

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
--------------------------------	----------

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
-----------------------------------	-----------

1 EINLEITUNG.....	1
--------------------------	----------

2 LITERATUR.....	3
-------------------------	----------

2.1 SKELETTMUSKULATUR.....	3
-----------------------------------	----------

2.1.1 Aufbau und Funktion.....	3
--------------------------------	---

2.1.2 Muskelfasertypen.....	5
-----------------------------	---

2.1.3 Adaption.....	5
---------------------	---

2.1.4 Muskuläre Erkrankungen.....	6
-----------------------------------	---

2.2 MESENCHYMALE STAMMZELLEN (MSZ).....	7
--	----------

2.2.1 Muskelstammzelle	8
------------------------------	---

2.2.1.1 Charakterisierung	8
---------------------------------	---

2.2.1.2 Funktion, Heterogenität und Selbsterneuerung.....	9
---	---

2.2.1.3 Stammzellnische	10
-------------------------------	----

2.2.1.4 Therapeutische Bedeutung	11
--	----

2.3 MYOGENE DIFFERENZIERUNG.....	13
---	-----------

2.3.1 Steuerung	13
-----------------------	----

2.3.2 Embryonale Myogenese	14
----------------------------------	----

2.3.3 Postnatale Regeneration	15
-------------------------------------	----

2.4 EXTERNE BELASTUNG	18
------------------------------------	-----------

2.4.1 Mechanische Belastung.....	18
----------------------------------	----

2.4.1.1 Mechanotransduktion	19
-----------------------------------	----

2.4.1.2 Dehnungsspannung	19
--------------------------------	----

2.4.1.3 Kompression	20
---------------------------	----

2.4.1.4 Flüssigkeitsscherspannung	21
---	----

2.4.2 Atmosphärische Belastung.....	22
-------------------------------------	----

2.4.2.1 Hypoxie	23
-----------------------	----

3 MATERIAL UND METHODEN26

3.1 MATERIAL.....26

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur	26
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien für Färbungen	27
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen.....	28
3.1.4 Verbrauchsmaterialien	29
3.1.5 Geräte	31
3.1.6 Programme	33

3.2 METHODEN34

3.2.1 Zellkultur	34
3.2.1.1 C2C12-Zelllinie	34
3.2.1.2 Kultivierung, Zellzählung und Subkultivierung.....	34
3.2.1.3 Medienwechsel.....	35
3.2.1.4 Auftauen von eingefrorenen Zellen	36
3.2.1.5 Kryokonservierung	36
3.2.1.6 Myogene Differenzierung	37
3.2.1.7 Kollagenbeschichtung	38
3.2.2 Versuchsaufbau.....	38
3.2.2.1 Vorversuch	39
3.2.2.2 Proliferationsversuch.....	39
3.2.2.3 Differenzierungsversuch.....	40
3.2.2.4 Flüssigkeitsscherspannung	40
3.2.2.5 Hypoxie	41
3.2.3 Ermittlung der Zellzahl und Viabilität	42
3.2.3.1 MTT-Test.....	42
3.2.3.2 Sulforhodamin B-Färbung	43
3.2.3.3 Colony Forming Unit Assay.....	43
3.2.4 Fluoreszenzfärbungen	44
3.2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung.....	44
3.2.4.2 Phalloidin-färbung.....	47
3.2.4.3 DAF-FM-Färbung	48
3.2.5 Molekularbiologische Untersuchungen	49
3.2.5.1 RNA-Isolierung	50
3.2.5.2 DNase-Behandlung	51
3.2.5.3 cDNA-Synthese (reverse Transkription, RT).....	51
3.2.5.4 Qualitative Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, RT-PCR).....	53
3.2.5.5 Agarose-Gelelektrophorese	54

3.2.5.6	Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)	55
3.2.6	Statistische Auswertung	56
4	ERGEBNISSE	58
4.1	CHARAKTERISIERUNG DER C2C12-ZELLINIE	58
4.1.1	Zellmorphologie der proliferierenden Myoblasten	58
4.1.2	Morphologie während der myogenen Differenzierung	58
4.1.3	Nachweis von Stammzellmarkern und myogenen Markern	60
4.2	EINFLUSS VON MECHANISCHER FSS	61
4.2.1	Einfluss von FSS auf proliferierende Myoblasten	61
4.2.1.1	Zellmorphologie	61
4.2.1.2	Beurteilung der Zellviabilität	62
4.2.1.3	Beurteilung des Zellwachstums	63
4.2.1.4	Beurteilung des koloniebildenden Potenzials	63
4.2.1.5	Immunfluoreszenzfärbung	66
4.2.1.6	Genexpression myogener Differenzierungsmarker	66
4.2.2	Einfluss von FSS auf die myogene Differenzierung	67
4.2.2.1	Zellmorphologie	67
4.2.2.2	Immunfluoreszenzfärbung	68
4.2.2.3	Genexpression myogener Differenzierungsmarker	71
4.3	VERGLEICH DES EINFLUSSES VON PERIODISCH UND KONTINUIERLICH AUFTRETENDER FSS	73
4.3.1	Einfluss von periodisch und kontinuierlich auftretender FSS auf proliferierende Myoblasten	73
4.3.1.1	Zellmorphologie	73
4.3.1.2	Beurteilung der Zellviabilität	74
4.3.1.3	Beurteilung des Zellwachstums	75
4.3.1.4	Beurteilung des koloniebildenden Potenzials	75
4.3.1.5	Immunfluoreszenzfärbung	78
4.3.1.6	Genexpression myogener Differenzierungsmarker	78
4.3.2	Einfluss von periodisch und kontinuierlich auftretender FSS auf die myogene Differenzierung	80
4.3.2.1	Zellmorphologie	80
4.3.2.2	Immunfluoreszenzfärbung	80
4.3.2.3	Genexpression myogener Differenzierungsmarker	82
4.4	EINFLUSS VON HYPOXIE	85
4.4.1	Einfluss von Hypoxie auf proliferierende Myoblasten	85

4.4.1.1	Zellmorphologie.....	85
4.4.1.2	Beurteilung der Zellviabilität	85
4.4.1.3	Beurteilung des Zellwachstums.....	85
4.4.1.4	Beurteilung des koloniebildenden Potenzials	86
4.4.1.5	Immunfluoreszenzfärbung	88
4.4.1.6	Genexpression myogener Differenzierungsmarker und Hypoxiemarker.....	88
4.4.1.7	Nachweis von Stickstoffmonoxid	90
4.4.2	Einfluss von Hypoxie auf die myogene Differenzierung	90
4.4.2.1	Zellmorphologie.....	90
4.4.2.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	92
4.4.2.3	Genexpression myogener Differenzierungsmarker und Hypoxiemarker.....	93
4.4.2.4	Nachweis von Stickstoffmonoxid	96
5	<u>DISKUSSION</u>	<u>98</u>
5.1	<u>DISKUSSION DER METHODE.....</u>	<u>98</u>
5.1.1	Auswahl der C2C12-Zelllinie	98
5.1.2	FSS-Protokoll.....	98
5.1.3	Hypoxie-Protokoll.....	100
5.2	<u>DISKUSSION DER ERGEBNISSE</u>	<u>100</u>
5.2.1	Charakterisierung der C2C12-Zelllinie.....	100
5.2.2	Mechanische Belastung.....	102
5.2.2.1	Einfluss von FSS auf proliferierende Myoblasten.....	102
5.2.2.2	Einfluss von FSS auf die myogene Differenzierung	108
5.2.3	Atmosphärische Belastung	112
5.2.3.1	Einfluss von Hypoxie auf proliferierende Myoblasten.....	113
5.2.3.2	Einfluss von Hypoxie auf die myogene Differenzierung	116
5.3	<u>AUSBLICK.....</u>	<u>122</u>
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>124</u>
7	<u>SUMMARY.....</u>	<u>128</u>
8	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>132</u>
9	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>135</u>
10	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>136</u>

11 ANHANG.....	156
11.1 VERWENDETER WIPPSCHÜTTLER UND HYPOXIE-INKUBATOR.....	156
11.2 BERECHNUNG DER FSS	157
11.3 ZUSAMMENSETZUNG VERWENDETER LÖSUNGEN	157
12 DANKSAGUNG	159