depletion auf den Zellzyklus untersucht. Eine Zellzyklusanalyse zeigte keinen Unterschied zwischen den PKD2-Knock-down Zellen und der Kontrollzellgruppe (**Abbildung 19A**). Darüber hinaus zeigte die Zellzyklusanalyse ähnliche Profile in allen drei Zelllinien (**Abbildung 19A-D**), obwohl sich ein leichter, aber nicht signifikanter Trend

abzeichnete, dass sich bei der #PKD2-4-Zelllinie weniger Zellen in der Synthese (S)-Phase befanden (**Abbildung 19B und D**). Es fand sich ebenfalls kein relevanter Effekt durch den Knock-down von PKD2 auf die Expression des Zellzyklusprotein Zyklin D1 (**Abbildung 19E**).

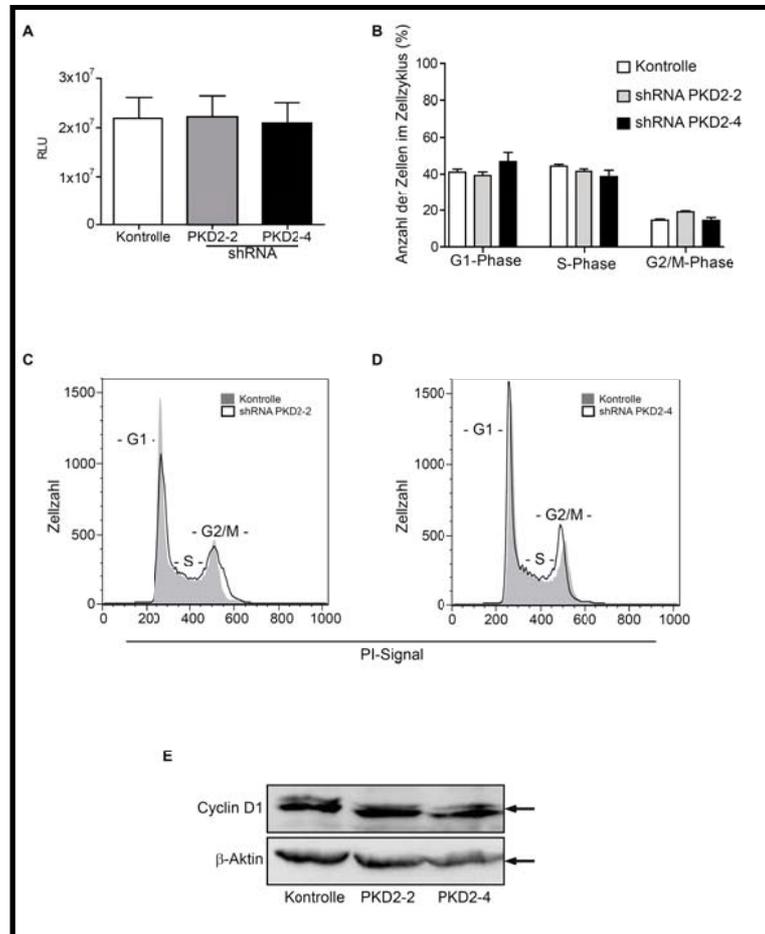


Abbildung 19A-E: Proteinkinase D2 (PKD2)-Knock-down-Zellen haben eine normale Proliferationskapazität. (A) Die Anzahl der vitalen Zellen wurde über das CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay bestimmt. Es besteht kein signifikanter Unterschied von der Aktivität der Kontrollzelllinie zu den short hairpin Ribonukleinsäure (shRNA) #PKD2-2-Knock-down-Zellen und den shRNA #PKD2-4-Knock-down-Zellen. Die Werte der Ordinate sind in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. (B-D) **Zellzyklusanalyse von PKD2-Knock-down- und Kontroll-C2C12-Zellen.** Repräsentative Darstellung der Zellzyklusprofile der Kontrollzelllinie verglichen mit shRNA #PKD2-2-Zellen (C) und shRNA #PKD2-4-Zellen (D) (In Zusammenarbeit mit PD Dr. Cornelia Brunner, Institut für physiologische Chemie Universität Ulm). (E) **Zyclin D1-Expression nach PKD2-Knock-down in undifferenzierten C2C12-Zellen.** Western Blot mit Zyclin D1 in Kontrollzellen, shRNA #PKD2-2-Zellen und shRNA #PKD2-4-Zellen nach 24h unter Wachstumsbedingungen. β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.8. PKD1 und PKD3 haben im Vergleich zu PKD2 eine eher untergeordnete Bedeutung für die C2C12-Muskelstammzellendifferenzierung

Bisher konnte gezeigt werden, dass PKD2 proliferationsunabhängig den regelrechten Ablauf des myogenen Differenzierungsprogramms beeinflusst (**Abbildung 19A-B**). Unklar bleibt jedoch weiterhin die Funktion der beiden Isoformen PKD1 und PKD3. Insbesondere war an dieser Stelle die Bedeutung von PKD3 für die terminale Differenzierung von Interesse. Daher wurden analog zu den PKD2-Knock-down-Zelllinien PKD1- und PKD3-Knock-down-Zelllinien hergestellt (**Abbildung 20A und B**). Diese wurden dann ebenfalls durch Serumentzug und konfluentes Wachstum zur Differenzierung angeregt. Als Marker für die Initiation der Myogenese wurde MyoD und als später Marker nAch gewählt, um die verschiedenen Entwicklungsstadien der Muskelstammzellendifferenzierung zu erfassen. Eine qPCR-Analyse ergab keine signifikante Veränderung der MyoD-Expression in PKD1- und PKD3-depletierten Zellen im Vergleich zu der mit scramble-RNA transfizierten Zellgruppe an Tag 3 und Tag 5 der Differenzierung (**Abbildung 20C**). Dies lässt passend zu den Expressionsprofilen während der Differenzierung (**Abbildung 9C-E**) eine eher untergeordnete Rolle dieser Kinasen für die frühe Muskelstammzellendifferenzierung vermuten. Interessanterweise war die Expression von nAch in PKD3-Knock down-Zellen an Tag 3 der Differenzierung unverändert im Vergleich zu der Kontrollzellgruppe, wohingegen sich an Tag 5 eine signifikante Reduktion von nAch zeigte (**Abbildung 19D**). Dieses Ergebnis unterstreicht die Vermutung, die zuvor anhand der Expressionsprofile von PKD1, 2 und 3 (**Abbildung 9C-E**) getroffen wurde, dass PKD1 generell eine untergeordnete Rolle bei der C2C12-Muskelstammzellendifferenzierung spielt, während PKD3 gegen Ende der Differenzierung eine kritischere Rolle spielt. Allerdings müssen weitere Experimente durchgeführt werden, um diese Vermutungen detaillierter zu untersuchen.

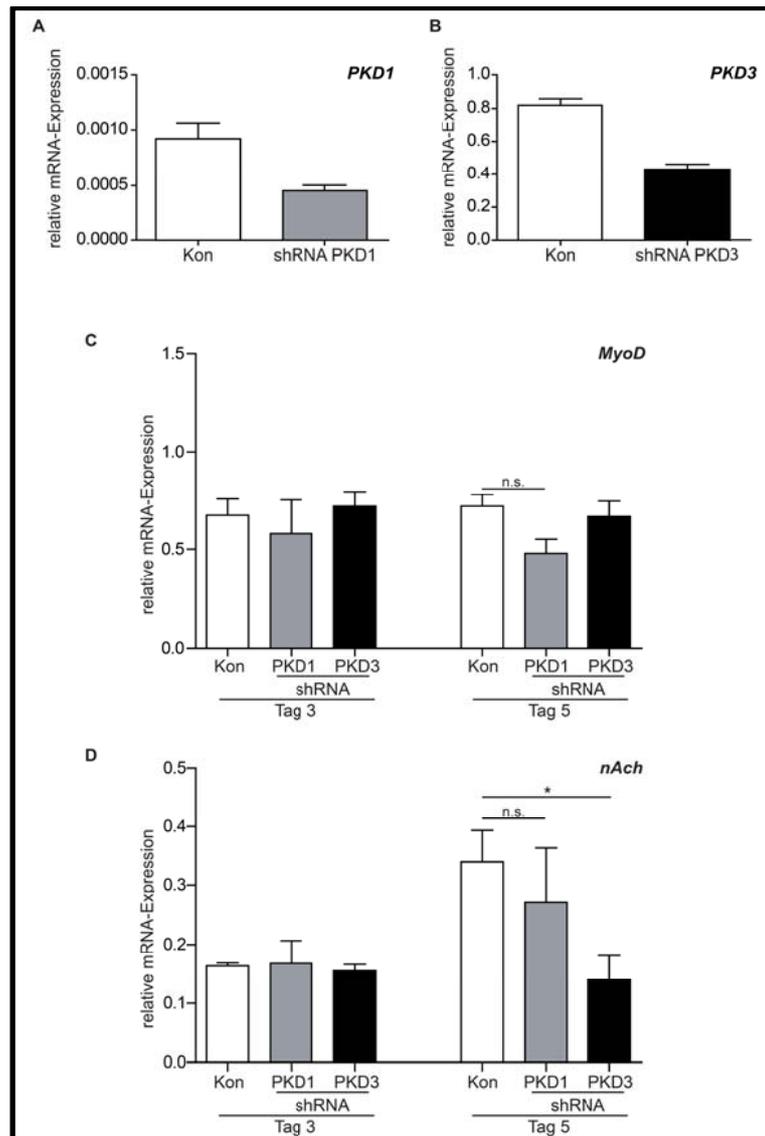


Abbildung 20A-D: Proteinkinase D1 (PKD1) und Proteinkinase D3 (PKD3) spielen eine untergeordnete Bedeutung für die C2C12-Muskelstammzellendifferenzierung im Vergleich zu Proteinkinase D2 (PKD2). (A-B) Quantitative Polymerasekettenreaktionen (qPCR)-Analyse von PKD1- und 3. Die Generierung stabiler C2C12-Zelllinien erfolgte nach lentiviraler Infektion mit scramble short hairpin Ribonukleinsäure (shRNA, Kon) oder einem Pool von shRNAs gerichtet gegen PKD1 (A) und PKD3 (B). Es sind die Mittelwerte \pm SEM dreier voneinander unabhängiger Experimente dargestellt. (C und D) qPCR-Expressionsprofile von MyoD (C) und nikotinischem Acetylcholinrezeptor (nAch) (D) an Tag 3 und 5 der Differenzierung in PKD1- und 3-Knock-down-Zellen. Die Zellen wurden durch Mediumwechsel und 100% Konfluenz zur Differenzierung angeregt, an Tag 3 und Tag 5 wurde die RNA entnommen. Es sind die Mittelwerte \pm SEM dreier voneinander unabhängiger Experimente dargestellt. Signifikanzprüfung mit Student-*t*-Test. $P < 0,05$ (*). N.s.= nicht signifikant.

3.9. Ektope Expression von PKD2 führt zu einer Zunahme der Muskelstammzellendifferenzierung in C2C12-Zellen

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Aktivierungshemmung von PKCs und PKD2 sowie der selektive lentivirale Knock-down von PKD2 zu einer reduzierten Muskelstammzellendifferenzierung führt. Um nun herauszufinden, ob PKD2 alleine in der Lage ist, die Muskelstammzellendifferenzierung in C2C12-Zellen zu triggern, wurde PKD2 in einem retroviralen Vektor in C2C12-Zellen überexprimiert (PKD2-ÜE). Die Überexpression im Vergleich zu mit einem Leervektor transfizierten Zellen ist im Western Blot für PKD2 in **Abbildung 21A** zu erkennen. Die so analysierten stabilen Zelllinien wurden nach dem Standardprotokoll für die Muskelstammzellendifferenzierung ausdifferenziert. Es zeigte sich, dass die vermehrte PKD2-Expression zu einer beschleunigten Fusion der Myoblasten und einer zunehmenden Anzahl von elongierten Zellen, am ehesten Myotuben entsprechend, pro Gesichtsfeld führte. Dieser Effekt zeigte sich bereits an Tag 2 der Differenzierung und bestand bis zum Ende des Experiments (**Abbildung 21B**). Eine genauere Auswertung dieses Effekts lieferte die Ausmessung der Zelllängen in zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern. In der Kontrollgruppe wurden 2421 Zellen ohne weitere MHC-Färbung ausgemessen, in der Gruppe der PKD2-Überexpression 2090 Zellen, jeweils in drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die ausgezählten Zellen wurden in drei verschiedene Gruppen mit Zelllängen bis 100, 100-200 und >200µm eingeteilt. Die Mehrzahl der Kontrollzellen konnte der Gruppe mit einer Zelllänge von 100µm zugeordnet werden, wohingegen sich weniger Zellen der PKD2-überexprimierten Zellen in dieser Gruppe befanden (**Abbildung 21C**, 82% vs. 37%; n= 1996 vs. n =782). Im Gegensatz dazu waren in der zweiten Gruppe mit 100-200µm vermehrt die Zellen mit PKD2-Überexpression zu finden (**Abbildung 21C**, 16% vs. 51%; n =408 vs. n= 1067). In der dritten Zellgruppe mit über 200µm lagen nur noch wenige Kontrollzellen vor, während die PKD2-überexprimierenden Zellen die Mehrheit bildeten (**Abbildung 21C**, 0,6% vs. 11%; n= 16 vs. n =240). Anschließend wurde die Gesamtlänge aller drei Zellgruppen berechnet, welche signifikant höhere Werte der Zelllängen von PKD2-überexprimierenden Zellen in allen drei Gruppen, ebenso wie eine vermehrte Differenzierung (**Abbildung 21D**) ergab. Zur weiteren Charakterisierung und Quantifizierung dieser Veränderungen wurde eine qPCR-

Expressionsanalyse für MyoD und nAch während der Differenzierung beider Zellgruppen durchgeführt (**Abbildung 21E und F**). MyoD diente hierbei wiederum als Marker der frühen Muskelstammzellendifferenzierung, wohingegen nAch als Marker für reife Myotuben angesehen wurde. Entsprechend unserer morphologischen Beobachtungen konnten eine erhöhte und beschleunigte MyoD-Expression (**Abbildung 21E**) sowie eine vermehrte nAch-Expression (**Abbildung 21F**) besonders zu späteren Zeitpunkten der Differenzierung bei den PKD2-überexprimierenden Zellen beobachtet werden. Auch ein Western Blot erbrachte leicht erhöhte Mengen von MHC an Tag 3 und eine deutliche Zunahme des Proteins an Tag 5 der Differenzierung im Vergleich zu der Kontrollzellgruppe (**Abbildung 21G**). Diese Daten implizieren, dass die gesteigerte Expression von PKD2 ausreichend ist, um die Differenzierung in C2C12-Zellen voranzutreiben. Diese Daten unterstreichen die essenzielle Bedeutung der Proteinkinase D2 für die Differenzierung von Muskelstammzellen.

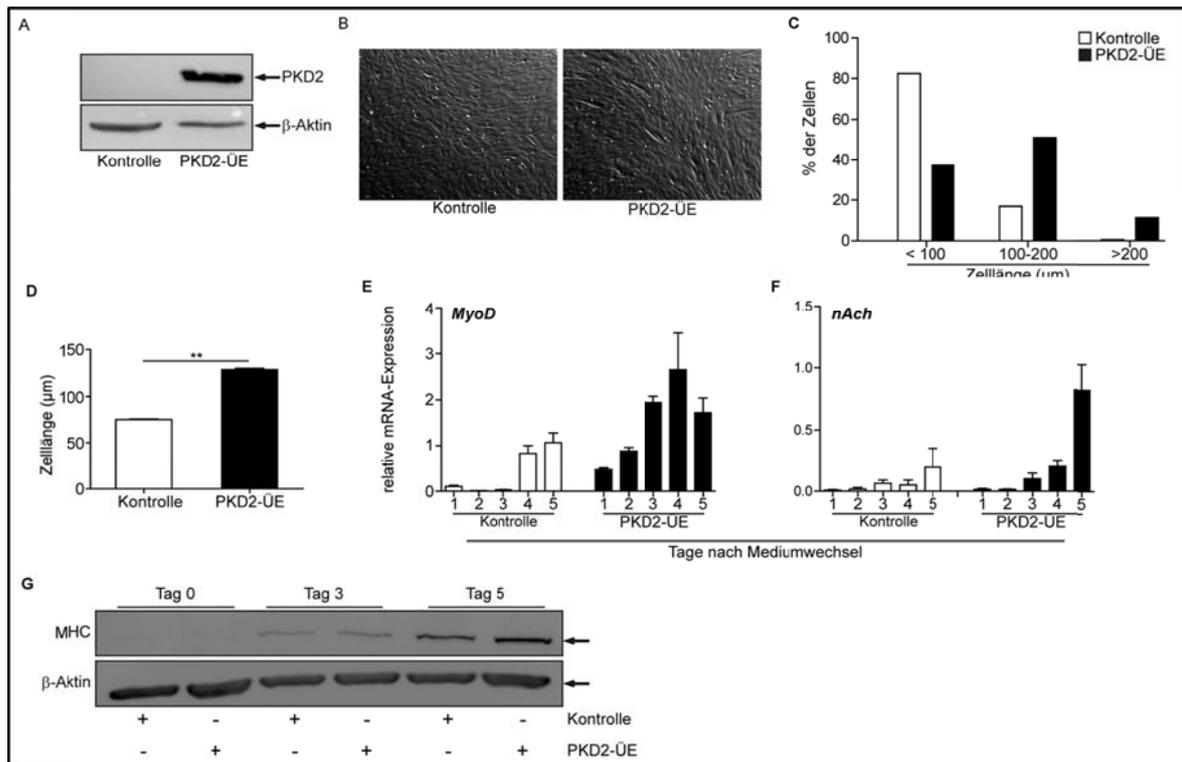


Abbildung 21A-G: Ektote Protein-Kinase D2-Expression beschleunigt die C2C12-Zell-Differenzierung. (A) Retroviral-vermittelte PKD2-Überexpression in C2C12-Zellen. Western Blot mit PKD2 bzw. β -Aktin als Ladekontrolle in den mit EGFP bzw. PKD2 transduzierten Zellen. Um eine Überbelichtung und Interferenz mit benachbarten Banden zu vermeiden, musste eine kurze Expositionszeit gewählt werden. Daher ist die endogene Expression von PKD2 in der EGFP-Kontrolle nicht zu erkennen. (B) C2C12-Zellmorphologie während der Differenzierung nach PKD2-Überexpression. Repräsentative mikroskopische Phasenkontrastaufnahme von Kontrollzellen (Kon) und transduzierten C2C12-Zellen (PKD2-ÜE) an Tag 3. Der Größenbalken entspricht 20 μ m. (C) Zelllängenanalyse während der Differenzierung nach PKD2-Überexpression. Die EGFP-Kontroll- und die PKD2-ÜE-Zellen wurden an Tag 3 ausgemessen und in folgende Gruppen eingeteilt: <100, 100-200, >200 μ m. (D) Mittelwerte der gemessenen Zelllängen beider Zelllinien. (E und F) Expressionsprofil von MyoD und nAch während der C2C12-Zelldifferenzierung nach PKD2-Überexpression. Dargestellt sind die durch die quantitative Polymerasekettenreaktionen (qPCR)-Analyse gewonnenen Werte für MyoD (E) und nAch (F) bis Tag 5 in beiden Zelllinien im Verhältnis zur murinen Hydroxymethylbilansynthese (mHMBS) aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. (G) Myosin Heavy Chain (MHC)-Expression während der Differenzierung nach PKD2-Überexpression. Western Blot der Kontroll- und der PKD2-ÜE-Zelllinie mit MHC und β -Aktin als Ladekontrolle an Tag 0, 3 und 5. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzanalyse mit Student *t*-Test. $P < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

3.10. Pharmakologische PKC/PKD-Inhibition in primären Satellitenzellen hemmt deren Differenzierung

Die bisherigen Daten wurden in einer embryonalen Myoblastenzelllinie durchgeführt. Obwohl C2C12-Zellen ein etabliertes *in vitro* Modell für die Skelettmuskelentwicklung darstellen, entsprechen sie nicht echten adulten Stammzellen des Skelettmuskels. In einer kürzlich erschienen Arbeit gelang es erstmals, primär isolierte murine Satellitenzellen basierend auf der Expression bestimmter Oberflächenmarker (CD45⁻Sca-1⁻Mac-1⁻CXCR4⁺ β 1-integrin⁺) mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) zu isolieren (Cerletti et al. 2008). Mit Hilfe dieser Zellen konnten funktionsfähige Skelettmuskeln in Dystrophin-defizienten Mäusen gebildet werden und die Dystrophin-Expression der Muskelfasern wieder hergestellt werden, womit es zu einer Verbesserung der Muskelfunktion kam. Zusätzlich integrierten sich diese Zellen in die Stammzellnische, welche bei späteren Verletzungen des Muskels für dessen Regeneration zuständig sind (Cerletti et al. 2008). In Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Tümpel und Dr. Anett Illing (molekularmedizinisches Institut und Max-Planck-Forschungseinrichtung für Stammzellalterung, Universität Ulm, Deutschland) wurden diese Zellen mit den genannten Oberflächenmarkern aus 6-8 Wochen alten Mäusen isoliert (**Abbildung 22A**). Die auf diese Weise gewonnenen Zellen wiesen die typische Morphologie von *in vitro* kultivierten primären Satellitenzellen (**Abbildung 22B**) und eine stabile Expression von nukleärem Pax7-Protein (**Abbildung 22C**), einem Marker primärer myogener Zellen auf. Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurde die endogene Expression von PKD2 in diesen Zellen verifiziert (**Abbildung 22D**). Anschließend wurde die Differenzierung der Zellen durch Fibroblast Growth Factor (FGF)- und Serumentzug induziert. Gleichzeitig wurden die Zellen während der Differenzierung mit Gö6976 bzw. Gö6983 behandelt. Es zeigten sich ähnliche morphologische Veränderungen unter Behandlung mit den chemischen Inhibitoren wie in den C2C12-Zellen, einschließlich einer gestörten Fusion der Myotuben (**Abbildung 22E**). Diese Beobachtungen deuten auf eine konservierte Funktion des PKC/PKD-Signalwegs in verschiedenen Stammzellkompartimenten (embryonal und adult) des Skelettmuskels hin und unterstreichen dessen wichtige Funktion für die Myogenese *in vitro*.

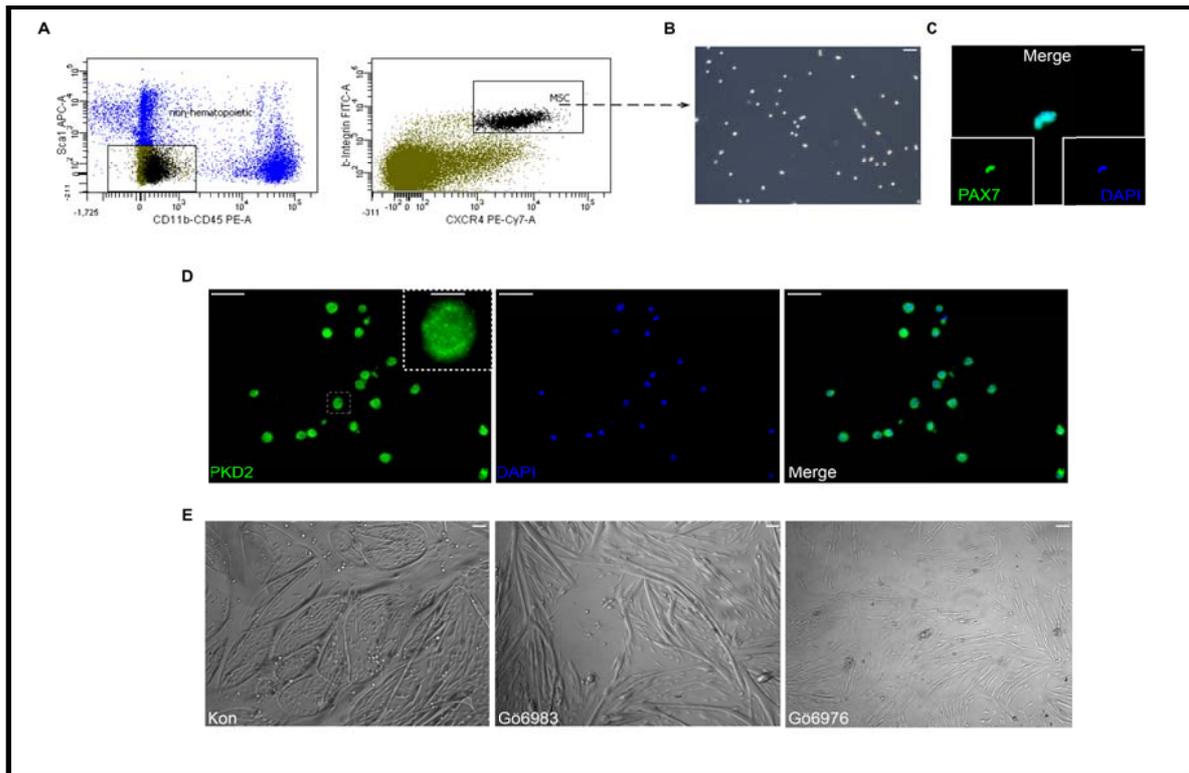


Abbildung 22A-E: Die pharmakologische Proteinkinase C(PKC)/Proteinkinase D(PKD)-Hemmung reduziert die myogene Differenzierung primärer Satellitenzellen. (A) Repräsentative Darstellung der Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Plots zur Isolation primärer muriner Stammzellen. Sca1-, CD11b- und CD45-positive Zellen wurden als Zellen hämatopoetischen Ursprungs ausgeschlossen. Im negativen Gate für die hämatopoetischen Marker wurde die Expression von CXCR4 und β -1-Integrin untersucht. Doppelt positive Zellen wurden als Satellitenzellen (MSC) definiert und entsprechend des Gates in 24-Well-Platten (1000/Well) sortiert (rechts). (B) **Morphologie der via FACS isolierten Satellitenzellen.** Phasenkontrastmikroskopie der FACS-isolierten murinen Satellitenzellen nach einem Tag Kultur *in vitro*. Der Größenbalken entspricht 100 μ m. (C) **Pax7-Expression in Satellitenzellen.** Immunfluoreszenz für das Pax7-Protein (grün) und den Zellkernen (4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), blau) in Satellitenzellen. Der Größenbalken entspricht 12,5 μ m. (D) **PKD2-Expression in Satellitenzellen.** Immunfluoreszenzanalyse von Satellitenzellen für PKD2 (grün). Zellkerne, DAPI (blau). Der Größenbalken entspricht 37,5 μ m. Die Vergrößerung zeigt eine Zelle mit zytoplasmatischem PKD2-Signal. Der Größenbalken entspricht 12,5 μ m. (E) **Morphologie der Satellitenzellen während der Differenzierung unter Inhibition von PKDs und PKCs.** Die Satellitenzellen wurden auf Laminin-beschichteten Deckgläschen ausgesät, durch Fibroblast Growth Factor (FGF)- und Serumentzug zur Differenzierung angeregt und entweder mit Gö6976 oder Gö6983 (beide 10 μ M) behandelt. Dargestellt ist eine mikroskopische Phasenkontrastaufnahme der Satellitenzellen 2 Tage nach Induktion der Differenzierung. Der Größenbalken entspricht 100 μ m.

3.11. PKD2 induziert die Aktivierung von Mef2D

Die bisherigen Daten beschreiben die wichtige Funktion von PKD2 während der Myogenese anhand verschiedener Zellmodelle. Unklar bleibt jedoch, welche Signalwege durch PKD2 letztlich aktiviert bzw. reprimiert werden, um dessen myogene Funktion in Muskelstammzellen zu vermitteln. Bisherige Arbeiten aus unserem Labor konnten zeigen, dass PKD2 in Magenkarzinomzellen über eine Phosphorylierung von Klasse II-Histondeacetylasen (HDACs) den myogenen Transkriptionsfaktor Myocyte enhancer factor 2D (Mef2D) aktivieren kann (von Blume et al. 2007). Mef2D ist ein Transkriptionsfaktor, der spezifisch an das Myocyte Enhancer Factor (MEF)-Element von regulatorischen Einheiten vieler muskelspezifischer Gene bindet (Naya u. Olson 1999). In Anbetracht der essenziellen Funktion von Mef2D während der Skelettmuskeldifferenzierung könnte Mef2D ein möglicher Kandidat für die Vermittlung der myogenen PKD2-Wirkung in Muskelvorläuferzellen darstellen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Mef2D Reporter Assays bei gleichzeitiger Ko-Expression verschiedener PKD2-Mutanten durchgeführt. Dazu wurden C2C12-Zellen in undifferenziertem Zustand mit einem Leervektor, pcDNA3, verschiedenen PKD2-Konstrukten und zwei Mef2D-Reporterkonstrukten transfiziert. Die exogene Expression von Wildtyp (WT)-PKD oder aktivem PKD in C2C12-Muskelstammzellen führte zu einer 4.5- bzw. einer 7-fachen Zunahme der Mef2D-Promotoraktivität (**Abbildung 23A**). Im Gegensatz dazu konnte keine relevante Zunahme der Mef2D-Promotoraktivität im Vergleich zu den pcDNA3-transfizierten Zellen festgestellt werden, wenn die Zellen mit katalytisch inaktiver PKD2 transfiziert worden sind, oder der Mef2D-Reporter mutierte Bindungsstellen aufwies.

3.12. PKD2 hemmt die transkriptionelle Aktivität von Pax3

Es konnte gezeigt werden, dass die Pax-Gene die Selbsterneuerung und das Populationswachstum undifferenzierter Zellen vorantreiben (Collins et al. 2009). Darüber hinaus steigert die Überexpression von Pax3 die Proliferationskapazität, und verzögert die Muskelzellendifferenzierung (Epstein et al. 1995, Collins et al. 2009, Young u. Wagers 2010). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PKD2 das promyogene Mef2D aktiviert und dadurch die Differenzierung induziert. Da Selbsterneuerung und Differenzierung antagonisierende Prozesse darstellen, könnte die Repression von Pax3 einen weiteren Mechanismus der PKD2-Wirkung

während der Myogenese darstellen. Um diese Frage zu klären, wurden Pax3-Reporter Assays mit Hilfe eines Chloramphenicolazetyl-Transferase (CAT)-Enzym Assays in C2C12-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem pcDNA3- Pax3-Flag, dem (PRS-9)-TK-CAT-Reporterplasmid und den jeweiligen EGFP-PKD2-Mutanten (EGFP-PKD2-WT, EGFP-PKD2-DA, EGFP-PKD2-2SE und EGFP-PKD2-3SE) kotransfiziert. Eine exogene Expression von WT-PKD2 oder katalytisch inaktivem PKD2 (PKD2-DA) führte zu keiner Reduktion der Pax3-Reporteraktivität. Eine Mutation des S^{706/710} gegen Glutamat (PKD2-2SE) führte zu einer konstitutiven Aktivierung von PKD2, eine weitere Mutation von L¹⁵⁹/V¹⁶³ PKD2-3SE führte zu einem Verbleib des aktiven PKD2s im Zellkern (Auer et al. 2005). Eine Koexpression von PKD2-2SE bzw. PKD2-3SE führte in den C2C12-Zellen zu einer Reduktion von 30% bzw. 70% der Transkriptionsaktivität von Pax3 im Vergleich mit WT-PKD2 und der katalytisch inaktiven Mutante (**Abbildung 23B** und **C**). Auf diese Weise ist PKD2 in der Lage, die Muskelstammzellendifferenzierung über zwei verschiedene Mechanismen zu regulieren; die Aktivierung von Mef2D und die Hemmung der Transkriptionsaktivität von Pax3, wodurch einerseits Differenzierung induziert und andererseits Selbsterneuerung gehemmt wird.

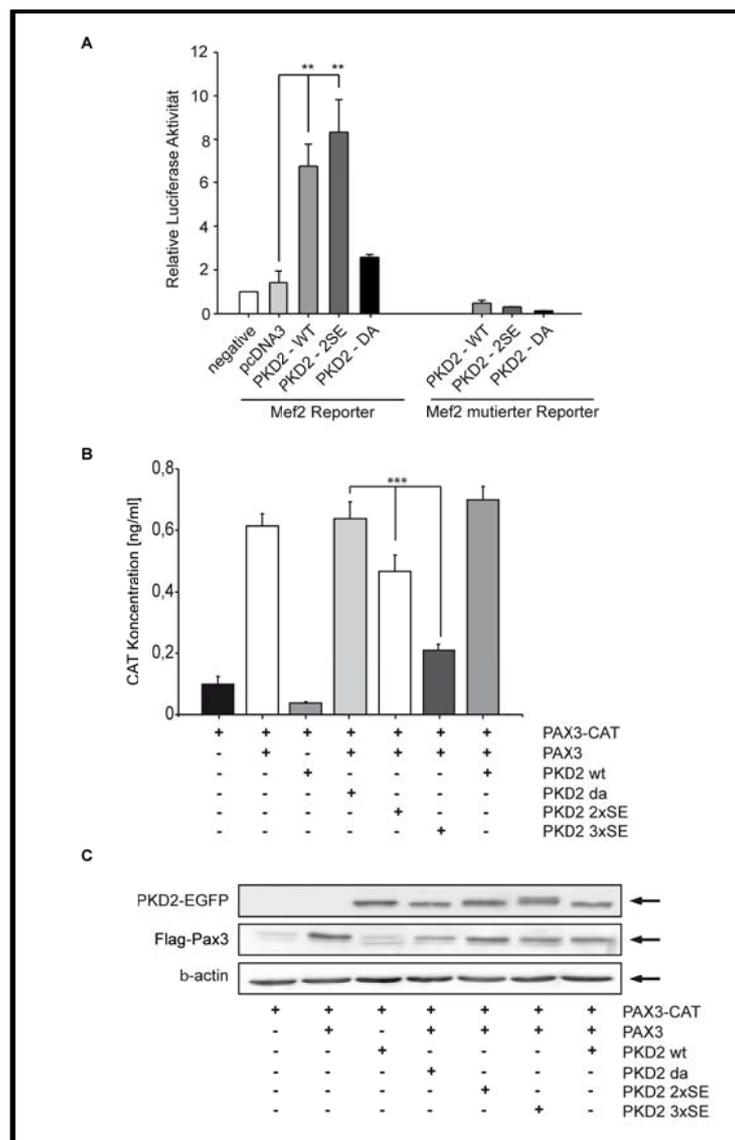


Abbildung 23A-C: Die Proteinkinase D2 (PKD2)-induzierte Myogenese wird über eine Aktivierung von Myocyte enhancer factor 2D (Mef2D) und Hemmung von Pax3 vermittelt. (A) Luziferase Reporter Assay für den Mef2D-Promotor. Transfektion der C2C12-Zellen mit Renilla. Bei „Negativ“ ohne weitere RNA, bei den Reihen 2-5 Kotransfektion von Mef2D mit pcDNA3, PKD2-Wildtyp (WT), PKD2-2SE (konstitutiv aktiv) und PKD2-DA (katalytisch inaktiv). Bei 6-8 Kotransfektion des mutierten Mef2D-Vektors mit PKD2-WT, PKD2-2SE und PKD2-DA. 36h später Mediumwechsel auf Differenzierungsmedium. 24h später Durchführung der Luziferase Assays. Auf der Ordinate sind die relativen Lichteinheiten (relative light units, RLU) aufgetragen. Dargestellt sind die Werte von drei voneinander unabhängigen Experimenten. $P < 0.05$ (*) und $p < 0.01$ (**)

(B) Cat Enzyme Assay für den Pax3-Promotor. Kotransfektion der C2C12-Zellen mit pcDNA3-Pax3-Flag, (PRS-9)-TK-CAT und/oder den jeweiligen pEGFP-PKD2-Konstrukten. 24h später Durchführung des CAT Enzyme Assays. Die Werte entsprechen drei voneinander unabhängigen Experimenten und wurden mithilfe des Student *t*-Tests auf Signifikanz geprüft. $P < 0,001$ (***)

(C) Western Blot des Cat Enzyme Assays für PKD2 und Pax3.

3.13. Schematische Darstellung des möglichen PKD2-Signalwegs

Die oben beschriebenen Ergebnisse wurden in **Abbildung 24** schematisch dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass S1P PKD2 in C2C12-Zellen aktiviert. Dies geschieht am ehesten entweder über PKC η oder durch eine direkte Phosphorylierung an den Serinresten Ser⁷⁰⁶ und Ser⁷¹⁰. PKD2 transloziert anschließend in den Zellkern und führt dort zu einer gleichzeitigen Aktivierung von Mef2D und einer Hemmung der Pax3 Expression. Das Gleichgewicht zwischen Pax3 und Mef2D-Aktivität wird durch PKD2 zugunsten der Mef2D-Aktivität verschoben, was zu einer verminderten Reproduktion selbsterneuender Myoblasten und einer Ausdifferenzierung der Myoblasten zu Muskelfasern führt und somit die Muskelzellendifferenzierung aktiviert.

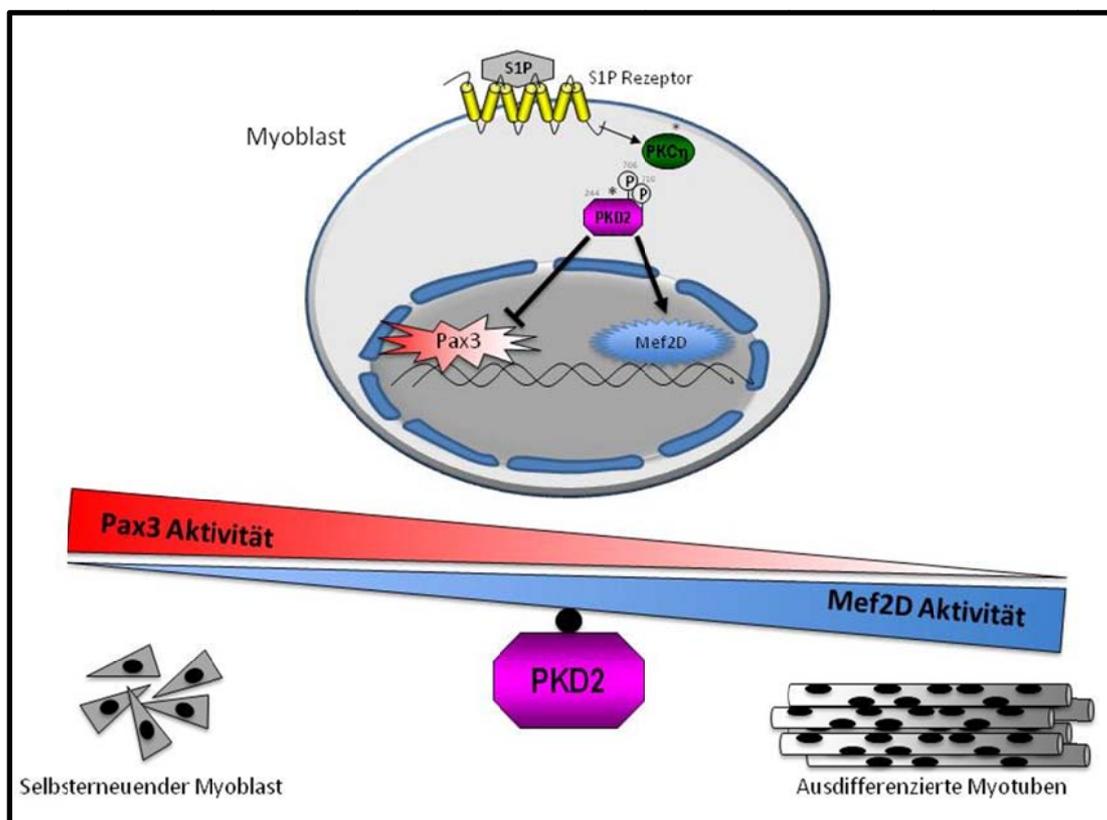


Abb. 24: Schematische Darstellung der möglichen Wirkweise von Proteinkinase D2 (PKD2).

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) führt über entweder über eine Aktivierung von PKC η oder direkt zu einer Phosphorylierung von PKD2, welche in den Zellkern wandert. Hier hemmt PKD2 die Pax3-Aktivität und steigert die Myocyte enhancer factor 2D (Mef2D)-Aktivität, was zu einer Ausdifferenzierung der Myoblasten zu Myotuben führt.

4. Diskussion

Diese Arbeit zeigt, dass C2C12-Zellen alle Proteinkinase D (PKD)-Isoformen exprimieren, am meisten jedoch PKD2. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass PKD2 während der Initiation der murinen Muskelzelldifferenzierung spezifisch phosphoryliert bzw. aktiviert wird. Eine selektive Hemmung von Proteinkinasen C (PKCs) oder PKDs durch pharmakologische Inhibitoren blockierte die Myotubenbildung. Die Depletion von PKD2 durch short hairpin Ribonukleinsäuren (shRNAs) führte zu einer deutlichen Hemmung der Myoblastenfusion. PKD2-depletierte Zellen zeigen eine beeinträchtigte Regulation der mit der Muskelzelldifferenzierung assoziierten Gene, wohingegen die Proliferationsfähigkeit der Zellen unverändert blieb. Eine forcierte Expression von PKD2 hingegen führte zu einer Zunahme der Muskelzelldifferenzierung. Dies ließ sich in primären murinen Satellitenzellen bestätigen, wo eine Hemmung von PKDs zu einer reduzierten Myotubenbildung führte. Aktiviertes PKD2 induziert die Transkriptionsaktivität von Myocyte enhancer factor 2D (Mef2D) und hemmt die Transkriptionsaktivität von Pax3. Somit können die Mitglieder der PKD-Familie, insbesondere PKD2, als wichtige Mediatoren der Muskelzelldifferenzierung *in vitro* identifiziert werden, und somit als ein neues Ziel für die Modulation der Muskelzellregeneration definiert werden.

4.1. PKD-Expression in C2C12-Zellen

Neuere Daten belegen, dass PKC ϵ während der Muskelzelldifferenzierung von C2C12-Zellen hochreguliert wird und dass die Aktivität dieser Proteinkinase während dieses Prozesses zunimmt (Gaboardi et al. 2010). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Angiotensin II-vermittelte Hypertrophie von glatter Muskulatur durch PKD2 induziert wird (Geng et al. 2009). Daher wurden in dieser Arbeit die C2C12-Zellen auf das Vorhandensein der PKD-Isoformen als Hauptsubstrate von PKC untersucht. Über Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die C2C12-Myoblasten alle drei PKD-Isoformen exprimieren (**Abbildung 8**). Da sich bei dieser Methode nur eine qualitative Aussage über das Vorhandensein der PKD-Isoformen machen ließ, wurde für eine quantitative Analyse die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine hochempfindliche Methode des Nachweises von PKD. PKD2 und PKD3 bilden auf Protein- und Expressionsebene die vorherrschende Isoform.

Allerdings konnte in C2C12-Zellen praktisch weder PKD1 nachgewiesen werden, noch zeigte sich während der Differenzierung der Zellen ein signifikanter Anstieg von PKD1, obwohl Analysen der PKD1-Expression in Mausembryonen gezeigt haben, dass PKD1 in allen Stadien der Embryogenese nachgewiesen werden kann und im Embryo ubiquitär lokalisiert ist. Darüber hinaus konnte an Tag E9,5 eine Zunahme von PKD1 in den Extremitätenknospen gemessen werden, sowie eine verstärkte Expression an Tag E14,5 im Bereich des Achsenskeletts (Ellwanger et al. 2008). Zusätzlich belegen neuere Daten, dass PKD1 *in vivo* eine Schlüsselfunktion für das Remodeling des Herzmuskels (Kim et al. 2008, Fielitz et al. 2008) und die Hypertrophie aortaler glatter Muskulatur ausübt (Geng et al. 2009), und den Muskelaufbau von Typ I-Muskelfasern aktiviert. Dies lässt vermuten, dass Muskelzelldifferenzierung in den C2C12-Zellen nicht über PKD1, sondern über andere Isoformen und Enzyme reguliert wird. Dies könnte einerseits an Kulturartefakten liegen, oder aber auch dadurch bedingt sein, dass PKD1 in den unterschiedlichen Derivaten der quergestreiften Muskulatur unterschiedliche Funktionen ausübt, wie auch aus dem Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung zu erahnen ist.

Im Gegensatz zu PKD1 konnte schon am ersten Tag nach Beginn der Differenzierung ein 6facher Anstieg von PKD2 festgestellt werden, welcher bis zum Ende der Differenzierung wieder abnahm. Ähnlich wie bei PKD1 lassen sich aus der Expression von PKD2 während der Embryonalentwicklung keine Analogien zu der Expression während der Muskelstammzelldifferenzierung herstellen. Eine vermehrte Expression von PKD2 kann ab Tag E14,5 in quergestreifter Muskulatur festgestellt werden. Davor kann es an Tag E9,5 nur in Spuren in den Extremitätenknospen und im mandibulären Branchialbogen detektiert werden (Oster et al. 2006). Allerdings lässt hier der 6fache Anstieg der PKD2-Expression eine Bedeutung für die C2C12-Zelldifferenzierung vermuten.

Das PKD3-Expressionsprofil zeigte eine entgegengesetzte Kinetik. Zelllinien wie die von uns verwendeten C2C12-Zellen haben entscheidende Nachteile gegenüber primär isolierten Satellitenzellen oder Myoblasten. Aufgrund der im Falle der C2C12-Zelllinie bereits Jahrzehnte zurückliegenden Isolation aus deren Stammzellnische ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von sogenannten Kulturartefakten deutlich erhöht und dadurch die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Hinzu kommt, dass C2C12-Zellen embryonalen Myoblasten

entsprechen und damit nicht adulten Muskelstammzellen. Daher erschien es uns von besonderer Bedeutung die Kernaussage unserer Daten in einem primären und adulten Skelettmuskelstammzellsystem zu untersuchen. Mittels chemischer PKD-Inhibition konnten wir zeigen, dass auch in Satellitenzellen die myogene Differenzierung unterdrückt wird. Damit liegt eine konservierte Funktion über die komplette Entwicklungsspanne eines Organismus (embryonal bis adult) der PKD nahe. Interessant wäre an dieser Stelle, die spezifischere Inhibition der PKDs zum Beispiel mittels shRNAs in Satellitenzellen durchzuführen. Die lentivirale Transduktion von Satellitenzellen gestaltete sich in durchgeführten Vorversuchen als äußerst schwierig, da geringe Multiplicities Of Infection (MOIs) keine guten Infektionsraten gezeigt haben und MOI-Erhöhungen zu deutlicher Toxizität geführt haben (Daten nicht gezeigt).

Die Kinetik von PKD3 lässt auf eine Bedeutung der Kinase bei der terminalen Muskelstammzellendifferenzierung schließen. Dies wird auch durch die aktuelle Literatur unterstützt. So scheint PKD3 insbesondere den Insulin-abhängigen Glucosetransport in terminal differenzierten Myotuben zu regulieren (Chen et al. 2005). Auch konnte gezeigt werden, dass PKD3 während der Embryonalentwicklung von Tag E10 bis E16,5 in sich entwickelndem Herzmuskel, sowie ab Tag E12,5 in Skelettmuskelzellen nachgewiesen werden (Ellwanger et al. 2008), wohingegen Myogenin als Initiator bereits an E8,5 exprimiert wird (Molkentin u. Olson 1996) was eine Bedeutung von PKD3 für die terminale Entwicklung der Muskelzellen auch *in vivo* erahnen lässt. Dies sollte allerdings in weiteren Experimenten genauer untersucht werden.

4.2. Wirkung der PKDs in Muskelvorläuferzellen

4.2.1. Chemische Inhibition

Um die Bedeutung von PKD2 und dessen vermehrter Aktivität näher bestimmen zu können, wurde zunächst ein System etabliert, um die Phosphorylierung von PKD2, welche einerseits durch Phorbol-12, 13-Myristatazetat (PMA) oder andererseits durch den Beginn der Differenzierung ausgelöst wurde, chemisch zu hemmen. Hierbei führte eine Inkubation mit dem chemischen Inhibitor für PKCs als Hauptregulatoren der PKDs (Gö6983) zu einer Hemmung der basalen und durch PMA stimulierten Aktivierung von PKD. Die selektive Hemmung von PKD über Gö6976 führte ebenfalls zu einer reduzierten PKD-Phosphorylierung in

C2C12-Zellen. Dies bedeutet, dass in C2C12-Zellen eine konstitutive PKC-vermittelte Aktivierung von PKDs stattfindet, welche durch chemische Inhibitoren gehemmt werden kann. Die unter Inhibition differenzierenden Zellen zeigten eine stark beeinträchtigte Myogenese. Darüber hinaus führte die Behandlung mit den Inhibitoren zu vermehrtem Zelltod innerhalb der Populationen. Leider ließ sich bei den Experimenten nicht differenzieren, ob es sich hierbei um spezifische Effekte durch die Hemmung von PKD oder unspezifische Effekte der Inhibitoren handelte. Daher wurden im Verlauf Zellzyklusanalysen mit PKD2-depletierten C2C12-Zellen durchgeführt, welche ergaben, dass die PKD2-depletierten Zellen sich, abgesehen von einem leichten, aber nicht signifikanten Trend der #PKD2-4Zellen mit weniger Zellen in der Synthese (S)-Phase (**Abbildung 17**) kaum in den Zellzyklen voneinander unterschieden (**Abbildung 17**). Somit ist der vermehrte Zelltod eher einem unspezifischen Nebeneffekt der Inhibitoren zuzuordnen. Darüber hinaus konnten aktuelle Daten nicht nachempfunden werden, dass PKDs einen Einfluss auf die Proliferation von Zellen über eine Interaktion mit Zyklin D haben (Zhukova et al. 2001). Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass nur PKD2 keinen Effekt auf diesen Signalweg hat.

Bei der Differenzierung der mit den Inhibitoren behandelten C2C12-Zellen ließ sich keine absolute Hemmung der Muskelzelldifferenzierung beobachten. Auch zeigten sich unterschiedliche Phänotypen in Abhängigkeit des jeweiligen Inhibitors. Zellen, die mit dem PKC-Inhibitor behandelt wurden, blieben weitestgehend einkernig und fusionierten kaum. PKD-inhibierte Zellen waren zwar in der Lage, zu fusionieren, bildeten jedoch keine suffizienten Myotuben. Der unterschiedliche Phänotyp, aber auch die residuelle Differenzierung nach PKD2-Inhibition könnte durch eine Induktion anderer Signalwege, die zur Myogenese führen, bedingt sein, oder durch das Vorhandensein kleiner Mengen PKD2-Proteins oder durch eine Aktivierung kompensatorischer Mechanismen, die durch andere PKD-Isoformen ausgelöst werden.

4.2.2. RNAi-vermittelte Inhibition

Die nähere Charakterisierung der Funktion von PKD2 während der Muskelstammzelldifferenzierung wurde durch lentiviralen Knock-down von PKD2 erreicht. Dieses Verfahren ließ spezifischere Aussagen über die Funktion von PKD in der Muskelzelldifferenzierung zu. Allerdings kann durch die Transduktion und

Aufreinigung zusätzlicher Stress für die Zellen entstehen, die nicht zu vereinzelt liegen dürfen und sich bei unsachgemäßer Behandlung in Morphologie und Eigenschaften verändern. Diese Gefahr wurde in meinen Experimenten durch die Verwendung verschiedener Kontrollzelllinien (shRNA-scramble-/bzw. Green Fluorescent Protein (GFP)-exprimierende Zelllinie) bzw. durch die Verwendung verschiedener shRNAs gegen PKD1-3 umgangen. Außerdem wurden die stabilen Zelllinien mehrmals täglich während der Transduktionsphase morphologisch kontrolliert um eine zu niedrige oder zu hohe Konfluenz mit einem potenziellen Einfluss auf das spätere Differenzierungsverhalten zu vermeiden. In den auf diese Weise gewonnenen PKD2-depletierten Zellen zeigte sich nach der Transduktion eine veränderte Morphologie der Zellen, sowie eine verminderte Anzahl von Myotuben während der Differenzierung (**Abbildung 15**). Eine Genexpressionsanalyse während der Differenzierung ergab stark veränderte Expressionsprofile der Expressionsmarker MyoD, Pax7, Myogenin, Mef2D und nAch in den PKD2-depletierten Zelllinien, wohingegen die charakteristische Expression dieser Marker in den Kontrollzellen nachempfunden werden konnte (**Abbildung 16**). Die Aktivierung von Satellitenzellen ist in der Regel mit einer simultanen Stimulation der Expression von Pax7 und MyoD assoziiert. MyoD gilt als Marker für die Initiation der Myogenese. Es wurde beschrieben, dass durch eine konstante MyoD-Expression eine Abnahme der Pax7-Expression erfolgt. Diese Reduktion von Pax7 ist das Startsignal für die Differenzierung der Zellen. Sobald Pax7 reduziert ist, beginnt die Myogeninexpression (Halevy et al. 2004, Zammit et al. 2006, Diel et al. 2008, Olguin u. Olwin 2004). Bei der normalen Differenzierung unbehandelter Myoblasten findet in der Regel nach 72h Differenzierung ein Expressionsmaximum von Mef2D statt. Darüber hinaus kommt es zu einer kontinuierlichen Steigerung des Markers für Muskelreife, dem nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAch) (Zhu, et al. 2004). Die Expression der Marker war in den PKD2-depletierten Zellkulturen deutlich reduziert, wohingegen die zeitliche Aufeinanderfolge der Marker unbeeinträchtigt blieb. Ähnliche Daten konnten auf Proteinebene mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine Einschränkung der "Initialzündung" der Zellfusion hin. Diese Hypothese wird nochmals zusätzlich durch die Aktivierungs-/Phosphorylierungskinetik sowie die Expression von PKD2 an Tag 1 und 2 unterstützt.

Interessanterweise zeigte sich in diesen Experimenten eine Art Dosis-Wirkungsbeziehung, so dass ein schlechterer Knock-down von PKD2 mit einer geringeren Reduktion der Expressionsfaktoren und der Myotubenbildung einherging (#PKD2-2-Konstrukt < #PKD2-4-Konstrukt). Neben dem Dosis-Wirkungseffekt des PKD2-Knock-downs zeigte sich bei der Analyse der Expressionsprofile auch, dass das Differenzierungsprogramm nicht vollständig unterbrochen wird. Dies zeigt sich darin, dass Myogenin und nAch als Reifemarker trotz des Knock-downs während der Muskelzelldifferenzierung ansteigen. Diese Tatsache ist jedoch nicht überraschend, wenn man bedenkt, dass die Muskelzelldifferenzierung ein streng kontrollierter und konservierter Vorgang ist, der von mindestens vier Schlüsselfaktoren wie MyoD, Myogenin, Myf5 und Myogenic Regulatory Factor 4 (MRF4) reguliert wird. Diese Faktoren wirken an vielen verschiedenen Angriffspunkten in der Entwicklung von Skelettmuskelzellen, die schließlich die Morphologie des Skelettmuskels bestimmen (Molkentin u. Olson 1996). Knock-out-Mäuse von MyoD oder Myf5 zeigen ein Fehlen jeglicher myogenen Aktivität (MyoD) oder eine stark reduzierte myogene Aktivität (Myf5) (Braun u. Arnold 1996). In Anbetracht der Tatsache, dass Hauptaktivatoren wie MyoD und Myf5 praktisch im Überfluss vorhanden sind, ist es nicht verwunderlich, dass die Muskelzelldifferenzierung nicht von dem Fehlen einer einzigen Kinase, wie in diesem Fall PKD2, vollständig unterbrochen werden kann. Als ultimativer Beweis dieser Daten wurde PKD2 in den Myoblasten mittels retroviraler Transduktion überexprimiert. Es zeigte sich bereits in den frühen Stadien der Differenzierung, dass die vermehrte PKD2-Expression zu einer beschleunigten Fusion der Myoblasten und einer zunehmenden Anzahl elongierter Zellen führte (**Abbildung 19E**.) Weitere molekulare Daten unterstreichen diesen Eindruck. Damit zeigen unsere Daten, dass PKD2 die ersten Schritte der Muskelzelldifferenzierung wesentlich, aber sicherlich nicht alleine beeinflusst.

4.3. PKD1 und PKD3

Da PKD1 und PKD3 ebenfalls sowohl in den C2C12-Zellen als auch in ausdifferenzierten murinen Muskelzellen detektiert werden konnten (**Abbildung 8**), wurde weiterhin untersucht, in wieweit sich ein Knock-down dieser beiden Isoformen auf die Muskelzelldifferenzierung auswirken würde. Dazu wurden exemplarisch MyoD als Marker für die Initiation der Myogenese, und nAch als

Reifemarker untersucht, um die verschiedenen Entwicklungsstadien der Muskelstammzellendifferenzierung zu erfassen (**Abbildung 18**).

Die Expressionsanalyse der PKD1-depletierten Zellen ergab keine signifikante Veränderung der MyoD- und nAch-Expression, wie bereits vermutet worden war, da PKD1 nur in sehr geringen Mengen in C2C12-Zellen exprimiert wurde und auch keine auffallende Kinetik während der Muskelzellendifferenzierung zeigte (**Abbildung 9**). Dies unterstützt die bereits oben diskutierte Vermutung, dass PKD1 in C2C12-Zellen keine entscheidende Rolle für die Myogenese einnimmt, obwohl gezeigt werden konnte, dass PKD1 entscheidende Funktionen während der Myogenese während der Embryogenese (Ellwanger et al. 2008) oder für das Remodeling des Herzmuskels (Kim et al. 2008, Fielitz et al. 2008), und die Hypertrophie aortaler glatter Muskulatur ausübt (Geng et al. 2009). Dies unterstützt die Theorie, dass PKD1 in den verschiedenen Derivaten der quergestreiften Muskulatur unterschiedliche Funktionen ausübt.

Die PKD3-depletierten Zellen zeigten keine Veränderung der Expression des Initiationsmarkers MyoD im Vergleich zu den Kontrollzellen (**Abbildung 18**), wohingegen sich eine signifikante Reduktion der nAch-Expression an Tag 5 ergab, was auf eine kritische Rolle von PKD3 gegen Ende der Differenzierung und eine Beeinträchtigung der vollständigen Ausreifung der Myotuben hinweist. Dies würde auch Daten entsprechen, dass PKD3 während der Embryogenese eher zu einem späteren Zeitpunkt der Myogenese exprimiert wird (Ellwanger et al. 2008). Möglicherweise lässt sich das damit erklären, dass PKD3 den Insulin-abhängigen Glucosetransport in terminal differenzierten Myotuben zu reguliert (Chen et al. 2005). PKD3 könnte jedoch auch über andere, bisher unerforschte Signalwege auf die terminale Differenzierung von Muskelzellen wirken, was Raum für weitere Untersuchungen lässt.

4.4. Upstream gelegene Signalwege der PKD-vermittelten Skelettmuskeldifferenzierung

Die Muskelzellendifferenzierung ist ein streng kontrollierter Prozess, der neben einem Netzwerk an myogenen Transkriptionsfaktoren auch durch extrazelluläre Stimuli gesteuert wird.

So kommt es zum Beispiel durch die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), wie z. B. der Insulin- oder der Insulin-like Growth Factor (IGF)-1-Rezeptor

(Fanzani et al. 2006, Gentile et al. 2010, Prella et al. 2000, Qiang et al. 2004, Magri et al. 1991) oder durch die Aktivierung von heptahelikalen Rezeptoren, wie z.B. den Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Rezeptoren nach Bindung durch ihren Liganden IGF1 bzw. S1P zur Aktivierung verschiedener downstream gelegener Signalwege, die letztlich ihre Aktivität auf das Netzwerk der myogenen Transkriptionsfaktoren integrieren und dadurch die myogene Differenzierung regulieren (Donati et al. 2005, Meacci et al. 2004). Eine wesentliche Rolle bei dieser Signalintegration spielen die Phospholipasen C β 1 (PLC β 1) und Cy1 (PLC γ 1) oder Phosphodiesterasen, die über eine Vielzahl an Oberflächenrezeptoren aktiviert werden können. Sie wirken ebenfalls über eine Insulin-vermittelte Aktivierung der Myogenese (Faenza et al. 2007, Lee et al. 1995). Neuere Daten belegen, dass außerdem die Isoform Proteinkinase C epsilon (PKC ϵ) während der Muskelzelldifferenzierung hochreguliert wird, und dass deren Aktivität während des Prozesses zunimmt (Gaboardi et al. 2010). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass PKC ϵ und PLC γ 1 einen Komplex bilden, der entscheidend für die Insulin-vermittelte Muskelzelldifferenzierung ist, indem aktivierte Phospholipasen C (PLC) zu einer direkten und indirekten Aktivierung der PKD-Isoformen führt (Rebecchi u. Pentylala 2000, Sturany et al. 2001, Van Lint et al. 2002). Die stark exprimierten Klasse II Histondeacetylasen (HDACs) sind dafür bekannt, dass sie die Expression von Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2)-abhängigen Genen durch eine direkte Bindung an MEF2 stark unterdrücken (Lu et al. 2000). Der Verlust der Bindung von HDAC an MEF2 und die damit verbundene Aktivierung von MEF2 wird von einem nukleären Export von HDAC in das Zytoplasma begleitet. Spätere Studien zeigen, dass die PKDs eine entscheidende Rolle in diesem Vorgang innehaben, indem sie als Substrate der Effektorinasen der PKC-Familie fungieren und den Export von Klasse II-HDACs aus dem Zellkern vermitteln (Bassel-Duby u. Olson 2006). In Anbetracht der bedeutenden Rolle der HDACs für Muskelzelldifferenzierung und -umbau und der Rolle der PKCs für die Signalübertragung während der Muskelzelldifferenzierung, ist es wahrscheinlich, dass PKDs als Hauptsubstrate von PKCs fungieren.

PKDs werden mithilfe von Klasse-I-ADP-Ribosylierungsfaktor (ARF)-Proteinen zum Golgi-Apparat geleitet (Pusapati et al. 2010). Dort werden sie durch ortständiges Diacylglycerol (DAG) und die β und γ - Untereinheiten des G-Proteingekoppelten Rezeptors (GPCR) aktiviert (Jamora et al. 1999). In C2C12-Zellen

könnte PKD2 über zwei verschiedene Signalwege aktiviert werden. Indirekt über PKC ϵ (Sturany et al. 2002), welches ebenfalls während der Muskelzellendifferenzierung aktiv ist (Faenza et al. 2007, Gaboardi et al. 2010), oder direkt über eine PLC-vermittelte Bildung von DAG (Faenza et al. 2007, Lee et al. 1995, Mirandola et al. 2006). In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass S1P PKD2 in differenzierenden C2C12-Zellen aktiviert (**Abbildung 9**). Dass PKD2 durch S1P aktiviert werden kann, welches einen starken pro-myogenen Effekt über die Steigerung der Expression von Differenzierungsfaktoren wie Myogenin, Myosin heavy chain und Caveolin-3 (Donati et al. 2005, Meacci et al. 2004) hat, lässt vermuten, dass PKD2 ebenfalls zu der Reihe von Differenzierungsfaktoren gehört und für die Myogenese eine grundlegende Bedeutung hat.

4.5. Mef2D und Pax3 - „Ying und Yang“ der PKD-vermittelten Skelettmuskeldifferenzierung

Die Muskelzellendifferenzierung wird von einem Netzwerk von Transkriptionsfaktoren aktiviert und reguliert. Diese Transkriptionsfaktoren entstammen grundsätzlich zwei großen Familien: die Gruppe der basic Helix-Loop-Helix (bHLH)-Faktoren, zu denen MyoD gehört und die auch muskuläre Regulationsfaktoren (Myogenic Regulatory Factors, MRFs) genannt werden, und die Gruppe der Myocyte Enhancer Faktors (MEF), die über eine Regulation der MADS-Box wirken. C2C12-Zellen haben als embryonale Myoblastenzelllinie alle Eigenschaften multipotenter Stammzellen: die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung. Damit stellen sich die entscheidenden Fragen zur Funktion von PKD2 für die Myogenese: Wie integrieren PKDs, insbesondere PKD2, ihre differenzierungsinduzierende Funktion auf das transkriptionelle Netzwerk, welches die Myogenese steuert? Handelt es sich um eine Aktivierung von differenzierungsfördernden Faktoren oder um eine Repression von Selbsterneuerungsfaktoren, oder um eine Kombination aus beidem?

MEF und die myogenen bHLH-Regulationsfaktoren (MRFs) wie MyoD regulieren jeweils die Expression von kontraktile Muskelproteinen. (Du et al. 2008, Nebbioso et al. 2009, Ohkawa et al. 2006, Molkentin u. Olson 1996, Braun u. Arnold 1996, Naidu et al. 1995, Kuisk et al. 1996). Es ist bekannt, dass PKD1 in seiner Funktion als Klasse II-HDAC-Kinase die Aktivität von MEF stimuliert und die

Muskelfunktion verbessert (Kim et al. 2008, Bassel-Duby u. Olson 2006). Darüber hinaus zeigen Daten aus unserem Labor, dass PKD2 in Magenkarzinomzellen über eine Phosphorylierung von Klasse II HDACs den myogenen Transkriptionsfaktor Mef2D aktivieren kann (von Blume et al. 2007). Damit könnte PKD2 über eine Aktivierung von Mef2D in Myoblasten, die Differenzierung fördern und oben genannte Effekte wesentlich downstream beeinflussen. Zur Prüfung dieser Hypothese führten wir Mef2D Promotorreporterassays (auf Luziferasebasis) durch und konnten dabei zeigen, dass eine exogene Expression von Wildtyp (WT)-PKD oder aktivem PKD in C2C12-Zellen zu einer 4,5- bzw. einer 7-fachen Zunahme der Mef2D-Promotoraktivität führte (**Abbildung 21**). Dass die Promotoraktivität auch in C2C12-Zellen, die mit dem Wildtyp transfiziert worden sind, stark erhöht ist, liegt wahrscheinlich an der Tatsache, dass bereits eine exogene Expression von PKD2 zu einer beträchtlichen Aktivierung der Kinase führt (Daten nicht gezeigt). Damit konnte gezeigt werden, dass ein wesentlicher Bestandteil der PKD-vermittelten Differenzierung die Aktivierung von Kernfaktoren der Myogenese ist, im speziellen von Mef2D. Unklar bleibt wie und ob auch die Selbsterneuerung der Myoblasten durch PKD2 unterdrückt wird. Wie oben bereits erwähnt, aktiviert PKD HDAC. Darüber hinaus aktiviert HDAC Pax3, welches eine entscheidende Rolle bei der Muskelzelldifferenzierung während der Embryogenese spielt (Goulding et al. 1994). Daher wurde in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen Pax3 und PKD2 untersucht.

Pax3 gehört zu der Familie der „paired box“-enthaltenden Gene, die zellspezifische Transkriptionsfaktoren regulieren. Pax-Gene werden an spezifischen Regionen des Embryos exprimiert, wo sie feste und Zell-/Kontextsensitive Funktionen kontrollieren. Pax3 ist im paraaxialen Mesoderm vor der Bildung der Somiten detektierbar und befindet sich in den späteren Dermomyotomen, Myotomen und Myoblasten (Goulding et al. 1994). In C2C12-Zellen konnte gezeigt werden, dass Pax3 zusammen mit Pax7 ein wesentlicher Faktor der Selbsterneuerung von Myoblasten ist. Dabei führten deren Hemmung zu einer verminderten Differenzierung und deren Expression zu einer vermehrten Selbsterneuerung der Zellen (Epstein et al. 1995, Collins et al. 2009, Young u. Wagers 2010). Es wird damit vermutet, dass Pax3 sowohl für eine dauerhafte Expression der MRFs und die Muskelzelldifferenzierung, als auch für das Wachstum der Zellpopulation zuständig ist (Collins et al. 2009). Um eine mögliche

Regulation von Pax durch PKD2 zu prüfen, wurden in C2C12-Zellen Pax3-Reporter Assays durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Expression von PKD2 zur einer Repression von Pax3 führte (**Abbildung 21**). Damit scheint PKD2 die Differenzierung von embryonalen Myoblasten und wahrscheinlich auch von adulten Satellitenzellen dual zu beeinflussen: Einerseits wird durch die Induktion von Mef2D das transkriptionelle Netzwerk der Myogenese aktiviert. Andererseits wird eine Hemmung der Selbsterneuerung durch Pax-Repression verursacht, wodurch die Muskelstammzellen den Selbsterneuerungskreislauf verlassen und in das myogene Differenzierungsprogramm eingehen.

5. Zusammenfassung

Die Muskelzellendifferenzierung ist ein hochkomplexer Prozess, der durch die basic Helix-loop-helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren MyoD, Myf5, Myogenin und Myogenic Regulatory Factor4 (MRF4) reguliert wird. Diese Faktoren kooperieren untereinander und mit den Myocyte Enhancer Factors (MEFs), einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die das Transkriptionsprogramm über eine positive Feedback-Schleife aufrechterhalten. Dies resultiert in einer Expression myofibrillärer Proteine, wie z.B. Myosin Heavy Chain (MHC). Der Verlauf der Muskelzellendifferenzierung kann mithilfe des C2C12-Zellsystems optimal evaluiert werden, da diese Zellen innerhalb von sechs Tagen ausdifferenzieren und ein klassisches Expressionsprofil entwickeln. Zusätzlich zu den myogenen Transkriptionsfaktoren sind einige Proteinkinasen identifiziert worden, die für die Regulation der Muskelzellendifferenzierung von Bedeutung sind, wie z.B. Phospholipase D (PLD), Proteinkinase C (PKC)- und Proteinkinase D (PKD)-Isoformen. Die PKD-Familie gehört zu der Superfamilie der Kalzium/Kalmodulin-abhängigen Kinasen und besteht aus drei Isoformen: PKD1, -2 und -3. PKDs werden über eine Reihe verschiedene Stimuli aktiviert, u.a. auch Phorbol ester, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) und reaktive Sauerstoffspezies. PKDs können auch über PKCs oder direkte Bindung von Diacylglycerol (DAG) in der regulatorischen Einheit aktiviert werden. Neuere Daten belegen, dass die Mitglieder der PKD-Familie auch eine Rolle für die Regulation von Skelett-, Herz-, und glatter Muskulatur spielen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von PKDs und insbesondere von PKD2 auf die Muskelzellendifferenzierung am Beispiel der C2C12-Myoblasten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass C2C12-Zellen und primäre Satellitenzellen alle PKD-Isoformen exprimieren, wobei PKD2 die dominante Isoform bildet. Expressionsanalysen mittels Western Blot und quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) konnten zeigen, dass PKD2 zu Beginn der Differenzierung aufreguliert und aktiviert wird. Es konnte festgestellt werden, dass sowohl eine pharmakologische Hemmung, als auch eine Hemmung mittels short hairpin Ribonukleinsäure (shRNA) zu einer beeinträchtigten Myogenese führten, wohingegen ein Knock-down von PKD1 und PKD3 nur einen geringen Einfluss auf die Myogenese hatte. Im Gegensatz dazu führte eine Überexpression von PKD2 zu einer beschleunigten Myogenese in C2C12-Zellen.

Als mögliches upstream gelegenes Signal konnte das als Muskelzellendifferenzierungs-Induktor bekannte bioaktive Lipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) identifiziert werden. Downstream integriert PKD2 seine promyogene Funktion dual durch eine Induktion von Myocyte enhancer factor 2D (Mef2D) (differenzierungsinduzierend) und durch eine Repression von Pax3 (selbsterneuerungshemmend). Die vorgestellten Daten werden entscheidend zu dem Verständnis der Funktion der PKDs im Skelettmuskel beitragen und könnten in Zukunft auch durch eine Modulation des Signalwegs positiv für die Skelettmuskelregeneration genutzt werden.

6. Literatur

- 1) Alexander, M. S., X. Shi, K. A. Voelker, R. W. Grange, J. A. Garcia, R. E. Hammer and D. J. Garry: "Foxj3 transcriptionally activates Mef2c and regulates adult skeletal muscle fiber type identity." *Dev Biol* 337: 396-404 (2010)
- 2) Arnold, H. H. and T. Braun: "Genetics of muscle determination and development." *Curr Top Dev Biol* 48: 129-164 (2000)
- 3) Auer, A., J. von Blume, S. Sturany, G. von Wichert, J. Van Lint, J. Vandenheede, G. Adler and T. Seufferlein: "Role of the regulatory domain of protein kinase D2 in phorbol ester binding, catalytic activity, and nucleocytoplasmic shuttling." *Mol Biol Cell* 16: 4375-4385 (2005)
- 4) Baron, C. L. and V. Malhotra: "Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane." *Science* 295: 325-328 (2002)
- 5) Bassel-Duby, R. and E. N. Olson: "Signaling pathways in skeletal muscle remodeling." *Annu Rev Biochem* 75: 19-37 (2006)
- 6) Bhatia, B., S. Singhal, H. Jayaram, P. T. Khaw and G. A. Limb: "Adult retinal stem cells revisited." *Open Ophthalmol J* 4: 30-38 (2010)
- 7) Braun, T. and H. H. Arnold: "Myf-5 and myoD genes are activated in distinct mesenchymal stem cells and determine different skeletal muscle cell lineages." *EMBO J* 15: 310-318 (1996)
- 8) Cerletti, M., S. Jurga, C. A. Witczak, M. F. Hirshman, J. L. Shadrach, L. J. Goodyear and A. J. Wagers: "Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles." *Cell* 134: 37-47 (2008)
- 9) Chen, J., G. Lu and Q. J. Wang: "Protein kinase C-independent effects of protein kinase D3 in glucose transport in L6 myotubes." *Mol Pharmacol* 67: 152-162 (2005)
- 10) Collins, C. A., V. F. Gnocchi, R. B. White, L. Boldrin, A. Perez-Ruiz, F. Relaix, J. E. Morgan and P. S. Zammit: "Integrated functions of Pax3 and Pax7 in the regulation of proliferation, cell size and myogenic differentiation." *PLoS One* 4: e4475 (2009)
- 11) Cossu, G. and S. Biressi: "Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration." *Semin Cell Dev Biol* 16: 623-631 (2005)
- 12) Czifra, G., I. B. Toth, R. Marincsak, I. Juhasz, I. Kovacs, P. Acs, L. Kovacs, P. M. Blumberg and T. Biro: "Insulin-like growth factor-I-coupled mitogenic signaling in primary cultured human skeletal muscle cells and in C2C12 myoblasts. A central role of protein kinase Cdelta." *Cell Signal* 18: 1461-1472 (2006)
- 13) Czyz, J., C. Wiese, A. Rolletschek, P. Blyszczuk, M. Cross and A. M. Wobus: "Potential of embryonic and adult stem cells in vitro." *Biological chemistry* 384: 1391-1409 (2003)
- 14) Dabeva, M. D. and D. A. Shafritz: "Hepatic stem cells and liver repopulation." *Semin Liver Dis* 23: 349-362 (2003)
- 15) De Girolamo, L., M. F. Sartori, E. Arrigoni, L. Rimondini, W. Albisetti, R. L. Weinstein and A. T. Brini: "Human adipose-derived stem cells as future tools in tissue regeneration: osteogenic differentiation and cell-scaffold interaction." *Int J Artif Organs* 31: 467-479 (2008)
- 16) Diel, P., D. Baadners, K. Schlupmann, M. Velders and J. P. Schwarz: "C2C12 myoblastoma cell differentiation and proliferation is stimulated by

- androgens and associated with a modulation of myostatin and Pax7 expression." *J Mol Endocrinol* 40: 231-241 (2008)
- 17) Donati, C., E. Meacci, F. Nuti, L. Becciolini, M. Farnararo and P. Bruni: "Sphingosine 1-phosphate regulates myogenic differentiation: a major role for S1P2 receptor." *FASEB J* 19: 449-451 (2005)
 - 18) Du, M., R. L. Perry, N. B. Nowacki, J. W. Gordon, J. Salma, J. Zhao, A. Aziz, J. Chan, K. W. Siu and J. C. McDermott: "Protein kinase A represses skeletal myogenesis by targeting myocyte enhancer factor 2D." *Mol Cell Biol* 28: 2952-2970 (2008)
 - 19) Edwards, R. G.: "Stem cells today: A. Origin and potential of embryo stem cells." *Reproductive biomedicine online* 8: 275-306 (2004)
 - 20) Eiseler, T., H. Doppler, I. K. Yan, K. Kitatani, K. Mizuno and P. Storz: "Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated F-actin reorganization and cell motility through slingshot." *Nat Cell Biol* 11: 545-556 (2009)
 - 21) Ellwanger, K., K. Pfizenmaier, S. Lutz and A. Hausser: "Expression patterns of protein kinase D 3 during mouse development." *BMC Dev Biol* 8: 47 (2008)
 - 22) Epstein, J. A., P. Lam, L. Jepeal, R. L. Maas and D. N. Shapiro: "Pax3 inhibits myogenic differentiation of cultured myoblast cells." *J Biol Chem* 270: 11719-11722 (1995)
 - 23) Faenza, I., G. Ramazzotti, A. Bavelloni, R. Fiume, G. C. Gaboardi, M. Y. Follo, R. S. Gilmour, A. M. Martelli, K. Ravid and L. Cocco: "Inositide-dependent phospholipase C signaling mimics insulin in skeletal muscle differentiation by affecting specific regions of the cyclin D3 promoter." *Endocrinology* 148: 1108-1117 (2007)
 - 24) Fanzani, A., F. Colombo, R. Giuliani, A. Preti and S. Marchesini: "Insulin-like growth factor 1 signaling regulates cytosolic sialidase Neu2 expression during myoblast differentiation and hypertrophy." *FEBS J* 273: 3709-3721 (2006)
 - 25) Fielitz, J., M. S. Kim, J. M. Shelton, X. Qi, J. A. Hill, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby and E. N. Olson: "Requirement of protein kinase D1 for pathological cardiac remodeling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3059-3063 (2008)
 - 26) Gaboardi, G. C., G. Ramazzotti, A. Bavelloni, M. Piazzini, R. Fiume, A. M. Billi, A. Matteucci, I. Faenza and L. Cocco: "A role for PKCepsilon during C2C12 myogenic differentiation." *Cell Signal* 22: 629-635 (2010)
 - 27) Geng, J., Z. Zhao, W. Kang, W. Wang, G. Liu, Y. Sun, Y. Zhang and Z. Ge: "Hypertrophic response to angiotensin II is mediated by protein kinase D-extracellular signal-regulated kinase 5 pathway in human aortic smooth muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun* 388: 517-522 (2009)
 - 28) Gentile, M. A., P. V. Nantermet, R. L. Vogel, R. Phillips, D. Holder, P. Hodor, C. Cheng, H. Dai, L. P. Freedman and W. J. Ray: "Androgen-mediated improvement of body composition and muscle function involves a novel early transcriptional program including IGF1, mechano growth factor, and induction of {beta}-catenin." *J Mol Endocrinol* 44: 55-73 (2010)
 - 29) Goulding, M., A. Lumsden and A. J. Paquette: "Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development." *Development* 120: 957-971 (1994)
 - 30) Gros, J., M. Manceau, V. Thome and C. Marcelle: "A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells." *Nature* 435: 954-958 (2005)

- 31) Gschwendt, M., S. Dieterich, J. Rennecke, W. Kittstein, H. J. Mueller and F. J. Johannes: "Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes." FEBS Lett 392: 77-80 (1996)
- 32) Halevy, O., Y. Piestun, M. Z. Allouh, B. W. Rosser, Y. Rinkevich, R. Reshef, I. Rozenboim, M. Wleklinski-Lee and Z. Yablonka-Reuveni: "Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal." Dev Dyn 231: 489-502 (2004)
- 33) Hasty, P., A. Bradley, J. H. Morris, D. G. Edmondson, J. M. Venuti, E. N. Olson and W. H. Klein: "Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene." Nature 364: 501-506 (1993)
- 34) Hsu, Y. C., D. C. Lee and I. M. Chiu: "Neural stem cells, neural progenitors, and neurotrophic factors." Cell Transplant 16: 133-150 (2007)
- 35) Jackson, L. N., J. Li, L. A. Chen, C. M. Townsend and B. M. Evers: "Overexpression of wild-type PKD2 leads to increased proliferation and invasion of BON endocrine cells." Biochem Biophys Res Commun 348: 945-949 (2006)
- 36) Jamora, C., N. Yamanouye, J. Van Lint, J. Laudenslager, J. R. Vandenheede, D. J. Faulkner and V. Malhotra: "Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D." Cell 98: 59-68 (1999)
- 37) Kim, M., H. R. Jang, J. H. Kim, S. M. Noh, K. S. Song, J. S. Cho, H. Y. Jeong, J. C. Norman, P. T. Caswell, G. H. Kang, S. Y. Kim, H. S. Yoo and Y. S. Kim: "Epigenetic inactivation of protein kinase D1 in gastric cancer and its role in gastric cancer cell migration and invasion." Carcinogenesis 29: 629-637 (2008)
- 38) Kim, M. S., J. Fielitz, J. McAnally, J. M. Shelton, D. D. Lemon, T. A. McKinsey, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby and E. N. Olson: "Protein kinase D1 stimulates MEF2 activity in skeletal muscle and enhances muscle performance." Mol Cell Biol 28: 3600-3609 (2008)
- 39) Kleger, A., C. Loebnitz, G. V. Pusapati, M. Armacki, M. Muller, S. Tumpel, A. Illing, D. Hartmann, C. Brunner, S. Liebau, K. L. Rudolph, G. Adler and T. Seufferlein: "Protein kinase D2 is an essential regulator of murine myoblast differentiation." PLoS One 6 e14599 (2011)
- 40) Kuisk, I. R., H. Li, D. Tran and Y. Capetanaki: "A single MEF2 site governs desmin transcription in both heart and skeletal muscle during mouse embryogenesis." Dev Biol 174: 1-13 (1996)
- 41) Lee, S. J., Y. H. Lee, Y. S. Kim, S. H. Ryu and P. G. Suh: "Transcriptional regulation of phospholipase C-gamma 1 gene during muscle differentiation." Biochem Biophys Res Commun 206: 194-200 (1995)
- 42) Li, L. and T. Xie: "Stem cell niche: structure and function." Annu Rev Cell Dev Biol 21: 605-631 (2005)
- 43) Liljedahl, M., Y. Maeda, A. Colanzi, I. Ayala, J. Van Lint and V. Malhotra: "Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network." Cell 104: 409-420 (2001)
- 44) Lin, J., H. Wu, P. T. Tarr, C. Y. Zhang, Z. Wu, O. Boss, L. F. Michael, P. Puigserver, E. Isotani, E. N. Olson, B. B. Lowell, R. Bassel-Duby and B. M. Spiegelman: "Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres." Nature 418: 797-801 (2002)

- 45) Lovell-Badge, R.: "The future for stem cell research." *Nature* 414: 88-91 (2001)
- 46) Lu, J., T. A. McKinsey, R. L. Nicol and E. N. Olson: "Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4070-4075 (2000)
- 47) Ludolph, D. C. and S. F. Konieczny: "Transcription factor families: muscling in on the myogenic program." *FASEB J* 9 1595-1604 (1995)
- 48) Magri, K. A., D. Z. Ewton and J. R. Florini: "The role of the IGFs in myogenic differentiation." *Adv Exp Med Biol* 293: 57-76 (1991)
- 49) Mallet, V. O. and H. Gilgenkrantz: "Mobilizing stem cells to repair liver after surgery: dream or reality?" *J Hepatol* 43: 754-756 (2005)
- 50) Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam: "The protein kinase complement of the human genome." *Science* 298: 1912-1934 (2002)
- 51) Matthews, S. A., R. Dayalu, L. J. Thompson and A. M. Scharenberg: "Regulation of protein kinase C η by the B-cell antigen receptor." *J Biol Chem* 278: 9086-9091 (2003)
- 52) McKay, R.: "Stem cells--hype and hope." *Nature* 406: 361-364 (2000)
- 53) McMahon, D. K., P. A. Anderson, R. Nassar, J. B. Bunting, Z. Saba, A. E. Oakeley and N. N. Malouf: "C2C12 cells: biophysical, biochemical, and immunocytochemical properties." *Am J Physiol* 266: C1795-1802 (1994)
- 54) Meacci, E., F. Cencetti, C. Donati, F. Nuti, L. Becciolini and P. Bruni: "Sphingosine kinase activity is required for sphingosine-mediated phospholipase D activation in C2C12 myoblasts." *Biochem J* 381: 655-663 (2004)
- 55) Mirandola, P., G. Gobbi, C. Ponti, I. Sponzilli, L. Cocco and M. Vitale: "PKC ϵ controls protection against TRAIL in erythroid progenitors." *Blood* 107: 508-513 (2006)
- 56) Molkentin, J. D. and E. N. Olson: "Defining the regulatory networks for muscle development." *Curr Opin Genet Dev* 6: 445-453 (1996)
- 57) Moran, J. L., Y. Li, A. A. Hill, W. M. Mounts and C. P. Miller: "Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling." *Physiol Genomics* 10: 103-111 (2002)
- 58) Naidu, P. S., D. C. Ludolph, R. Q. To, T. J. Hinterberger and S. F. Konieczny: "Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis." *Mol Cell Biol* 15: 2707-2718 (1995)
- 59) Naya, F. J. and E. Olson: "MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation." *Curr Opin Cell Biol* 11: 683-688 (1999)
- 60) Nebbioso, A., F. Manzo, M. Miceli, M. Conte, L. Manente, A. Baldi, A. De Luca, D. Rotili, S. Valente, A. Mai, A. Usiello, H. Gronemeyer and L. Altucci: "Selective class II HDAC inhibitors impair myogenesis by modulating the stability and activity of HDAC-MEF2 complexes." *EMBO Rep* 10: 776-782 (2009)
- 61) Oancea, E., V. J. Bezzerides, A. Greka and D. E. Clapham: "Mechanism of persistent protein kinase D1 translocation and activation." *Dev Cell* 4: 561-574 (2003)
- 62) Ohkawa, Y., C. G. Marfella and A. N. Imbalzano: "Skeletal muscle specification by myogenin and Mef2D via the SWI/SNF ATPase Brg1." *EMBO J* 25: 490-501 (2006)

- 63) Olguin, H. C. and B. B. Olwin: "Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal." *Dev Biol* 275: 375-388 (2004)
- 64) Olson, E. N., M. Perry and R. A. Schulz: "Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors." *Dev Biol* 172: 2-14 (1995)
- 65) Oster, H., D. Abraham and M. Leitges: "Expression of the protein kinase D (PKD) family during mouse embryogenesis." *Gene Expr Patterns* 6: 400-408 (2006)
- 66) Prella, K., A. M. Wobus, O. Krebs, W. F. Blum and E. Wolf: "Overexpression of insulin-like growth factor-II in mouse embryonic stem cells promotes myogenic differentiation." *Biochem Biophys Res Commun* 277: 631-638 (2000)
- 67) Prigozhina, N. L. and C. M. Waterman-Storer: "Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility." *Curr Biol* 14: 88-98 (2004)
- 68) Pusapati, G. V., D. Krndija, M. Armacki, G. von Wichert, J. von Blume, V. Malhotra, G. Adler and T. Seufferlein: "Role of the second cysteine-rich domain and Pro275 in protein kinase D2 interaction with ADP-ribosylation factor 1, trans-Golgi network recruitment, and protein transport." *Mol Biol Cell* 21: 1011-1022 (2010)
- 69) Pyne, S. and N. J. Pyne: "Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells." *Biochem J* 349: 385-402 (2000)
- 70) Qiang, Y. W., L. Yao, G. Tosato and S. Rudikoff: "Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells." *Blood* 103: 301-308 (2004)
- 71) Rebecchi, M. J. and S. N. Pentylala: "Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C." *Physiol Rev* 80: 1291-1335(2000)
- 72) Riccio, M., E. Resca, T. Maraldi, A. Pisciotta, A. Ferrari, G. Bruzzesi and A. De Pol: "Human dental pulp stem cells produce mineralized matrix in 2D and 3D cultures." *Eur J Histochem* 54: e46 (2010)
- 73) Roskams, T.: "Different types of liver progenitor cells and their niches." *J Hepatol* 45: 1-4 (2006)
- 74) Rudnicki, M. A. and R. Jaenisch: "The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis." *Bioessays* 17: 203-209 (1995)
- 75) Rykx, A., L. De Kimpe, S. Mikhalap, T. Vantus, T. Seufferlein, J. R. Vandenheede and J. Van Lint: "Protein kinase D: a family affair." *FEBS Lett* 546: 81-86 (2003)
- 76) Sadler, Thomas W.: Embryonalperiode (vierte bis achte Woche) S100-103, Sadler, Medizinische Embryologie, Georg Thieme Stuttgart 2008
- 77) Schiaffino, S. and C. Mammucari: "Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models." *Skelet Muscle* 1: 4 (2011)
- 78) Shore, P. and A. D. Sharrocks: "The MADS-box family of transcription factors." *Eur J Biochem* 229: 1-13 (1995)
- 79) Spradling, A., D. Drummond-Barbosa and T. Kai: "Stem cells find their niche." *Nature* 414: 98-104 (2001)

- 80) Stempka, L., A. Girod, H. J. Muller, G. Rincke, F. Marks, M. Gschwendt and D. Bossemeyer: "Phosphorylation of protein kinase Cdelta (PKCdelta) at threonine 505 is not a prerequisite for enzymatic activity. Expression of rat PKCdelta and an alanine 505 mutant in bacteria in a functional form." *J Biol Chem* 272: 6805-6811 (1997)
- 81) Storz, P., H. Doppler and A. Toker: "Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species." *Mol Cell Biol* 25: 8520-8530 (2005)
- 82) Sturany, S., J. Van Lint, A. Gilchrist, J. R. Vandenheede, G. Adler and T. Seufferlein: "Mechanism of activation of protein kinase D2(PKD2) by the CCK(B)/gastrin receptor." *The Journal of biological chemistry* 277: 29431-29436 (2002)
- 83) Sturany, S., J. Van Lint, A. Gilchrist, J. R. Vandenheede, G. Adler and T. Seufferlein: "Mechanism of activation of protein kinase D2(PKD2) by the CCK(B)/gastrin receptor." *J Biol Chem* 277: 29431-29436 (2002)
- 84) Sturany, S., J. Van Lint, F. Muller, M. Wilda, H. Hameister, M. Hocker, A. Brey, U. Gern, J. Vandenheede, T. Gress, G. Adler and T. Seufferlein: "Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2. A novel member of the protein kinase D family of serine threonine kinases." *J Biol Chem* 276: 3310-3318 (2001)
- 85) Van Lint, J., A. Rykx, Y. Maeda, T. Vantus, S. Sturany, V. Malhotra, J. R. Vandenheede and T. Seufferlein: "Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move." *Trends Cell Biol* 12: 193-200 (2002)
- 86) Venuti, J. M., J. H. Morris, J. L. Vivian, E. N. Olson and W. H. Klein: "Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development." *J Cell Biol* 128: 563-576 (1995)
- 87) von Blume, J., U. Knippschild, F. Dequiedt, G. Giamas, A. Beck, A. Auer, J. Van Lint, G. Adler and T. Seufferlein: "Phosphorylation at Ser244 by CK1 determines nuclear localization and substrate targeting of PKD2." *EMBO J* 26: 4619-4633 (2007)
- 88) von Wichert, G., T. Edenfeld, J. von Blume, H. Krisp, D. Krndija, H. Schmid, F. Oswald, U. Lothar, P. Walther, G. Adler and T. Seufferlein: "Protein kinase D2 regulates chromogranin A secretion in human BON neuroendocrine tumour cells." *Cell Signal* 20: 925-934 (2008)
- 89) Wakioka, T., A. Sasaki, R. Kato, T. Shouda, A. Matsumoto, K. Miyoshi, M. Tsuneoka, S. Komiya, R. Baron and A. Yoshimura: "Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling." *Nature* 412: 647-651 (2001)
- 90) Waldron, R. T., O. Rey, T. Iglesias, T. Tugal, D. Cantrell and E. Rozengurt: "Activation loop Ser744 and Ser748 in protein kinase D are transphosphorylated in vivo." *J Biol Chem* 276: 32606-32615 (2001)
- 91) Waldron, R. T. and E. Rozengurt: "Protein kinase C phosphorylates protein kinase D activation loop Ser744 and Ser748 and releases autoinhibition by the pleckstrin homology domain." *J Biol Chem* 278: 154-163 (2003)
- 92) Wang, D., X. Yu and P. Brecher: "Nitric oxide and N-acetylcysteine inhibit the activation of mitogen-activated protein kinases by angiotensin II in rat cardiac fibroblasts." *J Biol Chem* 273: 33027-33034 (1998)
- 93) Wang, H., Q. Xu, F. Xiao, Y. Jiang and Z. Wu: "Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, and gamma isoforms in myogenic differentiation." *Mol Biol Cell* 19: 1519-1528 (2008)
- 94) Wehr, R. and P. Gruss: "Pax and vertebrate development." *Int J Dev Biol* 40: 369-377 (1996)

- 95) Weintraub, H.: "The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds." *Cell* 75: 1241-1244 (1993)
- 96) Yaffe, D. and O. Saxel: "Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle." *Nature* 270: 725-727 (1977)
- 97) Yeaman, C., M. I. Ayala, J. R. Wright, F. Bard, C. Bossard, A. Ang, Y. Maeda, T. Seufferlein, I. Mellman, W. J. Nelson and V. Malhotra: "Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network." *Nat Cell Biol* 6: 106-112 (2004)
- 98) Yoon, M. S. and J. Chen: "PLD regulates myoblast differentiation through the mTOR-IGF2 pathway." *J Cell Sci* 121: 282-289 (2008)
- 99) Young, A. P. and A. J. Wagers: "Pax3 induces differentiation of juvenile skeletal muscle stem cells without transcriptional upregulation of canonical myogenic regulatory factors." *J Cell Sci* 123: 2632-2639 (2010)
- 100) Yun, K. and B. Wold: "Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context." *Curr Opin Cell Biol* 8: 877-889 (1996)
- 101) Zammit, P. S., F. Relaix, Y. Nagata, A. P. Ruiz, C. A. Collins, T. A. Partridge and J. R. Beauchamp: "Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells." *J Cell Sci* 119: 1824-1832 (2006)
- 102) Zhu, S., P. J. Goldschmidt-Clermont and C. Dong: "Transforming growth factor-beta-induced inhibition of myogenesis is mediated through Smad pathway and is modulated by microtubule dynamic stability." *Circ Res* 94: 617-625 (2004)
- 103) Zhukova, E., J. Sinnott-Smith, H. Wong, T. Chiu and E. Rozengurt: "CCK(B)/gastrin receptor mediates synergistic stimulation of DNA synthesis and cyclin D1, D3, and E expression in Swiss 3T3 cells." *J Cell Physiol* 189: 291-305 (2001)
- 104) Ziomek, C. A. and M. H. Johnson: "Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction." *Cell* 21: 935-942 (1980)

7. Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Guido Adler, Prof Dr. Götz von Wichert als konsiliarischem Leiter der Abteilung für Innere Medizin der Universität Ulm und Prof. Dr. Seufferlein für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und des Equipments bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Seufferlein für die konstante und sehr anregende Betreuung während meiner gesamten Arbeit, welche die Neugierde an der Wissenschaft weckte.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Alexander Kleger bedanken, welcher mich zu jeder Tag- und Nachtzeit enthusiastisch betreute, meinen Ehrgeiz zu wecken verstand und in wissenschaftlicher und menschlicher Hinsicht meine Entwicklung weit voranbrachte.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Claudia Ruhland, welche mich jederzeit hilfsbereit, engagiert, geduldig und fundiert in die Grundlagen der Laborarbeit einführte. Die Diskussionen und die Arbeit mit ihr waren eine Bereicherung meines Laboralltags und haben mich immer wieder aufgebaut und motiviert. Ich danke auch Ralf Köhntop, der mir ebenfalls mit Rat und Tat zur Seite stand.

Dankbar bin ich für die wissenschaftliche und tatkräftige Unterstützung durch Dr. Milena Armacki, Dr. Ganesh Pusapati, Dr. Tobias Busch, Dr. Julia von Blume und Dr. Stefan Liebau. Die Arbeit mit ihnen war sehr lehrreich für mich.

Mein weiterer Dank gilt Frau PD Dr. Cornelia Brunner, Dr. Anett Illing und Dr. Stefan Tümpel für die ergänzenden Daten in Zusammenhang mit den Zellzyklusanalysen und der Arbeit mit primären Satellitenzellen, welche meine Arbeit vervollständigten.

Besonders möchte ich Michael Gallwitz danken, welcher alle Hochs und Tiefs während dieser Arbeit geduldig ertrug und mich mit der nötigen Kraft und dem nötigen Durchhaltevermögen versorgte.

8. Lebenslauf

- Aus Gründen des Datenschutz entfernt-

9. Veröffentlichung

Alexander Kleger, Christiane Loebnitz, Ganesh Varma Pusapati, Martin Müller, Stefan Tümpel, Anett Illing, Daniel Hartmann, Cornelia Brunner, Stefan Liebau, Lenhard Rudolph, Guido Adler, Thomas Seufferlein: "Protein kinase D2 is an essential regulator of murine myoblast differentiation." PLoS One (1): e14599 (2011).