

Sachbericht „Talente für Sachsens an der Berufsakademie“ des SMWK

Projekttitle

Etablierung eines Modellsystems zur Herstellung einfacher Muskelgewebeersatzstoffe auf der Basis von C2C12-Muskelzellen für die Regeneration von Skelettmuskelgewebe bei Muskelverletzungen oder Muskeldystrophien mittels Tissue Engineering

Projektverantwortliche

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

Staatliche Studienakademie Riesa, Studiengang Labor- und Verfahrenstechnik

Sachbericht

Ziel des abgeschlossenen Projektes war die Etablierung eines Modellsystems zur Herstellung einfacher Muskelgewebeersatzstoffe. Als Ausgangspunkt dienten murine C2C12-Myoblasten. Diese sollten zunächst hinsichtlich ihres Wachstums und ihres Differenzierungspotenzials in einer klassischen Zellkulturumgebung untersucht werden. Anschließend war geplant, unterschiedliche Hydrogel-bildende Biopolymere (z.B. Kollagen, Matrigel, Alginat) mit den C2C12-Myoblasten zu besiedeln und die Bildung von Muskelgewebe zu charakterisieren.

Beschreibung des Vorhabens

Kommt es bei einem Patienten durch Erkrankung, eine Verletzung oder einen Tumor zu einer Verletzung bzw. einem völligen Verlust an Skelettmuskulatur, ist der Skelettmuskel, anders als der Knochen oder die Haut, nicht in der Lage diese Muskelbereiche zu reparieren. Herkömmliche chirurgische Behandlungen führen nur zu einem begrenzten Erfolg, einen Muskelverlust wiederherzustellen. Im Gegensatz zur Haut oder zum Knochen existieren für die Skelettmuskelreparatur keine geeigneten synthetischen Materialien.

Eine Alternative für herkömmliche Behandlungsverfahren stellt das Tissue-Engineering von Muskelgewebe dar. Hier sollen künstlich im Labor hergestellte Gewebeersatzstoffe für die funktionelle und ästhetische Rekonstruktion von geschädigtem Skelettmuskel verwendet werden (Abbildung 1).

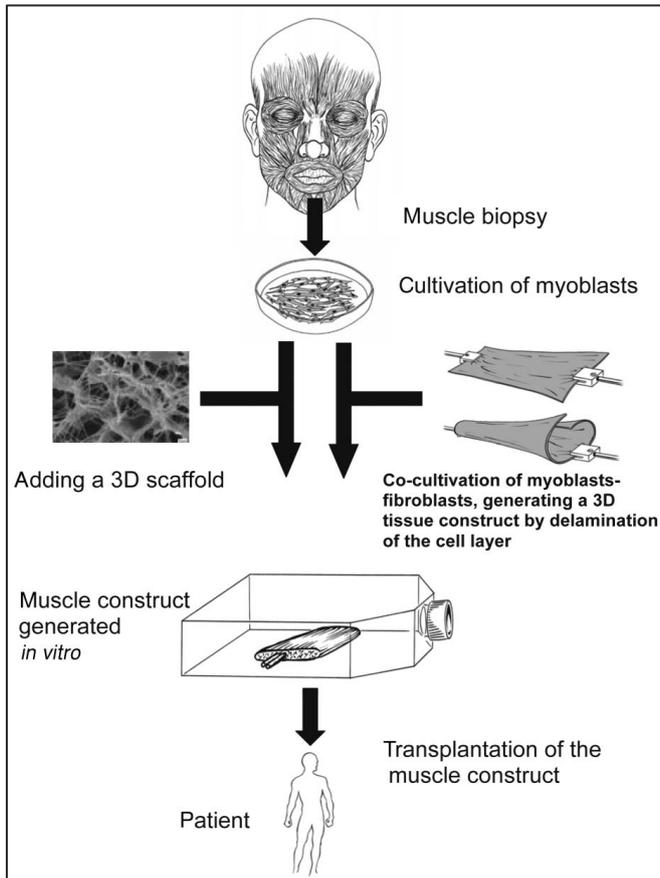


Abbildung 1. Konzept des Skelettmuskel-Tissue Engineering (Stern-Straeter2007*)

Dem Patienten wird mittels Biopsie ein Stück Muskelgewebe entnommen. Aus diesem werden die Skelettmuskel-Zellen (Myoblasten) isoliert und vermehrt (Kultivierung). Die Zellen werden dann in einem geeigneten bioabbaubaren Trägergerüst (3D-Scaffold) zur Bildung von Muskelfasern angeregt. Der so im Labor hergestellte Skelettmuskel wird abschließend dem Patienten an die defekte Stelle transplantiert.

*Stern-Straeter J, Riedel F, Bran G, Hörmann K, Goessler UR. Advances in skeletal muscle tissue engineering. In Vivo. 2007 May-Jun;21(3):435-44.

Um Muskelgewebe im Labor zu generieren, können Muskelvorläuferzellen (z.B. Myoblasten) zum Beispiel in einem Kollagen- oder Gelatine-Hydrogel kultiviert (Trägergerüst bzw. 3D-Scaffold) und zur Differenzierung angeregt werden. Dabei verschmelzen die Myoblasten letztlich zu Muskelfasern. Für so gezüchtete Muskelgewebe ist ein Einsatz sowohl in der regenerativen Medizin (Muskelverletzungen, Muskeldefekte oder Muskeldystrophien) aber auch als Krankheitsmodellssystem für die genannte Erkrankung sowie für die Produktion von Fleisch vorstellbar.

Ziel des vorliegenden Projektes ist die Etablierung eines Modellsystems zur Herstellung einfacher Muskelgewebeersatzstoffe. Ausgangspunkt sind murine C2C12-Myoblasten. Diese sollen zunächst hinsichtlich ihres Wachstums und ihres Differenzierungspotenzials in einer klassischen Zellkulturumgebung untersucht werden. Anschließend ist geplant, unterschiedliche Hydrogel-bildende Biopolymere (z.B. Kollagen, Matrigel) mit den C2C12-Myoblasten zu besiedeln und die Bildung von Muskelgewebe zu charakterisieren.

Wachstumsverhalten der C2C12-Zellen

Das optimale Wachstum der C2C12-Muskelzellen ist stark abhängig von der initialen Zellzahl. Als optimal stellte sich eine Zellzahl von 250 Zellen/cm² heraus (Abbildung 2 A). Für diese Zellzahl lag die

schnellste Verdopplungszeit von 0,64 Tagen vor. Höhere initiale Zellzahlen zeigen langsamere Verdopplungszeiten von 0,76-1,75 Tagen (Abbildung 2 B).

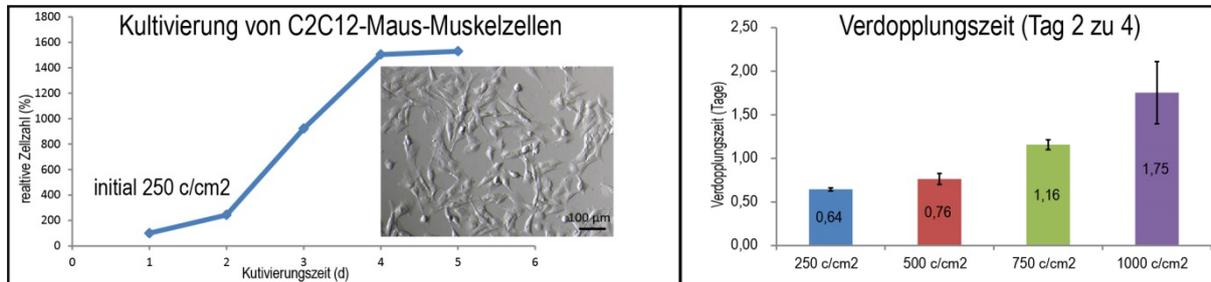


Abbildung 2. Darstellung des Zellwachstums von C2C12-Zellen.

(A) Wachstumskurve von C2C12 anhand der relativen Zellzahl ausgehend von einer initialen Zellzahl von 250 Zellen/cm sowie eine repräsentative Darstellung der Morphologie von C2C12-Zellen an Tag 3. (B) Darstellung der Verdopplungszeiten zwischen Tag 2 und 4 von C2C12-Zellen in Abhängigkeit der initialen Zellzahl.

Differenzierung von C2C12-Zellen

Die Differenzierung der Muskelzellen zeichnet sich morphologisch durch ein Verlängern und Aneinanderlagern einzelner Zellen sowie durch ein Verschmelzen aus (Abbildung 3). Untersuchungen zur Anzahl und Größe der differenzierten Zellen unterstützen den Differenzierungsprozess der Zellen (Daten nicht gezeigt).

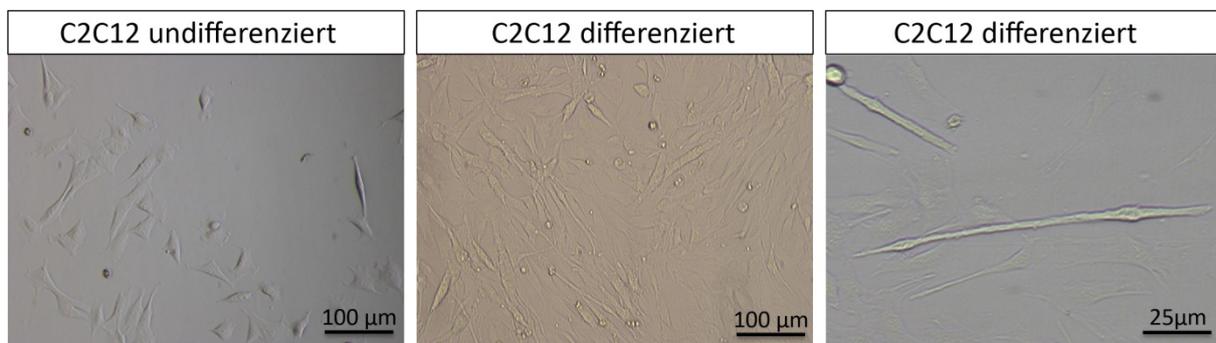


Abbildung 3. Darstellung der Differenzierung von C2C12-Zellen.

Undifferenzierte Zellen zeigen sich als einzelne Zellen mit einer spindel- bis sternförmigen Morphologie. Während der Differenzierung werden die Zellen länger, lagern sich aneinander und beginnen zu verschmelzen.

Neben morphologischen Veränderungen der Zellen, verändert sich während der Differenzierung das Expressionsprofil der Zellen. Mittels einer quantitativer PCR konnten erste Erkenntnisse über diese Veränderungen erlangt werden. Es wurde das Vorkommen verschiedener, für die Differenzierung von Muskelzellen spezifische Proteine, untersucht (Myogenin, MRF4, Pax7, MyoD, Myf5). Es konnte ein erster Verlauf der Expression (Vorkommen und Zeitpunkt) während der Differenzierung aufgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Hier sind weitere Untersuchungen von Nöten.

Etablierung von Hydrogelen als Träger von Zellen

Im zweiten Teil des Projektes wurde die Herstellung von Alginatbeads realisiert. Beads mit unterschiedlicher Alginat-Konzentration und mit unterschiedlichen Durchmessern konnten hergestellt und charakterisiert werden (Abbildung 4 A).

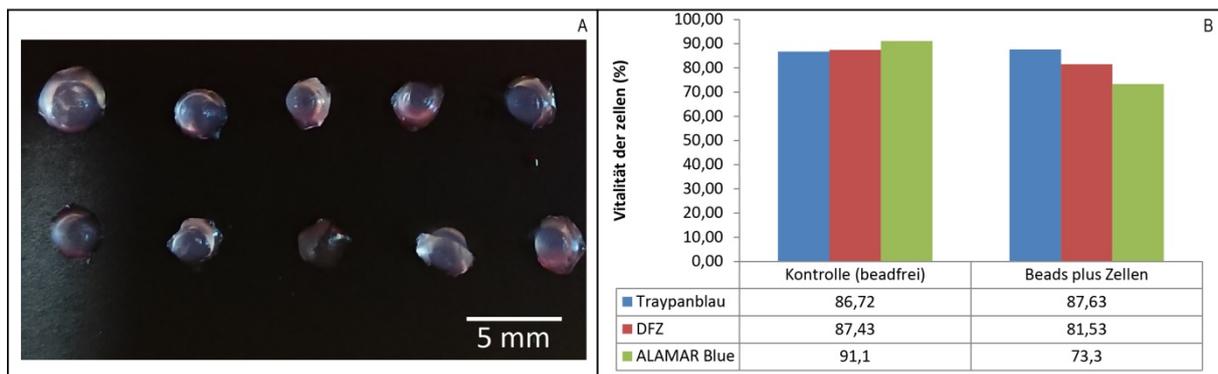


Abbildung 4. (A) Alginat-Hydrogel-Beads (Alginat-Konzentration 2%). (B) Vergleich von Vitalitäts-Assays.

Nach der Etablierung des Alginat-Herstellungsverfahrens wurden die Beads mit C2C12-Zellen beladen. Verschiedene Untersuchungsmethoden zur Vitalität der Zellen zeigten, dass ca. 75 % der eingebrachten Zellen überlebten (Daten nicht gezeigt). Diese Zellen weisen eine hohe Vitalität von 73-78 % auf (Abbildung 4 B). Weitere geplante Versuche sollen zusätzlich zum Alginat z.B. Kollagen für die Herstellung der Hydrogele nutzen. Außerdem soll die Charakterisierung der Zellen sowie deren Differenzierungsverhalten genauer untersucht werden.