

**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann**

**Morphologische Untersuchungen an Myoblasten von Patienten,  
die an facioscapulohumeraler Muskeldystrophie (FSHD) leiden**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Stefanie Martina Kißner, geb. Stenger  
aus Frammersbach**

**Würzburg, April 2017**

**Referentin:** Prof. Dr. Claudia Sommer

**Koreferentin:** Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 11. Januar 2018

**Die Promovendin ist Zahnärztin**

***Für Mama und Papa***

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>X</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Kernhülle .....	1
1.2 Kernlamina .....	3
1.3 Mitochondrien .....	4
1.4 Skelettmuskulatur.....	7
1.5 Facioscapulohumerale Muskeldystrophie (FSHD).....	10
1.5.1 Epidemiologie und Klinik .....	10
1.5.2 Genetik .....	12
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	14
<b>2 MATERIAL UND GERÄTE.....</b>	<b>16</b>
2.1 Zelllinien .....	16
2.2 Zellkulturmedien und -lösungen .....	17
2.3 Antikörper .....	18
2.3.1 Primärantikörper .....	18
2.3.2 Sekundärantikörper.....	18

<b>2.4</b>	<b>Chemikalien .....</b>	<b>19</b>
<b>2.5</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>20</b>
<b>2.6</b>	<b>Software .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Kultivieren von humanen Zellkulturen .....</b>	<b>22</b>
3.1.1	Auftauen von Kulturzellen .....	22
3.1.2	Mediumwechsel .....	23
3.1.3	Passagieren adhärenter Zellen .....	24
3.1.4	Einfrieren adhärenter Zellen .....	25
3.1.5	Umsetzen auf Deckgläschen.....	27
3.1.6	Umsetzen auf Saphirplättchen .....	28
<b>3.2</b>	<b>Elektronenmikroskopie – konventionell.....</b>	<b>30</b>
3.2.1	Chemische Fixierung von Kulturzellen.....	30
3.2.2	Entwässerung .....	33
3.2.3	Flacheinbettung.....	35
<b>3.3</b>	<b>Elektronenmikroskopie – High Pressure Freezing (HPF) .....</b>	<b>36</b>
3.3.1	Kohlebedampfung von Saphirplättchen .....	36
3.3.2	Hochdruckgefrieren – High Pressure Freezing (HPF).....	38
3.3.3	Gefriersubstitution – Freeze Substitution (FS) .....	42
3.3.4	Infiltration und Einbettung in Epon .....	44
<b>3.4</b>	<b>Anfertigung von Ultradünnschnitten .....</b>	<b>45</b>
<b>3.5</b>	<b>Kontrastieren von Ultradünnschnitten.....</b>	<b>46</b>
<b>3.6</b>	<b>Indirekte Immunfluoreszenz.....</b>	<b>48</b>
3.6.1	Fixierung .....	48
3.6.1.1	Fixierung mittels Methanol und Aceton.....	49
3.6.1.2	Fixierung mittels Paraformaldehyd und Triton X-100 .....	49
3.6.2	Antikörperinkubation und Fixierung auf dem Objektträger mit Mowiol .....	50

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Elektronenmikroskopie</b> .....	<b>51</b>
4.1.1	Konventionelle Fixierung .....	52
4.1.2	High Pressure Freezing (HPF).....	65
4.1.3	Vergleich von konventioneller Fixierung und HPF.....	76
<b>4.2</b>	<b>Indirekte Immunfluoreszenz</b> .....	<b>91</b>
4.2.1	Nachweis und Verteilung der Lamine A und C .....	92
4.2.2	Nachweis und Verteilung der Kernporen .....	105
4.2.3	Nachweis und Verteilung von ANT1 und ANT2 .....	118
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>123</b>
<b>5.1</b>	<b>Elektronenmikroskopie</b> .....	<b>124</b>
5.1.1	Konventionelle Fixierung: Veränderte Kernhülle und Mitochondrien .....	124
5.1.2	Auffälligkeiten an Kernhülle und Mitochondrien bei HPF-fixierten Myoblasten .....	127
5.1.3	HPF und konventionelle Fixierung: Unterschiede und Gemeinsamkeiten .....	128
5.1.4	Gehäuftes Auftreten von morphologischen Atypien in höheren Passagen .....	131
<b>5.2</b>	<b>Indirekte Immunfluoreszenz</b> .....	<b>132</b>
5.2.1	Keine Auffälligkeiten in der Verteilung von Lamin A/C .....	132
5.2.2	Homogene Verteilung der Kernporen .....	132
5.2.3	ANT1/2: Mehr Signale bei NO44 und MO54 .....	133
5.2.4	Atypisch geformte Zellkerne bei FSHD-Myoblasten .....	135
<b>5.3</b>	<b>Keine Auffälligkeiten der Zellkernform</b> .....	<b>136</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>137</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>141</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Übersicht über die Organisation der Kernhülle.....	2
Abbildung 2: Struktur von Prälamina A/C .....	3
Abbildung 3: Schematische Übersicht eines Mitochondriums .....	6
Abbildung 4: Aufbau eines Skelettmuskels .....	9
Abbildung 5: Übersicht über die betroffenen Muskelgruppen bei FSHD .....	11
Abbildung 6: Schematische Darstellung des bei FSHD betroffenen Genabschnittes in verschiedenen Ausprägungen .....	12
Abbildung 7: Modell für die Entstehung von FSHD auf molekularer Ebene .....	14
Abbildung 8: Wellplatte mit Saphiren, Myoblastenmedium und verschiedenen Myoblasten .....	29
Abbildung 9: Kohlebedampfen der Saphirplättchen.....	37
Abbildung 10: Vorbereiteter Arbeitsplatz für HPF .....	39
Abbildung 11: Schemazeichnung der einzelnen Komponenten, die für das Hochdruckgefrieren der Saphire u.a. erforderlich sind.....	40
Abbildung 12: Das Hochdruckgefriersystem Leica EM HPM100 (A) und die schematische Darstellung der Gefrier-Patrone (B) .....	41
Abbildung 13: Vorbereitete Plastikschnappdeckel für die Infiltration von Epon .....	44
Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen der konventionell fixierten Myoblasten NO44 und MO54 .....	53
Abbildung 15: Vergrößerte Ausschnitte der Kernhülle der konventionell fixierten Myoblasten NO44 und MO54.....	55
Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen der konventionell fixierten Myoblasten NO45 und MO37 .....	57
Abbildung 17: Vergrößerte Ausschnitte der Kernhülle der konventionell fixierten Myoblasten NO45 und MO37 .....	59
Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen der konventionell fixierten Myoblasten 19951 und FSHD10.....	61

Abbildung 19: Vergrößerungen der Kernhülle von 19951 und FSHD10 nach konventioneller Fixierung .....	63
Abbildung 20: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen der HPF-fixierten Myoblasten NO44 und MO54.....	66
Abbildung 21: Vergrößerungen der Kernhülle der HPF-fixierten Myoblasten NO44 und MO54 .....	67
Abbildung 22: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen der Myoblasten NO45 und MO37, fixiert nach der HPF-Methode .....	69
Abbildung 23: Vergrößerungs-Ausschnitte der Kernhülle der HPF-fixierten Myoblasten NO45 und MO37 .....	71
Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen der HPF-fixierten Myoblasten 19951 und FSHD10 .....	73
Abbildung 25: Vergrößerungen der Kernhülle von 19951 und FSHD10, fixiert nach der HPF-Methode.....	74
Abbildung 26: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen der konventionell und HPF-fixierten gesunden Myoblasten NO44 .....	77
Abbildung 27: Vergrößerte Kernhüllen-Ausschnitte der gesunden NO44-Myoblasten nach konventioneller und HPF-Fixierung .....	78
Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen der FSHD-Myoblasten MO54 nach konventioneller und HPF-Fixierung .....	79
Abbildung 29: Vergrößerungs-Ausschnitte der Kernhülle von MO54 nach konventioneller und HPF-Fixierung .....	80
Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen der konventionell und HPF-fixierten Kontrollzellen NO45.....	81
Abbildung 31: Vergrößerte Ausschnitte der Kernhülle der gesunden Myoblasten NO45 nach konventioneller und HPF-Fixierung .....	82
Abbildung 32: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen der MO37-Myoblasten von FSHD-Patienten nach konventioneller und HPF-Fixierung.....	83
Abbildung 33: Vergrößerte Ausschnitte der Kernhülle der erkrankten MO37-Myoblasten nach konventioneller und HPF-Fixierung .....	85

Abbildung 34: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der konventionell und HPF-fixierten Kontrollzellen 19951 in der Übersicht .....	86
Abbildung 35: Vergrößerungen der Kernhülle der konventionell und HPF-fixierten Kontroll-Myoblasten 19951 .....	87
Abbildung 36: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen der erkrankten FSHD10-Myoblasten nach konventioneller und HPF-Fixierung .....	88
Abbildung 37: Vergrößerungs-Ausschnitte der Kernhülle von FSHD10 nach konventioneller und HPF-Fixierung .....	89
Abbildung 38: Lokalisation von Lamin A/C durch Immunfluoreszenz auf die Kontroll-Myoblasten NO44 #6 .....	93
Abbildung 39: Lokalisation von Lamin A/C durch Immunfluoreszenz auf die FSHD-Myoblasten MO54 #6 .....	94
Abbildung 40: Lokalisation von Lamin A/C durch Immunfluoreszenz auf die gesunden Myoblasten NO44 #16 .....	95
Abbildung 41: Lokalisation von Lamin A/C durch Immunfluoreszenz auf die FSHD-Myoblasten MO54 #16 .....	96
Abbildung 42: Lokalisation von Lamin A/C durch Immunfluoreszenz auf die gesunden Myoblasten NO45 #6 .....	97
Abbildung 43: Lokalisation von Lamin A/C durch Immunfluoreszenz auf die FSHD-Myoblasten MO37 #6 .....	98
Abbildung 44: Lokalisation von Lamin A/C durch Immunfluoreszenz auf die Kontrollzellen NO45 #16.....	99
Abbildung 45: Lokalisation von Lamin A/C durch Immunfluoreszenz auf die FSHD-Myoblasten MO37 #16 .....	100
Abbildung 46: Lokalisation von Lamin A/C durch Immunfluoreszenz auf die Kontroll-Myoblasten 19951 #6 .....	101
Abbildung 47: Lokalisation von Lamin A/C durch Immunfluoreszenz auf die erkrankten Myoblasten FSHD10 #6.....	102
Abbildung 48: Lokalisation von Lamin A/C durch Immunfluoreszenz auf die Kontroll-Myoblasten 19951 #16 .....	103

Abbildung 49: Lokalisation von Lamin A/C durch Immunfluoreszenz auf die FSHD-Myoblasten FSHD10 #16.....	104
Abbildung 50: Immunfluoreszenz mit dem Antikörper Mab414 gegen Proteine der Kernporenkomplexe auf die Kontrollzellen NO44 #6.....	106
Abbildung 51: Immunfluoreszenz mit dem Antikörper Mab414 gegen Proteine der Kernporenkomplexe auf die FSHD-Myoblasten MO54 #6 .....	107
Abbildung 52: Immunfluoreszenz mit dem Antikörper Mab414 gegen Proteine der Kernporenkomplexe auf die Kontroll-Myoblasten NO44 #16.....	108
Abbildung 53: Immunfluoreszenz mit dem Antikörper Mab414 gegen Proteine der Kernporenkomplexe auf die erkrankten Myoblasten MO54 #16 .....	109
Abbildung 54: Immunfluoreszenz mit dem Antikörper Mab414 gegen Proteine der Kernporenkomplexe auf die gesunden Myoblasten NO45 #6 .....	110
Abbildung 55: Immunfluoreszenz mit dem Antikörper Mab414 gegen Proteine der Kernporenkomplexe auf die FSHD-Myoblasten MO37 #6 .....	111
Abbildung 56: Immunfluoreszenz mit dem Antikörper Mab414 gegen Proteine der Kernporenkomplexe auf die Kontroll-Myoblasten NO45 #16.....	112
Abbildung 57: Immunfluoreszenz mit dem Antikörper Mab414 gegen Proteine der Kernporenkomplexe auf die FSHD-Myoblasten MO37 #16 .....	113
Abbildung 58: Immunfluoreszenz mit dem Antikörper Mab414 gegen Proteine der Kernporenkomplexe auf die Kontrollzellen 19951 #6.....	114
Abbildung 59: Immunfluoreszenz mit dem Antikörper Mab414 gegen Proteine der Kernporenkomplexe auf die erkrankten Myoblasten FSHD10 #6.....	115
Abbildung 60: Immunfluoreszenz mit dem Antikörper Mab414 gegen Proteine der Kernporenkomplexe auf die gesunden Myoblasten 19951 #16 .....	116
Abbildung 61: Immunfluoreszenz mit dem Antikörper Mab414 gegen Proteine der Kernporenkomplexe auf die erkrankten Myoblasten FSHD10 #16.....	117
Abbildung 62: Lokalisation von ANT1 und ANT2 der Mitochondrien durch Immunfluoreszenz auf die gesunden Myoblasten NO44 #16 .....	119
Abbildung 63: Lokalisation von ANT1 und ANT2 der Mitochondrien durch Immunfluoreszenz auf die FSHD-Myoblasten MO54 #16 .....	120

Abbildung 64: Lokalisation von ANT1 und ANT2 der Mitochondrien durch Immunfluoreszenz auf die Kontrollzellen 19951 #16.....	121
Abbildung 65: Lokalisation von ANT1 und ANT2 der Mitochondrien durch Immunfluoreszenz auf die erkrankten Myoblasten FSHD10 #16.....	122

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Muskelfasertypen der Halte- und Bewegungsmuskulatur im Vergleich..	8
Tabelle 2:	Übersicht über die verwendeten Myoblasten.....	16
Tabelle 3:	Verwendete Myoblasten mit Angabe von Alter und Geschlecht der Patienten, der Entnahmestelle des Gewebes und der Anzahl an D4Z4-Wiederholungen .....	16
Tabelle 4:	Verwendete Primärantikörper für die Immunfluoreszenz (IF) .....	18
Tabelle 5:	Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz (IF) .....	18
Tabelle 6:	Verwendete Geräte mit Angabe der Herkunft .....	20
Tabelle 7:	Verwendete Software mit Angabe der Herkunft.....	21

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

#	Passage
%	Prozent
>	größer als
®	Registered
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Aktiengesellschaft
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokator
ATP	Adenosintriphosphat
BSC	Biohazard Safety Cabin
BV	besloten vennootschap; entspricht im Deutschen der GmbH
bzw.	beziehungsweise
CHRU	Centre Hospitalier Régional Universitaire
Co.	Compagnie; Firmenzusatz als Hinweis auf weitere Gesellschafter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
DDSA	dodecyl succinic anhydride
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid; deutsch: Desoxyribonukleinsäure
DUX4	double homeobox 4
EDMD	Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat
EMG	Elektromyographie oder Elektromyogramm
engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FBS	fetal bovine serum; deutsch: fetales Rinderserum
FCS	fetal calf serum; deutsch: fetales Kälberserum
FSHD	facioscapulohumerale Muskeldystrophie
g	Gramm
Gew.	Gewicht
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HPF	High-Pressure-Freezing; deutsch: Hochdruckgefrieren, Kryofixierung unter hohem Druck
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IgG <sub>1</sub>	Immunglobulin G <sub>1</sub>
IMM	inner mitochondrial membrane; deutsch: innere Mitochondrienmembran
INM	inner nuclear membrane; deutsch: innere Kernmembran
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KG	Kommanditgesellschaft
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
M	molar
M./Mm.	Musculus/Musculi

## Abkürzungsverzeichnis

---

Mab	monoclonal antibody; deutsch: monoklonaler Antikörper
mbar	Millibar
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
MNA	methyl nadic anhydride
mtDNA	mitochondriale DNA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NES	nuclear export signal, deutsch: nukleäres Exportsignal oder Kernexportsignal
NLS	nuclear localization signal; deutsch: Kernlokalisationsignal oder Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
OMM	outer mitochondrial membrane; deutsch: äußere Mitochondrienmembran
ONM	outer nuclear membrane; deutsch: äußere Kernmembran
OsO <sub>4</sub>	Osmiumtetroxid
PBS	phosphate buffered saline; deutsch: phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PNS	perinuclear space; deutsch: perinukleärer Raum
Pte. Ltd.	Private Limited
RNA	ribonucleic acid; deutsch: Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute; deutsch: Umdrehungen pro Minute
SMCHD1	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
™	Trademark
u.a.	unter anderem
UA	Uranylacetat
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 KERNHÜLLE

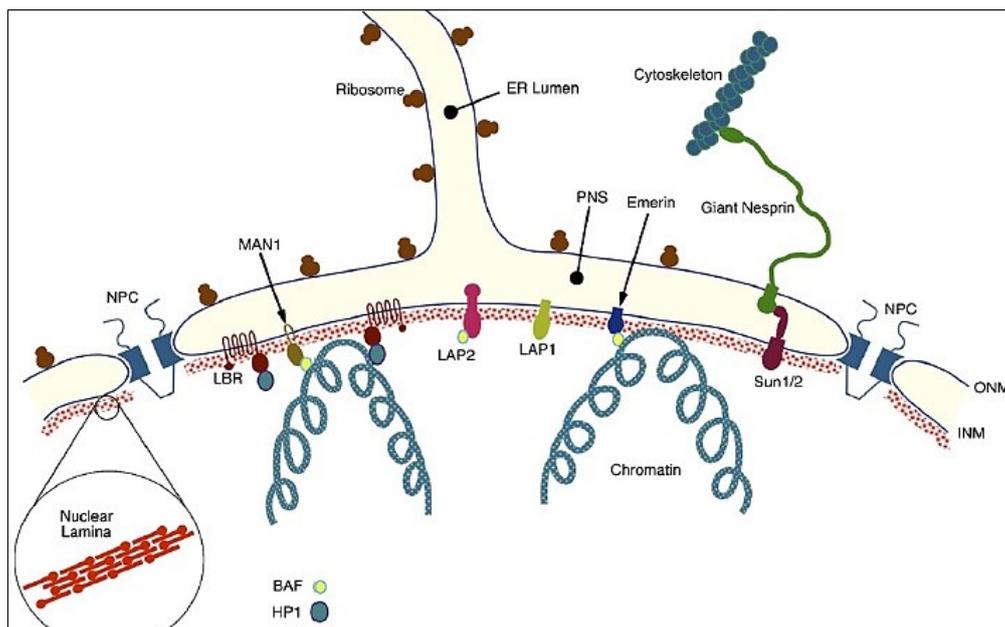
Der Intrazellularraum eukaryotischer Zellen wird durch die Trennung in zwei Kompartimente charakterisiert. Einerseits der Zellkern, der die Erbinformation und die für die Transkription relevanten Strukturen enthält, und andererseits das Zytoplasma mit Translationsapparat, Zellorganellen und weiteren Komponenten (Franke et al., 1981). Innerhalb des Zellkerns liegt die DNA als Chromatin vor (Spagnol et al., 2016). Man unterscheidet zwei Chromatin-Strukturen. Es ist entweder als dicht gepacktes Heterochromatin organisiert, das nicht transkribiert wird und mit der Kernlamina assoziiert ist, oder liegt als lockeres, transkriptionsaktives Euchromatin vor. Durch die Kernhülle werden Vorgänge, die innerhalb des Zellkerns stattfinden, räumlich von denjenigen im Zytoplasma getrennt (Gant and Wilson, 1997; Gondor and Ohlsson, 2009). Über die Kernporen innerhalb der Kernhülle stehen Nukleoplasma und Zytosol miteinander in Verbindung. Kernporen stellen große, komplexe Strukturen dar, welche aus circa 30 unterschiedlichen Proteinen zusammengesetzt sind (Alberts, 2012; Roux and Burke, 2007). Ionen, Metabolite und Moleküle, die kleiner sind als circa 30 bis 40 kDa können über die Kernporen ungehindert zwischen Kern und Zytosol hindurchtreten. Makromoleküle und andere größere Partikel werden aktiv transportiert. Der Import erfolgt mithilfe des Kernlokalisationssignals (NLS). Durch das nukleäre Exportsignal (NES) wird der Export ermöglicht. Außerdem sind weitere Faktoren, darunter Importine, Exportine, Rezeptoren und Adaptoren, an dem Transport beteiligt (Gant and Wilson, 1997; Gorlich, 1998; Guttler and Gorlich, 2011; Mohr et al., 2009; Weis et al., 1996).

Die Kernhülle setzt sich aus der inneren (INM) und der äußeren (ONM) Kernmembran, der Kernlamina und den Kernporen zusammen (Martinez-Vieyra et al., 2013). ONM und INM verlaufen in einem Abstand von ungefähr 10 bis 30 nm nahezu parallel zueinander und werden durch den perinukleären Raum (PNS) voneinander abgegrenzt (Newport and Forbes, 1987; Watson, 1959).

Innere und äußere Kernmembran und das endoplasmatische Retikulum (ER) bilden ein durchgehendes Membransystem. Das Lumen des endoplasmatischen Retikulums setzt sich perinukleär in Form des PNS fort. In ihrer Zusammensetzung ähnelt die äußere Kernmembran der Membran des endoplasmatischen Retikulums, mit welcher sie in Verbindung steht. Die Innenseite der inneren Kernmembran wird von einem zweidimensionalen Geflecht aus Intermediärfilamenten, welches als Kernlamina bezeichnet wird, ausgekleidet und strukturell gestützt (Alberts, 2012; Roux and Burke, 2007).

Während der Mitose wird die Kernhülle in ihre Bestandteile zerlegt. Dabei kommt es zur Depolymerisation und Phosphorylierung der Lamina und zum Zerfall von innerer und äußerer Kernmembran und der Kernporen. Damit ein Wiederaufbau der Kernhülle nach der Mitose möglich ist, müssen die Kernmembranen, die Lamina und die Kernporen zurück auf die Chromatinoberfläche ausgerichtet werden (Gerace and Blobel, 1980; Miake-Lye and Kirschner, 1985; Newport et al., 1990).

Eine Übersicht über die Organisation der Kernhülle gibt Abbildung 1.

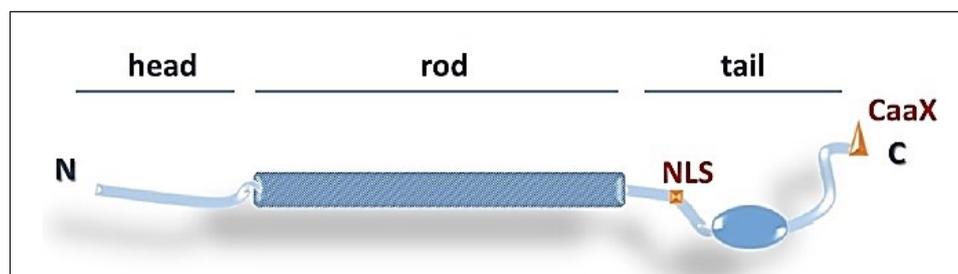


**ABBILDUNG 1: ÜBERSICHT ÜBER DIE ORGANISATION DER KERNHÜLLE**

Gezeigt werden die Kernlamina, bestehend aus Lamin-Oligomeren, und einige Proteine der INM und ONM. Proteine der INM sind der Lamin-B-Rezeptor (LBR), die Lamina-assoziierten Proteine 1 und 2 (LAP1 und LAP2), MAN1, Emerin und Sun1/2. Dabei dient Sun1/2 durch Interaktion mit dem perinukleären Raum (PNS) als Halteelement für Nesprin-2, das in der ONM lokalisiert ist. Die ONM geht in das endoplasmatische Retikulum (ER) über. Heterochromatin-Protein-1 (HP1) und barrier to autointegration factor (BAF) sind an INM-Proteindomänen gekoppelt, die dem Nucleoplasma zugewandt sind, und stellen eine Verbindung zwischen Chromatin und Kernhülle her. Außerdem ist das Chromatin in der Kernlamina verankert (Roux and Burke, 2007).

## 1.2 KERNLAMINA

Lamine sind die Hauptbestandteile der 20 bis 50 nm dicken Kernlamina. Als Intermediärfilament-Proteine vom Typ V zeigen sie einen dreiteiligen Aufbau (siehe Abbildung 2). Die zentrale alpha-helikale Stabdomäne wird von einer kurzen amino-terminalen Kopfdomäne und einer globulären carboxy-terminalen Schwanzdomäne flankiert. Die carboxy-terminale Domäne umfasst neben dem Kernlokalisierungssignal (NLS) auch eine Erkennungssequenz für die Isoprenylierung, die als CaaX-Sequenz bezeichnet wird (Alberts, 2012; Moir et al., 2000; Roux and Burke, 2007).



**ABBILDUNG 2: STRUKTUR VON PRÄLAMIN A/C**

Schematische Darstellung des Prälamins-Proteins mit den wichtigsten strukturellen Merkmalen und dem typischen dreigeteilten Aufbau. Man unterscheidet die kurze amino-terminale Kopfdomäne („head“), die zentrale alpha-helikale Stabdomäne („rod“) und die globuläre carboxy-terminale Schwanzdomäne („tail“). Letztere umfasst neben dem Kernlokalisierungssignal (NLS) auch eine Erkennungssequenz für eine Farnesyltransferase, die als CaaX-Motiv bezeichnet wird (Mattout et al., 2015).

Intermediärfilamente sind seilartige Fasern, die sich aus zahlreichen verdrehten, langen Strängen zusammensetzen und eine große Zugfestigkeit aufweisen. Sie bestehen aus langgestreckten fibrillären Proteinen und ihr Durchmesser liegt bei ungefähr 10 nm (Alberts, 2012).

Die Unterscheidung von Laminen und zytoplasmatischen Intermediärfilamenten beruht auf der Länge der Aminosäuresequenz, wobei erstere eine um 42 Aminosäuren längere Sequenz aufweisen. Weiterhin tragen die zytoplasmatischen Intermediärfilamente im Gegensatz zu den Laminen kein Kernlokalisierungssignal. Man differenziert zwischen Laminen vom Typ A und vom Typ B. B-Typ-Lamine besitzen einen sauren isoelektrischen Punkt und werden nach der Translation durch Isoprenylierung modifiziert, wobei das CaaX-Motiv erhalten bleibt. Dadurch wird die Anheftung an die INM selbst und deren

Proteine während der Interphase erleichtert und während der Mitose aufrechterhalten. Im Unterschied dazu weisen A-Typ-Lamine einen neutralen isoelektrischen Punkt auf und verteilen sich als lösliche Proteine während der Mitose, da das CaaX-Motiv im Rahmen der Prozessierung proteolytisch abgespalten wird (Gruenbaum et al., 2005; Monteiro et al., 1994; Stuurman et al., 1998).

Durch alternatives Spleißen codiert das LMNA-Gen für die vier Lamine A, C, A $\Delta$ 10 und C2. LMNB1 ist der Genort für das Lamin B1 und LMNB2 codiert für die B-Typ-Lamine B2 und B3. Die Lamine B1 und B2 werden ubiquitär exprimiert. Die Expression der Lamine A und C beschränkt sich hauptsächlich auf differenzierte Zellen. Neben der Stützfunktion für die Kernhülle spielen die A-Typ-Lamine eine Rolle bei der Chromatin-Organisation, der DNA-Replikation und der Regulation der Signalübermittlung (Burke and Stewart, 2006; Wilson, 2000; Wydner et al., 1996).

Die Lamina ist erforderlich für die Aufrechterhaltung von Größe und Form des Zellkerns und ist vermutlich auch bei der Chromatinorganisation beteiligt (Moir et al., 2000).

### 1.3 MITOCHONDRIEN

Die Mitochondrien gehören zu den auffälligsten Organellen im Zytoplasma und zeichnen sich durch ihre charakteristische Struktur aus. Sie sind in der Regel zylindrisch geformt, scharf begrenzt und können eine Länge von mehreren Mikrometern erreichen. Teilweise werden auch verzweigte Mitochondrien beschrieben (Alberts, 2012; Palade, 1952).

In Bezug auf die Mitochondrien-Größe gibt es nicht nur Unterschiede zwischen einzelnen Zellen des gleichen Zelltyps, sondern auch Variationen von einem Mitochondrium zum anderen (Palade, 1952; Zollinger, 1948).

Mitochondrien werden von zwei unterschiedlichen Membranen umschlossen (Frey and Mannella, 2000), wobei die innere Membran (IMM) viele Faltungen aufweist, die in das Innere des Mitochondriums reichen und als Cristae bezeichnet werden. Durch diese Oberflächenvergrößerung der Innenmembran steht mehr Platz für die ATP-Synthese zur Verfügung (Alberts, 2012).

Die Cristae verlaufen meist senkrecht zur Mitochondrien-Längsachse und sind weitestgehend parallel im gleichen Abstand angeordnet (Palade, 1952).

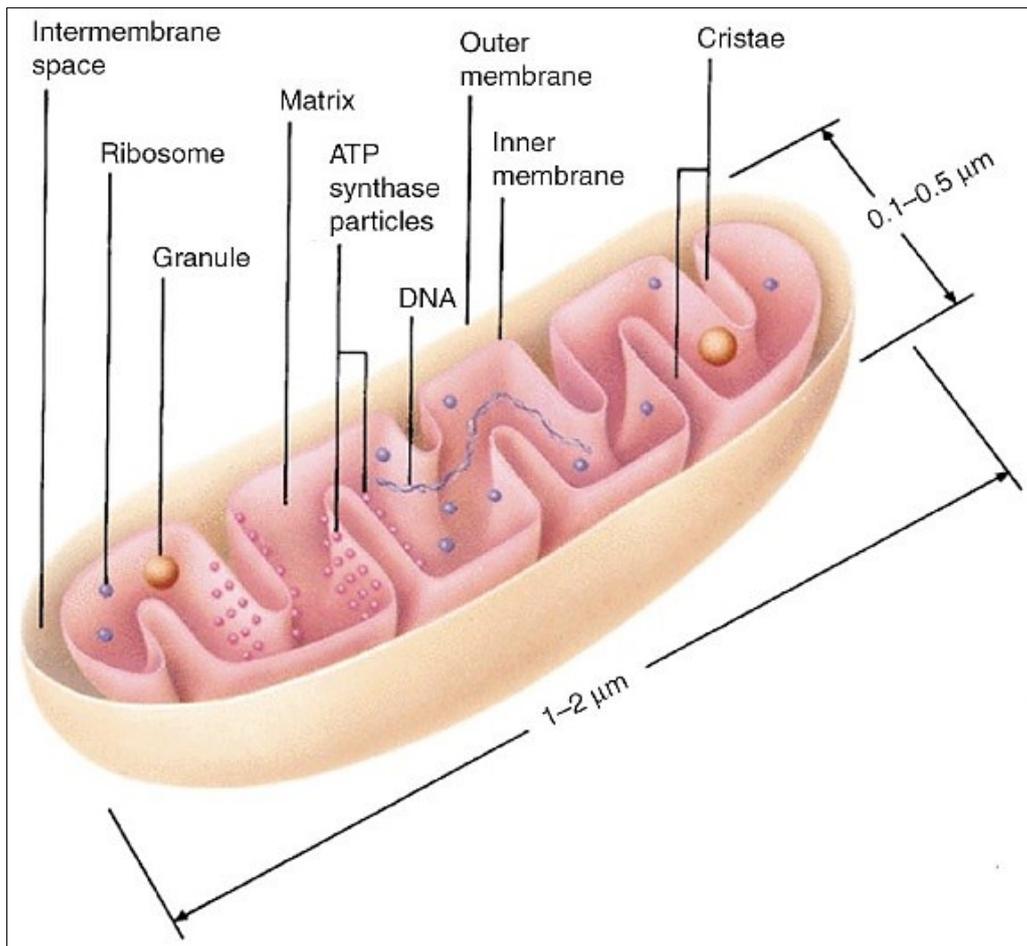
Die beiden Membranen sind hochspezialisiert und teilen das Mitochondrium in zwei Kompartimente: ein großer Innenraum, der Matrix genannt wird, und ein enger Intermembranraum (Alberts, 2012). Die Matrix beherbergt Enzyme des Intermediärstoffwechsels und zahlreiche mitochondriale DNA-Moleküle (mtDNA), die für einige mitochondriale Proteine und die für die Translation benötigten RNAs codieren. Die nukleäre DNA enthält die genetische Information für mehrere hundert weitere Proteine, die im Mitochondrium benötigt und nach der Proteinbiosynthese vom Zytosol ins Mitochondrium aufgenommen werden (Frey and Mannella, 2000).

In der äußeren Mitochondrienmembran (OMM) sind viele Porin-Moleküle zu finden. Durch diese Transportproteine werden wassergefüllte Kanäle durch die Lipiddoppelschicht gebildet. Dadurch ist die äußere Membran für Moleküle bis 5000 Dalton durchlässig und wirkt wie ein Sieb. Die innere Mitochondrienmembran ist weitgehend undurchlässig und beherbergt die ATP-Synthase, Proteine der Elektronentransportkette und viele Transportproteine (Alberts, 2012).

Durch oxidative Phosphorylierung erzeugen Mitochondrien den Großteil der chemischen Energie für die Zelle in Form von ATP und werden deshalb auch Kraftwerke der Zellen genannt (Alberts, 2012; Andersson et al., 2003; Wallace, 1999). Je nach Energiebedarf der Zelle variiert die Mitochondrien-Zahl in den verschiedenen Zelltypen erheblich (Alberts, 2012).

Die Entstehung der Mitochondrien reicht bis ungefähr 1,5 Milliarden Jahre zurück und beruht auf der symbiontischen Verbindung zwischen einem glykolytischen Proto-Eukaryoten und einem oxidativen Bakterium. Sie wird daher als Endosymbionten-Theorie bezeichnet und zeigt sich an verschiedenen Eigenschaften der Mitochondrien. Dazu gehören die Doppelmembran und das kreisförmige mitochondriale Genom mit spezifischem Transkriptions- und Translationsapparat (Wallace, 1999).

Der schematische Aufbau eines Mitochondriums ist in Abbildung 3 dargestellt.



**ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE ÜBERSICHT EINES MITOCHONDRIMUMS**

Die Doppelmembran bildet die Abgrenzung des Zellorganells. Zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran liegt der Intermembranraum. Die IMM beherbergt die ATP-Synthase und zeigt viele Faltungen, die in die Matrix ragen und als Cristae bezeichnet werden. In der mitochondrialen Matrix sind Granula, Ribosomen und die mtDNA zu finden (Frey and Mannella, 2000).

Der Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) der Mitochondrien gehört zu den funktionell zentralen und charakteristischen Komponenten eukaryotischer Zellen (Klingenberg, 1989). Es handelt sich dabei um ein integrales Membranprotein der inneren Mitochondrienmembran, das dem Austausch von ATP und ADP dient und somit den ATP-Vorrat im Zytoplasma wiederauffüllt. Dabei wird während der oxidativen Phosphorylierung ein ADP-Molekül in das Mitochondrium aufgenommen und ein ATP-Molekül in das extramitochondriale Zytoplasma entlassen (Vignais, 1976).

ANT wird von der nukleären DNA codiert, ist aus etwa 300 Aminosäuren aufgebaut und mit einem Anteil von zehn Prozent das häufigste Protein der inneren Mitochondrienmembran (Fiore et al., 1998; Kaukonen et al., 2000).

Beim Menschen existieren vier verschiedene ANT-Isoformen, die jeweils von unterschiedlichen Genen codiert werden. ANT1 wird überwiegend in Zellen der Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert, in denen die oxidative Phosphorylierung eine hohe Aktivität zeigt (Gavalda-Navarro et al., 2015; Stepien et al., 1992). Als Marker für die Zell-Proliferation wird ANT2 beschrieben, der außerhalb der Muskulatur in den meisten Gewebetypen vorkommt. ANT3 wird ubiquitär exprimiert und ist nur beim Menschen zu finden (Gavalda-Navarro et al., 2015; Levy et al., 2000). Die Expressionsrate der vierten Isoform, ANT4, ist im männlichen Hoden am höchsten (Rodic et al., 2005).

### 1.4 SKELETTMUSKULATUR

Die Skelettmuskeln dienen der Bewegung der Knochen in den entsprechenden Gelenken und werden daher in ihrer Gesamtheit als aktiver Bewegungsapparat bezeichnet. Sie besitzen einen als Ursprung benannten fixen und einen beweglichen Haftpunkt, der Ansatz heißt und sind von einer Faszie umgeben. Die Insertion des Muskels am Knochen erfolgt über die Sehne. Mikroskopisch weist die Skelettmuskulatur eine Querstreifung auf (Sobotta and Paulsen, 2010). Diese beruht auf der regelmäßigen Anordnung der Aktin- und Myosinfilamente zu Sarkomeren, die aufgrund ihrer Fähigkeit zur Verkürzung die kontraktile Bauelemente der Muskulatur darstellen (Lüllmann-Rauch and Asan, 2015).

Hinsichtlich ihrer metabolischen, physiologischen, histochemischen und biochemischen Eigenschaften unterscheidet man zwei verschiedene Skelettmuskelfasertypen (siehe Tabelle 1) (Schünke et al., 2014).

**TABELLE 1: MUSKELFASERTYPEN DER HALTE- UND BEWEGUNGSMUSKULATUR IM VERGLEICH**  
(Schünke et al., 2014)

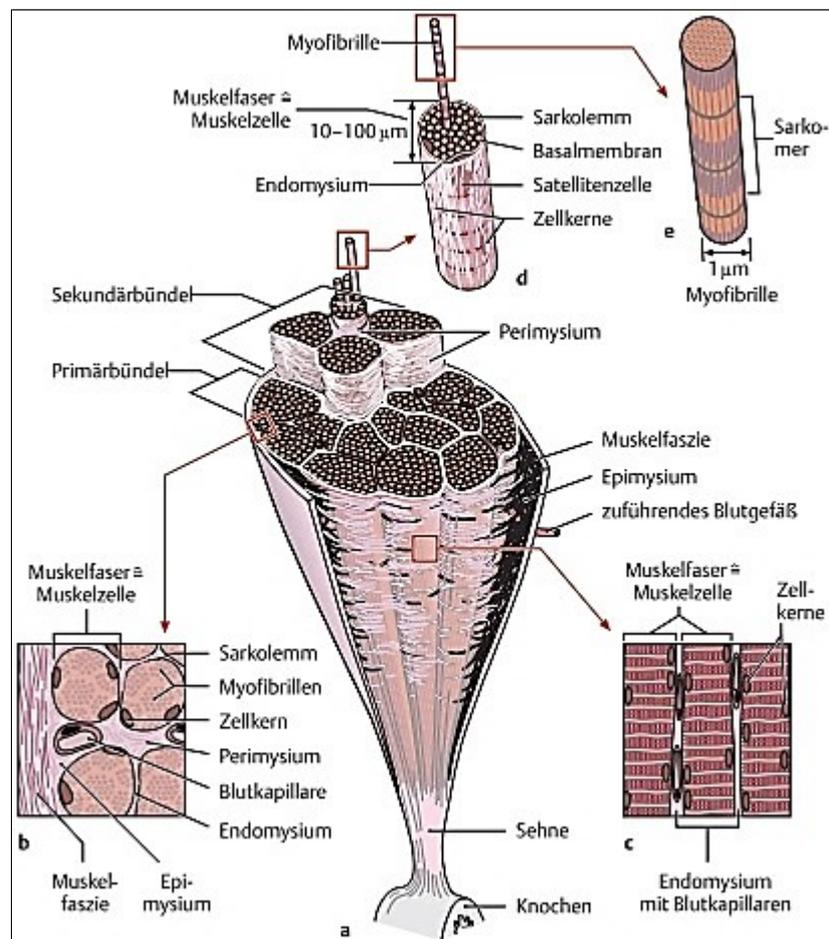
	<b>Haltemuskulatur</b>	<b>Bewegungsmuskulatur</b>
<b>Eigenschaften</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• rote Muskulatur; stark durchblutet; gute Blutgefäßversorgung</li> <li>• überwiegend langsam zuckende Muskelfasern (Typ-I-Fasern)</li> <li>• Dauerleistung</li> <li>• langsame Ermüdung</li> <li>• große motorische Einheiten</li> <li>• viel Myoglobin</li> <li>• viele Mitochondrien</li> <li>• oxidativer (aerober) Stoffwechsel</li> <li>• wenig Glykogen</li> <li>• Neigung zur Verkürzung; regelmäßige Dehnung erforderlich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• weiße Muskulatur; wenig durchblutet; gering kapillarisiert</li> <li>• überwiegend schnell zuckende Muskelfasern (Typ-II-Fasern)</li> <li>• schnelle, kurze, kraftvolle Kontraktionen</li> <li>• schnelle Ermüdung</li> <li>• kleine motorische Einheiten</li> <li>• wenig Myoglobin</li> <li>• wenig Mitochondrien</li> <li>• anaerober Stoffwechsel (Glykolyse)</li> <li>• viel Glykogen</li> <li>• Neigung zur Atrophie; regelmäßige Kräftigung erforderlich</li> </ul>
<b>Beispiele</b>	Mm. intercostales, Mm. masticatorii, M. trapezius Pars descendens, Mm. ischiocrurales, M. iliopsoas, Mm. adductores, M. rectus femoris, M. soleus	M. biceps brachii, Mm. vastus lateralis et medialis, M. tibialis anterior, M. serratus anterior, M. gluteus maximus, M. gastrocnemius

Die Skelettmuskulatur besteht aus Muskelfasern, die durch Fusion einkerniger Myoblasten entstanden sind und bei einem Durchmesser zwischen 40 und 80 µm bis zu mehreren Zentimetern an Länge erreichen können. Pro Millimeter Muskelfaserstrecke weisen diese lang gestreckten, zylindrischen Gebilde circa 50 ovale Kerne auf, die longitudinal ausgerichtet sind und dicht unter der Plasmamembran, die als Sarkolemm bezeichnet wird, liegen. Jede Muskelfaser ist von einer Basalmembran umgeben und besteht aus mehreren Myofibrillen. Diese stellen die Bau- und Funktionseinheit der Muskelfaser dar und setzen sich aus den Myofilamenten zusammen, welche aus Aktin- und Myosinmolekülen aufgebaut sind (Lüllmann-Rauch and Asan, 2015).

Da die Zellkerne der Muskelfaser nicht mehr teilungsfähig sind, werden im Bedarfsfall, z.B. nach einer Muskelverletzung, teilungsfähige Satellitenzellen aktiviert. Diese proliferieren und differenzieren sich in Myoblasten. Es kommt anschließend zur Fusion der Myoblasten und Ausbildung neuer oder Reparatur geschädigter Myofibrillen (Carvajal Monroy et al., 2016; Lüllmann-Rauch and Asan, 2015; Mauro, 1961).

Je 200 bis 250 Muskelfasern werden vom Endomysium, der innersten Bindegewebshülle, umgeben und zu Primärbündeln zusammengefasst. Zur Versorgung des Muskels enthalten diese eine große Anzahl an Kapillaren. Die mittlere Querschnittsfläche der Primärbündel beträgt  $1 \text{ mm}^2$ . Das Perimysium fasst mehrere Primärbündel zu Sekundärbündeln zusammen. Mit einer Dicke von mehreren Millimetern sind diese mit bloßem Auge sichtbar. Die Gesamtheit aller Sekundärbündel bilden den Muskel. Über das Epimysium ist dieser mit der Muskelfaszie verbunden (Schünke et al., 2014).

Abbildung 4 gibt einen schematischen Überblick über den Aufbau der Skelettmuskulatur.



**ABBILDUNG 4: AUFBAU EINES SKELETTMUSKELS**

**a:** Querschnitt; **b:** Ausschnittvergrößerung (Querschnitt) aus **a**; **c:** Ausschnittvergrößerung (Längsschnitt) aus **a**; **d:** Aufbau einer Muskelfaser; **e:** Aufbau einer Myofibrille (Schünke et al., 2011).

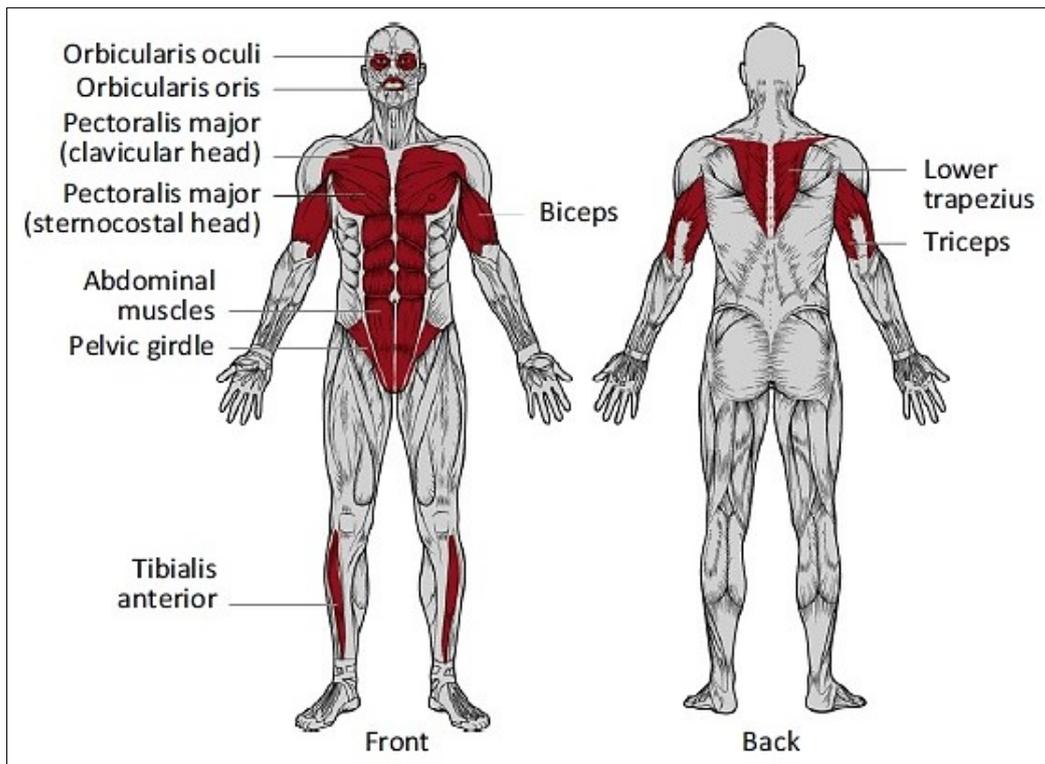
## 1.5 FACIOSCAPULOHUMERALE MUSKELDYSTROPHIE (FSHD)

### 1.5.1 EPIDEMIOLOGIE UND KLINIK

Die Erstbeschreibung der autosomal-dominant vererbten Erkrankung im Jahr 1868 geht auf Duchenne zurück. Benannt wurde die Krankheit nach Landouzy und Déjérine, die im Jahr 1885 erstmals das Adjektiv „facioscapulohumeral“ zur Beschreibung dieser Art der Muskeldystrophie verwendeten (Lunt and Harper, 1991; Padberg, 2004).

Mit einer Prävalenz von ungefähr 1:20.000 ist die facioscapulohumerale Muskeldystrophie (FSHD) nach der Duchenne-Muskeldystrophie und der myotonen Dystrophie Curschmann-Steinert die dritthäufigste Form der hereditären Myopathien (Richards et al., 2012).

Der Beginn der Beschwerdesymptomatik der FSHD ist variabel, wird aber am häufigsten in der zweiten Lebensdekade beobachtet. Zunächst ist – in unterschiedlich großem Ausmaß – die Muskulatur des Gesichts („facio“) und der Schultern („scapulo“) betroffen, gefolgt von der Oberarmmuskulatur („humeral“), der Fußhebermuskulatur und der Hüftmuskulatur (siehe Abbildung 5). Besonders charakteristisch ist eine Asymmetrie der Muskelschwächen (Lunt and Harper, 1991; Padberg, 2004; Padberg, 1982).



**ABBILDUNG 5: ÜBERSICHT ÜBER DIE BETROFFENEN MUSKELGRUPPEN BEI FSHD**

Die dunkelrot hervorgehobenen Areale zeigen die Muskulatur, die hauptsächlich von der Erkrankung betroffen ist. Dazu gehören Teile der mimischen Muskulatur, die Muskulatur des Schultergürtels und der Oberarme, die Fußhebermuskulatur, die Bauchmuskeln und die Muskeln des Hüftgürtels. Charakteristisches Merkmal der FSHD ist das asymmetrische Auftreten der Muskelschwächen (Lek et al., 2015).

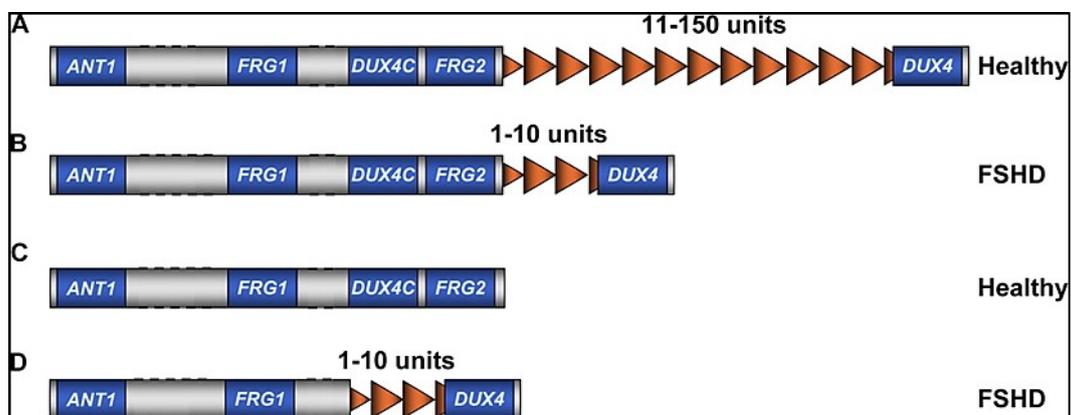
Neben der Muskulatur können auch andere Systeme des Körpers von der Erkrankung betroffen sein. Bei vielen Patienten liegen Hörstörungen im Hochtonbereich vor. Außerdem treten Veränderungen der Augengefäße auf, die in seltenen Fällen Sehstörungen zur Folge haben (Lunt and Harper, 1991; Padberg, 2004; Padberg, 1982). Vereinzelt können sich auch kardiale Symptome zeigen, die sich als atriale Arrhythmien manifestieren. Der Schweregrad der Erkrankung ist sehr unterschiedlich und reicht von asymptomatischen Fällen bis hin zu Patienten, die auf einen Rollstuhl angewiesen sind (Tawil, 2008). Die Lebenserwartung der Betroffenen ist in der Regel nicht herabgesetzt (Padberg, 2004; Padberg, 1982).

## 1.5.2 GENETIK

Man unterscheidet zwei Formen von FSHD. Am häufigsten (> 95 %) wird die Erkrankung durch einen Gendefekt ausgelöst, der den langen Arm des Chromosoms vier (4q35) betrifft (van den Boogaard et al., 2016; Wijmenga et al., 1990; Wijmenga et al., 1991). Bei einem kleinen Anteil der FSHD-Fälle (FSHD2) wird eine Mutation im SMCHD1-Gen auf Chromosom 18 als kausale Determinante beschrieben (Lemmers et al., 2012).

Bei FSHD kommt es zur teilweisen Deletion des polymorphen Abschnitts D4Z4, der für das Protein DUX4 codiert (Gabriels et al., 1999; van Deutekom et al., 1993).

Jede D4Z4-Einheit hat eine Größe von 3,3 kb. Bei gesunden Probanden liegt die Länge des entsprechenden DNA-Abschnitts auf Chromosom vier zwischen 35-38 kb und bis über 300 kb, was 11 bis 150 D4Z4-Wiederholungen entspricht. Im Gegensatz dazu weisen FSHD-Patienten ein nur 7 bis 35-38 kb langes DNA-Fragment auf. Dies entspricht 1 bis 10 Wiederholungen von D4Z4 (siehe Abbildung 6) (Cabianca and Gabellini, 2010; Upadhyaya and Cooper, 2002).



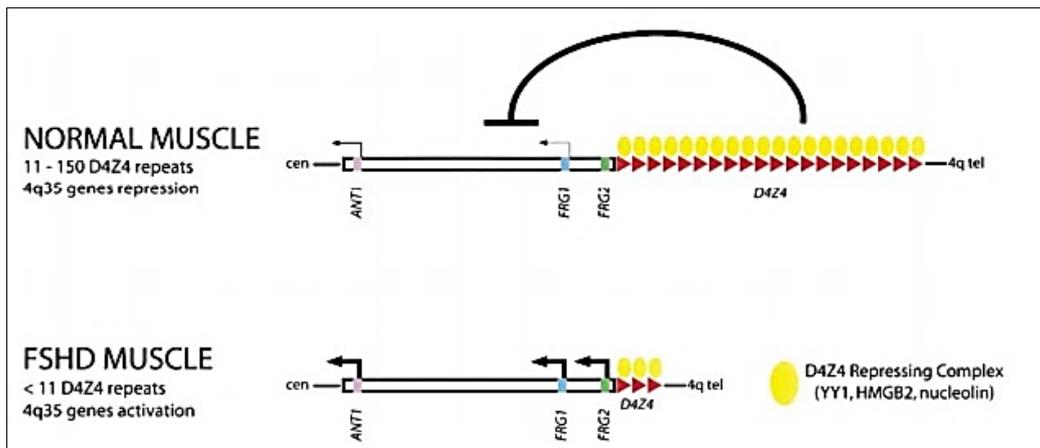
**ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES BEI FSHD BETROFFENEN GENABSCHNITTES IN VERSCHIEDENEN AUSPRÄGUNGEN**

FSHD wird durch die reduzierte Anzahl an D4Z4-Wiederholungen hervorgerufen. Gesunde tragen 11 bis 150 D4Z4-Einheiten (A), FSHD-Patienten weisen weniger als elf Wiederholungen auf (B). Individuen, denen D4Z4 komplett fehlt, sind gesund, da mindestens eine D4Z4-Einheit für die Ausbildung der Krankheit vorhanden sein muss (C). In einigen Fällen fehlen den FSHD-Patienten neben den D4Z4-Einheiten auch die Gene FRG2 und DUX4c (D). Dies deutet darauf hin, dass diese nicht zur Ausprägung der Erkrankung erforderlich sind (Cabianca and Gabellini, 2010).

Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der genetischen Schädigung und der Schwere der Erkrankung beschrieben. Allgemein scheint es bei ein bis drei D4Z4-Wiederholungen zu einer schweren Ausprägungsform der Erkrankung zu kommen, die bereits in der Kindheit auftritt. Der Großteil der typischen FSHD-Patienten weist zwischen vier und sieben D4Z4-Einheiten auf. Acht bis zehn Wiederholungen von D4Z4 scheinen mit einem milderen Krankheitsverlauf einherzugehen und mit einer geringeren Häufigkeit aufzutreten (Gabellini et al., 2002).

Dadurch, dass bei gesunden Menschen eine gewisse Anzahl an D4Z4-Einheiten vorhanden ist, wird die Genexpression auf dem Abschnitt 4q35 des Chromosoms vier durch einen DNA-gebundenen Multiproteinkomplex unterdrückt. Bei FSHD-Patienten sind aufgrund der Deletion von D4Z4-Wiederholungen weniger Repressor-Komplexe an die DNA gebunden, was wiederum zu einer verminderten Unterdrückung und damit zu einer erhöhten Genexpression von 4q35-Genen führt (siehe Abbildung 7). Daraus resultiert eine Überexpression, die letztendlich zum Ausbruch und zur Progression der Erkrankung führt (Gabellini et al., 2002). Unter anderem sind dabei die DUX4-Expression und die myogene Genexpression betroffen. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer Unterdrückung der Muskelzellendifferenzierung und einer Inhibition der Muskelbildung (Bosnakovski et al., 2008; Snider et al., 2009).

Da der Genort von ANT1 (siehe 1.3) auch auf Chromosom vier liegt, wird das ANT1-Gen bei FSHD überexprimiert (siehe Abbildung 7), was in einer erhöhten Anzahl von ANT1-Proteinen in der Muskulatur von FSHD-Patienten resultiert (Gabellini et al., 2002; Laoudj-Chenivesse et al., 2005).



**ABBILDUNG 7: MODELL FÜR DIE ENTSTEHUNG VON FSHD AUF MOLEKULARER EBENE**

Beim gesunden Menschen ist eine entsprechende Anzahl an D4Z4-Wiederholungen vorhanden, sodass die Genexpression auf dem 4q35-Abschnitt von Chromosom vier durch einen DNA-gebundenen Multiproteinkomplex unterdrückt wird. FSHD-Patienten weisen aufgrund der Deletion von D4Z4-Wiederholungen weniger gebundene Repressor-Komplexe auf, was wiederum zu einer verminderten Unterdrückung und damit zu einer erhöhten Genexpression von 4q35-Genen führt. Die daraus resultierende Überexpression bedingt den Ausbruch der Erkrankung und trägt zur Progression von FSHD bei (Gabellini et al., 2002).

## 1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

FSHD (siehe 1.5.2) und eine andere Form der Muskeldystrophie, die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD) (Bonne et al., 1999), besitzen zwar unterschiedliche genetische Ursachen, aber phänotypisch finden sich Ähnlichkeiten in der Ausprägung der Erkrankungen (siehe 1.5.1 und (Emery, 1989)). Da sich bei der EDMD bereits in früheren Studien Auffälligkeiten der Kernhülle von erkrankten Myoblasten zeigten (Reichart et al., 2004; Sabatelli et al., 2001), wird diese bei den FSHD-Myoblasten elektronenmikroskopisch untersucht und mit der Kernhülle gesunder Kontrollzellen verglichen.

In anderen Untersuchungen konnten morphologische Veränderungen und Dysfunktionen der Mitochondrien von FSHD-Patienten festgestellt werden (Turki et al., 2012). Neben der Kernhülle werden daher auch elektronenmikroskopische Untersuchungen der Mitochondrien von FSHD-Myoblasten und der entsprechenden Kontrolle durchgeführt. Da es sich bei Myoblasten um Primärzellen handelt, die während der Kultivierung altersabhängige Strukturveränderungen und Seneszenzprozesse zeigen, muss auf die entsprechende Passage der FSHD-Myoblasten und der Kontrollzellen geachtet werden (Schmitz, 2011). Als Passage wird die unterschiedliche Anzahl an Subkultivierungen bezeichnet,

wobei im Rahmen der Versuche Myoblasten der Passagen 6, 11 und 16 verwendet werden. Hierbei stellt sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Passage und der Häufigkeit des Auftretens von Abweichungen, Besonderheiten oder Unregelmäßigkeiten besteht.

Bei FSHD sind unterschiedliche Muskelgruppen betroffen (siehe 1.5.1). Weiterhin scheint die Schwere der genetischen Schädigung eine Rolle für die Ausprägung der Erkrankung zu spielen (siehe 1.5.2). Daher werden drei verschiedene Zelllinien für die Untersuchungen verwendet, die sich hinsichtlich des Patientenalters und -geschlechts, der Entnahmestelle des Gewebes und der Anzahl an DZ4Z-Wiederholungen unterscheiden. Es stellt sich die Frage, ob die genannten Faktoren einen Einfluss auf die Morphologie der untersuchten Myoblasten haben, oder ob keine signifikanten Unterschiede festzustellen sind.

Im Rahmen der Proben-Vorbereitung für die Elektronenmikroskopie stehen zwei Fixierungsmethoden zur Verfügung, die hinsichtlich ihrer Eignung und ihrer Vor- und Nachteile für morphologische Untersuchungen an Myoblasten verglichen werden sollen.

Der Hochdruckgefrierung (engl.: high pressure freezing, HPF) wird in Bezug auf die Qualität des Strukturerhalts, die bei dieser Art der Fixierung erreicht wird, eine Überlegenheit gegenüber allen anderen Verfahren zugeschrieben (Weimer, 2006). HPF und anschließende Gefriersubstitution (engl.: freeze substitution, FS) stehen daher der konventionellen, chemischen Fixierung und Flacheinbettung von Kulturzellen auf Deckgläschen gegenüber.

Da bei EDMD in vorangegangenen Untersuchungen (Reichart et al., 2004) auch fluoreszenzmikroskopisch Veränderungen der erkrankten Zellen auffällig waren, wird neben den Methoden der Elektronenmikroskopie das Vorliegen und die Verteilung verschiedener Proteine in FSHD-Myoblasten mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht und mit den Kontrollzellen verglichen. Zur Beurteilung der Kernhülle werden Antikörper gegen Lamin A/C und Nukleoporine eingesetzt. Die Mitochondrien werden mithilfe des Antikörpers ANT1/2, der an den Adenin-Nukleotid-Translokator (siehe 1.3 und 1.5.2) der inneren Mitochondrienmembran bindet, untersucht.

## 2 MATERIAL UND GERÄTE

### 2.1 ZELLINIEN

**TABELLE 2: ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN MYOBLASTEN**

NO44 ist die Kontrolle zu MO54, NO45 ist die Kontrolle zu MO37 und 19951 ist die Kontrolle zu FSHD10. Jede Zelllinie wurde in den Passagen 6, 11 und 16 verwendet und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Humane Myoblasten eines gesunden Menschen	Humane Myoblasten eines FSHD-Patienten
NO44	MO54
NO45	MO37
19951	FSHD10

**TABELLE 3: VERWENDETE MYOBLASTEN MIT ANGABE VON ALTER UND GESCHLECHT DER PATIENTEN, DER ENTNAHMESTELLE DES GEWEBES UND DER ANZAHL AN D4Z4-WIEDERHOLUNGEN**

Patient	Alter in Jahren	Geschlecht	Gewebe	D4Z4-Wiederholungen
NO44	29	männlich	Musculus quadriceps femoris	
MO54	25	männlich	Musculus quadriceps femoris	4u
NO45	45	weiblich	Musculus quadriceps femoris	
MO37	42	weiblich	Musculus quadriceps femoris	8u
19951	30	männlich	Musculus deltoideus	
FSHD10	30	männlich	Musculus trapezius	5u

Die verwendeten Myoblasten stammen vom Département de Physiologie Clinique du Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Montpellier und werden dort nach dem Protokoll von Marietta Barro und Kollegen in *Journal of Cellular and Molecular Medicine (Volume 14)* gewonnen (Barro et al., 2010). In der Deklaration No. DC 2008-594 wird die Nutzung und Konservierung menschlicher Muskelbiopsien und davon abgeleiteter Zellkulturen vom französischen Wissenschaftsministerium genehmigt.

## 2.2 ZELLKULTURMEDIEN UND -LÖSUNGEN

Neue und angebrochene Medium- und Serumflaschen, Puffer, Trypsin und andere Zellkulturmedien, für die eine Lagerung bei 4 bis 8 °C vorgeschrieben ist, werden im Kühlschrank aufbewahrt. Je nach Herstellerangabe erfolgt die Lagerung von anderen Lösungen bei -20 °C oder -80 °C (Schmitz, 2011).

Alle Bestandteile der verwendeten Medien und Lösungen wurden – soweit nicht anders angegeben – von folgenden Firmen bezogen:

- AppliChem GmbH
- CARL ROTH®
- gibco® by life technologies™ / Fisher Scientific GmbH
- PALL® Life Sciences
- SIGMA-ALDRICH®, Co. / SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

## 2.3 ANTIKÖRPER

### 2.3.1 PRIMÄRANTIKÖRPER

**TABELLE 4: VERWENDETE PRIMÄRANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNFLUORESZENZ (IF)**

<b>Antikörper</b>	<b>Antigen</b>	<b>Typ</b>	<b>Verdünnung IF (in PBS)</b>	<b>Herkunft</b>
ANT1/2 (N-19)	ANT1 und ANT2 von Maus, Ratte und menschlichem Ursprung	Ziegen-IgG polyklonal	pur	Santa Cruz Biotechnology
Lamin A/C (E-1)	Lamin A und Lamin C (human) von Maus, Ratte und menschlichem Ursprung	Maus-IgG <sub>1</sub> monoklonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Mab414	FXFG-Wiederholungen in Nukleoporen	Maus-IgG <sub>1</sub> monoklonal	1:500	abcam® discover more
Hoechst	DNA	Fluoreszenz-Farbstoff (zellpermeabler Nukleinsäure-Farbstoff)	1:250	SIGMA-ALDRICH®, Co. / SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

### 2.3.2 SEKUNDÄRANTIKÖRPER

**TABELLE 5: VERWENDETE SEKUNDÄRANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNFLUORESZENZ (IF)**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung IF (in PBS)</b>	<b>Fluoreszenz</b>	<b>Herkunft</b>
Anti-Maus Texas-red	1:100	Rot	Dianova
Alexa Fluor® 488 Anti-Ziege	1:200	Grün	Dianova

## 2.4 CHEMIKALIEN

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Lösungen von folgenden Firmen bezogen:

- AppliChem GmbH
- CARL ROTH®
- CHEMIKALIEN SCHELLER
- Electron Microscopy Sciences
- Merck KGaA
- PanReac AppliChem GmbH
- Plano GmbH
- SCIENCE SERVICES
- SERVA Electrophoresis GmbH
- SIGMA-ALDRICH®, Co. / SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

## 2.5 GERÄTE

**TABELLE 6: VERWENDETE GERÄTE MIT ANGABE DER HERKUNFT**

Gerät	Herkunft
Brutschrank (37°C-Inkubator): BINDER C150 E2	BINDER GmbH
Digitalkamera: Samsung PL210	Samsung Electronics GmbH
Gefriersubstitutions- & Tieftemperatureinbettungssystem: Leica EM AFS2	Leica Microsystems GmbH
Gefriertruhe: Ultra-Low Temperature Freezer Innova® C585	Eppendorf AG / New Brunswick Scientific
Heiz-/Rührplatte: HOTPLATE STIRRER MODEL L-81	Labinco BV
Hochdruckgefrieranlage: Leica EM HPM100	Leica Microsystems GmbH
Isopropanol-gefüllte Einfrierbox: NALGENE™ Cryo 1°C Freezing Container	SIGMA-ALDRICH®, Co. / SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
Kamera am Axiophot: Axio Cam MRm	Carl Zeiss
Kohlebedampfungsgerät: BALZERS UNION MED 010	œrlikon balzers
Kühlschrank Zellkultur: AEG Elektrolux SANTO	Electrolux Hausgeräte GmbH
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse II: ESCO Class II BSC (Biohazard Safety Cabin) Airstream®	Esco Micro Pte. Ltd.
Mikroskope: <ul style="list-style-type: none"> <li>Leitz Labovert (inverses Phasenkontrastmikroskop)</li> <li>ZEISS FB/WOp6 4752009901</li> <li>ZEISS FB/WOp8 (Binokular) 4640029901</li> <li>Photomikroskop Axiophot (Fluoreszenzmikroskop)</li> </ul>	Leica Microsystems GmbH Carl Zeiss Carl Zeiss Carl Zeiss
Präzisionswaage: METTLER TOLEDO PB3002 DeltaRange®	Mettler-Toledo GmbH
Reinstwassersystem: Milli-Q® UF PLUS MERCK MilliPORE	Merck KGaA
Scanner: EPSON PERFECTION V700 PHOTO	EPSON
Transmissionselektronenmikroskop: ZEISS EM 900	Carl Zeiss
Ultramikrotom und -zubehör: <ul style="list-style-type: none"> <li>Leica EM UC7</li> <li>Leica M80</li> </ul>	Leica Microsystems GmbH Leica Microsystems GmbH
Wärmeschrank/Trockenschrank	Memmert GmbH + Co.KG
Wasserbad Zellkultur: GFL® (Inkubations-/Inaktivierungsbad)	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Zentrifugen: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hermle Z 400 K</li> <li>Hettich Mikroliter Tischzentrifuge</li> </ul>	HERMLE Labortechnik GmbH Andreas Hettich GmbH & Co.KG

## 2.6 SOFTWARE

**TABELLE 7: VERWENDETE SOFTWARE MIT ANGABE DER HERKUNFT**

<b>Software</b>	<b>Herkunft</b>
Bildbearbeitungsprogramm: Fiji ImageJ 1.51d	Fiji
Einscan-Programm (EM-Bilder): SilverFast (Epson-SE).8ba (vers. 6.6.1r2b)	LaserSoft Imaging AG
Literaturverwaltungssoftware: EndNote™ X7.7	THOMSON REUTERS
Mikroskopsoftware: AxioVision LE64, Anwendung: AxioVs40x64 V 4.9.1.0	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Schreibprogramm: Microsoft® Word 2016	Microsoft Corporation

### 3 METHODEN

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle angefertigt.

#### 3.1 KULTIVIEREN VON HUMANEN ZELLKULTUREN

##### 3.1.1 AUFTAUEN VON KULTURZELLEN

Lösungen:

Myoblastenmedium:	20 %	FCS bzw. FBS
	0,5 %	Ultroser G
	0,02 %	Gentamycin (10 mg/ml)
	79,48 %	DMEM (1x) + GlutaMAX™-I

alle Angaben in Vol.-%

Zu Beginn werden 7 ml Myoblastenmedium in ein 15 ml Falconröhrchen vorgelegt. Die in Kryoröhrchen eingefrorenen Kulturzellen werden schnellstmöglich im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und dem Medium sofort zugesetzt. Ein vorsichtiges Durchmischen dient der Verhinderung einer DMSO-Vergiftung. DMSO ist ein Gefrierschutzmittel, das im Einfriermedium enthalten ist (siehe 3.1.4).

Da sich die intrazelluläre DMSO-Konzentration während des Abkühlens, Gefrierens und Auftauens wesentlich ändert, kann es zu irreversiblen Schädigungen der Zellstruktur und des Zellstoffwechsels kommen (Penninckx et al., 1983). Daher muss bei allen Schritten, bei denen DMSO zum Einsatz kommt, schnell gearbeitet werden.

Anschließend wird fünf Minuten bei 1000 rpm (Hermle Z 400 K) und 4 °C zentrifugiert. Um das Zellpellet nicht aufzuwirbeln, werden die Falconröhrchen vorsichtig aus der Zentrifuge entnommen und transportiert. Nach dem Absaugen des Überstandes mit

DMSO wird das Pellet in 5 ml Myoblastenmedium resuspendiert. Medium und gelöstes Pellet werden komplett aufgenommen und in eine 25-cm<sup>2</sup>-Kulturflasche, in der bereits 5 ml Medium vorgelegt wurden, überführt. Die Inkubation erfolgt bei circa 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

### 3.1.2 MEDIUMWECHSEL

Die Versorgung der Kulturen mit lebenswichtigen Nährstoffen erfolgt durch das Zellkulturmedium. In Abhängigkeit von Wachstumsgeschwindigkeit, Metabolismus und Vitalität der Zellen muss in regelmäßigen Abständen ein Mediumwechsel durchgeführt werden. Die im Medium enthaltenen Bestandteile werden einerseits nach einer gewissen Zeit durch die Zellen verbraucht und sind andererseits bei den im Inkubator herrschenden 37 °C nicht unbegrenzt stabil. Weiterhin kommt es durch die im Zellstoffwechsel anfallenden Abfallprodukte zu einer Ansäuerung des Mediums und damit zu einer Verschiebung des pH-Optimums (Schmitz, 2011).

Lösungen:

Myoblastenmedium (siehe 3.1.1)

Das alte Medium wird mittels Glaspipette abgesaugt, ohne den Zellrasen vorher enzymatisch von der Unterlage abzulösen oder zu beschädigen. Anschließend werden 10 ml auf 37 °C vorgewärmtes neues Myoblastenmedium in die Kulturflasche pipettiert. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Schmitz, 2011).

### 3.1.3 PASSAGIEREN ADHÄRENTER ZELLEN

Lösungen:

- Myoblastenmedium (siehe 3.1.1)
- PBS:                   0,82 % NaCl  
                          0,02 % KCl  
                          0,02 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
                          0,09 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
                          in  $\text{dH}_2\text{O}$   
                          alle Angaben in Gew.-%
- Trypsin-Lösung:    0,02 % EDTA  
                          0,06 % Trypsin  
                          in PBS  
                          alle Angaben in Gew.-%

Bevor die Zellen umgesetzt werden können, muss das Zellwachstum unter dem Mikroskop beobachtet werden. Hierfür wird das inverse Phasenkontrastmikroskop Leitz Labovert verwendet. Dabei befinden sich die Objektive unter dem Objektisch. Die Durchlichtbeleuchtung ist oberhalb des Objektisches angebracht (Mulisch et al., 2015).

Ist der Boden der Kulturflasche dicht besiedelt, wird das Medium mit Hilfe von Glaspipette und Sicherheitsschlauch abgesaugt und anschließend mit 2 ml vorgewärmtem PBS gewaschen, um das restliche Medium zu entfernen. Im nächsten Schritt erfolgt die Zugabe von 1 ml Trypsin, um die adhärenen Zellen enzymatisch vom Flaschenboden zu lösen. Da das Aktivitätsoptimum dieses proteolytischen Enzyms bei 37 °C liegt, wird es vor Gebrauch im Wasserbad erwärmt und anschließend so lange im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden lösen (Vogel, 1978). Dies kann durch Klopfen gegen den Flaschenboden beschleunigt werden.

Die Serinprotease Trypsin entfaltet ihre größte Aktivität bei einer Temperatur von 37 °C und einem pH-Wert von 7,5 bis 8,5 und katalysiert die hydrolytische Spaltung von Pep-

tiden und Proteinen. Durch Zugabe von EDTA erfolgt eine Ansäuerung der Trypsin-Lösung und damit eine Beschleunigung der Trypsinierung. Als Komplexbildner bindet EDTA zweiwertige Ionen wie Calcium oder Magnesium, die zellbindende Membranproteine stabilisieren (Schmitz, 2011).

Durch Beobachtung unter dem Umkehrmikroskop wird die Zellablösung kontrolliert. Die gelösten Zellen bewegen sich mit der Flüssigkeit in der Flasche. Nach Zugabe von 9 ml Myoblastenmedium wird dieses mit dem Trypsin vermischt und die Zellen in das Medium aufgenommen. Durch die Zugabe des serumhaltigen Mediums wird die Enzymreaktion gestoppt. Die Zellsuspension wird in vorbereitete Kulturflaschen gegeben. Im Brutschrank wird bei circa 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.1.4 EINFRIEREN ADHÄRENTER ZELLEN

Um Zellmaterial für eine spätere Verwendung aufzubewahren, werden die Zellen eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert (Schmitz, 2011).

Lösungen:

- Myoblastenmedium (siehe 3.1.1)
- Einfriermedium:     70 % Kulturmedium (hier: Myoblastenmedium)  
                              20 % FCS bzw. FBS  
                              10 % DMSO  
                              alle Angaben in Vol.-%
- PBS (siehe 3.1.3)
- Trypsinlösung (siehe 3.1.3)

Nach dem Absaugen des Mediums wird mit 2 ml vorgewärmtem PBS gewaschen. Um die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden zu erreichen, wird 1 ml auf 37 °C erwärmtes Trypsin zugegeben und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (siehe 3.1.3). Anschließend

erfolgt die Zugabe von 4 ml Myoblastenmedium und die Überführung der Suspension in ein 15 ml Falconröhrchen. Bei 1000 rpm (Hermle Z 400 K) und 4 °C wird für 5 Minuten zentrifugiert.

In der Zwischenzeit erfolgt die Vorbereitung des Einfriermediums. Dieses enthält unter anderem das penetrierende Gefrierschutzmittel Dimethylsulfoxid (DMSO).

DMSO ist ein farbloses und fast geruchloses organisches Lösungsmittel und bei Raumtemperatur zelltoxisch (Schmitz, 2011). Durch die Ausbildung von DMSO-Wasser-Komplexen werden beim Gefrieren weniger Eiskristalle ausgebildet, was die mechanischen Schädigungen der Zellen minimiert (Yu and Quinn, 1994). DMSO dringt schnell in die Zellen ein und besitzt eine scheinbar allgemeingültige Penetrier-Fähigkeit. Es verursacht Veränderungen in der Elektrolyt-Verteilung der Zellen. Penetrierende Gefrierschutzmittel sind in der Konzentrationshöhe, die für die Schutzwirkung erforderlich ist, zelltoxisch. Übermäßige osmotische Gradienten, wie sie durch das Einbringen und Entfernen von Gefrierschutzmitteln verursacht werden, können die Zellen schädigen (Meryman, 1971). Daher muss sowohl beim Einfrieren, als auch beim Auftauen von Kulturzellen schnell gearbeitet werden.

Nach der Zentrifugation wird der Medium-Überschuss von den pelletierten Zellen abgesaugt. Danach wird 1 ml Einfriermedium zu dem Zellpellet gegeben und homogenisiert. Die Zellsuspension wird in Kryoröhrchen überführt. Eine Isopropanol-gefüllte Einfrierbox dient zum langsamen Abkühlen (Abkühlungsrate circa -1 °C pro Minute) der Zellen bei -80 °C. Am darauffolgenden Tag werden die eingefrorenen Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen von Kulturzellen (siehe 3.1.1), der Wechsel des Myoblastenmediums (siehe 3.1.2), das Passagieren adhärenter Zellen (siehe 3.1.3) und das Einfrieren der Myoblasten (siehe 3.1.4) werden in modifizierter Form durchgeführt nach dem Protokoll von Sabine Schmitz in *Der Experimentator: Zellkultur (3. Auflage)* (Schmitz, 2011).

### 3.1.5 UMSETZEN AUF DECKGLÄSCHEN

Um die Myoblasten (siehe 2.1) für die Elektronenmikroskopie fixieren, entwässern und einbetten zu können, müssen diese adhärent wachsenden Zellen auf Deckgläschen aus Glas umgesetzt werden. Diese stellen eine Unterlage dar, die keine Interaktion mit den Fixantien zeigt und nicht von den verwendeten Lösungsmitteln oder Epon angegriffen wird (Mulisch et al., 2015).

Lösungen:

- Myoblastenmedium (siehe 3.1.1)
- PBS (siehe 3.1.3)
- Trypsinlösung (siehe 3.1.3)

Bevor die Zellen umgesetzt werden können, muss das Zellwachstum unter dem Mikroskop beobachtet werden. Ist der Boden der Kulturflasche dicht besiedelt, kann mit dem Umsetzen begonnen werden.

Pro Zelllinie werden drei Deckgläschen mit der Pinzette aus dem Vorratsgefäß entnommen und in eine Wellplatte oder Petrischale gelegt. Je nach Verdünnung wird das entsprechende Volumen an Myoblastenmedium in die Platte oder Schale pipettiert.

Mit Hilfe von Glaspipette und Sicherheitsschlauch wird das alte Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und anschließend mit 2 ml vorgewärmtem PBS gewaschen, um das restliche Medium zu entfernen. Dann erfolgt die Zugabe von 1 ml vorgewärmtem Trypsin, um die adhärennten Zellen enzymatisch vom Flaschenboden zu lösen (siehe 3.1.3). Durch Beobachtung unter dem Umkehrmikroskop wird die Zellablösung kontrolliert. Die gelösten Zellen bewegen sich mit der Flüssigkeit in der Flasche. Nach Zugabe von 9 ml Myoblastenmedium wird dieses mit dem Trypsin vermischt und die Zellen in das Medium aufgenommen. Durch die Zugabe des serumhaltigen Mediums wird die Enzymreaktion gestoppt. Die Zellsuspension wird tröpfchenweise auf die vorbereiteten Deckgläschen überführt. Anschließend wird geschwenkt, um eine gute Durchmischung

und Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Mit einer Pinzette werden die Deckgläschen an den Schalen- bzw. Plattenboden gedrückt und die Lage überprüft. Im Brutschrank wird bei circa 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

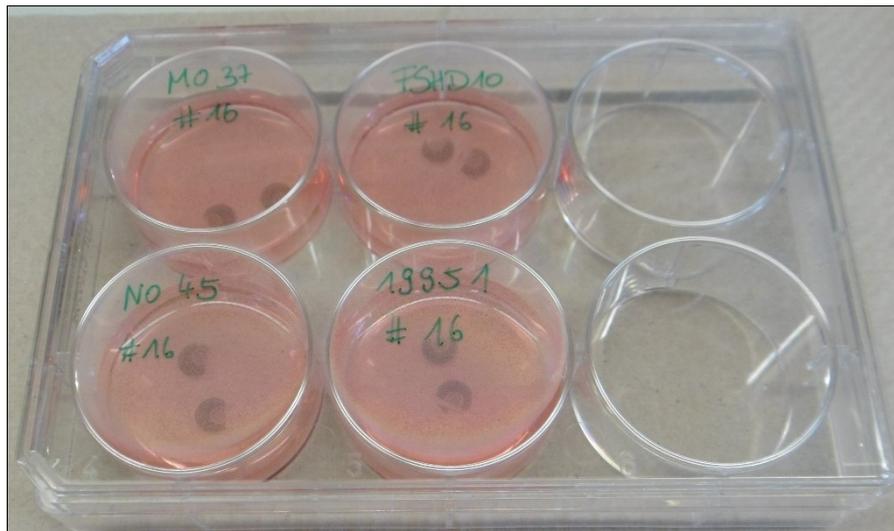
### 3.1.6 UMSETZEN AUF SAPHIRPLÄTTCHEN

Lösungen:

- Myoblastenmedium (siehe 3.1.1)
- PBS (siehe 3.1.3)
- Trypsin-Lösung (siehe 3.1.3)
- dH<sub>2</sub>O

Für das Hochdruckgefrieren (siehe 3.3) ist aufgrund der verbesserten Wärmeleitung (Tse et al., 1997) die Verwendung von kohlebedampften Saphirplättchen vorgesehen. Hierfür werden diese zweimal in destilliertem Wasser und einmal in Myoblastenmedium gewaschen. Pro Probe wird eine Petrischale mit je zwei Saphiren bestückt, wobei die kohlebedampfte Seite unten liegt. Unter dem Mikroskop muss die Schrift auf den Plättchen lesbar sein. Nach Vorlage von Myoblastenmedium wird die Zellsuspension (Vorgehen siehe 3.1.5) aufgeträufelt und anschließend geschwenkt. Mit einer Pinzette wird die Position der Saphirplättchen kontrolliert und diese vorsichtig an den Schalenboden gedrückt. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

In Abbildung 8 ist eine entsprechend bestückte und beschriftete Wellplatte gezeigt.



**ABBILDUNG 8: WELLPLATTE MIT SAPHIREN, MYOBLASTENMEDIUM UND VERSCHIEDENEN MYOBLASTEN**  
Für das Hochdruckgefrieren (siehe 3.3) vorbereitete Wellplatte mit kohlebedampften Saphiren. Zum vorgelegten Myoblastenmedium wird entsprechend der Beschriftung die Zellsuspension aufgeträufelt und anschließend geschwenkt. Nach Kontrolle der Position der Sapphire erfolgt die Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### 3.2 ELEKTRONENMIKROSKOPIE – KONVENTIONELL

Bei der Elektronenmikroskopie werden – im Gegensatz zur Lichtmikroskopie, wo sichtbares Licht eingesetzt wird – Elektronen zur Bilderzeugung genutzt. Die Wellenlänge und die Geschwindigkeit der Elektronen bestimmen das Auflösungsvermögen eines Transmissionselektronenmikroskops hauptsächlich. Je höher die Elektronengeschwindigkeit, desto kleinere Wellenlängen können erzielt und eine verbesserte Auflösung erreicht werden. Bei optischen Mikroskopen ist die Auflösung physikalisch durch die Lichtwellenlänge auf circa 200 nm begrenzt (Mulisch et al., 2015).

Grundlage für die Funktionsfähigkeit eines Elektronenmikroskops ist ein Vakuumsystem. Dieses Vakuum verhindert die Elektronenstreuung oder -absorption an Gasmolekülen und sorgt dafür, dass sich die Elektronen ungehindert ausbreiten können. Es dient außerdem zum Schutz der Probe und verhindert Entladungen im Kathodenbereich.

Voraussetzung für erfolgreiche TEM-Aufnahmen sind artefaktfreie Proben, die Schichtdicken von weniger als 100 nm aufweisen (Mulisch et al., 2015).

Für die Untersuchungen an den Myoblasten wird das Transmissionselektronenmikroskop ZEISS EM 900 verwendet.

Der Großteil der zu untersuchenden Proben ist zu groß und/oder zu dick für die direkte Betrachtung unter dem Mikroskop. Durch Fixierung – standardmäßig mit Aldehyden und Osmiumtetroxid –, Entwässerung, Einbettung, Anfertigung von Ultradünnschnitten und Kontrastierung werden die Myoblasten für die Verwendung am TEM vorbereitet (Luft, 1961; Mulisch et al., 2015; Pease and Porter, 1981).

#### 3.2.1 CHEMISCHE FIXIERUNG VON KULTURZELLEN

Das Verfahren der Transmissionselektronenmikroskopie eignet sich nicht für Lebendmaterial. Deshalb ist es notwendig, die Präparate im Vorfeld zu fixieren. Unter Erhaltung der Zellstrukturen in ihrem momentanen, natürlichen Zustand werden dabei die Zellfunktionen abgetötet. In der Elektronenmikroskopie finden im Normalfall vernetzende Fixantien Verwendung, weil sich dadurch ein guter Strukturerhalt ergibt. Die Fixierung

stellt somit einen der wesentlichen Schritte in der Vorbereitung von biologischem Material für elektronenmikroskopische Untersuchungen dar. Als am meisten verbreitete Fixierungsmethode beruht die chemische Fixierung auf der Wechselwirkung zwischen chemischen Substanzen und Zellkomponenten (Mulisch et al., 2015).

Lösungen:

- PBS (siehe 3.1.3)
- Cacodylatpuffer 0,05 M in dH<sub>2</sub>O, pH 7,2
- 2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer (plus Ionen), pH 7,2:

10 %	25%ige Glutardialdehyd-Lösung
5 %	KCl 1 M
2,5 %	MgCl <sub>2</sub> 0,1 M
25 %	Cacodylatpuffer 0,2 M
57,5 %	dH <sub>2</sub> O

alle Angaben in Vol.-%

- 2 % Osmiumtetroxid:      50 % 4%iges OsO<sub>4</sub>  
                                         25 % Cacodylatpuffer 0,2 M  
                                         25 % dH<sub>2</sub>O

alle Angaben in Vol.-%

- 0,5 % (Gew.-%) Uranylacetat in dH<sub>2</sub>O
- dH<sub>2</sub>O

Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen werden in PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten in eine Wellplatte mit Glutaraldehyd-Lösung eingelegt.

Durch die Reaktion von Glutaraldehyd mit Aminogruppen erfolgt innerhalb kurzer Zeit eine irreversible Quervernetzung der zellulären Proteine und einiger Lipide. Außerdem bewirken Aldehyde die Immobilisation dieser Proteine und Lipide (Hurbain and Sachse, 2011; Mulisch et al., 2015). Die Feinstruktur der Zellen wird durch die Fixierung mit Glutaraldehyd sehr gut erhalten. Durch während der Reaktion freiwerdende Protonen

wird der pH-Wert erniedrigt. Zur Vermeidung eines pH-Abfalls wird Glutaraldehyd in einem Cacodylatpuffer verwendet (Mulisch et al., 2015).

Anschließend erfolgt das dreimalige Waschen in 0,05 M Cacodylatpuffer für jeweils fünf Minuten. Die Deckgläschen werden danach auf eine Parafilm-Glasplatte auf Eis überführt. Es wird 2%iges  $\text{OsO}_4$  auf die Deckgläschen gegeben und für circa 60 Minuten abgedeckt inkubiert.

Durch die Reaktion von Osmiumtetroxid mit ungesättigten Fettsäuren und Amino- und Sulfhydrylgruppen anderer Zellkomponenten erfolgt die Stabilisierung von Zellmembranen und Lipiden. In der Elektronenmikroskopie ist 2%iges  $\text{OsO}_4$  häufig als zweites Fixans nach der Glutaraldehyd-Fixierung im Einsatz (Bahr, 1954; Mulisch et al., 2015). Osmiumtetroxid dient nicht nur der Fixierung, sondern wirkt auch als Kontrastmittel (Baker and Modern, 1952).

Nach Abtropfen des Osmiums werden die Deckgläschen kurz in ein Becherglas mit  $\text{dH}_2\text{O}$  eingetaucht. Im folgenden Schritt wird dreimal für je fünf Minuten mit  $\text{dH}_2\text{O}$  gewaschen. Über Nacht werden die Deckgläschen in 0,5 % Uranylacetat eingelegt und bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag schließen sich drei Waschschrte mit  $\text{dH}_2\text{O}$  für je fünf Minuten an.

Durch die Inkubation in Uranylacetat werden die Proben besser sichtbar gemacht und der Kontrast gesteigert. Es erfolgt eine Fixierung und Stabilisierung von Lipiden und Proteinen, ohne die bei der anschließenden Entwässerung einige Membranteile verlorengehen würden. Zwischen den einzelnen Schritten muss gründlich gewaschen werden, weil es zu Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Fixantien beziehungsweise Lösungen kommen kann (Mulisch et al., 2015; Silva et al., 1971).

Die chemische Fixierung wird durchgeführt modifiziert nach dem Protokoll von John J. Wolosewick und Keith R. Porter in *The Journal of Cell Biology (Volume 82)* (Wolosewick and Porter, 1979).

### 3.2.2 ENTWÄSSERUNG

Da die spätere Einbettung mit dem Epoxidharz Epon erfolgt und dieses nicht mit Wasser mischbar ist, muss der Probe vorher das gesamte enthaltene Wasser entzogen werden. Um dann die Infiltration des Einbettmediums zu gewährleisten, wird das in der Probe enthaltene Wasser stufenweise durch ein organisches Lösungsmittel – hier Ethanol – ersetzt (Hurbain and Sachse, 2011; Mulisch et al., 2015).

Lösungen:

- 100 % (Vol.-%) Propylenoxid
- Epon: 

Gemisch A	DDSA	260,52 g
	Glycidether 100	193,44 g
Gemisch B	MNA	173,6 g
	Glycidether 100	192,0 g

Chemikalie C 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol

A + B für Gebrauch mit C komplettieren  
je 10 ml A + B werden 0,2 ml C hinzugegeben
- Ethanol: 50 %, 70 %, 90 % EtOH in dH<sub>2</sub>O  
100 % EtOH  
alle Angaben in Vol.-%
- Propylenoxid-Epon-Gemisch: 50 % Propylenoxid  
50 % Epon A + B + C  
alle Angaben in Vol.-%

Die Entwässerung erfolgt durch eine Ethanol-Verdünnungsreihe mit aufsteigender Konzentration. Dabei werden Lipide aus der Probe extrahiert, was eine Membranschädigung nach sich zieht und auch extrahierend auf andere Zellbestandteile wirkt. Alle Alkohol-Stufen werden vorgekühlt verwendet, da Kälte die Lipid-Extraktion verringert (Mulisch et al., 2015).

Die Inkubation erfolgt nacheinander für jeweils fünf Minuten in 50%iger, 70%iger und 90%iger Ethanol-Lösung auf Eis.

Durch den Wasserentzug verursachte Schrumpfungen im Gewebe sollen überall gleichmäßig erfolgen und das Gewebe soll gleichmäßig durchdrungen werden. Daher wird mit einer niedrigen Ethanol-Konzentration von 50 % begonnen und diese dann langsam gesteigert (Mulisch et al., 2015).

Abschließend wird zweimal für je fünf Minuten in 100%iger Ethanol-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert.

Dadurch, dass Ethanol nicht vollständig mit Epon mischbar ist, wird Propylenoxid als Intermedium verwendet (Hardin et al., 1983; Mulisch et al., 2015). Da dieses Plastik auflöst, kommen für die Inkubation Glasgefäße zum Einsatz. Außerdem müssen die Proben abgedeckt werden, weil sich Propylenoxid sehr schnell verflüchtigt (Hardin et al., 1983). Es wird zweimal für jeweils fünf Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt werden die Deckgläschen für zwei bis vier Stunden in ein Propylenoxid-Epon-Gemisch (1:1) eingelegt, um ein gleichmäßiges Durchdringen der Probe zu gewährleisten und die Epon-Infiltration zu beschleunigen (Luft, 1961; Mulisch et al., 2015). Über Nacht erfolgt die Inkubation in reinem Epon. Bei allen Schritten, bei denen Epon verwendet wird, müssen Glasscherben auf den Boden der Glasschälchen gelegt werden, um eine Ablösung des Epons vom Schalenboden zu gewährleisten.

### 3.2.3 FLACHEINBETTUNG

Lösungen:

Epon (siehe 3.2.2)

Die Einbettung der Proben erfolgt mit Eponharz. Die Deckgläschen werden aus dem Epon vom Vortag entnommen, abgetropft und mit der Probe nach oben auf eine mit Alufolie umwickelte Glasplatte gelegt. Kleine Gelatinekapseln werden mit frischem Epon zu dreivierteln gefüllt. Zur Protokollierung werden bedruckte oder mit Bleistift beschriftete Zettel in die Kapsel eingelegt. Nach dem vollständigen Befüllen der Gelatinekapseln werden diese mit der Öffnung nach unten auf die bewachsene Seite der Deckgläschen aufgesetzt (Mulisch et al., 2015) und angedrückt, wobei die Probe möglichst in der Mitte liegen sollte. Die Proben werden für circa eine Stunde an einen erschütterungsfreien Ort gestellt, damit Luftblasen nach oben steigen können. Im Wärmeschrank erfolgt bei 60 °C für mindestens 48 Stunden die Polymerisation.

Die beschriebenen Arbeitsschritte der Entwässerung (siehe 3.2.2) und der Flacheinbettung (siehe 3.2.3) werden durchgeführt modifiziert nach dem Protokoll von John H. Luft in *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology (Volume 9)* (Luft, 1961).

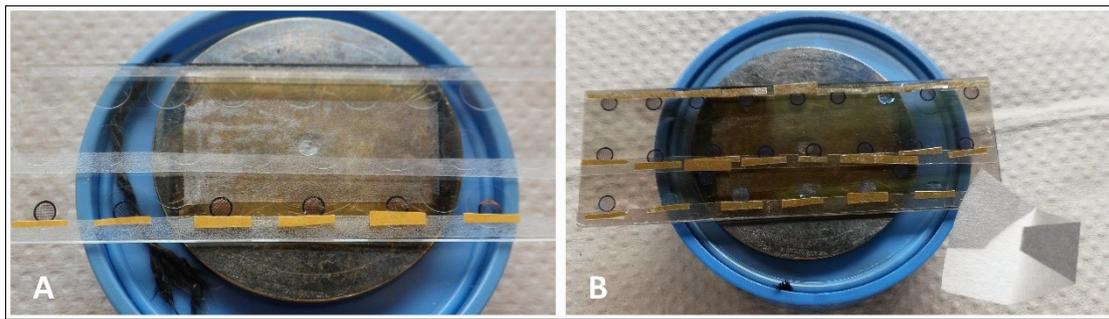
### 3.3 ELEKTRONENMIKROSKOPIE – HIGH PRESSURE FREEZING (HPF)

#### 3.3.1 KOHLEBEDAMPFUNG VON SAPHIRPLÄTTCHEN

Als Vorbereitung für das Hochdruckgefrieren werden zwei Saphirplättchen pro Probe mit Kohle bedampft. Dies ist erforderlich, um nach den einzelnen Arbeitsschritten und vor der Einbettung in Epon unterscheiden zu können, auf welcher Seite der Plättchen die Zellen gewachsen sind.

Die entsprechende Anzahl an Saphiren wird mit einer Pinzette aus dem Vorratsgefäß entnommen, mit Filterpapier getrocknet und in eine Petrischale überführt. Ein Objektträger wird mit doppelseitigem Klebeband auf dem schwarzen Träger des Kohlebedampfungsgeräts befestigt. Anschließend werden längliche, schmale Streifen doppelseitigen Klebebandes zugeschnitten und im Bereich der beiden langen Seiten des Objektträgers in Randnähe aufgeklebt. Nach Abziehen des Schutzstreifens werden die Saphirplättchen auf dem Klebeband fixiert. Unter dem Mikroskop erfolgt das Aufbringen der Kupfernetzchen, die mit Zahlen und Buchstaben versehen sind, auf die Saphirplättchen. Diese werden mit der matten Seite nach oben aufgelegt, sodass die Schrift spiegelverkehrt erscheint. Die Befestigung erfolgt abschließend mit einem weiteren dünnen, länglichen Streifen Klebeband. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Netzchen den Saphiren plan aufliegen. Ansonsten wird durch den Abstand bei der Bedampfung und die Streuung der Kohle die Schrift unscharf. Zusätzlich wird ein Filterpapier-Sektor zweifach geknickt und ebenfalls auf dem Objektträger neben den Saphiren befestigt. Durch die bei der Bedampfung entstehenden Farbunterschiede ist dann die Intensität der Kohleschicht erkennbar.

In Abbildung 9 ist die Anordnung von Tisch, Objektträger, Klebeband, Saphiren, Netzchen und geknicktem Filterpapier gezeigt.



**ABBILDUNG 9: KOHLEBEDAMPFEN DER SAPHIRPLÄTTCHEN**

Anordnung von Tisch, Objektträger, Klebeband, Saphiren, Netzen und geknicktem Filterpapier vor **(A)** und nach **(B)** der Bedampfung.

Die Reinigung des Kopfes des Kohlebedampfungsgeräts erfolgt durch Auspusten mit Druckluft. Es werden neue und angespitzte Graphitstäbe unter Druck eingespannt und die Blende geschlossen. Anschließend wird der Träger mit den Saphirplättchen in das Gerät eingelegt, die Glasmanschette gefettet und dicht adaptiert, der Deckel aufgesetzt und überprüft, ob die Blende geschlossen ist. Nachdem ein Vakuum von  $10^{-5}$  mbar erreicht ist, erfolgt das Vorglühen der Graphitstäbe bei geschlossener Blende. Dadurch werden mögliche Rückstände beseitigt. Währenddessen wird das Vakuum ruckartig abgebaut. Sobald das Vakuum nach circa 20 Minuten einen Wert unter  $10^{-4}$  mbar erreicht hat, wird die Blende geöffnet. Wenn nach circa 60 Minuten ein Vakuumwert von unter  $10^{-5}$  mbar angezeigt wird, kann mit der Kohlebedampfung der Saphire begonnen werden. Bei diesem Vorgang wird das Vakuum wieder abgebaut. Es muss dann erneut abgewartet werden, bis ein Wert von unter  $10^{-5}$  mbar erreicht ist. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis das Filterpapier bzw. die Saphirplättchen eine ausreichende Graufärbung aufweisen. Beim Ausschalten des Geräts ist darauf zu achten, dass das Vakuum langsam abgebaut wird. Der Deckel kann anschließend geöffnet und die bedampften Saphirplättchen entnommen werden.

Die Kohlebedampfung der Saphirplättchen wird durchgeführt nach dem Protokoll von Kent McDonald und Kollegen in *Methods in Cell Biology (Volume 96)* (McDonald et al., 2010).

### 3.3.2 HOCHDRUCKGEFRIEREN – HIGH PRESSURE FREEZING (HPF)

Der Schmelzpunkt von Wasser liegt bei einem Druck von 2045 bar bei  $-22\text{ °C}$  und die minimale Temperatur, bei der eine homogene Nukleation stattfindet, bei  $-92\text{ °C}$ . Als Nukleation oder Keimbildung wird der erste Teilprozess, der einen Phasenübergang erster Ordnung – in diesem Fall das Gefrieren von Wasser zu Eis – einleitet, bezeichnet. Dieses physikalische Prinzip stellt die Grundlage der Hochdruckgefrier-Methode dar. Nukleationsrate und Eiskristallwachstum sind unter den oben genannten Bedingungen deutlich verringert. Durch den hohen Druck wird die Ausdehnung des Wassers beim Gefrieren unterbunden und die Kristallbildung indirekt verhindert (Mulisch et al., 2015; Weimer, 2006).

Im Gegensatz zur konventionellen Fixierung kann beim Hochdruckgefrieren der Einsatz quervernetzender Fixiermittel im Anfangsstadium der Proben-Stabilisierung vermieden werden, was die außerordentlich gute Konservierung von zellulären Details ermöglicht (Monaghan et al., 2003).

Das Hochdruckgefrieren erfolgt im Hochdruckgefriersystem Leica EM HPM100 (siehe Abbildung 12 A).

Lösungen:

- Myoblastenmedium (siehe 3.1.1)
- Hexadecen

Zuerst wird eine Feuchtkammer vorbereitet. Dazu wird eine große Plastik-Petrischale mit einem zugeschnittenen und befeuchteten Whatman-Papier versehen und abgedeckt. In die Feuchtkammer wird ein Objektträger gelegt, der zuvor mit zwei Banden á vier Lagen Klebeband beklebt wurde. Pro Saphirplättchen wird eine Trägerplatte mit Einkerbung benötigt. Diese wird mit den Enden auf die Klebestreifen gelegt, sodass die Distanz dazwischen überbrückt wird und die Öffnung der Trägerplatte einen Abstand zum Objektträger aufweist (siehe Abbildung 10 C und Abbildung 11 A). Dadurch wird

verhindert, dass das Myoblastenmedium durch Kapillarkräfte vom Saphir gesaugt wird (Kaech and Ziegler, 2014).

Die Vorbereitung der Saphire wird in den Kapiteln 3.1.6 und 3.3.1 beschrieben.

Abbildung 10 gibt einen Überblick über den Arbeitsplatz für das Hochdruckgefrieren.



**ABBILDUNG 10: VORBEREITETER ARBEITSPLATZ FÜR HPF**

Der Arbeitsplatz wird mit Papiertüchern ausgelegt. **A** zeigt die Übersicht: Glaspipetten (links oben); Glas-Petrischalen mit Spacer-Ringen bzw. Deckeln (rechts oben); Trägerplatten, Halbschalen und Filterpapier (links unten), Feuchtkammer mit einem mit Klebeband umwickelten Objektträger (mittig); Pinzetten, Handschuhe, Abwurfgefäß, Becherglas mit dH<sub>2</sub>O (rechts unten). Im Bildausschnitt **B** sind die Wellplatte mit den bewachsenen Saphiren (oben), Filterpapier (links unten), die Feuchtkammer mit Objektträger und Trägerplatte (mittig unten) und eine Pinzette (rechts unten) zu sehen. In **C** ist die Feuchtkammer abgebildet. Der Objektträger ist mit zwei Banden Klebeband umwickelt, sodass die Öffnung der Trägerplatte einen Abstand zu diesem aufweist.

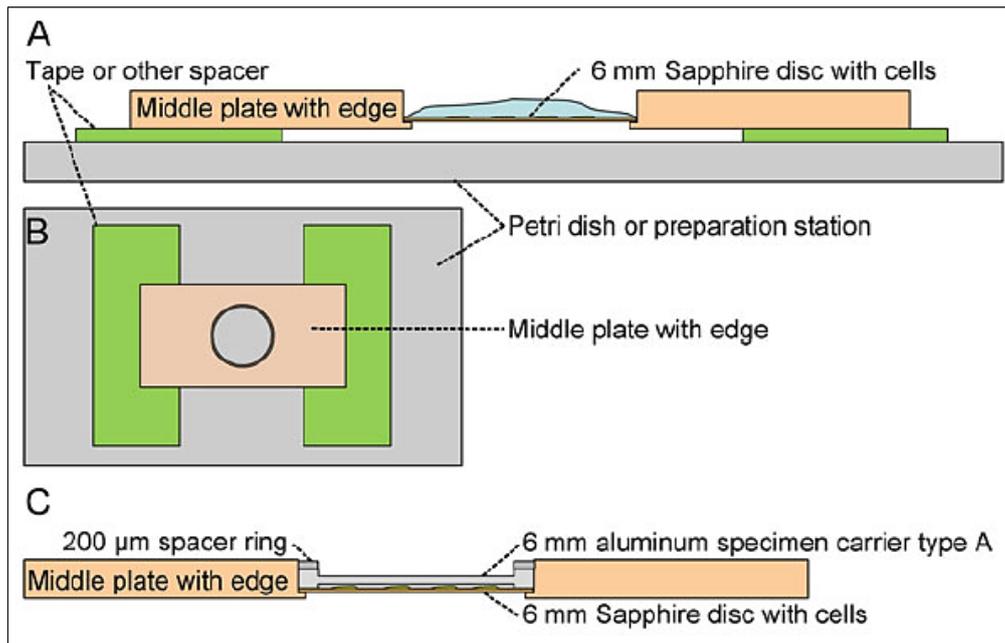
Sobald die Saphire dicht genug mit Zellen bewachsen sind, kann das Hochdruckgefrieren erfolgen.

Da die Leitungen des Leica EM HPM100 Ethanol führen, müssen einige Leerschüsse durchgeführt werden, um dieses zu entfernen. Dies ist notwendig, weil überschüssiger Alkohol am Rande der Mittelplatte oder im Bereich des Spacer-Rings gefriert, sodass das Saphirplättchen nach dem Einfrieren nicht von der Mittelplatte gelöst werden kann ohne beschädigt zu werden (Kaech and Ziegler, 2014).

Das Saphirplättchen wird aus der Petrischale entnommen und mit der bewachsenen Seite nach oben in die Öffnung der Trägerplatte auf die Einkerbung gelegt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass genügend Medium vorhanden ist, sodass die Zellen nicht austrocknen. Auf das Plättchen wird ein Deckel gelegt. Dieser besitzt auf beiden Seiten Vertiefungen von 100 µm bzw. 200 µm. Die 100µm-Seite wird in das Wärmeleitmedium Hexadecen (Mulisch et al., 2015) getaucht und auf den Saphir gesetzt. Kurz vorher wird

das Myoblastenmedium möglichst vollständig mit einer Glaspipette abgesaugt. Zuoberst wird ein 200 µm dicker Spacer-Ring auf den Deckel gesetzt, der mit der Oberkante der Trägerplatte abschließt.

In Abbildung 11 ist die Anordnung der einzelnen Bestandteile für das Hochdruckgefrieren der Sapphire schematisch dargestellt.



**ABBILDUNG 11: SCHEMAZEICHNUNG DER EINZELNEN KOMPONENTEN, DIE FÜR DAS HOCHDRUCKGEFRIEREN DER SAPHIRE U.A. ERFORDERLICH SIND**

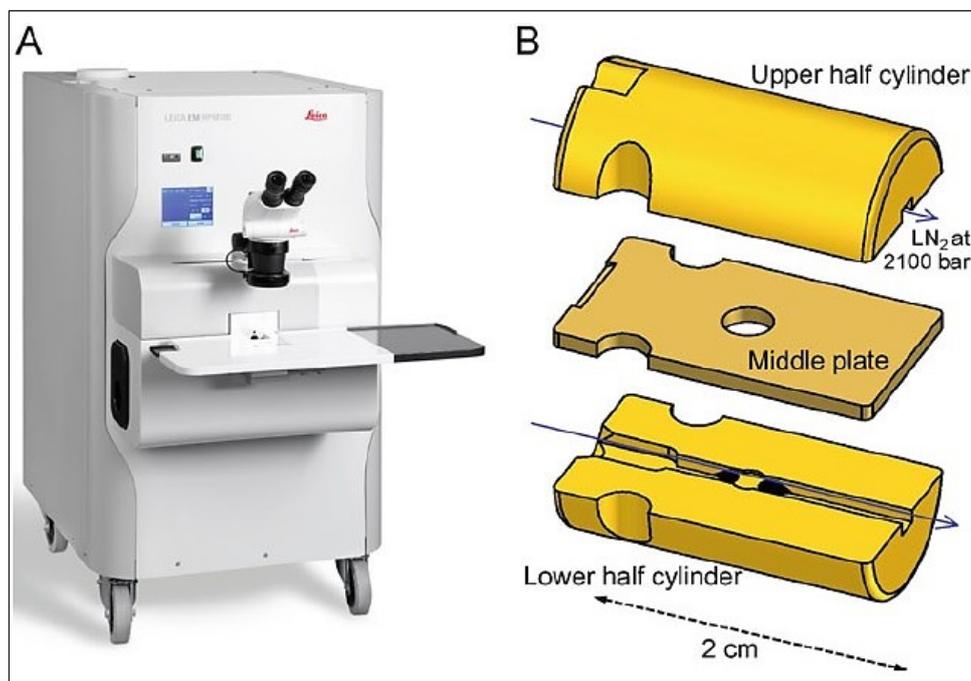
**A:** Objektträger (grau) mit zwei Banden Klebeband (grün), Mittelplatte mit Vertiefung und bewachenes Saphirplättchen mit Myoblastenmedium in Seitenansicht. Der Abstand zwischen Petrischale und Mittelplatte verhindert, dass das Myoblastenmedium durch Kapillarkräfte vom Saphir gesaugt wird. **B:** Ansicht von oben. **C:** Seitenansicht der Mittelplatte mit Saphirplättchen, Deckel mit Vertiefungen (100µm-Seite nach unten) und Spacer-Ring (Kaech and Ziegler, 2014).

Da Luftblasen innerhalb der Gefrierkammer als Isolatoren wirken und somit die Kühlrate innerhalb der Probe herabsetzen, muss darauf geachtet werden, dass die Kammer komplett vom Wärmeleitmedium ausgefüllt wird. Außerdem kann es unter hohem Druck zum Kollabieren der Luftblasen kommen, was eine Schädigung der Gefrierkammer und der Probe hervorruft (Weimer, 2006).

Das Konstrukt aus Trägerplatte, Saphirplättchen, Metaldeckel und Spacer-Ring (siehe Abbildung 11) wird auf die untere Halbschale gelegt. Die obere Halbschale wird darauf-

geklappt. Somit entsteht die Patrone, die sowohl als Probenhalter als auch als Gefrierkammer dient und in das Hochdruckgefriersystem geschoben wird (siehe Abbildung 12). Anschließend kann der Schuss ausgelöst werden. Dabei wird der flüssige Stickstoff mit einem Druck von 2100 bar durch den Flusskanal in den Halbschalen an der Probe vorbeigeschossen.

Dies führt zu einer sofortigen Fixierung der Zellen im Bereich von Millisekunden. Durch diese schnelle Abkühlung wird das Wasser in einen glasartigen Zustand überführt und die Eiskristallbildung vermieden (Bullen et al., 2014).



**ABBILDUNG 12: DAS HOCHDRUCKGEFRIERSYSTEM LEICA EM HPM100 (A) UND DIE SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER GEFRIER-PATRONE (B)**

In **A** ist die Hochdruckgefrieranlage Leica EM HPM100 mit Arbeitsfläche, Binokularmikroskop und Touchscreen in der Frontansicht gezeigt. **B**: Schemazeichnung der Gefrierkammer bestehend aus oberer und unterer Halbschale jeweils mit Einkerbung und Mittelplatte mit Vertiefung für die zu gefrierende Probe (Kaech and Ziegler, 2014).

Nach dem Gefriervorgang fällt die Patrone in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Behälter, der seitlich am Gerät angebracht ist. Im Normalfall werden alle Einzelteile voneinander gelöst und liegen frei vor. Es ist darauf zu achten, dass die Deckel von den Saphirplättchen getrennt werden. Ansonsten werden die Zellen nicht von den im weiteren Verlauf verwendeten Lösungen erreicht. Das Saphirplättchen wird aus dem Behälter

entnommen und mit Hilfe einer Transportbox, die flüssigen Stickstoff enthält, in des Gefriersubstitutions- und Tieftemperatureinbettungssystem Leica EM AFS2 überführt.

Das Hochdruckgefrieren der Saphire wird durchgeführt nach dem Protokoll von Andres Käch und Urs Ziegler in *Methods in Molecular Biology (Volume 1117)* (Kaech and Ziegler, 2014).

### 3.3.3 GEFRIERSUBSTITUTION – FREEZE SUBSTITUTION (FS)

Die Entwässerung bei tiefen Temperaturen wird als Gefriersubstitution bezeichnet und in der automatisierten Substitutionsanlage Leica EM AFS2 durchgeführt. Bei niedrigen Temperaturen zwischen -90 und -78 °C wird das gefrorene Wasser gegen ein organisches Lösungsmittel – in diesem Fall Aceton – ausgetauscht. Dadurch werden die Zellen beim Auftauen nicht durch Eiskristallbildung geschädigt. Um die Zellstrukturen zu stabilisieren und den Kontrast zu erhöhen, werden dem Lösungsmittel chemische Fixantien und Kontrastmittel zugesetzt (Weimer, 2006).

Lösungen:

- 0,5 % (Vol.-%) Glutaraldehyd in anhydriertem Aceton
  - 0,1 % (Gew.-%) Tanninsäure in anhydriertem Aceton
  - anhydriertes Aceton
  - 2 % Osmiumtetroxid in anhydriertem Aceton
- 50 % 4%iges OsO<sub>4</sub>  
25 % Cacodylatpuffer 0,2 M  
25 % anhydriertes Aceton  
alle Angaben in Vol.-%

Nachdem die Saphirplättchen in das vorgekühlte Gefriersubstitutionssystem überführt worden sind, werden sie in kleine Plastikzylinder gelegt. Diese stehen in Aluminiumzylindern, die mit der entsprechenden Lösung gefüllt sind und zwischen den einzelnen Arbeitsschritten mit Teflondeckeln abgedeckt werden. Es ist auf eine genaue Dokumentation zu achten, um eine Verwechslung der Proben auszuschließen.

Die Inkubation in 0,5 % Glutaraldehyd und 0,1 % Tanninsäure in anhydriertem Aceton erfolgt bei  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 96 Stunden, wobei die Lösung nach ungefähr 24 Stunden einmal gewechselt wird, um das bereits herausgelöste Wasser zu entfernen.

Glutaraldehyd fungiert hierbei als vernetzendes Fixans, wohingegen die Tanninsäure beizende Eigenschaften besitzt und so den späteren Kontrast der Membranen erhöht. Nach Ablauf der 96 Stunden werden die Proben viermal innerhalb von vier Stunden mit reinem anhydriertem Aceton gewaschen. Somit erfolgt die Entfernung der Substitutionslösung. Die Proben werden anschließend in 2 % Osmiumtetroxid in anhydriertem Aceton für mindestens 28 Stunden bei  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingelegt.

Osmium ist ein elektronendichtes Fixiermittel, das eine Quervernetzung von Lipiden bewirkt (Weimer, 2006). Da die Reaktion von Osmiumtetroxid bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  beginnt (White et al., 1976), erfolgt innerhalb von 14 Stunden eine Temperaturerhöhung auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Diese wird für 16 Stunden gehalten bis sich innerhalb weiterer vier Stunden der Temperaturanstieg auf  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  anschließt. Sobald eine Temperatur von  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  erreicht ist, erfolgt sofort der erste Waschschrift mit reinem anhydriertem Aceton, weil die Reaktivität von Osmium bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  deutlich höher ist als unter  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Innerhalb der folgenden vier Stunden schließen sich drei weitere Waschschriffe mit reinem anhydriertem Aceton, sowie eine Temperaturerhöhung auf Raumtemperatur an (Weimer, 2006).

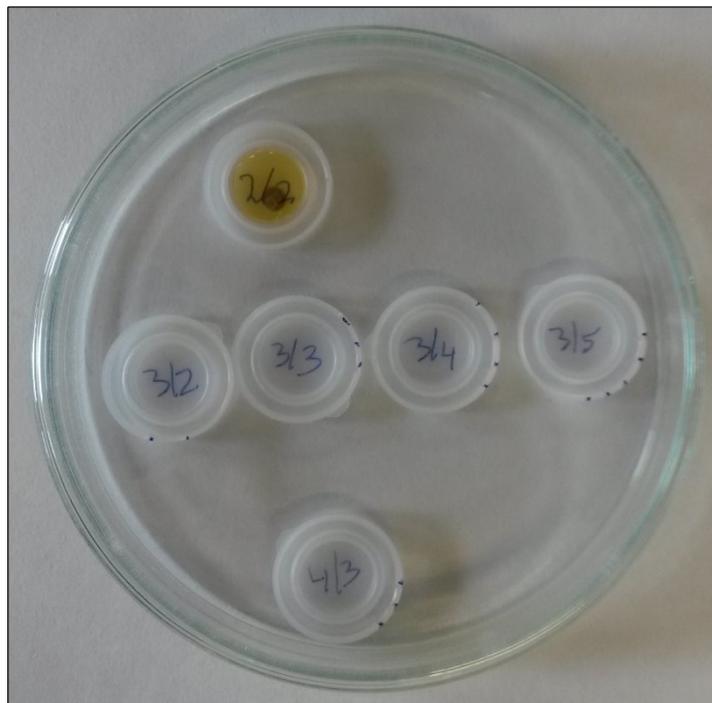
### 3.3.4 INFILTRATION UND EINBETTUNG IN EPON

Nachdem die Temperaturerhöhung abgeschlossen ist, erfolgt die Einbettung der Proben bei Raumtemperatur (Mulisch et al., 2015).

Lösungen:

- Epon (siehe 3.2.2)
  - anhydriertes Aceton
  - 50 % Epon in anhydriertem Aceton
  - 90 % Epon in anhydriertem Aceton
- alle Angaben in Vol.-%

Für alle Infiltrationsschritte werden Plastik-Schnappdeckel zur Zuordnung beschriftet, eingekerbt und in einer Glaspetrischale mit Deckel aufbewahrt (siehe Abbildung 13).



**ABBILDUNG 13: VORBEREITETE PLASTIKSCHNAPPDECKEL FÜR DIE INFILTRATION VON EPON**

Nach dem Hochdruckgefrieren und der Gefriersubstitution erfolgt die Infiltration von Epon. Dafür werden Plastikschnappdeckel benötigt.

Im ersten Schritt wird 50 % Epon in Aceton in die Deckel vorgelegt und die Saphire in die Mischung überführt. Hierbei muss zügig gearbeitet werden, sodass die Proben nicht austrocknen. Nach drei bis fünf Stunden wird das Epon-Aceton-Gemisch abgesaugt und durch 90 % Epon in Aceton ersetzt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag werden neue Plastik-Schnappdeckel vorbereitet und mit 100 % Epon gefüllt. Sobald die Proben Raumtemperatur erreicht haben, werden sie aus der 90%igen Epon-Aceton-Mischung entnommen, am Rand des Deckels abgestreift und in reines Epon überführt. Nach zwei bis drei Stunden wird das 100%ige Epon gewechselt. Die Flacheinbettung erfolgt nach weiteren zwei bis drei Stunden. Das Vorgehen entspricht dem in 3.2.3 beschriebenen Ablauf für Deckgläschen.

Gefrierubstitution (siehe 3.3.3) und Einbettung in Epon (siehe 3.3.4) nach dem Hochdruckgefrieren werden durchgeführt nach dem Protokoll von Robby M. Weimer in *Methods in Molecular Biology (Volume 351)* (Weimer, 2006), angepasst durch Christian Stigloher.

### 3.4 ANFERTIGUNG VON ULTRADÜNNNSCHNITTEN

Proben, die unter dem Transmissionselektronenmikroskop untersucht werden sollen, müssen verschiedene Anforderungen erfüllen. Sie müssen vakuumfest und damit waserfrei sein und dem Elektronenstrahl standhalten. Um die Durchlässigkeit für Elektronen zu gewährleisten, dürfen sie eine gewisse Dicke und Dichte nicht überschreiten. Dazu erfolgt die Anfertigung von Ultradünnschnitten (Mulisch et al., 2015).

Nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Epons werden die Kapseln von der Alufolie abgelöst und der überstehende Rand des Deckglases beziehungsweise Saphirplättchens mit einer Schere entfernt. Die Proben werden für ca. 10 Minuten zurück in den Wärmeschrank gestellt und anschließend in flüssigen Stickstoff gegeben, damit sich die Deckgläschen beziehungsweise Saphire vom Epon lösen (Mulisch et al., 2015). Nach der Entnahme der Gelatine kapseln aus dem Stickstoff werden diese angehaucht und das

restliche Glas mit Hilfe von Pressluft abgesprengt. Die Probe liegt nun frei und überschüssiges Epon wird mittels einer Rasierklinge entfernt. Unter dem Binokular wird eine Stelle in der Probe aufgesucht, die gut mit Zellen bewachsen ist und als flache Pyramide so zugespitzt (getrimmt), dass das Präparat an deren Spitze liegt (Mulisch et al., 2015). Das getrimmte Eponblöckchen wird in das Ultramikrotom eingespannt. Mit einem Diamantmesser werden Schnitte von 50 bis 70 nm Dicke angefertigt und anschließend auf ein mit Pioloform beschichtetes Objektträgernetzchen (Grid) aus Kupfer übertragen. Nach dem Trocknen des Netzchens wird dieses in einer Grid-Box aufbewahrt (Mulisch et al., 2015).

### 3.5 KONTRASTIEREN VON ULTRADÜNNNSCHNITTEN

Da biologische Proben hauptsächlich aus Atomen mit geringem Molekulargewicht bestehen, deren Elektronendichte nur geringgradig voneinander abweicht, grenzen sich die Zellstrukturen eines unbehandelten Ultradünnschnittes im TEM-Bild nur wenig voneinander und vom Einbettmedium ab. Daher ist die Kontrastierung von Ultradünnschnitten von entscheidender Bedeutung für die Transmissionselektronenmikroskopie. Sie gibt Aufschlüsse über die chemische Zusammensetzung und Form, Größe und Dichte der Zellkomponenten (Mulisch et al., 2015).

Für Ultrastrukturuntersuchungen wird routinemäßig die Schnittkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat genutzt (Mulisch et al., 2015).

Lösungen:

- 2 % (Gew.-%) Uranylacetat in Ethanol
- abgekochtes dH<sub>2</sub>O
- 100 % (Vol.-%) Ethanol
- Reynold's Bleicitrat (Reynolds, 1963)

Vorbereitend wird Parafilm auf einer Glasplatte befestigt. Zum Abdecken werden zwei Petrischalen benötigt. Destilliertes Wasser wird für 10 Minuten gekocht und kann nach dem Abkühlen verwendet werden. Weiterhin wird 2% Uranylacetat in Ethanol hergestellt. Hierbei muss ein schwarzes Eppi verwendet werden, da Uranylacetat lichtempfindlich ist. In einem weißen Eppi wird Reynold's Bleicitrat mit abgekochtem dH<sub>2</sub>O verdünnt (1:1) und für 5 Minuten bei 13500 rpm (Hettich Mikroliter) zentrifugiert.

Pro Netzchen wird ein UA-EtOH-Tropfen von 50 µl auf die Parafilm-Glasplatte gegeben. Die dunkle, glänzende Seite des Kupfernetzchens wird nach unten auf das Uranylacetat gelegt, mit einer Petrischale abgedeckt und für 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgen drei Waschschriffe. Für je 15 Sekunden wird in 100 % Ethanol, in einem Ethanol-Wasser (abgekocht)-Gemisch (1:1) und in abgekochtem dH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Netzchen werden dann mit abgekochtem dH<sub>2</sub>O abgespült und mit Filterpapier getrocknet. Für jedes Netzchen wird ein Bleicitrat-Tropfen von jeweils 50 µl auf die Parafilm-Glasplatte vorgelegt. Um die Tropfen wird ein Ring aus NaOH-Plätzchen gelegt, um den CO<sub>2</sub>-Gehalt möglichst gering zu halten, da Bleicitrat mit dem CO<sub>2</sub> der Luft reagiert. Dadurch entstehendes Bleicarbonat würde zu einer starken Verschmutzung der Schnitte führen (Mulisch et al., 2015). Die Netzchen werden mit der Probenseite nach unten auf die Bleicitrat-Tropfen gelegt, mit einer Petrischale abgedeckt und für 10 Minuten inkubiert. Danach wird mit abgekochtem dH<sub>2</sub>O zweimal für je 15 Sekunden gewaschen. Die Proben werden daraufhin mit abgekochtem dH<sub>2</sub>O abgespült, mit Filterpapier getrocknet und zurück in die Grid-Box gelegt.

Anfertigung (siehe 3.4) und Kontrastierung (siehe 3.5) der Ultradünnschnitte erfolgen in modifizierter Form nach dem Protokoll von Maria Mulisch, Ulrich Welsch und Kollegen in *Romeis: Mikroskopische Technik (19. Auflage)* (Mulisch et al., 2015).

### 3.6 INDIREKTE IMMUNFLUORESZENZ

Sobald Licht einer bestimmten Wellenlänge auf ein Molekül trifft, werden Photonen absorbiert und Elektronen des Moleküls angeregt, das heißt auf ein höheres Energieniveau gehoben. Bei Rückkehr der Elektronen in den Grundzustand wird die freiwerdende Energie als Wärme und längerwelliges, energieärmeres Licht abgegeben. Dieses Prinzip wird Fluoreszenz genannt (Mulisch et al., 2015).

Als Fluorochrome werden Moleküle bezeichnet, die Licht eines bestimmten Spektrums absorbieren und dieses als langwelligere Strahlung teilweise wieder abgeben. Absorptionsspektrum, Emissionsspektrum und Intensität des emittierten Lichts sind dabei jeweils charakteristisch für das entsprechende fluoreszierende Molekül.

Zum Nachweis von Makromolekülen wie Proteine, Polysaccharide und Nukleinsäuren und deren Verteilung in den vorliegenden Myoblasten wird die Methode der indirekten Immunfluoreszenz angewandt. Hierbei bindet zuerst der Primärantikörper an das zu lokalisierende Antigen. Im zweiten Schritt bindet ein fluorochromgekoppelter Sekundärantikörper an den Primärantikörper. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird der Marker und damit auch das entsprechende Antigen sichtbar (Mulisch et al., 2015).

#### 3.6.1 FIXIERUNG

Nachdem die auf Deckgläschen angesetzten Zellen (Vorgehen siehe 3.1.5) eine ausreichende Dichte erreicht haben, erfolgt die Fixierung durch Methanol und Aceton oder durch Paraformaldehyd und Triton X-100.

### 3.6.1.1 FIXIERUNG MITTELS METHANOL UND ACETON

Lösungen:

- Methanol zur Analyse
- Aceton zur Analyse
- PBS (siehe 3.1.3)

Die Gläschen werden aus der Petrischale entnommen, kurz in PBS gewaschen und zuerst für 10 Minuten bei -20 °C in Methanol fixiert und anschließend für 5 Minuten bei -20 °C in Aceton permeabilisiert (Blouin and Blaho, 2001). Danach werden die Deckgläschen getrocknet und mit der Probenseite nach oben in eine Feuchtkammer auf einen Streifen Parafilm gelegt.

### 3.6.1.2 FIXIERUNG MITTELS PARAFORMALDEHYD UND TRITON X-100

Lösungen:

- 2 % (Gew.-%) Paraformaldehyd (PFA) in PBS
- 0,2 % (Vol.-%) Triton X-100 in PBS
- PBS (siehe 3.1.3)

Nach Entnahme der Deckgläschen aus der Petrischale werden diese kurz in PBS eingetaucht und in eine Feuchtkammer auf einen Streifen Parafilm gelegt. Zur Fixierung (Parr and Oei, 1973) wird für 10 Minuten mit 2 % PFA bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss werden die Deckgläschen dreimal fünf Minuten in PBS gewaschen. In der Feuchtkammer erfolgt dann die Permeabilisation mit 0,2 % Triton X-100 (Lindon et al., 1998) für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wird erneut dreimal für jeweils 5 Minuten

mit PBS gewaschen und die Deckgläschen werden anschließend wieder in die Feuchtkammer gelegt. Es ist darauf zu achten, dass die Proben während der Fixierung nicht austrocknen.

### 3.6.2 ANTIKÖRPERINKUBATION UND FIXIERUNG AUF DEM OBJEKTTRÄGER MIT MOWIOL

Lösungen:

- PBS (siehe 3.1.3)
- Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe 2.3.1)
- Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe 2.3.2)
- Hoechst in entsprechender Verdünnung (siehe 2.3.1)
- Ethanol absolut zur Analyse
- Mowiol

Auf jede der zuvor fixierten Proben werden 50 µl des entsprechend mit PBS verdünnten Primärantikörpers gegeben und zugedeckt für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abtropfen der Antikörper-Lösung wird dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Die Waschschrte dienen jeweils dazu, nicht spezifisch gebundene Antikörper zu entfernen (Mulisch et al., 2015).

Die Inkubation mit je 50 µl des verdünnten Sekundärantikörpers erfolgt für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf Parafilm in der Feuchtkammer. Nach 20 Minuten wird entsprechend verdünntes Hoechst in PBS zum Sekundärantikörper auf die Deckgläschen gegeben. Dieser fluoreszierende Kernfarbstoff wird zur Gegenfärbung verwendet (Mulisch et al., 2015).

Anschließend wird dreimal für 5 Minuten mit PBS und einmal 1 Minute mit Ethanol gewaschen. Nach Abtrocknen der Proben werden diese mit den Zellen nach unten mit Mowiol auf einem Objektträger fixiert. Mowiol wird mit anti-fading-Agenzien versetzt, um das Ausbleichen der Fluoreszenz unter Belichtung zu verhindern (Mulisch et al., 2015). Die Lagerung erfolgt lichtgeschützt in einer Mappe im Kühlschrank.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Trotz unterschiedlicher genetischer Ursachen zeigen FSHD und die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD) phänotypisch Ähnlichkeiten in der Ausprägung der Erkrankungen. Da bei der EDMD bereits in früheren Studien Veränderungen der Kernhülle von erkrankten Myoblasten beschrieben wurden (Reichart et al., 2004; Sabatelli et al., 2001), wird diese bei den FSHD-Myoblasten elektronenmikroskopisch untersucht und mit der Kernhülle gesunder Kontrollzellen verglichen.

Interessanterweise konnten in anderen Untersuchungen beim Vergleich gesunder Myoblasten und FSHD-Myoblasten Auffälligkeiten der Mitochondrien von FSHD-Patienten festgestellt werden (Turki et al., 2012). Neben der Kernhülle werden daher auch elektronenmikroskopische Untersuchungen der Mitochondrien von FSHD-Myoblasten und der entsprechenden Kontrolle durchgeführt.

Während der Kultivierung zeigen Myoblasten allgemein altersabhängige Veränderungen hinsichtlich des Differenzierungsmusters. Außerdem werden eine Verringerung der Zellteilungsrate und Seneszenzprozesse beschrieben (Schmitz, 2011). Daher muss auf die entsprechende Passage, das heißt die unterschiedliche Anzahl an Subkultivierungen, der FSHD-Myoblasten und der Kontrollzellen geachtet werden. Im Rahmen der Versuche werden Myoblasten der Passagen 6, 11 und 16 verwendet, wobei sich die Frage stellt, ob ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit des Auftretens von Abweichungen, Besonderheiten oder Unregelmäßigkeiten und der Höhe der Passage besteht.

Da bei FSHD unterschiedliche Muskelgruppen betroffen sind (siehe 1.5.1) und die Schwere der genetischen Schädigung eine Rolle für die Ausprägung der Erkrankung zu spielen scheint (siehe 1.5.2), werden drei verschiedene Zelllinien für die Untersuchungen verwendet. Dabei soll geklärt werden, ob Patientenalter und -geschlecht, Entnahmestelle des Gewebes und Anzahl der DZ4Z-Wiederholungen Einfluss auf die Morphologie der untersuchten Myoblasten nehmen.

Zur Vorbereitung der Proben auf die Elektronenmikroskopie werden zwei Fixierungsmethoden angewandt und hinsichtlich ihrer Eignung und ihrer Vor- und Nachteile für morphologische Untersuchungen an Myoblasten verglichen.

Die Hochdruckgefrierung (HPF) soll in Bezug auf die Qualität des Strukturerhalts, die bei dieser Fixierung erreicht wird, allen anderen Verfahren überlegen sein (Weimer, 2006). HPF und anschließende Gefriersubstitution stehen deshalb der konventionellen, chemischen Fixierung und Flacheinbettung von Kulturzellen auf Deckgläschen gegenüber.

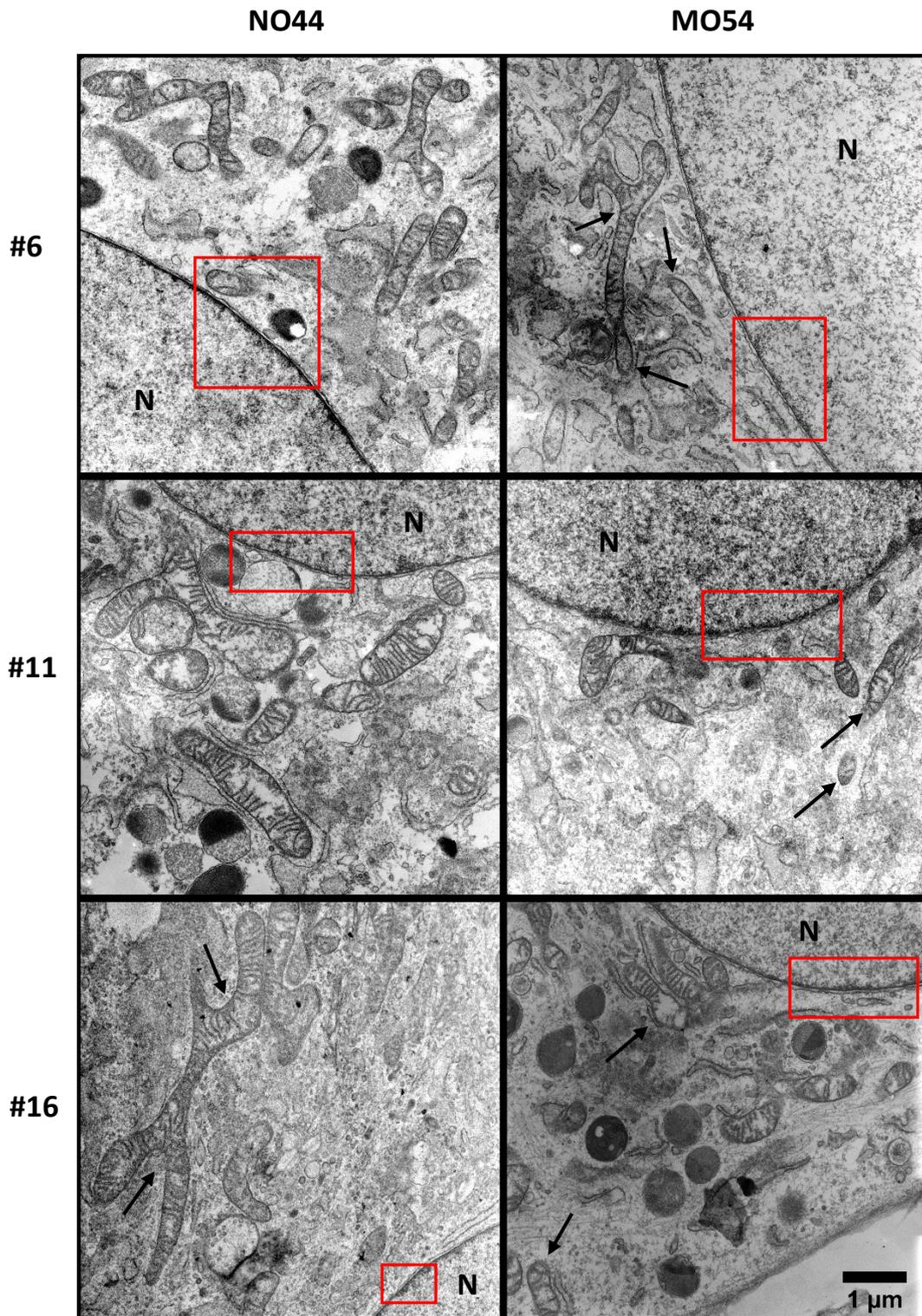
### 4.1.1 KONVENTIONELLE FIXIERUNG

Die in 2.1 aufgeführten Myoblasten wurden für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen nach chemischer Fixierung, Entwässerung und Flacheinbettung in den Passagen 6, 11 und 16 (#6, #11 und #16) verwendet.

Abbildung 14 zeigt Übersichtsaufnahmen der FSHD-Myoblasten MO54 und den dazugehörigen Kontrollzellen NO44.

Bei NO44 sind meist typisch geformte Mitochondrien mit Cristae erkennbar. In Passage 6 zeigen die Mitochondrien keine Auffälligkeiten. Die Mitochondrien von NO44 in Passage 11 weisen erste Veränderungen hinsichtlich Größe und Form auf. Ein besonders markantes, sehr großes und verzweigtes Mitochondrium ist in Passage 16 mit Pfeilen markiert.

Ein vergrößertes und verzweigtes Mitochondrium ist bei den FSHD-Myoblasten MO54 bereits in Passage 6 zu sehen und mit einem Pfeil gekennzeichnet. Insgesamt weisen die Mitochondrien weniger Cristae auf als diejenigen von NO44. Es sind Leerräume innerhalb der Mitochondrien aller Passagen von MO54 zu erkennen (siehe Pfeile in Abbildung 14).



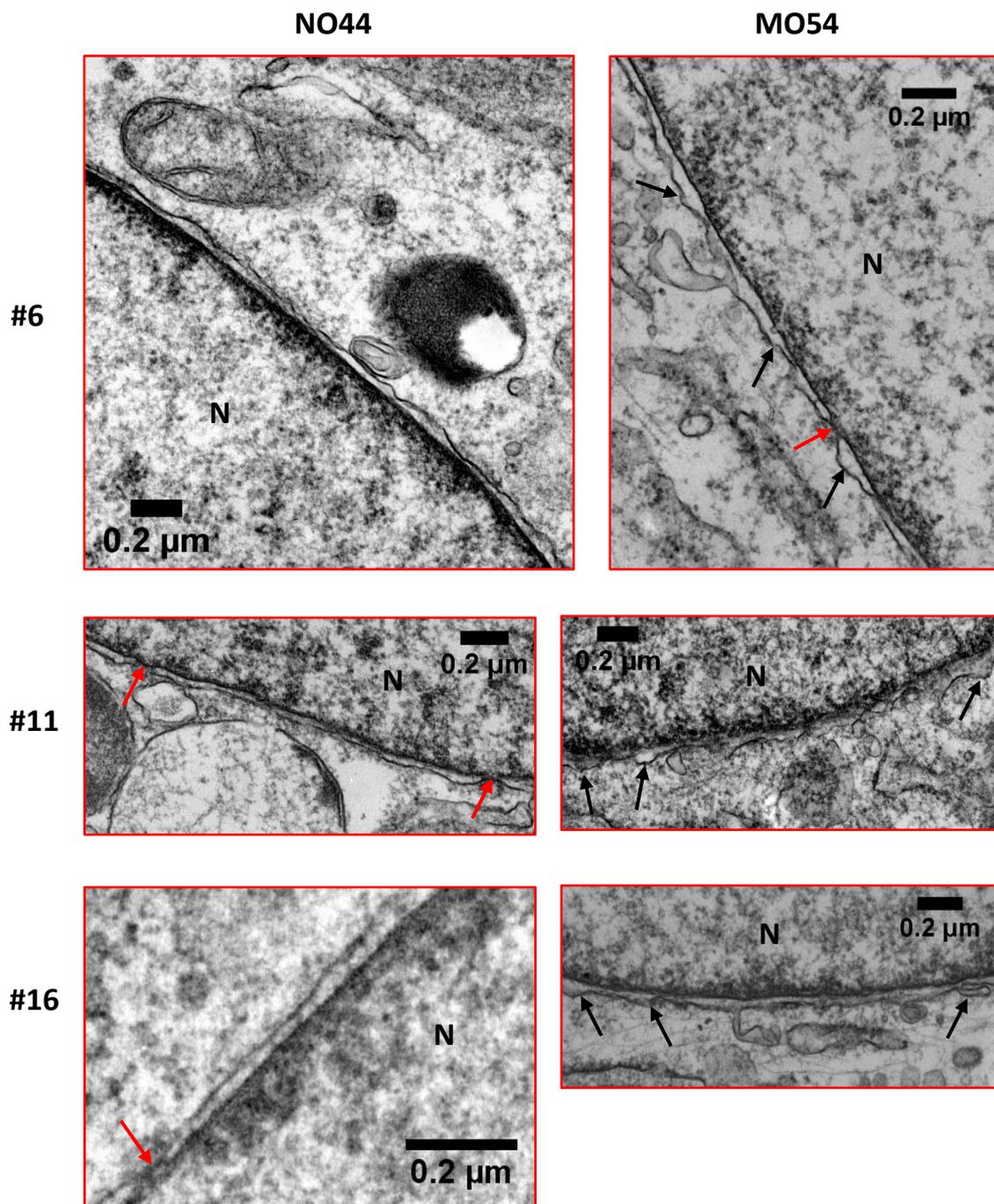
**ABBILDUNG 14: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ÜBERSICHTSAUFNAHMEN DER KONVENTIONELL FIXIER-  
TEN MYOBLASTEN NO44 UND MO54**

In den Aufnahmen der Myoblasten sind jeweils ein Ausschnitt der Kernhülle und Mitochondrien abgebildet. Die Zell-Morphologie wurde in verschiedenen Passagen untersucht. Auffällige Mitochondrien sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Vergrößerungen der rot umrahmten Abschnitte der Kernhülle sind in Abbildung 15 dargestellt. Das Nukleoplasma ist durch **N** markiert.

Die rot eingerahmten Bereiche der Kernhülle aus den Übersichtsaufnahmen (siehe Abbildung 14) sind in Abbildung 15 vergrößert dargestellt.

Die innere und äußere Kernmembran der Kontroll-Myoblasten NO44 sind in den Ausschnitts-Vergrößerungen gut erkennbar und verlaufen in meist regelmäßigem Abstand parallel zueinander. Rote Pfeile markieren in den Passagen 11 und 16 die Kernporen. Die Lamina liegt als schwarze Struktur der INM im Nukleoplasma an. Das Heterochromatin scheint homogen entlang der Kernhülle verteilt zu sein.

Bei den FSHD-Myoblasten MO54 sind innere und äußere Kernmembran weiter voneinander entfernt als bei der Kontrolle. Die ONM aller Passagen verläuft sehr unregelmäßig gewellt (siehe schwarze Pfeile in Abbildung 15). Obwohl die Kernhülle in den gezeigten Ausschnitten kaum von Kernporen durchsetzt ist, weisen INM und ONM einen variierenden Abstand zueinander auf. In Passage 16 ist eine leichte Ausstülpung der ONM erkennbar und mit einem schwarzen Pfeil markiert. Es scheint so, als ob ein Teil der äußeren Kernmembran abgeschnürt würde. Daher wird diese Besonderheit als bleb (deutsch: Bläschen) bezeichnet. Bei Passage 16 treten die Unregelmäßigkeiten häufiger und deutlicher auf als bei Passage 6. Eine typische Kernpore ist in Passage 6 mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.



**ABBILDUNG 15: VERGRÖßERTE AUSSCHNITTE DER KERNHÜLLE DER KONVENTIONELL FIXIERTEN MY-OBLASTEN NO44 UND MO54**

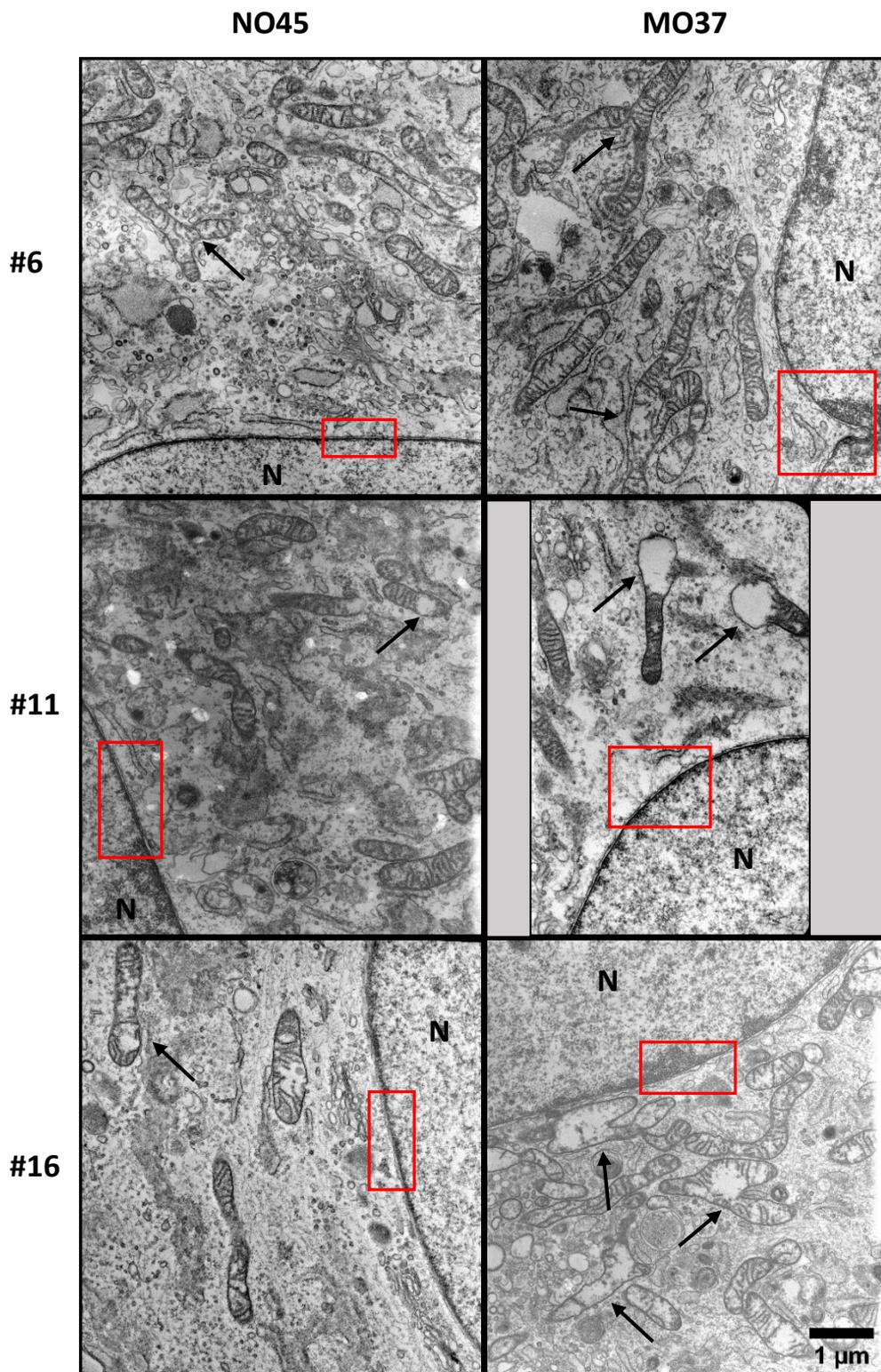
Die innere und die äußere Kernmembran sind deutlich zu erkennen. Auffälligkeiten an der Kernhülle und Ausstülpungen der ONM sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Rote Pfeile markieren die Kernporen. N kennzeichnet das Nukleoplasma.

Die Passagen 6, 11 und 16 der FSHD-Myoblasten MO37 und der zugehörige Kontrolle NO45 sind in Abbildung 16 in der Übersicht dargestellt.

Bei den Kontroll-Myoblasten NO45 fällt in Passage 6 ein verzweigtes Mitochondrium auf. In Passage 11 sind ebenfalls atypisch geformte Mitochondrien zu erkennen. Teilweise enthalten die Mitochondrien von NO45 #11 wenige Cristae. Die Mitochondrien in Passage 16 zeigen eine leichte Vergrößerung und enthalten weniger Cristae als diejenigen der Passagen 6 und 11.

Die erkrankten Zellen MO37 weisen in allen Passagen große und/oder verzweigte Mitochondrien auf. Sie enthalten weniger Cristae als die der Kontroll-Myoblasten und erscheinen deshalb stellenweise leer. Bereits in Passage 6 sind vergrößerte und verzweigte Mitochondrien erkennbar. Bei Passage 11 fallen deutliche Leerräume innerhalb zweier Mitochondrien auf. Vergrößerungen, Verzweigungen und reduzierte Cristae sind bei den Mitochondrien von MO37 #16 festzustellen.

Auffällige Mitochondrien sind in Abbildung 16 jeweils mit Pfeilen markiert.



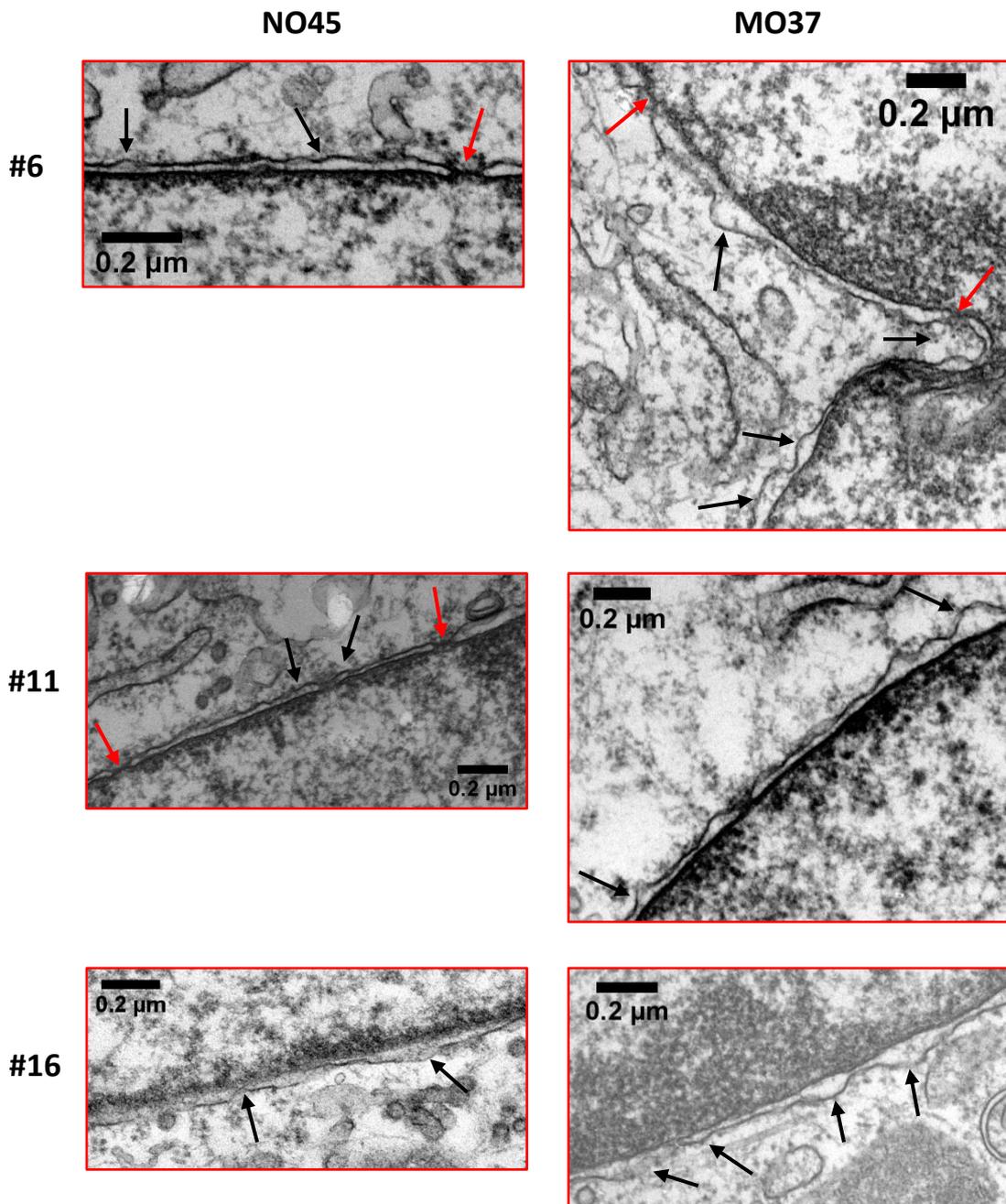
**ABBILDUNG 16: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ÜBERSICHTSAUFNAHMEN DER KONVENTIONELL FIXIERTEN MYOBLASTEN NO45 UND MO37**

Die vorliegenden Aufnahmen der Myoblasten zeigen jeweils einen Ausschnitt der Kernhülle und Mitochondrien. Zur Untersuchung der Zell-Morphologie wurden verschiedene Passagen verwendet. Pfeile markieren auffällige Mitochondrien. Die rot eingerahmten Bereiche sind in Abbildung 17 vergrößert dargestellt. **N** kennzeichnet das Nukleoplasma.

In Abbildung 17 sind die rot umrahmten Bereiche der Kernhülle aus den Übersichtsaufnahmen von NO45 und MO37 (siehe Abbildung 16) vergrößert dargestellt.

Zwischen parallelen Abschnitten von ONM und INM verläuft die äußere Kernmembran der Kontroll-Myoblasten NO45 in allen Passagen teilweise leicht gewellt, woraus an einigen Stellen ein leicht variierender Abstand von ONM und INM resultiert (siehe schwarze Pfeile in Abbildung 17). In den Passagen 6 und 11 sind Kernporen schön erkennbar und in Abbildung 17 mit roten Pfeilen markiert.

INM und ONM der FSHD-Myoblasten MO37 sind gut erkennbar. Sie verlaufen nicht parallel und weisen ungleichmäßige Abstände auf. Die äußere Kernmembran zeigt im Vergleich zur Kontrolle einen stärker gewellten und unregelmäßigeren Verlauf. Eine Invagination, also eine gemeinsame Einstülpung von innerer und äußerer Kernmembran in Richtung Kern-Inneres, ist in Passage 6 zu sehen. Auffälligkeiten der Kernhülle sind in Abbildung 17 mit schwarzen Pfeilen markiert. Weiterhin sind in den Vergrößerungsaufnahmen der Kernhülle typische Kernporen zu erkennen und mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Verglichen mit den Kontroll-Myoblasten NO45 #6 und #16 scheint im Bereich der Kernhülle von MO37 #6 und #16 mehr Heterochromatin vorhanden zu sein.



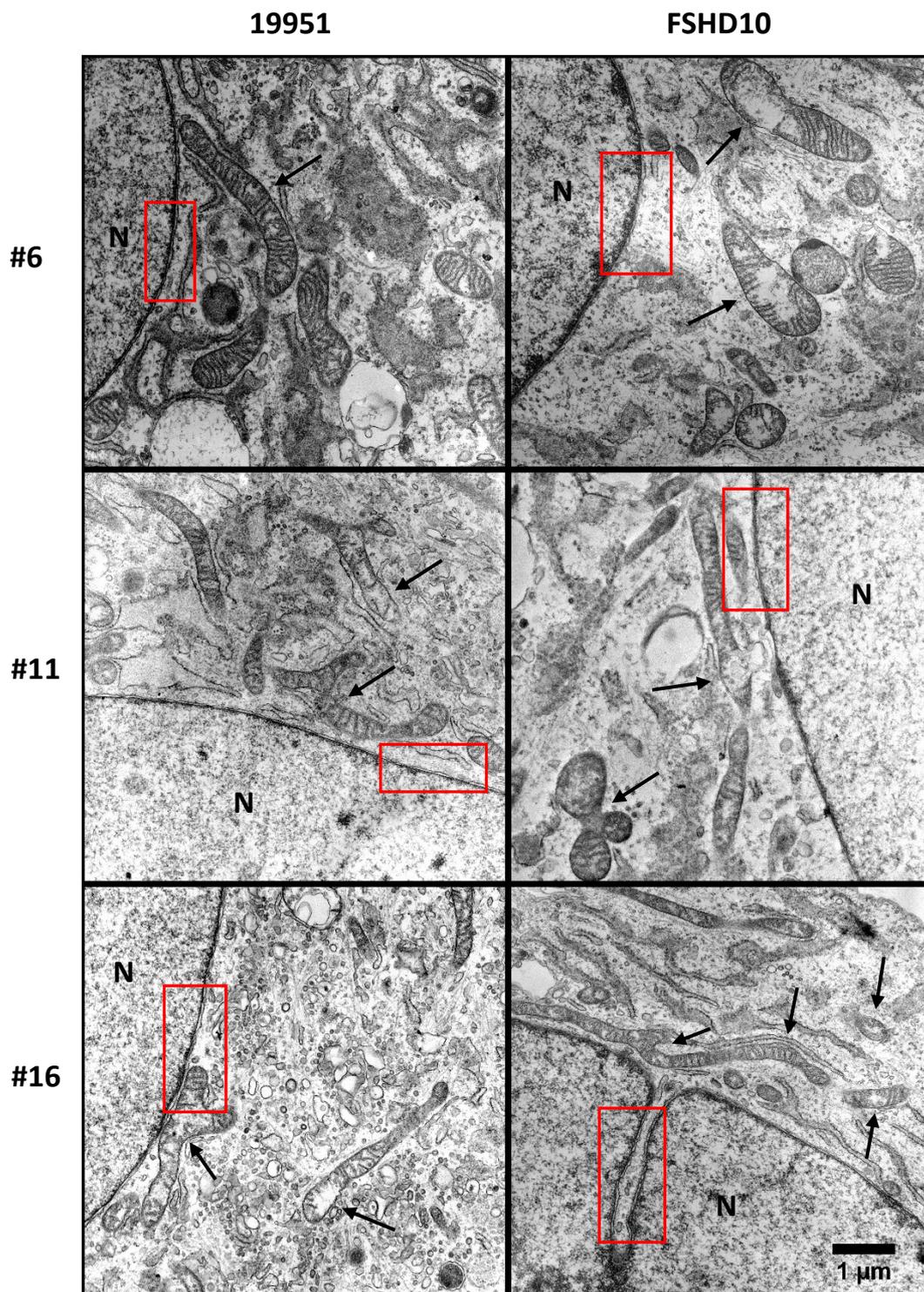
**ABBILDUNG 17: VERGRÖßERTE AUSSCHNITTE DER KERNHÜLLE DER KONVENTIONELL FIXIERTEN MY-OBLASTEN NO45 UND MO37**

Innere und äußere Kernmembran sind deutlich erkennbar. Schwarze Pfeile kennzeichnen Auffälligkeiten an der Kernhülle und Ausstülpungen der ONM. Typische Kernporen werden durch rote Pfeile markiert. N kennzeichnet das Nukleoplasma.

Die FSHD-Myoblasten FSHD10 und die entsprechenden Kontrollzellen 19951 sind in Abbildung 18 jeweils in den Passagen 6, 11 und 16 gezeigt.

Bei den gesunden Myoblasten 19951 kommen in allen Passagen neben typisch geformten auch sehr große, lange und verzweigte Mitochondrien vor, die teilweise einen geringen Anteil an Cristae aufweisen (siehe Pfeile in Abbildung 18). Die Unregelmäßigkeiten nehmen von Passage 6 über Passage 11 bis zu Passage 16 zu.

Die erkrankten Myoblasten FSHD10 zeigen deutlich mehr Auffälligkeiten als die entsprechende Kontrolle 19951. Extrem große Mitochondrien mit breiten und verzweigten Formen enthalten kaum Cristae, Ribosomen und Proteinkomplexe (siehe Pfeile in Abbildung 18).



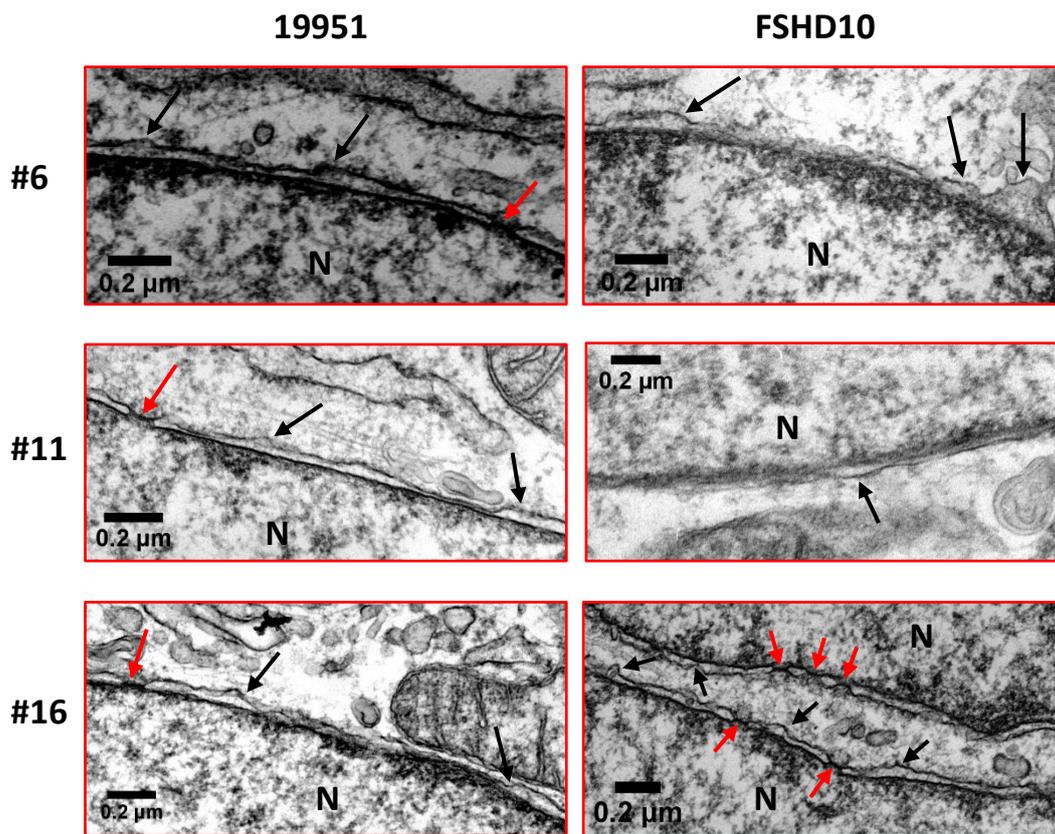
**ABBILDUNG 18: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ÜBERSICHTSAUFNAHMEN DER KONVENTIONELL FIXIERTEN MYOBLASTEN 19951 UND FSHD10**

Die Aufnahmen der Myoblasten zeigen jeweils einen Ausschnitt der Kernhülle und Mitochondrien. Die Zell-Morphologie wurde in verschiedenen Passagen untersucht. Auffällige Mitochondrien sind mit Pfeilen gekennzeichnet. In Abbildung 19 sind die rot umrahmten Bereiche in Vergrößerung gezeigt. Das Nukleoplasma ist durch N markiert.

Abbildung 19 zeigt die rot eingerahmten Bereiche aus den Übersichtsaufnahmen von FSHD10 und 19951 (siehe Abbildung 18) in Vergrößerung.

Die innere und äußere Kernmembran der Kontroll-Myoblasten 19951 weisen einen größtenteils parallelen Verlauf auf, wobei bei der ONM in allen Passagen teilweise leicht gewellte und ungleichmäßige Abschnitte auffallen (siehe schwarze Pfeile in Abbildung 19). Außerdem sind in den Passagen 6, 11 und 16 Kernporen gut zu erkennen und mit roten Pfeilen markiert.

Bei FSHD10 zeigt die äußere Kernmembran große Ausstülpungen und einen unregelmäßigen, gewellten Verlauf (siehe schwarze Pfeile in Abbildung 19). INM und ONM weisen ungleichmäßige Abstände zueinander auf. Parallele Abschnitte sind selten zu beobachten. Typische Kernporen sind in Passage 16 mit roten Pfeilen gekennzeichnet.



**ABBILDUNG 19: VERGRÖßERUNGEN DER KERNHÜLLE VON 19951 UND FSHD10 NACH KONVENTIONELLER FIXIERUNG**

Die innere und die äußere Kernmembran sind deutlich zu erkennen. Bei FSHD10 #11 sind INM und ONM trotz reduzierter Bildqualität und Schärfe beurteilbar. Auffälligkeiten an der Kernhülle und Ausstülpungen der ONM sind durch schwarze Pfeile markiert. Rote Pfeile kennzeichnen die Kernporen. Das Nukleoplasma ist jeweils durch **N** gekennzeichnet.

Insgesamt ist festzustellen, dass die gesunden Myoblasten NO44, NO45 und 19951 deutlich weniger Auffälligkeiten zeigen als die Myoblasten MO54, MO37 und FSHD10 von FSHD-Patienten.

Die Mitochondrien weisen mehr Cristae auf als diejenigen der erkrankten Zellen.

Innere und äußere Kernmembran verlaufen bei den Kontrollzellen meist parallel.

Jedoch ist eine Abstufung bei den Kontrollzellen erkennbar. NO45 zeigt mehr Unregelmäßigkeiten als 19951 und 19951 ist diesbezüglich auffälliger als NO44.

Hinsichtlich der verschiedenen Passagen ist festzustellen, dass die Auffälligkeiten mit der Höhe der Passage zunehmen. Die gesunden Myoblasten in Passage 6 zeigen meist typische Mitochondrien und einen parallelen Verlauf der Kernhülle. Bei Passage 11 sind leichte Veränderungen zu beobachten, die bis zur Passage 16 zunehmen.

Die erkrankten Myoblasten weisen bereits in der niedrigsten Passage 6 Veränderungen auf.

Neben typischen Mitochondrien sind deutlich vergrößerte Mitochondrien, die nur wenige Cristae aufweisen, und somit leer erscheinen, zu erkennen.

Die ONM verläuft häufig unregelmäßig und gewellt und der Abstand zwischen ONM und INM ist vergrößert und zeigt eine große Variationsbreite.

Bei den FSHD-Myoblasten zeigt FSHD10 die deutlichsten Atypien.

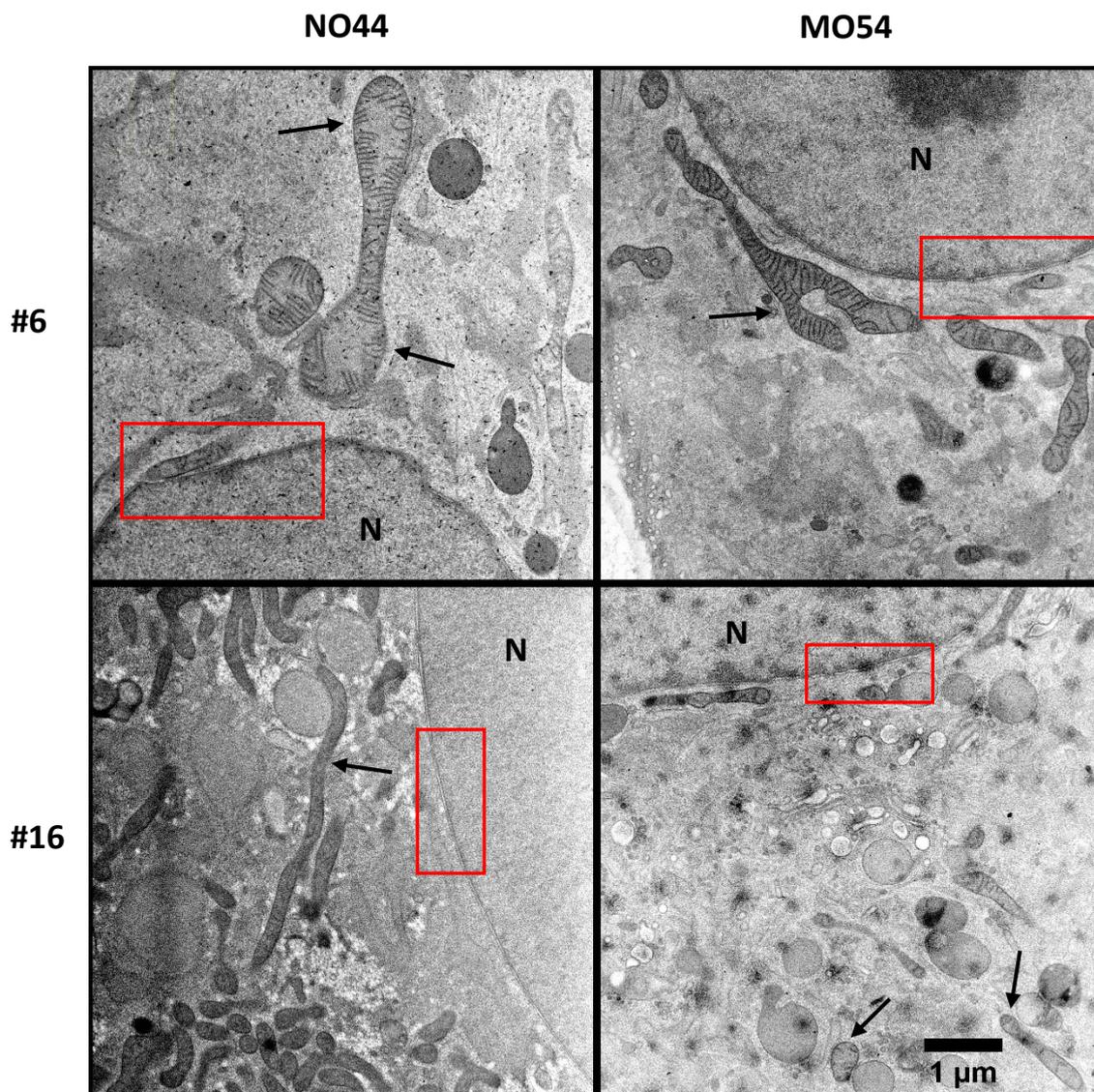
### 4.1.2 HIGH PRESSURE FREEZING (HPF)

Neben der konventionellen Fixierung für die Elektronenmikroskopie wurde auch das Verfahren der Hochdruckgefrierung mit anschließender Gefriersubstitution durchgeführt. Hierbei soll ermittelt werden, ob die beobachteten Veränderungen von Kernhülle und Mitochondrien in gleicher Weise auftreten oder auf die Fixiermethode zurückzuführen sind. Außerdem werden die Detailwiedergabe und die Eignung für morphologische Untersuchungen an Myoblasten beurteilt. Alle in 2.1 aufgeführten Zelllinien werden in der niedrigen Passage 6 (#6) und der hohen Passage 16 (#16) verwendet und als „Extreme“ gegenübergestellt.

In Abbildung 20 sind die FSHD-Myoblasten MO54 und die zugehörige Kontrolle NO44 jeweils in den Passagen 6 und 16 in der Übersicht gezeigt.

Neben wenigen sehr langen Mitochondrien (siehe Pfeile in Abbildung 20), weisen die Kontrollzellen NO44 in beiden abgebildeten Passagen hauptsächlich typisch geformte Mitochondrien mit Cristae auf. Auch die verlängerten Mitochondrien enthalten Cristae.

Bei den FSHD-Myoblasten MO54 ist in Passage 6 ein großes, verzweigtes Mitochondrium mit einem Pfeil markiert. Im Gegensatz zu Passage 6 sind bei Passage 16 die Cristae teilweise gar nicht erkennbar und die Mitochondrien erscheinen somit fast leer (siehe Pfeile in Abbildung 20).



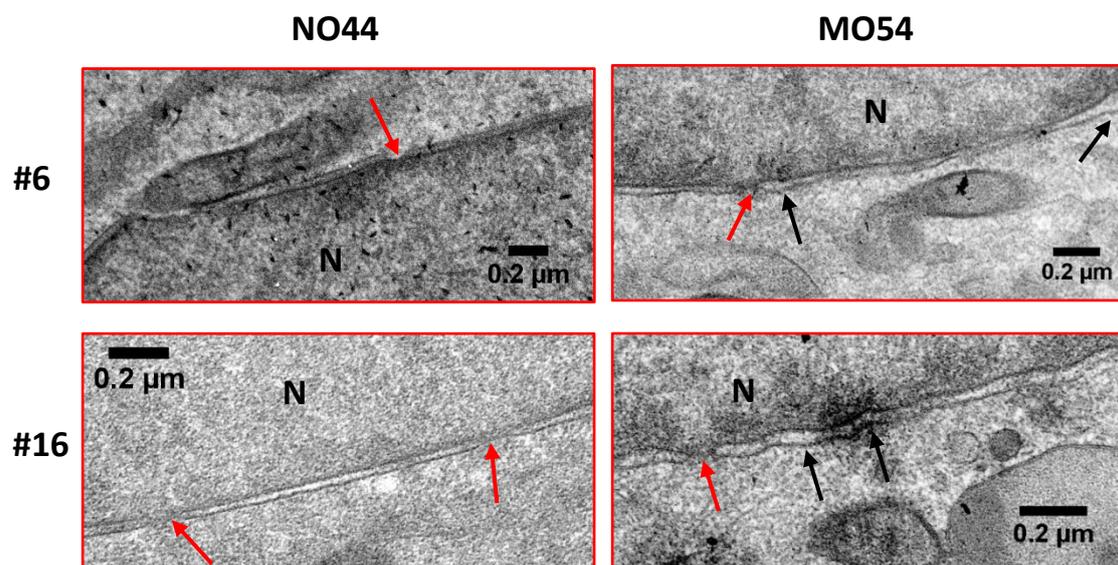
**ABBILDUNG 20: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ÜBERSICHTSAUFNAHMEN DER HPF-FIXIERTEN MY-OBLASTEN NO44 UND MO54**

In den Aufnahmen der Myoblasten sind jeweils ein Ausschnitt der Kernhülle und Mitochondrien dargestellt. Die Zell-Morphologie wurde in verschiedenen Passagen untersucht. Auffällige Mitochondrien sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Trotz reduzierter Bildqualität und Schärfe sind die Mitochondrien von NO44 und MO54 in Passage 16 beurteilbar. Die rot umrahmten Bereiche sind vergrößert in Abbildung 21 gezeigt. Das Nukleoplasma ist durch **N** markiert.

Die rot eingerahmten Bereiche aus den Übersichtsaufnahmen von NO44 und MO54 (siehe Abbildung 20) sind in Abbildung 21 in Vergrößerung gezeigt.

Äußere und innere Kernmembran der Kontroll-Myoblasten NO44 verlaufen in beiden Passagen parallel in immer gleichem Abstand. In Passage 6 erscheinen INM und Lamina dicker als in Passage 16. Rote Pfeile markieren in Abbildung 21 Kernporen, die die Kernhülle durchsetzen.

Bei den FSHD-Myoblasten MO54 zeigen INM und ONM einen meist parallelen Verlauf und gleichen Abstand zueinander. Stellenweise sind leichte Unregelmäßigkeiten erkennbar (siehe schwarze Pfeile in Abbildung 21). An der inneren Kernmembran scheint bei MO54 #16 mehr Heterochromatin vorzuliegen als bei der entsprechenden Kontrolle NO44 #16. Typische Kernporen sind in Abbildung 21 jeweils mit einem roten Pfeil markiert.



**ABBILDUNG 21: VERGRÖßERUNGEN DER KERNHÜLLE DER HPF-FIXIERTEN MYOBLASTEN NO44 UND MO54**

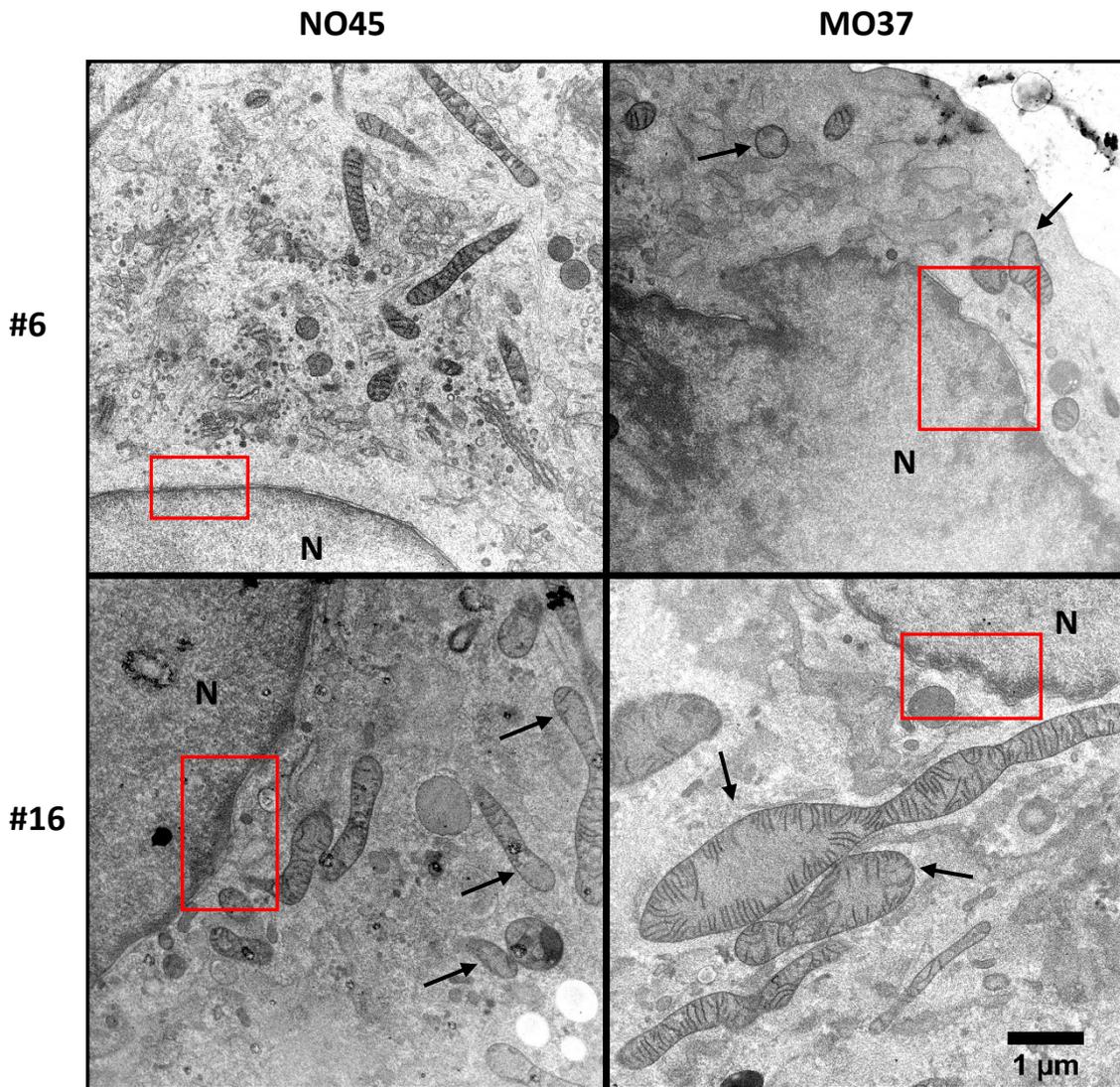
Innere und äußere Kernmembran sind deutlich zu erkennen. Auffälligkeiten an der Kernhülle und Ausstülpungen der ONM sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Rote Pfeile markieren die Kernporen. N kennzeichnet das Nukleoplasma.

In Abbildung 22 sind die FSHD-Myoblasten MO37 sowie die Kontrolle NO45 jeweils in den Passagen 6 und 16 nach HPF-Fixierung in der Übersicht dargestellt.

Die Mitochondrien der NO45-Myoblasten zeigen typische Formen, sind aber zum Teil verlängert. Bei Passage 16 sind teilweise wenige Cristae zu erkennen wodurch ein Leer-  
raum innerhalb einiger Mitochondrien entsteht (siehe Pfeile in Abbildung 22).

Bei den Mitochondrien von MO37 sind sowohl in Passage 6 als auch in Passage 16 wenige Cristae vorhanden, was sie leer erscheinen lässt (siehe Pfeile in Abbildung 22). In Passage 16 ist ein riesiges Mitochondrium abgebildet.

Bei reduzierter Bildqualität von MO37 #6 fällt in der Übersicht ein stark gezackter Verlauf der Kernhülle auf.



**ABBILDUNG 22: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ÜBERSICHTSAUFNAHMEN DER MYOBLASTEN NO45 UND MO37, FIXIERT NACH DER HPF-METHODE**

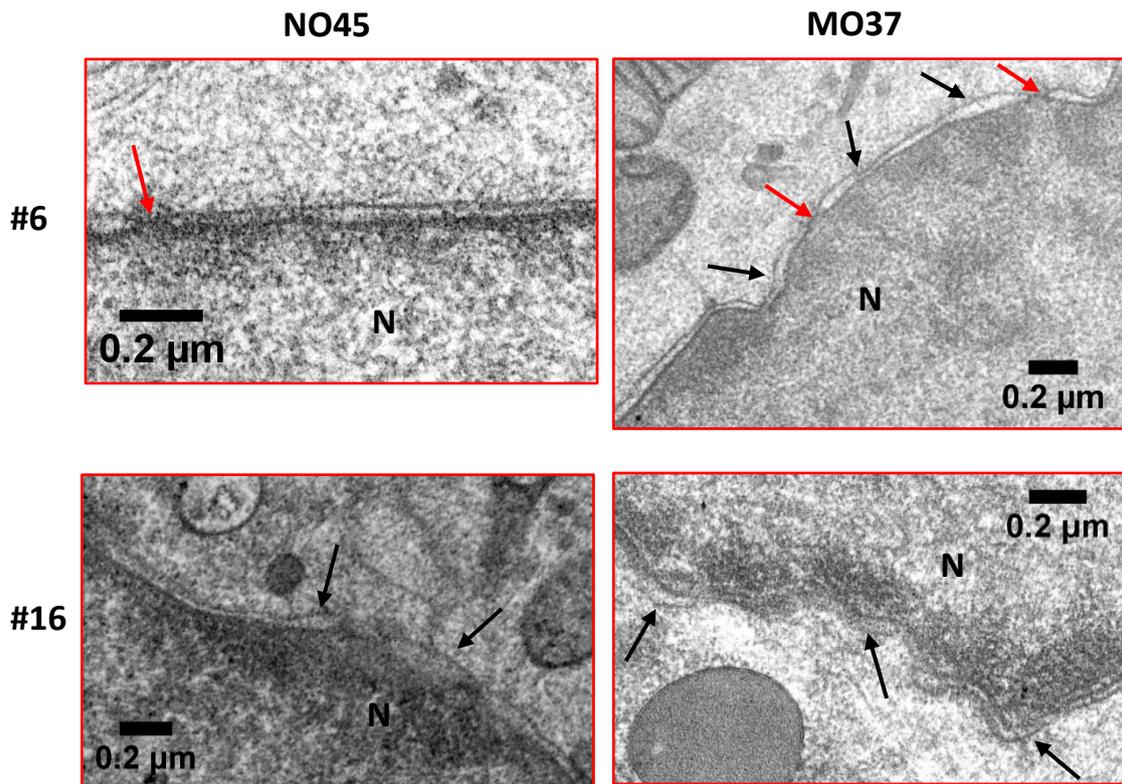
Die Aufnahmen der Myoblasten zeigen jeweils einen Ausschnitt der Kernhülle und Mitochondrien. Diese sind auch bei MO37 #6 trotz reduzierter Bildqualität beurteilbar. Die Zell-Morphologie wurde in verschiedenen Passagen untersucht. Auffällige Mitochondrien sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Vergrößerungen der rot eingerahmten Bereiche sind in Abbildung 23 dargestellt. Das Nukleoplasma ist durch **N** markiert.

Abbildung 23 zeigt die rot umrahmten Ausschnitte der Kernhülle aus den Übersichtsaufnahmen von NO45 und MO37 (siehe Abbildung 22) in Vergrößerung.

Die äußere und die innere Kernmembran der gesunden Myoblasten NO45 verlaufen parallel mit einzelnen leicht unregelmäßigen Abschnitten in Passage 16 (siehe schwarze Pfeile in Abbildung 23). Insgesamt sind die Membranen stellenweise gut, stellenweise aber auch schlecht erkennbar. Die INM erscheint in Passage 16 sehr dick und dunkel. Außerdem scheint viel Heterochromatin an der Lamina und der INM von NO45 #16 lokalisiert zu sein.

Die Kernhülle der FSHD-Myoblasten MO37 ist teilweise sehr gut, teilweise schlecht erkennbar. Sie zeigt neben parallelen Abschnitten auch gewellte Verläufe. INM und ONM verlaufen zwar meist parallel, aber in unterschiedlichem Abstand, was durch schwarze Pfeile in Abbildung 23 markiert ist. Dadurch variiert die Breite des Intermembranraums. In beiden gezeigten Passagen scheint viel Heterochromatin an der INM vorhanden zu sein.

Bei beiden Zelllinien sind in Passage 6 typische Kernporen jeweils mit roten Pfeilen gekennzeichnet.



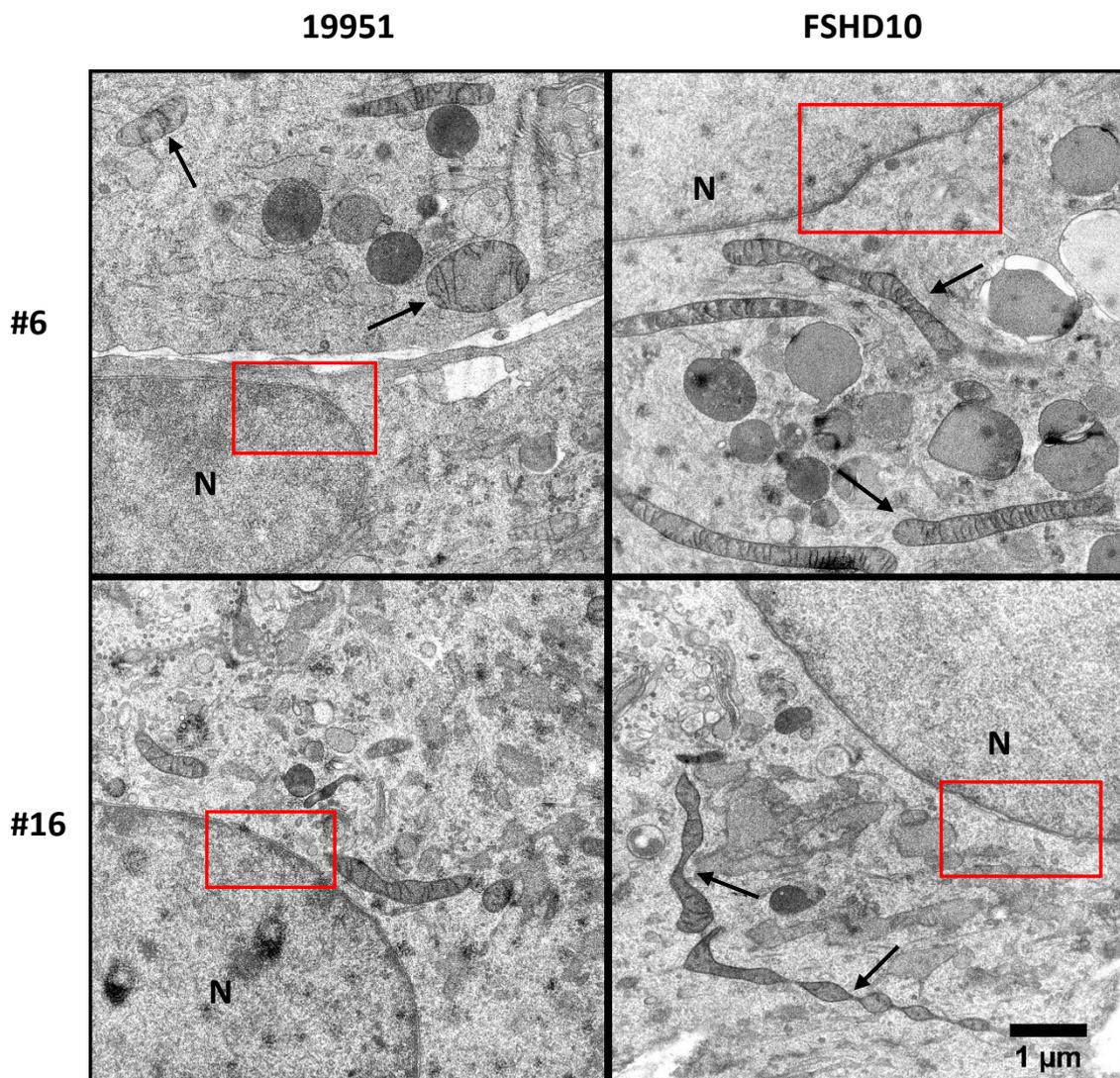
**ABBILDUNG 23: VERGRÖßERUNGS-AUSSCHNITTE DER KERNHÜLLE DER HPF-FIXIERTEN MYOBLASTEN NO45 UND MO37**

Die innere und die äußere Kernmembran sind deutlich zu erkennen. Auffälligkeiten an der Kernhülle und Ausstülpungen der ONM sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Rote Pfeile markieren die Kernporen. **N** kennzeichnet das Nukleoplasma.

Die erkrankten Myoblasten FSHD10 sowie die entsprechende Kontrolle 19951 sind in Abbildung 24 in der Übersicht gezeigt.

Die Mitochondrien von 19951 zeigen typische Formen. In Passage 6 weisen sie teilweise wenige Cristae auf (siehe Pfeile in Abbildung 24).

Die von der Erkrankung betroffenen Myoblasten FSHD10 enthalten in beiden Passagen deutlich verlängerte Mitochondrien. Weiterhin zeigen vor allem die Mitochondrien der Passage 16 eine reduzierte Cristae-Zahl. Auffällige Mitochondrien sind in Abbildung 24 mit Pfeilen markiert.



**ABBILDUNG 24: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ÜBERSICHTSAUFNAHMEN DER HPF-FIXIERTEN MY-OBLASTEN 19951 UND FSHD10**

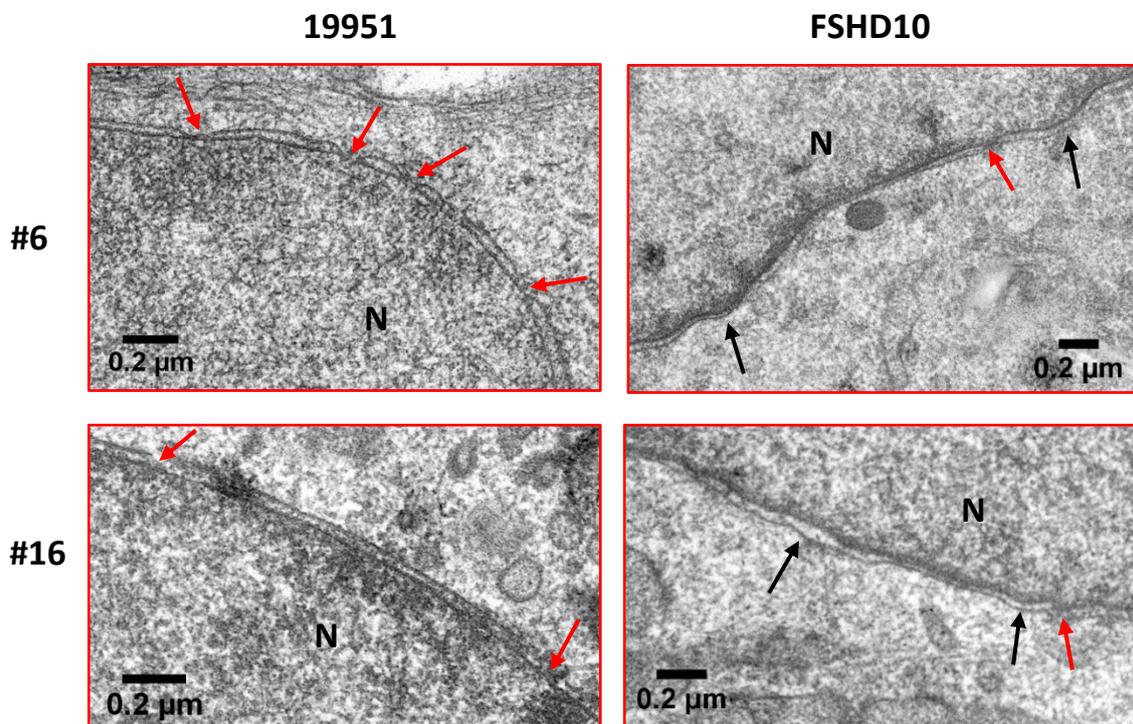
In den Aufnahmen der Myoblasten sind jeweils ein Ausschnitt der Kernhülle und Mitochondrien abgebildet. Die Zell-Morphologie wurde in verschiedenen Passagen untersucht. Auffällige Mitochondrien sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die rot umrahmten Bereiche sind in Abbildung 25 vergrößert dargestellt. N kennzeichnet das Nukleoplasma.

Die in den Übersichtsaufnahmen rot umrandeten Ausschnitte der Kernhülle von FSHD10 und 19951 (siehe Abbildung 24) sind in Abbildung 25 vergrößert dargestellt.

Innere und äußere Kernmembran der Kontroll-Myoblasten 19951 verlaufen parallel. An der INM von Passage 16 scheint mehr Heterochromatin vorhanden zu sein als bei Passage 6.

Bei den erkrankten Myoblasten FSHD10 in den Passagen 6 und 16 zeigen INM und ONM einen parallelen Verlauf, wobei ihr Abstand teilweise variiert (siehe schwarze Pfeile in Abbildung 25). Die Membranen sind stellenweise scharf abgebildet und gut erkennbar, zeigen aber auch unscharfe und schlecht erkennbare Bereiche. Bei FSHD10 #16 scheint weniger Heterochromatin an der inneren Kernmembran vorhanden zu sein als bei den entsprechenden Kontrollzellen 19951 #16.

Typische Kernporen sind sowohl bei 19951 als auch bei FSHD10 zu sehen und werden durch rote Pfeile in Abbildung 25 markiert.



**ABBILDUNG 25: VERGRÖßERUNGEN DER KERNHÜLLE VON 19951 UND FSHD10, FIXIERT NACH DER HPF-METHODE**

Innere und äußere Kernmembran sind deutlich zu erkennen. Auffälligkeiten an der Kernhülle und Ausstülpungen der ONM sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Rote Pfeile markieren die Kernporen. N kennzeichnet das Nukleoplasma.

Die HPF-fixierten Kontrollzellen NO44, NO45 und 19951 enthalten größtenteils typisch geformte Mitochondrien mit Cristae. Daneben zeigen sich vereinzelt sehr große und lange Mitochondrien und Bereiche mit wenigen Cristae. Am auffälligsten hierbei sind die NO44-Myoblasten.

Die Kernmembranen verlaufen parallel und meist in gleichem Abstand, wobei selten auch leicht unregelmäßige Abschnitte erkennbar sind. Diesbezüglich weisen die NO45-Zellen mehr Atypien auf als 19951 und diese sind wiederum auffälliger als NO44.

Bei den nach der Hochdruckgefrier-Methode fixierten erkrankten Myoblasten MO54, MO37 und FSHD10 treten sowohl in Passage 6 als auch in Passage 16 große, verzweigte Mitochondrien mit atypischer Form auf, die wenige Cristae enthalten.

INM und ONM weisen parallele Abschnitte mit gleichmäßigen Abständen auf, zeigen daneben aber auch einige unregelmäßig verlaufende Stellen mit variierender Breite des Intermembranraums.

Verglichen mit den gesunden Myoblasten enthalten die FSHD-Myoblasten deutlich mehr veränderte Mitochondrien. Die Kernhülle ist dagegen nur geringfügig verändert.

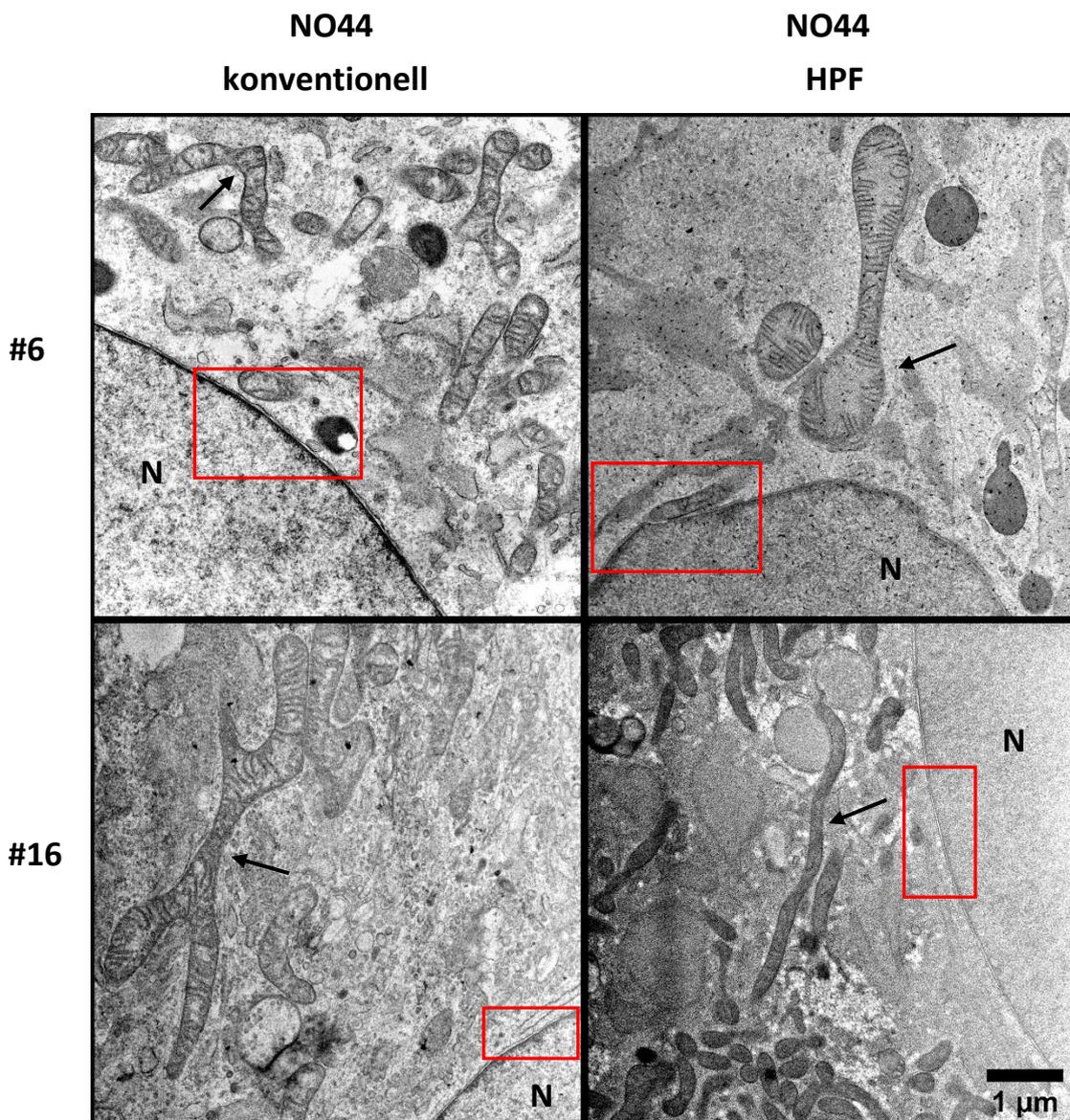
Außer bei NO44 #16 und bei FSHD10 #16 scheinen die HPF-fixierten Myoblasten in Passage 16 sowohl bei den gesunden, als auch bei den erkrankten Zellen mehr Heterochromatin im Bereich der INM aufzuweisen als die Myoblasten der Passage 6.

#### 4.1.3 VERGLEICH VON KONVENTIONELLER FIXIERUNG UND HPF

In der direkten Gegenüberstellung von konventionell und HPF-fixierten Myoblasten soll herausgearbeitet werden, welchen Einfluss die Fixierungsmethode auf die Zell-Morphologie hat. Die Myoblasten (siehe 2.1) werden hierfür in den Passagen 6 und 16 verwendet.

Abbildung 26 zeigt die Kontroll-Myoblasten NO44 in der Übersicht.

Die Mitochondrien von NO44 zeigen sowohl nach der konventionellen Fixierung als auch nach dem Hochdruckgefrieren in beiden Passagen meist typische Formen mit Cristae. Daneben liegen – vor allem in Passage 16 – einzelne vergrößerte und verzweigte Mitochondrien vor. Diese sind durch Pfeile in Abbildung 26 gekennzeichnet. Die höchste Schärfe wird bei den HPF-fixierten Myoblasten NO44 in Passage 6 erreicht.

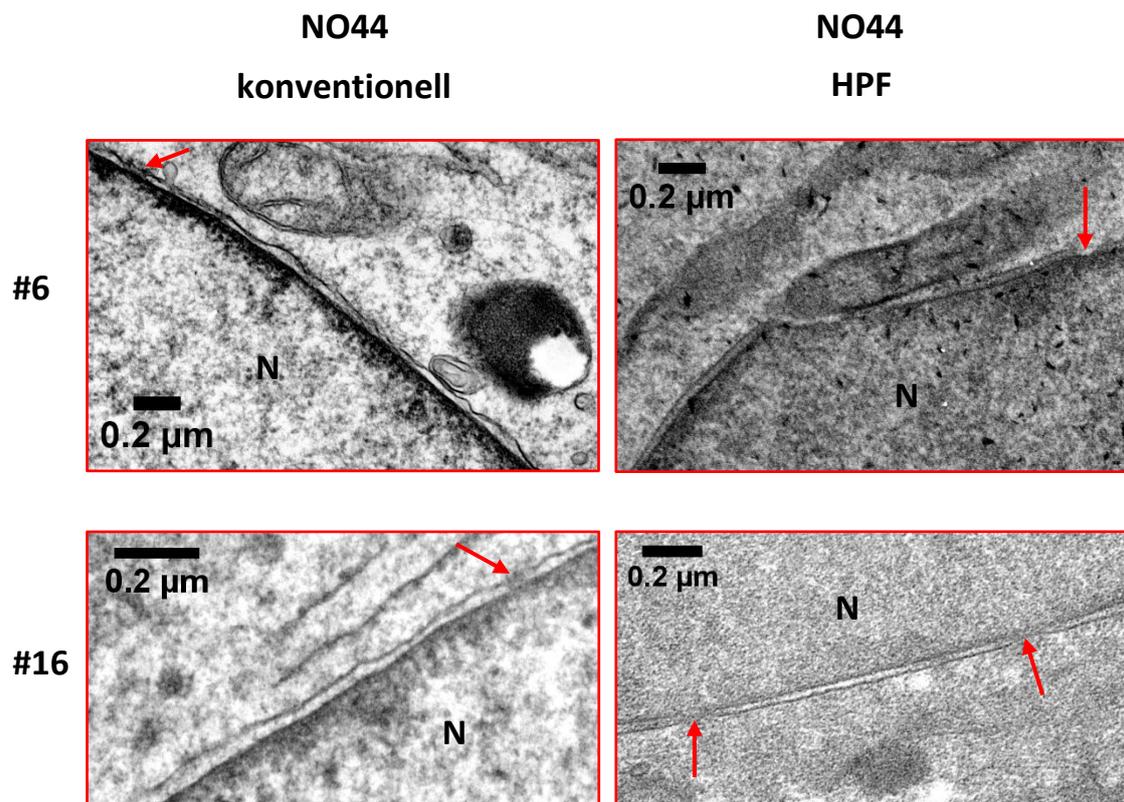


**ABBILDUNG 26: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ÜBERSICHTSAUFNAHMEN DER KONVENTIONELL UND HPF-FIXIERTEN GESUNDEN MYOBLASTEN NO44**

Die Aufnahmen der Myoblasten zeigen jeweils einen Ausschnitt der Kernhülle. Außerdem sind Mitochondrien abgebildet. Die Zell-Morphologie wurde in verschiedenen Passagen und nach unterschiedlichen Fixierungsmethoden untersucht. Auffällige Mitochondrien sind mit Pfeilen gekennzeichnet. In Abbildung 27 sind die rot umrahmten Bereiche vergrößert dargestellt. Das Nukleoplasma ist durch **N** gekennzeichnet.

Die rot umrahmten Bereiche aus den Übersichtsaufnahmen von NO44 (siehe Abbildung 26) sind in Abbildung 27 vergrößert dargestellt.

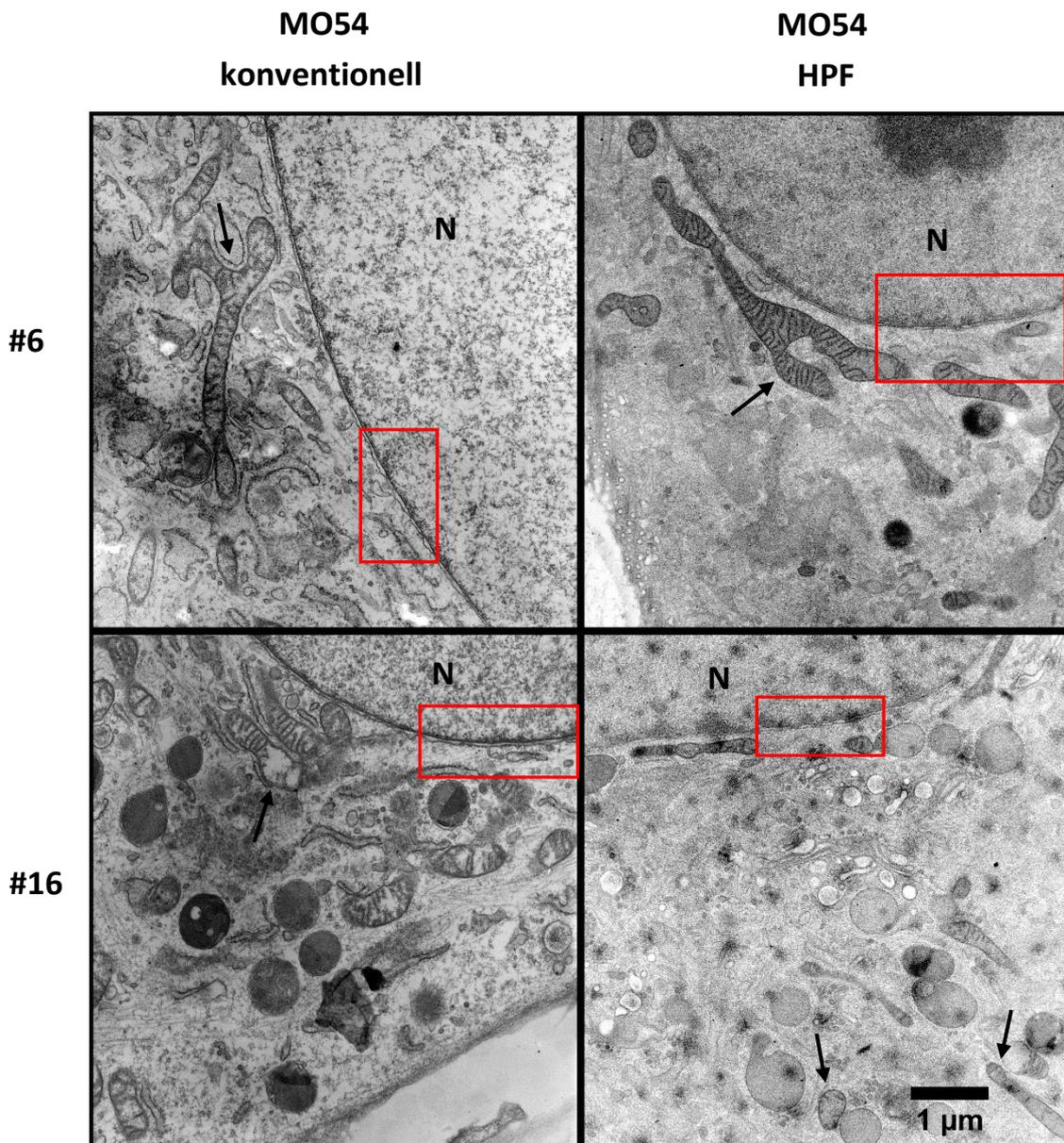
Die Kernhülle ist bei beiden Fixierungsmethoden gut erkennbar. INM und ONM verlaufen parallel und nahezu immer im gleichen Abstand (siehe Abbildung 27). Kernporen, die die Kernhülle durchsetzen, sind jeweils in beiden Passagen der NO44-Myoblasten zu sehen und durch rote Pfeile markiert.



**ABBILDUNG 27: VERGRÖßERTE KERNHÜLLEN-AUSSCHNITTE DER GESUNDEN NO44-MYOBLASTEN NACH KONVENTIONELLER UND HPF-FIXIERUNG**

Die innere und die äußere Kernmembran sind deutlich zu erkennen. Rote Pfeile markieren die Kernporen. N kennzeichnet das Nukleoplasma.

Bei den FSHD-Myoblasten MO54 weisen die Mitochondrien unabhängig von der Fixierungsmethode die gleichen atypischen Formen und Verzweigungen auf. Eine reduzierte Cristae-Zahl ist vor allem bei Passage 16 zu beobachten. In Abbildung 28 sind diese Auffälligkeiten der Mitochondrien durch Pfeile gekennzeichnet.



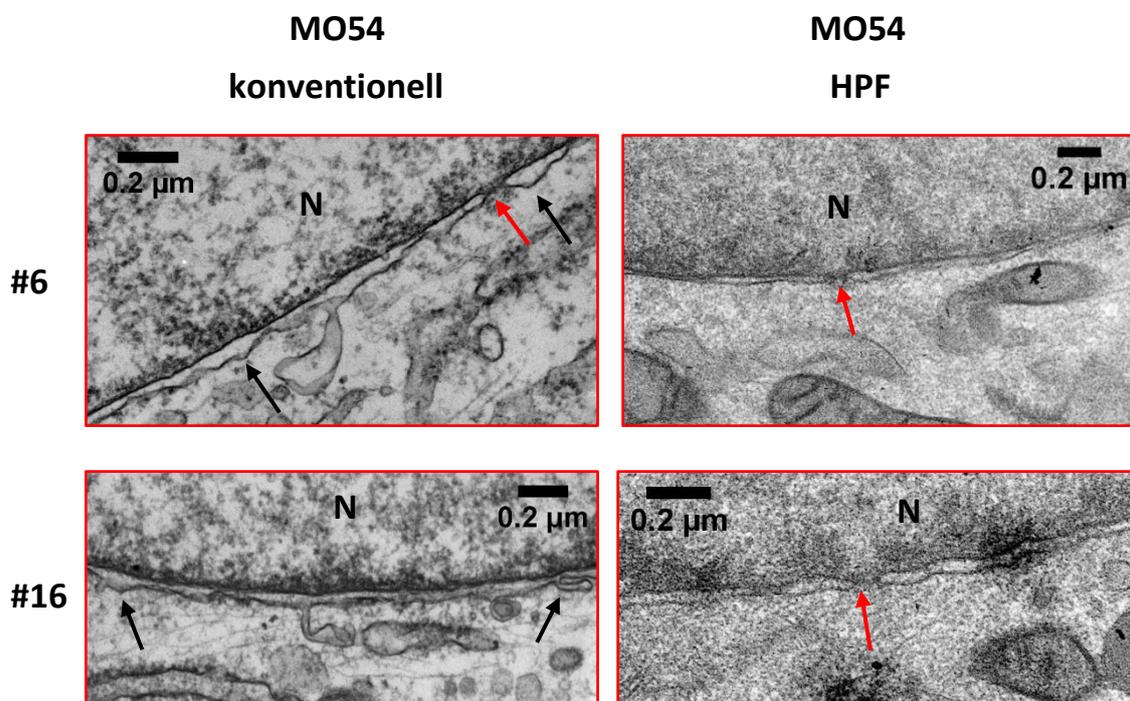
**ABBILDUNG 28: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ÜBERSICHTSAUFNAHMEN DER FSHD-MYOBLASTEN MO54 NACH KONVENTIONELLER UND HPF-FIXIERUNG**

In den Aufnahmen der Myoblasten sind jeweils ein Ausschnitt der Kernhülle und Mitochondrien abgebildet. Die Zell-Morphologie wurde in verschiedenen Passagen untersucht. Zudem kamen zwei unterschiedliche Fixierungsmethoden zum Einsatz. Auffällige Mitochondrien sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die rot eingerahmten Bereiche sind in Abbildung 29 vergrößert dargestellt. Das Nukleoplasma ist durch **N** markiert.

Betrachtet man die Kernhülle in der Vergrößerung (siehe Abbildung 29), so sind Unterschiede zwischen der konventionellen Fixierung und der HPF-Fixierung festzustellen. Bei der erstgenannten Methode verläuft die ONM sehr unregelmäßig und stark gewellt und der Abstand zwischen INM und ONM variiert deutlich. Im Gegensatz dazu zeigen innere und äußere Kernmembran der HPF-fixierten MO54-Myoblasten einen auffällig parallelen Verlauf. Der Abstand zwischen INM und ONM ändert sich zwar stellenweise leicht, aber die beiden Membranen sind weitgehend parallel zueinander. Auffälligkeiten der Kernhülle und Ausstülpungen der ONM sind in Abbildung 29 mit schwarzen Pfeilen markiert.

In den Passagen 6 und bei den HPF-fixierten Myoblasten MO54 #16 sind typische Kernporen zu erkennen und mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

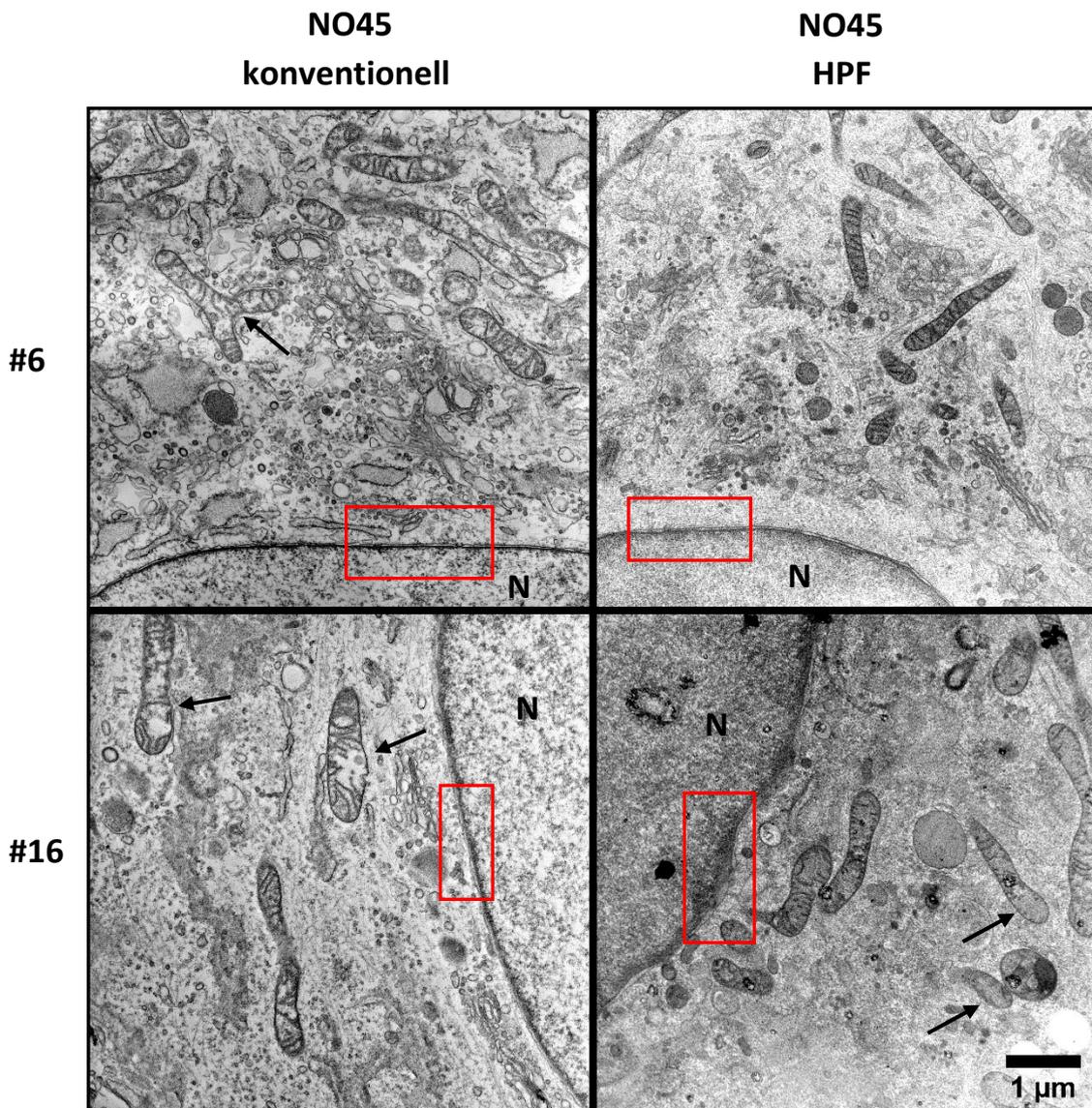
An der Innenseite der inneren Kernmembran scheint bei den HPF-fixierten Zellen etwas mehr Heterochromatin vorhanden zu sein als bei den konventionell fixierten Myoblasten.



**ABBILDUNG 29: VERGRÖßERUNGS-AUSSCHNITTE DER KERNHÜLLE VON MO54 NACH KONVENTIONELLER UND HPF-FIXIERUNG**

Innere und äußere Kernmembran sind deutlich zu erkennen. Schwarze Pfeile kennzeichnen Auffälligkeiten der Kernhülle und Ausstülpungen der ONM. Typische Kernporen sind durch rote Pfeile markiert. Das Nukleoplasma ist durch **N** gekennzeichnet.

Abbildung 30 zeigt Übersichtsaufnahmen der Kontrollzellen NO45 nach HPF- und konventioneller Fixierung. Bei Betrachtung der Mitochondrien (siehe Pfeile in Abbildung 30) fallen sowohl bei der konventionellen Fixierung (#6 und #16), als auch bei der HPF-Methode (#16) vereinzelt Verzweigungen und leicht atypische Formen auf. Die Cristae fehlen stellenweise, was den Eindruck eines Leerraums erweckt.

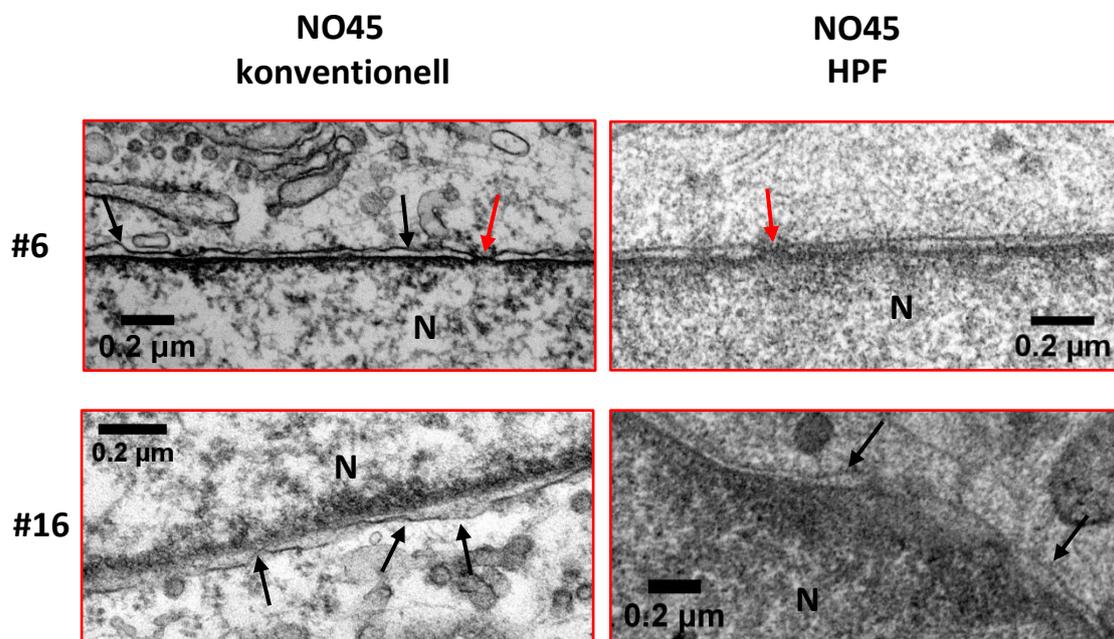


**ABBILDUNG 30: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ÜBERSICHTSAUFNAHMEN DER KONVENTIONELL UND HPF-FIXIERTEN KONTROLLZELLEN NO45**

In den Aufnahmen der Myoblasten sind jeweils ein Ausschnitt der Kernhülle sowie Mitochondrien dargestellt. Die Zell-Morphologie wurde in verschiedenen Passagen und Fixierungsmethoden untersucht. Auffällige Mitochondrien sind mit Pfeilen gekennzeichnet. In Abbildung 31 sind die rot umrandeten Bereich vergrößert gezeigt. Durch **N** ist das Nukleoplasma gekennzeichnet.

Die rot eingerahmten Bereiche der Kernhülle aus den Übersichtsaufnahmen (siehe Abbildung 30) sind in Abbildung 31 vergrößert dargestellt.

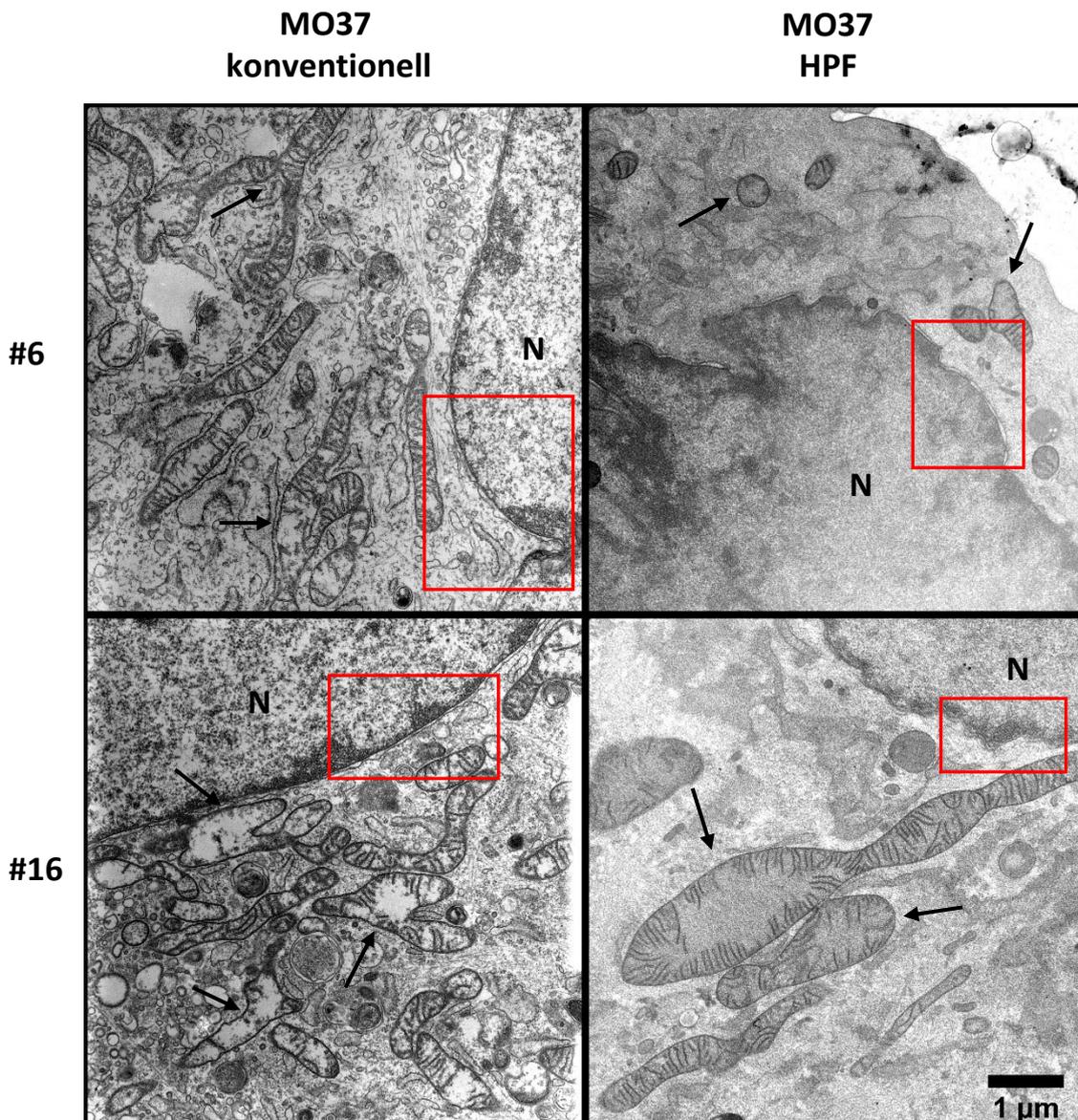
Die äußere und die innere Kernmembran von NO45 verlaufen bei beiden Fixierungsmethoden meist parallel. Stellenweise treten leichte Unregelmäßigkeiten auf. Nach der konventionellen Methode fixierte Zellen zeigen teilweise einen leicht gewellten Verlauf der ONM. Dieser ist in Abbildung 31 mit schwarzen Pfeilen markiert. Weiterhin sind jeweils in Passage 6 typische Kernporen mit roten Pfeilen gekennzeichnet. An der Kernhülle der HPF-fixierten NO45-Myoblasten in Passage 16 imponiert die im Vergleich zu den anderen Myoblasten scheinbare Anhäufung von Heterochromatin.



**ABBILDUNG 31: VERGRÖßERTE AUSSCHNITTE DER KERNHÜLLE DER GESUNDEN MYOBLASTEN NO45 NACH KONVENTIONELLER UND HPF-FIXIERUNG**

Die innere und die äußere Kernmembran sind deutlich zu erkennen. Auffälligkeiten an der Kernhülle und Ausstülpungen der ONM sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Rote Pfeile markieren die Kernporen. N kennzeichnet das Nukleoplasma.

In den Übersichtsaufnahmen der unterschiedlich fixierten erkrankten Myoblasten MO37 sind bei beiden Fixierungsmethoden in den Passagen 6 und 16 auffällige Mitochondrien zu erkennen (siehe Pfeile in Abbildung 32). Einigen fehlen Cristae, einige weisen Verzweigungen auf und andere sind deutlich vergrößert. Bei den HPF-fixierten Myoblasten MO37 in Passage 6 imponiert der gezackte Verlauf der Kernhülle.



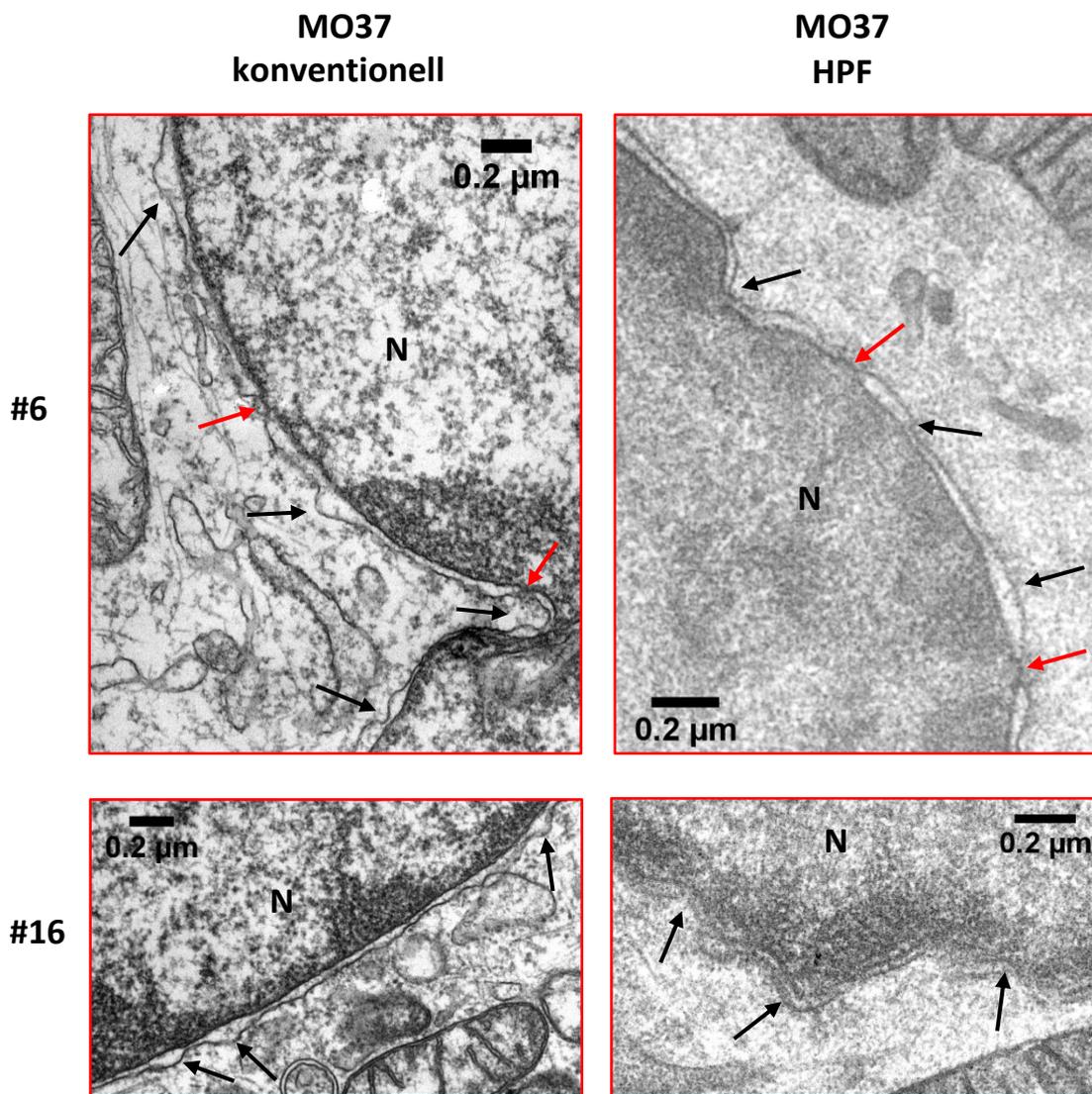
**ABBILDUNG 32: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ÜBERSICHTSAUFNAHMEN DER MO37-MYOBLASTEN VON FSHD-PATIENTEN NACH KONVENTIONELLER UND HPF-FIXIERUNG**

Die Aufnahmen der Myoblasten zeigen jeweils einen Ausschnitt der Kernhülle, wobei die rot umrandeten Bereiche in Abbildung 33 in Vergrößerung dargestellt sind. Weiterhin sind Mitochondrien abgebildet. Die Zell-Morphologie wurde in verschiedenen Passagen untersucht. Außerdem wurden zwei Fixierungsmethoden angewandt. Auffällige Mitochondrien sind mit Pfeilen markiert. Das Nukleoplasma ist durch N gekennzeichnet.

Im Verlauf der Kernhülle unterscheiden sich die konventionell und HPF-fixierte FSHD-Myoblasten MO37. Erstere zeigen verschiedene Abstände zwischen INM und ONM. Die Membranen sind nicht parallel zueinander und die ONM verläuft gewellt und unregelmäßig. Die Kernmembranen der HPF-fixierten Zellen sind teilweise gut, teilweise schlecht erkennbar. Sie verlaufen meist parallel, wobei auch leicht wellenförmige Abschnitte auftreten. Weiterhin fällt auf, dass die ONM im Gegensatz zu den konventionell fixierten Myoblasten keine Ausstülpungen zeigt. Auffälligkeiten der Kernhülle sind in Abbildung 33 durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Die Kernporen sind in Passage 6 bei beiden Fixierungsmethoden deutlich erkennbar und mit roten Pfeile in Abbildung 33 markiert.

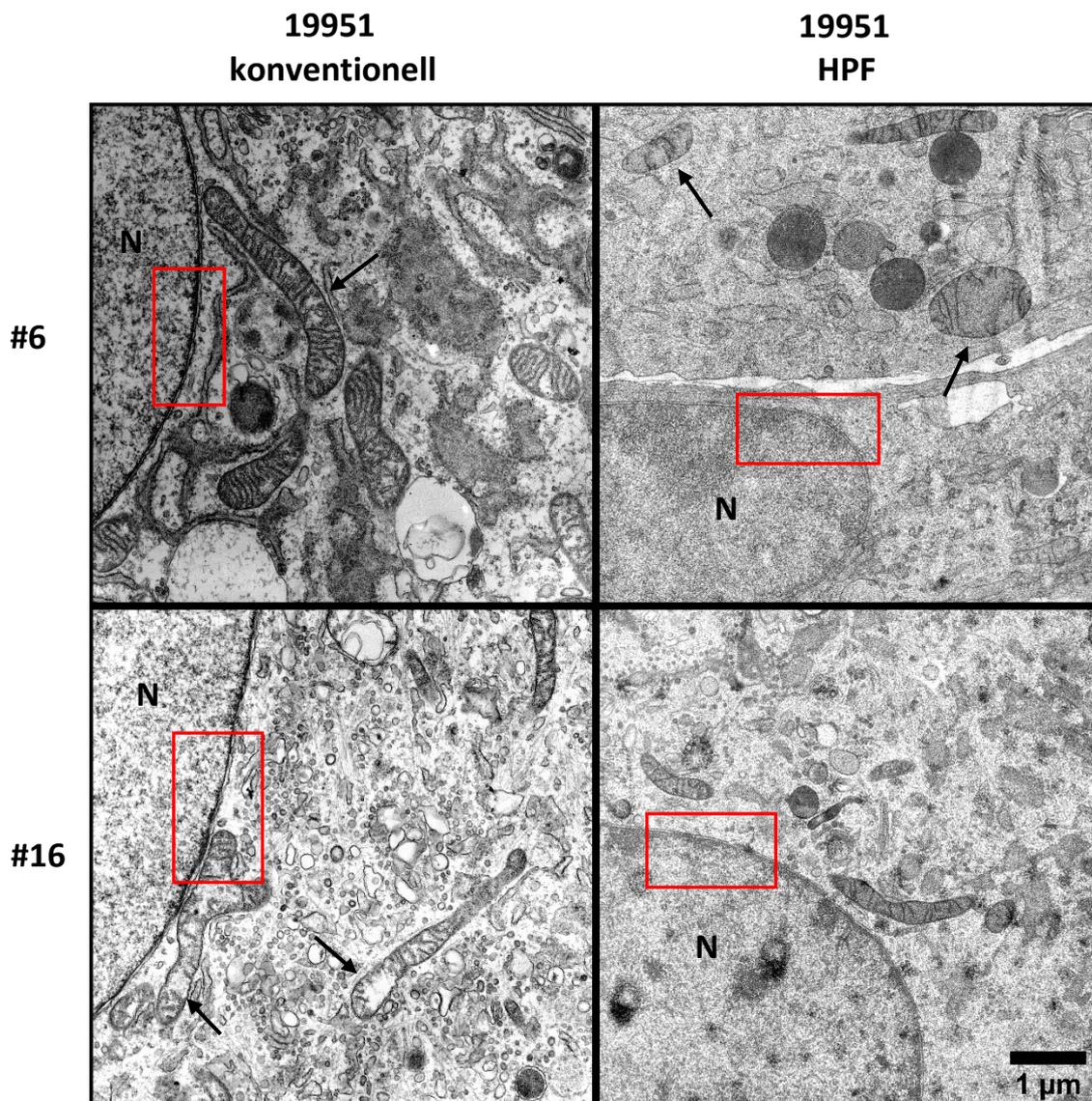
Das Heterochromatin an der Kernhülle scheint bei den HPF-fixierten Myoblasten homogener verteilt zu sein als bei den konventionell fixierten Myoblasten.



**ABBILDUNG 33: VERGRÖßERTE AUSSCHNITTE DER KERNHÜLLE DER ERKRANKTEN MO37-MYOBLASTEN NACH KONVENTIONELLER UND HPF-FIXIERUNG**

Innere und äußere Kernmembran sind deutlich zu erkennen. Auffälligkeiten an der Kernhülle und Ausstülpungen der ONM sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Rote Pfeile markieren die Kernporen. **N** kennzeichnet das Nukleoplasma.

In den Übersichtsaufnahmen der unterschiedlich fixierten Myoblasten (siehe Abbildung 34) zeigen die Mitochondrien der Kontrollzellen 19951 meist typische Formen. Einzelne leichte Atypien, verzweigte Abschnitte und Bereiche mit reduzierten Cristae sind mit Pfeilen markiert (siehe Abbildung 34).

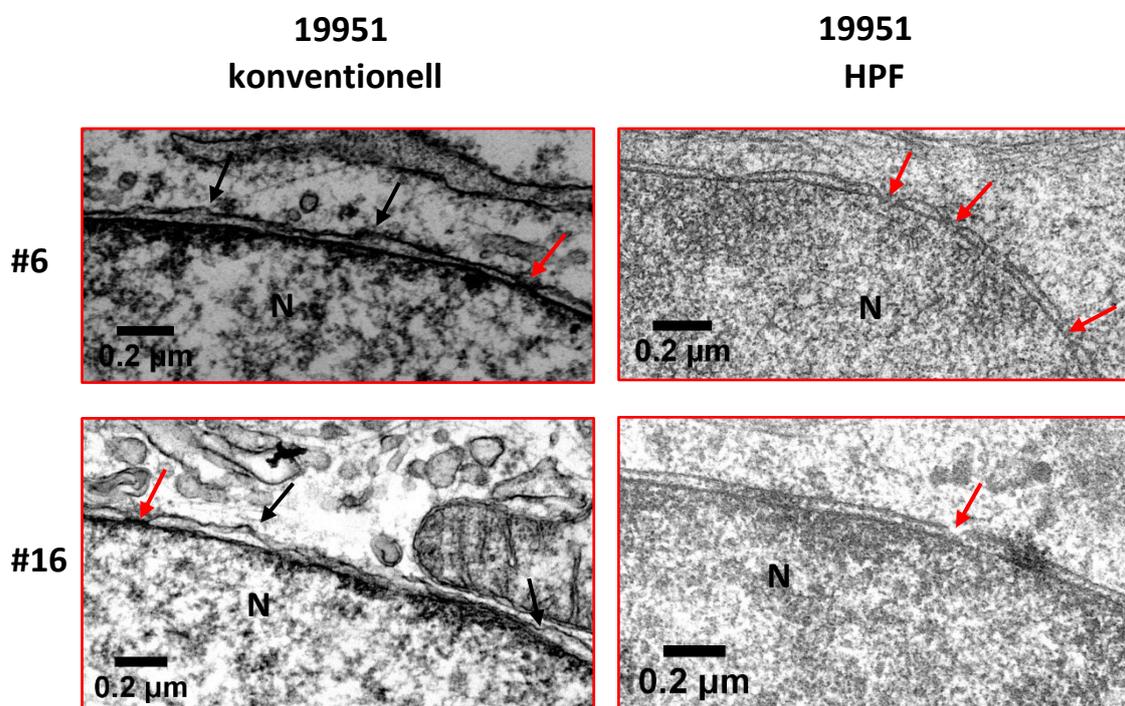


**ABBILDUNG 34: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER KONVENTIONELL UND HPF-FIXIERTEN KONTROLLZELLEN 19951 IN DER ÜBERSICHT**

Die Aufnahmen der Myoblasten zeigen jeweils einen Ausschnitt der Kernhülle und Mitochondrien. Die Zell-Morphologie wurde in verschiedenen Passagen untersucht. Zudem kamen zwei unterschiedliche Fixierungsmethoden zum Einsatz. Auffällige Mitochondrien sind mit Pfeilen gekennzeichnet. In Abbildung 35 sind die rot umrandeten Bereiche vergrößert dargestellt. **N** kennzeichnet das Nukleoplasma.

Die Kernhülle der Kontroll-Myoblasten 19951 weist bei beiden Fixierungsmethoden in den Passagen 6 und 16 einen ähnlichen Verlauf auf. INM und ONM sind meist parallel zueinander, wobei INM und ONM der HPF-fixierten Myoblasten einen geraderen und ruhigeren Verlauf zeigen. Die äußere Kernmembran der konventionell fixierten Zellen verläuft teilweise leicht gewellt und etwas unregelmäßig. Auffälligkeiten der Kernhülle sind in Abbildung 35 durch schwarze Pfeile markiert.

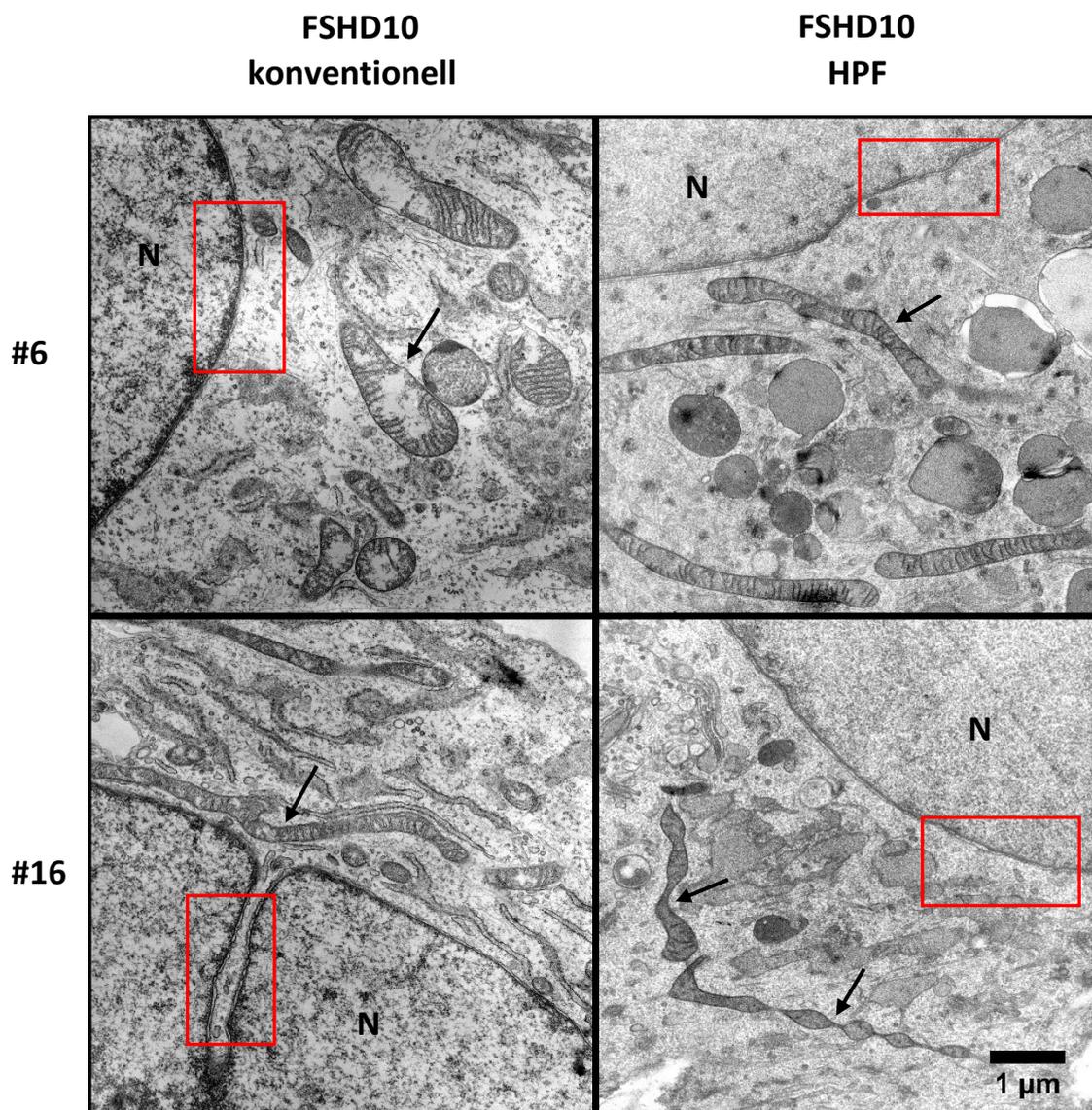
Typische Kernporen sind bei allen abgebildeten Myoblasten gut zu erkennen (siehe rote Pfeile in Abbildung 35).



**ABBILDUNG 35: VERGRÖßERUNGEN DER KERNHÜLLE DER KONVENTIONELL UND HPF-FIXIERTEN KONTROLL-MYOBLASTEN 19951**

Die innere und die äußere Kernmembran sind deutlich zu erkennen. Auffälligkeiten an der Kernhülle und Ausstülpungen der ONM sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Rote Pfeile markieren die Kernporen. N kennzeichnet das Nukleoplasma.

In der Übersicht zeigen die erkrankten Myoblasten FSHD10 bei beiden Fixierungsmethoden ähnliche atypisch geformte und verlängerte Mitochondrien. Einigen fehlen Cristae, wodurch ein Leerraum entsteht. Auffällige Mitochondrien sind in Abbildung 36 durch Pfeile markiert.

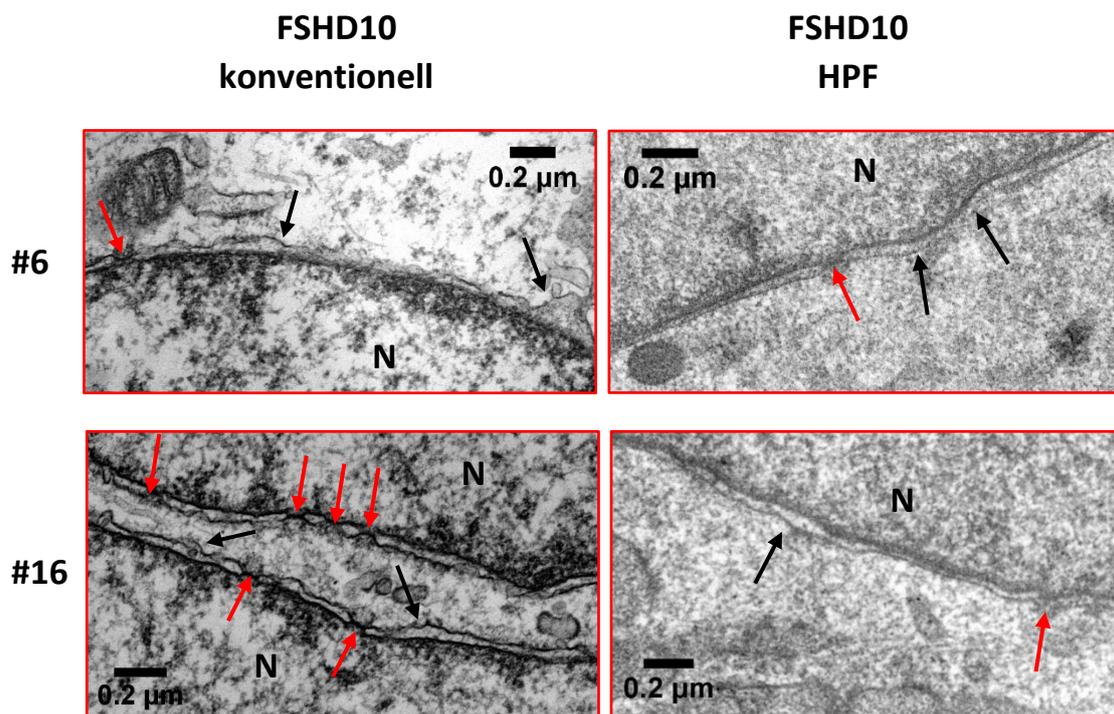


**ABBILDUNG 36: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ÜBERSICHTSAUFNAHMEN DER ERKRANKTEN FSHD10-MYOBLASTEN NACH KONVENTIONELLER UND HPF-FIXIERUNG**

In den Aufnahmen der Myoblasten sind jeweils ein Ausschnitt der Kernhülle und Mitochondrien dargestellt. Zur Untersuchung der Zell-Morphologie wurden unterschiedliche Passagen und zwei verschiedene Fixierungsmethoden verwendet. Auffällige Mitochondrien sind mit Pfeilen markiert. Die rot eingerahmten Ausschnitte sind vergrößert in Abbildung 37 gezeigt. **N** kennzeichnet das Nukleoplasma.

Die Kernhülle der konventionell fixierten Myoblasten FSHD10 weist einen unregelmäßigen und gewellten Verlauf der ONM auf, der in Abbildung 37 mit schwarzen Pfeilen markiert ist. Im Gegensatz dazu sind INM und ONM der HPF-fixierten Zellen häufig parallel zueinander, wobei der Abstand der Kernmembranen und damit die Breite des Inter-membranraums stellenweise leicht variiert (siehe schwarze Pfeile in Abbildung 37).

Typische Kernporen sind in Abbildung 37 durch rote Pfeile markiert.



**ABBILDUNG 37: VERGRÖßERUNGS-AUSSCHNITTE DER KERNHÜLLE VON FSHD10 NACH KONVENTIONEL-  
LER UND HPF-FIXIERUNG**

Innere und äußere Kernmembran sind deutlich erkennbar. Auffälligkeiten an der Kernhülle und Ausstülpungen der ONM sind durch schwarze Pfeile markiert. Rote Pfeile kennzeichnen die Kernporen. Das Nukleoplasma ist durch **N** gekennzeichnet.

Beim Vergleich der beiden Fixierungsmethoden fallen Gemeinsamkeiten und Unterschiede auf.

Die Feinstrukturen und das Zytoskelett werden bei der konventionellen Fixierung klarer dargestellt.

Für die Untersuchung der Kernmembranen sind beide Methoden geeignet.

Sowohl bei der konventionellen Fixierung, als auch nach dem Hochdruckgefrieren werden ONM und INM meist sehr schön und deutlich sichtbar. Der Abstand zwischen innerer und äußerer Kernmembran wird jedoch nach der HPF-Fixierung schärfer abgebildet. Auffällig ist jedoch der unterschiedliche Verlauf der Kernhülle bei konventionell und HPF-fixierten Myoblasten. Nach konventioneller Fixierung zeigt die ONM – hauptsächlich bei den erkrankten Zellen – Ausstülpungen und deutliche Unregelmäßigkeiten. Innere und äußere Kernmembran der gesunden Myoblasten verlaufen meist parallel. Die HPF-fixierten Myoblasten weisen einen geraderen und ruhigeren Verlauf der Kernhülle auf. Sowohl die FSHD-Myoblasten als auch die entsprechenden Kontroll-Myoblasten zeigen im Vergleich zu konventionell fixierten Zellen parallel verlaufende INM und ONM.

Bei der Darstellung der Mitochondrien liefern die elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach dem Hochdruckgefrieren und der Gefriersubstitution bessere Ergebnisse. Die Membranen der Mitochondrien werden hierbei deutlich schärfer abgebildet. Atypisch geformte, verzweigte und vergrößerte Mitochondrien treten bei beiden Fixierungsmethoden vor allem bei den erkrankten Myoblasten auf.

Die Kernporen sind bei beiden Fixierungsmethoden gut erkennbar.

Bei der konventionellen Fixierung scheint das Heterochromatin insgesamt deutlicher erkennbar zu sein und schärfer abgrenzbar zu sein als bei den HPF-fixierten Myoblasten.

## 4.2 INDIREKTE IMMUNFLUORESZENZ

Die indirekte Immunfluoreszenz dient zum Nachweis bestimmter Proteine in den Myoblasten und Analyse deren Verteilung innerhalb der Zelle. Der Primärantikörper bindet dabei spezifisch an das entsprechende Antigen. Um diesen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wird ein Sekundärantikörper eingesetzt, der spezifisch an den Primärantikörper bindet und an ein Fluorochrom gekoppelt ist. Weiterhin wird Hoechst hinzugegeben. Dieser Nukleinsäure-Farbstoff färbt durch Bindung an die DNA die Zellkerne an, welche dann unter dem Mikroskop zu erkennen sind.

In vorangegangenen Untersuchungen von EDMD-Zellen zeigten sich bei den erkrankten Myoblasten fluoreszenzmikroskopische Veränderungen von Lamin A/C (Reichart et al., 2004). Aufgrund der phänotypisch ähnlichen Ausprägung von EDMD und FSHD, wird neben den Methoden der Elektronenmikroskopie das Vorliegen und die Verteilung verschiedener Proteine in FSHD-Myoblasten mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht und mit den Kontrollzellen verglichen.

Zur Beurteilung der Kernhülle wird neben dem Antikörper gegen Lamin A/C auch ein Antikörper, der die Kernporen detektiert, eingesetzt.

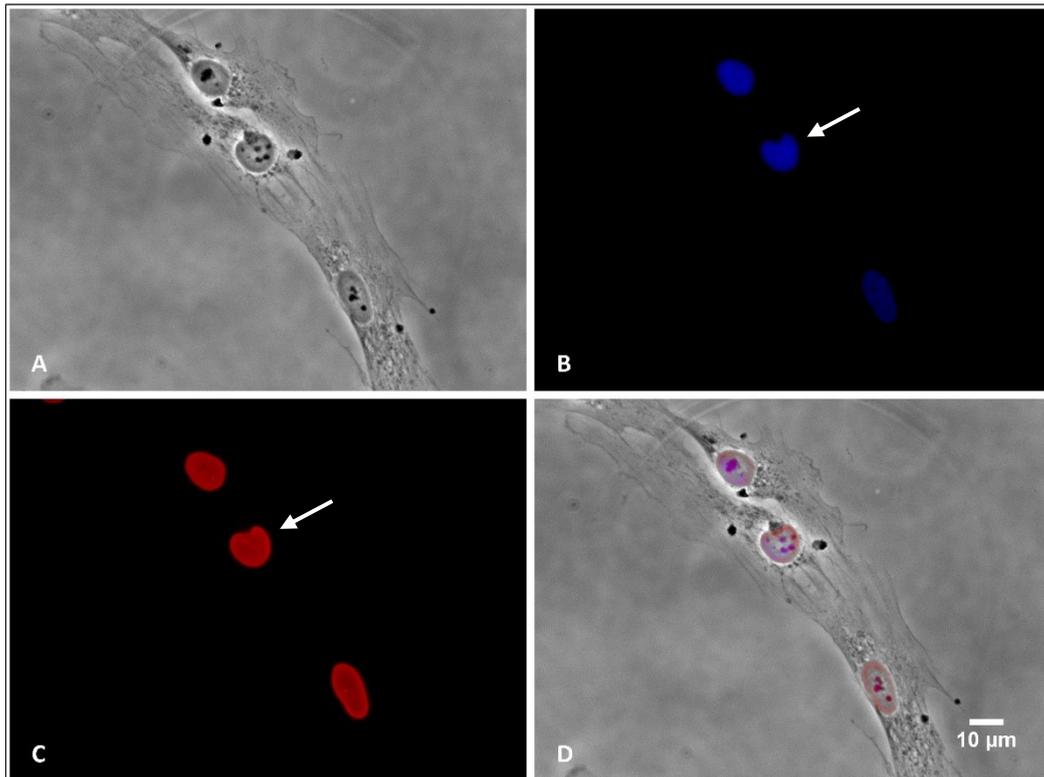
Da in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen auch veränderte Mitochondrien auffielen, werden mithilfe des Antikörpers ANT1/2, der an den Adenin-Nukleotid-Translokator der inneren Mitochondrienmembran bindet, auch diese fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

#### 4.2.1 NACHWEIS UND VERTEILUNG DER LAMINE A UND C

Die in der Kernlamina enthaltenen Lamine A und C sollen bei den FSHD-Myoblasten nachgewiesen und auf Auffälligkeiten hinsichtlich ihrer Verteilung untersucht werden. Dafür wird ein Primärantikörper verwendet, der Lamin A/C erkennt. Durch die Bindung des Sekundärantikörpers Anti-Maus Texas red wird Lamin A/C als intensiv-rote Färbung in der Zellkern-Peripherie unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Pro Zelllinie werden jeweils die Passagen 6 und 16 (#6 und #16) untersucht.

Lamin A/C ist bei den Kontroll-Myoblasten NO44 in Passage 6 gleichmäßig verteilt und wird im Randbereich des Zellkerns als intensiv-rote Anreicherung sichtbar (siehe Abbildung 38 C). In der Hoechst-Färbung und bei Lamin A/C und Anti-Maus Texas-red ist ein leicht unregelmäßig geformter Zellkern zu erkennen (siehe Pfeile in Abbildung 38 B und C).

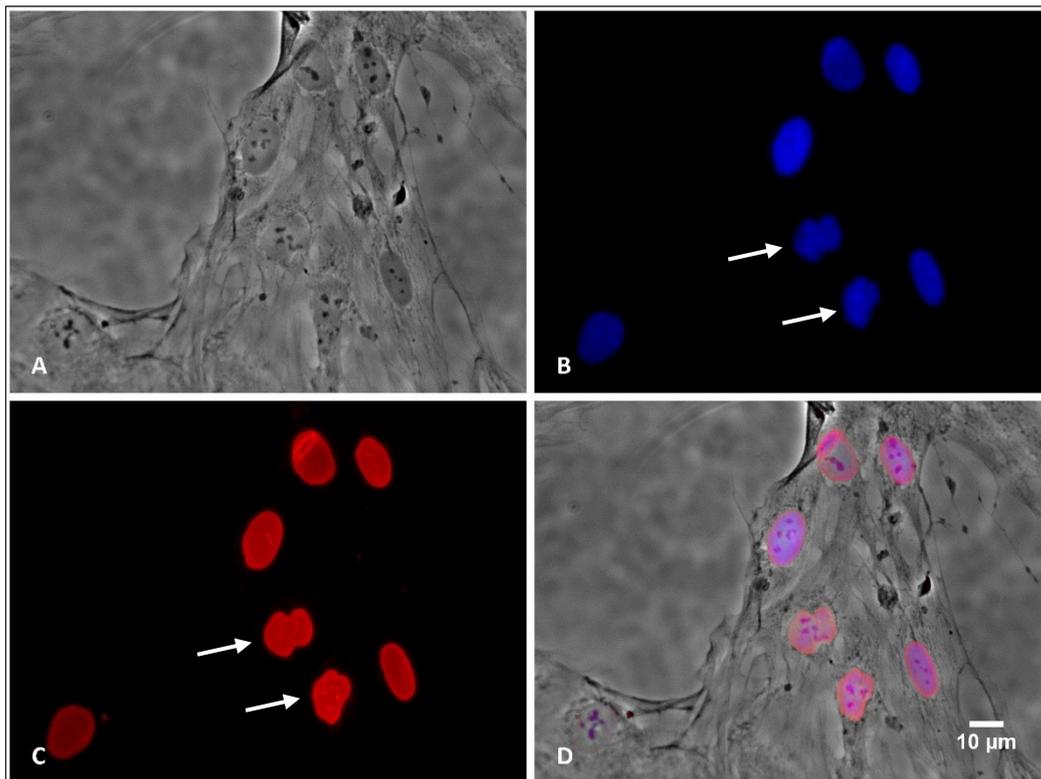


**ABBILDUNG 38: LOKALISATION VON LAMIN A/C DURCH IMMUNFLUORESZENZ AUF DIE KONTROLL-MY-OBLASTEN NO44 #6**

Bei den Kontrollzellen NO44 #6 ist eine deutliche Anreicherung von Lamin A/C in der Zellkern-Peripherie erkennbar. Ein leicht atypisch geformter Zellkern ist durch weiße Pfeile markiert. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Lamin A/C; **D:** Überlagerung von A, B und C.

Bei den FSHD-Myoblasten MO54 #6 ist eine gleichmäßige intensiv-rote Anreicherung von Lamin A/C im Randbereich des Zellkerns bei Lamin A/C und Anti-Maus Texas-red zu erkennen (siehe Abbildung 39 C). Leicht unregelmäßig geformte Zellkerne sind mit Pfeilen in der Hoechst-Färbung und bei Lamin A/C und Anti-Maus Texas-red gekennzeichnet (siehe Abbildung 39 B und C).

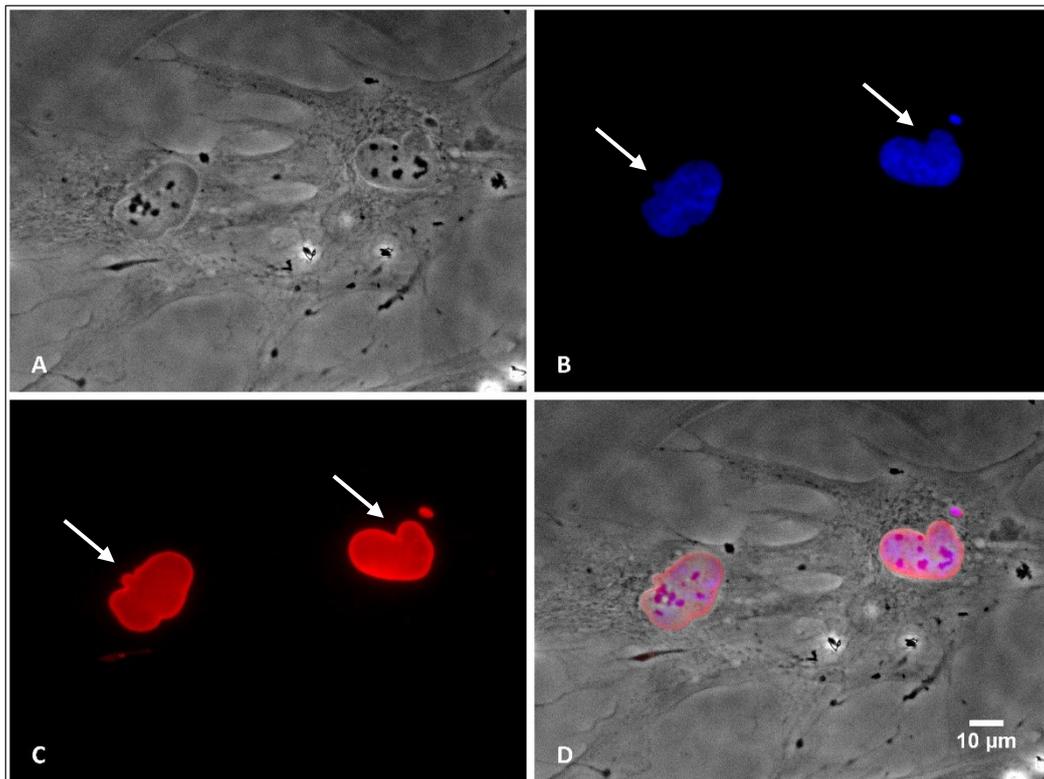


**ABBILDUNG 39: LOKALISATION VON LAMIN A/C DURCH IMMUNFLUORESZENZ AUF DIE FSHD-MY-OBLASTEN MO54 #6**

Lamin A/C ist bei den erkrankten Myoblasten MO54 in Passage 6 in der Zellkern-Peripherie angereichert. Leicht atypisch geformte Zellkerne mit Ausstülpungen sind durch weiße Pfeile markiert. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Lamin A/C; **D:** Überlagerung von A, B und C.

In Abbildung 40 sind die Kontrollzellen NO44 in Passage 16 dargestellt. Bei Lamin A/C und Anti-Maus Texas-red ist die Anreicherung von Lamin A/C in der Kern-Peripherie deutlich erkennbar (siehe Abbildung 40 C). Es weist eine homogene Verteilung auf. Auffällig sind die atypisch geformten Zellkerne mit leichten Ausstülpungen (siehe Pfeile in Abbildung 40 B und C).

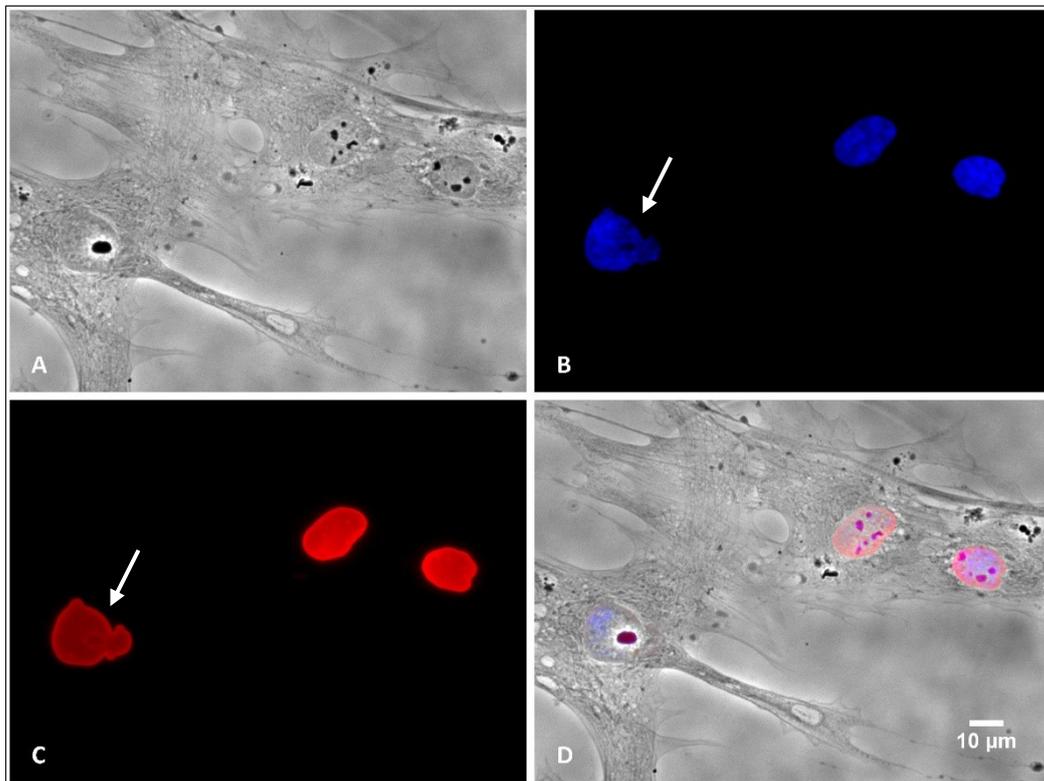


**ABBILDUNG 40: LOKALISATION VON LAMIN A/C DURCH IMMUNFLUORESCENZ AUF DIE GESUNDEN MY-OBLASTEN NO44 #16**

Bei den Kontrollzellen NO44 #16 zeigt sich eine deutliche Anreicherung von Lamin A/C als rote Färbung in der Zellkern-Peripherie. Leicht atypisch geformte Zellkerne mit Ausstülpungen sind durch weiße Pfeile markiert. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Lamin A/C; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Die FSHD-Myoblasten MO54 #16 zeigen eine Lamin A/C-Anreicherung im Randbereich des Zellkerns (siehe Abbildung 41 C). In der jeweils linken Bildhälfte fällt sowohl in der Hoechst-Färbung als auch bei Lamin A/C und Anti-Maus Texas-red ein atypisch geformter Zellkern mit einer Ausstülpung auf (siehe Pfeile in Abbildung 41 B und C).

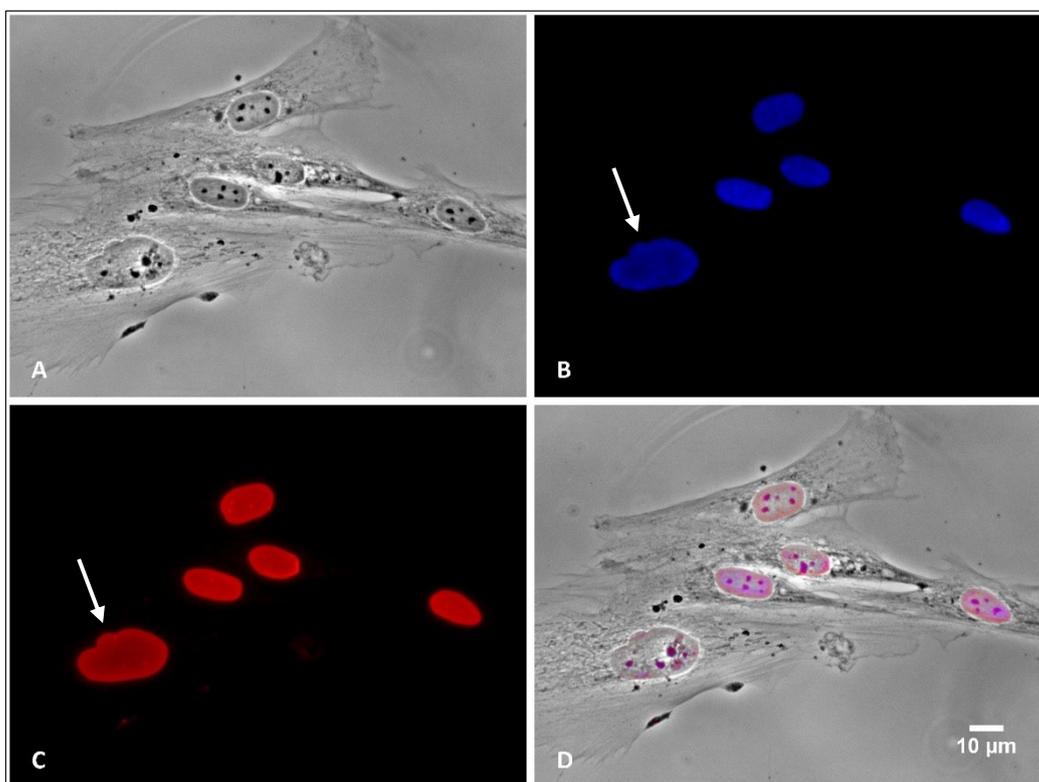


**ABBILDUNG 41: LOKALISATION VON LAMIN A/C DURCH IMMUNFLUORESZENZ AUF DIE FSHD-MY-OBLASTEN MO54 #16**

Die erkrankten Myoblasten MO54 #16 zeigen eine Fluoreszenz in der Zellkern-Peripherie. Ein atypisch geformter Zellkern mit Ausstülpungen ist durch weiße Pfeile markiert. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Lamin A/C; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Bei den Kontrollzellen NO45 in Passage 6 zeigt sich eine Fluoreszenz im Randbereich des Zellkerns bei Lamin A/C und Anti-Maus Texas-red (siehe Abbildung 42 C). In der Hoechst-Färbung und bei Lamin A/C und Anti-Maus Texas-red fällt ein leicht atypisch geformter Zellkern auf (siehe Pfeile in Abbildung 42 B und C).

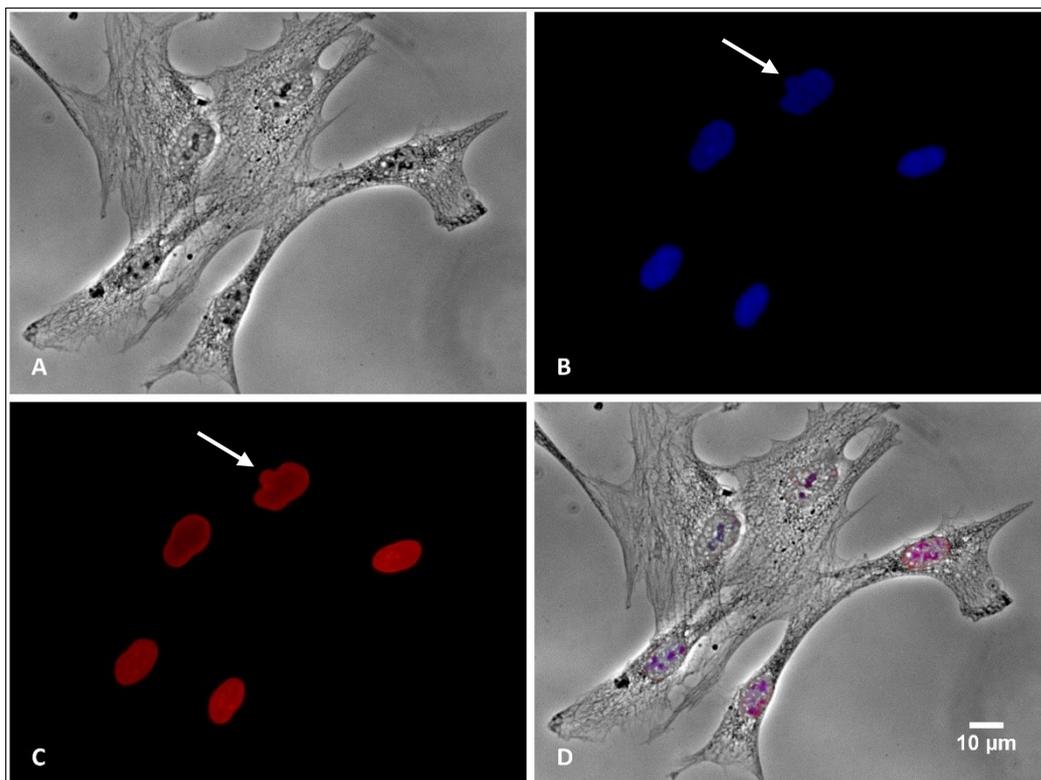


**ABBILDUNG 42: LOKALISATION VON LAMIN A/C DURCH IMMUNFLUORESZENZ AUF DIE GESUNDEN MY-OBLASTEN NO45 #6**

Bei den Kontrollzellen NO45 #6 ist eine deutliche Anreicherung von Lamin A/C als intensiv-rote Färbung in der Zellkern-Peripherie erkennbar. Weiße Pfeile markieren einen leicht atypisch geformten Zellkern. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Lamin A/C; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Abbildung 43 zeigt die erkrankten Zellen MO37 #6. Die Lamine A und C sind vorhanden, homogen verteilt und treten als gleichmäßige intensiv-rote Färbung im Randbereich des Zellkerns in Erscheinung (siehe Abbildung 43 C). Pfeile markieren in Abbildung 43 B und C einen atypisch geformten Zellkern mit einer leichten Ausstülpung.

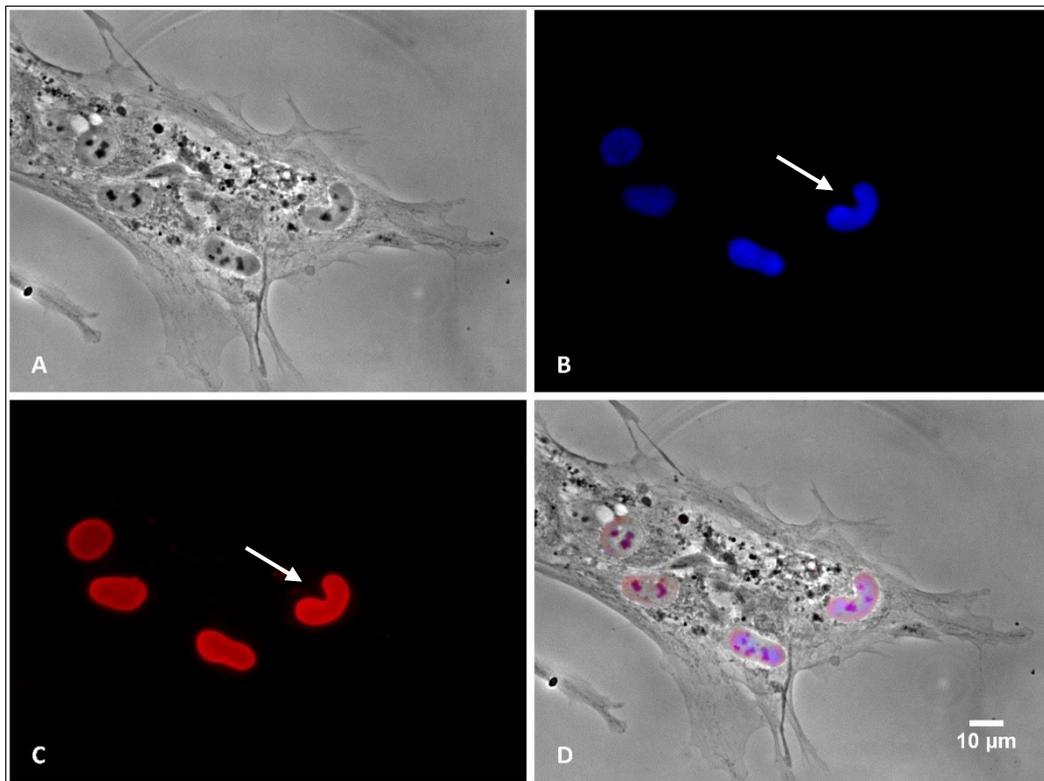


**ABBILDUNG 43: LOKALISATION VON LAMIN A/C DURCH IMMUNFLUORESZENZ AUF DIE FSHD-MY-OBLASTEN MO37 #6**

Die erkrankten Myoblasten MO37 #6 zeigen eine Fluoreszenz in der Zellkern-Peripherie. Ein atypisch geformter Zellkern mit Ausstülpung ist durch weiße Pfeile markiert. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Lamin A/C; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Die Kontroll-Myoblasten NO45 #16 sind in Abbildung 44 dargestellt. Bei Lamin A/C und Anti-Maus Texas-red ist eine gleichmäßige Anreicherung von Lamin A/C in der Zellkern-Peripherie zu erkennen. In Abbildung 44 **B** und **C** sind zwei nahe nebeneinanderliegende Zellkerne mit einem Pfeil markiert.

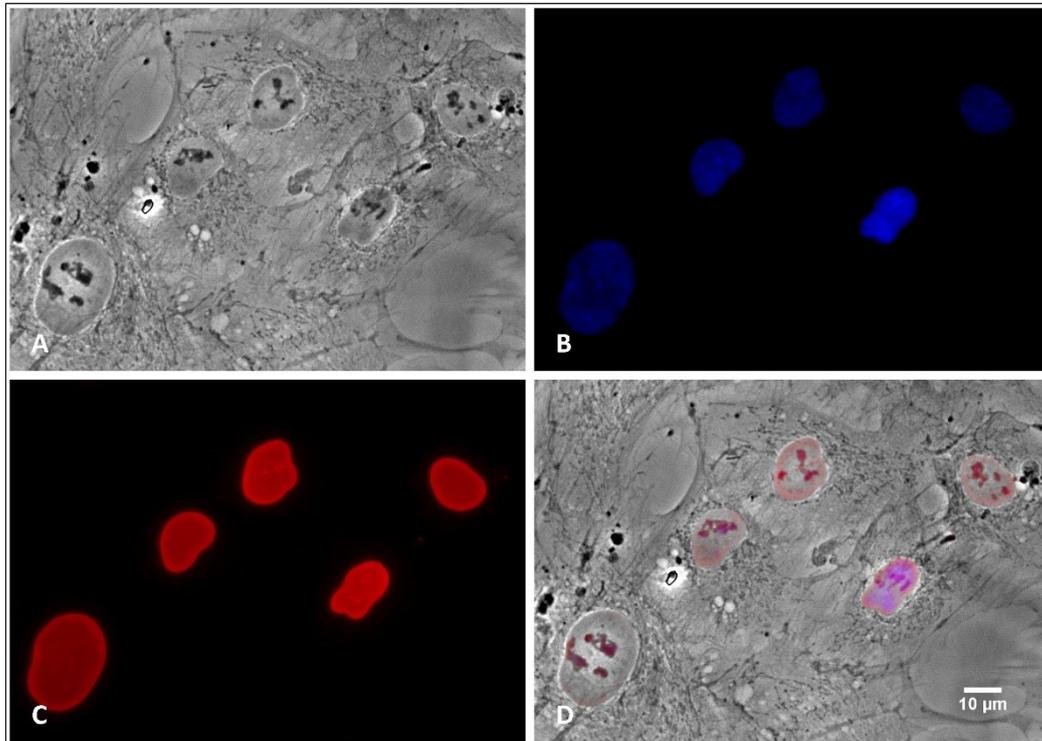


**ABBILDUNG 44: LOKALISATION VON LAMIN A/C DURCH IMMUNFLUORESZENZ AUF DIE KONTROLLZELLEN NO45 #16**

Bei den Kontrollzellen NO45 in Passage 16 ist eine deutliche LaminA/C-Anreicherung in der Zellkern-Peripherie erkennbar. Weiße Pfeile markieren zwei nahe nebeneinanderliegende Zellkerne. Der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst wurde zur DNA-Lokalisation verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Lamin A/C; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Bei den FSHD-Myoblasten MO37 in Passage 16 liegt eine homogene Verteilung der Lamine A und C in der Kernlamina vor. Dies ist an der Fluoreszenz im Randbereich des Zellkerns in Abbildung 45 C zu erkennen.

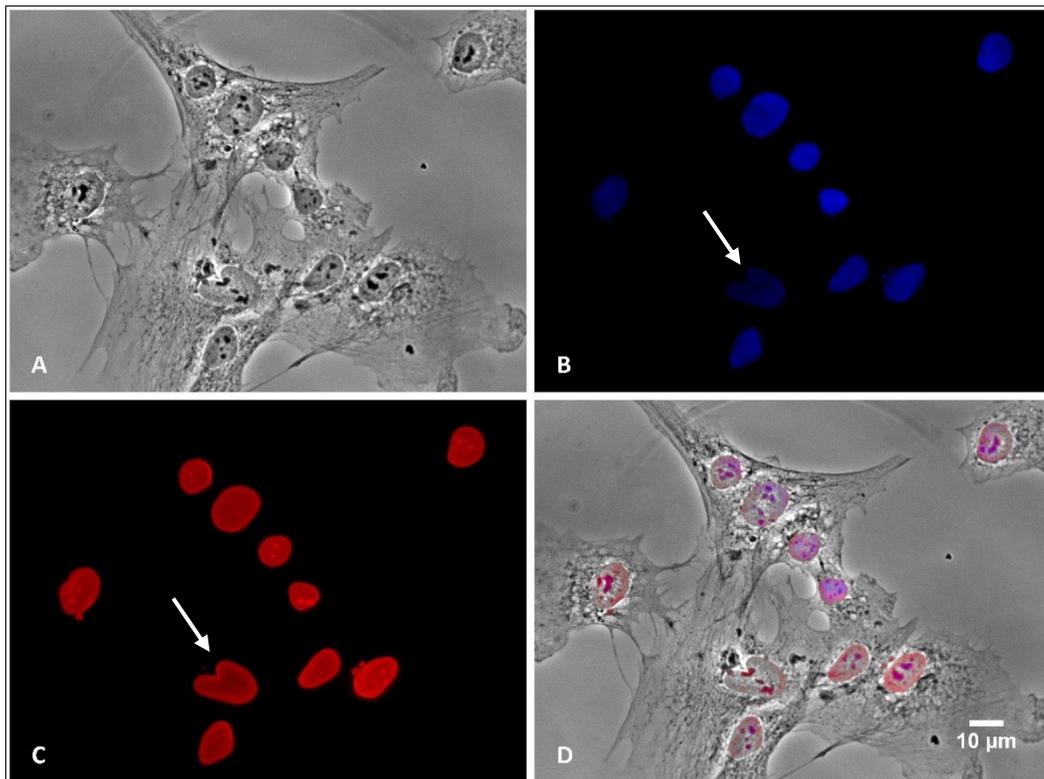


**ABBILDUNG 45: LOKALISATION VON LAMIN A/C DURCH IMMUNFLUORESZENZ AUF DIE FSHD-MY-OBLASTEN MO37 #16**

Die erkrankten Myoblasten MO37 #16 zeigen eine Anreicherung von Lamin A/C in der Zellkern-Peripherie. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Lamin A/C; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Abbildung 46 zeigt die Kontroll-Myoblasten 19951 in Passage 6. Im Bildausschnitt **C** ist in der Zellkern-Peripherie eine gleichmäßige Fluoreszenz zu erkennen. Lamin A/C ist somit vorhanden und homogen verteilt. Die Pfeile in Abbildung 46 **B** und **C** markieren einen atypisch geformten Zellkern, der leichte Ausstülpungen aufweist.

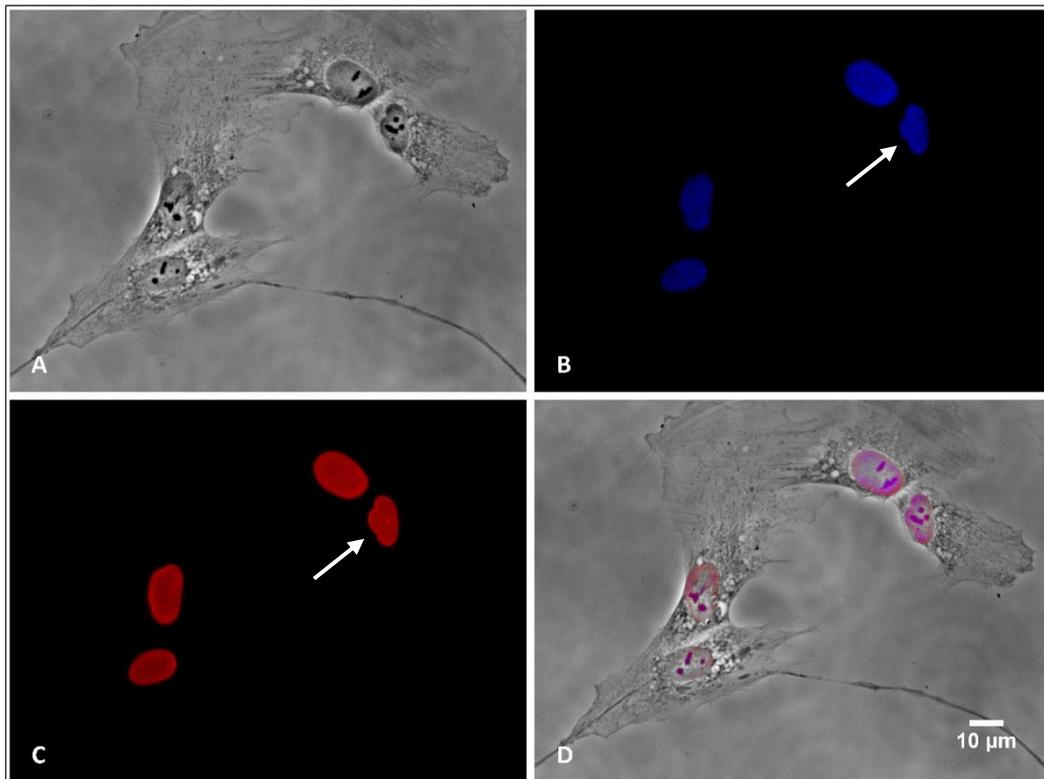


**ABBILDUNG 46: LOKALISATION VON LAMIN A/C DURCH IMMUNFLUORESCENZ AUF DIE KONTROLL-MY-OBLASTEN 19951 #6**

Bei den Kontrollzellen 19951 in Passage 6 ist eine deutliche Anreicherung von Lamin A/C als intensiv-rote Färbung in der Zellkern-Peripherie erkennbar. Ein leicht atypisch geformter Zellkern ist durch weiße Pfeile markiert. Der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst wurde zur DNA-Lokalisation verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Lamin A/C; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Die erkrankten Myoblasten FSHD10 #6 weisen eine gleichmäßige Verteilung von Lamin A/C auf, was als intensiv-rote Färbung in der Zellkern-Peripherie in Abbildung 47 C erkennbar ist. In der Hoechst-Färbung und bei Lamin A/C und Anti-Maus Texas-red markieren Pfeile einen leicht unregelmäßig geformten Zellkern (siehe Abbildung 47 B und C).

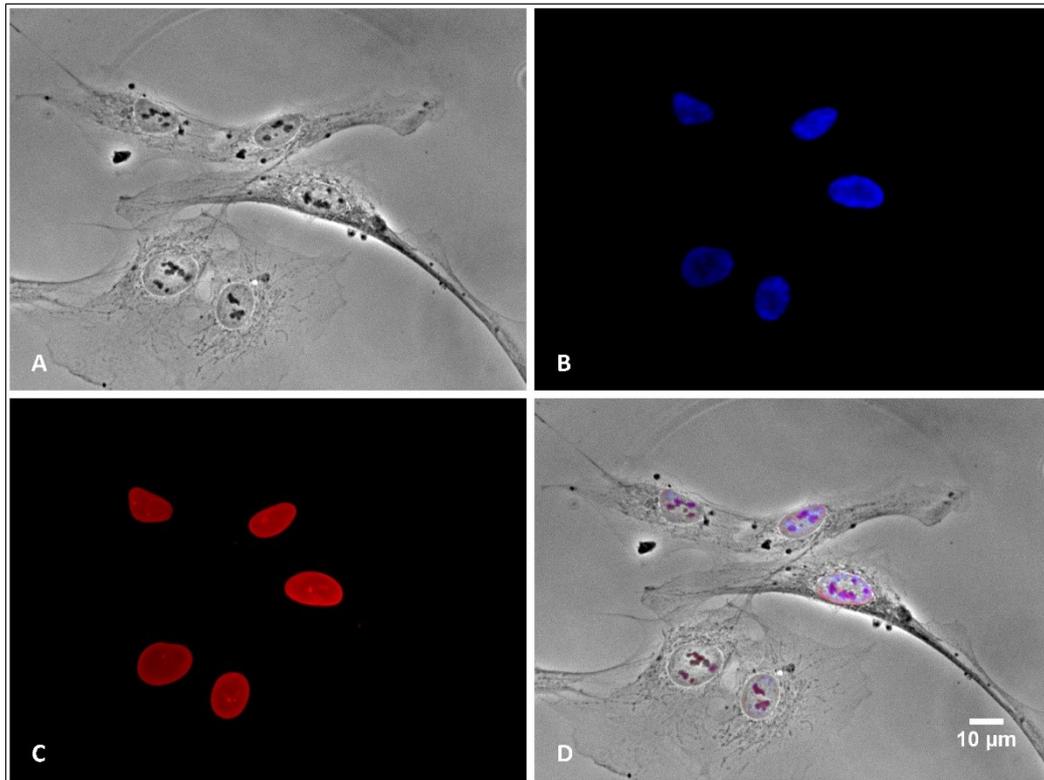


**ABBILDUNG 47: LOKALISATION VON LAMIN A/C DURCH IMMUNFLUORESZENZ AUF DIE ERKRANKTEN MYOBLASTEN FSHD10 #6**

Bei den FSHD-Myoblasten FSHD10 in Passage 6 zeigt sich eine Fluoreszenz in der Kernperipherie. Weiße Pfeile markieren einen atypisch geformten Zellkern mit leichter Ausstülpung. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Lamin A/C; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Bei der Kontrolle 19951 in Passage 16 ist in Abbildung 48 C eine gleichmäßige Anreicherung von Lamin A/C in der Zellkern-Peripherie nachweisbar.

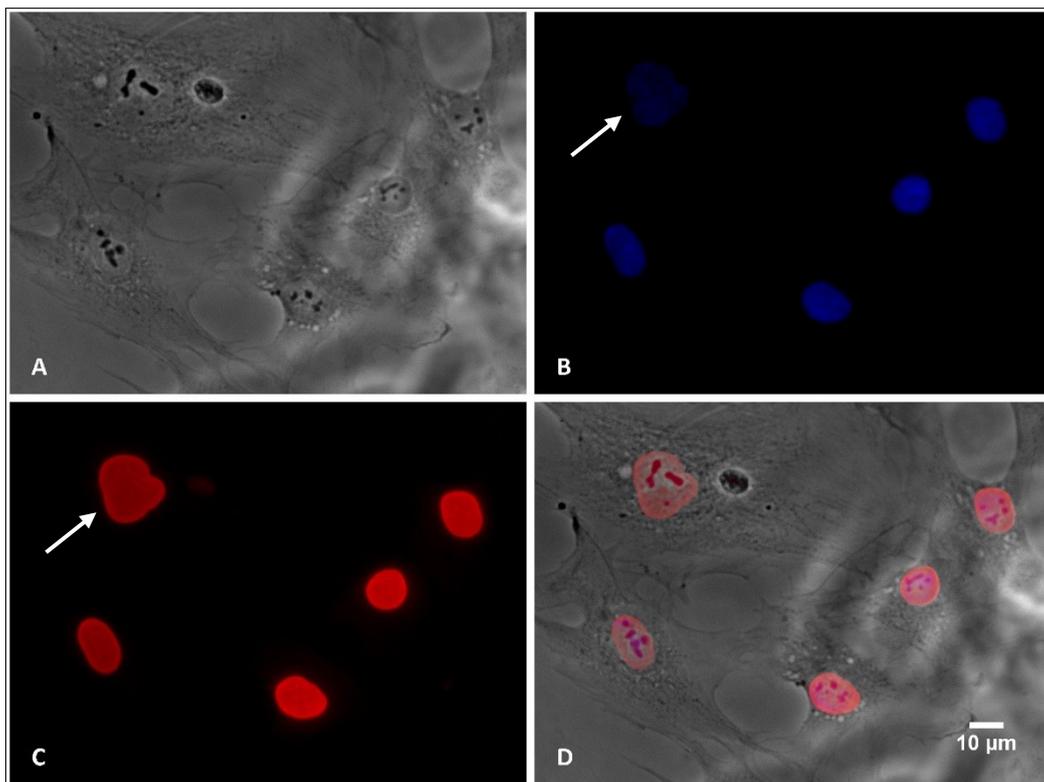


**ABBILDUNG 48: LOKALISATION VON LAMIN A/C DURCH IMMUNFLUORESZENZ AUF DIE KONTROLL-MY-OBLASTEN 19951 #16**

Die Kontrollzellen 19951 #16 weisen eine Anreicherung von Lamin A/C in der Zellkern-Peripherie auf. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Lamin A/C; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Die erkrankten Myoblasten FSHD10 #16 zeigen eine homogene Verteilung der Lamine A und C, was durch eine gleichmäßige Anreicherung im Randbereich des Zellkerns sichtbar wird (siehe Abbildung 49 C). Ein atypisch geformter Zellkern mit einer leichten Ausstülpung ist in Abbildung 49 B und C jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.



**ABBILDUNG 49: LOKALISATION VON LAMIN A/C DURCH IMMUNFLUORESCENZ AUF DIE FSHD-MY-OBLASTEN FSHD10 #16**

Bei den erkrankten Myoblasten FSHD10 in Passage 16 ist eine deutliche Anreicherung von Lamin A/C als intensiv-rote Färbung in der Zellkern-Peripherie erkennbar. Ein leicht atypisch geformter Zellkern ist durch weiße Pfeile markiert. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Lamin A/C; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

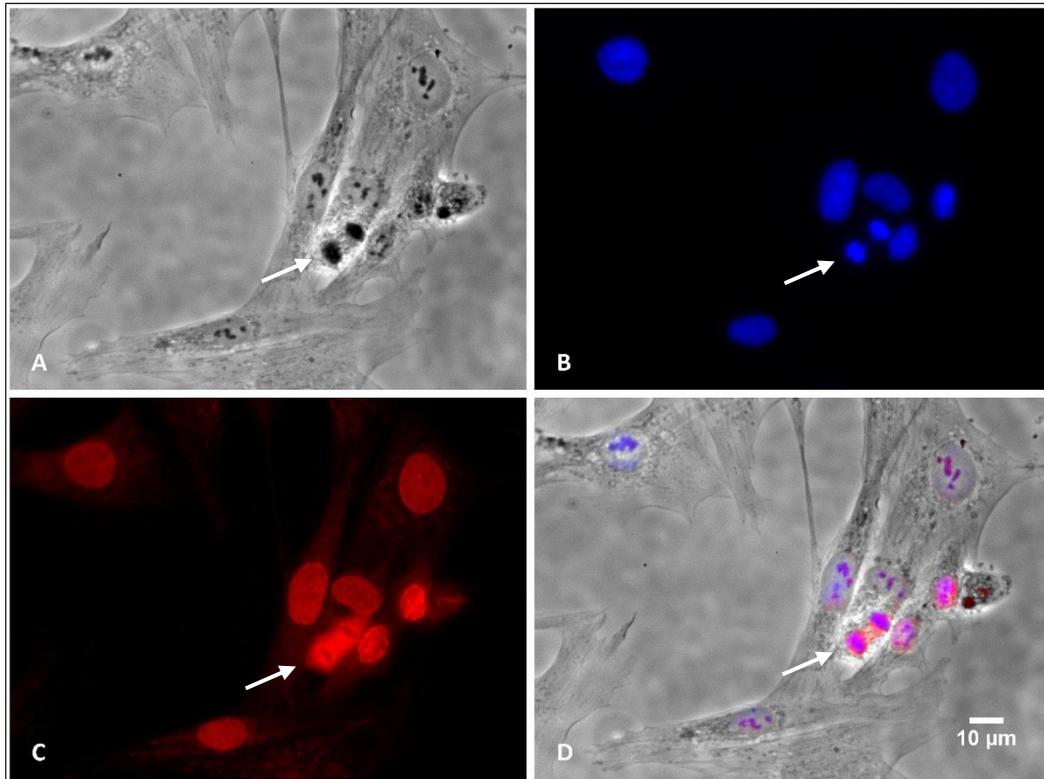
Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Lamine A und C sowohl bei den Myoblasten der FSHD-Patienten, als auch bei den Kontrollzellen nachweisbar sind. Hinsichtlich ihrer Verteilung sind keine Unterschiede zu beobachten. Betrachtet man die einzelnen Passagen der untersuchten Myoblasten, können die Lamine A und C in der niedrigen Passage 6 und in der hohen Passage 16 nachgewiesen werden. Sie sind in beiden Proben jeweils homogen verteilt. Sowohl in der Hoechst-Färbung, als auch bei Lamin A/C und Anti-Maus Texas-red treten vor allem bei den erkrankten Zellen leicht atypische Zellkerne mit unterschiedlicher Zellkernform und Ausstülpungen auf.

### 4.2.2 NACHWEIS UND VERTEILUNG DER KERNPOREN

Die Untersuchung der Kernporen und ihrer Verteilung erfolgt mittels des Primärantikörpers Mab414, der an Nukleoporine mit FXFG-Motiv bindet. Als Sekundärantikörper wird Anti-Maus Texas-red verwendet. Dadurch können die Kernporen über die rote Pünktchenfluoreszenz an den Nukleoporinen lokalisiert werden.

Pro Zelllinie wurden jeweils die Passagen 6 und 16 (#6 und #16) untersucht.

Bei den Kontrollzellen NO44 in Passage 6 sind die roten Fluoreszenz-Signale an den Nukleoporinen, die die Kernporen detektieren, homogen verteilt (siehe Abbildung 50 C). Eine Zytokinese ist jeweils mit einem Pfeil markiert (siehe Abbildung 50).

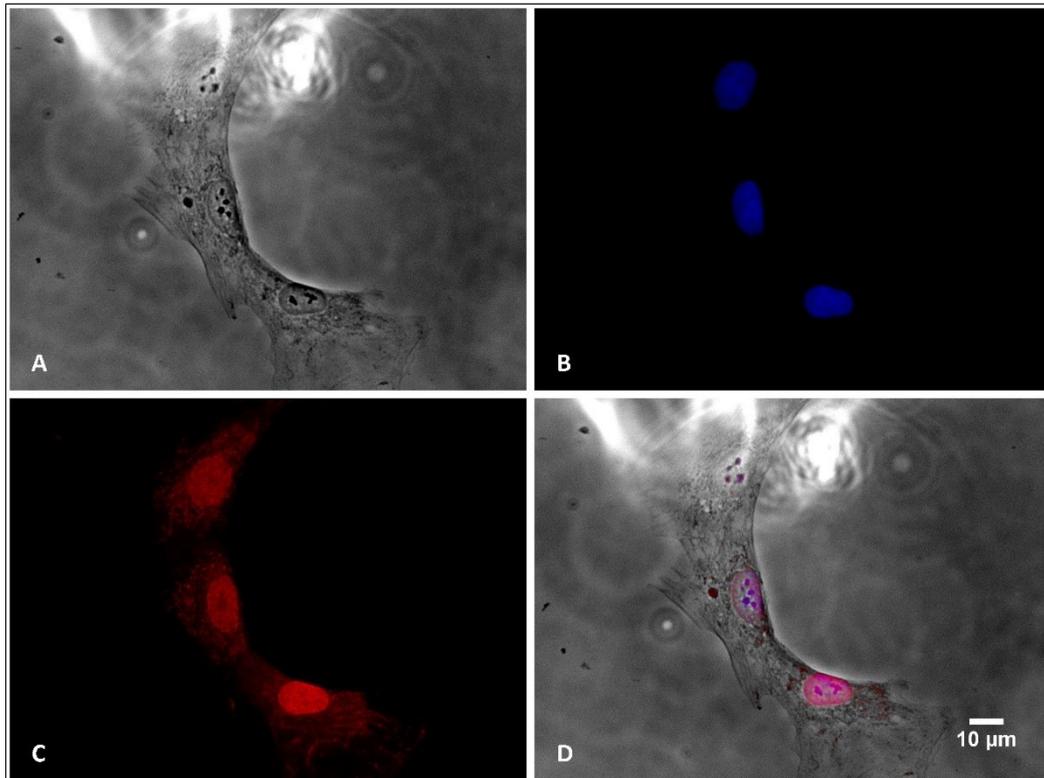


**ABBILDUNG 50: IMMUNFLUORESCENZ MIT DEM ANTIKÖRPER MAB414 GEGEN PROTEINE DER KERNPorenKOMPLEXE AUF DIE KONTROLLZELLEN NO44 #6**

Die gesunden Myoblasten NO44 in Passage 6 zeigen homogen verteilte Fluoreszenz-Signale im Zellkern. Weiße Pfeile markieren eine Zytokinese. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Mab414; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Die Kernporen der erkrankten Myoblasten MO54 #6 sind als rote Pünktchenfluoreszenz an den Nukleoporinen in Abbildung 51 C zu sehen und zeigen eine homogene Verteilung.

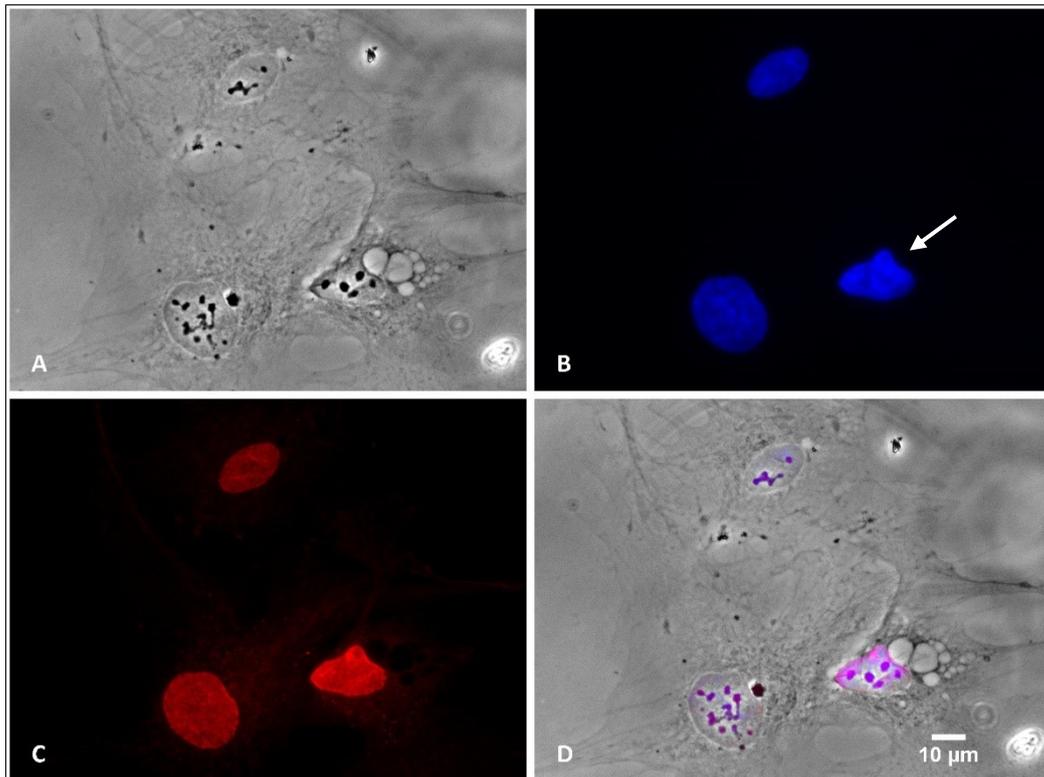


**ABBILDUNG 51: IMMUNFLUORESCENZ MIT DEM ANTIKÖRPER MAB414 GEGEN PROTEINE DER KERNPorenKOMPLEXE AUF DIE FSHD-MYOBLASTEN MO54 #6**

Bei den erkrankten Myoblasten MO54 #6 zeigen sich homogen verteilte Fluoreszenz-Signale im Zellkern. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nucleinstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Mab414; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Abbildung 52 zeigt die Aufnahmen der Kontrollzellen NO44 in Passage 16. Bei Mab414 und dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper Anti-Maus Texas-red ist eine gleichmäßige Verteilung der roten Signale erkennbar (siehe Abbildung 52 C). In der Hoechst-Färbung ist ein atypisch geformter Zellkern mit Ausstülpung zu sehen (siehe Pfeil in Abbildung 52 B).

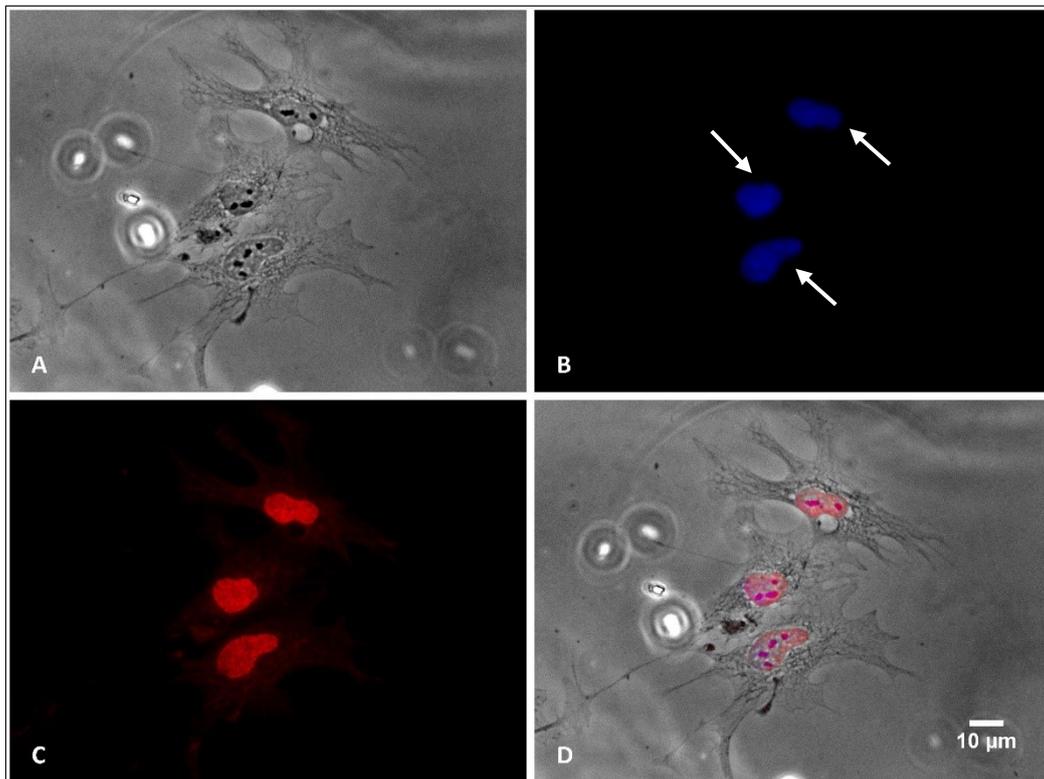


**ABBILDUNG 52: IMMUNFLUORESCENZ MIT DEM ANTIKÖRPER MAB414 GEGEN PROTEINE DER KERNPorenKOMPLEXE AUF DIE KONTROLL-MYOBLASTEN NO44 #16**

Bei den gesunden Myoblasten NO44 #16 zeigen die Fluoreszenz-Signale im Zellkern eine homogene Verteilung. Ein atypisch geformter Zellkern mit Ausstülpung ist mit einem weißen Pfeil markiert. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Mab414; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Die Kernporen von MO54 #16, die durch rote Pünktchenfluoreszenz an den Nukleopori-  
nen in Abbildung 53 **C** sichtbar werden, weisen eine homogene Verteilung auf. Leicht  
atypisch geformte Zellkerne mit Ausstülpungen sind mit Pfeilen in der Hoechst-Färbung  
gekennzeichnet (siehe Abbildung 53 **B**).

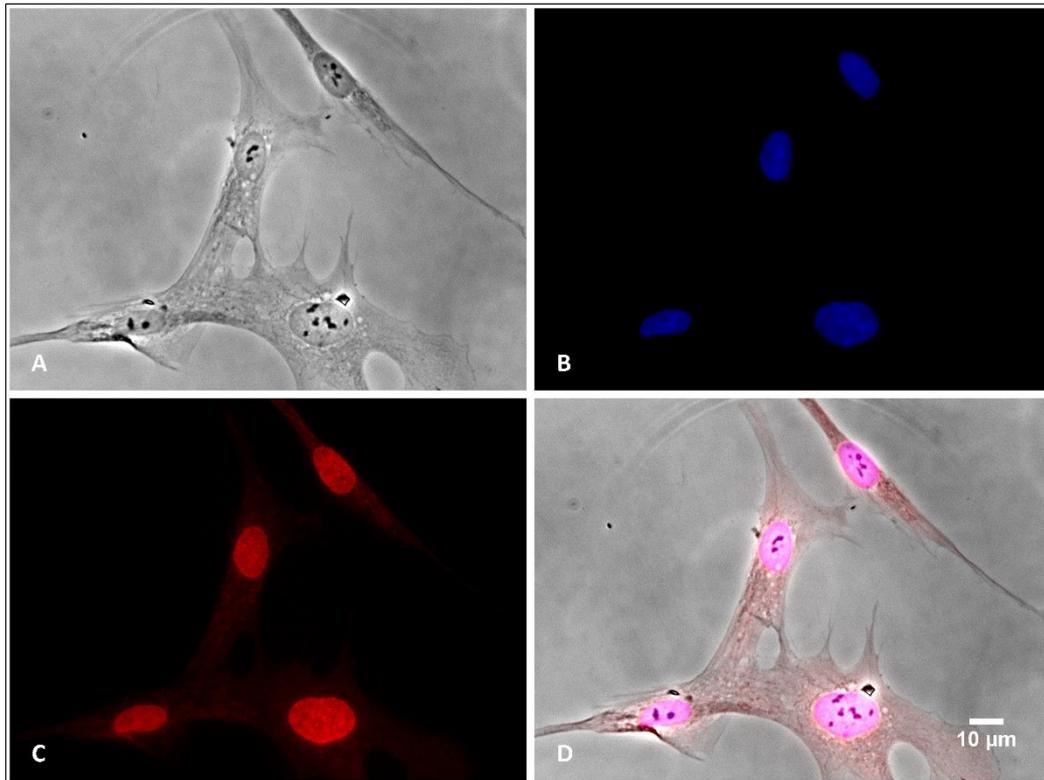


**ABBILDUNG 53: IMMUNFLUORESCENZ MIT DEM ANTIKÖRPER MAB414 GEGEN PROTEINE DER KERNPORENKOMPLEXE AUF DIE ERKRANKTEN MYOBLASTEN MO54 #16**

Die FSHD-Myoblasten MO54 #16 zeigen homogen verteilte Fluoreszenz-Signale im Zellkern. Weiße Pfeile markieren leicht atypisch geformte Zellkerne mit Ausstülpungen. Der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst wurde zur DNA-Lokalisation verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Mab414; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Bei den Kontrollzellen NO45 #6 zeigt sich eine homogene Verteilung der roten Signale und damit der Kernporen bei Mab414 und Anti-Maus Texas-red (siehe Abbildung 54 C).

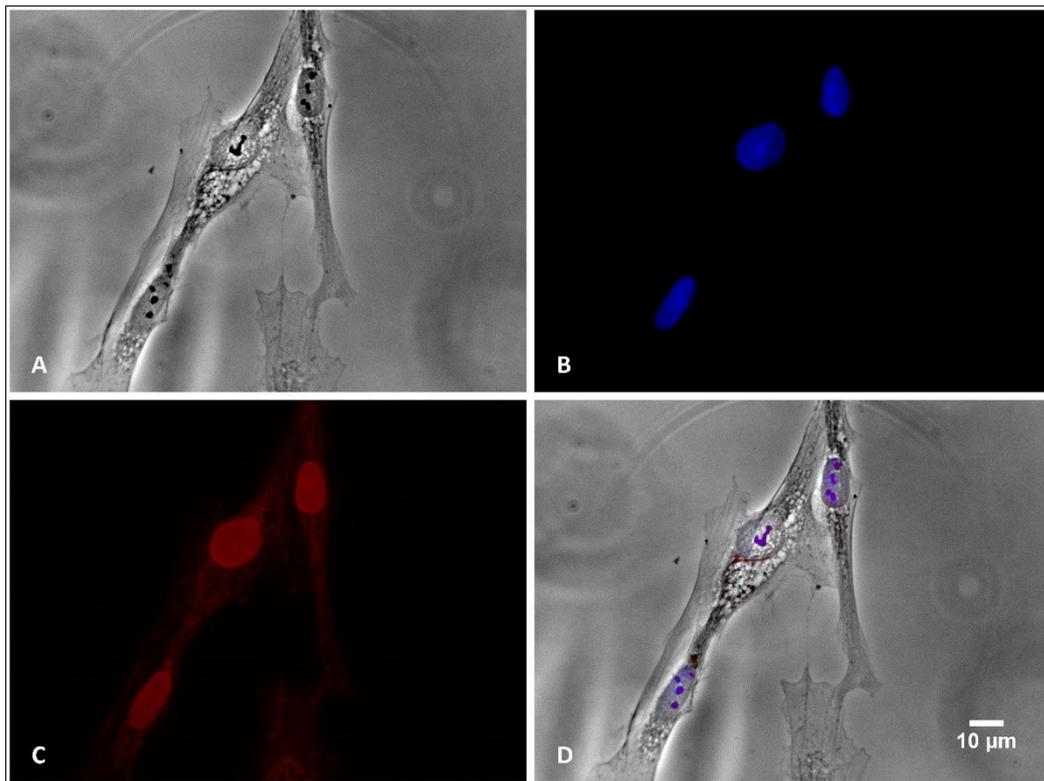


**ABBILDUNG 54: IMMUNFLUORESCENZ MIT DEM ANTIKÖRPER MAB414 GEGEN PROTEINE DER KERNPorenKOMPLEXE AUF DIE GESUNDEN MYOBLASTEN NO45 #6**

Bei der Kontrolle NO45 in Passage 6 zeigen die Fluoreszenz-Signale im Zellkern eine homogene Verteilung. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Mab414; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Die Kernporen der erkrankten Myoblasten MO37 #6 zeigen eine gleichmäßige Verteilung. In Abbildung 55 **C** ist eine homogene rote Signalgebung an den Nukleoporinen mit FXFG-Motiv durch Mab414 und den Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper Anti-Maus Texas-red erkennbar.

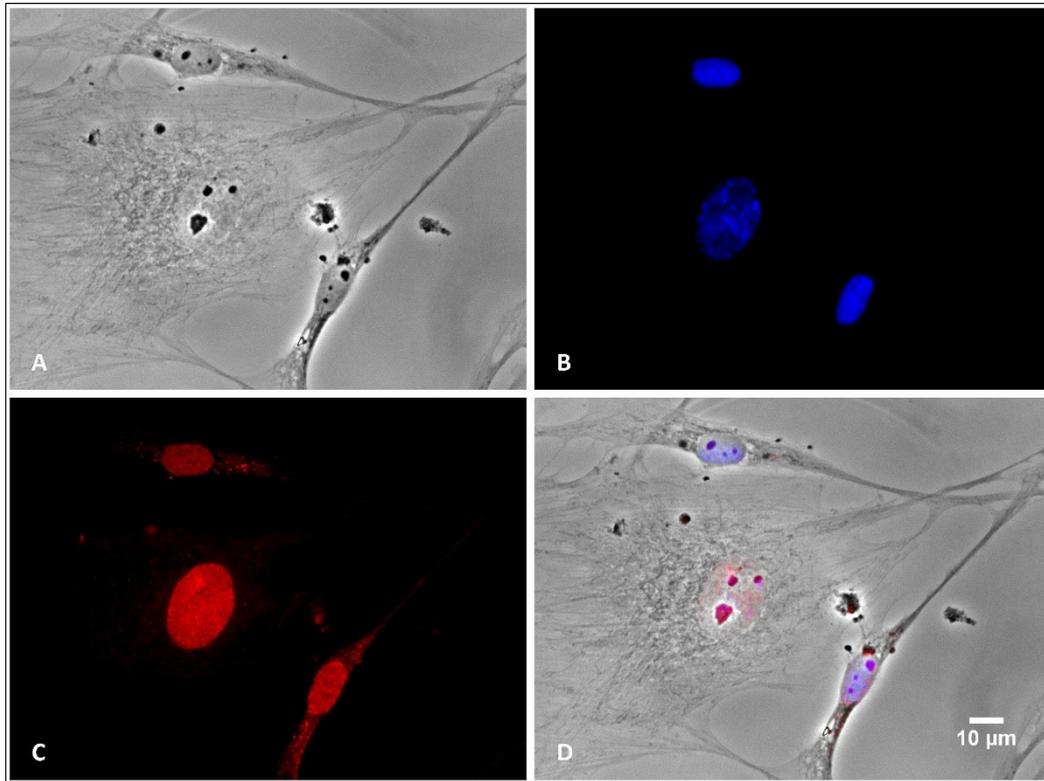


**ABBILDUNG 55: IMMUNFLUORESCENZ MIT DEM ANTIKÖRPER MAB414 GEGEN PROTEINE DER KERNPORENKOMPLEXE AUF DIE FSHD-MYOBLASTEN MO37 #6**

Die erkrankten Myoblasten MO37 #6 weisen gleichmäßig verteilte rote Fluoreszenz-Signale im Zellkern auf. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Mab414; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Die Kontrollzellen NO45 #16 zeigen eine gleichmäßige Verteilung der roten Fluoreszenz-Signale an den Nukleoporinen und somit der Kernporen bei Mab414 und Anti-Maus Texas-red (siehe Abbildung 56 C).

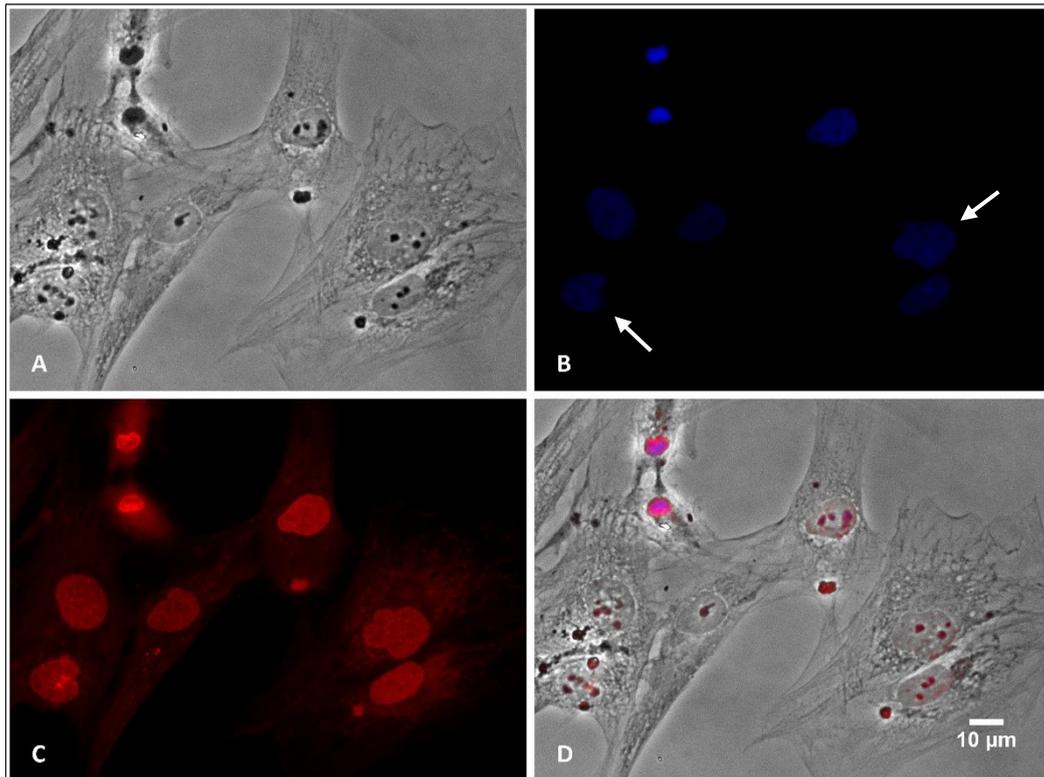


**ABBILDUNG 56: IMMUNFLUORESCENZ MIT DEM ANTIKÖRPER MAB414 GEGEN PROTEINE DER KERNPorenKOMPLEXE AUF DIE KONTROLL-MYOBLASTEN NO45 #16**

Bei den gesunden Myoblasten NO45 #16 zeigen die Fluoreszenz-Signale im Zellkern eine homogene Verteilung. Der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst wurde zur DNA-Lokalisation verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Mab414; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Bei den FSHD-Myoblasten MO37 in Passage 16 ist eine homogene Verteilung der Signale (siehe Abbildung 57 **C**) und damit der Kernporen festzustellen. Bei Hoechst (siehe Abbildung 57 **B**) sind atypisch geformte Zellkerne mit leichten Ausstülpungen zu erkennen und mit Pfeilen markiert. Weiterhin kann eine Zytokinese beobachtet werden (siehe jeweils linken oberen Bildausschnitt in Abbildung 57).

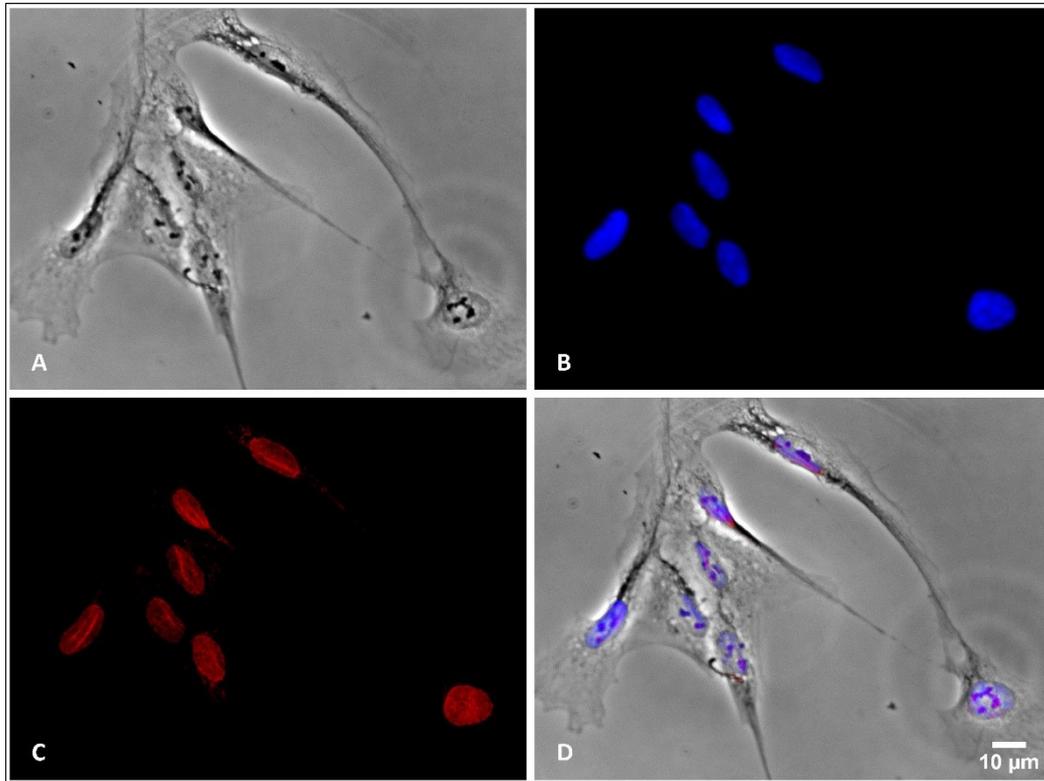


**ABBILDUNG 57: IMMUNFLUORESCENZ MIT DEM ANTIKÖRPER MAB414 GEGEN PROTEINE DER KERNPorenKOMPLEXE AUF DIE FSHD-MYOBLASTEN MO37 #16**

Die erkrankten Myoblasten MO37 in Passage 16 zeigen homogen verteilte Fluoreszenz-Signale im Zellkern. Weiße Pfeile markieren atypisch geformte Zellkerne mit leichten Ausstülpungen. Eine Zytokinese ist jeweils im linken oberen Bildausschnitt zu erkennen. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Mab414; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Die Kontrollzellen 19951 zeigen in Passage 6 eine gleichmäßige Verteilung der Kernporen. In Abbildung 58 **C** ist diese durch das homogene Auftreten der punktförmigen roten Fluoreszenz-Signale im Bereich der Zellkerne erkennbar.

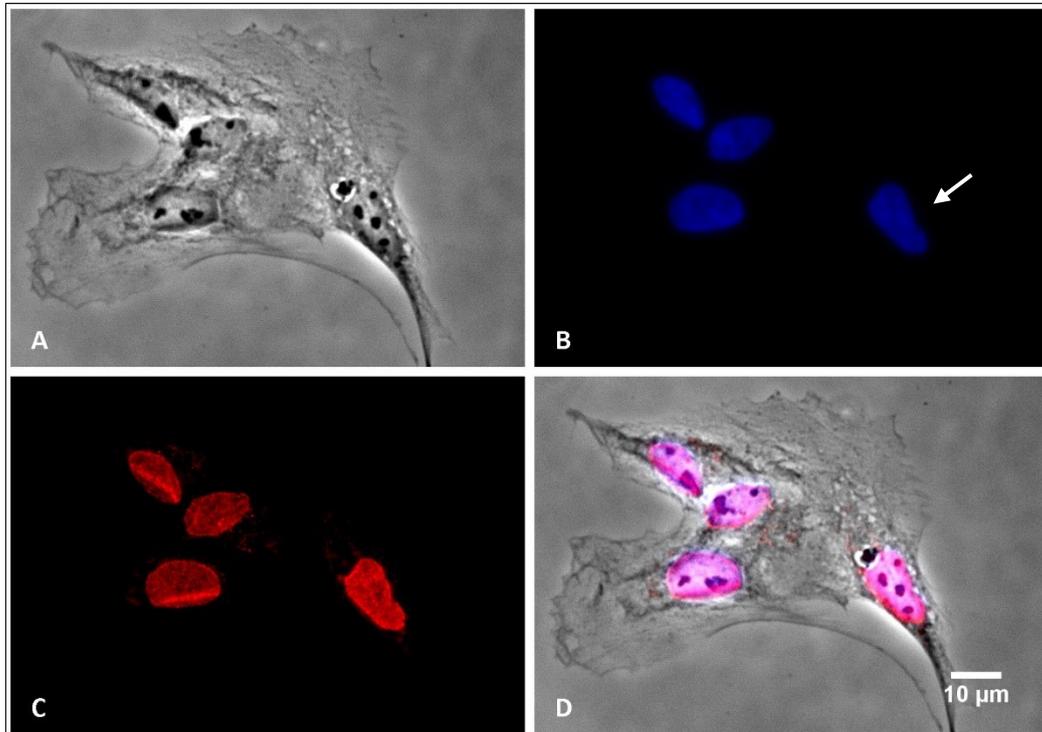


**ABBILDUNG 58: IMMUNFLUORESCENZ MIT DEM ANTIKÖRPER MAB414 GEGEN PROTEINE DER KERNPorenKOMPLEXE AUF DIE KONTROLLZELLEN 19951 #6**

Bei den gesunden Myoblasten 19951 #6 zeigen die Fluoreszenz-Signale im Zellkern eine homogene Verteilung. Der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst wurde zur DNA-Lokalisation verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Mab414; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Bei den erkrankten Zellen FSHD10 in Passage 6 liegt eine homogene Verteilung der roten Signale vor (siehe Abbildung 59 C). In der Hoechst-Färbung ist ein Zellkern mit leicht unregelmäßiger Form zu erkennen und mit einem Pfeil in Abbildung 59 B markiert.

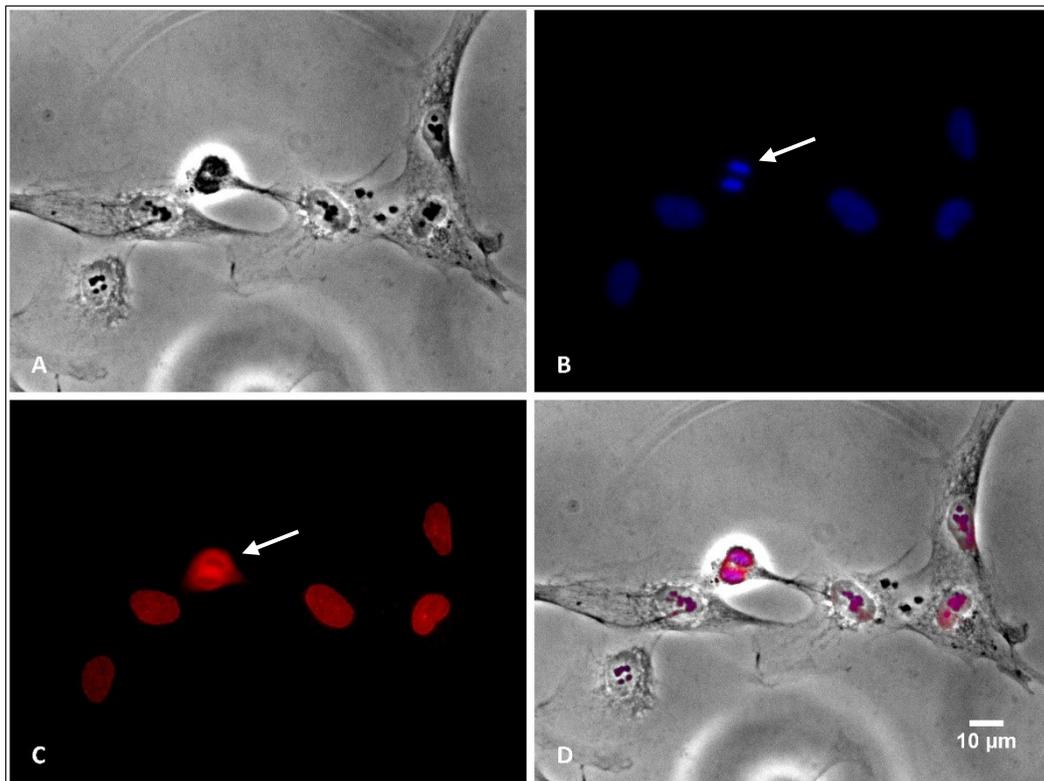


**ABBILDUNG 59: IMMUNFLUORESCENZ MIT DEM ANTIKÖRPER MAB414 GEGEN PROTEINE DER KERNPorenKOMPLEXE AUF DIE ERKRANKTEN MYOBLASTEN FSHD10 #6**

Die FSHD-Myoblasten FSHD10 #6 weisen homogen verteilte Fluoreszenz-Signale im Zellkern auf. Ein leicht atypisch geformter Zellkern ist mit einem weißen Pfeil markiert. Der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst wurde zur DNA-Lokalisation verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Mab414; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Bei den Kontrollzellen 19951 #16 ist eine homogene Verteilung der roten Signale und damit der Kernporen in der Kernhülle festzustellen (siehe Abbildung 60 C). Die stärker rot bzw. blau fluoreszierenden Bereiche (siehe Pfeile in Abbildung 60 B und C) zeigen die Telophase einer Kernteilung bis beginnende Zytokinese.

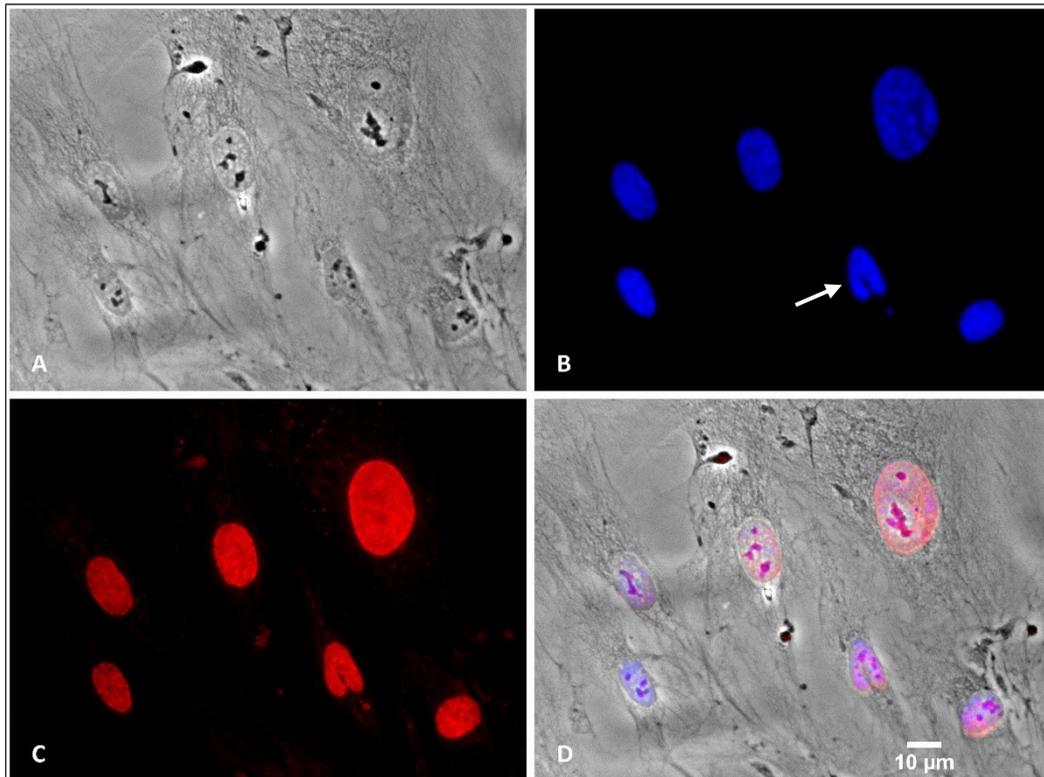


**ABBILDUNG 60: IMMUNFLUORESCENZ MIT DEM ANTIKÖRPER MAB414 GEGEN PROTEINE DER KERNPorenKOMPLEXE AUF DIE GESUNDEN MYOBLASTEN 19951 #16**

Die Kontroll-Myoblasten 19951 #16 weisen eine homogene Verteilung der Fluoreszenz-Signale im Zellkern auf. Weiße Pfeile kennzeichnen die Telophase einer Kernteilung bis beginnende Zytokinese. Der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst wurde zur DNA-Lokalisation verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Mab414; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Die FSHD-Myoblasten FSHD10 zeigen in Passage 16 eine gleichmäßige Verteilung der Kernporen. In Abbildung 61 C ist diese durch das homogene Auftreten der punktförmigen roten Fluoreszenz-Signale im Bereich der Zellkerne erkennbar. In der Hoechst-Färbung (siehe Abbildung 61 B), sind nahe beieinanderliegende Zellkerne mit einem Pfeil markiert.



**ABBILDUNG 61: IMMUNFLUORESCENZ MIT DEM ANTIKÖRPER MAB414 GEGEN PROTEINE DER KERNPorenKOMPLEXE AUF DIE ERKRANKTEN MYOBLASTEN FSHD10 #16**

Bei den FSHD-Myoblasten FSHD10 in Passage 16 zeigt sich eine homogene Verteilung der Fluoreszenz-Signale im Zellkern. Nahe beieinanderliegende Zellkerne sind durch einen weißen Pfeil gekennzeichnet. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** Mab414; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Bei den Untersuchungen der Myoblasten mit dem Primärantikörper Mab414 und dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper Anti-Maus Texas-red sind keine Unterschiede in der Signalgebung zwischen den FSHD-Myoblasten und den Kontroll-Myoblasten festzustellen. Die Kernporen weisen keine Veränderungen bezüglich ihres Vorkommens und ihrer Verteilung auf. Dies ist durch die rote Pünktchenfluoreszenz an den Nucleoporinen mit FXFG-Motiv nachweisbar. Zwischen den einzelnen Passagen sind keine Unterschiede erkennbar. Sowohl in der Hoechst-Färbung, als auch bei Mab414 und Anti-Maus Texas-red fallen bei den erkrankten Myoblasten leichte Atypien der Zellkernform mit Ausstülpungen auf.

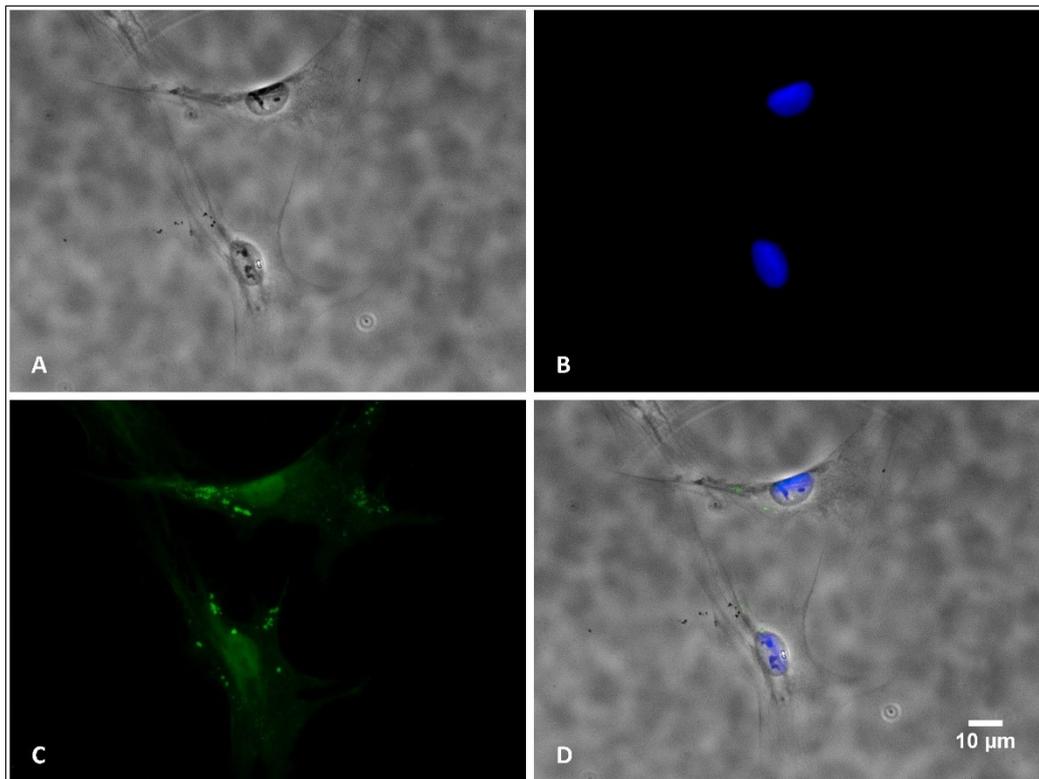
### 4.2.3 NACHWEIS UND VERTEILUNG VON ANT1 UND ANT2

Wie in früheren Studien bereits festgestellt wurde, weisen Mitochondrien von FSHD-Patienten morphologische Veränderungen und Dysfunktionen auf, wodurch die Muskulatur funktionell beeinträchtigt ist (Turki et al., 2012). Daher werden neben der Kernhülle auch die Mitochondrien fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Mit dem Antikörper ANT1/2, der an den Adenin-Nukleotid-Translokator der inneren Mitochondrienmembran bindet, wird das Vorhandensein, die Anordnung und die Verteilung der Mitochondrien fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Da als Zweitantikörper der grün fluoreszierende Antikörper Alexa Fluor® 488 Anti-Ziege verwendet wird, erscheinen der ANT und damit auch die Mitochondrien unter dem Fluoreszenzmikroskop als grüne Signale.

Es werden die Zelllinien NO44, MO54, 19951 und FSHD10 jeweils in Passage 16 (#16) untersucht.

Die Kontroll-Myoblasten NO44 in Passage 16 zeigen deutliche Fluoreszenz-Signale im Zytoplasma (siehe Abbildung 62 C). Diese entsprechen den Mitochondrien. Es scheint, dass diese in einigen Zellteilen gehäuft und in Ansammlungen, sogenannten Clustern, auftreten und in anderen Arealen fehlen.

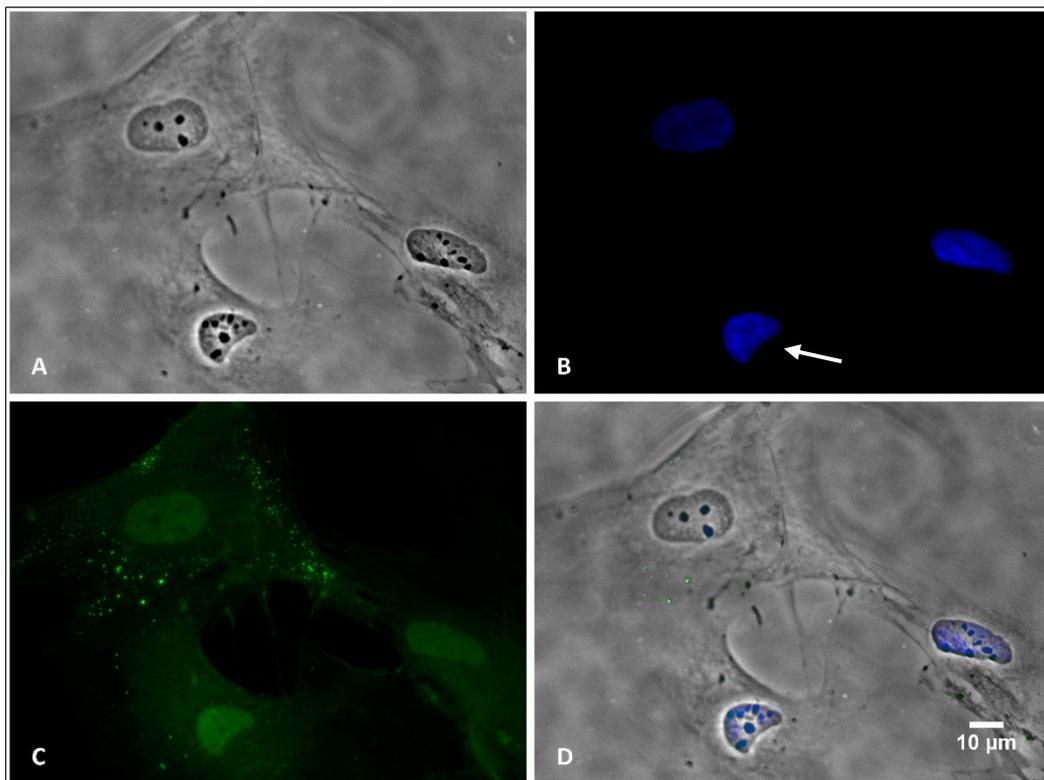


**ABBILDUNG 62: LOKALISATION VON ANT1 UND ANT2 DER MITOCHONDRIEN DURCH IMMUNFLUORESCENZ AUF DIE GESUNDEN MYOBLASTEN NO44 #16**

Bei der Kontrolle NO44 #16 sind deutliche Ansammlungen von Fluoreszenz-Signalen im Zytoplasma erkennbar. Daneben liegen Bereiche ohne Signalgebung vor. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** ANT1/2; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Bei den FSHD-Myoblasten MO54 in Passage 16 finden sich Zellen mit vielen, deutlichen grünen Signalen im Zytoplasma, aber auch Myoblasten bei denen diese fehlen (siehe Abbildung 63 C). In den Myoblasten, in denen die Mitochondrien deutlich nachweisbar sind, ist erneut die scheinbare Konzentration auf einzelne Stellen innerhalb der Zelle auffällig. Der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst färbt die DNA blau und macht die Zellkerne sichtbar. Dabei ist ein leicht unregelmäßig geformter Kern zu erkennen (siehe Pfeil in Abbildung 63 B).

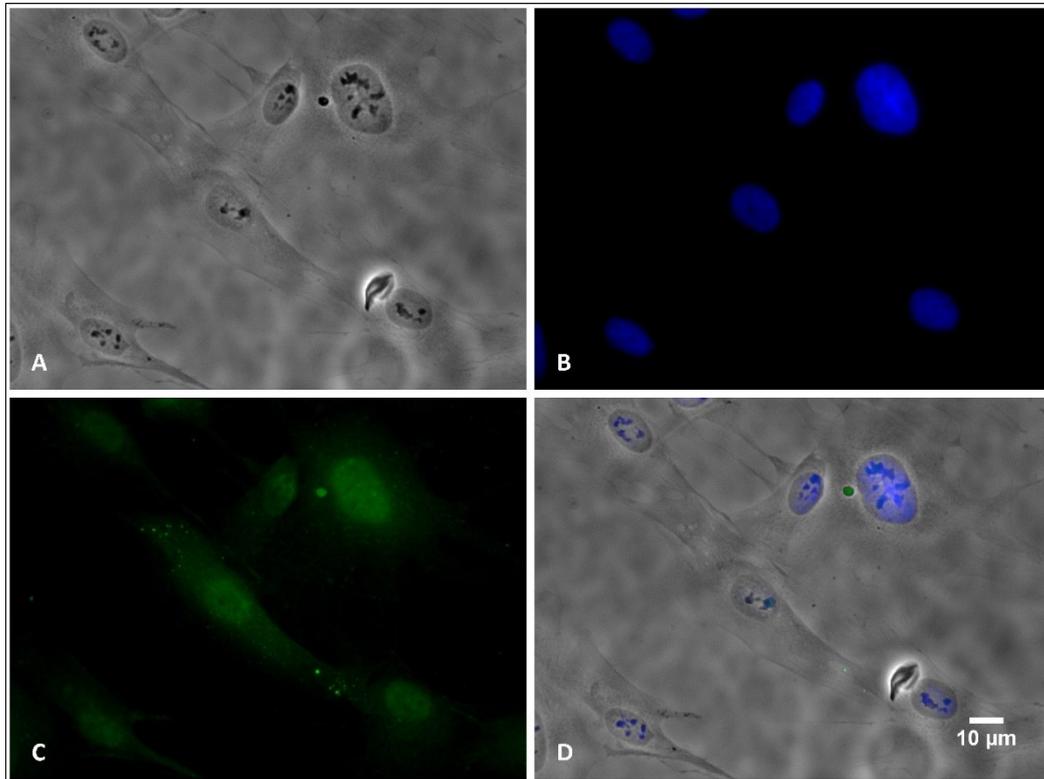


**ABBILDUNG 63: LOKALISATION VON ANT1 UND ANT2 DER MITOCHONDRIEN DURCH IMMUNFLUORESCENZ AUF DIE FSHD-MYOBLASTEN MO54 #16**

Im Zytoplasma der erkrankten Myoblasten MO54 in Passage 16 sind grüne Fluoreszenz-Signale nachweisbar. Diese treten als Ansammlungen auf. Weiterhin sind Myoblasten ohne Signale gezeigt. Ein leicht atypisch geformter Zellkern ist durch einen weißen Pfeil gekennzeichnet. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** ANT1/2; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Die gesunden Myoblasten 19951 in Passage 16 stellen sich insgesamt sehr signalarm dar. Neben einzelnen Zellen mit grünen Punkten im Zytoplasma zeigt sich der Großteil der Myoblasten ohne Signale (siehe Abbildung 64 C).

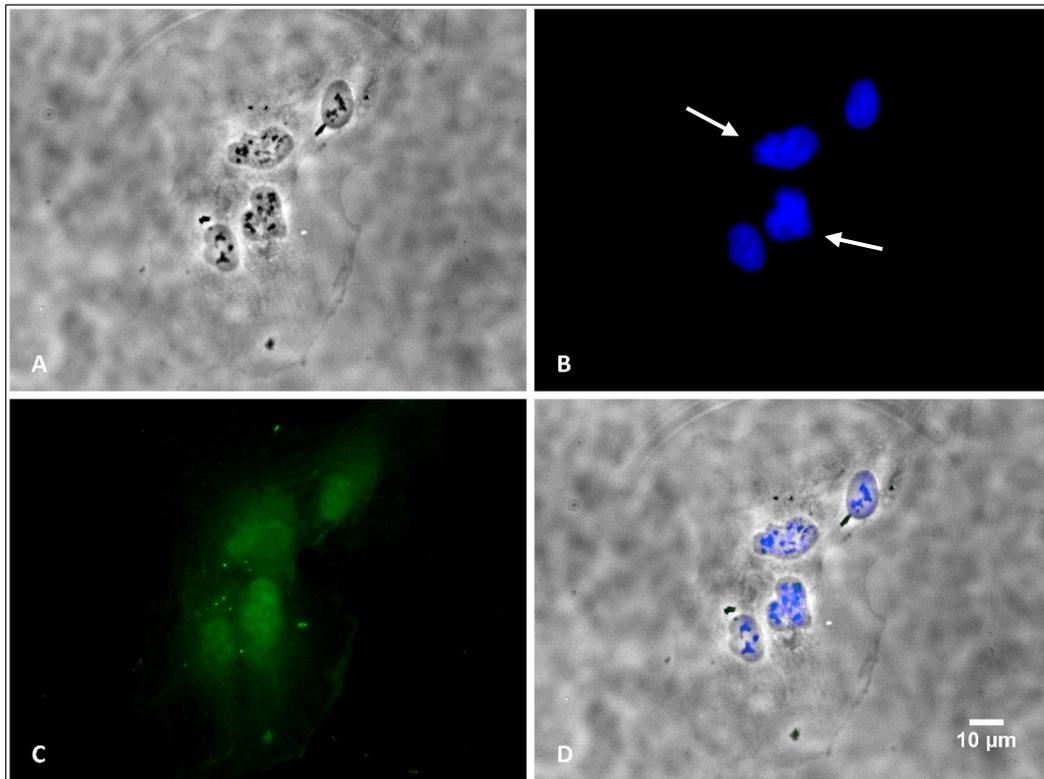


**ABBILDUNG 64: LOKALISATION VON ANT1 UND ANT2 DER MITOCHONDRIEN DURCH IMMUNFLUORESCENZ AUF DIE KONTROLLZELLEN 19951 #16**

Die gesunden Myoblasten 19951 in Passage 16 weisen wenige Fluoreszenz-Signale im Zytoplasma auf. Weiterhin sind Myoblasten ohne Signale zu erkennen. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** ANT1/2; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Bei den erkrankten Myoblasten FSHD10 #16, die in Abbildung 65 dargestellt sind, sind einzelne Signale und damit Mitochondrien im Zytoplasma zu detektieren. Daneben weisen andere Zellen keine Fluoreszenz im Zytoplasma auf. In der Hoechst-Färbung sind nahe nebeneinanderliegende Zellkerne zu erkennen (siehe Pfeile in Abbildung 65 B).



**ABBILDUNG 65: LOKALISATION VON ANT1 UND ANT2 DER MITOCHONDRIEN DURCH IMMUNFLUORESCENZ AUF DIE ERKRANKTEN MYOBLASTEN FSHD10 #16**

Die FSHD-Myoblasten FSHD10 #16 weisen vereinzelt Fluoreszenz-Signale im Zytoplasma auf. Daneben sind Myoblasten ohne Signale gezeigt. Nahe beieinanderliegende Zellkerne sind durch weiße Pfeile markiert. Zur DNA-Lokalisation wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst verwendet.

**A:** Phasenkontrast; **B:** Hoechst; **C:** ANT1/2; **D:** Überlagerung von **A**, **B** und **C**.

Insgesamt scheinen bei NO44 #16 und MO54 #16 im Vergleich zu 19951 #16 und FSHD10 #16 deutlich mehr Myoblasten mit Fluoreszenz-Signalen und damit Mitochondrien im Zytoplasma und auch mehr Signale pro Zelle nachweisbar zu sein. Auffällig ist die scheinbare Konzentration der Signale auf einzelne Stellen innerhalb der Zelle.

Die erkrankten Myoblasten MO54 #16 enthalten einen leicht atypisch geformten Zellkern.

## 5 DISKUSSION

Bei der EDMD wurden bereits in früheren Studien Auffälligkeiten der Kernhülle festgestellt (Reichart et al., 2004; Sabatelli et al., 2001). FSHD (siehe 1.5.2) und EDMD (Bonne et al., 1999) besitzen zwar unterschiedliche genetische Ursachen, aber phänotypisch finden sich Ähnlichkeiten in der Ausprägung der Erkrankungen (siehe 1.5.1 und (Emery, 1989)).

Außerdem konnten in anderen Untersuchungen morphologische Veränderungen und Dysfunktionen der Mitochondrien von FSHD-Patienten festgestellt werden, wodurch die Muskulatur funktionell beeinträchtigt ist (Turki et al., 2012).

Daher wurden morphologische Untersuchungen an Myoblasten von Patienten, die an facioscapulohumeraler Muskeldystrophie leiden, durchgeführt und mit gesunden Kontrollzellen verglichen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf den Verlauf der Kernhülle und die Gestalt der Mitochondrien gelegt.

In der Elektronenmikroskopie standen zwei Fixierungsmethoden zur Verfügung, die hinsichtlich ihrer Eignung und ihrer Vor- und Nachteile für morphologische Untersuchungen an Myoblasten verglichen wurden: die konventionelle, chemische Fixierung und Flach-einbettung von Kulturzellen auf Deckgläschen und das Hochdruckgefrieren mit anschließender Gefriersubstitution.

Weiterhin wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz das Vorliegen und die Verteilung von Lamin A/C in der Lamina, von ANT1/2 in den Mitochondrien und von Nukleoporinen mit FXFG-Motiv, die die Kernporen detektieren, untersucht und mit den Kontrollzellen verglichen.

Bei allen Versuchen wurden die entsprechenden Patientenzellen und die Kontrollzellen in verschiedenen Passagen verwendet. Hierbei stellte sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Passage und der Häufigkeit des Auftretens von Abweichungen, Besonderheiten oder Unregelmäßigkeiten besteht.

Da bei FSHD unterschiedliche Muskelareale betroffen sind (siehe 1.5.1) und die Schwere der genetischen Schädigung eine Rolle für die Ausprägung der Erkrankung zu spielen scheint (siehe 1.5.2), wurden drei verschiedene Zelllinien für die Untersuchungen verwendet. Diese unterscheiden sich hinsichtlich des Patientenalters und -geschlechts, der Entnahmestelle des Gewebes und der Anzahl an DZ4Z-Wiederholungen. Es stellt sich die Frage, ob die genannten Faktoren einen Einfluss auf die Morphologie der untersuchten Myoblasten haben, oder ob keine signifikanten Unterschiede festzustellen sind.

## 5.1 ELEKTRONENMIKROSKOPIE

### 5.1.1 KONVENTIONELLE FIXIERUNG: VERÄNDERTE KERNHÜLLE UND MITOCHONDRIEN

Die nach konventioneller Methode fixierten gesunden Myoblasten NO44, NO45 und 19951 zeigen deutlich weniger Auffälligkeiten als die Myoblasten MO54, MO37 und FSHD10 von FSHD-Patienten (siehe 4.1.1).

Innere und äußere Kernmembran verlaufen bei den Kontrollzellen meist parallel und die Mitochondrien weisen mehr Cristae auf als diejenigen der erkrankten Zellen. Es treten zwar auch leicht unregelmäßig verlaufende Abschnitte der Kernhülle und teilweise atypisch geformte, verzweigte oder vergrößerte Mitochondrien auf, jedoch viel seltener als bei den FSHD-Myoblasten. Es zeigt sich, dass die Häufigkeit des Auftretens von Auffälligkeiten mit der Höhe der Passage korreliert. Je höher die Passage, desto häufiger sind Atypien.

Die Begründung dieser Erkenntnis kann in der Herkunft der Myoblasten liegen. Es handelt sich dabei um Primärzellen, die während der Kultivierung aufgrund einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress altersabhängige Strukturveränderungen und Seneszenzprozesse zeigen. Es kann dabei zur Schädigung von Proteinen, Lipiden und der DNA kommen (Cantuti-Castelvetri et al., 2000; Schmitz, 2011). Diese Veränderungen und Alterungsprozesse resultieren damit vermutlich in dem verstärkten Auftreten von Unregelmäßigkeiten in den höheren Passagen.

Neben dem Einfluss der Passage auf morphologische Veränderungen, sind auch zwischen den verwendeten Zelllinien Unterschiede erkennbar. NO45 zeigt mehr Unregelmäßigkeiten als 19951 und 19951 ist diesbezüglich auffälliger als NO44.

Eine Erklärung für die oben genannte Abstufung könnte die Entnahmestelle der Myoblasten sein. NO44 und NO45 stammen aus dem Musculus quadriceps femoris und 19951 wurde aus dem Musculus deltoideus entnommen. Allerdings wäre dann zu erwarten, dass NO44 und NO45 ähnliche Ergebnisse liefern. Weiterhin könnten auch das Geschlecht und das Alter der Probanden eine Rolle spielen. NO44 stammt von einem 29-jährigen Mann, NO45 wurde einer 45 Jahre alten weiblichen Person entnommen und 19951 kommt von einem Mann, der 30 Jahre alt ist.

Um diese Auffälligkeiten weiter zu untersuchen, müssten Versuche mit bezüglich Alter, Geschlecht und Entnahmestelle einheitlichem Probandengut durchgeführt werden.

Bei den konventionell fixierten kranken Myoblasten sind vergrößerte Mitochondrien, die nur wenige Cristae aufweisen, und somit leer erscheinen, zu erkennen.

Die äußere Kernmembran verläuft unregelmäßig und gewellt und der Abstand zwischen ONM und INM ist vergrößert und zeigt eine große Variationsbreite.

Dies deutet darauf hin, dass die gegenseitige Verankerung zwischen innerer und äußerer Kernmembran gestört ist. Hier sollten sich weitere Untersuchungen verschiedener Proteine der Kernhülle anschließen.

Die genannten Veränderungen von Kernhülle und Mitochondrien der erkrankten Myoblasten könnten auch in Zusammenhang mit der Sensitivität gegenüber oxidativem Stress stehen. In früheren Studien wurden bereits durch oxidativen Stress bedingte Veränderungen der Mitochondrien-Morphologie beschrieben (Jendrach et al., 2008). Weiterhin wird angenommen, dass Zellen mit hoher DUX4-Expression, wie sie die FSHD-Myoblasten zeigen, weniger Pufferkapazität für das Abpuffern von oxidativem Stress besitzen (Bosnakovski et al., 2008). Außerdem reagieren FSHD-Myoblasten empfindlicher auf oxidativen Stress als Kontrollzellen (Winokur et al., 2003). Daneben zeigt sich bei FSHD-Patienten eine Erhöhung der Marker für oxidativen Stress sowie eine veränderte Expression von Antioxidantien (Turki et al., 2012).

Die deutlichsten Atypien bei den FSHD-Myoblasten weist FSHD10 auf. Diese stammen aus dem Musculus trapezius eines 30-jährigen männlichen Patienten. Da dieser Muskel zum Schultergürtel gehört, welcher bereits im Anfangsstadium der Erkrankung betroffen ist (siehe 1.5.1), könnte darin die Begründung für die oben genannten signifikantesten Auffälligkeiten liegen.

Bei Betrachtung des Heterochromatins fiel auf, dass dieses bei den erkrankten Myoblasten MO37 in den Passagen 6 und 16 im Vergleich zur Kontrolle NO45 scheinbar in größerer Menge an der Kernhülle verteilt ist. Bei den anderen Zelllinien NO44 und MO54 sowie 19951 und FSHD10 konnten diesbezüglich jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die die MO37- und NO45-Myoblasten liefern, liegt die Vermutung nahe, dass in den Myoblasten, die von FSHD-Patienten stammen, mehr DNA transkribiert werden könnte als bei den Kontroll-Myoblasten und somit eigentlich weniger Heterochromatin an der Kernhülle der FSHD-Myoblasten vorhanden sein müsste. Dies kann mit den genetischen Ursachen von FSHD (siehe 1.5.2) in Verbindung gebracht werden. Durch die Überexpression von u.a. DUX4c (Anseau et al., 2009) werden weitere Transkriptions-Kaskaden in Gang gesetzt. Somit wird in den von FSHD betroffenen Myoblasten mehr DNA abgelesen, was eine geringere Menge an Heterochromatin bedingen könnte.

Um eine gezielte Bestimmung der Verteilung des Heterochromatins vornehmen zu können, sollten sich Untersuchungen mit spezifischen Markern anschließen. Hierbei können sowohl qualitative als auch quantitative Messungen interessant sein.

### 5.1.2 AUFFÄLLIGKEITEN AN KERNHÜLLE UND MITOCHONDRIEN BEI HPF-FIXIERTEN MYOBLASTEN

Die HPF-fixierten Kontrollzellen NO44, NO45 und 19951 enthalten größtenteils typisch geformte Mitochondrien mit Cristae. Daneben zeigen sich vereinzelt sehr große und lange Mitochondrien und Bereiche mit wenigen Cristae. Am auffälligsten hierbei sind die NO44-Myoblasten. Die Kernmembranen verlaufen parallel und meist in gleichem Abstand, wobei teilweise auch leicht unregelmäßige Abschnitte erkennbar sind. Diesbezüglich weisen die NO45-Zellen mehr Atypien auf als 19951 und diese wiederum sind auffälliger als NO44. Diese Abstufung korreliert mit den Ergebnissen aus der konventionellen Fixierung (siehe 4.1.1) und wird in 5.1.1 diskutiert.

Bei den nach der Hochdruckgefrier-Methode fixierten erkrankten Myoblasten MO54, MO37 und FSHD10 treten sowohl in Passage 6, als auch in Passage 16 große, verzweigte Mitochondrien mit atypischer Form auf, die wenige Cristae enthalten. INM und ONM weisen neben unregelmäßig verlaufenden Stellen mit variierender Breite des Inter-membranraums erstaunlich viele parallele Abschnitte mit gleichmäßigen Abständen auf. Wie in 5.1.1 bereits angeführt, sollte hierzu getestet werden, ob diese gestörte Verbindung zwischen innerer und äußerer Kernmembran auf Veränderungen von Membranproteinen zurückzuführen ist.

Der mögliche Zusammenhang zwischen den beschriebenen Veränderung von Kernhülle und Mitochondrien der erkrankten Myoblasten und der erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativem Stress wurde bereits in 5.1.1 beschrieben.

Außer bei NO44 #16 und bei FSHD10 #16 scheinen die HPF-fixierten Myoblasten in Passage 16 sowohl bei den gesunden, als auch bei den erkrankten Zellen mehr Heterochromatin im Bereich der INM aufzuweisen als die Myoblasten der Passage 6.

Auch diese Auffälligkeit könnte in Zusammenhang mit der reduzierten Toleranz der Myoblasten gegenüber oxidativem Stress stehen. Als Primärzellen zeigen Myoblasten während der Kultivierung allgemein altersabhängige Strukturveränderungen und Seneszenzprozesse, wobei es zur Schädigung von Proteinen, Lipiden und auch der DNA kommen

kann (Cantuti-Castelvetri et al., 2000; Schmitz, 2011). Wenn eine DNA-Schädigung vorliegt, könnte eine erniedrigte Transkriptionsrate die Folge sein, was wiederum in der erhöhten Menge an Heterochromatin in höheren Passagen resultieren könnte. Wie in 5.1.1 bereits aufgeführt wurde, sollten sich hierzu weitere Untersuchungen des Heterochromatins anschließen.

In der Übersichtsaufnahme von MO37 #6 mit reduzierter Bildqualität weist die Kernhülle einen sehr auffälligen, stark gezackten Verlauf auf (siehe Abbildung 22). Dies kann auf die Fixierung zurückzuführen sein. Außerdem ist auch eine ungünstige Wahl der Schnittebene denkbar.

### 5.1.3 HPF UND KONVENTIONELLE FIXIERUNG: UNTERSCHIEDE UND GEMEINSAMKEITEN

Die Feinstrukturen und das Zytoskelett werden bei der konventionellen Fixierung klarer und kontrastreicher dargestellt, da durch die vielen Waschschriffe (siehe 3.2.1 und 3.2.2) vermehrt locker gebundene Proteine und Lipide aus der Probe extrahiert werden.

Für die Untersuchung der Kernmembranen haben beide Methoden (siehe 4.1.3) Vor- und Nachteile. Sowohl bei der konventionellen Fixierung, als auch nach dem Hochdruckgefrieren werden ONM und INM meist sehr schön und deutlich sichtbar. Stellenweise werden die Kernmembranen aber auch unscharf abgebildet und sind schlecht erkenn- und beurteilbar. Dies tritt bei beiden Fixierungsmethoden gleichermaßen auf. Der Abstand zwischen innerer und äußerer Kernmembran wird jedoch nach der HPF-Fixierung schärfer abgebildet.

Bei Betrachtung der Kernhüllen fallen einerseits Abweichungen zwischen gesunden und kranken Zellen auf, andererseits zeigen sich auch zwischen den konventionell und HPF-fixierten FSHD-Myoblasten Unterschiede.

Die gesunden Myoblasten weisen nach beiden Fixierungs-Techniken einen parallelen Verlauf von innerer und äußerer Kernmembran auf. Vereinzelt sind vor allem bei den konventionell fixierten Kontrollzellen leicht unregelmäßige Abschnitte erkennbar (siehe 4.1.3).

Nach konventioneller Fixierung kann ein gewellter Verlauf der äußeren Kernmembran von erkrankten Myoblasten beobachtet werden. Abschnittsweise entsteht der Eindruck, dass Membranteile der ONM abgeschnürt werden (siehe Abbildung 15), was als Ausbildung von blebs bezeichnet wird.

Außerdem treten bei den konventionell fixierten Myoblasten von FSHD-Patienten Inaginationen, also gemeinsame Einstülpungen von INM und ONM in Richtung Kerninneres, auf (siehe Abbildung 17). Diese werden vermutlich durch die Schnittebene hervorgerufen.

Die genannten Auffälligkeiten sind bei den erkrankten Myoblasten nach Hochdruckgefrierung nicht zu erkennen. Zwar verlaufen innere und äußere Kernmembran teilweise leicht gewellt und in unterschiedlichem Abstand voneinander, jedoch verhalten sie sich dabei immer auffallend parallel zueinander.

Bei der Darstellung der Mitochondrien zeigen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach dem Hochdruckgefrieren und der Gefriersubstitution (siehe 4.1.2) bessere Ergebnisse. Die Membranen der Mitochondrien werden hierbei deutlich schärfer abgebildet. Hinsichtlich der Mitochondrien-Morphologie korrelieren konventionelle und HPF-Fixierung. Atypisch geformte, verzweigte und vergrößerte Mitochondrien treten bei beiden Fixierungsmethoden vor allem bei den erkrankten Myoblasten auf. Häufig zeigen sie dabei eine reduzierte Cristae-Zahl. Die Kontrollzellen weisen größtenteils typisch geformte Mitochondrien mit Cristae auf.

Die Kernporen sind bei beiden Fixierungsmethoden gut erkennbar.

Beim Vergleich zwischen HPF-fixierten Myoblasten und den Myoblasten, die konventionell fixiert wurden, fällt ein Unterschied bei der Betrachtung des Heterochromatins auf. Bei der konventionellen Fixierung scheint das Heterochromatin insgesamt deutlicher erkennbar und schärfer abgrenzbar zu sein als bei den HPF-fixierten Myoblasten. Weiterhin stellen sich die konventionell fixierten Myoblasten kontrastreicher dar.

Alle genannten Auffälligkeiten können auf die unterschiedliche Methodik zurückzuführen sein.

Im Gegensatz zur konventionellen Fixierung kann beim Hochdruckgefrieren der Einsatz quervernetzender Fixiermittel im Anfangsstadium der Proben-Stabilisierung vermieden werden, was die außerordentlich gute Konservierung von zellulären Details ermöglicht (Monaghan et al., 2003).

Da die vernetzenden Fixantien Zeit brauchen, um die Probe zu durchdringen und Quervernetzungen auszubilden, werden nicht alle Zellbestandteile gleichzeitig erreicht und fixiert. Dies führt dazu, dass diese als Unregelmäßigkeiten sichtbar werden. Um biologische Proben möglichst nahe am lebenden Zustand zu konservieren, sollten deshalb alle Zellbestandteile gleichzeitig fixiert werden. Hierbei liegen deutliche Vorteile auf Seiten der Hochdruckgefrierung (Bullen et al., 2014; Gilkey and Staehelin, 1986).

Durch den hohen Druck, der im Rahmen des Gefriervorgangs aufgebaut wird, wird die Ausdehnung des Wassers beim Gefrieren unterbunden und die Kristallbildung indirekt verhindert (Mulisch et al., 2015; Weimer, 2006). Zellstrukturen können so in ihrem natürlichen Zustand erhalten werden. Weiterhin bleibt die Protein-Antigenität durch die Gefriersubstitution und Einbettung gewahrt (Weimer, 2006).

Die Qualität des Strukturerhalts, der bei der HPF erreicht wird, ist allen anderen Verfahren überlegen (Weimer, 2006). Diese allgemeine Aussage kann nicht vollständig auf die Untersuchungen an den Myoblasten übertragen werden. Für die Darstellung der Mitochondrien eignet sich das Verfahren der Hochdruckgefrierung sehr gut. Bei Betrachtung von Kernporen und Kernhülle zeigen beide Fixierungsmethoden Vor- und Nachteile.

#### 5.1.4 GEHÄUFTES AUFTRETEN VON MORPHOLOGISCHEN ATYPIEN IN HÖHEREN PASSAGEN

In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen fällt auf, dass die Unregelmäßigkeiten in den höheren Passagen 11 und vor allem 16 häufiger und deutlicher auftreten als in Passage 6. Diese Tatsache lässt sich einerseits durch die enorme Zahl an Umsetzungsschritten und andererseits durch das häufige Auftauen und Einfrieren der Kulturzellen begründen. Hier sollten sich weiter Versuche anschließen, in denen auf das zwischenzeitliche Einfrieren und Auftauen verzichtet wird.

Eine weitere Erklärung für die Häufung der Auffälligkeiten in höheren Passagen sind zelluläre Seneszenzprozesse und ein dadurch eingeschränktes Zellteilungspotential. Durch diese Alterungsvorgänge kommt es zur Zelldegeneration (Schmitz, 2011). Weiterhin zeigt sich im Rahmen der Alterungsprozesse eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress, wobei es dadurch zur Schädigung von Proteinen, Lipiden und der DNA kommen kann (Cantuti-Castelvetri et al., 2000).

## 5.2 INDIREKTE IMMUNFLUORESZENZ

### 5.2.1 KEINE AUFFÄLLIGKEITEN IN DER VERTEILUNG VON LAMIN A/C

In vorangegangenen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten Myoblasten von EDMD-Patienten ein deutlich reduziertes LaminA/C-Signal (Reichart et al., 2004). Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeit von FSHD und EDMD war zu erwarten, dass Lamin A/C auch bei den FSHD-Myoblasten reduziert ist oder Auffälligkeiten in der Verteilung aufweist.

Es kann jedoch festgestellt werden, dass die Lamine A und C sowohl bei den Myoblasten der FSHD-Patienten, als auch bei den Kontrollzellen nachweisbar sind (siehe 4.2.1). Hinsichtlich ihrer Verteilung sind keine Unterschiede zu beobachten. Betrachtet man die einzelnen Passagen der untersuchten Myoblasten, so sind die Lamine A und C in der niedrigen Passage 6 und in der hohen Passage 16 nachweisbar und gleichmäßig verteilt. Obwohl die Lamine A und C in den erkrankten Myoblasten vorhanden sind, könnten sie aber in veränderter Form vorliegen. Dazu sollten weitere Versuche durchgeführt werden, in denen beispielsweise Funktionsweise und Bindungseigenschaften untersucht werden.

### 5.2.2 HOMOGENE VERTEILUNG DER KERNPOREN

Frühere Untersuchungen der Kernporen von EDMD-Myoblasten (Sabatelli et al., 2001) zeigten eine unregelmäßige Verteilung der Kernporen. Weiterhin konnten diese an einigen Kernhüllen-Abschnitten nur selten detektiert werden. Da EDMD und FSHD phänotypische Ähnlichkeiten aufweisen, wurden auch bei den FSHD-Myoblasten Auffälligkeiten der Kernporen vermutet.

Diese Annahme kann bei den Untersuchungen der Myoblasten von FSHD-Patienten mit dem Primärantikörper Mab414 und dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper Anti-Maus Texas-red widerlegt werden. Es sind keine Unterschiede in der Signalgebung

zwischen den FSHD-Myoblasten und der Kontrolle festzustellen (siehe 4.2.2). Die Kernporen weisen keine Veränderungen bezüglich ihres Vorkommens und ihrer Verteilung auf. Zwischen den einzelnen Passagen sind keine Unterschiede erkennbar.

Obwohl die Kernporen in FSHD-Myoblasten gleichmäßig verteilt vorliegen, könnten sie funktionelle Beeinträchtigungen aufweisen. Hier könnte daher die Überprüfung der Funktion der Kernporen in weiteren Versuchen interessant sein.

### 5.2.3 ANT1/2: MEHR SIGNALE BEI NO44 UND MO54

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Mitochondrien mit dem Antikörper ANT1/2 scheinen NO44 #16 und MO54 #16 jeweils mehr Signale zu zeigen als 19951 #16 und FSHD10 #16 (siehe 4.2.3).

Weiterhin fällt die Konzentration der Signale auf einzelne Zellteile auf. Diese Anreicherung der Mitochondrien wurde bereits in der Literatur beschrieben und wird als Mitochondrien-Cluster bezeichnet (Bereiter-Hahn, 1990; Bereiter-Hahn et al., 1990).

Die Ursache für die Unterschiede in der Signalstärke und -menge könnte im Schweregrad der Erkrankung liegen, wobei ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der genetischen Schädigung und der Schwere der Erkrankung beschrieben wurde (Gabellini et al., 2002). In anderen Untersuchungen konnten morphologische Veränderungen und Dysfunktionen der Mitochondrien von FSHD-Patienten festgestellt werden (Turki et al., 2012). Verknüpft man diese Ergebnisse, kann man zu dem Schluss kommen, dass der Schweregrad der Erkrankung mit dem Ausmaß der Mitochondrien-Veränderungen in Zusammenhang steht. Da MO54 (4u) und FSHD10 (5u) aber eine ähnliche Anzahl an D4Z4-Wiederholungen aufweisen (siehe 2.1), kann die oben genannte Vermutung in diesem Fall nicht bestätigt werden.

Weiterhin könnte die Entnahmestelle der Muskelbiopsie eine Rolle spielen. NO44 und MO54 wurden aus dem Musculus quadriceps femoris gewonnen und 19951 (Musculus deltoideus) und FSHD10 (Musculus trapezius) aus der Muskulatur des Schultergürtels. Da die Schultergürtel-Muskeln bereits im Anfangsstadium der Erkrankung betroffen

sind (siehe 1.5.1), könnte darin die Begründung für die scheinbar verminderte Mitochondrien-Zahl liegen.

Auch ein Zusammenhang mit der Art der entnommenen Probe ist denkbar. So enthalten schnell zuckende Muskelfasern weniger Mitochondrien als langsam zuckende Muskelfasern (Schünke et al., 2014).

Weiterhin können die Größe der Mitochondrien und die Cristae-Zahl eine Rolle spielen. Es ist anzunehmen, dass ein größeres Mitochondrium mit vielen Faltungen und einer dadurch vergrößerten Oberfläche mehr ANT-Proteine besitzt und somit mehr Antikörper binden können, was in einer vergleichsweise intensiveren Färbung resultiert.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Signalgebung könnte in der verminderten Produktion von ANT in den FSHD10- und 19951-Myoblasten begründet sein. Wenn trotz ähnlicher Mitochondrien-Zahl weniger ANT vorhanden ist, können weniger Antikörper binden. Dies zeigt sich dann in einer geringeren Fluoreszenz-Färbung und es scheinen daher weniger Mitochondrien vorhanden zu sein.

Denkbar ist auch, dass die ANT-Proteine von FSHD10 #16 und 19951 #16 nicht für den Antikörper zugänglich sind. Dieser kann somit nicht binden und die Mitochondrien unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar machen.

Es ist außerdem zu berücksichtigen, dass die Myoblasten in der hohen Passage 16 verwendet wurden. Dabei handelt es sich um Primärzellen, die während der Kultivierung aufgrund einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress altersabhängige Strukturveränderungen und Seneszenzprozesse zeigen. Schäden an Proteinen, Lipiden und der DNA können die Folge sein (Cantuti-Castelvetri et al., 2000; Schmitz, 2011).

Diese Alterungsprozesse könnten die reduzierte Mitochondrien-Zahl bei 19951 #16 und FSHD10 #16 bedingen oder den Adenin-Nukleotid-Translokator so verändern, dass der Antikörper ANT1/2 nicht mehr binden kann. Fraglich ist jedoch, warum NO44 und MO54, die auch in Passage 16 verwendet wurden, keine Alterungs-Erscheinungen in Form der verringerten Anzahl an Mitochondrien oder veränderten Bindungseigenschaften zeigen.

Für weitere Untersuchungen sollten auch die FSHD-Myoblasten MO37 und die zugehörige Kontrolle NO45 betrachtet werden. Außerdem sollten alle Myoblasten auch in einer niedrigen Passage, z. B. Passage 6, verwendet und mit Passage 16 verglichen werden.

### 5.2.4 ATYPISCH GEFORMTE ZELLKERNE BEI FSHD-MYOBLASTEN

In allen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen fallen in der Hoechst-Färbung und auch bei Lamin A/C teilweise atypisch geformte Zellkerne mit Ausstülpungen bei den erkrankten Myoblasten auf.

Es könnte ein Zusammenhang zwischen den Zellkern-Atypien und der Sensitivität der Myoblasten gegenüber oxidativem Stress bestehen. Bei FSHD-Patienten zeigt sich eine Erhöhung der Marker für oxidativen Stress sowie eine veränderte Expression von Antioxidantien (Turki et al., 2012). Zellen mit hoher DUX4-Expression, wie sie die FSHD-Myoblasten zeigen, scheinen weniger Pufferkapazität für das Abpuffern von oxidativem Stress zu besitzen (Bosnakovski et al., 2008). Außerdem reagieren FSHD-Myoblasten empfindlicher auf oxidativen Stress als Kontrollzellen (Winokur et al., 2003). Somit könnten die unregelmäßigen Zellkernformen, die vor allem bei den FSHD-Myoblasten auffallen, durch die erhöhte Sensitivität und geringere Pufferkapazität der erkrankten Myoblasten gegenüber oxidativem Stress hervorgerufen werden.

Um die Auffälligkeiten der Zellkern-Form bei FSHD-Myoblasten mit einer anderen Methode zu überprüfen, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen der Zellkerne durchgeführt, welche in 5.3 diskutiert werden.

### 5.3 KEINE AUFFÄLLIGKEITEN DER ZELLKERNFORM

Da vor allem die erkrankten Myoblasten bei der indirekten Immunfluoreszenz teilweise atypisch geformte Zellkerne mit Ausstülpungen zeigten, wurden die Kerne auch unter dem Elektronenmikroskop auf Formabweichungen untersucht. Jedoch konnten keine signifikanten Auffälligkeiten nachgewiesen werden.

Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass bei der Immunfluoreszenz eine deutlich größere, mit Zellen bewachsene Fläche untersucht wird als bei der Elektronenmikroskopie, wo nur ein sehr kleiner Ausschnitt betrachtet werden kann. Einige Myoblasten – sowohl erkrankte als auch gesunde – weisen auch elektronenmikroskopisch Besonderheiten hinsichtlich der Zellkernform auf, was jedoch auf die Schnittebene zurückzuführen sein könnte. Bei der Probenpräparation für die Elektronenmikroskopie werden Ultradünnschnitte angefertigt und anschließend unter einem Transmissions-Elektronenmikroskop betrachtet. Im Gegensatz dazu unterbleibt bei der Methode der indirekten Immunfluoreszenz das Schneiden der Probe und die Zellen sind als Ganzes unter dem Fluoreszenzmikroskop zu sehen.

Um diesen Beobachtungen weiter nachzugehen, sollte das Auftreten der atypischen Formvariationen der Zellkerne mit verschiedenen Mikroskopie-Methoden u.a. quantitativ untersucht werden. Außerdem sollten die Myoblasten auch in einer höheren Passage und nach HPF-Fixierung für diese Versuche verwendet werden.

.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die autosomal-dominant vererbte facioscapulohumerale Muskeldystrophie (FSHD) ist mit einer Prävalenz von circa 1:20.000 die dritthäufigste Form der hereditären Myopathien (Padberg, 2004; Richards et al., 2012). Der Beginn der Beschwerdesymptomatik wird am häufigsten in der zweiten Lebensdekade beobachtet. Betroffen sind vor allem die Muskulatur des Gesichts („facio“) und der Schultern („scapulo“), die Oberarmmuskulatur („humeral“), die Fußhebermuskulatur und die Muskeln des Hüftgürtels. Charakteristischerweise treten die Muskelschwächen asymmetrisch auf. Daneben können auch andere Systeme des Körpers von der Erkrankung betroffen sein. Hierbei sind das Gehörorgan, die Augen und das Herz zu nennen (Lunt and Harper, 1991; Padberg, 2004; Padberg, 1982).

FSHD wird durch einen Gendefekt ausgelöst, der den langen Arm des Chromosoms vier (4q35) betrifft (Wijmenga et al., 1990; Wijmenga et al., 1991), wobei es zur teilweisen Deletion des polymorphen Abschnitts D4Z4, der für das Protein DUX4 codiert, kommt (Gabriels et al., 1999; van Deutekom et al., 1993). Dabei treten unter anderem Störungen in der DUX4-Expression, Veränderungen der myogenen Genexpression, eine Unterdrückung der Muskelzellendifferenzierung und eine Inhibition der Muskelbildung auf (Bosnakovski et al., 2008; Snider et al., 2009).

Bei einem kleinen Anteil der FSHD-Fälle (FSHD2) kann kein genetischer Zusammenhang mit dem Chromosom vier nachgewiesen werden (Gilbert et al., 1993).

FSHD und eine andere Form der Muskeldystrophie, die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD) (Bonne et al., 1999), zeigen trotz unterschiedlicher genetischer Ursachen phänotypisch Ähnlichkeiten in der Ausprägung der Erkrankungen (Emery, 1989). Bereits in früheren Studien zeigte die Kernhülle von EDMD-Myoblasten morphologische Auffälligkeiten (Reichart et al., 2004; Sabatelli et al., 2001).

In anderen Untersuchungen konnten morphologische Veränderungen der Mitochondrien von FSHD-Patienten festgestellt werden (Turki et al., 2012).

Daher wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen der Kernhülle und der Mito-

chondrien von FSHD-Myoblasten durchgeführt und mit der entsprechenden Kontrolle verglichen.

Hierfür wurden drei verschiedene Zelllinien-Paare in unterschiedlichen Passagen, das heißt unterschiedlicher Anzahl an Subkultivierungen, eingesetzt, wobei in den höheren Passagen vermehrt morphologische Atypien beobachtet werden konnten.

Die eingesetzten Zelllinien differenzieren sich durch verschiedene Parameter wie beispielsweise Alter und Geschlecht der Patienten. Dabei zeigten sich sowohl zwischen den Kontrollzellen als auch zwischen den FSHD-Myoblasten Unterschiede.

Im Rahmen der Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie kamen zwei verschiedene Fixierungsmethoden zum Einsatz: die konventionelle chemische Fixierung, Entwässerung und Flacheinbettung von Kulturzellen und die Hochdruckgefrierung mit anschließender Gefriersubstitution. In Bezug auf die Qualität des Strukturerhalts, die beim Hochdruckgefrieren erreicht wird, wird dieser Art der Fixierung eine Überlegenheit gegenüber allen anderen Verfahren zugeschrieben (Weimer, 2006). Diese allgemeine Aussage kann nicht vollständig auf die Untersuchungen an den Myoblasten übertragen werden.

Für die Untersuchung der Kernmembranen sind beide Methoden geeignet, wobei der Abstand zwischen innerer und äußerer Kernmembran nach der HPF-Fixierung schärfer abgebildet wurde. Bei der Darstellung der Mitochondrien zeigten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach dem Hochdruckgefrieren und der Gefriersubstitution bessere und schärfere Ergebnisse. Die Kernporen waren bei beiden Fixierungsmethoden gut erkennbar.

Beim Vergleich der gesunden und erkrankten Myoblasten wiesen die Kontrollzellen NO44, NO45 und 19951 deutlich weniger Auffälligkeiten auf als die Myoblasten MO54, MO37 und FSHD10 von FSHD-Patienten.

Innere und äußere Kernmembran verliefen bei den Kontrollzellen meist parallel und die Mitochondrien zeigten in den meisten Fällen eine typische wurmartige, längliche Form und waren durch Cristae gefüllt. Dies traf sowohl für die konventionelle Fixierung als auch für das Hochdruckgefrieren zu.

Die erkrankten Myoblasten wiesen im Vergleich zur Kontrolle bei beiden Fixierungsmethoden deutliche Auffälligkeiten in der Ausprägung und Gestalt der Mitochondrien auf. Neben einer oft großen Variationsbreite hinsichtlich Form und Länge war auch das teilweise Fehlen der Cristae festzustellen.

Bei Betrachtung der Kernhülle fielen jedoch deutliche Unterschiede zwischen konventioneller und HPF-Fixierung auf. Die äußere Kernmembran der konventionell fixierten FSHD-Myoblasten verlief unregelmäßig und gewellt und der Abstand zwischen ONM und INM war vergrößert und zeigte eine große Variationsbreite. Im Gegensatz dazu wies die Kernhülle der HPF-fixierten erkrankten Myoblasten einen erstaunlich parallelen Verlauf mit nur vereinzelt leicht unregelmäßigen Abschnitten auf.

Da bei EDMD in vorangegangenen Untersuchungen (Reichart et al., 2004) auch fluoreszenzmikroskopisch Veränderungen der erkrankten Zellen auffällig waren, wurde neben den Methoden der Elektronenmikroskopie das Vorliegen und die Verteilung verschiedener Proteine in FSHD-Myoblasten mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht und mit den Kontrollzellen verglichen.

Zur Beurteilung der Kernhülle wurden Antikörper gegen Lamin A/C und Nukleoporine bei drei verschiedenen Zelllinien-Paaren jeweils in einer niedrigen und einer hohen Passage eingesetzt.

Die Mitochondrien wurden mithilfe des Antikörpers ANT1/2, der an den Adenin-Nukleotid-Translokator (siehe 1.3 und 1.5.2) der inneren Mitochondrienmembran bindet, untersucht. Dabei wurde jeweils eine hohe Passage zweier Zelllinien-Paare betrachtet.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen an EDMD-Myoblasten (Reichart et al., 2004; Sabatelli et al., 2001) waren die Lamine A und C sowie die Kernporen sowohl bei den Myoblasten der FSHD-Patienten als auch bei den Kontrollzellen nachweisbar. Hinsichtlich ihrer Verteilung waren keine Unterschiede zur Kontrolle zu beobachten.

Das Myoblasten-Paar NO44 und MO54 zeigte bei der indirekten Immunfluoreszenz mit ANT1/2 im Vergleich zu 19951 und FSHD10 mehr Myoblasten mit Signalen und enthielt damit scheinbar Mitochondrien im Zytoplasma und auch mehr Signale pro Zelle.

Vor allem bei den erkrankten Zellen traten in den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen einzelne atypische Zellkerne mit unterschiedlicher Zellkernform auf.

Durch die vorliegenden Ergebnisse ist darauf zu schließen, dass die Myoblasten von FSHD-Patienten Veränderungen der Zellkernform und der Mitochondrien aufweisen. Die Untersuchungen der Kernhülle liefern abhängig von der Fixierungsmethode unterschiedliche Ergebnisse.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts, B., Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. Wiley-VCH, Weinheim (2012).
- Andersson, S.G., Karlberg, O., Canback, B., Kurland, C.G., On the origin of mitochondria: a genomics perspective, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**(2003), pp. 165-177; discussion 177-169.
- Anseau, E. *et al.*, DUX4c is up-regulated in FSHD. It induces the MYF5 protein and human myoblast proliferation, *PLoS One* **4**(2009), p. e7482.
- Bahr, G.F., Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reactions with biologically important substances. Electron stains. III, *Exp Cell Res* **7**(1954), pp. 457-479.
- Baker, R.F., Modern, F.W., Controlled fixation with osmium tetroxide, *Anat Rec* **114**(1952), pp. 181-187.
- Barro, M. *et al.*, Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects, *J Cell Mol Med* **14**(2010), pp. 275-289.
- Bereiter-Hahn, J., Behavior of mitochondria in the living cell, *Int Rev Cytol* **122**(1990), pp. 1-63.
- Bereiter-Hahn, J., Luck, M., Miebach, T., Stelzer, H.K., Voth, M., Spreading of trypsinized cells: cytoskeletal dynamics and energy requirements, *J Cell Sci* **96 ( Pt 1)**(1990), pp. 171-188.
- Blouin, A., Blaho, J.A., Assessment of the subcellular localization of the herpes simplex virus structural protein VP22 in the absence of other viral gene products, *Virus Res* **81**(2001), pp. 57-68.
- Bonne, G. *et al.*, Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy, *Nat Genet* **21**(1999), pp. 285-288.
- Bosnakovski, D. *et al.*, An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies, *EMBO J* **27**(2008), pp. 2766-2779.
- Bullen, A. *et al.*, Inner ear tissue preservation by rapid freezing: improving fixation by high-pressure freezing and hybrid methods, *Hear Res* **315**(2014), pp. 49-60.
- Burke, B., Stewart, C.L., The laminopathies: the functional architecture of the nucleus and its contribution to disease, *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**(2006), pp. 369-405.
- Cabianca, D.S., Gabellini, D., The cell biology of disease: FSHD: copy number variations on the theme of muscular dystrophy, *J Cell Biol* **191**(2010), pp. 1049-1060.
- Cantuti-Castelvetri, I., Shukitt-Hale, B., Joseph, J.A., Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging, *Int J Dev Neurosci* **18**(2000), pp. 367-381.
- Carvajal Monroy, P.L., Grefte, S., Kuijpers-Jagtman, A.M., Von den Hoff, J.W., Wagener, F.A., Neonatal Satellite Cells Form Small Myotubes In Vitro, *J Dent Res*(2016).
- Emery, A.E., Emery-Dreifuss muscular dystrophy and other related disorders, *Br Med Bull* **45**(1989), pp. 772-787.
- Fiore, C. *et al.*, The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects, *Biochimie* **80**(1998), pp. 137-150.

- Franke, W.W., Scheer, U., Krohne, G., Jarasch, E.D., The Nuclear-Envelope and the Architecture of the Nuclear Periphery, *Journal of Cell Biology* **91**(1981), pp. S39-S50.
- Frey, T.G., Mannella, C.A., The internal structure of mitochondria, *Trends Biochem Sci* **25**(2000), pp. 319-324.
- Gabellini, D., Green, M.R., Tupler, R., Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle, *Cell* **110**(2002), pp. 339-348.
- Gabriels, J. *et al.*, Nucleotide sequence of the partially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element, *Gene* **236**(1999), pp. 25-32.
- Gant, T.M., Wilson, K.L., Nuclear assembly, *Annu Rev Cell Dev Bi* **13**(1997), pp. 669-695.
- Gavalda-Navarro, A., Domingo, P., Vinas, O., Mampel, T., Expression of human and mouse adenine nucleotide translocase (ANT) isoform genes in adipogenesis, *Int J Biochem Cell Biol* **64**(2015), pp. 34-44.
- Gerace, L., Blobel, G., The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis, *Cell* **19**(1980), pp. 277-287.
- Gilbert, J.R. *et al.*, Evidence for heterogeneity in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD), *Am J Hum Genet* **53**(1993), pp. 401-408.
- Gilkey, J.C., Staehelin, L.A., Advances in Ultrarapid Freezing for the Preservation of Cellular Ultrastructure, *J Electron Microscop Tech* **3**(1986), pp. 177-210.
- Gondor, A., Ohlsson, R., Chromosome crosstalk in three dimensions, *Nature* **461**(2009), pp. 212-217.
- Gorlich, D., Transport into and out of the cell nucleus, *EMBO J* **17**(1998), pp. 2721-2727.
- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R.D., Shumaker, D.K., Wilson, K.L., The nuclear lamina comes of age, *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(2005), pp. 21-31.
- Guttler, T., Gorlich, D., Ran-dependent nuclear export mediators: a structural perspective, *EMBO J* **30**(2011), pp. 3457-3474.
- Hardin, B.D., Schuler, R.L., McGinnis, P.M., Niemeier, R.W., Smith, R.J., Evaluation of propylene oxide for mutagenic activity in 3 in vivo test systems, *Mutat Res* **117**(1983), pp. 337-344.
- Hurbain, I., Sachse, M., The future is cold: cryo-preparation methods for transmission electron microscopy of cells, *Biol Cell* **103**(2011), pp. 405-420.
- Jendrach, M., Mai, S., Pohl, S., Voth, M., Bereiter-Hahn, J., Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress, *Mitochondrion* **8**(2008), pp. 293-304.
- Kaech, A., Ziegler, U., High-pressure freezing: current state and future prospects, *Methods Mol Biol* **1117**(2014), pp. 151-171.
- Kaukonen, J. *et al.*, Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance, *Science* **289**(2000), pp. 782-785.
- Klingenberg, M., Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria, *Arch Biochem Biophys* **270**(1989), pp. 1-14.
- Laoudj-Chenivesse, D. *et al.*, Increased levels of adenine nucleotide translocator 1 protein and response to oxidative stress are early events in facioscapulohumeral muscular dystrophy muscle, *J Mol Med (Berl)* **83**(2005), pp. 216-224.

- Lek, A., Rahimov, F., Jones, P.L., Kunkel, L.M., Emerging preclinical animal models for FSHD, *Trends Mol Med* **21**(2015), pp. 295-306.
- Lemmers, R.J. *et al.*, Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2, *Nat Genet* **44**(2012), pp. 1370-1374.
- Levy, S.E., Chen, Y.S., Graham, B.H., Wallace, D.C., Expression and sequence analysis of the mouse adenine nucleotide translocase 1 and 2 genes, *Gene* **254**(2000), pp. 57-66.
- Lindon, C., Montarras, D., Pinset, C., Cell cycle-regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts, *J Cell Biol* **140**(1998), pp. 111-118.
- Luft, J.H., Improvements in epoxy resin embedding methods, *J Biophys Biochem Cytol* **9**(1961), pp. 409-414.
- Lüllmann-Rauch, R., Asan, E., *Taschenlehrbuch Histologie*, 5., vollständig überarb. Aufl. ed. Thieme, Stuttgart (2015) 726 S. pp.
- Lunt, P.W., Harper, P.S., Genetic counselling in facioscapulohumeral muscular dystrophy, *J Med Genet* **28**(1991), pp. 655-664.
- Martinez-Vieyra, I.A. *et al.*, A role for beta-dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts, *Biochim Biophys Acta* **1833**(2013), pp. 698-711.
- Mattout, A., Cagianca, D.S., Gasser, S.M., Chromatin states and nuclear organization in development--a view from the nuclear lamina, *Genome Biol* **16**(2015), p. 174.
- Mauro, A., Satellite cell of skeletal muscle fibers, *J Biophys Biochem Cytol* **9**(1961), pp. 493-495.
- McDonald, K. *et al.*, "Tips and tricks" for high-pressure freezing of model systems, *Methods Cell Biol* **96**(2010), pp. 671-693.
- Meryman, H.T., Cryoprotective agents, *Cryobiology* **8**(1971), pp. 173-183.
- Miake-Lye, R., Kirschner, M.W., Induction of early mitotic events in a cell-free system, *Cell* **41**(1985), pp. 165-175.
- Mohr, D., Frey, S., Fischer, T., Guttler, T., Gorlich, D., Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes, *EMBO J* **28**(2009), pp. 2541-2553.
- Moir, R.D., Yoon, M., Khuon, S., Goldman, R.D., Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells, *J Cell Biol* **151**(2000), pp. 1155-1168.
- Monaghan, P., Cook, H., Hawes, P., Simpson, J., Tomley, F., High-pressure freezing in the study of animal pathogens, *J Microsc* **212**(2003), pp. 62-70.
- Monteiro, M.J., Hicks, C., Gu, L., Janicki, S., Determinants for intracellular sorting of cytoplasmic and nuclear intermediate filaments, *J Cell Biol* **127**(1994), pp. 1327-1343.
- Mulisch, M., Welsch, U., Romeis, B., *Romeis Mikroskopische Technik*, 19. Auflage ed. Springer Spektrum, Berlin (2015) XVIII, 603 Seiten pp.
- Newport, J.W., Forbes, D.J., The Nucleus - Structure, Function, and Dynamics, *Annu Rev Biochem* **56**(1987), pp. 535-565.
- Newport, J.W., Wilson, K.L., Dunphy, W.G., A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly, *J Cell Biol* **111**(1990), pp. 2247-2259.

- Padberg, G.W., Facioscapulohumeral muscular dystrophy: a clinician's experience, *Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy (FSHD): Clinical Medicine and Molecular Cell Biology*(2004), p. 40.
- Padberg, G.W.A.M., Facioscapulohumeral disease. Leiden (1982), p. 243 sider.
- Palade, G.E., The fine structure of mitochondria, *Anat Rec* **114**(1952), pp. 427-451.
- Parr, E.L., Oei, J.S., Immobilization of membrane H-2 antigens by paraformaldehyde fixation, *J Cell Biol* **59**(1973), pp. 537-542.
- Pease, D.C., Porter, K.R., Electron microscopy and ultramicrotomy, *J Cell Biol* **91**(1981), pp. 287s-292s.
- Penninckx, F., Cheng, N., Kerremans, R., Van Damme, B., De Loecker, W., The effects of different concentrations of glycerol and dimethylsulfoxide on the metabolic activities of kidney slices, *Cryobiology* **20**(1983), pp. 51-60.
- Reichart, B. *et al.*, Expression and localization of nuclear proteins in autosomal-dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy with LMNA R377H mutation, *BMC Cell Biol* **5**(2004), p. 12.
- Reynolds, E.S., The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, *J Cell Biol* **17**(1963), pp. 208-212.
- Richards, M., Coppee, F., Thomas, N., Belayew, A., Upadhyaya, M., Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): an enigma unravelled?, *Hum Genet* **131**(2012), pp. 325-340.
- Rodic, N. *et al.*, DNA methylation is required for silencing of ant4, an adenine nucleotide translocase selectively expressed in mouse embryonic stem cells and germ cells, *Stem Cells* **23**(2005), pp. 1314-1323.
- Roux, K.J., Burke, B., Nuclear envelope defects in muscular dystrophy, *Biochim Biophys Acta* **1772**(2007), pp. 118-127.
- Sabatelli, P. *et al.*, Nuclear alterations in autosomal-dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy, *Muscle Nerve* **24**(2001), pp. 826-829.
- Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*, 3. Aufl. ed. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg (2011) XVI, 272 S. pp.
- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., *Prometheus LernAtlas der Anatomie*, 3., überarb. und erw. Aufl. ed. Thieme, Stuttgart (2011) 3 Bde. pp.
- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., Wesker, K., *Prometheus LernAtlas der Anatomie*, 4., überarb. und erw. Aufl. ed. Thieme, Stuttgart (2014) 3 Bände pp.
- Silva, M.T., Santos Mota, J.M., Melo, J.V., Guerra, F.C., Uranyl salts as fixatives for electron microscopy. Study of the membrane ultrastructure and phospholipid loss in bacilli, *Biochim Biophys Acta* **233**(1971), pp. 513-520.
- Snider, L. *et al.*, RNA transcripts, miRNA-sized fragments and proteins produced from D4Z4 units: new candidates for the pathophysiology of facioscapulohumeral dystrophy, *Hum Mol Genet* **18**(2009), pp. 2414-2430.
- Sobotta, J., Paulsen, F., *Allgemeine Anatomie und Bewegungsapparat*, 23. Aufl. / hrsg. von F. Paulsen ... ed. Elsevier, München (2010) 406 S. pp.
- Spagnol, S.T., Armiger, T.J., Dahl, K.N., Mechanobiology of Chromatin and the Nuclear Interior, *Cell Mol Bioeng* **9**(2016), pp. 268-276.

- Stepien, G., Torroni, A., Chung, A.B., Hodge, J.A., Wallace, D.C., Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation, *J Biol Chem* **267**(1992), pp. 14592-14597.
- Stuurman, N., Heins, S., Aebi, U., Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions, *J Struct Biol* **122**(1998), pp. 42-66.
- Tawil, R., Facioscapulohumeral muscular dystrophy, *Neurotherapeutics* **5**(2008), pp. 601-606.
- Tse, F.W., Tse, A., Hille, B., Horstmann, H., Almers, W., Local Ca<sup>2+</sup> release from internal stores controls exocytosis in pituitary gonadotrophs, *Neuron* **18**(1997), pp. 121-132.
- Turki, A. *et al.*, Functional muscle impairment in facioscapulohumeral muscular dystrophy is correlated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction, *Free Radic Biol Med* **53**(2012), pp. 1068-1079.
- Upadhyaya, M., Cooper, D.N., Molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy, *Expert Rev Mol Diagn* **2**(2002), pp. 160-171.
- van den Boogaard, M.L. *et al.*, Double SMCHD1 variants in FSHD2: the synergistic effect of two SMCHD1 variants on D4Z4 hypomethylation and disease penetrance in FSHD2, *Eur J Hum Genet* **24**(2016), pp. 78-85.
- van Deutekom, J.C. *et al.*, FSHD associated DNA rearrangements are due to deletions of integral copies of a 3.2 kb tandemly repeated unit, *Hum Mol Genet* **2**(1993), pp. 2037-2042.
- Vignais, P.V., The mitochondrial adenine nucleotide translocator, *J Bioenerg* **8**(1976), pp. 9-17.
- Vogel, K.G., Effects of hyaluronidase, trypsin, and EDTA on surface composition and topography during detachment of cells in culture, *Exp Cell Res* **113**(1978), pp. 345-357.
- Wallace, D.C., Mitochondrial diseases in man and mouse, *Science* **283**(1999), pp. 1482-1488.
- Watson, M.L., Further Observations on the Nuclear Envelope of the Animal Cell, *J Biophys Biochem Cy* **6**(1959), pp. 147-&.
- Weimer, R.M., Preservation of *C. elegans* tissue via high-pressure freezing and freeze-substitution for ultrastructural analysis and immunocytochemistry, *Methods Mol Biol* **351**(2006), pp. 203-221.
- Weis, K., Ryder, U., Lamond, A.I., The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import, *EMBO J* **15**(1996), pp. 1818-1825.
- White, D.L., Andrews, S.B., Faller, J.W., Barnett, R.J., The chemical nature of osmium tetroxide fixation and staining of membranes by x-ray photoelectron spectroscopy, *Biochim Biophys Acta* **436**(1976), pp. 577-592.
- Wijmenga, C. *et al.*, Location of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on chromosome 4, *Lancet* **336**(1990), pp. 651-653.
- Wijmenga, C. *et al.*, Mapping of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene to chromosome 4q35-qter by multipoint linkage analysis and in situ hybridization, *Genomics* **9**(1991), pp. 570-575.
- Wilson, K.L., The nuclear envelope, muscular dystrophy and gene expression, *Trends Cell Biol* **10**(2000), pp. 125-129.

- Winokur, S.T. *et al.*, Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) myoblasts demonstrate increased susceptibility to oxidative stress, *Neuromuscul Disord* **13**(2003), pp. 322-333.
- Wolosewick, J.J., Porter, K.R., Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance. Artifact or reality, *J Cell Biol* **82**(1979), pp. 114-139.
- Wydner, K.L., McNeil, J.A., Lin, F., Worman, H.J., Lawrence, J.B., Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1, and LBR by fluorescence in situ hybridization, *Genomics* **32**(1996), pp. 474-478.
- Yu, Z.W., Quinn, P.J., Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology, *Biosci Rep* **14**(1994), pp. 259-281.
- Zollinger, H.U., Cytologic studies with the phase microscope; the mitochondria and other cytoplasmic constituents under various experimental conditions, *Am J Pathol* **24**(1948), pp. 569-589.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle angefertigt.

Frau **Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle** danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die fachliche Betreuung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Für die stets offene Tür, die geduldige Beantwortung aller Fragen, die Vermittlung des nötigen Fachwissens und die Einführung in wissenschaftliches Arbeiten gilt mein besonderer Dank.

Vielen Dank an meine Doktormutter Frau **Prof. Dr. Claudia Sommer** für das Interesse an meiner Arbeit, die unkomplizierte Kommunikation, ein stets offenes Ohr und die freundliche Unterstützung.

Ein Dankeschön gilt Herrn **Prof. Dr. Christian Stigloher**, der mir in allen Fragen rund um das Hochdruckgefrieren mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herzlichen Dank an alle Mitarbeiter der AG Dabauvalle und der EM für das tolle Arbeitsklima und die Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Meinem Ehemann, meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden danke ich von Herzen für die Unterstützung, Motivation und Geduld während meines Studiums und der Dissertationsphase. Danke für alles.

## Lebenslauf

Name: Stefanie Martina Kißner, geb. Stenger

### Schulischer Werdegang

1997-2001 Grundschule Frammersbach  
2001-2010 Franz-Ludwig-von-Erthal-Gymnasium Lohr am Main  
25. Juni 2010 Allgemeine Hochschulreife

### Universitärer Werdegang

WS 2010/2011 Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
04. Oktober 2011 Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
18. März 2013 Zahnärztliche Vorprüfung  
13. November 2015 Staatsexamen Zahnmedizin  
07. Dezember 2015 Approbation als Zahnärztin  
seit Januar 2016 Promotionsstudium

### Beruflicher Werdegang

seit November 2016 Vorbereitungsassistentin  
Praxis Dr. Bernhard Gubik und Dr. Ulrike Gubik in Rieneck

Frammersbach, den 13.01.2018

---

Stefanie Kißner