



### **Maria Frenzel**

Nach dem Abitur am Beruflichen Gymnasium für Biotechnologie am BSZ "Ernst Lößnitz" in Dresden im Jahr 2012 und der anschließenden Ausbildung zur medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin (MTA), arbeitete sie als MTA beim MVZ Labor Limbach Dresden GbR. Im Jahr 2019 begann Maria Frenzel das Duale Studium der Biotechnologie an der Berufsakademie Sachsen am Standort Riesa, welches sie 2022 erfolgreich abschloss. Praxispartner war die MVZ Labor Limbach Dresden GbR.

**Kontakt:** maria.frenzel@outlook.de



### **B. Sc. Melanie Thielemann**

Studium zum Bachelor of Science an der Staatlichen Studienakademie Riesa (2009-2012) im Studiengang Labor- und Verfahrenstechnik, Studienrichtung Biotechnologie, seit 2012 Laboringenieurin an der Staatlichen Studienakademie Riesa im Studiengang Labor- und Verfahrenstechnik.

Arbeits- und Forschungsschwerpunkte: Organische Chemie; Analytische Trennmethode; Instrumentelle Analytik; Mikrobiologie und Umweltmikrobiologie, Biochemie, Molekularbiologie, Zellkulturtechnik, Fermentation

**Kontakt:** melanie.thielemann@ba-sachsen.de



### **Prof. Dr. rer. medic. Barbe Rentsch**

Professorin für Angewandte Biotechnologie

Dozentin für biologische, biotechnologische und biomedizinische Module im Studiengang Labor- und Verfahrenstechnik der Berufsakademie Sachsen am Standort Riesa

Arbeits- und Forschungsschwerpunkte: Molekularbiologie, Zell- und Gewebekultivierung, Bioanalytik, Biomaterialien, Tissue Engineering und Regenerative Medizin

**Kontakt:** barbe.rentsch@ba-sachsen.de

# Charakterisierung der myogenen Differenzierung von C2C12-Mausmyoblasten als Modell der Skelettmuskelentwicklung

*Maria Frenzel | Melanie Thielemann | Barbe Rentsch*

*Das Skelettmuskel-Tissue Engineering befasst sich mit der Reparatur bzw. dem Ersatz von geschädigtem Muskelgewebe. Es hat das Ziel funktionstüchtiges Skelettmuskelgewebe im Labor zu rekonstruieren. Hierfür ist es notwendig, ein grundlegendes Verständnis für die Entwicklung von Muskelzellen zu Muskelfasern (Myogenese) zu*

*Skeletal muscle tissue engineering deals with the repair or replacement of damaged muscle tissue by reconstructing functional skeletal muscle tissue in the laboratory. For this purpose, it is necessary to gain a basic understanding of the development of muscle cells into muscle fibers (myogenesis). The aim was to optimize the myogenic*

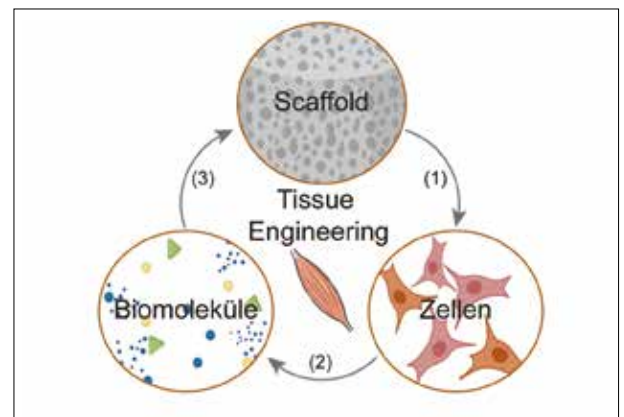
erlangen. Das Ziel war es, den myogenen Differenzierungsprozess von C2C12-Mausmyoblasten als Modellsystem der Skelettmuskelentwicklung zu optimieren sowie anhand geeigneter Methoden zu charakterisieren. Für die Untersuchung der myogenen Differenzierung wurden zwei verschiedene Kultivierungsmedien (reduzierte Serumbedingungen, 2 % FCS (fötales Kälberserum) und nicht-reduzierte Serumbedingungen, 20 % FCS) in einem Zeitraum von vierzehn Tagen verglichen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Morphologie der Zellen sowie deren Expression von zwei myogenen Differenzierungsfaktoren (Myogenin, Myosin) analysiert und quantifiziert. Unter beiden Kultivierungsbedingungen konnte die Differenzierung eingeleitet werden. Die Zellen elongierten zu länglichen und z. T. mehrkernigen Myotubes und exprimierten den myogenen Regulationsfaktor Myogenin sowie das Muskelstrukturprotein Myosin. Mit dem konventionellen Serumzug konnten grundsätzlich mit der Literatur vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Die erzeugten Daten für die Kultivierung mit 20 % FCS zeigten Myotubes, welche im Vergleich größer und länger waren sowie eine höheren Zellkernanzahl aufwiesen. Die erzielten Ergebnisse sind vielversprechend, um den in vivo stattfindenden myogenen Differenzierungsprozess besser in vitro abzubilden und rechtfertigen fortführende Untersuchungen.

### Einleitung

Die Skelettmuskulatur übernimmt im menschlichen Körper eine Reihe an wichtigen Funktionen. Sie dient unter anderem zur Fortbewegung sowie für die Körperhaltung und als Stoffwechselregulator [1,2]. Bei pathologischen Erscheinungen wie alters- oder krankheitsbedingten Muskeldegenerationen, Myopathien, traumatischen Verletzungen, Tumoren und Muskeldenervierung kommt es daher zu erheblichen Einschränkungen des Patienten [2,3]. Ein Verlust von Muskelmasse von mehr als 20 % beeinträchtigt die natürliche körpereigene Regenerationsfähigkeit des Gewebes. In diesen Fällen wird meist ein autologer Gewebetransfer (Muskelappen) von einer intakten Stelle des Patienten durchgeführt. Dies führt zum einen zu einer Defektstelle in eigentlich gesundem Gewebe und zum anderen wird die ursprüngliche Muskelkraft und Funktionalität vor der Verletzung nicht vollständig wiederhergestellt [4]. In diesem Szenario kann das Tissue Engineering (TE) eine wichtige Rolle spielen, nicht nur um die Bildung von Narbengewebe zu verhindern und die Muskelfunktion bei leichten Verletzungen wiederherzustellen, sondern auch als potenzielle Behandlungsoption für Patienten mit schwerem Muskelverlust [4].

Das Skelettmuskel-TE (Abbildung 1) konzentriert sich auf die Entwicklung von Gewebe, welches in der Lage ist, die vollständige Funktion eines defekten Muskels zu ersetzen oder zu reparieren. Dies umfasst die folgenden Schwerpunkte: die Kultivierung von Muskelzellen, welche von dem Patienten selbst oder einem Spender stammen, das Wachstumsmaterial (Scaffold) sowie zugesetzte Faktoren (Biomoleküle) zur Optimierung des Zell- und Gewebewachstums und Ausbildung eines funktionellen Muskels [3,5].

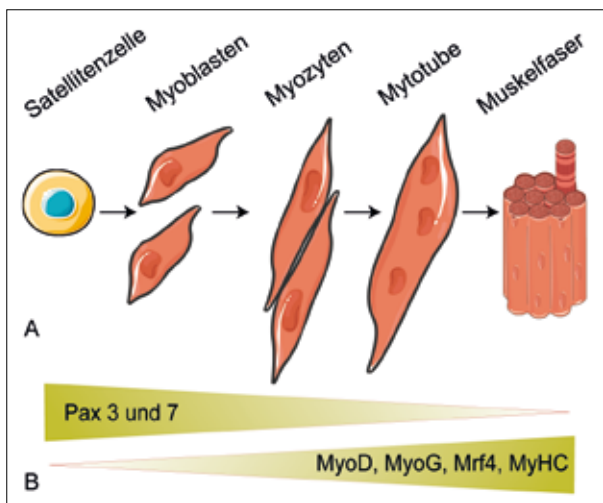
differentiation process of C2C12 mouse myoblasts as a model system of skeletal muscle development and characterize it through appropriate methods. To study myogenic differentiation, two different cultivation media (reduced serum conditions, 2 % FCS (fetal calf serum) and non-reduced serum conditions, 20 % FCS) were compared over a fourteen-day period. At different time points, the morphology of the cells and their expression of two myogenic differentiation factors (myogenin, myosin) were analyzed and quantified. Differentiation was initiated under both cultivation conditions. The cells elongated into elongated and partly multinucleated myotubes and expressed the myogenic regulatory factor myogenin as well as the muscle structural protein myosin. Results obtained with conventional reduced serum conditions were comparable to those reported in the literature. The data generated for cultivation with 20 % FCS showed myotubes that were larger and longer in comparison, as well as having a higher number of nuclei. The results obtained are promising to better represent in vitro the myogenic differentiation process taking place in vivo and warrant further investigations.



**Abbildung 1: Die Trias des Tissue Engineering**  
Beim Tissue Engineering werden (1) Scaffolds, (2) Zellen und (3) Biomoleküle kombiniert, um Gewebe zu regenerieren oder beschädigtes oder krankes Gewebe zu ersetzen [6].

Die Myogenese als Entwicklungs- und Bildungsprozess der Skelettmuskulatur findet in der embryonalen Entwicklung sowie während der Muskelregeneration (adulte Myogenese) statt. Beide Prozesse (adult und embryonal) laufen in einer ähnlichen Art und Weise ab und unterscheiden sich nur in wenigen Aspekten der Regulierung [7,8]. Nach einer starken Belastung oder Verletzung des Muskelgewebes werden im Rahmen der adulten Myogenese (Abbildung 2) die Stammzellen der Skelettmuskulatur, sog. Satellitenzellen, aktiviert und differenzieren in Myoblasten (myogene Vorläuferzellen). Die Myoblasten proliferieren und beginnen zu mehrkernigen Myotubes zu fusionieren. Der Regenerationsprozess der Skelettmuskulatur

wird durch eine zeitabhängige Expression von myogenen Regulatorfaktoren (MRFs, *muscle regulatory factors*) gesteuert. Zu den MRFs gehören Pax3, Pax7, Myf5, MyoD, Myogenin (MyoG) und Mrf4. [9] Die MRFs induzieren ebenfalls andere muskelspezifische Proteine, wie z. B.  $\alpha$ -Aktin, leichte und schwere Myosinkette (MyLC, MyHC), Tropomyosin, Troponin C und Troponin I [10]. Abschließend beginnt die endgültige Reifung zu elektrisch erregbaren Myofasern mit charakteristischer Anordnung von kontraktile Einheiten. [5,11]



**Abbildung 2: Skelettmogenese bei Säugetieren**

Nach einer Muskelverletzung beginnt eine ansässige Population von ruhenden myogenen Vorläuferzellen (Satellitenzellen) zu proliferieren und sich in Myoblasten zu differenzieren. Diese Zellen proliferieren und fusionieren miteinander zu mehrkernigen Myotubes. Weitere Myoblasten fusionieren mit den vorhandenen Myotubes zu Muskelfasern (A). Dieser Differenzierungsprozess wird durch zahlreiche interne und externe Faktoren gesteuert. Im Laufe der Myogenese geht die Expression von Satellitenzellmarkern wie Pax7 allmählich verloren, während die Expression von Differenzierungsmarkern wie MyoG oder MyHC allmählich zunimmt (B). [12,13]

#### Motivation

Die Prozesse der Myogenese im Labor zu rekonstruieren, stellt aufgrund von deren Komplexität eine große Herausforderung dar [3]. Die Grundlage bilden hierfür zelluläre *In-vitro*-Muskelmodellsysteme, die als Plattform zur Untersuchung verschiedener zellulärer Prozesse dienen. Solche Modellsysteme können das Verständnis für die Prozesse der Myogenese, der Differenzierung und das Verhalten der Muskelzellen fördern sowie eine gezielte Beeinflussung der Prozesse, z. B. mit Einsatz von Stimulantien, ermöglichen. Diese Voruntersuchungen müssen vom tatsächlichen Skelettmuskel-TE abgegrenzt werden, da jegliche Scaffolds fehlen. Als Modellsystem diente in der vorliegenden Arbeit die C2C12-Myoblasten-Zelllinie der Maus. Diese adhärenente immortalisierte Zelllinie weist unter Zugabe von ca. 10 - 20 % fötalem Kälberserum (FCS, *fetal calf serum*) zum

Kultivierungsmedium der Zellen eine hohe Proliferationsrate auf. Zu den wichtigsten Funktionen des Serums in Kulturmedien gehört u. a. die Bereitstellung von Hormonen und Wachstumsfaktoren für das Zellwachstum und die Zellvermehrung [14]. Die Differenzierung der C2C12-Zellen kann typischerweise durch die Reduzierung des Serumanteils im Kultivierungsmedium, also den Entzug von wachstumsfördernden Faktoren, eingeleitet werden. [10,15].

Im Mittelpunkt der Bachelorarbeit stand die Charakterisierung der myogenen Differenzierung von C2C12-Mausmyoblasten als Modellsystem der Skelettmuskelentwicklung. Hierfür wurde zunächst das Wachstum der C2C12-Zellen analysiert und optimiert. Anschließend wurden die Differenzierungsprozesse der Zelllinie in drei verschiedenen Kultivierungsmedien charakterisiert und verglichen. Im Fokus des vorliegenden Artikels steht der Vergleich der Differenzierung unter reduzierten (2 % FCS) und nicht-reduzierten Serumbedingungen (20 % FCS). Die vollständigen Untersuchungsergebnisse können bei Frenzel, 2022 eingesehen werden [16].

#### Material und Methoden

##### Zellkultivierung

Techniken, wie Kultivierung, Passagieren, Auftauen oder Einfrieren von Zellen, wurden nach Standardverfahren durchgeführt [17]. Die Zellviabilität sowie die Lebendzellzahl wurden mit der Trypanblaufärbung bestimmt. Die adhärenente C2C12-Maus-Myoblasten (DSMZ: ACC 565, Passage 1) wurden mit einer initialen Zellzahl von 1000 Zellen/cm<sup>2</sup> in Proliferationsmedium (RPMI-Medium, 20 % FCS und 1 % Penicillin/ Streptomycin) ausgesät und für vier Tage (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) bis zu einer Konfluenz von ca. 60 - 70 % kultiviert. Um die myogene Differenzierung zu induzieren, wurde das Proliferationsmedium (nicht-reduzierte Serumbedingungen, 20 % FCS) durch Differenzierungsmedium (reduzierte Serumbedingungen, 2 % FCS) ersetzt. Parallel dazu wurden Zellen in Proliferationsmedium weiter kultiviert. An den Kultivierungstagen 0 (undifferenzierte Probe) 2, 4, 7, 10 und 14 nach Einleitung der Differenzierung erfolgte die Analyse der Zellen. Für mikroskopische Analysen mittels Hellfeld-, im Phasenkontrast- oder mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden das BZ-X8010 All-in-One Fluorescence Microscope BZ-X800 Series (KEYENCE Deutschland GmbH) genutzt.

##### Jenner-Giemsa-Färbung

Die C2C12-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und über einen Zeitraum von vierzehn Tagen kultiviert. An den einzelnen Probennahmetagen wurden die Zellen mit 100 % eiskaltem Methanol fixiert und im Anschluss gefärbt [18]. Die einzelnen Proben wurden mit 1,5 ml Jenner-Färbelösung (ScyTek Laboratories; 1:3 Verdünnung in 1 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,6) für 5 Minuten inkubiert (Raumtemperatur) und mit destilliertem Wasser (3x) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1,5 ml Giemsa-Färbelösung (ScyTek Laboratories; 1:20 Verdünnung in 1 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,6) für 10 Minuten (Raumtemperatur) inkubiert und erneut mit Wasser (3x) gewaschen. Das Wasser wurde anschließend abgesaugt und die

6-Well-Platten mit geöffnetem Deckel getrocknet. Mittels Hellfeldmikroskopie wurden repräsentative sowie Bilder für die quantitative Analytik aufgenommen. Für die Ermittlung der Myotube-Länge und -breite wurden ca. 60 - 200 Zellen von jeder Versuchsreihe und Proben tag mittels ImageJ [19] ausgemessen.

### Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die C2C12-Zellen in 8-Well-Chamber-Slides ausgesät und über einen Zeitraum von vierzehn Tagen kultiviert. Differenzierte C2C12-Zellen wurden mit 4 % Formaldehyd fixiert und für 60 Minuten mit 0,2 % Triton X-100 und 3 % BSA in PBS permeabilisiert. Der primäre MyHC-Antikörper (*Myosin Heavy Chain Antibody*, MAB4470 bio-techne) wurde 1:25 mit 1 % BSA-Lösung und der MyoG-Antikörper (Myogenin (5FD), Alexa Fluor647, sc-52903 Santa Cruz Biotechnology) 1:20 mit 1 % BSA-Lösung verdünnt. Die Chamber-Slides wurden für 25 Minuten lichtgeschützt geschüttelt sowie über Nacht bei 4 - 8 °C inkubiert. Der sekundäre MyHC-Antikörper (NorthernLights™ *Anti-mouse* IgG-NL557, NL007 bio-techne) wurde 1:50 mit 1 % BSA verdünnt und die Inkubation erfolgte für 60 Minuten. Die Färbung der Zellkerne erfolgte im Anschluss für 30 Minuten (DAPI, 1:1000, D1306 Thermo Fisher Scientific). Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle vorherigen Schritte bei Raumtemperatur und unter Schütteln durchgeführt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie (All-in-One Fluorescence Microscope BZ-X800 Series, Keyence) wurden repräsentative sowie Bilder für die quantitative Analytik aufgenommen.

Für die Bestimmung der Anzahl der Myogenin-positiven (MyoG<sup>+</sup>)-Zellen mittels ImageJ [16,19] wurden für jeden Ansatz je mind. drei Bilder ausgewertet. Es wurde die Anzahl aller Zellkerne pro Bild (Gesamtanzahl) sowie die Anzahl aller MyoG<sup>+</sup>-Zellen ermittelt. Der prozentuale Anteil der MyoG<sup>+</sup>-Zellen ergab sich aus der Anzahl der MyoG<sup>+</sup>-Zellen zur Gesamtzellzahl (Formel 1).

$$\text{MyoG}^+\text{-Zellen (\%)} = \frac{\text{Anzahl MyG}^+\text{-Kerne} \cdot 100\%}{\text{Gesamtzahl der Zellkerne}}$$

Formel 1: Berechnung des prozentualen Anteils an MyoG<sup>+</sup>-Zellen

### Quantifikation der mRNA-Expression mittel RT-qPCR

Die mRNA-Expression von MyoG und MyHC wurde mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) quantifiziert. Gesamt-RNA wurde nach Herstellerangaben isoliert (Nucleospin® RNA, MACHE-REY-NAGEL GmbH & Co. KG). Die Quantität sowie die Qualität der RNA wurde mittels eines Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die cDNA wurde in einer 20 µl Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion unter Nutzung eines Oligo(dT)18 Primers (Thermo Fisher Scientific) mit 2 µg RNA nach Herstellerangaben durchgeführt (Omniskript® RT Kit, QIAGEN GmbH). Die qPCR-Reaktion wurden mittels iQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories GmbH) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte wie folgt im CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad Laboratories GmbH): 1. Initialisierung bei 95 °C für 180 s, 2. Denaturierung bei 95 °C für 10 s, 3. Annealing bei

60 °C für 30 s, 4. Elongation bei 72 °C für 60 s, 40 Zyklen 2-4) unter Nutzung der Primer (Eurofins Genomics) in Tabelle 1. Es schloss sich eine Schmelzkurvenanalyse (60 °C auf 95 °C) an. Die erhaltenen Ct-Werte der Proben wurden auf das *housekeeping*-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) normalisiert [20].

| Name (NCBI Referenzsequenz) |   | Sequenz (5'→3')                   | Produktgröße Schmelztemp. |
|-----------------------------|---|-----------------------------------|---------------------------|
| MyoG<br>NM_031189.2         | f | AAGGTGTGTAAGAGG-<br>AAGTCTGTGTCGG | 404 bp*<br>66,6 °C**      |
|                             | r | ACGATGGACGTAAGGAGTG-<br>CAGATTGT  |                           |
| MyHC<br>NM_030679.2         | f | CGCAAGAATGTTCTCAGGCT              | 110 bp*<br>57,3 °C**      |
|                             | r | GCCAGGTTGACATTGGATTG              |                           |
| GAPDH<br>NM_001289726.2     | f | TGATGACATCAAGAAGGTG-<br>AAG       | 240 bp*<br>64,2/56,5 °C** |
|                             | r | TCCTTGAGGCCATGTAGG-<br>CCAT       |                           |

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Primer in der qPCR

f=forward Primer, r=reverse Primer, \*Quelle: NCBI Primer-BLAST, \*\*Quelle: Hersteller

### Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± Standardabweichung präsentiert. Zur Ermittlung der Signifikanzen der Untersuchungsergebnisse wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt und der ermittelte p-Wert beurteilt. Ein p-Wert mit p < 0,05 (Kennzeichnung: \*) gilt als signifikant, p < 0,01 (Kennzeichnung: \*\*) gilt als sehr signifikant und p < 0,001 (Kennzeichnung: \*\*\*) gilt als hoch signifikant.

### Ergebnisse und Diskussion

Eine morphologische Beurteilung (Abbildung 3) der C2C12-Zellen in undifferenzierten Zustand wurde für alle Versuche vor Beginn der Differenzierungseinleitung durchgeführt (Konfluenz ca. 60 %). Die undifferenzierten C2C12-Zellen sind adhären te, kompakte Myoblasten mit einer Größe von 30 (±10,75) µm. Sie zeigten die für sie typische sternenförmige Morphologie mit der Ausbildung von Zellausläufern auf [10].

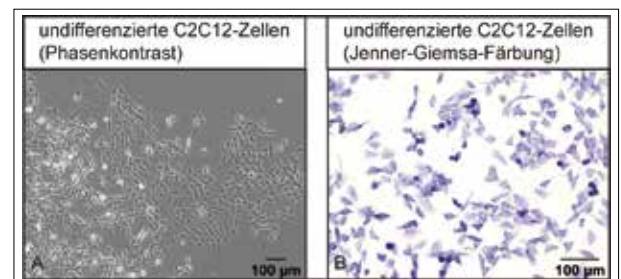
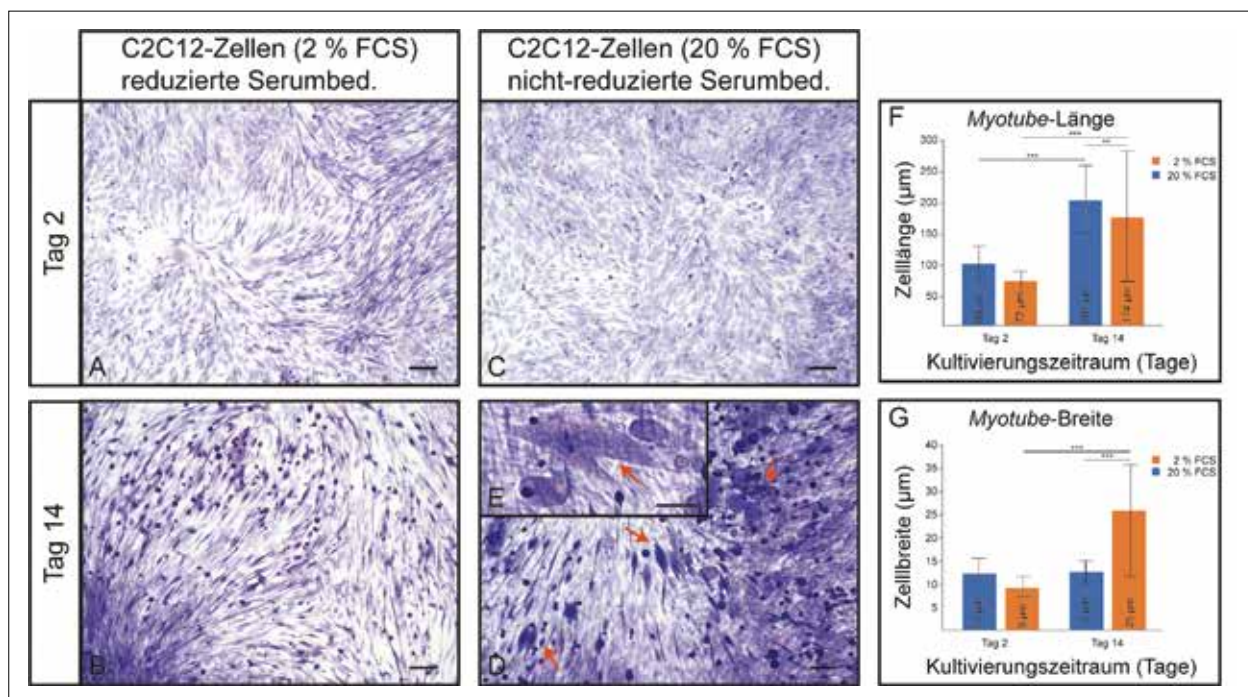


Abbildung 3: Morphologische Beurteilung von undifferenzierten C2C12-Zellen zum Zeitpunkt des Starts der Differenzierung (A) Phasenkontrastaufnahme (B) Hellfeldmikroskopieaufnahme der Jenner-Giemsa-Färbung mit hellblaugefärbten Myoblasten

Für die Untersuchung der C2C12-Zellen im myogenen Differenzierungsprozess wurden diese über vierzehn Tage unter reduzierten (2 % FCS) sowie unter nicht-reduzierten Serumbedingungen (20 % FCS) kultiviert. Für die Bewertung der Differenzierung wurden die Morphologie der Zellen, die Größe der entstandenen Myotubes, deren Häufigkeit sowie die Expression von myogenen Markern (MyoG oder MyHC) herangezogen.

Mit zunehmender Differenzierung (Abbildung 4 A-E) elongieren die sternförmigen Myoblasten, bilden Zellstraßen und verschmelzen

dann zu mehrkernigen Myotubes [10]. Während diese morphologischen Veränderungen bei einer Kultivierung mit 2 % FCS homogen über die gesamte Zellpopulation zu beobachten waren, wiesen die Zellen nach einer Kultivierung mit 20 % FCS eine inhomogene Zellentwicklung auf. Neben undifferenzierten Bereichen wurden ab Tag 2 zunehmend sowohl schmale Zellen am Anfang der Differenzierung als auch stark fusionierte Myotubes erkennbar. Diese Myotubes wiesen zahlreiche Zellkerne auf, welche entlang ihrer gesamten Zellausdehnung verteilt waren (Abbildung 4 D, E, Pfeile).



**Abbildung 4: Morphologischen Veränderungen der C2C12-Zellen im myogenen Differenzierungsprozess**

(A, B) Darstellung von Hellfeldaufnahmen von gefärbten C2C12-Zellen kultiviert unter reduzierten Serumbedingungen (2 % FCS), Jenner-Giemsa-Färbung. (Scale = 100 µm)

(C, D, E) Darstellung von Hellfeldaufnahmen von gefärbten C2C12-Zellen kultiviert unter nicht-reduzierten Serumbedingungen (20 % FCS), Jenner-Giemsa-Färbung. (Scale = 100 µm)

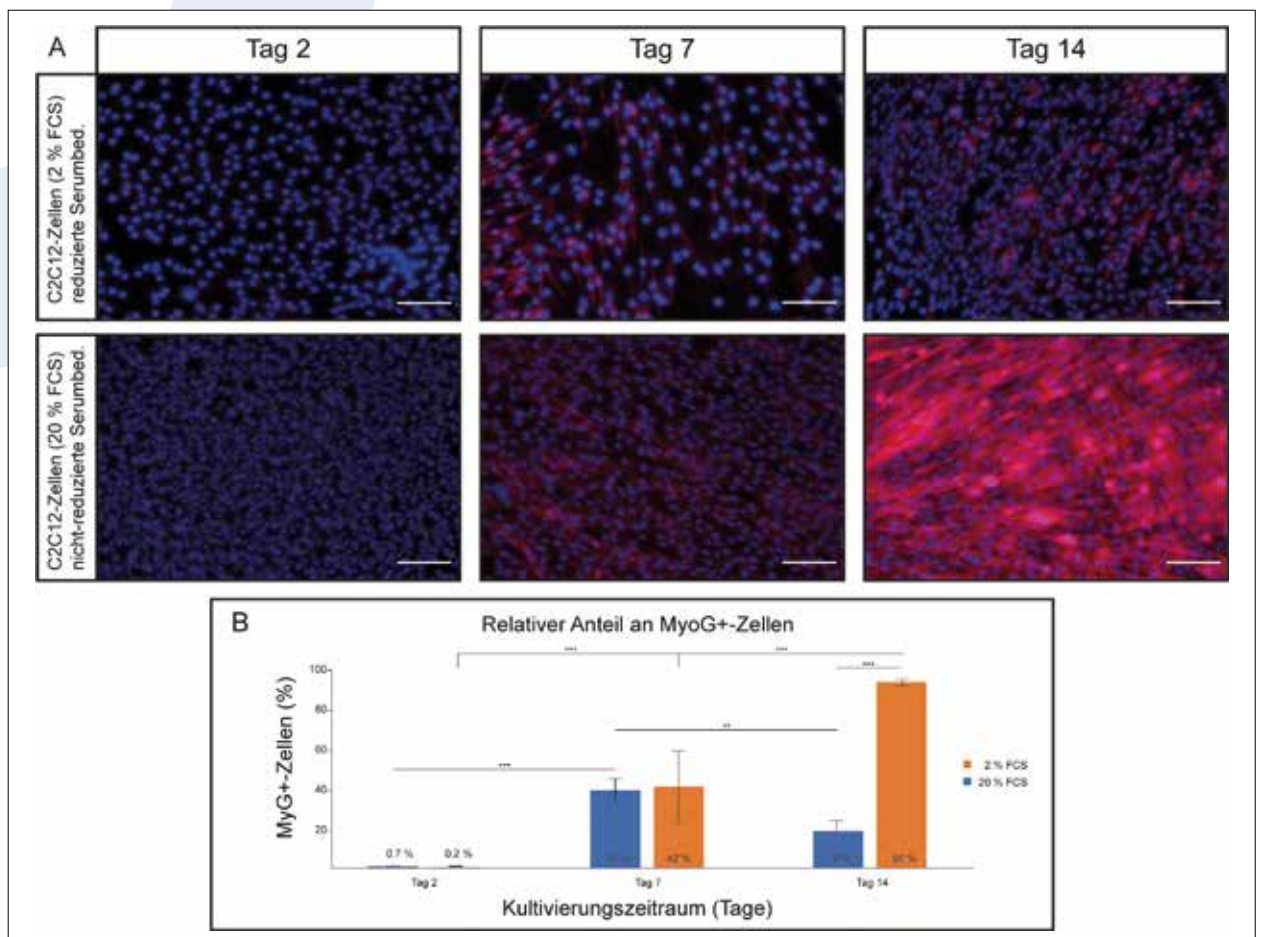
Fusionierte C2C12-Zellen, welche sich zu Myotubes differenzieren, werden dunkelblau und undifferenzierte Myoblasten werden hellblau angefärbt. Die orangefarbenen Pfeile zeigen exemplarisch die besonders dicken bzw. langen Myotubes bei 20 % FCS, welche 2 % FCS nicht zu beobachten sind.

(F, G) Quantitative Bewertung der myogenen Differenzierung von C2C12-Zellen anhand der Myotube-Länge und -Breite. Analyse der Länge und Breite der Myotubes erfolgte von Jenner-Giemsa-gefärbten Mikroskopieaufnahmen über ImageJ. (\*\*p-Wert < 0,001, \*\*p-Wert < 0,01).

Die Länge der Myotubes (Abbildung 4 F) nahm mit steigender Kultivierungszeit unabhängig vom Kultivierungsmedium signifikant zu, was ein Indiz für eine fortschreitende Differenzierung ist [10,21,22]. Mit einer mittleren Länge von ca. 200  $\mu\text{m}$  (2 % FCS = 201  $\mu\text{m}$ ; 20 % FCS = 174  $\mu\text{m}$ ), sind die Myotubes vergleichbar mit denen anderer Studien, in denen Längen von durchschnittlich 100 - 400  $\mu\text{m}$  nach bis zu zehn Tagen angegeben werden [10,21,22]. Betrachtet man die maximal erreichbaren Myotube-Längen bei einer Kultivierung in 2 % FCS gliedern diese sich in diesen Größenbereich ein. Für die Versuchsreihe 20 % FCS wurden Myotube-Längen bis fast 1000  $\mu\text{m}$  ermittelt. Damit konnten Myotubes beobachtet werden, die weitaus länger sind als die bisher beschriebenen Längen von maximal 600  $\mu\text{m}$  [10]. Die mittlere Myotube-Breite (Abbildung 4 G) bei einer Kultivierung mit 2 % FCS blieb über den gesamten Kultivierungszeitraum konstant (ca. 12  $\mu\text{m}$ ). Eine Kultivierung mit 20 % FCS führte zu stetig brei-

ter werdenden Myotubes, wobei nach 14 Tagen Kultivierung eine Verdopplung in der Breite der Myotubes zu beobachten war (ca. 25  $\mu\text{m}$ ). In der Literatur ist eine vergleichbare Spannweite der Myotube-Breite von 13-50  $\mu\text{m}$  zu finden [10,21-23].

Laut Yoshida *et al.* differenzieren etwa 50 % einer C2C12-Zellpopulation, wobei die restlichen Zellen vermutlich in einem ruhendem myoblastischen Zustand verbleiben [10,24]. Für eine Quantifizierung des Anteils myogen differenzierter C2C12-Zellen können verschiedene Methoden (z. B. Fusionsindex, Differenzierungsindex) angewendet werden [16]. Eine Bestimmung des relativen Gesamtanteils von Myotube-spezifischer Proteine, wie MyoG oder MyHC, kann ein allgemeines Maß für die Differenzierung liefern [18]. Über diese Methode können z. B. MyoG+ bzw. MyHC+ Zellen bestimmt und auf die Gesamtzellzahl bezogen werden (Abbildung 5 A, B).



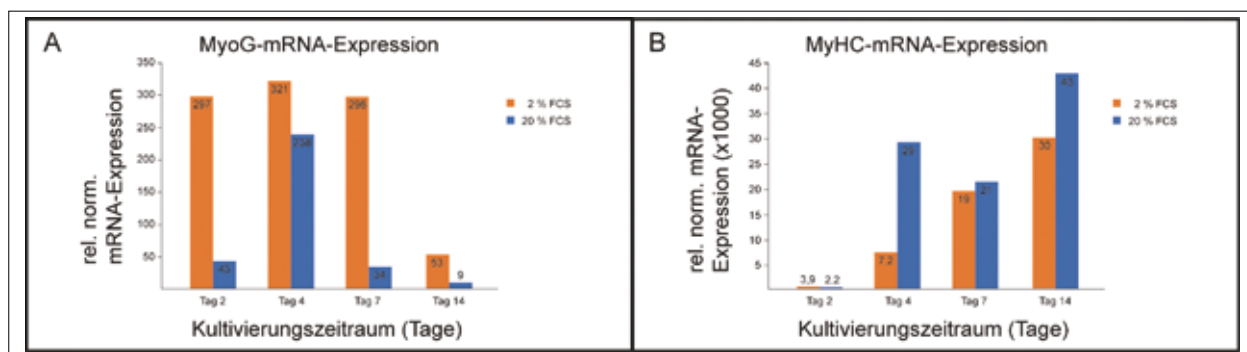
**Abbildung 5: Bewertung des Differenzierungsprozess anhand der Expression von MyoG nach Kultivierung über 14 Tage in 2 % FCS bzw. 20 % FCS**

- (A) Fluoreszenzaufnahmen der C2C12-Zellen nach Kultivierung in 2 % FCS bzw. 20 % FCS im Vergleich. MyoG ist rot- und die Zellkerne sind blaufluoreszierend im Bild sichtbar (Scale = 100  $\mu\text{m}$ ).  
 (B) Darstellung der Anzahl von MyoG+-Zellen zur Gesamtanzahl (\*\*p-Wert < 0,001, \*\*p-Wert < 0,01).

In der vorliegenden Arbeit wurde der relative Anteil von MyoG+ Zellen zur Bestimmung des Anteils an differenzierten Zellen genutzt. Für 2% FCS konnte an Tag 7 ein Maximum von 40% differenzierter Zellen beobachtet werden. Dies entspricht den aus der Literatur bekannten Prozentzahlen von 10-50% [18,21,25-28]. Die beobachtete Abnahme der MyoG-Expression auf Tag 14, ist auf einen Rückgang der MyoG-Expression zurückzuführen und nicht auf eine abnehmende Differenzierung [27]. Bei einer Kultivierung in 20% FCS war ein steiler Anstieg von Tag 2 (0,2%) über Tag 7 (42%) bis Tag 14 (95%) an differenzierten Zellen zu beobachten. Es lagen also deutliche mehr Zellen im differenzierten Zustand (95% statt maximal 50%) und weniger in einem ruhenden myoblastischen Zustand vor, als bisher von anderen Autoren berichtet.

Als weiterer Marker für die Bewertung des myogenen Differenzie-

rungsprozesses wurde die mRNA-Expression von MyoG und MyHC herangezogen (Abbildung 6). MyoG ist ein myogener Transkriptionsfaktor, dessen Expression innerhalb einer sich differenzierenden Zellpopulation mit der Zeit zunimmt. Er leitet den Differenzierungsprozess von Myoblasten zu Myotubes ein. [27,29] Unabhängig vom Kultivierungsmedium konnte eine ansteigende Expression von MyoG, mit einem Maximum an Tag 4, beobachtet werden, wobei eine Kultivierung unter reduzierten Serumbedingungen eine frühere und höhere Expression aufwies (Abbildung 6 A). Mit der ansteigenden Fusionierung der Myoblasten zu Myotubes begann der MyoG-Gehalt wieder abzunehmen. MyoG vermittelt den Prozess zur Myotubebildung und die Synthese von kontraktile Proteinen, daher ist ein Anstieg zu Beginn der Differenzierung sowie ein anschließendes Herunterregulieren plausibel [27].

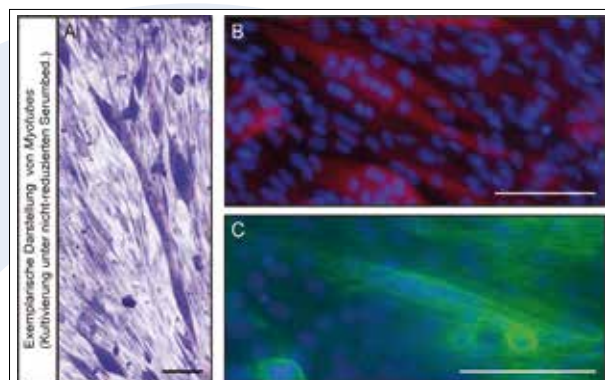


**Abbildung 6: Relativ normalisierte mRNA-Expression von MyoG (A) und MyHC (B) der C2C12-Zellen nach Kultivierung über 14 Tage in 2% FCS bzw. 20% FCS**  
Bestimmung der jeweiligen mRNA-Expression über die Normalisierung der GAPDH-Expression. Als Basis der Normalisierung diente die undifferenzierte Probe (=Tag 0).

MyoG steuert die Expression von weiteren muskelspezifischen Genen, z. B. von MyHC, welches zum strukturellen Anteil der Myofibrillen gehört und essenziell für die Muskelkontraktion ist. Es wurde daher ein stetiger Anstieg im Verlauf der Kultivierung erwartet. [30,31] Für beide Versuchsreihen konnte eine Zunahme der mRNA-MyHC-Expression ab Tag 2 über den gesamten Kultivierungszeitraum beobachtet werden, wobei die Zunahme bei einer Kultivierung unter nicht-reduzierten Serumbedingungen (20%) ca. 1,4-fach stärker war (Abbildung 6 B).

#### Zusammenfassung

Nach einer starken Belastung oder Verletzung des Muskelgewebes werden im Rahmen der adulten Myogenese ruhende Satellitenzellen über einen mehrstufigen Prozess von myogenen Vorläuferzellen, über Myoblasten bis hin zu Myotubes differenziert [15]. Für eine Nachahmung dieses myogenen Differenzierungsprozesses *in vitro* wurde die Mausmyoblasten-Zelllinie C2C12 herangezogen, auf unbeschichteten Polystyrol-Zellkulturgefäßen kultiviert sowie die myogene Differenzierung der C2C12-Zellen unter zwei Kultivie-



**Abbildung 7 Exemplarische Darstellung von Myotubes der C2C12-Zellen kultiviert unter nicht-reduzierten Serumbedingungen (20% FCS).**

Die Myotubes weisen eine hohe Mehrkernigkeit auf (Jenna-Giemsa-Färbung, A) und exprimieren sowohl MyoG (Immunfluoreszenzfärbung, MyoG = rot), (B) als auch MyHC (Immunfluoreszenzfärbung, MyHC = grün). Die Zellkerne in B und C sind blau dargestellt (DAPI-Färbung). (Scale = 100 µm)

rungsbedingungen (reduzierte Serumbedingungen, 2 % FCS und nicht-reduzierte Serumbedingungen, 20 % FCS) analysiert. Mit der Initiierung der Differenzierung elongierten die sternenförmigen Myoblasten zu länglichen und z. T. mehrkernigen Myotubes unabhängig vom Kultivierungsmedium. Mit dem Differenzierungsprozess wurde eine beginnende Zunahme der Expression des myogenen Regulationsfaktors MyoG erzielt, wobei im zeitlichen Verlauf eine Herunterregulierung erfolgte und eine Zunahme des Muskelproteins MyHC zu beobachten war. Die Untersuchungen zeigten, dass unter beiden Kultivierungsbedingungen die Differenzierung eingeleitet werden konnte, jedoch in einem unterschiedlichen Ausmaß. Mit dem konventionellen Serumentzug konnten grundsätzlich vergleichbare Ergebnisse, im Vergleich zur Literatur erzielt werden.

Die erzeugten Daten für die Kultivierung mit 20 % FCS zeigten Myotubes, welche im Vergleich der Versuchsreihen am weitesten in der Entwicklung erschienen. Die unter diesen Bedingungen gebildeten Myotubes waren größer, länger und wiesen mehr Kerne auf. Sie waren MyoG und MyHC positiv und hoben sich in der Fluoreszenzfärbung von ihrer Umgebung stark ab (Abbildung 7). In der Literatur konnten bisher keine vergleichbaren Untersuchungen ermittelt werden. Eine längere Kultivierung unter nicht-reduzierten Serumbedingungen wurde kaum untersucht oder angewendet. Die erzielten Ergebnisse deuten jedoch auf einen vielversprechenden Ansatz hin, um den *in vivo* stattfindenden myogenen Differenzierungsprozess besser *in vitro* abzubilden. Fortführende Untersuchungen könnten dahingehend weitere Erkenntnisse liefern [16].

#### Literatur

- [1] Elsässer H.-P.(2021): Allgemeine Histologie. Berlin, Heidelberg: Berlin Heidelberg (Springer), 2021.
- [2] Zanou N., Gailly P. (2013): Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. Cellular and molecular life sciences CMLS, 70 (21), p. 4117-4130. doi:10.1007/s00018-013-1330-4.
- [3] Ostrovidov S. et al. (2014): Skeletal muscle tissue engineering: methods to form skeletal myotubes and their applications. Tissue engineering. Part B, Reviews, 20 (5), p. 403-436. doi:10.1089/ten.TEB.2013.0534.
- [4] Qazi T. H. et al. (2015): Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends. Biomaterials, 53, p. 502-521. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.02.110.
- [5] Beldjilali-Labro M. et al. (2018): Biomaterials in Tendon and Skeletal Muscle Tissue Engineering: Current Trends and Challenges. Materials (Basel, Switzerland), 11 (7) 8. doi:10.3390/ma11071116.
- [6] Han F. et al. (2020): Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 8, p. 83. doi:10.3389/fbioe.2020.00083.
- [7] Yusuf F., Brand-Saberi B. (2012): Myogenesis and muscle regeneration. Histochemistry and cell biology, 138 (2), p. 187-199. doi:10.1007/s00418-012-0972-x.
- [8] Wang J., Conboy I. (2010): Embryonic vs. adult myogenesis: challenging the 'regeneration recapitulates development' paradigm. Journal of molecular cell biology, 2 (1), p. 1-4. doi:10.1093/jmcb/mjp027.
- [9] Schmidt M. et al. (2019): Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. Cellular and Molecular Life Sciences, 76 (13), p. 2559-2570. doi:10.1007/s00018-019-03093-6.
- [10] Burattini S. et al.(2004): C2 C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. Eur J Histochem, Jul-Sep (48(3)), p. 223-233.
- [11] Yin H. et al. (2013): Satellite cells and the muscle stem cell niche. Physiological reviews, 93 (1), p. 23-67. doi:10.1152/physrev.00043.2011.
- [12] Le Grand F., Rudnicki M. A. (2007): Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. Current opinion in cell biology, 19 (6), p. 628-633. doi:10.1016/j.ceb.2007.09.012.
- [13] Enwere E. K. et al. (2014): Role of the TWEAK-Fn14-cIAP1-NF-κB Signaling Axis in the Regulation of Myogenesis and Muscle Homeostasis. Frontiers in immunology, 5, p. 34. doi:10.3389/fimmu.2014.00034.
- [14] Fang C.-Y. et al. (2017): Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines. PloS one, 12 (6), e0178960. doi:10.1371/journal.pone.0178960.
- [15] Hupkes M. et al. (2011): Epigenetics: DNA demethylation promotes skeletal myotube maturation. FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 25 (11), p. 3861-3872. doi:10.1096/fj.11-186122.
- [16] Frenzel M. (2022): Charakterisierung der myogenen Differenzierung von C2C12-Mausmyoblasten als Modell der Skelettmuskelentwicklung. Bachelorarbeit. Riesa.
- [17] Gstraunthaler G., Lindl T. (2013): Zell- und Gewebekultur. Berlin, Heidelberg (Springer)



- [18] Veliça P., Bunce C. M. (2011): A quick, simple and unbiased method to quantify C2C12 myogenic differentiation. *Muscle & nerve*, 44 (3), p. 366-370. doi:10.1002/mus.22056.
- [19] Reinking L. (2007): *ImageJ Basics*. Biology 211 Laboratory Manual.
- [20] Rao X. et al. (2013): An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 3 (3), p. 71-85.
- [21] Ricotti L. et al. (2012): Proliferation and skeletal myotube formation capability of C2C12 and H9c2 cells on isotropic and anisotropic electrospun nanofibrous PHB scaffolds. *Biomedical materials (Bristol, England)*, 7 (3), p. 35010. doi:10.1088/1748-6041/7/3/035010.
- [22] Arya M. A. et al. (2013): Notch pathway activation contributes to inhibition of C2C12 myoblast differentiation by ethanol. *PloS one*, 8 (8), e71632. doi:10.1371/journal.pone.0071632.
- [23] Han D.-S. et al. (2017): Dexamethasone Treatment at the Myoblast Stage Enhanced C2C12 Myocyte Differentiation. *International journal of medical sciences*, 14 (5), p. 434-443. doi:10.7150/ijms.18427.
- [24] Yoshida N. et al. (1998): Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *Journal of cell science*, 111 (Pt 6), p. 769-779. doi:10.1242/jcs.111.6.769.
- [25] Bajaj P. et al. (2011): Patterning the differentiation of C2C12 skeletal myoblasts. *Integrative biology quantitative biosciences from nano to macro*, 3 (9), p. 897-909. doi:10.1039/c1ib00058f.
- [26] Steffens A. A. et al. (2011): Sodium arsenite delays the differentiation of C2C12 mouse myoblast cells and alters methylation patterns on the transcription factor myogenin. *Toxicology and applied pharmacology*, 250 (2), p. 154-161. doi:10.1016/j.taap.2010.10.006.
- [27] Willkomm L. et al. (2014): Lactate regulates myogenesis in C2C12 myoblasts in vitro. *Stem cell research*, 12 (3), p. 742-753. doi:10.1016/j.scr.2014.03.004.
- [28] Leciejewska N. et al. (2022): Ostarine-Induced Myogenic Differentiation in C2C12, L6, and Rat Muscles. *International journal of molecular sciences*, 23 (8). doi:10.3390/ijms23084404.
- [29] Asfour H. A. et al. (2018): Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 243 (2), p. 118-128. doi:10.1177/1535370217749494.
- [30] bio-techne (2020): Myosin Heavy Chain Antibody.
- [31] Welsch U., Deller T. (2010): *Lehrbuch Histologie*. 3rd ed. München (Elsevier Urban & Fischer).

#### Abkürzungen

|       |  |
|-------|--|
| BSA   | bovines Serumalbumin                                   |
| MyHC  | engl. myosin heavy chain                               |
| cDNA  | engl. complementary DNA                                |
| MyLC  | engl. myosin light chain                               |
| DAPI  | 4',6-Diamidino-2-phenylindol                           |
| MyoG  | Myogenin   |
| DNA   | engl. deoxyribonucleic acid                            |
| MyoG+ | Myogenin-positiv                                       |
| DSMZ  | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| NCBI  | engl. National Center for Biotechnology Information    |
| FCS   | engl. fetal calf serum                                 |
| qPCR  | quantitative Polymerase-Kettenreaktion                 |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase               |
| RNA   | engl. ribonucleic acid                                 |
| MRF   | engl. muscle regulatory factors                        |
| RT    | Reverse Transkriptase                                  |
| mRNA  | engl. messenger-RNA                                    |
| TE    | engl. tissue engineering                               |