

Sachbericht „Talente für Sachsens an der Berufsakademie“ des SMWK

Projekttitle

Etablierung fortgeschrittener mikroskopischer Verfahren für den Nachweis myogener Regulationsfaktoren und deren Expressionsprofil während der Muskeldifferenzierung

Projektverantwortliche

Name: Rentsch Vorname: Barbe akad. Grad.: Prof. Dr. rer. medic.

Staatliche Studienakademie Riesa, Studiengang Labor- und Verfahrenstechnik

Sachbericht

Ziel des abgeschlossenen Projektes war die Etablierung mikroskopischer Nachweismethoden, um myogenen Regulationsfaktoren und deren Expressionsprofil während der Muskeldifferenzierung zu charakterisieren. Als Modellsystem dienten dazu C2C12-Zellen, eine Mausmuskelzelllinie.

Im Rahmen des Projektes wurde das im Studiengang Labor- und Verfahrenstechnik vorhandene Fluoreszenzmikroskop durch einen Dualbandfilter FITC + TexasRed ergänzt. Im herkömmlichen Mikroskop werden Fluoreszenz-Erscheinungen überstrahlt und sind deshalb nicht erkennbar. Deshalb muss durch eine geschickte Auswahl von Filtern dafür gesorgt werden, dass möglichst nur das Fluoreszenz-Licht an der Bildentstehung teilnimmt. Floreszenzen und deren Anregung treten im Bereich unterschiedlicher Wellenlängen des Lichts auf. Deshalb existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Filterkombinationen, welche jeweils an eine oder mehrere Floreszenzen speziell angepasst sind. Die meisten Fragestellungen in der biotechnologischen Anwendung manche die Nutzung von mehreren Fluoreszenzfilter und damit eingehend mehreren zu detektierenden Floreszenzen nötig. Neben einer blauen Fluoreszenz (DAPI = Zellkern), sind vor allem Rot und Grün die zwei der am meisten bevorzugten Farben aus dem gesamten chromatischen Spektrum.

Myogenese beschreibt den Prozess der Muskelzellendifferenzierung. Muskelvorläuferzellen, sogenannte Myoblasten, fusionieren zu ausgewaschenen mehrkernigen Muskelfasern (Abbildung 1). Diese Entwicklung spiegelt sich in einem zeitlichen abgestimmten Muster der Genexpression wieder. Myogene Regulationsfaktoren (MRFs), wie MyoD, Myogenin, Mrf4 und Myf5 werden exprimiert und können zu unterschiedlichen Zeiten in den Zellen nachgewiesen werden.

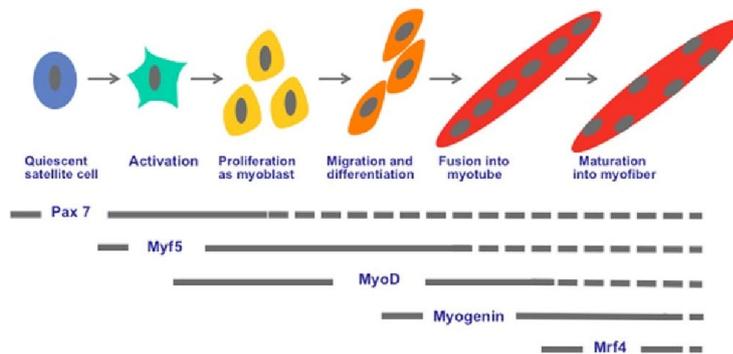


Abbildung 1. Myogene Regulationsfaktoren während der Skelettmuskelregeneration (Zanou2013*)

Ruhenden Zellen können aktiviert werden. Sie exprimieren Myf5, um sich als Myoblast zu vermehren. MyoD, Myogenin und Mrf4 bilden die Schlüssel-MRF, um die Myoblastenfusion zu Muskelfasern zu regulieren.

*Zanou N, Gailly P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. Cell Mol Life Sci. 2013 Nov;70(21):4117-30.

Zur Untersuchung des Differenzierungsverhaltens der Muskelzellen wurden unterschiedliche Methoden herangezogen. Weiterhin wurde die Kultivierung dieser Zellen in Alginate-Gelen etabliert sowie erste Versuche an Alginate-Kollagen-Hydrogelen durchgeführt. Über die mikroskopische Untersuchung dieser Zellen konnte die Morphologie der Zellen in undifferenziertem sowie in differenziertem Zustand Auskunft geben. Undifferenzierte Zellen zeigen eine Fibroblasten-ähnliche, spindel- bis sternförmige Morphologie (Abbildung 2 A). Bei der Differenzierung verlängern sich die Zellen, lagern sich aneinander und verschmelzen miteinander (Abbildung 2 B).

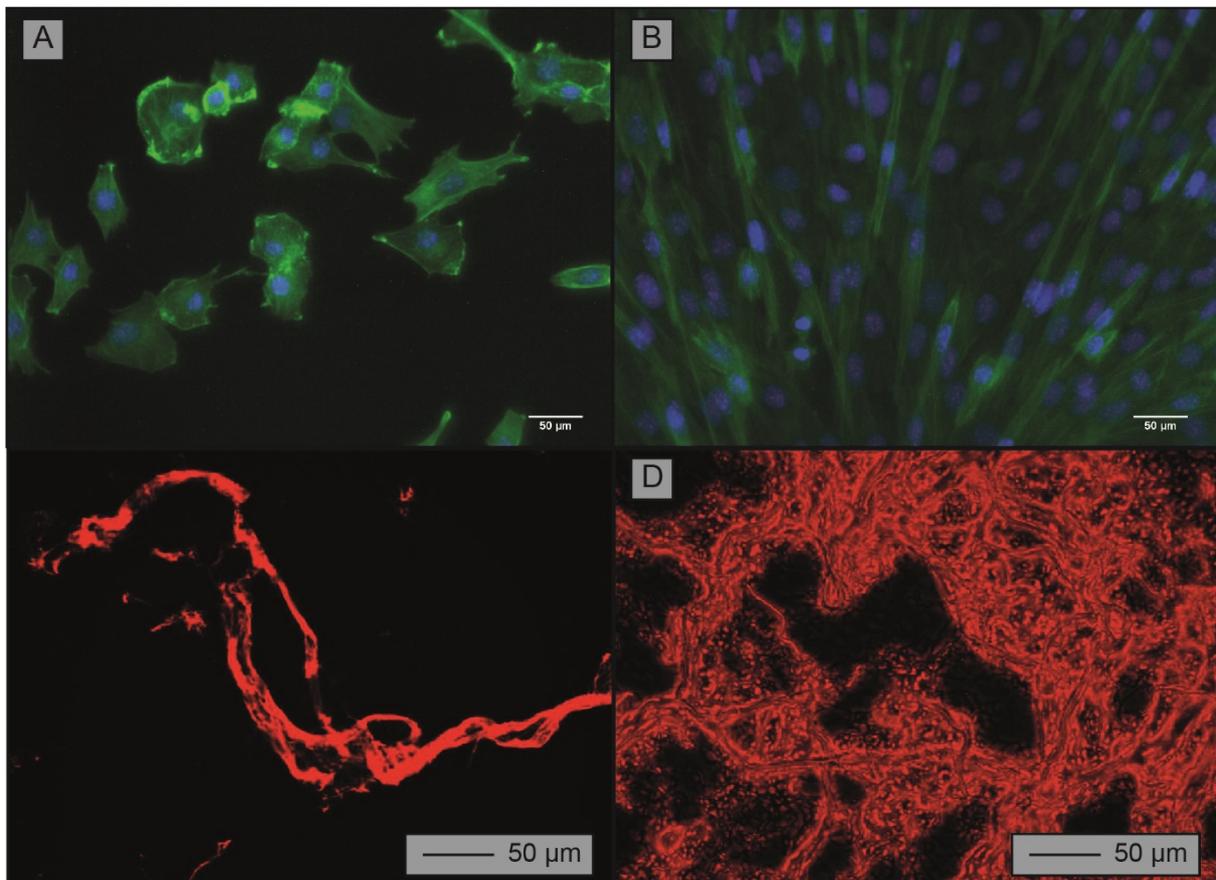


Abbildung 2. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

(A) C2C12 Mausmuskelzellen undifferenzierte Morphologie, (B) C2C12 Mausmuskelzellen differenzierte Morphologie, (C) Kollagenfibrille; (D) Kollagennetzwerk. (grün = Cytoskelett; blau = Zellkern; rot = Kollagen)

Weiterhin wurden zwei Antikörper, die spezifisch die Differenzierungsstadien der Muskelzellen charakterisieren können, eingesetzt. Zunächst wurden in Vorversuchen die experimentellen Bedingungen, wie Inkubationszeiten sowie Verdünnungen, etabliert. Die Untersuchung der undifferenzierten sowie der differenzierten Zellen ist derzeit in Arbeit.

Zusätzlich wurden mikroskopische Methoden herangezogen, um die Hydrogele, in denen die Zellen immobilisiert wurden, zu charakterisieren. Kollagen als ein möglicher Partner bei der Hydrogelbildung ist ein langkettiges Protein, das ausgehend von Einzelproteinen, über eine Helix aus drei Proteinen bis hin zu unterschiedlichen starken Quervernetzungen, große Fibrillen aufweist (Abbildung 2 C), die zusammen Netzwerke bilden (Abbildung 2 D).