

Aus dem Institut für Myologie des Experimental and Clinical Research Centers
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung von humanen Satellitenzellen und deren
Proliferationseigenschaften

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sina Gloy

aus Neumünster

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. S. Spuler
2. Prof. /MD PhD H. Amthor
3. Priv. – Doz. Dr. K. Claeys

Datum der Promotion: 7.9.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	5
1 Einleitung.....	6
1.1 <i>Struktur und Myogenese der Skelettmuskulatur</i>	6
1.1.2 Funktion von myogenen Regulationsfaktoren während der Myogenese	7
1.2 <i>Die Satellitenzelle</i>	8
1.2.1 Herkunft und Funktion von Satellitenzellen	8
1.2.2 Charakterisierung von Satellitenzellen anhand immunhistochemischer Marker	10
1.2.3 Pax7 ist ein wichtiger Faktor in der Generierung und Erhaltung von Satellitenzellen	12
1.3 <i>Herausforderung bei der Isolation von humanen Satellitenzellen</i>	13
1.4 <i>Aktuelle Ergebnisse in der Charakterisierung von humanen Satellitenzellen</i>	13
1.5 <i>Zielstellung dieser Promotionsarbeit</i>	14
2 Material.....	16
2.1 <i>Chemikalien und Verbrauchsmateriale</i>	16
2.2 <i>Antikörper</i>	18
2.2.1 Primäre Antikörper	18
2.2.2 sekundäre Antikörper	18
2.2.3 Standardpuffer und Medien	18
3 Methoden	20
3.1 <i>Ethikantrag</i>	20
3.2 <i>Etablierung einer Methodik zur rein mechanischen Faserisolation</i>	20
3.2.1 Vorbereitung des Arbeitsplatzes.....	20
3.2.2 Ankunft des humanen Skelettmuskels aus dem Operationssaal	21
3.2.3 Präparation der einzelnen Muskelfasern	22
3.2.4 Kultivierung mechanisch isolierter Muskelfasern	23
3.3 <i>Enzymatische Myoblastenisolation</i>	24
3.3.1 Kultivierung enzymatisch isolierter Myoblasten	24
3.4 <i>Differenzierung kultivierter Myoblasten</i>	25
3.5 <i>Herstellung von Kryogewebeschnitten</i>	25
3.6 <i>Immunhistochemie</i>	25
3.6.1 Immunhistochemische Färbungen nach enzymatischer Myoblastenisolation und anschließender Immobilisierung der Zellen durch Zentrifugation	26
3.6.2 Verwendete Antikörperverdünnungen.....	26
3.7 <i>Proteinchemische Methoden</i>	27
3.7.1 Herstellung von Proteinlysaten.....	27
3.7.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	27
3.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	27
3.7.4 Westernblot.....	29
3.8 <i>Auswertung</i>	30
3.8.1 Auswertung immunhistochemischer Abbildungen	30
3.8.2 Statistische Auswertung	31
4 Ergebnisse	32

4.1. Pax7 zeigt sich als aussagekräftigster Marker zur Charakterisierung von humanen Satellitenzellen.....	32
4.2 Altersabhängige Abnahme des prozentualen Anteils der Pax7 - positiven Satellitenzellen.....	34
4.3 c-Met charakterisiert eine Pax7 - negative Subpopulation an Muskelvorläuferzellen.....	37
4.4 CXCR4 markiert eine eigene Subpopulation an Muskelvorläuferzellen.....	39
4.5 Satellitenzellen zeigen myogenes Regenerationspotenzial in vitro.....	41
4.6 Die Differenzierung von Myoblasten ist abhängig von myogenen Regulationsfaktoren.....	43
4.7 Die Differenzierung von der Satellitenzelle zur reifen Myotube wird durch unterschiedliche Antigene charakterisiert.....	46
4.7.1 Endzusammenfassung der Ergebnisse.....	46
5 Diskussion.....	49
5.1 Methodendiskussion.....	49
5.1.1 Isolationsmethode.....	49
5.1.2 Immunzytochemie.....	50
5.2 Ergebnisdiskussion.....	51
5.2.1 Pax7 als Satellitenzellmarker.....	51
5.2.2 Veränderung des prozentualen Anteils der Pax7 - positiven Satellitenzellen mit Zunahme des Alters ...	52
5.2.3 Expression von c-Met und CXCR4.....	53
5.2.4 Myogenes Potenzial von Satellitenzellen <i>in vitro</i>	56
5.2.5 Heterogenität von Satellitenzellen.....	57
5.3 Bedeutung der Satellitenzellen für die Medizin.....	58
5.4 Resümee.....	59
6 Zusammenfassung.....	61
7 Summary.....	63
8 Abkürzungsverzeichnis.....	64
9 Literaturverzeichnis.....	66
Paper.....	69
Kongressbeiträge.....	69
Erklärung.....	70
Danksagung.....	71
Lebenslauf.....	72

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Expression der MRFs während der Myogenese.	7
Abbildung 2: Anatomische Lage der Satellitenzellen.	9
Abbildung 3: Vorbereitung des Arbeitsplatzes vor dem Beginn der Faserisolation.	21
Abbildung 4: Ankunft des humanen Skelettmuskels aus dem Operationssaal.	21
Abbildung 5: Mechanische Isolation der einzelnen Muskelfasern	23
Abbildung 6: Pax7-Expression in humanem Skelettmuskel.	33
Abbildung 7: Abhängigkeit des prozentualen Anteils der Satellitenzellen vom Alter.	36
Abbildung 8: Kein signifikanter Unterschied des prozentualen Anteils von Pax7 – positiven Satellitenzellen bei gesunden und potenziell erkrankten Probanden.	37
Abbildung 9: c-Met Expression in humanem Skelettmuskel.	38
Abbildung 10: CXCR4-Expression in humanen Satellitenzellen.	40
Abbildung 11: Proliferierende Myoblasten aus isolierten Muskelfasern.	42
Abbildung 12: Expression von myogenen Regulationsfaktoren in fusionierenden Myoblasten aus Normalkontrollen.	44
Abbildung 13: Westernblot Analyse zur Expression von MyoD in differenzierenden Zelle	45
Abbildung 14: Antigenexpression im Verlauf der Differenzierung von der Satellitenzelle zur reifen Myotube	47
Abbildung 15: Heterogenität von Satellitenzellen.	57
Tabelle 1: Bekannte murine Satellitenzellmarker	10
Tabelle 2: Verwendete Muskelbiopsien	35

1 Einleitung

1.1 Struktur und Myogenese der Skelettmuskulatur

Die Skelettmuskulatur stellt ungefähr die Hälfte des Körpergewichtes dar und spielt damit eine wichtige Rolle für den menschlichen Körper. Das Zellindividuum der Skelettmuskulatur ist die Muskelfaser, die durch Fusion von einkernigen Zellen, den Myoblasten, entsteht. Jede einzelne Muskelfaser besteht aus mehreren Myofibrillen, die die kontraktilen Proteine Myosin und Actin beinhalten [1].

Die Entwicklung der Skelettmuskulatur des Vertebraten geht von den Somiten aus [2, 3], die aus dem paraxialen Mesoderm hervorgehen. Durch induktive und inhibierende Signale des umgebenden Gewebes sowie der Extrazellulärmatrix gewinnen die Somiten eine dorsal - ventrale, eine anterior - posteriore und eine medial - laterale Polarität [4]. Aus Regionen des ventralen Anteils entwickeln sich hierbei unter Deepithelisierung Zellen des Sklerotoms, das durch die Expression der paired-box-Transkriptionsfaktoren Pax1 und Pax9 gekennzeichnet sind. Die Zellen des dorsalen Anteils hingegen exprimieren Pax3 und Pax7, behalten ihre Epithelisierung bei und bilden das Dermomyotom [1, 4].

Aus dem Sklerotom entwickeln sich im weiteren Verlauf Knochen und Knorpel der Wirbelsäule und der Rippen. Aus dem Dermomyotom entspringt die Dermis der Haut sowie ein großer Teil der Skelettmuskulatur [5]. Das Dermomyotom wird wiederum unterteilt in einen epaxialen Anteil für die Muskulatur des Rückens und einen hypaxialen Anteil für die Muskulatur von Rippen, Extremitäten und Abdomen [1, 3, 6].

Ein wichtiger Schritt in der Formation der Skelettmuskulatur stellt die Bildung des Myotoms dar, das durch Delamination von Muskelvorläuferzellen aus dem Dermomyotom entsteht [7]. Zusätzlich migrieren Muskelvorläuferzellen in die Anlagen für die Extremitäten, wobei sie während der gesamten Migration in einem undifferenzierten Stadium verweilen und erst mit Erreichen ihres endgültigen Zieles differenzieren [8].

In Studien wurde gezeigt, dass *Pax3* eine essenzielle Rolle während der Migration von Muskelvorläuferzellen einnimmt. *Splotch* (*Pax3* - mutante) - Mäuse sind durch das Fehlen der Extremitätenmuskulatur gekennzeichnet, womit die Notwendigkeit von *Pax3* für den Migrationsprozess nachgewiesen werden konnte.

Eine gestörte Migration von Muskelvorläuferzellen konnte auch in Mäusen beobachtet werden, die eine Mutation von *c-Met*, dem Rezeptor für den Hepatozyten-growth-factor (HGF) oder auch Scatter Factor (SF) genannt, aufwiesen. In weiteren Versuchen mit *Splotch* - Mäusen wurde

gezeigt, dass auch hier kein c-Met exprimiert wurde, sodass davon ausgegangen werden kann, dass *Pax3* in der genetischen Hierarchie höher gelegen ist als c-Met [8, 9].

1.1.2 Funktion von myogenen Regulationsfaktoren während der Myogenese

Nach Migration der hypaxialen Muskelvorläuferzellen in die Extremitätenanlagen beginnen diese Zellen myogene Regulationsfaktoren (MRFs) zu aktivieren, die eine Schlüsselrolle in der Differenzierung der Muskelvorläuferzellen zu Skelettmuskulatur einnehmen.

Die MRFs gehören zur Gruppe der basic-helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren, zu denen das Myf5, das MyoD, das Myogenin und das MRF4 gezählt werden [10-12]. Ihr myogenes Potenzial bestätigt sich in unterschiedlichen Versuchen, in denen gezeigt werden konnte, dass sie *in vitro* die Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen zu Muskelzellen induzieren können [10].

Während der Myogenese zeigt sich die Expression der MRFs in einer zeitlich streng regulierten Abfolge. Es konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Geninaktivierungen in der Maus gezeigt werden, dass die MRFs die Muskeldifferenzierung kontrollieren. Die primären MRFs Myf5 und MyoD konnten zu einem frühen Zeitpunkt des Entwicklungsprozesses in den proliferierenden, somitischen Zellen nachgewiesen werden. Sie scheinen wichtig für die Spezifizierung der multipotenten Vorläuferzelle zu myogenen Myoblasten. Im Gegensatz dazu werden die sekundären MRFs Myogenin und MRF4 erst in determinierten Myoblasten exprimiert und spielen somit eine Rolle in der weiteren Differenzierung der Myoblasten zu Myotuben und zu reifen Muskelfasern [10, 13, 14].

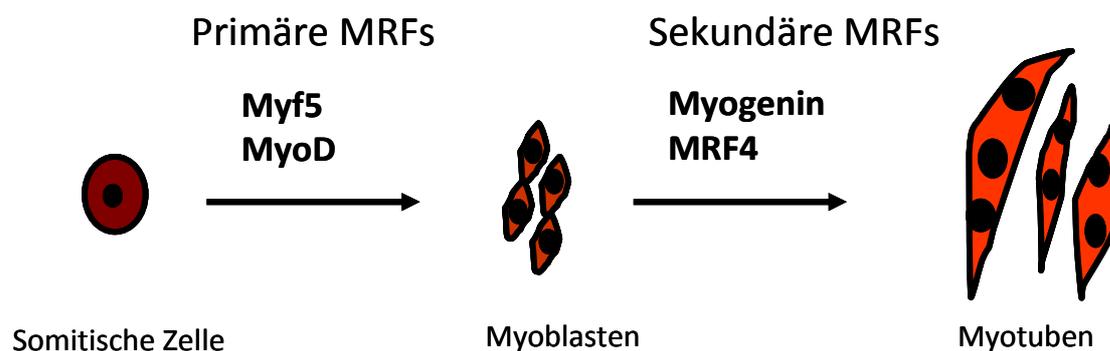


Abbildung 1: Expression der MRFs während der Myogenese. Abgebildet sieht man die zeitliche Expressionsabfolge der MRFs während der Myogenese. Während Myf5 und MyoD eine wichtige Rolle in der Spezifizierung der multipotenten Vorläuferzellen in den Somiten zu myogenen Myoblasten spielen, zeigt sich die Expression von Myogenin und MRF4 erst zu einem späteren Zeitpunkt der Myogenese. Sie sind wichtig für die

weitere Differenzierung der Myoblasten zu reifen Myotuben. Die Abbildung wurde anlehnd an Sabourin, Rudnicki, *The molecular regulation of myogenesis.*, 2000 [10] erstellt.

1.2 Die Satellitenzelle

1.2.1 Herkunft und Funktion von Satellitenzellen

Die Skelettmuskulatur ist ein einzigartiges Gewebe, das sich aus hoch spezialisierten, postmitotischen, mehrkernigen Muskelfasern zusammensetzt. Es ist in der Lage, durch Kontraktion Kraft und Bewegung zu erzeugen [15]. Physiologische Prozesse wie Wachstum, Training oder Verletzungen machen eine kontinuierliche Regeneration der Muskelfasern nötig. Diese Adaptation geht von einer kleinen Population von Zellen aus, die sich neben den mehrkernigen Muskelfasern ebenfalls in der adulten Skelettmuskulatur nachweisen lassen, den Satellitenzellen [13].

Vorwiegend wird davon ausgegangen, dass auch die Satellitenzellen einen somitischen Ursprung haben. Sie können in den Somiten durch eine Expression sowohl von *Pax3* als auch *Pax7* bei gleichzeitiger Abwesenheit von MRFs charakterisiert werden. Ihre typische anatomische Lage zwischen Sarkolemm und Basallamina der einzelnen Muskelfaser nehmen sie allerdings erst am Ende der Fetalperiode ein [16].

Satellitenzellen wurden das erste Mal 1961 mithilfe des Elektronenmikroskops anhand ihrer anatomischen Lage und Morphologie beschrieben. Sie wurden als mononukleäre Zellen definiert, die ihren Sitz zwischen dem Sarkolemm und der Basallamina der einzelnen Muskelfaser aufweisen [17].

Morphologische Besonderheiten der Satellitenzellen sind eine erhöhte Kern-Plasma-Relation, eine verminderte Anzahl von Zellorganellen und ein kleinerer Zellkern mit einer vermehrten Menge an Heterochromatin im Gegensatz zu den Zellkernen der Faser - assoziierten Zellkerne. Diese Beobachtungen zeigen, dass Satellitenzellen mitotisch quieszent und transkriptional weniger aktiv sind als die Muskelfaserzellkerne [18]. Satellitenzellen können allerdings als Antwort auf physiologischen Stress wieder in den Zellzyklus einsteigen. Durch Aktivierung verändert sich das oben beschriebene morphologische Bild der quieszenten Satellitenzelle. Die mitotische Aktivität und die Anzahl der Zellorganellen nehmen zu, während sich die Menge des Heterochromatins verringert [13].

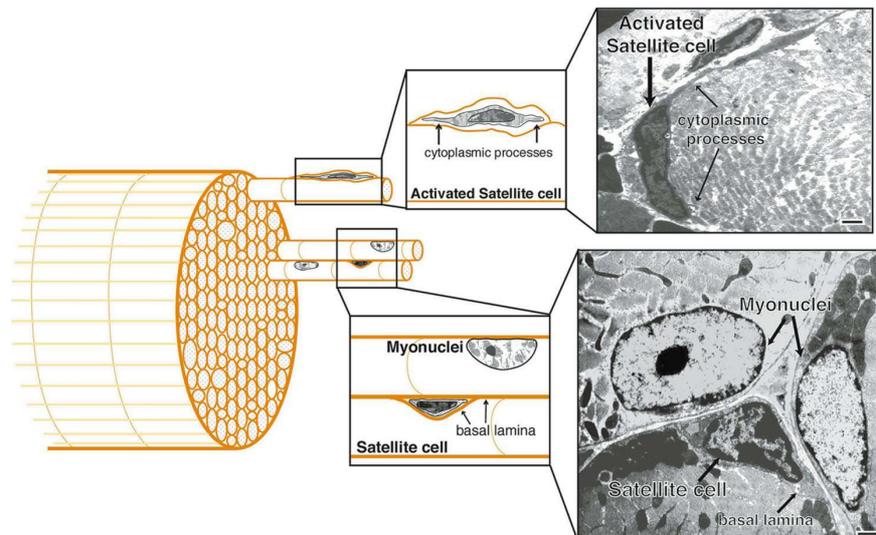


Abbildung 2: Anatomische Lage der Satellitenzellen. Satellitenzellen zeigen ihre typische anatomische Lage zwischen dem Sarkolemm und der Basallamina jeder einzelnen Muskelfaser. Satellitenzellen liegen normalerweise in einem quieszenten Stadium vor und zeigen als morphologische Eigenschaft wie oben beschrieben eine vermehrte Menge an Heterochromatin. Sie können aber durch physiologischen Stress oder Verletzungen der Muskulatur aktiviert werden. Zeichen der Aktivierung sind eine verminderte Menge an Heterochromatin sowie eine Zunahme der Zellorganellen. Die Abbildung ist übernommen aus Hawke and Garry, *Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology.*, 2001 [13].

Die Nachkommen von aktivierten Satellitenzellen werden Myoblasten genannt. Diese sind nach mehreren Teilungen in der Lage, entweder mit schon existierenden Muskelfasern oder untereinander zu verschmelzen und auf diese Weise den Muskel vollständig zu regenerieren [19].

Ein Teil der Satellitenzellen kehrt allerdings auch in die Quieszenz zurück. Diese beiden Schritte zeigen, dass die Satellitenzelle die Definition einer Stammzelle erfüllt, indem aus ihr zum einen differenzierte Zellen hervorgehen, und sie zum anderen ihre Population durch Selbsterneuerung konstant hält [16].

Unser Wissen zur molekularen Regulation der Proliferation und Differenzierung von Satellitenzellen verdanken wir der Arbeit mit verschiedenen Tiermodellen. Mithilfe von Knockout - Mäusen ist es durch gezielte Inaktivierung eines Gens möglich, dessen Funktion zu untersuchen. Besonders der Einfluss der *Pax* - Gene sowie der MRFs konnte anhand dieser Mausmodelle bestimmt werden. Gezielte Mutationen von Genen in humanen Satellitenzellen sind bisher nicht bekannt. Hier ist die Immunhistochemie eine wichtige Grundlage zur Charakterisierung der Satellitenzellen.

1.2.2 Charakterisierung von Satellitenzellen anhand immunhistochemischer Marker

In früheren Studien wurde die Satellitenzelle elektronenmikroskopisch aufgrund ihrer anatomischen Lage identifiziert. Mit Entdeckung unterschiedlicher immunhistochemischer Marker wurde es möglich, die Satellitenzelle auch lichtmikroskopisch zu untersuchen. Aktuell sind unterschiedliche Satellitenzellmarker bekannt, die bei Versuchen am murinen Modell verwendet werden können. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei humanen Satellitenzellen noch ein großer Bedarf der Charakterisierung.

Trotz marginaler Diskrepanzen wird davon ausgegangen, dass die quieszente Satellitenzelle in der Maus unter anderen Pax7, M - Cadherin und auch CD34 exprimiert [20, 21]. Einige dieser Marker wie das CXCR4, c - Met, Syndecan 4, Vcam1, β_1 - Integrin und auch CD34 sind Oberflächenrezeptoren oder Zelladhäsionsmoleküle, die sowohl in der Satellitenzelle als auch in anderen Typen an Stammzellen identifiziert werden können.

Pax7 hingegen zeigt sich als der verlässlichste Marker, da es von keiner anderen muskelspezifischen Zelle exprimiert wird [22].

In humanen Satellitenzellen scheint es im Vergleich zu murinen Satellitenzellen ein unterschiedliches Expressionsmuster immunhistochemischer Marker zu geben. CD34 definiert nicht die humane Satellitenzelle und auch M - Cadherin ist nicht wie in den murinen Zellen konstant exprimiert. Neben anderen Markern zeigt sich CD56 allerdings als effizienter Marker von Satellitenzellen in humaner Muskulatur [19] und wird neben Pax7 zur Charakterisierung der Satellitenzelle verwendet.

In der nachfolgenden Tabelle sind Satellitenzellmarker aufgeführt, die aktuell zur Charakterisierung muriner Zellen verwendet werden.

Tabelle 1: Bekannte murine Satellitenzellmarker. Dargestellt sind immunhistochemische Marker, die zur Charakterisierung von murinen Satellitenzellen verwendet werden. MSTN: Myostatin, VCAM - 1: vascular cell adhesion molecule - 1, NCAM: neural cell adhesion molecule, MNF: myocyte nuclear factor, IRF - 2: interferon regulatory factor - 2, Msx - 1: msh homeobox 1 [18, 22].

Molekulare Marker	In quieszenten Zellen	In proliferierenden Zellen
<i>Oberflächenmarker</i>		
M - Cadherin	+/-	+
Syndecan 3	+	+
Syndecan 4	+	+
c - Met	+	+
VCAM - 1	+	+
NCAM (CD56)	+	+

Glycoprotein Leu - 19	+	+
CD34	+/-	+/-
CXCR4	+	+
<i>Zytoskelettmarker</i>		
Desmin	-	+
<i>Transkriptionsfaktoren</i>		
Pax7	+	+
Myf5	+/-	+
MyoD	-	+
MNF	+	+
MSTN	+	+/-
IRF - 2	+	+
Msx - 1	+	-

Von den in Tabelle 1 aufgelisteten Antigenen soll sich in dieser Promotionsarbeit neben Pax7 auf das Expressionsmuster von c - Met und CXCR4 konzentriert werden.

C - Met spielt wie in 1.1 beschrieben, eine wichtige Rolle in der Delamination und Migration von Muskelvorläuferzellen während der Myogenese. Als Rezeptor für HGF nimmt es eine wichtige Funktion sowohl in der Entwicklung der Leber als auch der Extremitäten ein. In verschiedenen Mausmodellen konnte beobachtet werden, dass HGF an der Aktivierung von Satellitenzellen mitwirkt [23]. Es wird beschrieben, dass es die Aktivierung und Proliferation von Satellitenzellen fördert, während es deren weitere Differenzierung zu hemmen scheint [24].

Der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor, kurz CXCR4, ist ein Rezeptorprotein aus der Familie der G-Protein gekoppelten Chemokinrezeptoren. Durch Mutationen im *CXCR4* - Gen entstehen Phänotypen mit Defiziten sowohl in der Myelopoese, B - Lymphopoese, Angiogenese, der Kardiogenese oder beispielsweise auch der Neurogenese. Diese unterschiedlichen Aspekte können durch Beobachtungen erklärt werden, die zeigen, dass CXCR4 eine wichtige Funktion in der Migration unterschiedlicher Stammzellen einnimmt [25].

Auch während der Myogenese soll CXCR4 eine Rolle spielen. Es wurde gesehen, dass *CXCR4* - mutante Mäuse sowohl in der Anlage der Zunge als auch der dorsalen Extremitäten eine verminderte Anzahl an Muskelvorläuferzellen aufweisen [26]. Auch durch Versuche mit den Mauszelllinien C2C12 und G7 konnte eine Expression von CXCR4 nachgewiesen werden [27].

Die Charakterisierung dieser beiden Antigene an humanen Satellitenzellen ist bisher aber nur in seinen Anfängen.

1.2.3 Pax7 ist ein wichtiger Faktor in der Generierung und Erhaltung von Satellitenzellen

Die *Pax* - Gene (*Paired-box*-Gene) setzen sich aus einer Familie von neun Genen (*Pax1-9*) zusammen, die für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren kodieren. Diese sind gekennzeichnet durch zwei spezifische DNA - bindende Domänen, der *paired* - Domäne und der *homeo* - Domäne. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Bildung von Geweben und Organen während der Embryonalentwicklung.

Pax7 zeigt seine Funktion in der Entwicklung des zentralen Nervensystems, der Neuralleiste sowie des Dermomyotoms und des Myotoms. Es ist außerdem wichtig in der Generierung von Satellitenzellen und nimmt damit eine kritische Rolle in der Muskelregeneration von adulter Muskulatur ein [28].

Das *Pax7* - Protein wird von quieszenten Satellitenzellen exprimiert. Während der Aktivierung und der darauf folgenden Proliferation von Satellitenzellen kann *Pax7* im murinen Modell konstant nachgewiesen werden. Mit Verlassen des Zellzyklus und Fortschreiten des Differenzierungsprozesses der entstandenen Myoblasten wird *Pax7* allerdings herunterreguliert und durch die Expression von MRFs zur weiteren Differenzierung abgelöst [29].

In McKinnell et al. „*Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex*“, 2008 [30] wurde gezeigt, dass *Pax7* über eine Bindung an einen Histon-Methyltransferase-Komplex die Aktivität unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren regulieren kann. Besonderes Augenmerk wurde in dieser Studie auf die Regulation der Transkriptionsaktivität von *Myf5* gelegt. *Pax7* scheint Einfluss auf die Erhaltung der Population von Muskelstammzellen durch eben diese Bindung an einen Histon-Methyltransferase-Komplex und der damit verbundenen Regulation sowohl von *Myf5* als auch *MyoD* zu haben. Auf diese Weise soll sichergestellt werden, dass einige der aktivierten Satellitenzellen die *Pax7* - Expression beibehalten und nicht terminal differenzieren [31].

Anhand unterschiedlicher Experimente konnte demonstriert werden, dass *Pax7* eine kritische Rolle in der Generierung und Erhaltung einer Population von postnatalen Satellitenzellen spielt. Mithilfe von *Pax7* - mutanten Mäusen konnte die Funktion des *Pax7* definiert werden. In der frühen postnatalen Periode konnten auch in Abwesenheit von *Pax7* Satellitenzellen detektiert werden. Die Anzahl der Satellitenzellen in *Pax7* - mutanten Mäusen ist allerdings im Vergleich zu den Wildtyptieren reduziert und fällt in den ersten Lebensstagen der Tiere rapide ab [20, 32, 33]. Diese Abnahme erfolgt durch Defekte des Zellzyklus und Apoptose von Satellitenzellen, sodass *Pax7* ebenfalls eine anti - apoptotische Rolle zugesprochen werden kann [33].

1.3 Herausforderung bei der Isolation von humanen Satellitenzellen

Trotz des sehr großen Interesses weitere Erkenntnisse über das Regenerationspotenzial von Satellitenzellen zu gewinnen, wird die wissenschaftliche Arbeit an dieser Gruppe von Zellen erschwert. Nicht nur die Lage der quieszenten Satellitenzelle zwischen Plasmamembran und Basallamina der einzelnen Muskelfaser, sondern auch die Schwierigkeit nur die reine Population an Satellitenzellen ohne muskelassoziierte Fibroblasten, Endothelzellen usw. zu gewinnen zeigt sich als Problem.

Gerade die Arbeit mit humanen Satellitenzellen zeigt sich als große Herausforderung, denn es ist zum einen schwierig humane Muskelbiopsien zu erhalten, zum anderen sind erst wenige Marker bekannt, die es ermöglichen, die Satellitenzelle von anderen muskelassoziierten Zellen zu unterscheiden [34].

1.4 Aktuelle Ergebnisse in der Charakterisierung von humanen Satellitenzellen

Die Expression unterschiedlicher Satellitenzellmarker wurde in den letzten Jahren sehr intensiv mithilfe von Mausmodellen untersucht. Über die Expression dieser Marker ist in humanen Satellitenzellen bisher jedoch nur sehr wenig bekannt.

In vielen Studien sind verschiedene Methoden zur Isolation muriner Satellitenzellen etabliert worden. Die Spanne der Versuche reicht von verwendeten Kryogewebeschnitten über Isolationen durch mechanische Zerkleinerung und anschließendem enzymatischen Verdau, sowie folgender Kultivierung oder FACS Analyse [34].

Eine elegante Methode zur Charakterisierung der Satellitenzelle innerhalb ihrer anatomischen Position wurde durch die Isolation der einzelnen intakten Muskelfasern etabliert [35]. Auf diesem Weg ist es möglich, die isolierten Muskelfasern entweder sofort zu fixieren und immunhistochemisch mit den in 1.2.2 aufgelisteten Satellitenzellmarkern zu färben oder sie auf Matrigel gebettet zu kultivieren und die Proliferations- und Differenzierungseigenschaften der sich aus der Faser entwickelnden neuen Myoblasten zu beobachten [36].

Matrigel ist der Handelsname für eine gelatinöse Proteinmischung, die von Maustumorzellen (Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma cells) sezerniert wird und von der Firma BD Biosciences vermarktet wird.

In Pawlikowski et al. „*Analysis of human muscle stem cells reveals a differentiation - resistant progenitor cell population expressing Pax7 capable of self-renewal*“, 2009 [31] wurde mithilfe unterschiedlicher Isolationsmethoden das Expressionsmuster von humanen Satellitenzellen

untersucht. Zur Analyse, ob in der Maus bekannte Satellitenzellmarker auch in humaner Muskulatur exprimiert werden, wurden Kryogewebeschnitte sowohl aus fetalem als auch aus adultem Muskelgewebe angefertigt und immunhistochemisch gefärbt. Es zeigte sich eine Pax7 - Expression in Zellen, die die anatomische Lage von Satellitenzellen einnahmen. Ebenfalls konnte eine mehrheitliche Koexpression von Pax7 und dem HGF - Rezeptor c - Met beobachtet werden.

Mithilfe eines Antikörpers gegen alpha-7-Integrin wurde außerdem durch FACS - Analysen eine Satellitenzellpopulation gewonnen, die später kultiviert wurde und deren Proliferationseigenschaften beurteilt werden konnte.

Auch andere Gruppen nutzen FACS - Analysen mithilfe des alpha-7-Integrins [37]. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die gewonnenen Zellen ebenfalls Expressionsmuster für c - Met und auch M - Cadherin aufwiesen.

Analysen von NCAM und Pax7 sind ebenfalls Gegenstand vieler Analysen und zeigen vielversprechende Ergebnisse [34].

Trotz dieser vielen Studien zeigen sich immer noch Diskrepanzen bei der Suche nach verlässlichen Markern für humane Satellitenzellen, sodass diese zukünftig weiter untersucht werden sollten.

1.5 Zielstellung dieser Promotionsarbeit

Myogene Stammzellen zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in murinen Modellen ein großes Regenerationspotenzial. Die Isolation mittels konventioneller in der Literatur bekannter Methoden resultiert allerdings in einer Zellpopulation, deren regenerativer Stammzellcharakter stark reduziert ist. Dieses Regenerationspotenzial für eine Therapie von dystrophem Muskel zu nutzen, ist bisher wenig erfolgreich. Die Transplantation dieser Zellressource in dystrophes Gewebe wird durch Elimination der Zellen durch das körpereigene Immunsystem und die fehlende Migrationsbereitschaft der Zellen sehr limitiert.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb eine erstmalige Analyse zum Regenerationspotenzial humaner myogener Stammzellen durchzuführen, und diese Zellen für einen in der Zukunft möglichen therapeutischen Einsatz zu optimieren.

Als ersten Schritt soll dafür eine Methode etabliert werden, mit der Satellitenzellen in ihrer anatomischen Lage zwischen Sarkolemm und Basallamina der einzelnen Muskelfasern identifiziert und charakterisiert werden können.

Die Muskelbiopsien werden sowohl aus der Hochschulambulanz für Muskelerkrankungen als auch aus einer Kooperation mit der orthopädischen Abteilung des HELIOS - Klinikum in Berlin, Buch zur Verfügung gestellt.

Die Charakterisierung der gewonnenen Zellen soll mittels immunhistochemischer Färbungen erfolgen. Als Satellitenzellen werden Pax7 - positive Zellen definiert. Anlehnend an die in der Literatur bekannten murinen Satellitenzellmarker soll untersucht werden, ob sich eine Variation im Expressionsprofil von murinen und humanen Satellitenzellen feststellen lässt. Dabei soll vor allem die Expression von c - Met und CXCR4 charakterisiert werden.

Anschließend sollen optimale Bedingungen geschaffen werden, die es erlauben, die isolierten Satellitenzellen zu kultivieren und deren Proliferationseigenschaften zu beurteilen. Es soll beobachtet werden, ob sich aus den isolierten Zellen differenzierte Muskelzellen entwickeln, die myogenes Potenzial aufweisen. Dies soll mithilfe eines Antikörpers gegen ein für Muskelzellen spezifisches Element des Zytoskeletts, das Desmin, bewiesen werden.

Zur Kontrolle soll der Differenzierungsprozess der kultivierten Zellen durch veränderte Kultivierungsbedingungen forciert werden. Das Fortschreiten dieses Prozesses soll mittels des Nachweises myogener Regulationsfaktoren gezeigt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmateriale

Aceton	Dr.K. Holborn & Söhne, Leipzig, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau Na-Salz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chromatografiepapier	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Collagenase	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Indianapolis, USA neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Coomassie Blau Farbstoff	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser 22 x 22 mm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser 24 x 60 mm	VWR, Lauda-Königshofen, Deutschland
Deckgläser Ø 12 mm	VWR, Lauda-Königshofen, Deutschland
Deckgläser Ø 15 mm	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Diagnostikobjektträger mit 8 Vertiefungen	Rosch, Pensberg, Deutschland
Dispase	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Dulbecco's Modified Eagles Medium	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Lonza, Levallois Perret Frankreich
Fetales Kälberserum	Lonza, Levallois Perret, Frankreich
fetales Pferdeserum	Lonza, Levallois Perret, Frankreich
Fetales Ziegenserum	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe, Deutschland
Gentamicin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glukose	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe, Deutschland
Glutamax	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	MERCK, Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland
Gum Traganth	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonysäure)	Abcam, Cambridge, UK
His	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopentan	Nunc, Rochester, New York, USA
Isopropanol	Nunc, Rochester, New York, USA
Kammerobjektträger	Instrumenten Manufaktur , Berlin, Deutschland
Korkplättchen	

Laminin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe, Deutschland
Marker Seebblue®Plus2	BD, Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Matrigel (Wachstumsfaktor reduziert)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Natriumfluorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Objektträger	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Parafilm	American National Can™, Menasha, USA
PBS für Zellkultur	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phenolrot	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid	Roche, Indianapolis, USA
Pinzetten	Leica, München, Deutschland
Pipetten (2,5,10,25 ml)	Costar, Corning, New York, USA
Poly – L - Lysin	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Ponceau S Lösung	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Röhrchen 50 ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Histofix	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel 30	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Skeletal Muscle Cell Growth Medium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Supplement Mix	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thimerosal	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland
Tris	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe, Deutschland
Triton - X	Sigma, München, Deutschland
Trypsin - EDTA	Scientific Industries, New York, USA
Tween 20	MERCK, Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland
Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen 10 cm	Sigma, München, Deutschland
Zellkulturschalen 6 cm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
rundes Filterpapier	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zellsieb 40 µm	BD, Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.2 Antikörper

2.2.1 Primäre Antikörper

Anti-beta-2-Laminin aus Maus	Chemicon International, Temecula, USA
Anti-c-Met aus Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-CXCR4 aus Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Desmin aus Maus	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-Myf-5 aus Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-MyoD aus Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Myogenin aus Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti- Myosin-Heavy-Chain aus Maus	NovoCastra, Newcastle, UK
Anti-Pax7 aus Maus	DSHB, Yokohama, Japan

2.2.2 sekundäre Antikörper

Ziege-gegen-Maus IgG, Alexa 488 gekoppelt	Molecular Probes, Inc. Eugene, USA
Ziege-gegen-Kaninchen IgG, Cy3 gekoppelt	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege-gegen-Maus IgG, IR Dye 800 gekoppelt	Rockland, Gilbertsville, USA
Ziege-gegen-Kaninchen IgG, IR Dye 800 gekoppelt	Rockland, Gilbertsville, USA
Ziege-gegen-Maus IgG, IR Dye 700 gekoppelt	Rockland, Gilbertsville, USA
Ziege-gegen-Kaninchen IgG, IR Dye 700 gekoppelt	Rockland, Gilbertsville, USA

2.2.3 Standardpuffer und Medien

10 x PBS	NaH ₂ PO ₄	0,1 M
	Thimerosal	2,4 mM
	NaCl	1,5 M
	pH	7,4
PBS	NaH ₂ PO ₄	10 mM
	Thimerosal	0,24 mM
	NaCl	150 mM
	pH	7,4
10 x TBS	NaCl	1,4 M
	Tris	100 mM
	pH	7,3
TBS	Tris	10 mM
	NaCl	0,14 M
	pH	7,3

TBST	Tris	10 mM
	NaCl	0,14 M
	Tween 20	0,05%
	pH	7,3
Muskelbiopsiemedium	HEPES	30 mM
	NaCl	0,13 M
	KCl	3 mM
	Glucose	10 mM
	Phenolrot	3 μ M
	pH	7,6
Zellkulturmedium	Skeletal Muscle Growth Medium	500 ml
	Gentamicin	0,036 mg/ml
	fetales bovines Serum	10%
	Glutamax	15 ml

3 Methoden

3.1 Ethikantrag

Diese Studie wurde vom Ethikkomitee der Charité - Universitätsmedizin, Berlin genehmigt. Die Nummer des Ethikantrages lautet: EA1/203/08. Alle Teilnehmer wurden über die Untersuchung aufgeklärt und haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben.

3.2 Etablierung einer Methodik zur rein mechanischen Faserisolation

Charlotte A. Collins und Peter S. Zammit beschrieben in ihrer Veröffentlichung „*Isolating and Grafting of Single Muscle Fibers*“ [38] eine Möglichkeit der Isolation von einzelnen Muskelfasern anhand eines Mausmodells. Nach Freipräparation des gewünschten Muskels wurde er für circa 60-90 Minuten, je nach Größe, in einer Kollagenaselösung bei 35°C inkubiert, bis der Muskel einen gelockerten, gequollenen Eindruck machte. Anschließend wurden die einzelnen Muskelfasern mit Pasteurpipetten, die vorher mit 10%igem Pferdeserum beschichtet wurden, mechanisch auseinander präpariert. Die Inkubation erfolgte auf mit 10%-Pferdeserum beschichteten Petrischalen bei 37°C und 5% CO₂.

Anlehnend an diese Methodik sollte ein Weg zur Isolation von humanen Muskelfasern etabliert werden. Die Muskelbiopsien stammten sowohl von Patienten aus der Hochschulambulanz für Muskelerkrankungen als auch aus einer Kooperation mit der orthopädischen Abteilung des HELIOS - Klinikums, Berlin Buch. Die Entwicklung der Methodik soll nun in den nächsten Abschnitten beschrieben werden.

3.2.1 Vorbereitung des Arbeitsplatzes

Von sehr großer Wichtigkeit war die Bewahrung der Sterilität während des gesamten Präparationsprozesses, sodass die Gefahr einer Kontamination minimiert werden konnte. Gearbeitet wurde mit einem Präparationsmikroskop des Modells KL 1500 LCD der Firma Leika. Für die mechanische Isolation der einzelnen Fasern wurden Mikropräparationspinzetten und Nadeln verwendet, die vor Beginn der Präparation desinfiziert wurden. Als weitere Vorbereitungen wurden kleine Deckgläschen mit unverdünntem Matrigel, das eine verminderte Anzahl an Wachstumsfaktoren besaß, beschichtet, indem circa 20-30 µl auf die Deckgläschen pipettiert und anschließend verteilt wurde. Diese wurden nun für ungefähr 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Frisch angesetzt werden musste außerdem eine 3,7%ige

Formaldehydlösung, eine Gentamicin/PBS-Lösung (0,036 mg/ml) und Skeletal Muscle Growth Medium (Zusammensetzung siehe im Kapitel 3.3.1).



Abbildung 3: Vorbereitung des Arbeitsplatzes vor dem Beginn der Faserisolation. Abgebildet ist der Arbeitsplatz zur Faserisolierung. Die Präparation wurde mithilfe eines Präparationsmikroskops des Modells KL 1500 LCD der Firma Leika durchgeführt. Benötigt wurden außerdem autoklavierte kleine Pinzetten und Scheren. Frisch angesetzt wurde eine PBS – Gentamicinlösung als Präparationslösung und eine 3,7%ige Formaldehydlösung zur sofortigen Fixierung isolierter Muskelfasern. Skeletal Muscle Growth Medium der Firma PromoCell wurde zur Kultivierung gewonnener Muskelfasern verwendet.

3.2.2 Ankunft des humanen Skelettmuskels aus dem Operationssaal

Die Muskelbiopsien wurden direkt nach Exzision im Operationssaal entgegen genommen. Verwendet wurden Biopsien des M. vastus lateralis des M. quadriceps femoris. Ein Teil der Muskulatur wurde noch im Operationssaal wie im Methodikteil unter 3.5 beschrieben eingebettet und in flüssigem Stickstoff zur Anfertigung späterer Kryogewebeschnitte eingefroren. Die zur Faserisolation verwendeten Biopsate wiesen ungefähr eine Größe von 1 cm x 2 cm x 1 cm auf und konnten in einem frisch angesetzten Muskelbiopsiemedium (30 mM HEPES, 0,13 M NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Glucose, 3 μ M Phenolrot) vom Operationssaal in das Labor transportiert werden.



Abbildung 4: Ankunft des humanen Skelettmuskels aus dem Operationssaal. Abgebildet ist das frische Muskelbiopsat in einer PBS - Gentamicinlösung unter dem Präparationsmikroskop. Das Muskelbiopsat wies

ungefähr eine Größe von 1 cm x 2 cm x 1 cm auf und wurde innerhalb einer Muskelbiopsatlösung vom Operationssaal in das Labor transportiert.

3.2.3 Präparation der einzelnen Muskelfasern

Nach Ankunft der Muskelbiopsie aus dem Operationssaal wurde sofort mit der Faserisolation begonnen. Zu Beginn der Arbeit wurde anlehnend an die Methodik von Charlotte A. Collins und Peter S. Zammit der Muskel in einer Enzymlösung bestehend aus Collagenase, Trypsin und Dispase (Zusammensetzung wie in 3.3) angedaut und anschließend mit der mechanischen Isolation begonnen. Im Vergleich zum murinen Modell, das von der oben erwähnten Arbeitsgruppe verwendet wurde, konnte jedoch gezeigt werden, dass die Präparation humanen Gewebes leichter ohne enzymatischen Vorverdau durchzuführen war. Das Ziel der enzymatischen Behandlung war die Aufspaltung von bindegewebigen Verbindungen der Muskulatur und damit die erleichterte mechanische Präparation. Diese Dissoziation der Muskulatur trat bei den humanen Geweben von alleine nach ca. 30-60 Minuten ein, zudem ließen sich die einzelnen Muskelfasern aber auch in dem Zeitraum vorher mechanisch gut voneinander lösen.

Zu Beginn der Isolation wurde das Muskelgewebe unter sterilen Arbeitsbedingungen mit einer PBS - Gentamicinlösung von Raumtemperatur gewaschen. Wenn möglich sollten schon vor Überführung zum Präparationsmikroskop bindegewebige Anteile abpräpariert werden. Mithilfe des Mikroskops des Modells KL 1500 LCD von der Firma Leika wurde nun versucht, erst die Muskelfaszie von den Muskelfaserbündel zu entfernen, sodass anschließend entlang der Längsachse des Muskels einzelne Fasern präpariert werden konnten. Einzelne Fasern wurden sofort erst in einer PBS - Gentamicinlösung gewaschen und zur Direktfärbung in 3,7%iger Formaldehydlösung fixiert, während andere Fasern auf den mit Matrigel beschichteten Deckgläschen in Kultur gehalten wurden.

Falls die Beschaffenheit des Muskelgewebes es nicht zuließ, dass einzelne Muskelfasern präpariert werden konnten, war auch die Möglichkeit vorhanden, kleine Muskelfaserbündel freizulegen, die dann nach Fixierung voneinander getrennt werden konnten.

Während der Entwicklungsphase des Projekts wurde die Faserisolation unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Wie oben erwähnt, wurde sowohl mit enzymatischer Vorbehandlung als auch ohne gearbeitet. Weiterhin musste aber auch die Präparationslösung optimiert werden. Die Isolation erfolgte sowohl in PBS, Muscle Growth Medium sowie einer PBS/Gentamicin -

Lösung. Letztendlich stellte sich die sofortige Präparation des Gewebes in mit Gentamycin versetztem PBS als optimale Vorgehensweise dar.

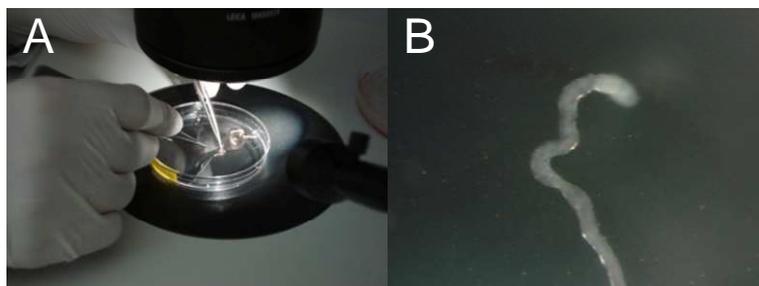


Abbildung 5: Mechanische Isolation der einzelnen Muskelfasern. In Abbildung A lässt sich ein Teil des Muskelbiopsats in einer PBS/Gentamicin - Lösung unter dem Präparationsmikroskop erkennen. Die Isolierung der einzelnen Fasern erfolgte mechanisch mithilfe von Mikropräparationspinzetten und Scheren. In Abbildung B erkennt man die einzelne isolierte Muskelfaser. Diese wurde anschließend sofort fixiert und immunhistochemisch gefärbt oder in Skeletal Muscle Growth Medium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

3.2.4 Kultivierung mechanisch isolierter Muskelfasern

Die während der Präparation gewonnenen Fasern wurden zum einen sofort mit 3,7%igem Formaldehyd fixiert und immunhistochemisch gefärbt und andererseits bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und auf mit Matrigel beschichteten Deckgläschen in Skeletal Muscle Growth Medium kultiviert. Während der Etablierungsphase wurde beobachtet, dass eine Aussprossung von neuen Muskelzellen nur bei adhärennten Fasern erfolgte. Daher war es besonders wichtig, dass die präparierten Fasern an den Deckgläschen möglichst fest haften blieben.

Es ließ sich erkennen, dass sich der größte Teil der Muskelfasern, der auf Deckgläschen ohne Beschichtung gebettet war, nach wenigen Tagen in Kultur oder schon direkt mit Zugabe des Nährmediums ablöste. Eine weitere Möglichkeit zeigte eine Beschichtung mit Kollagen, was zu einer etwas besseren Ausbeute führte.

Die besten Ergebnisse wurden mit einer Matrigelbeschichtung der Deckgläschen erzielt. Matrigel ist der Handelsname für eine gelatinöse Proteinmischung, die von Maustumorzellen (Engelbreth – Holm - Swarm mouse sarcoma cells) sezerniert wird und von der Firma BD Biosciences vermarktet wird. Diese Maustumoren sind reich an extrazellulären Matrixproteinen, dessen Hauptbestandteile Laminin, Kollagen IV, Entactin und Heparansulfat - Proteoglykane sind. Es dient zur Anhaftung und Differenzierung von normalen und transformierten verankerungsabhängigen Zellen. Durch diese Beschichtung war es möglich, den isolierten Muskelfasern eine Umgebung zu schaffen, in der sie adhären konnten.

3.3 Enzymatische Myoblastenisolation

Enzymlösung:

4 ml Collagenase Typ II in PBS (254 U/ml; steril filtriert) + 100 µl Dispase1 (100 U/ml; steril filtriert) + 500 µl Trypsin/EDTA

Durchführung:

Zur Verhinderung einer Kontamination des Gewebes wurde die gesamte Isolation unter der Sterilbank vorgenommen.

Zuerst wurde das Muskelstück in eine 6-cm-Petrischale überführt, wo es zweimal mit 5 ml kalter 1%iger Penicillin/Streptomycin in PBS - Lösung gewaschen wurde. Anschließend wurde die Waschlösung abgesaugt und das Muskelstück mithilfe einer Schere zerkleinert. Dieses wurde nun mit 2 ml PBS in einer 10-ml-Pipette aufgenommen und in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Die Muskel-PBS-Suspension in dem Röhrchen wurde als nächsten Schritt für 5 min bei 350 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Auch hier war es wichtig, die Sterilität zu bewahren, sodass bei allen Schritten, die außerhalb des sterilen Bereichs stattfanden, das Röhrchen mit der Suspension mit Parafilm abgedichtet, und es ebenfalls vor Beginn des nächsten Arbeitsschrittes mit Ethanol abgespült wurde. Nach der Zentrifugation wurde das Muskelpellet in der oben genannten Enzymlösung aufgenommen und 45 min im Wasserbad bei 37°C auf mittlerer Stufe geschüttelt. Alle 10 min wurde dabei die Suspension mit einer Pasteurpipette 8 Mal durchmischt. Nach diesen 45 min wurde die Suspension durch 4 immer dünner werdende Pasteurpipetten, deren Öffnung vorher mithilfe eines Bunsenbrenners anpassend verkleinert wurde, je 8 Mal pipettiert. Anschließend wurde der Verdau mit 5 ml Muscle Growth Medium abgestoppt. Nach Abstoppen wurde ein weiteres Mal bei 350 g bei 4°C allerdings für 10 min zentrifugiert und danach der Überstand abgesaugt. Zum Abschluss wurde das Pellet in 3 ml Medium resuspendiert und auf eine 6-cm-Schale gegeben, die für 3 Tage im Brutschrank ruhte. Nach drei Tagen fand dann der erste Mediumwechsel statt, danach alle 2-3 Tage, bis die Zellen passagiert werden konnten.

3.3.1 Kultivierung enzymatisch isolierter Myoblasten

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Myoblasten erfolgte in Skeletal Muscle Growth Medium, welches mit 10% fetalem bovines Serum (FBS) und Gentamicin (0,036 mg/ml) versetzt wurde. Die Gewebekulturflaschen und -schalen wurden bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre im Brutschrank gehalten. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 70% wurden die Zellen passagiert, indem

zuerst das Medium entfernt und anschließend Trypsin/EDTA auf diese gegeben wurde. Nach kurzer Inkubation bei 37°C wurde unter einem Lichtmikroskop kontrolliert, ob sich die Gesamtzahl der Zellen von der Kulturschale gelöst hatte. War dies nicht der Fall, wurde die Ablösung durch leichtes Beklopfen gefördert. Nach Resuspension mit frischem Medium erfolgte die Aufteilung auf neue Gewebekulturschalen und deren Weiterkultivierung.

3.4 Differenzierung kultivierter Myoblasten

Die Kultivierung proliferierender Myoblasten erfolgte wie im vorigen Absatz beschrieben in Skeletal Muscle Growth Medium, das zusätzlich mit fetalem bovinem Serum und Gentamicin versetzt wurde. Die Induktion der Fusion von Myoblasten zu Myotuben erfolgte dagegen an 80% konfluenten Zellen. Hierfür wurden die Zellen in Fusionsmedium kultiviert, welches im Gegensatz zum Kultivierungsmedium einen 2%igen Anteil an Pferdeserum enthielt. Der Entzug der Wachstumsfaktoren im Fusionsmedium verminderte die Proliferationsrate der Zellen, induzierte den Austritt aus dem Zellzyklus und leitete die Fusion zu Myotuben ein. Dieser Prozess konnte lichtmikroskopisch anhand der Zellmorphologie beobachtet werden. Mononukleäre Zellen wurden als Myoblasten und Zellen mit mehreren Zellkernen als reife Myotuben identifiziert. Zur weiteren Analyse im Verlauf der Fusionierung wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und nach dem weiter unten beschriebenen Protokoll immunhistochemisch gefärbt.

3.5 Herstellung von Kryogewebeschnitten

Nach Entnahme wurde das Muskelgewebsstück noch im Operationssaal in Gum Traganth auf einem Korkplättchen gebettet und in Isopentan (in flüssigen Stickstoff gefroren und leicht angetaut) geschwenkt. Anschließend wurde die Probe in flüssigem Stickstoff gefroren und bei 80°C gelagert. Zur weiterführenden Diagnostik wurde das Muskelgewebe nun geschnitten und anschließend gefärbt. Die Schnitte wurden mit dem Modell CL 30505 der Firma Leika angefertigt. In diesem Gefriermikrotom wurden bei -20°C Schnitte einer Dicke von 7 µm erstellt. Die Muskelproben wurden auf kleinen Objektträgern fixiert und konnten auf diese gebettet gefärbt werden.

3.6 Immunhistochemie

Zur Darstellung unterschiedlicher Antigene, seien es spezifische Oberflächenmarker als auch Transkriptionsfaktoren, wurden die isolierten Fasern nach 0 h, 2 d und nach 4 d, sowie nach

Auswachsen von neuen Myoblasten aus den Fasern immunhistochemisch gefärbt. Als Vergleich wurden außerdem Kryogewebeschnitte, sowie Myoblasten aus der Zellkultur mit den gleichen Antikörpern behandelt.

Durchführung von Gewebe-, Faser-, und Myoblastenfärbungen

Die in 3,7%iger Formaldehydlösung fixierten Muskelfasern wurden zu Beginn der Färbung mit 0,2%igem Triton-X-100 in PBS für 15 min permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen von jeweils 5 Minuten wurde anschließend für die Pax7 - Färbung eine Ureabehandlung durchgeführt, indem die Fasern in 360 mg/1 ml für 30 Minuten bei 60°C inkubierten. Es folgten wiederum drei Waschschritte von jeweils 5 Minuten, bevor die zu färbenden Gewebe zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 5% Ziegen Serum in 1% BSA überschichtet wurden. Anschließend wurde der primäre Antikörper in geeigneter Weise mit 1% BSA/PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden alle weiteren Schritte unter Ausschluss von Licht durchgeführt. Nach einem dreimaligen Waschen von jeweils 10 Minuten wurde der mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelte zweite Antikörper in einer geeigneten Verdünnung in 1% BSA/PBS für 30 Minuten inkubiert. Zum Abschluss wurden die Zellkerne mit einem Hoechstfarbstoff sichtbar gemacht und die gefärbten Gewebe mit 50% Glycerin in PBS eingebettet.

3.6.1 Immunhistochemische Färbungen nach enzymatischer Myoblastenisolation und anschließender Immobilisierung der Zellen durch Zentrifugation

Nach einem ähnlichen Protokoll wurden Zellen immunhistochemisch gefärbt, die durch eine enzymatische Myoblastenisolation gewonnen wurden. Im Unterschied zu den kultivierten Myoblasten waren diese nicht adhären und mussten mithilfe von Zentrifugation (Cytospin, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) immobilisiert werden. Direkt nach der Isolation wurde die Zellsuspension durch einen 40-µm-Filter pipettiert. Anschließend wurden jeweils 150 µl der Suspension auf einen Objektträger gegeben und für 10 min bei 2000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Die Zellen waren anschließend immobilisiert und konnten nach dem oben beschriebenen Standardprotokoll gefärbt werden, nur mit dem Unterschied, dass bei der Pax7 - Färbung auf die Vorbehandlung mit Urea verzichtet wurde.

3.6.2 Verwendete Antikörperverdünnungen

Anti-beta-2-Laminin aus Maus	1:500 in 1% BSA/PBS
Anti-c-Met aus Kanninchen	1:50 in 1% BSA/PBS

Anti-CXCR4 aus Kanninchen	1:200 in 1% BSA/PBS
Anti-Desmin aus Maus	1:50 in 1% BSA/PBS
Anti-Myf-5 aus Kanninchen	1:50 in 1% BSA/PBS
Anti-MyoD aus Kanninchen	1:50 in 1% BSA/PBS
Anti-Myogenin aus Kanninchen	1:25 in 1% BSA/PBS
Anti- Myosin-Heavy-Chain aus Maus	1:50 in 1% BSA/PBS
Anti-Pax7 aus Maus	1:10 in 1% BSA/PBS

Die sekundären Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:600 in 1% BSA/PBS verwendet. Für den Hoechstfarbstoff wurde eine Verdünnung von 1:1000 in 1% BSA/PBS angefertigt.

3.7 Proteinchemische Methoden

3.7.1 Herstellung von Proteinlysaten

Nach Abnahme des Mediums und dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellkulturgefäße sofort auf Eis gebettet. Dort wurden sie mit eiskaltem Lysispuffer inklusive des Complete-Protease-Inhibitor-Cocktails der Firma Roche, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Dithiothreitol (DTT) überschichtet. Anschließend wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers von den Zellkulturgefäßen entfernt und in ein Reaktionsröhrchen überführt, in dem sie für 30 Minuten auf Eis inkubierten. Während der Inkubationszeit wurde das Proteinlysate alle 10 Minuten durchmischt. Abschließend wurden die Lysate zur Entfernung von Zelltrümmern für 15 Minuten bei 4°C und 13000 g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung konnten die Lysate nun aliquotiert, mit einem 6-fach-konzentriertem Probenpuffer versetzt und entweder bei - 80°C weggefroren oder sofort weiterverarbeitet werden.

3.7.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des *BCA™ Protein assay Kit* der Firma Pierce entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse der jeweiligen Proteinlysate wurden diese nach Denaturierung mithilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Gele bestanden aus einem ca. 1,5 cm breitem Sammelgel, das nach der Elektrophorese wieder entfernt wurde und einem ca.

5 cm breitem Trenngel, dessen Polyacrylamidanteil je nach Größe des Proteins zwischen 7% und 15% variierte. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C gekocht und je nach Volumen mit einem 6-fach-konzentriertem Probenpuffer versetzt. Nach anschließendem kurzem Abzentrifugieren wurden die Proben auf das Gel aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei maximal 200 V und endete mit Erreichen der Lauffront am Gelende.

Zusammensetzung des Trenngelpuffers:

Tris:	1,5 M
Natriumlaurylsulfat (SDS):	0,4%
pH:	8,8

Zusammensetzung des Sammelgelpuffers:

Tris:	0,5 M
Natriumlaurylsulfat (SDS):	0,4%
pH:	6,8

Zusammensetzung des Probenpuffers (6x-konz):

Tris:	350 mM
Natriumlaurylsulfat (SDS):	10%
Dithiothreitol (DTT):	0,6 M
Glyzerin:	30%
Bromphenolblau:	0,012%

Zusammensetzung des Trenngels:

	7%	10%	12%	15%
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Rotiphorese Gel 30	2,3 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
Wasser	5,2 ml	4,1 ml	3,5 ml	3,0 ml
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Zusammensetzung des SDS – Laufpuffers:

Glycin	200 mM
Tris	2,5 mM
SDS	1%

Zusammensetzung des Sammelgels:

Sammelgelpuffer	1,25 ml
Rotiphorese Gel 30	0,55 ml
Wasser	3,15 ml
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

3.7.4 Westernblot

Diese Methode diente zum semiquantitativen Nachweis von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen. Der Transfer der Proteine auf eine Membran (Blot) erfolgte elektrisch mithilfe einer halbtrockenen (semidry) Blotapparatur. Dafür wurde die Anode der Blotapparatur zunächst mit Blotpuffer befeuchtet. Anschließend wurden 2 Lagen mit Blotpuffer getränktes Chromatografiepapier auf die Anode gebettet. Darauf konnte nun eine Nitrozellulosemembran und zwei weitere Lagen Chromatografiepapier gelegt werden, die ebenfalls vorher in Blotpuffer getränkt wurden.

Der Transfer erfolgte unter 18 V für 35 Minuten.

Zusammensetzung des Blotpuffers:

Tris	48 mM
SDS	13 mM
Glycin	39 mM
Methanol	20%
pH	7,3

Inkubation mit Antikörpern

<i>Blockierung:</i>	4% Milchpulver in TBS für 1h
<i>Primärer Antikörper:</i>	MyoD – AK 1:500 in 4% Milchpulver in TBS-T für 2-16 h
<i>Waschen:</i>	3 x mit TBS-T
<i>Sekundärer Antikörper:</i>	IR Dye 700/800 1: 5000 in 4% Milchpulver in TBS-T für 30 min
<i>Waschen:</i>	2 x mit TBS-T und 1 x mit TBS

Entwicklung mit LiCore

Die Entwicklung der Membran und damit der Nachweis spezifischer Proteine wurde mit dem Odysseusgerät der Firma LiCore vorgenommen. Dieses Gerät verfügt über ein Infrarot-

Fluoreszenzdetektion Scanning System, dessen Sensitivität im unteren Picogrammbereich liegt. Die hohe Empfindlichkeit wird durch eine Markierung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen erreicht, die im Infrarotbereich abstrahlen. Hier verwendet wurden das IR Dye 800 sowohl gegen Maus als auch gegen Kaninchen, als auch das IR Dye 700 gegen Maus und Kaninchen.

Darstellung von Kontrollbanden mithilfe einer Coomassiefärbung:

Zusammensetzung Coomassielösung:

Coomassie:	0,25%
Essigsäure:	10%
Methanol:	50%

Zusammensetzung der Entfärbelösung:

Essigsäure:	5%
Methanol:	10%

Das Polyacrylamidgel wurde nach dem Blotvorgang für 30 Minuten im Coomassiefarbstoff inkubiert. Anschließend konnte das Gel mit Leitungswasser abgewaschen und mit der Entfärbelösung entfärbt werden. Das Gel konnte nun entweder in Leitungswasser gelagert oder mit dem Odysseusgerät der Firma LiCore (s.o) entwickelt werden.

3.8 Auswertung

3.8.1 Auswertung immunhistochemischer Abbildungen

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Fasern und Zellen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop des Modells CTR 6000 der Firma Leika. Zu Beginn konnte sich ein Überblick mithilfe einer kleinen mikroskopischen Vergrößerung verschafft werden. Für eine detaillierte Auswertung wurde eine größere Vergrößerung verwendet.

Die Auszählung der Pax7 - positiven Satellitenzellen erfolgte ebenfalls in einer großen Vergrößerung. Hierfür wurden jeweils 5 repräsentative Bildausschnitte ausgewählt und anschließend sowohl die Pax7 - positiven Zellen, als auch die Gesamtzahl der Zellkerne ausgezählt und ins Verhältnis zueinander gestellt.

3.8.2 Statistische Auswertung

Die Analyse der Daten wurde mit Hilfe von Microsoft Excel und IBM SPSS Statistics 19.0 für Windows (IBM Deutschland GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Die Auszählung der Pax7 - positiven Satellitenzellen erfolgte während der Auswertung der immunhistochemischen Abbildungen. Hierfür wurden jeweils 5 repräsentative Bildausschnitte ausgewählt und anschließend sowohl die Pax7 - positiven Zellen, als auch die Gesamtzahl der Zellkerne ausgezählt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Pax7 – positiven Zellen als Teil der Gesamtnuclei berechnet. Aus den fünf errechneten Werten wurde danach der Mittelwert gebildet. Die Abhängigkeit des prozentualen Anteils der Pax7 – positiven Zellen vom Alter des Patienten wurde mithilfe des nicht - parametrischen Kruskal – Wallis – Test für ungebundene Variablen berechnet. Dafür wurden die 24 Probanden in drei unterschiedliche Altersgruppen eingeteilt. Gruppe 1 enthielt alle Patienten im Alter von 0 – 49 Jahre, Gruppe 2 50 - 69 Jahre und Gruppe 3 alle Probanden über 70 Jahre. Anschließend sollte bestimmt werden, ob es einen Unterschied im prozentualen Anteil der Pax7 – positiven Zellen zwischen den gesunden und potenziell erkrankten Patienten gibt. Dafür wurden Probanden mit ungefähr dem gleichen Alter aus beiden Gruppen herausgesucht und die Mittelwerte der Pax7 – positiven Zellen verglichen. Eingeschlossen wurden dafür alle Probanden, die älter als fünf Jahre und jünger als 69 Jahre waren. Getestet wurde dieser Zusammenhang mithilfe des nicht - parametrischen Mann-Whitney-U-Test für nicht – verbundene Variablen. Bei allen Berechnungen wurde ein $p - \text{Wert} < 0,05$ als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte gezeigt werden, durch welche Antigene die humane Satellitenzelle im Skelettmuskel charakterisiert wird. Dafür sollte eine Methode etabliert werden, mit der die Möglichkeit gegeben ist, die Satellitenzelle in ihrer anatomischen Lokalisation zwischen Plasmamembran und Basallamina einer Muskelfaser zu analysieren. Wie im Methodikteil unter 3.2 beschrieben, wurde die rein mechanische Isolation humaner Muskelfasern etabliert. Durch eine Kooperation mit der orthopädischen Abteilung des HELIOS - Klinikum in Berlin, Buch war es möglich, Versuche an normalen humanen Satellitenzellen durchzuführen und Ergebnisse zu deren Antigenexpression zu gewinnen. Zur Verifizierung wurden außerdem Versuche an Zellen durchgeführt, die durch enzymatischen Verdau isoliert wurden sowie an Kryogewebschnitten. Anschließend wurde charakterisiert, wie sich die Expression dieser Antigene während des Differenzierungsprozesses von der Satellitenzelle zur reifen Myotube verändert. Von großer Wichtigkeit war dabei der Vergleich zu in der Literatur bekannten Informationen zur Antigenexpression von Satellitenzellen der Maus.

In den nachfolgenden Kapiteln werden die Ergebnisse geordnet nach Antigenen präsentiert.

4.1. Pax7 zeigt sich als aussagekräftigster Marker zur Charakterisierung von humanen Satellitenzellen

Pax7 zeigt sich in der Literatur als potenter Marker für Satellitenzellen, da dieser Transkriptionsfaktor außer von der Satellitenzelle, von keiner anderen Zelle der Muskulatur exprimiert wird. Deshalb wurde in dieser Promotionsarbeit die Zelle als Satellitenzelle definiert, die das Pax7-Antigen exprimiert.

Neben der Identifizierung dieses Antigens in frisch isolierten humanen Muskelfasern wurde außerdem das Expressionsmuster des Pax7 in frisch isolierten Myoblasten, die anschließend durch Zentrifugation (Cytospin) immobilisiert wurden, sowie in Kryogewebschnitten nachgewiesen.

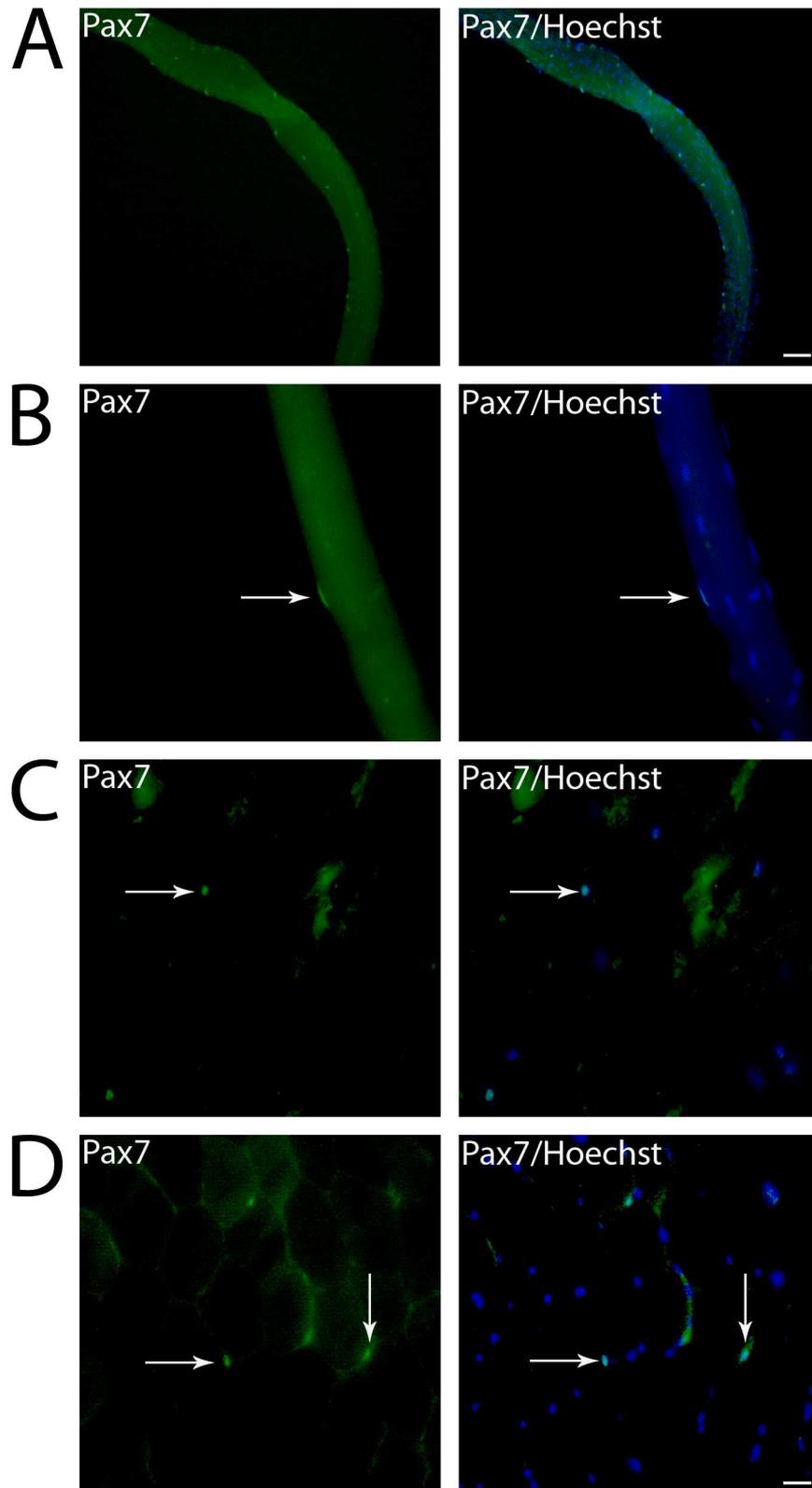


Abbildung 6: Pax7-Expression in humanem Skelettmuskel. Verwendet wurde ein anti-Pax7 Antikörper aus Maus. Dieser wurde mit einem sekundären Alexa 488 gekoppelten Ziege-gegen-Maus (grün) Antikörper detektiert. Blau: Hoechstfarbstoff. A-B: Pax7 - Expression in isolierten humanen Muskelfasern, C: Pax7 - Expression in frisch

isolierten Myoblasten und Immobilisierung durch Cytospin, D: Pax7 - Expression in Kryogewebeschnitten. Pfeile: Pax7 - positive Zellen. Balken in A = 100 μm , in B-D = 25 μm .

Wie in Abbildung 6 zu erkennen, ist es möglich, die isolierte Satellitenzelle mithilfe von Immunfluoreszenz zu markieren und durch ein Fluoreszenzmikroskop zu detektieren. In A lassen sich Übersichtsaufnahmen von einzelnen mechanisch isolierten Muskelfasern erkennen. B zeigt die gleiche Faser in einer detaillierteren Vergrößerung. Die Pax7 - positive Satellitenzelle lässt sich in diesen Abbildungen am Rand der Muskelfaser erkennen. Die zweite Abbildung der Reihe B zeigt eine Kofärbung des Pax7 mit einem Hoechstfarbstoff, der die Gesamtzahl der Zellkerne markiert. Es lässt sich erkennen, dass nur ein kleiner Teil der Faser-assoziierten Zellkerne eine Pax7 - Expression aufweist. Die Zellen in den Abbildungen der Reihe C wurden durch einen enzymatischen Verdau des Muskelbiopsats und anschließender Zentrifugation auf Objektträger gewonnen. Im Vergleich zu den Färbungen der isolierten Muskelfasern ließen sich die Pax7 - positiven Satellitenzellen schwieriger identifizieren, da sie ein schwächeres Signal aufwiesen.

Als zweiten Vergleich zu der neu etablierten Methode der mechanischen Isolation von Muskelfasern und auch als Kontrolle der immunhistochemischen Färbungen diente die Arbeit mit Kryogewebeschnitten. Die Muskelbiopsate stammten aus dem M. vastus lateralis des M. quadriceps femoris. Die Abbildungen der Reihe D zeigen einen Muskelquerschnitt mit mehreren Muskelfaserbündeln dieses Muskels. Die Satellitenzellen lassen sich ähnlich den faserassoziierten Zellkernen am Rande einer Muskelfaser auffinden. Sie sind anhand des grünen Pax7 - Signals erkennbar. In der zweiten Abbildung der Reihe D ist wiederum eine Kofärbung von Pax7 und einem Hoechstfarbstoff zur Kennzeichnung der Gesamtzahl der faserassoziierten Zellkerne aufgeführt. Es lässt sich ähnlich wie bei den immunhistochemischen Färbungen der isolierten Muskelfasern erkennen, dass die Pax7 - positiven Satellitenzellen nur einen kleinen Teil der faserassoziierten Zellkerne kennzeichnen.

4.2 Altersabhängige Abnahme des prozentualen Anteils der Pax7 - positiven Satellitenzellen

Nach Identifizierung und Definition der Satellitenzelle als Pax7 - positive Zelle wurde untersucht, wie hoch der prozentuale Anteil der Satellitenzelle an der Gesamtzahl der Zellkerne war, und ob dieser mit dem Alter der Patienten korrelierte. Dafür wurden von den immunhistochemisch markierten Muskelfasern jeweils fünf geeignete Abbildungen angefertigt. Anschließend wurden sowohl die Pax7 - positiven als auch die Gesamtzahl der Faser -

assoziierten Zellkerne gezählt und zueinander ins Verhältnis gesetzt. In die Auswertung mit einbezogen wurden sowohl Muskelbiopsien aus der Hochschulambulanz für Muskelerkrankungen der Charité als auch aus orthopädischen Operationen des HELIOS - Klinikums Berlin, Buch (später Normalkontrollen genannt).

Folgende Tabelle zeigt Daten zu den verwendeten Muskelbiopsien.

Tabelle 2: Verwendete Muskelbiopsien

	Anzahl	Geburtsjahr	Muskel	Begleiterkrankungen
Normalkontrollen	17	1929-1960	M. vastus lateralis	Keine neuromuskuläre Krankheit bekannt
Hochschulambulanz	7	1941-2004	M. vastus lateralis	- Dysferlinopathie - Neurogene Atrophie - Minimale Myopathie - Myopathie mit Typ II Faseratrophie - Partieller Acetylcholinesterasemangel

Für die Maus wurde gezeigt, dass sich der Anteil der Satellitenzellen unter der Gesamtzahl der Myonuclei altersabhängig verringert [13]. Der Frage, ob dies auch für humane Satellitenzellen zutrifft sollte damit nachgegangen werden.

Es wurden insgesamt 24 Muskelbiopsien ausgewertet, davon waren 17 gesund und 7 erkrankt. Das Verhältnis von Mann zu Frau lag bei 8:16. Das Alter variierte zwischen 5 und 80 Jahren. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 60,3 Jahren. Der durchschnittliche prozentuale Anteil von Satellitenzellen belief sich auf $2,99\% \pm 1,05\%$.

In Abbildung 7 lässt sich die Abhängigkeit des prozentualen Anteils Pax7 – positiver Satellitenzellen vom Alter der Probanden erkennen. Mit einem $p = 0,016$ zeigte sich eine signifikante Abnahme der Anzahl der Satellitenzellen mit Zunahme des Alters der Patienten

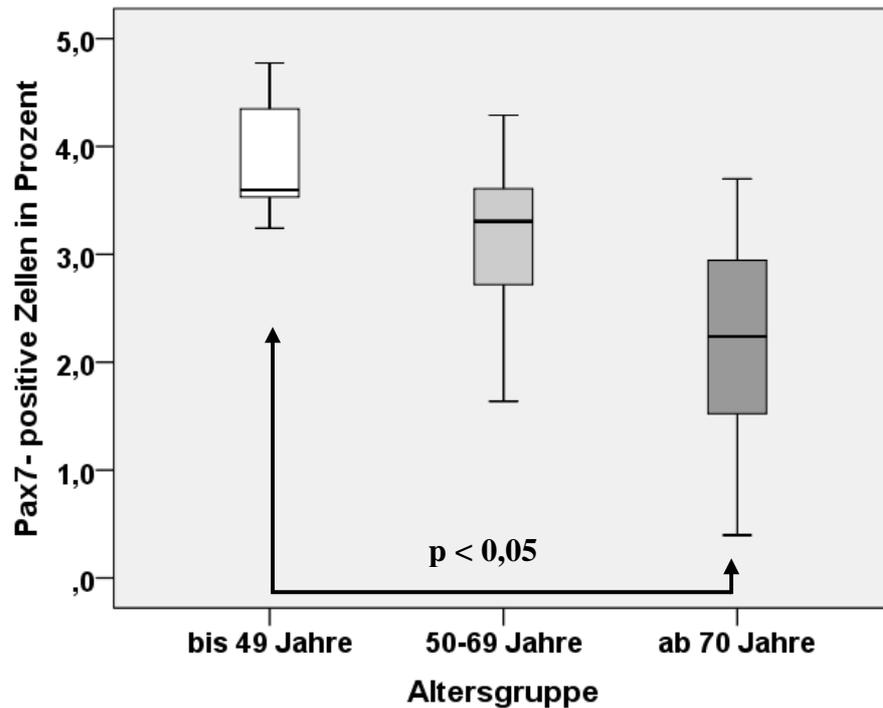


Abbildung 7: Abhängigkeit des prozentualen Anteils der Satellitenzellen vom Alter. Aufgetragen wurde der prozentuale Anteil der Pax7 – positiven Satellitenzellen in Abhängigkeit vom Alter. Das Alter der Patienten ist in drei Altersgruppen eingeteilt. Gruppe 1: bis 49 Jahre, n = 5, Gruppe 2: 50 – 60 Jahre, n = 11, Gruppe 3: ab 70 Jahre, n = 8. Das Signifikanzniveau wurde mithilfe des nicht – parametrischen Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Variablen berechnet. Mit $p = 0,016$ zeigte sich ein signifikanter Abfall des prozentualen Anteils der Pax7 – positiven Satellitenzellen mit Zunahme des Alters der Probanden.

Bei Gruppe 1 (bis 49 Jahre, n = 5) lag der Median an Pax7 – positiven Satellitenzellen bei 3,597%, die äußeren Enden der Box bildeten die Werte 3,387% (25. Perzentile) und 4,561% (75. Perzentile) mit einem Maximum von 4,8% und einem Minimum von 3,2%. Bei Gruppe 2 (50 – 69 Jahre, n = 11) ergab sich ein Median von 3,306%, mit 2,518% als Wert der 25. Perzentile und 3,685% für die 75. Perzentile. Das Maximum nahm hier einen Wert von 4,3% und das Minimum von 1,6% an. Für Gruppe 3 (ab 70 Jahre, n = 8) ergab sich ein Median von 2,239% mit den äußeren Enden der Box von 1,425% (25. Perzentile) und 3,06% (75. Perzentile) sowie einem Maximalwert von 3,7% und einem Minimalwert von 0,4%.

Bei Auswertungsbeginn wurde vermutet, dass sich der prozentuale Anteil der Pax7 - positiven Satellitenzellen bei Muskelfasern der Normalkontrollen von denen mit potentiell neuromuskulären Erkrankungen unterscheiden würde. Es ergab sich ein Median für den prozentualen Anteil der Pax7 – positiven Zellen für die Gruppe der gesunden Probanden (n = 8) von 3,418% mit einem Wert für die 25. Perzentile von 3,002% und für die 75. Perzentile von

3,824%. Der Maximalwert belief sich auf 4,3%, während der Minimalwert bei 1,6% lag. Für die Patienten mit potentiell neuromuskulären Erkrankungen (n = 6) ergab sich ein Median von 3,490% mit Werten für die äußeren Enden der Box von 2,428% (25. Perzentile) und 4,455% (75. Perzentile). Der Maximalwert lag bei 4,8% und der Minimalwert bei 2,2%. Mithilfe des nicht – parametrischen Mann – Whitney – U – Tests wurde das Signifikanzniveau der Nullhypothese, dass kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen besteht, berechnet. Mit einem $p = 0,699$ konnte kein signifikanter Unterschied dargestellt werden.

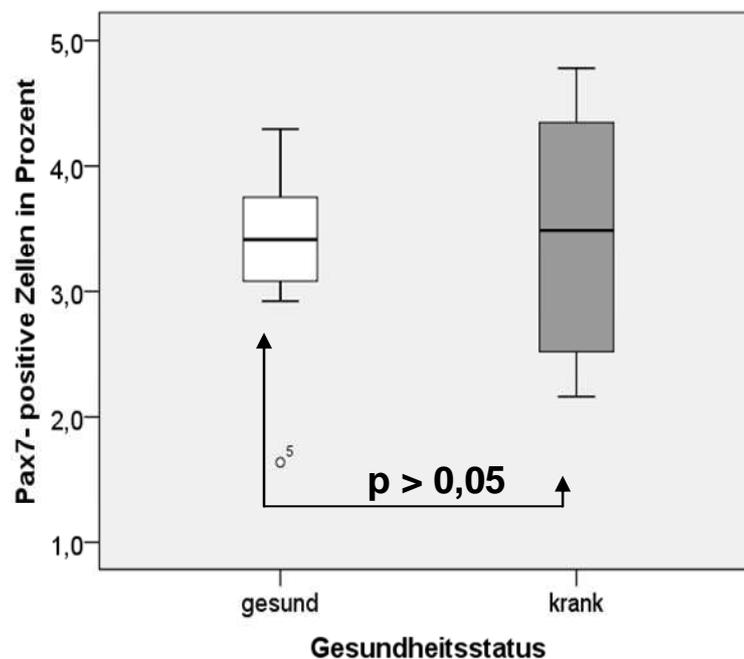


Abbildung 8: Kein signifikanter Unterschied des prozentualen Anteils von Pax7 – positiven Satellitenzellen bei gesunden und potenziell erkrankten Probanden. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der Pax – positiven Satellitenzellen in Abhängigkeit des Gesundheitsstatus der Probanden. Gesund = 8 Probanden, Krank = 6 Probanden. Das Signifikanzniveau wurde mithilfe des nicht - parametrischen Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Variablen bestimmt. $p = 0,699$.

4.3 c-Met charakterisiert eine Pax7 - negative Subpopulation an Muskelvorläuferzellen

Neben der Charakterisierung des Expressionsmusters von Pax7 in Satellitenzellen wurde in dieser Promotionsarbeit außerdem die Expression des Rezeptors des Hepatozyten-Growth-Factors, c-Met, beschrieben. Ähnlich wie auch bei den Versuchen zur Expression von Pax7, wurde c-Met sowohl in isolierten Muskelfasern, in isolierten Myoblasten, die anschließend durch Zentrifugation immobilisiert wurden und in Kryogewebeschnitten beobachtet.

Erste Schritte zur Charakterisierung der c-Met Ausprägung in humanen Satellitenzellen zeigen die folgenden Ergebnisse.

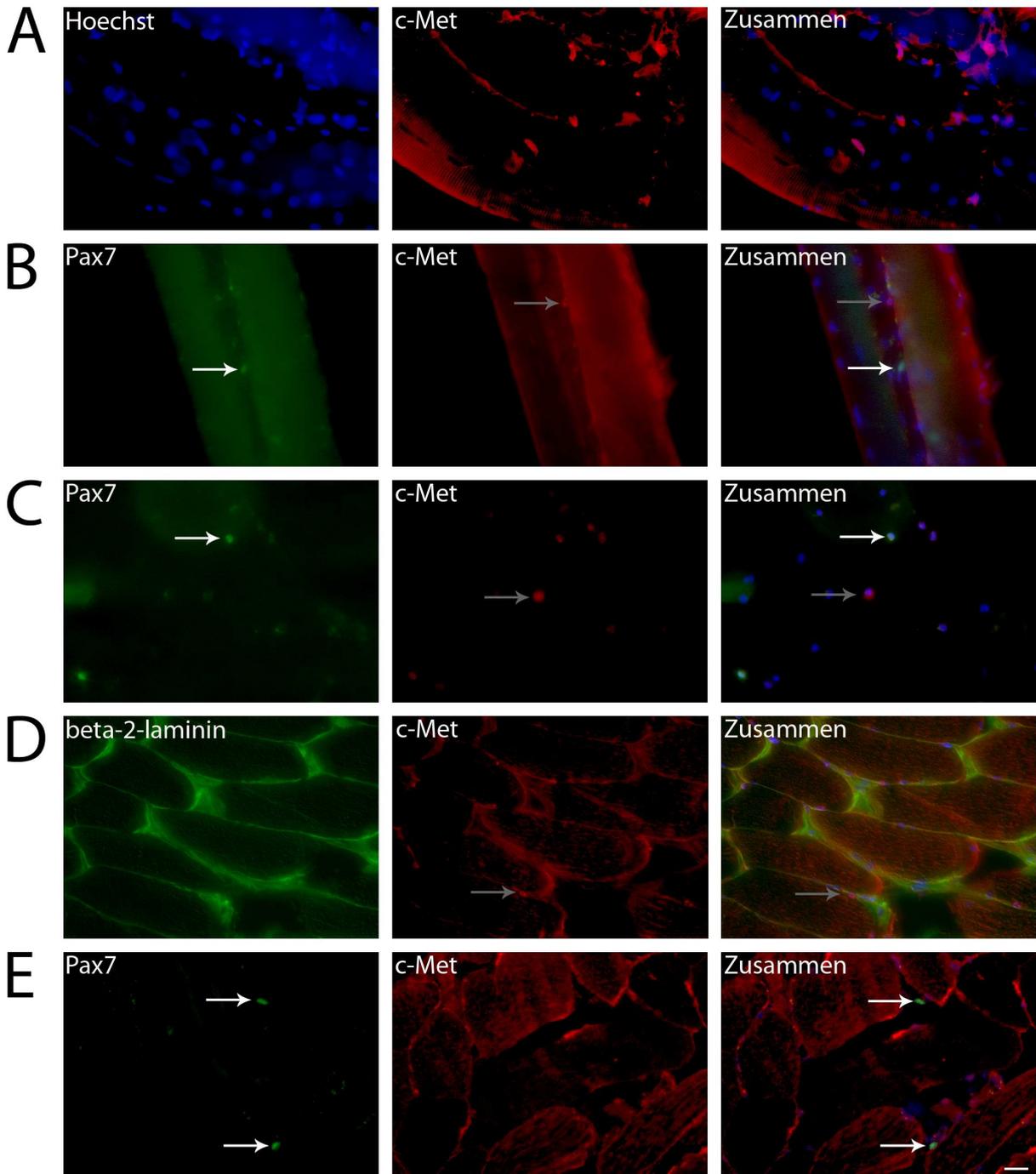


Abbildung 9: c-Met Expression in humanem Skelettmuskel. Verwendet wurde ein anti-Pax7 Antikörper aus Maus, ein anti-c-Met Antikörper aus Kaninchen und ein monoklonaler anti-beta-2-Laminin Antikörper. Diese wurden mit einem sekundären Cy3-gekoppelten Ziege-gegen-Kaninchen (rot) und einem sekundären Alexa 488 gekoppelten Ziege-gegen-Maus Antikörper (grün) detektiert. Blau: Hoechstfarbstoff, Grün: Pax7 und beta-2-laminin, Rot: c-Met. A: c-Met Expression in frisch isolierten humanen Muskelfasern, B: c-Met und Pax7 Expression in frisch isolierten humanen Muskelfasern, C: c-Met und Pax7 Expression in frisch isolierten Myoblasten und

Immobilisierung durch Cytospin, D: c-Met und beta-2-laminin in Kryogewebeschnitten, E: c-Met und Pax7 in Kryogewebeschnitten. Weißer Pfeil: Pax 7, grauer Pfeil: c-Met. Balken = 25 µm.

Der anti-c-Met Antikörper hat eine Zellpopulation markiert, die ähnlich lokalisiert ist wie die Pax7 - positiven Zellen, interessanterweise aber nicht mit ihr identisch ist. Das konnte in allen Ansätzen - isolierte Muskelfasern, isolierte Myoblasten die durch Zentrifugation immobilisiert wurden und Gewebsschnitt – bestätigt werden. Ob es sich bei den c-Met - positiven Zellen um Satellitenzellen eines anderen Aktivierungsgrades oder um eine separate Zellpopulation handelt, kann anhand der durchgeführten Experimente noch nicht entschieden werden.

4.4 CXCR4 markiert eine eigene Subpopulation an Muskelvorläuferzellen

Als drittes Antigen wurde das Expressionsmuster von CXCR4 untersucht. Wie auch in den vorherigen Kapiteln beschrieben, wurde die CXCR4-Expression sowohl in isolierten Muskelfasern, in isolierten Myoblasten, die anschließend durch Cytospin immobilisiert wurden und in Kryogewebeschnitten beschrieben.

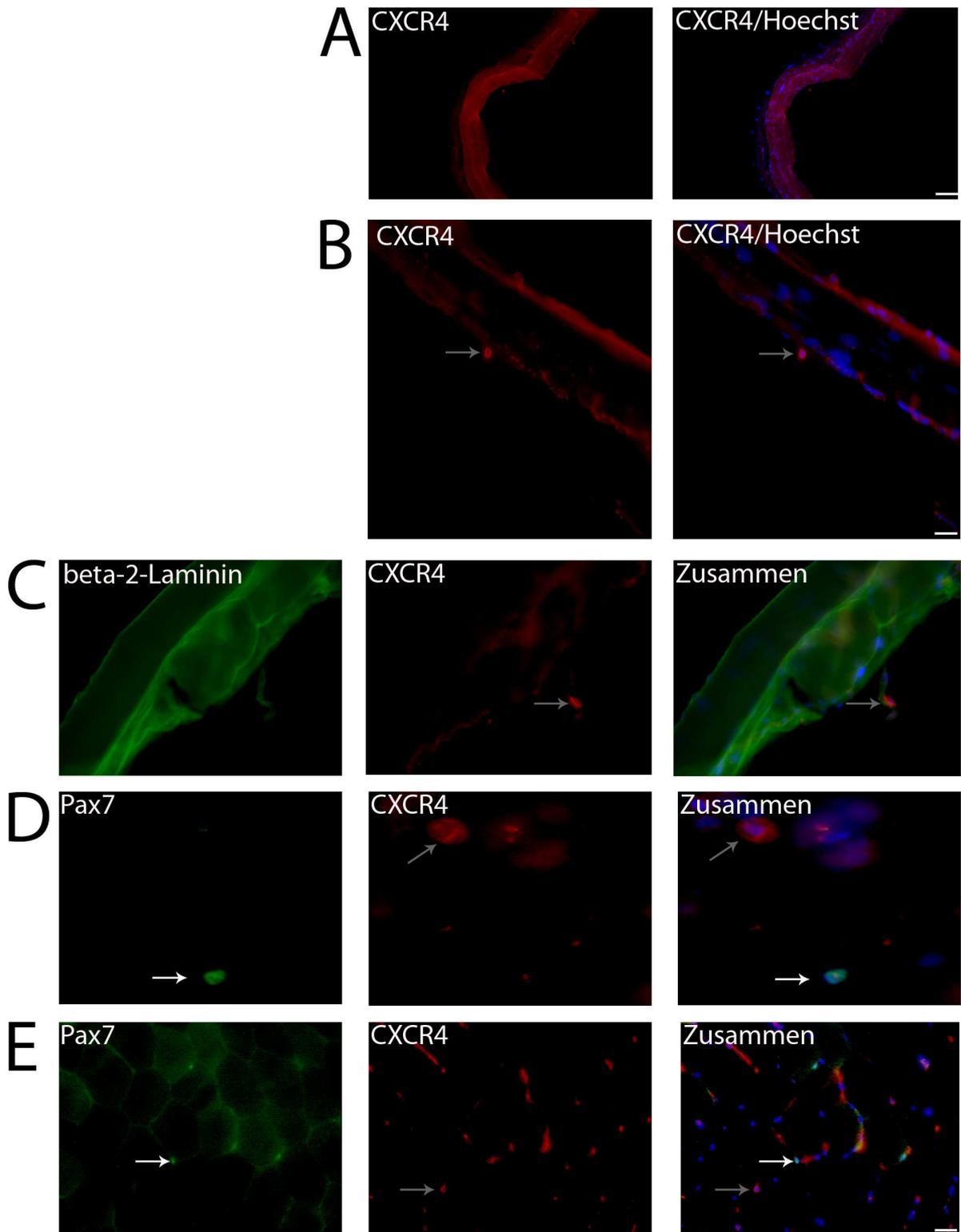


Abbildung 10: CXCR4-Expression in humanen Satellitenzellen. Verwendet wurde ein anti-CXCR4 Antikörper aus Kaninchen, ein anti-Pax7 Antikörper aus Maus und ein monoklonaler anti-beta-2-Laminin Antikörper. Diese wurden mit einem sekundären Cy3-gekoppelten Ziege-gegen-Kaninchen (rot) und einem sekundären Alexa 488 gekoppelten Ziege-gegen-Maus (grün) Antikörper detektiert. Blau: Hoechstfarbstoff, Rot: CXCR4, Grün: beta-2-

laminin oder Pax7. A und B: CXCR4 Expression in frisch isolierten humanen Muskelfasern, C: CXCR4 und beta-2-laminin Expression in frisch isolierten humanen Muskelfasern, D: CXCR4 und Pax7 Expression in frisch isolierten humanen Myoblasten und Immobilisierung durch Cytospin, E: CXCR4 und Pax7 Expression in Kryogewebeschnitten. Weißer Pfeil: Pax7, grauer Pfeil: CXCR4. Balken in Reihe A = 100 µm, in Reihe B bis E = 25 µm.

CXCR4 - positive Zellen waren als kleine Zellen außerhalb der Faser oder am Faserrand nachweisbar. Zur Bestimmung, ob diese Zellen die gleiche anatomische Lage wie die Satellitenzellen aufwiesen, nämlich zwischen der Basallamina und der Plasmamembran jeder einzelnen Faser, wurden weitere Färbungen mit einem Antikörper gegen beta-2-laminin durchgeführt (Abbildungen der Reihe C). Beta-2-laminin ist ein Strukturprotein, das in der Basallamina exprimiert wird. Auf diese Weise konnte die genaue Lokalisation der CXCR4 - positiven Zellen in der Faser identifiziert werden. In den Abbildungen der Reihe C stellt sich das beta-2-Laminin grün und das CXCR4 rot dar. Es konnte dargestellt werden, dass der Hauptteil der CXCR4 - positiven Zellen außerhalb der Basallamina zu finden war. Übereinstimmend wurden diese Ergebnisse bei isolierten Muskelfasern, Myoblasten, die nach Isolation durch Zentrifugation immobilisiert wurden und in Gewebeschnitten erzielt. Ähnlich der Ergebnisse zu der Expression von c-Met in Satellitenzellen zeigte sich auch bei der Expression von CXCR4 keine Korrelation zwischen Pax7 - positiven Satellitenzellen und CXCR4 - positiven Zellen. Vielmehr lassen sich auch hier zwei Subpopulationen von Zellen nachweisen.

4.5 Satellitenzellen zeigen myogenes Regenerationspotenzial in vitro

Nach Charakterisierung der isolierten Satellitenzellen anhand unterschiedlicher in der Literatur am murinen Modell bekannten Markern, war es das nächste Ziel deren Proliferationsverhalten unter Kultivierungsbedingungen zu beobachten. Die isolierten Muskelfasern wurden wie im Methodikteil unter 3.2.4 beschrieben, auf mit Matrigel beschichtete Deckgläschen gebettet und in Skeletal Muscle Growth Medium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Mit täglicher lichtmikroskopischer Kontrolle wurde beobachtet, zu welchem Zeitpunkt neue Myoblasten aus den isolierten Muskelfasern auswuchsen. Nach ungefähr 6-8 Tagen zeigten sich die ersten Zellen innerhalb der Faser, nach einigen Wochen konnten hunderte von Myoblasten außerhalb der Faser erkannt werden. Diese wurden mit einem Antikörper gegen Desmin immunhistochemisch gefärbt. Desmin ist ein Intermediärfilament und damit ein Element des Zytoskeletts von Myoblasten. Desmin spielt eine wichtige Rolle in der Architektur der Muskelzelle, indem es viele Komponenten des Zytoplasmas miteinander verknüpft. Seine Expression steigt mit zunehmender Differenzierung der Muskelzellen.

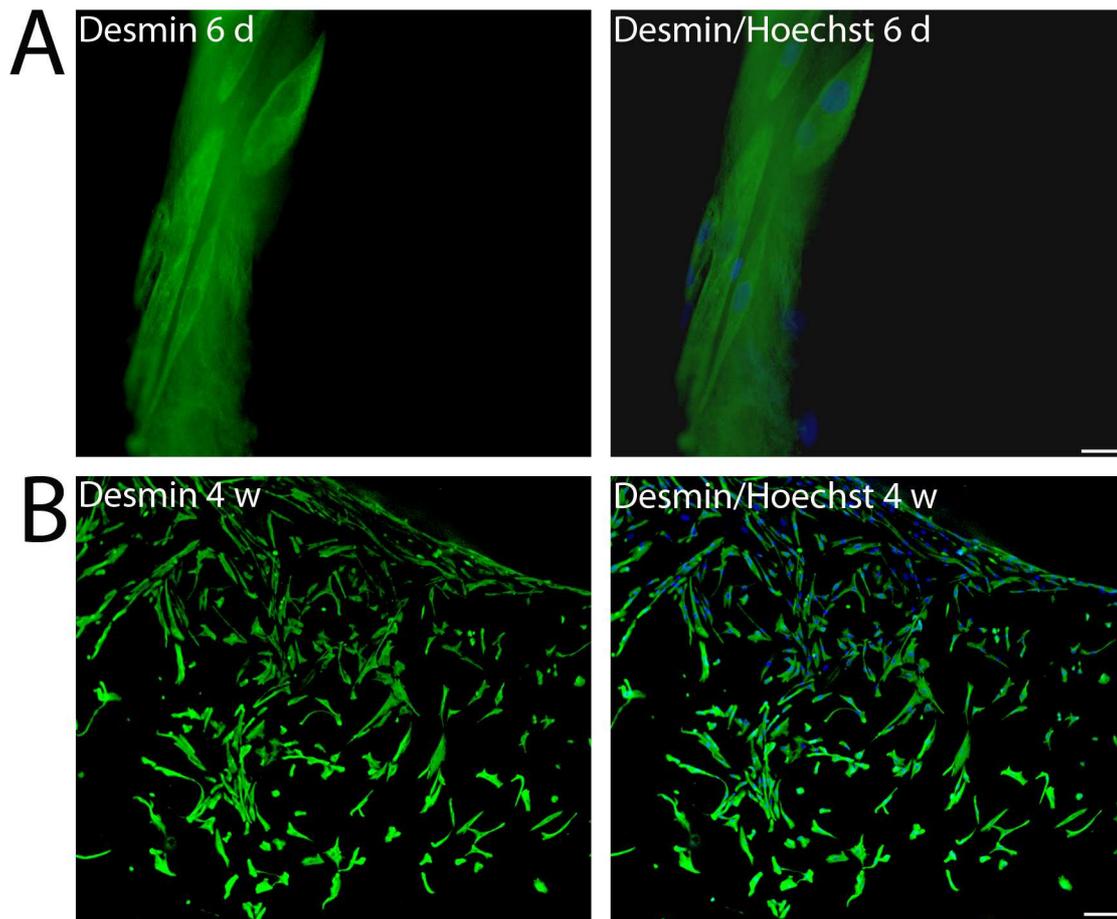


Abbildung 11: Proliferierende Myoblasten aus isolierten Muskelfasern. Verwendet wurde ein anti-Desmin Antikörper aus Maus, der mit einem Alexa 488 Ziege-gegen-Maus (grün) gekoppelten sekundären Antikörper detektiert wurde. Blau: Hoechstfarbstoff, Grün: Desmin. A: Muskelfaser, die 6 d kultiviert wurde, B: Muskelfaser mit ausgewachsenen Myoblasten, die 4 Wochen kultiviert wurde. Bar in Reihe A = 25 μm , in Reihe B = 100 μm .

Es zeigte sich, dass die mit den Muskelfasern isolierten Satellitenzellen *in vitro* ein starkes myogenes Potenzial aufweisen, durch das neue Myoblasten entstehen können. Nach einigen Tagen ließen sich erste Zellen erkennen, nach wenigen Wochen stieg deren Anzahl auf ein paar hundert. Es wurde beobachtet, dass sich Myoblasten nur aus isolierten Muskelfasern bildeten, die eine gewisse Adhärenz zu den für die Kultivierung verwendeten Deckgläschen zeigten. Lösten sich die Muskelfasern nach der Isolation von ihrer Unterlage, kam es zu keinem Auswachsen neuer Muskelzellen.

Zusammengefasst war unsere Beobachtung, dass die initiale Proliferation von Satellitenzellen innerhalb der isolierten Muskelfaser begann und nur dort aus der Faser auswuchs, wo es zu einer Verletzung der Basalmembran gekommen war, nämlich an der Peripherie des Muskelfaserpräparats.

So wurde mit der Etablierung der Methode zur rein mechanischen Isolation von Satellitenzellen nicht nur eine Möglichkeit geschaffen, die Satellitenzelle in ihrem quieszenten Stadium zu charakterisieren, es ist außerdem möglich, deren Proliferationspotenzial in ihrer physiologischen Umgebung zu beobachten. Die hier gezeigten Daten wurden 5 Mal beobachtet.

4.6 Die Differenzierung von Myoblasten ist abhängig von myogenen Regulationsfaktoren

Nach Charakterisierung der Satellitenzelle zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt war es das nächste Ziel die weitere Differenzierung der Satellitenzelle zu Myoblasten und anschließend zu Myotuben zu beobachten. Die Induktion der Myoblasten zur Fusion erfolgte, wie im Methodikteil unter 3.4 beschrieben. Die Zellen wurden anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und immunhistochemisch mit Antikörpern gegen die MRFs Myf5, MyoD und Myogenin gefärbt. Zusätzlich wurde ein Nachweis für die Expression von Myosin-Heavy-Chain (MHC) durchgeführt.

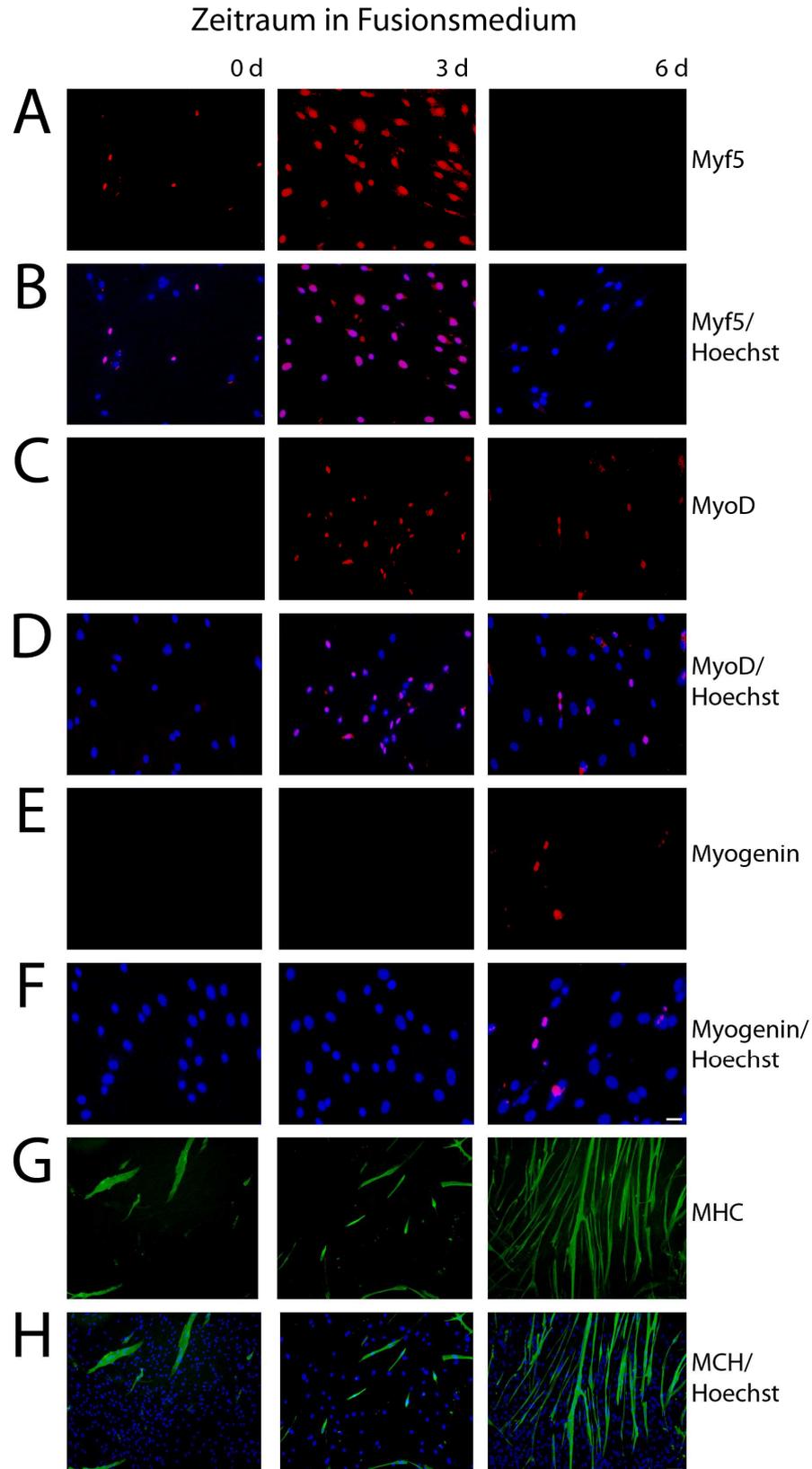


Abbildung 12: Expression von myogenen Regulationsfaktoren in fusionierenden Myoblasten aus Normalkontrollen. Verwendet wurden anti-Myf5, anti-MyoD und anti-Myogenin Antikörper aus Kaninchen, sowie ein anti-MHC Antikörper aus Maus. Diese wurden mit einem sekundären Cy3-gekoppelten Ziege-gegen-Kaninchen (rot) und einem sekundären Alexa 488 gekoppelten Ziege-gegen-Maus (grün) Antikörper detektiert.

Blau: Hoechstfarbstoff, Grün: MHC, Rot: Myf5, MyoD oder Myogenin. A und B: Expression von Myf5 in Myoblasten nach 0, 3 und 6 d in Fusionsmedium, C und D: Expression von MyoD in Myoblasten nach 0, 3 und 6 d in Fusionsmedium, E und F: Expression von Myogenin in Myoblasten nach 0, 3 und 6 d in Fusionsmedium, G und H: Expression von MHC nach 0, 3 und 6 d in Fusionsmedium. Balken in Reihe A-F = 25 μm , Bar in Reihe G- H = 100 μm .

Es lässt sich der immunhistochemische Nachweis von myogenen Regulationsfaktoren während des Differenzierungsprozesses von Myoblasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten erkennen. Die Expression von Myf5 (Reihe A und B) charakterisierte früh aktivierte und proliferierende Myoblasten. Die stärkste Signalintensität ließ sich nach drei Tagen in Fusionsmedium erkennen. Zu diesem Zeitpunkt ließen sich neben Myoblasten auch vereinzelte bereits fusionierte Myotuben erkennen. Die Expression von Myf5 beschränkte sich auf die Myoblasten. Mit Fortschreiten der Kultivierung der Zellen in Fusionsmedium und der weiteren Differenzierung konnten keine positiven Signale für Myf5 mehr erkannt werden (Spalte 3, Kultivierung nach 6 d).

MyoD spielt wie auch das Myf5 eine wichtige Rolle in der Myogenese. In den immunhistochemischen Färbungen ließ sich ein wellenförmiger Expressionsverlauf erkennen. Ab etwa dem dritten Tag der Fusionierung ließen sich erste Myotuben erkennen, die ein MyoD positives Signal aufwiesen (Reihe C und D, Spalte 2). Mit Fortschreiten der Kultivierung ließ sich ein weiteres Ansteigen der MyoD – Expression registrieren, die dann etwa nach dem sechsten Tag in Kultur wieder abnahm.

Zur Verifizierung der immunhistochemischen Ergebnisse wurden die gleichen Zellen nach unterschiedlich langer Kultivierung in Fusionsmedium zur Gewinnung von Proteinlysaten verwendet und anschließend mithilfe eines Westernblots analysiert.

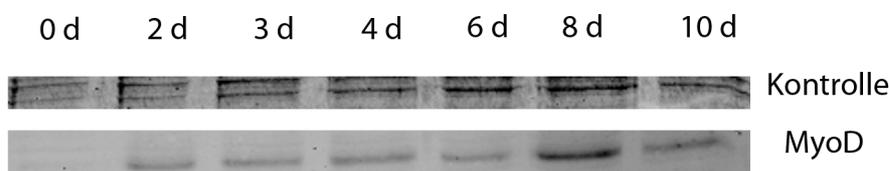


Abbildung 13: Westernblot Analyse zur Expression von MyoD in differenzierenden Zellen. Abgebildet ist ein Westernblot zum Nachweis des MyoD-Proteins in Myoblasten, die unterschiedlich lange in Fusionsmedium kultiviert wurden. Das 45 kDa große Protein zeigt seine deutlichste Expression nach einer Kultivierung von 8 Tagen in Fusionsmedium. Zu früheren Zeitpunkten ist es nur sehr schwach ausgeprägt. Nach Erreichen seines Höhepunktes nach 8 Tagen nimmt seine Expression im Laufe des Differenzierungsprozesses ab. Die Kontrollbande wurde mithilfe einer Coomassiefärbung dargestellt.

In Abbildung 13 lässt sich eine solche Westernblotanalyse erkennen. Die Proteinlysate der kultivierten Zellen wurden nach 0, 2, 3, 4, 6, 8 und 10 Tagen gewonnen. Es lässt sich mit Dauer der Kultivierung eine Zunahme der MyoD – Expression identifizieren, die ihr Maximum nach einem Zeitraum von acht Tagen zeigt und danach wieder abflacht. Diese Ergebnisse sind kongruent zu den Auswertungen der immunhistochemischen Färbungen.

Die Expression von Myogenin ist erst nach 6 Tagen in Fusionsmedium nachweisbar und auch hier erst in wenigen Myotuben.

Bei der Expression von MHC konnte gezeigt werden, dass diese proportional zum Differenzierungsgrad der Myoblasten anstieg (Reihen G und H).

Auch die bereits dargestellten Marker, c-Met, CXCR4 und Pax7 wurden während der Differenzierung untersucht. C-Met und CXCR4 konnten zu keinem Zeitpunkt identifiziert werden, Pax7 zeigte seine stärkste Expression in der quieszenten Satellitenzelle und war mit Fortschreiten der Differenzierung nicht mehr nachweisbar.

4.7 Die Differenzierung von der Satellitenzelle zur reifen Myotube wird durch unterschiedliche Antigene charakterisiert

4.7.1 Endzusammenfassung der Ergebnisse

Mithilfe verschiedener Versuche ist es gelungen, die Expression von in der Literatur bekannten Satellitenzellmarkern an humanen Muskelzellen zu untersuchen und ihnen bestimmte Zeitpunkte in der Differenzierung einer Satellitenzelle zu einer reifen Myotube zuzuordnen. Eine sehr wichtige Rolle spielte dabei die Etablierung einer Methode zur Isolation einzelner humaner Muskelfasern auf rein mechanische Weise, um den anatomischen Sitz der Satellitenzelle zwischen der Plasmamembran und der Basallamina zu wahren und sie in ihrem quieszenten Stadium zu beurteilen. Die dabei erhobenen Ergebnisse wurden dann in anderen Versuchen, wie der enzymatischen Isolation und einer anschließenden Färbung der gewonnenen Suspension, Färbungen von differenzierenden Myoblasten, von Kryogewebeschnitten und Auswertungen von Westernblots verifiziert. Die Abbildung 14 zeigt die Expression der untersuchten Antigene abschließend zusammengefasst.

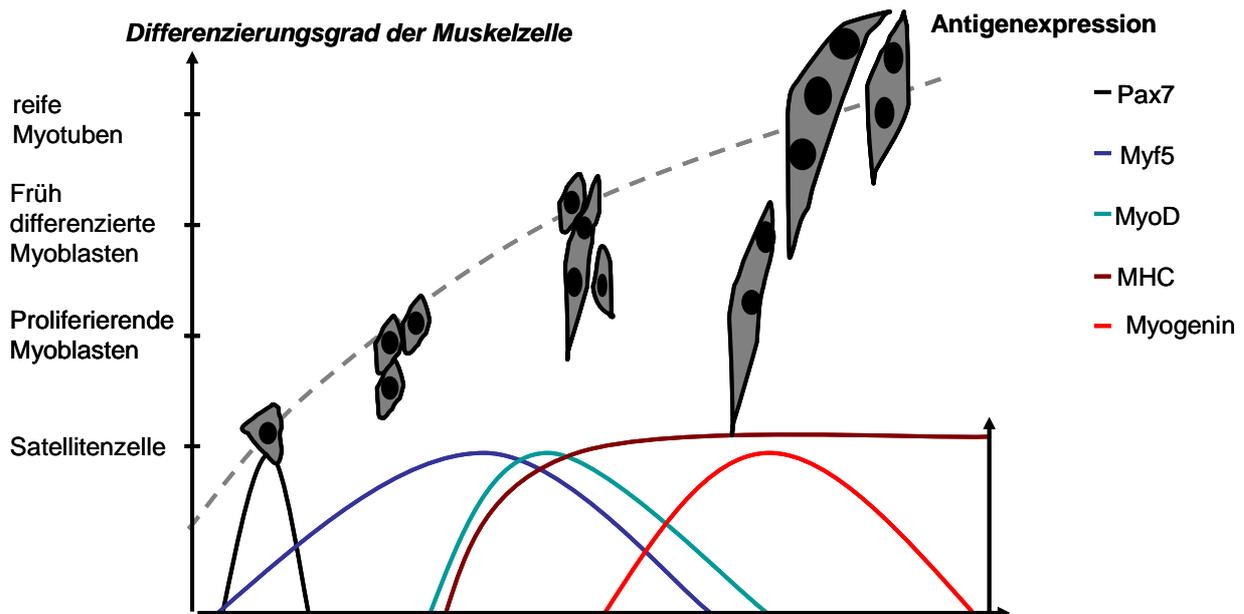


Abbildung 14: Antigenexpression im Verlauf der Differenzierung von der Satellitenzelle zur reifen Myotube. Zu erkennen ist die graphische Darstellung der Expression unterschiedlicher Antigene im Verlauf der Entwicklung von der Satellitenzelle bis zur reifen Myotube. Auf der X-Achse ist die Expression verschiedener Antigene mit ihren Maxima zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung der Muskelzellen dargestellt. Auf der Y-Achse ist der Differenzierungsgrad der Muskelzelle aufgezeichnet. Die dargestellten Zellen zeigen die morphologische Veränderung während des Differenzierungsprozesses.

Abbildung 14 zeigt eine Graphik zur Expression unterschiedlicher Antigene während des Differenzierungsprozesses einer Muskelzelle von der quieszenten Satellitenzelle zur Myotube. Auf der y-Achse ist der Differenzierungsgrad der Muskelzelle dargestellt, auf der x-Achse die Expression untersuchter Antigene mit ihren Maxima zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung. An den dargestellten Zellen lässt sich die morphologische Veränderung derer während ihrer Entwicklung erkennen. Während sich die Muskelzellen im Proliferationsstadium als kleine Zellen mit einem Zellkern zeigen, sind sie nach Fusion als mehrkernige Zellen charakterisiert.

Pax7 zeigt sich als potentester Marker zur Identifizierung und Charakterisierung der Satellitenzelle. Seine Expression zeigte ein Maximum im quieszenten Stadium der Satellitenzelle. Exprimierte eine Zelle dieses Antigen wurde sie als Satellitenzelle definiert.

C-Met und CXCR4 sind in dieser Graphik nicht aufgeführt, da sich die Expression dieser Antigene nicht in Zellen nachweisen ließ, die von den Pax7 - positiven Satellitenzellen abstammten. Vielmehr zeigte sich in unterschiedlichen Versuchen, dass Zellen mit positiven Signalen für c-Met oder CXCR4 eine weitere Subpopulation von Muskelvorläuferzellen

charakterisierten, die unabhängig von der Pax7 - positiven Satellitenzelle im Muskelgewebe existierten. Die weitere Untersuchung dieser Zellen ist daher von Bedeutung.

Als Kontrollversuch galt die Charakterisierung von myogenen Regulationsfaktoren während des Differenzierungsprozesses der isolierten Satellitenzellen zu proliferierenden Myoblasten und anschließend zu Myotuben. Wie in der Literatur am murinen Modell bekannt, konnte gezeigt werden, dass die MRFs auch in humanen Muskelzellen eine Schlüsselrolle während der Differenzierung spielen. Es ließ sich auch hier darstellen, dass Myf5 sein Expressionsmaximum in proliferierenden Myoblasten hat, während die späteren MRFs MyoD und Myogenin erst im Stadium der fusionierten Myotuben ausgeprägt werden.

Mit Fortschreiten der Differenzierung konnte außerdem ein Anstieg der Expression von MHC beobachtet werden.

5 Diskussion

5.1 Methodendiskussion

5.1.1 Isolationsmethode

Die außergewöhnliche Regenerationsfähigkeit von Skelettmuskulatur wurde 1964 von Studitsky präsentiert, der zeigte, dass sich das Gewebe nach völliger Zerstörung wieder regenerieren kann [39]. Diese Fähigkeit geht hauptsächlich von einer Population von undifferenzierten mononukleären Zellen aus, die unterhalb der Basallamina, die jede einzelne Muskelfaser umgibt, gelegen sind und aufgrund dieser anatomischen Lage Satellitenzellen genannt werden [17]. Die ersten Ansätze zur Identifizierung von Satellitenzellen konnten aufgrund dieser anatomisch beschriebenen Lage mithilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen erzielt werden. Diese Methode ist technisch schwierig und aufwendig. Weiterhin können wegen der notwendigen Fixierung die Satellitenzellen nicht mehr in ihrer physiologischen Funktion beobachtet werden [34].

Zwei Methoden zur Isolation von Satellitenzellen haben sich in den letzten Jahren durchgesetzt [40]. Dazu zählen erstens die mechanische Zerkleinerung mit anschließendem enzymatischen Verdau und zweitens die Isolation von einzelnen Muskelfasern.

In dieser Promotionsarbeit wurde von beiden Methoden Gebrauch gemacht. Während die enzymatische Isolation von Myoblasten eine in unserem Labor gut etablierte Methodik ist, musste die Isolation von einzelnen humanen Muskelfasern erst etabliert werden.

Anlehnend an das Isolationsprotokoll von Collins und Zammit [38] wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit ein Weg etabliert, der es erlaubte, Muskelfasern nach enzymatischem Andau mechanisch zu isolieren. Im Rahmen dieser Experimente wurde jedoch festgestellt, dass der enzymatische Andau für humanes Gewebe ungeeignet ist, da es sofort zu einer Desintegration des Gewebes kommt. Dieses neu entwickelte Protokoll beinhaltet deshalb eine rein mechanische Präparation.

Die Muskelfasern wurden direkt nach Entnahme der Muskelbiopsie mithilfe eines Präparationsmikroskops und feinen Pinzetten und Nadeln präpariert. Die sehr geringe Ausbeute von ungefähr 10 - 20 Fasern pro Muskelbiopsie zeigt, dass diese Isolationsmethode sehr aufwendig ist. Es konnte beobachtet werden, dass humane Muskelfasern sehr empfindlich gegenüber äußeren Stresseinfluss reagieren. Vor allem während der Präparation resultierte ein vermehrter Zug an der Muskelfaser in einer Hyperkontraktion wie es auch schon von Bonavaud

et al. [41] beschrieben wurde. Dies führt zu einer Schädigung der Muskelfaser, die danach nicht mehr zur Kultivierung verwendet werden kann.

Trotzdem zeigte sich diese Methode als vorteilhaft bei der Charakterisierung von Satellitenzellen in ihrer anatomisch gegebenen Lokalisation.

Zum Vorteil ist dabei, dass nur eine geringe Menge an Muskulatur für die Präparation einzelner Muskelfasern benötigt wird, sodass eventuell auch Untersuchungen an Patienten mit myopathischen Muskelerkrankungen durchgeführt werden können [41]. Dies zeigte sich gerade für diese Promotion sehr vorteilhaft. Es konnten sowohl Patienten mit gesunder Muskulatur als auch Patienten, die zur weiteren Diagnostik in der Hochschulambulanz für Muskelerkrankungen vorstellig wurden, in die Versuche mit einbezogen werden. Auf diese Weise konnten ebenfalls erste Aussagen über eventuelle Unterschiede in der Expression von Satellitenzellmarkern in gesunder und potenziell erkrankter Muskulatur gemacht werden.

Es wurde gesehen, dass das Expressionsmuster von Satellitenzellmarkern in beiden Patientengruppen keinen Unterschied zeigte.

5.1.2 Immunzytochemie

Zur Charakterisierung der isolierten Satellitenzellen wurden vor allem immunzytochemische Techniken gewählt. Durch diese Methodik ist es möglich, Untersuchungen auf Einzelzellniveau durchzuführen. Dies ist eine gute Voraussetzung, um bestimmte Zellen in heterogenen Zellgemischen zu identifizieren und zu charakterisieren.

Gerade für diese Arbeit war es nicht nur von großer Bedeutung die einzelnen Zellen zu detektieren, sondern außerdem Aussagen über die charakteristische Lokalisation von Antigenen machen zu können, d.h. beurteilen zu können, in welchen zytoplasmatischen Strukturen das untersuchte Antigen exprimiert wird. Pax7 zeigte beispielsweise eine zellkernzentrierte Expression, während c-Met und auch CXCR4 im Zytoplasma lokalisiert werden konnten.

Ein weiterer Vorteil zeigt sich in der Möglichkeit, dass während einer Färbung mehrere Antigene nachgewiesen werden können, indem zwei unterschiedliche Antikörper auf die zu färbenden Zellen gegeben werden. Hierdurch kann beurteilt werden, ob in einer Zelle eventuell mehrere Antigene exprimiert werden. Dies war besonders wichtig im Hinblick auf die Charakterisierung von Satellitenzellen in dieser Arbeit.

Die Immunhistochemie wie hier durchgeführt hat auch Einschränkungen. Es wurde sich zunächst auf die Satellitenzellmarker konzentriert, die aus Mausmodellen bekannt sind, allerdings gab es nur begrenzten Zugang zu Antikörpern, die ausdrücklich für Untersuchungen im humanen Gewebe geeignet waren. Es lässt sich nicht ausschließen, dass ein Teil der

negativen Ergebnisse durch ungeeignete Antikörper zu erklären ist. So wurde z.B. zur Quantifizierung der Populationen auch an FACS - Analysen gedacht, jedoch dafür keine geeigneten Antikörper gefunden.

Die Immunhistochemie erlaubt eine Quantifizierung bezüglich positiver und negativer Zellen, aber keine in Hinblick auf die Signalintensität. Dazu ist auf Proteinebene der Westernblot, auf mRNA Ebene die quantitative TaqMan RTPCR geeignet. Westernblot Analysen wurden z.B. für MyoD durchgeführt. Dafür waren die Myoblasten allerdings einige Tage proliferierend in Kultur gehalten worden. Aus frisch isolierten Muskelfasern mit einem Satellitenzellanteil von ungefähr 3% der Gesamtmyonuclei konnte mit keiner zur Verfügung stehenden Methode Satellitenzellmarker auf Protein - oder mRNA Ebene quantifiziert werden. Single Cell RT PCR zum Beispiel für einzelne Purkinjezellen wurde kürzlich beschrieben [42], allerdings war eine Übertragung auf die humane Satellitenzelle im Rahmen einer medizinischen Promotion nicht durchführbar.

5.2 Ergebnisdiskussion

5.2.1 Pax7 als Satellitenzellmarker

Der Transkriptionsfaktor Pax7 spielt wie in der Einleitung näher erläutert eine sehr kritische Rolle in der Selbsterneuerung und dem Erhalt von Satellitenzellen. Dieses Antigen ist sowohl in Versuchen mit murinen als auch mit humanen Satellitenzellen gut etabliert. In murinen Versuchen werden oft junge erwachsene Mäuse verwendet [36, 40, 43]. Mit einem Durchschnittsalter von 60,3 Jahren konnte in dieser Promotionsarbeit die Expression von Pax7 in gealterten Muskelfasern charakterisiert werden.

In murinen Modellen sind viele unterschiedliche Versuche zur Pax7 - Expression in Satellitenzellen und deren Abkömmlingen, den Myoblasten, durchgeführt worden. Bekannte Studien dazu führte Seale et al. im Jahre 2000 durch [20]. Auf der Basis von Northern Blot Analysen wurde die Expression von Pax7 in verschiedenen Geweben und Zelllinien untersucht. Pax7 - mRNA konnte außerdem in Satellitenzellen, proliferierenden Myoblasten, sowie in C2C12 - Zellen nachgewiesen werden. C2C12 - Zellen sind eine murine Myoblastenzelllinie, die häufig für Versuche an Myoblasten verwendet wird.

Wie auch in unterschiedlichen Studien [16, 29] wurde in dieser Arbeit das Pax7 durch immunhistochemische Färbungen nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass dieser Transkriptionsfaktor nur in quieszenten Satellitenzellen und früh aktivierten Zellen

nachgewiesen werden kann. Mit Fortschreiten des Differenzierungsprozesses wird die Pax7 - Expression herunterreguliert und durch das Auftreten der MRFs abgelöst.

Unabhängig vom Alter der Zellen zeigt sich Pax7 also als potenter Marker zur Identifizierung von Satellitenzellen in humaner Muskulatur.

5.2.2 Veränderung des prozentualen Anteils der Pax7 - positiven Satellitenzellen mit Zunahme des Alters

Der Alterungsprozess der Skelettmuskulatur kann sowohl mit Abnahme der Muskelmasse, der Kraft aber auch der Ausdauerfähigkeit assoziiert werden. Diese altersabhängigen Veränderungen konnten in unterschiedlichen Studien an murinen Modellen gezeigt werden [44, 45]. Mit Zunahme des Alters der Muskulatur kommt es zum einen zur Abnahme, aber auch zu vermehrten Anzeichen von Atrophie in den Muskelfasern [46]. Die Regeneration der Muskelfasern geht von den Satellitenzellen aus, die durch äußere Einflüsse wie Muskelaktivität oder Muskelfaserverletzungen aktiviert werden können [47]. Altersbedingten Veränderungen der Muskulatur scheinen sowohl durch einen Verlust an Satellitenzellen als auch durch Veränderungen in der Satellitenzellnische beeinflusst zu sein. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass die Regenerationsfähigkeit der Muskulatur nicht vollständig mit Zunahme des Alters verschwindet [45, 48].

Die Anzahl der Satellitenzellen ist weniger von der Art, sondern mehr vom Alter der Muskulatur abhängig. In der Maus beträgt der prozentuale Anteil der Satellitenzellen ungefähr 30% bei Geburt und sinkt auf 4% in der erwachsenen und 2% in der senilen Maus [13]. In [49] wurde gezeigt, dass, der prozentuale Anteil der Satellitenzellen in humaner Muskulatur besonders in Typ II Fasern mit Zunahme des Alters der Probanden von einem Mittelwert von $2,9\% \pm 0,4\%$ bei jungen Patienten auf einem Mittelwert von $1,5\% \pm 0,2\%$ bei älteren Patienten sinkt.

Während dieser Promotionsarbeit konnte daran angelehnt nachgewiesen werden, dass der prozentuale Anteil humaner Satellitenzellen zur Gesamtheit der faserassoziierten Zellkerne mit Zunahme des Alters der Patienten abnimmt.

Es wurden sowohl Muskelbiopsien von Patienten mit neuromuskulären Erkrankungen als auch von gesunden Patienten verwendet. Wie anfänglich angenommen, zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl von Satellitenzellen zwischen kranker und gesunder Muskulatur.

In der Literatur wird diese prozentuale Abnahme von Satellitenzellen mit Zunahme des Alters sehr kontrovers diskutiert. Während einige Arbeitsgruppen ähnlich den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit beobachten konnten, dass sich der prozentuale Anteil der Satellitenzellen mit

Zunahme des Alters verringert [45, 49, 50], scheinen andere diese Hypothese nicht zu unterstützen [51].

Es stellt sich die Frage, ob es wirklich im Laufe des Alters zu einem Verlust von Satellitenzellen kommt, oder ob es eventuell eher zu einer Zunahme der intrasarkolemmalen Zellkerne insgesamt kommt und sich damit nur das Verhältnis zwischen Satellitenzellen und der übrigen faserassoziierten Zellkerne ändert.

In Charlotte A. Collins, Peter S. Zammit et al. [48] wird aufgeführt, dass sich die Anzahl der Pax7 - positiven Zellen zwar mit Zunahme des Alters verringert, diese aber quantitativ durch Zellen ersetzt werden, die keine myogenen Marker exprimieren. Diese Beobachtung könnte eventuell die oben gestellte Frage beantworten, muss allerdings noch durch weitere zukünftige Versuche verifiziert werden.

In dieser Veröffentlichung wird außerdem die These aufgestellt, dass die Menge an Satellitenzellen im Alter zwar abnimmt, sie allerdings nie vollständig verschwunden sein werden. Es wird davon ausgegangen, dass zeitlebens ein kleiner Teil von Satellitenzellen in der Muskelfaser vorhanden sein wird, der das Regenerationspotenzial der Muskulatur aufrecht halten kann.

In dieser Promotionsarbeit waren die beiden ältesten Patienten 80 und 76 Jahre alt. Mit einem prozentualen Anteil von Satellitenzellen von 1,9% und 0,4% bildeten sie die niedrigsten Werte der Vergleichsgruppe. Im Hinblick auf die oben aufgestellte These wirken diese Daten unterstützend, da keine Muskelbiopsien gesehen wurden, in der keine Satellitenzellen identifiziert werden konnten.

So lässt sich auch mit den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit die These unterstützen, dass zwar der prozentuale Anteil der Satellitenzellen mit Zunahme des Alters abnimmt, es aber eine kleine Zellpopulation gibt, die das Regenerationspotenzial der Muskulatur aufrecht erhalten kann.

5.2.3 Expression von c-Met und CXCR4

HGF ist ein Wachstumsfaktor und zeigt sich essenziell in der Bedeutung für unterschiedliche Gewebe. Es hat einen wichtigen Einfluss auf die Aktivierung von Hepatozyten während der Entwicklung der Leber und soll außerdem in der Proliferation von renalen Tubuluszellen involviert sein [52].

Jennische et al. [53] beobachteten 1993 als erste Gruppe, dass HGF - mRNA in regenerierender Skelettmuskulatur identifiziert werden kann. Im Zusammenhang damit konnte außerdem nachgewiesen werden, dass HGF und sein Rezeptor c-Met in der Entwicklung der Extremitätenmuskulatur eine wichtige Rolle einnimmt [1, 8, 18].

In der genetischen Hierarchie über *c-Met* gelegen ist das *Pax3*, das die Expression von *c-Met* reguliert. Dies konnte anhand von *Pax3*-mutanten Mäusen (*Spotch*-Mäusen) verifiziert werden, bei denen weder eine *Pax3* noch *c-Met*-Expression nachgewiesen werden konnte. Bei diesen Mäusen konnte beobachtet werden, dass die Extremitätenanlagen während der Entwicklung nicht von Muskelvorläuferzellen besiedelt werden und sich keine Skelettmuskulatur ausbildet [8, 9].

Es werden gegenwärtig unterschiedliche Rollen für HGF diskutiert. Eingeschlossen werden können dabei eine Funktion als potenter chemotaktischer Faktor, ein Aktivator für Satellitenzellen und auch ein Inhibitor für die Differenzierung von Myoblasten durch Interaktionen mit den MRFs MyoD und Myogenin [13].

Studien zeigen, dass HGF und sein Rezeptor *c-Met* sowohl in quieszenten als auch aktivierten murinen Satellitenzellen lokalisiert werden können [13, 54]. Im Gegensatz zu Fibroblasten, in denen diese beiden Faktoren nicht nachgewiesen werden konnten [55].

In dieser Arbeit sollte beobachtet werden, ob *c-Met* auch in quieszenten humanen Satellitenzellen exprimiert wird. Nach Isolation von einzelnen humanen Muskelfasern wurde mithilfe einer immunhistochemischen Färbung die Expression von *c-Met* beobachtet. Es zeigten sich Zellen mit einem positiven Signal für *c-Met*. In Kombination mit einer *Pax7*-Färbung konnte allerdings gesehen werden, dass diese Zellen nicht zur gleichen Zellpopulation wie die *Pax7*-Satellitenzellen gezählt werden konnten, da die *c-Met*-positiven Zellen nicht gleichzeitig auch den Transkriptionsfaktor *Pax7* exprimierten.

Diese Ergebnisse weichen von dem Expressionsmuster von *c-Met* ab, dass in der Studie von Pawlikowski et al. [31] beobachtet wurde. Hier zeigte sich sowohl in fetaler als auch in adulter humaner Muskulatur eine Koexpression von *Pax7* und *c-Met*. Gründe für diese unterschiedlichen Beobachtungen können zum einen im Alter der verwendeten Muskulatur gesucht werden. Im Gegensatz zu der in Pawlikowskis Studie, wurde in dieser Promotionsarbeit hauptsächlich mit Muskelfasern aus älteren erwachsenen Patienten gearbeitet. Es scheint möglich, dass *c-Met*, dass eine wichtige Rolle gerade in der fetalen Muskelentwicklung spielt, eventuell im Laufe des Lebens von älteren Satellitenzellen nicht mehr exprimiert wird.

Wichtiger Unterschied zeigt sich allerdings auch in der Auswahl der Muskeln. In Pawlikowskis Studie wurde die adulte Muskulatur aus dem *M. sternocleidomastoideus* gewonnen, während in dieser Promotionsarbeit hauptsächlich der *M. vastus lateralis* verwendet wurde. Eventuelle Unterschiede in der Faserzusammensetzung können dadurch auch einen Einfluss auf das Expressionsmuster von *c-Met* haben.

Zum anderen besteht die Möglichkeit dass die c-Met - positiven Zellen, die in dieser Promotionsarbeit identifiziert werden konnten eine andere Zellpopulation an Muskelvorläuferzellen bilden, die unabhängig von der Pax7 - Satellitenzelle in der Muskulatur vorhanden ist.

Ein weiterer Grund für die fehlende Koexpression von c-Met und Pax7 kann eine zu geringe Proteinmenge an c-Met darstellen, sodass es durch eine immunhistochemische Färbung nicht detektiert werden konnte. Dies kann sowohl durch ein Fehlen des Antigens, durch Instabilitäten des Antigens oder aber auch einfach durch das Fehlen eines geeigneten Antikörpers gegen das Protein zustande kommen. Da innerhalb der gleichen Faser aber Zellen nachgewiesen werden konnten, die ein Expressionsmuster für c-Met aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass der verwendete Antikörper und auch das Protokoll zur immunhistochemischen Färbung geeignet waren.

Eine andere Möglichkeit wäre außerdem, dass c-Met nicht von quieszenten sondern erst nach Aktivierung der Satellitenzellen exprimiert wird.

Diesen Hypothesen sollte in zukünftigen Studien noch weiter nachgegangen werden.

Ähnlich präsentierten sich auch die Ergebnisse zur Charakterisierung der CXCR4 - Expression von humanen Satellitenzellen. Es konnten Zellen identifiziert werden, die eine CXCR4 - Expression aufwiesen. Diese befanden sich zum größten Teil außerhalb der Basallamina. Auch eine Koexpression mit dem Satellitenzellmarker Pax7 konnte nicht nachgewiesen werden. Cerletti et al. [15] konnten mithilfe von FACS - Analysen eine CXCR4 - positive Subpopulation von murinen Muskelvorläuferzellen isolieren, die ein großes Regenerationspotenzial zeigten. Diese Zellen waren in der gleichen anatomischen Lokalisation wie die Satellitenzellen unterhalb der Basallamina zu finden. In einer Kofärbung mit Pax7 konnte außerdem beobachtet werden, dass ungefähr 80% der Pax7 - positiven Zellen außerdem eine CXCR4 - Expression aufwies. Auch in Pawlikowskis Studie wurde an humanen Kryogewebeschnitten eine CXCR4 - Expression von Zellen, die am Rand einer Faser lokalisiert waren, identifiziert [31]. Allerdings wurde hier auf die schlechte Integrität gerade adulter Muskulatur hingewiesen, die die Auswertung erschwerte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es bei der Charakterisierung von Satellitenzellen durch die Oberflächenantigene c-Met und CXCR4 noch keine Übereinstimmung in wissenschaftlichen Studien gibt.

Es stellt sich die Frage, ob die unterschiedlichen Beobachtungen und Auswertungen eventuell doch anzeigen, dass die Daten aus murinen Modellen nicht direkt auf humane Satellitenzellen

übertragen werden können. Vielmehr scheint das Expressionsmuster von humanen Satellitenzellen sehr komplex und heterogen zu sein.

5.2.4 Myogenes Potenzial von Satellitenzellen *in vitro*

Es konnte in dieser Promotionsarbeit gezeigt werden, dass die in den humanen Muskelfasern isolierten Satellitenzellen auch *in vitro* ihr Potenzial zur Proliferation und Differenzierung nicht verloren haben. Nach 6 d ließen sich zwar lichtmikroskopisch noch keine aus der Muskelfaser ausgewachsenen Myoblasten erkennen, es konnten aber immunhistochemisch Zellen innerhalb der Muskelfaser identifiziert werden, die eine Expression von Desmin aufwiesen. Wenige Stunden bis Tage später konnten diese neuen Zellen auch lichtmikroskopisch nachgewiesen werden. Nach einigen Wochen in Kultur zeigten sich sogar Hunderte von neuen Myoblasten, die weiter zu reifen Myotuben differenzierten.

Im Vergleich zu in der Literatur bekannten Angaben ließen sich die ersten Myoblasten allerdings erst zu einem späteren Zeitpunkt identifizieren. In Versuchen mit murinen Muskelfasern konnten erste auswachsende Zellen bereits nach ungefähr 72 h beobachtet werden [40, 56].

Eine Erklärung für diesen Zusammenhang könnte die in dieser Promotionsarbeit fehlende enzymatische Vorbehandlung der Muskelbiopsien vor der Präparation der einzelnen Muskelfasern sein.

Durch die enzymatische Behandlung kommt es zum Verdau bindegewebiger Strukturen. Allerdings scheint es auch möglich, dass die Satellitenzelle durch diese Prozedur aus ihrer anatomischen Umgebung entfernt wird, welche eine wichtige Rolle in der Funktion dieser Zellpopulation einnimmt. Es wurde gezeigt, dass gerade aus der Satellitenzellnische sowohl inhibierende als auch aktivierende Einflüsse auf die Satellitenzelle einwirken und deren Regenerationsverhalten regulieren [47, 57]. Mit Fehlen dieser Umgebung kann es zu einer frühzeitigen Aktivierung der Satellitenzellen kommen, die nun wiederum in den Zellzyklus und den weiteren Differenzierungsprozess einsteigen.

Durch Fehlen dieser enzymatischen Behandlung kommt es nun erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Aktivierung der isolierten Satellitenzellen.

Dies zeigt, dass es durch eine rein mechanische Isolation von Satellitenzellen möglich ist, diese in ihrer anatomischen Umgebung innerhalb der Satellitenzellnische zu isolieren. Dies stellt eine wichtige Voraussetzung für Versuche an der quieszenten Satellitenzelle.

5.2.5 Heterogenität von Satellitenzellen

Die historische, rein anatomische Identifizierung von Satellitenzellen zeigt keine Heterogenität, sondern charakterisiert jede mononukleare Zelle zwischen Basallamina und Plasmamembran der Muskelfaser liegend, als Mitglied dieser Population. In verschiedenen Studien wurde allerdings die Möglichkeit aufgezeigt, dass Satellitenzellen eventuell eine gewisse Heterogenität aufweisen könnten.

In „*All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others?*“ [58] wurden zwei unterschiedliche Modelle zur Selbsterhaltung des Satellitenzellpools beschrieben.

Diese beiden Modelle sind in der folgenden Abbildung dargestellt:

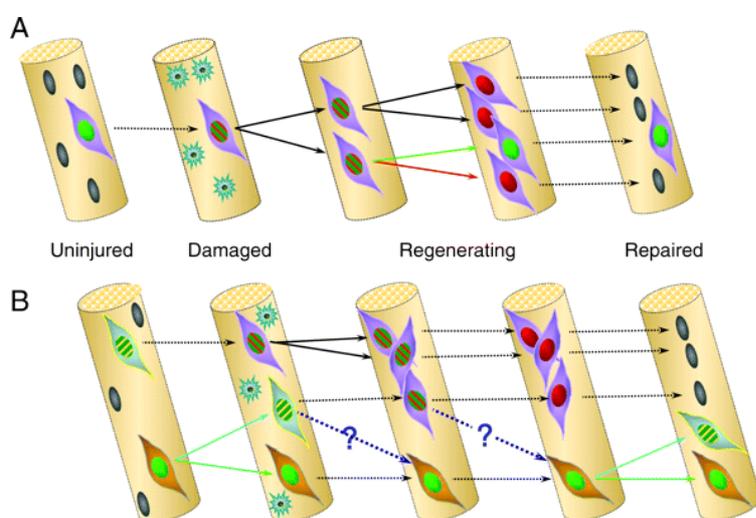


Abbildung 15: Heterogenität von Satellitenzellen. Zwei mögliche Methoden zur Satellitenzellerneuerung (Zammit et al. 2008).

Werden quieszente Pax7-positive Satellitenzellen (grüner Kern) durch physiologisch einwirkenden Stress wie z.B. Verletzungen der Muskelfasern, aktiviert, kommt es zu einer Koexpression mit MyoD (grün-roter Kern) als Zeichen der beginnenden Regenerierung. Die dabei neu-entstehenden Myoblasten unterziehen sich multiplen Teilungen. Der Großteil der Myoblasten reguliert außerdem die Expression von Pax7 unter Aufrechterhaltung der MyoD-Expression herunter und differenziert zu reifen Myotuben. Ein kleiner Teil der Zellen hält allerdings die Pax7-Expression bei, reguliert MyoD herunter und verlässt wieder den Zellzyklus. Diese Zellen sind wichtig für die Selbsterneuerung der Satellitenzellen (grüner Kern) (Abbildung A).

Abbildung B zeigt dagegen zwei unterschiedliche Pax7-positive Zellen. Eine Zelle weist eine Koexpression mit dem Transkriptionsfaktor Myf5 auf (grün-gelber Kern), während die andere

wiederum nur Pax7 exprimiert und eine Myf5 - Negativität aufweist (grüner Kern). Im Laufe des Regenerationsprozesses entwickelt sich aus der Pax7/Myf5 - positiven Zelle ein Pax7/MyoD - positiver Myoblast (grün - roter Kern), der anschließend proliferiert, Pax7 herunter reguliert und differenziert. Im Gegensatz dazu zeigt die Pax7 +/Myf5 - Zelle (grüner Kern) eine asymmetrische Teilung. Aus ihr entwickeln sich entweder neue Pax7 +/Myf5 - negative Zellen zur Aufrechterhaltung der Satellitenzellpopulation oder eine Pax7/Myf5 - positive Zelle (grün - gelber Kern), der ebenfalls in den Regenerationsprozess einsteigt [58].

Während *Zammit* hier beschrieb, dass es unterschiedliche Populationen von Satellitenzellen während des Regenerationsprozesses zu geben scheint [58], lässt sich eine eventuelle Heterogenität von Satellitenzellen in dieser Promotionsarbeit im Bezug auf die Expression unterschiedlicher Satellitenzellmarker erkennen. Wie in 4.3 und 4.4 dargestellt, konnte die Expression von c-Met und CXCR4, die in der Literatur zu der Gruppe der Satellitenzellmarker gezählt werden, in den in dieser Arbeit identifizierten Satellitenzellen nicht nachgewiesen werden. Vielmehr zeigte sich, dass die Pax7 - positive Satellitenzelle und die Zellen, die eine Expression von c-Met und CXCR4 aufwiesen zwei unterschiedliche Populationen von Muskelvorläuferzellen darstellten.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch von anderen Forschungsgruppen gemacht werden, sodass es noch keinen Konsens zu definitiven Satellitenzellmarkern zu geben scheint.

Während Einigung darüber besteht, dass Pax7 von der Mehrheit der Satellitenzellen exprimiert wird [20], ließen sich allerdings auch Marker identifizieren, die nur einen Teil dieser Zellpopulation detektiert. Beispiele dafür sind das CD34, das M - Cadherin, das beta -1 -Integrin, das CXCR4 oder auch der Transkriptionsfaktor Myf5 [15, 21, 59].

So scheint es möglich, dass eventuell auch die in dieser Arbeit unterschiedlichen Zellpopulationen zur Gruppe der Muskelvorläuferzellen gezählt werden können. Es muss allerdings noch in zukünftigen Versuchen vermehrt auf den Differenzierungsprozess dieser Zellen eingegangen werden.

5.3 Bedeutung der Satellitenzellen für die Medizin

Schon vor einigen Jahren konnte beobachtet werden, dass kultivierte Myoblasten die Dystrophinexpression in dystrophindefizienten Mäusen (*mdx* - Mäusen) ersetzen können [60]. Obwohl Myoblasten in vielen verschiedenen klinischen Studien verwendet wurden, scheint es allerdings immer noch viele Hürden zu geben, die die Anwendung von Myoblasten zur Stammzelltherapie behindern. Die wichtigsten Probleme sind 1.) Abstoßungsreaktionen des

Empfängers, 2.) verringerte Überlebenszeit der transplantierten Zellen und 3.) fehlende Migration der Zellen nach intramuskulärer Injektion.

Einige aktuellere Studien deuten an, dass sowohl frisch isolierte Satellitenzellen als auch einzelne Muskelfasern, bei denen die Satellitenzellen noch in ihrer anatomischen Lage identifiziert werden können, effizient in transplantierte Muskulatur einwachsen können und neue Satellitenzellen produzieren [47, 59, 61]. Im Gegensatz zur Transplantation von isolierten Myoblasten, wird von frisch isolierten Satellitenzellen eine viel geringere Anzahl benötigt. So wurde zum Beispiel gesehen, dass nur eine einzige Muskelfaser mit ungefähr 7 - 8 Satellitenzellen in *mdx*-Mäusen hunderte von Dystrophin - enthaltenden Muskelfasern wiederherstellen konnte [47].

Die Verwendung von Satellitenzellen zur Stammzelltherapie bei Muskeldystrophien wie der Muskeldystrophie Duchenne könnte die Lebensqualität und eventuelle Lebenserwartung dieser Patienten stark verbessern. Die Transplantationserfolge der *mdx* - Mäuse lassen sich bisher nicht vollständig auf den Menschen übertragen. Es gibt viele Fragen, die die medizinische Anwendung dieser muskulären Stammzellen einschränken: Warum migrieren transplantierte Satellitenzellen nicht nach intramuskulärer Injektion? Warum sind faserassoziierte Satellitenzellen geeigneter als kultivierte Myoblasten? Welche genaue Rolle spielt die Satellitenzellnische in der Interaktion der Satellitenzelle mit anderen muskulären Zellen? Gerade für genauere Informationen zur Interaktion der Satellitenzelle mit anderen Zellen ist eine genaue Charakterisierung von Bedeutung. Durch genaue Analysen der Antigenexpression von humanen Satellitenzellen ist es damit eventuell möglich synergistische Effekte zwischen verschiedenen Zellen innerhalb des menschlichen Organismus zu nutzen und die Stammzelltherapie mit muskulären Satellitenzellen zu optimieren.

5.4 Resümee

Zur erfolgreichen Anwendung von Satellitenzellen zur Stammzelltherapie müssen noch Fragen zur molekularen Regulation, der Proliferation, der Selbsterneuerung und Differenzierung dieser Zellen geklärt werden. Jeder dieser Schritte ist sowohl auf intrinsische als auch auf extrinsische Signale angewiesen. Gerade die extrinsischen Signale aus der Satellitenzellnische scheinen einen großen Einfluss auf die Stammzellfunktion von Satellitenzellen zu haben [62, 63].

Aus diesem Grund ist es wichtig, eine Isolationsmethode zu etablieren, die der Satellitenzelle eine Umgebung schafft, die der intramuskulären sehr ähnlich ist.

Dieser Schritt konnte mit der mechanischen Isolation von einzelnen Muskelfasern in dieser Promotionsarbeit erzielt werden. Bei dieser Methodik bleibt die Satellitenzelle in ihrer anatomischen Lokalisation zwischen Basallamina und Plasmamembran. Außerdem kommt es nicht durch vorherige enzymatische Behandlung zu einer eventuellen Aktivierung der Zelle oder Veränderung der Zelloberfläche durch eventuelle Reaktionen mit den verwendeten Enzymen.

Die meisten Erkenntnisse über die Satellitenzelle basieren auf murinen Modellen. Die Charakterisierung von humanen Satellitenzellen zeigt sich aktuell noch als Herausforderung für die Wissenschaft. Die Verfügbarkeit von humanem Muskel ist sehr begrenzt.

Weiterhin lassen sich in dieser Arbeit Hinweise finden, dass humane Satellitenzellen sich von ihren Maus - Analoga in verschiedenen Aspekten unterscheiden, die noch im Detail zu charakterisieren sind.

Auch die Auswahl an Satellitenzellmarkern stellt bei der Isolation von humanen Satellitenzellen eine große Herausforderung. Wie in der Einleitung unter 1.2.2 erwähnt, sind heutzutage sehr viele potente Antigene bekannt, die die murine Satellitenzelle charakterisieren. Leider gibt es für humane Zellen noch keine definitive Übereinstimmung über deren Antigenexpressionsmuster, so dass es viel Zeit in Anspruch nimmt, einen geeigneten Marker zur Identifizierung von humanen Satellitenzellen zu definieren.

In dieser Promotionsarbeit zeigte sich Pax7 als potentester Satellitenzellmarker.

Eine wichtige Aufgabe für zukünftige Versuche mit humanen Satellitenzellen stellt dabei die fortführende Charakterisierung ihrer Oberflächenproteine. Es muss untersucht werden, ob sich die Antigenexpression von murinen Zellen auch auf humane Zellen übertragen lässt oder ob doch eventuelle Unterschiede aufgezeigt werden können.

In dieser Promotionsarbeit wurde gesehen, dass es eventuelle Unterschiede zu murinen Zellen zu geben scheint. Wie aber unter 5.2.3 beschrieben, kann es für die abweichende Expression von Antigenen auch andere Gründe geben. In weiteren Studien sollte vermehrt auf die Antigenexpression von humanen Satellitenzellen und deren Proliferationseigenschaften eingegangen werden, um die Verwendung dieser Zelle zur Stammzelltherapie zu optimieren.

6 Zusammenfassung

Satellitenzellen garantieren die Regeneration des Skelettmuskels bis ins hohe Alter. Diese Zellen sind genuine Muskelstammzellen und in einer besonderen anatomischen Nische lokalisiert, nämlich zwischen Basalmembran und Sarkolemma der einzelnen Muskelfaser. Auf Proteinebene sind diese Zellen durch Expression des Transkriptionsfaktors Pax7 sowie der Marker c-Met und CXCR4 charakterisiert, ein Wissen, das wir im Wesentlichen aus Mausmodellen erworben haben. Da sich besondere Hoffnungen an diese muskelspezifische Stammzellpopulation in Bezug auf Therapien von Muskeldystrophien oder Inaktivitäts-induzierte Muskelatrophie knüpfen, wurde in dieser Arbeit Charakterisierung und Differenzierung von humanen Muskelstammzellen erstmals systematisch untersucht.

Aus der Hochschulambulanz für Muskelkrankheiten der Charité und durch eine Kooperation mit der Klinik für Orthopädie des HELIOS - Klinikums Berlin, Buch haben wir 24 Skelettmuskelproben erhalten, durch die eine Charakterisierung von humanen Muskelstammzellen vorgenommen werden konnte. Aus diesem Gewebe wurden Einzelfasern isoliert zur Darstellung von Satellitenzellen im physiologischen und anatomischen Kontext. Zur Durchführung dieser Isolation wurde eine Methode etabliert, die es erlaubte, humane Muskelfasern auf rein mechanische Weise zu gewinnen.

Es wurden außerdem Einzelzellsuspensionen angefertigt zur Anfärbung nach Cytospin-Fixierung oder Weiterdifferenzierung in Kultur, sowie in Kryostatschnitten immunhistochemische Färbungen für Pax7, c-Met, CXCR4 und den Differenzierungsmarkern Myf5, MyoD, Myosin-Schwerekette (MHC), Myogenin und Desmin, durchgeführt.

Pax7 konnte als zuverlässiger Marker einer Zellpopulation identifiziert werden, der Myonuclei in der Satellitenzellnische anfärbt, und wurde daher als Marker humaner Satellitenzellen bestätigt.

Altersabhängig zeigte sich eine Abnahme des Anteils Pax7 - positiver Zellen mit einem Median von 3,597% in der Altersgruppe unter 50 Jahre auf einen Median von 2,239% in einer Altersgruppe über 70 Jahre.

Wenn Muskelfasern im physiologischen Kontext kultiviert wurden, konnten aus Muskelfasern auch hochbetagter Donoren Satellitenzellen aktiviert werden und hunderte von Myoblasten auswachsen. Diese Zellen zeigten das komplette myogene Potenzial (Expression von MHC, Desmin). Die aus der Maus bekannten Satellitenzellmarker CXCR4 und c-Met haben im menschlichen Muskel keine durch Pax7 definierte Zellpopulation charakterisiert und sind zur Untersuchung humanen Materials ungeeignet.

Es kann gefolgert werden, dass Skelettmuskel auch hochbetagter Probanden durch Satellitenzellen ein enormes Regenerationspotenzial besitzt. Humane Satellitenzellen müssen allerdings separat von Nagetier - Modellen betrachtet werden. Das Wissen um das Regenerationspotenzial von humanem Skelettmuskel kann Therapiekonzepte für Muskeldystrophien entscheidend beeinflussen.

7 Summary

Satellite cells guarantee the regeneration of skeletal muscle until old age. They are genuine muscle stem cells that are localized in a characteristic anatomic localization between basal lamina and sarkolemma of each muscle fiber. On protein level they are characterized by their expression of the transcription factor Pax7 and different other markers like c-Met and CXCR4. Most of our knowledge is based on studies with mouse models.

Due to their availability and remarkable capacity to regenerate damaged muscle, satellite cells are considered potential candidates for cell-based therapies to treat muscular dystrophies and other neuromuscular diseases. To improve our knowledge about those muscle stem cells, human satellite cells were first systematically characterized in this study.

We obtained 24 muscle samples from the ambulance for muscle diseases at Charité, Berlin and due to a cooperation with the orthopaedic department of HELIOS - Klinikum Berlin, Buch. Immediately after surgery, single muscle fibers were primed to extract satellite cells in their typical anatomical localization. In difference to well known enzymatic methods to isolate single muscle fibres we established a method with just a mechanical preparation. Also, we worked with cell suspensions and cryo muscle sections of human muscle and cell culture to observe the differentiation of satellite cells into mature myotubes. To investigate the expression of human muscle stem cell markers, immunohistochemistry was performed for Pax7, c-Met, CXCR4, differentiation markers like Myf5, MyoD, Myosin – heavy – chain, Myogenin and Desmin.

Pax7 was shown to be the most potent marker to identify satellite cells in their anatomical niche. The amount of satellite cells in percent decreases with age from a median of 3,597% in patients younger than 50 years to a median of 2,239% in patients older than 70 years. Culturing human muscle fibres showed that satellite cells from older patients were also able to give rise to newly formed myoblasts which contain the whole myogenic potential of regeneration (expression of Desmin and MHC). In difference to the knowledge of murine models satellite cell markers c-Met and CXCR4 did not show a coexpression with our satellite cell marker Pax7 and are not suitable for characterising human muscle material.

It can be reasoned, that human satellite cells of older patients possess the same regeneration potential as satellite cells of younger probands. But it is important to examine human satellite cells separately to murine satellite cells since first differences were shown. It is important to learn about the regeneration potential in human satellite cells since this knowledge can have an impact of future therapy concepts in treating muscle disease.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
bHLH	basic-helix-loop-helix
BSA	bovines Serum Albumin
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CXCR4	CXC-Chemokinrezeptor 4
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FBS	fetales bovines Serum
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonysäure
HGF	Hepatocyte-growth-factor (Hepatozyten-Wachstums-Faktor)
Ig	Immunglobulin
IRF2	interferon regulatory factor 2
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
M	Molar
M.	Musculus (Muskel)
mg	Milligramm
MHC	Myosin-heavy-chain (Myosin-schwere-Kette)
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MNF	myocyte nuclear factor
MRFs	myogene Regulationsfaktoren
m-RNA	messenger-RNA (Boten-RNA)
MSTN	Myostatin
Msx-1	Msh homeobox-1
NaCl	Natriumchlorid

Pax	paired-box-Transkriptionsfaktoren
PBS	phosphate buffer saline (Phosphatgepufferte Salinsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumaurylsulfat
SF	scatter factor
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salinsäure)
TBS-T	Tris buffered saline Tween-20 (Tris-gepufferte Salinsäure mit Tween-20)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit/Einheit
V	Volt
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
z.B.	zum Beispiel

9 Literaturverzeichnis

1. Grefte, S., et al., *Skeletal muscle development and regeneration*. Stem Cells Dev, 2007. **16**(5): p. 857-68.
2. Biressi, S., M. Molinaro, and G. Cossu, *Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development*. Dev Biol, 2007. **308**(2): p. 281-93.
3. Vasyutina, E., D.C. Lenhard, and C. Birchmeier, *Notch function in myogenesis*. Cell Cycle, 2007. **6**(12): p. 1451-4.
4. Christ, B. and B. Brand-Saberi, *Limb muscle development*. Int J Dev Biol, 2002. **46**(7): p. 905-14.
5. Benninghoff, D., *Anatomie Band 1*. 16 ed, ed. U.F.V. München. Vol. 1st. 2003, Jena: Urban & Fischer Verlag München. 956.
6. Christ, B. and C.P. Ordahl, *Early stages of chick somite development*. Anat Embryol (Berl), 1995. **191**(5): p. 381-96.
7. Gros, J., M. Scaal, and C. Marcelle, *A two-step mechanism for myotome formation in chick*. Dev Cell, 2004. **6**(6): p. 875-82.
8. Francis-West, P.H., L. Antoni, and K. Anakwe, *Regulation of myogenic differentiation in the developing limb bud*. J Anat, 2003. **202**(1): p. 69-81.
9. Buckingham, M., et al., *The formation of skeletal muscle: from somite to limb*. J Anat, 2003. **202**(1): p. 59-68.
10. Sabourin, L.A. and M.A. Rudnicki, *The molecular regulation of myogenesis*. Clin Genet, 2000. **57**(1): p. 16-25.
11. Gayraud-Morel, B., et al., *A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis*. Dev Biol, 2007. **312**(1): p. 13-28.
12. Berkes, C.A. and S.J. Tapscott, *MyoD and the transcriptional control of myogenesis*. Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(4-5): p. 585-95.
13. Hawke, T.J. and D.J. Garry, *Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology*. J Appl Physiol, 2001. **91**(2): p. 534-51.
14. Arnold, H.H. and T. Braun, *Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review*. Int J Dev Biol, 1996. **40**(1): p. 345-53.
15. Cerletti, M., et al., *Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles*. Cell, 2008. **134**(1): p. 37-47.
16. Zammit, P.S., T.A. Partridge, and Z. Yablonka-Reuveni, *The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold*. J Histochem Cytochem, 2006. **54**(11): p. 1177-91.
17. Mauro, A., *Satellite cell of skeletal muscle fibers*. J Biophys Biochem Cytol, 1961. **9**: p. 493-5.
18. Charge, S.B. and M.A. Rudnicki, *Cellular and molecular regulation of muscle regeneration*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 209-38.
19. Peault, B., et al., *Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy*. Mol Ther, 2007. **15**(5): p. 867-77.
20. Seale, P., et al., *Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells*. Cell, 2000. **102**(6): p. 777-86.
21. Beauchamp, J.R., et al., *Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells*. J Cell Biol, 2000. **151**(6): p. 1221-34.
22. Kuang, S. and M.A. Rudnicki, *The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential*. Trends Mol Med, 2008. **14**(2): p. 82-91.

23. Tatsumi, R., et al., *HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells*. Dev Biol, 1998. **194**(1): p. 114-28.
24. Miller, K.J., et al., *Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **278**(1): p. C174-81.
25. Miller, R.J., G. Banisadr, and B.J. Bhattacharyya, *CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development*. J Neuroimmunol, 2008. **198**(1-2): p. 31-8.
26. Vasyutina, E., et al., *CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells*. Genes Dev, 2005. **19**(18): p. 2187-98.
27. Ratajczak, M.Z., et al., *Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles*. Stem Cells, 2003. **21**(3): p. 363-71.
28. White, R.B. and M.R. Ziman, *Genome-wide discovery of Pax7 target genes during development*. Physiol Genomics, 2008. **33**(1): p. 41-9.
29. Zammit, P.S., et al., *Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 9): p. 1824-32.
30. McKinnell, I.W., et al., *Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(1): p. 77-84.
31. Pawlikowski, B., et al., *Analysis of human muscle stem cells reveals a differentiation-resistant progenitor cell population expressing Pax7 capable of self-renewal*. Dev Dyn, 2009. **238**(1): p. 138-49.
32. Oustanina, S., G. Hause, and T. Braun, *Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification*. Embo J, 2004. **23**(16): p. 3430-9.
33. Relaix, F., et al., *Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells*. J Cell Biol, 2006. **172**(1): p. 91-102.
34. Boldrin, L., F. Muntoni, and J.E. Morgan, *Are Human and Mouse Satellite Cells Really the Same?* J Histochem Cytochem.
35. Bischoff, R., *Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture*. Dev Biol, 1986. **115**(1): p. 129-39.
36. Zammit, P.S., et al., *Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?* J Cell Biol, 2004. **166**(3): p. 347-57.
37. Ozeki, N., et al., *alpha7 integrin expressing human fetal myogenic progenitors have stem cell-like properties and are capable of osteogenic differentiation*. Exp Cell Res, 2006. **312**(20): p. 4162-80.
38. Collins, C.A. and P.S. Zammit, *Isolation and grafting of single muscle fibres*. Methods Mol Biol, 2009. **482**: p. 319-30.
39. Studitsky, A.N., *Free Auto- and Homografts of Muscle Tissue in Experiments on Animals*. Ann N Y Acad Sci, 1964. **120**: p. 789-801.
40. Shefer, G. and Z. Yablonka-Reuveni, *Isolation and culture of skeletal muscle myofibers as a means to analyze satellite cells*. Methods Mol Biol, 2005. **290**: p. 281-304.
41. Bonavaud, S., et al., *Preparation of isolated human muscle fibers: a technical report*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2002. **38**(2): p. 66-72.
42. Esumi, S., et al., *Split single-cell RT-PCR analysis of Purkinje cells*. Nat Protoc, 2006. **1**(4): p. 2143-51.
43. Gnocchi, V.F., et al., *Further characterisation of the molecular signature of quiescent and activated mouse muscle satellite cells*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5205.
44. Musaro, A. and N. Rosenthal, *Transgenic mouse models of muscle aging*. Exp Gerontol, 1999. **34**(2): p. 147-56.

45. Shefer, G., et al., *Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle*. Dev Biol, 2006. **294**(1): p. 50-66.
46. Edstrom, E. and B. Ulfhake, *Sarcopenia is not due to lack of regenerative drive in senescent skeletal muscle*. Aging Cell, 2005. **4**(2): p. 65-77.
47. Collins, C.A., et al., *Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche*. Cell, 2005. **122**(2): p. 289-301.
48. Collins, C.A., et al., *A population of myogenic stem cells that survives skeletal muscle aging*. Stem Cells, 2007. **25**(4): p. 885-94.
49. Verdijk, L.B., et al., *Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(1): p. E151-7.
50. Gibson, M.C. and E. Schultz, *Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells*. Muscle Nerve, 1983. **6**(8): p. 574-80.
51. Schafer, R., et al., *The ontogeny of soleus muscles in mdx and wild type mice*. Neuromuscul Disord, 2005. **15**(1): p. 57-64.
52. Gal-Levi, R., et al., *Hepatocyte growth factor plays a dual role in regulating skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1402**(1): p. 39-51.
53. Jennische, E., S. Ekberg, and G.L. Matejka, *Expression of hepatocyte growth factor in growing and regenerating rat skeletal muscle*. Am J Physiol, 1993. **265**(1 Pt 1): p. C122-8.
54. Cornelison, D.D. and B.J. Wold, *Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells*. Dev Biol, 1997. **191**(2): p. 270-83.
55. Wozniak, A.C., et al., *C-Met expression and mechanical activation of satellite cells on cultured muscle fibers*. J Histochem Cytochem, 2003. **51**(11): p. 1437-45.
56. Rosenblatt, J.D., et al., *Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1995. **31**(10): p. 773-9.
57. Kuang, S., M.A. Gillespie, and M.A. Rudnicki, *Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(1): p. 22-31.
58. Zammit, P.S., *All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others?* J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 18): p. 2975-82.
59. Kuang, S., et al., *Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle*. Cell, 2007. **129**(5): p. 999-1010.
60. Partridge, T.A., et al., *Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts*. Nature, 1989. **337**(6203): p. 176-9.
61. Montarras, D., et al., *Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration*. Science, 2005. **309**(5743): p. 2064-7.
62. Cosgrove, B.D., et al., *A home away from home: challenges and opportunities in engineering in vitro muscle satellite cell niches*. Differentiation, 2009. **78**(2-3): p. 185-94.
63. Fuchs, E., T. Tumber, and G. Guasch, *Socializing with the neighbors: stem cells and their niche*. Cell, 2004. **116**(6): p. 769-78.

Paper

in Vorbereitung

„Human satellite cells as a manageable tool for gene therapy“

Stephanie Adams, Helena Escobar, **Sina Gloy**, Olaf Utermöhlen, Josef Zacher, Andreas Spuler, Norbert Hubner, Herbert Schulz, Markus Schülke, Carmen Birchmeier, Zsuzsanna Izsvak, Simone Spuler

Kongressbeiträge

10/2009 **Posterpräsentation: 20. European students conference, Berlin**

„Characterization of human skeletal satellite cells“

Sina Gloy, Stephanie Adams, Angelika Gursche, Simone Spuler

10/2010 **Posterpräsentation: 15. International Congress of the World Muscle Society, Kumamoto, Japan**

“The amazing regenerative potency of human satellite cells – analysis in single fibers”

Stephanie Adams, **Sina Gloy**, Josef Zacher, Andreas Spuler, Simone Spuler

05/2011 **Posterpräsentation: EMBO Myogenesis Conference Series, The Molecular and Cellular Mechanisms, Regulating Skeletal Muscle, Development and Regeneration, Wiesbaden**

“Analysis of human satellite cells in single skeletal muscle fiber fragments”

Stephanie Adams, **Sina Gloy**, Katrin Wenzel, Josef Zacher, Andreas Spuler, Simone Spuler

Erklärung

„Ich, Sina Gloy, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung von humanen Satellitenzellen und deren Proliferationseigenschaften“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Abteilung für Myologie des Experimental and Clinical Research Centers (ECRC) der Charité angefertigt. Herrn Professor Dr. F.C. Luft als Direktor des ECRC und Frau Professor Spuler als Leiterin der Arbeitsgruppe möchte ich für die Überlassung des Promotionsthemas danken.

Frau Professor Spuler hat mich in die Thematik eingeführt und die interdisziplinären Kontakte ermöglicht, wodurch Proben für die Experimente zur Verfügung standen. Ihr möchte ich für die Möglichkeit danken, die Experimente in der Arbeitsgruppe durchzuführen und die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit und Diskussion.

Meine experimentelle Arbeit wurde von Frau Dr. vet. med. Stephanie Adams betreut, der mein besonderer Dank für die kontinuierliche Begleitung, großes Interesse und die immerwährende Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion gilt. Auch über die unmittelbare Betreuung hinaus war ihre persönliche Anteilnahme auch für meine berufliche Entwicklung von entscheidender Bedeutung.

Frau Dr. Angelika Gursche und Dr. Andreas Spuler im HELIOS Klinikum Berlin Buch haben uns den Zugang zu humanen Skelettmuskelproben ermöglicht, die mit Einverständnis der Patienten gewonnen werden konnten. Die Aufklärung zu den Zielen unserer Untersuchung benötigte Zeit, die nicht selbstverständlich zur Verfügung steht. Ein besonderer Dank geht an sie und ihre Kooperationsbereitschaft.

Vor allem bedanke ich mich auch bei meinen Laborkollegen für das schöne Arbeitsklima. Besonderen Dank dabei auch an Frau Stephanie Meyer, meinem „Laborengel“, der mich nicht nur in manchen Situationen rettete, sondern mir auch immer sehr geduldig und freudig neue Versuche zeigte und erklärte.

Einen großen Dank auch an meine Familie und Freunde, die in geduldiger und motivierender Anteilnahme die Entstehung dieser Promotion begleitet haben. Dabei gilt mein besonderer Dank meinen Eltern Sabine Gloy und Bernd Pommerening sowie Jan Hauke von Breska.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.