

Praktikumsbericht

**Zum Praktikum in der
AG Neumann im
Institut für Rekonstruktive Neurobiologie im
Life&Brain Center der
Universität Bonn im
Zeitraum vom 17.07. bis zum 11.08.2005
Erstellt von: Christina Kuhlmeiy**

Einführung

In diesem Sommer erhielt ich die Gelegenheit, für vier Wochen an der Arbeit der Arbeitsgruppe (AG) Neumann vom Life & Brain Center Bonn teilzunehmen. Die Arbeitsgruppe Neumann beschäftigt sich mit rekonstruktiver Neurobiologie, wobei der Schwerpunkt hierbei vor allem auf der Erforschung der Krankheiten Multiple Sklerose und Alzheimer liegt. Als Ansatz zur Krankheitsbehandlung werden hier Mikroglia angesehen, ein Zelltyp, den man als „Makrophagen des Nervensystems“ bezeichnen kann.

In meinem Praktikum durfte ich mit Zellkulturen arbeiten und dabei versuchen, embryonale Mausstammzellen zu Nervenzellen zu differenzieren. Aber auch bei Versuchen mit Mäusen durfte ich dabei sein, ebenso bei FACS und Immunfärbungen. Im Folgenden werde ich einige der angewendeten Methoden vorstellen.

Gewinnung von Stammzellen

Als Modellorganismus werden in der AG Neumann Mäuse verwendet, die zu dem Stamm „Black6“ (BL6) gehören. Da es nicht nur schwierig, sondern auch äußerst ineffizient wäre, direkt Mikroglia aus den Mäusen zu entnehmen, arbeitet man mit embryonalen Mäusestammzellen. Diese bezeichnet man als ES-Zellen, wobei das ES für embryonale Stammzellen steht.

Die isolierten ES-Zellen werden auf einer Schicht so genannter Nährzellen in einer Schale mit Kulturmedium plattiert. Diese Nährzellen sind Fibroblasten, die aus dem embryonalen Bindegewebe stammen und mitotisch inaktiviert sind. Diese sogenannten Feederzellen stellen geeignete Wachstumsbedingungen für die ES-Zellen bereit. Sie werden auch als MEFs (mouse-embryonic-fibroblast) bezeichnet. Um die

Vermehrung von ES-Zellen in vitro zu ermöglichen, müssen mehrere Bedingungen erfüllt sein. Wichtig ist hierbei, dass vor allem die Differenzierung der Zellen verzögert werden muss. Dies erreicht man zum einen über die Zugabe von Wachstumsfaktoren wie LIF (leukemia inhibitory factor) und auch dadurch, dass die ES-Zellen nicht zu dicht gehalten werden und so nicht spontan differenzieren. Zell-Zell-Interaktionen fördern die Differenzierung; verhindert man den Kontakt der Zellen, so verhindert man ihre Differenzierung.

Differenzierung zu Nervenzellen

Sobald nach wenigen Tagen die ES-Zellen ausreichend proliferiert sind und sich ausreichend große Kolonien gebildet haben, werden diese durch Trypsin von der Gefäßoberfläche gelöst, durch Zentrifugation von dem alten Medium und den MEF-Zellen getrennt und mit neuem Medium resuspendiert. Nun werden die Zellen in Suspensionskultur gehalten, das heißt, die Zellen sind nicht mehr adherent, sondern schweben im Medium. Ohne den Kontakt zu einer festen Oberfläche aggregieren sie und bilden Zell-Zell-Kontakte aus, die zusammen mit Zelltyp-spezifischen Faktoren ihre Differenzierung begünstigen. Hält man die Zellen unter diesen Bedingungen, entstehen bald Zellklumpen, die sowohl undifferenzierte als auch differenzierte Zellen enthalten. Diese Zellklumpen werden als embryoid bodies (EBs) bezeichnet.

Nach einigen Tagen in der Suspensionskultur werden die Ebs auf Schalen ausplattiert, wo sie adherieren und auswachsen. Die adherenten Zellen werden nun mit einem Medium kultiviert, welches eine Selektion auf nestin-positive Zellen begünstigt. Nestin ist ein Intermediärfilament, welches in neuronalen Zellen vorkommt. Es erfolgt daher eine Selektion in die neuronale Richtung.

Die Entwicklung „meiner“ Zellen zu verfolgen war sehr lehrreich und wurde von mir auch fotografiert; die Bilder finden sich im Anhang.

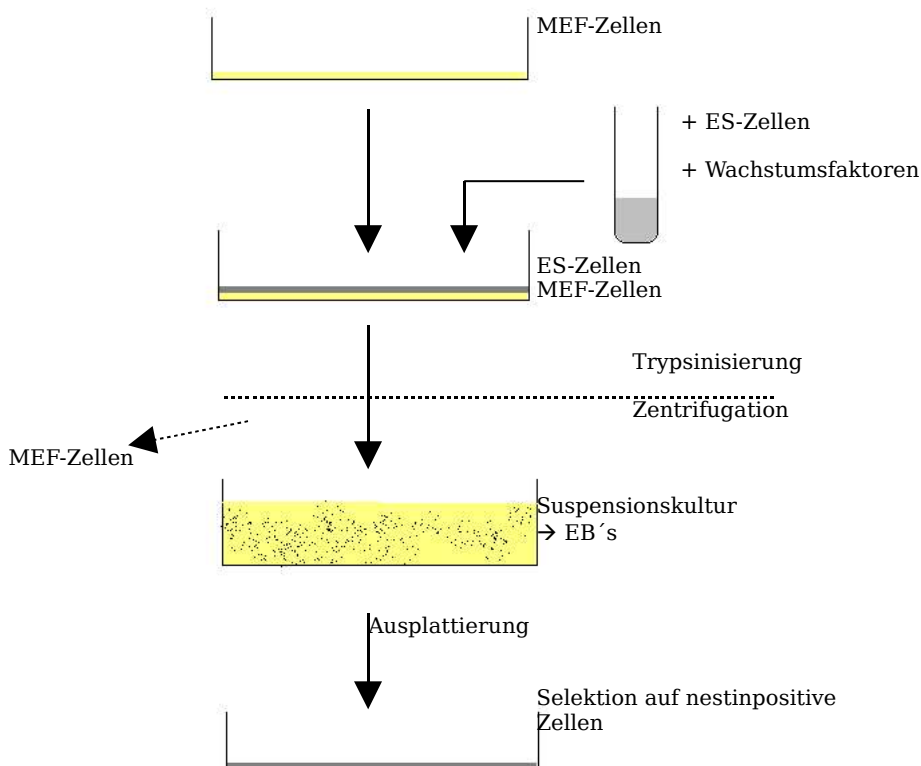


Abb.1: Fließschema zur Gewinnung von nestinpositiven Zellen aus embryonalen Mausstammzellen

Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis bei Mäusen

In der AG Neumann wird auch mit BL6-Mäusen gearbeitet, wobei jedoch für spezielle Experimente nur Weibchen verwendet werden. Diese sollten zum Zeitpunkt des Experimentes sechs bis sieben Wochen alt sein und müssen 16 bis 18 Gramm wiegen. Bei diesen Tieren wird eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ausgelöst, die sowohl hinsichtlich einer Reihe von wichtigen Symptomen als auch bezüglich der pathologischen Grundlagen der Multiplen Sklerose ähnelt. Aus diesem Grund wird dieser Autoimmunprozess bei den Mäusen ausgelöst, um diese als Multiple-Sklerose-Modell nutzen zu können. Dabei werden den Tieren zunächst Proteine intraperitoneal injiziert, die

auch Bestandteil des im Zentralnervensystem vorhandenen Myelins sind. Diese Eingabe erfolgt am Schwanzansatz in der Nähe der Lymphknoten. Anschließend wird ein Toxin mit abgetöteten *Myobacterium tuberculosis* intravenös in den Schwanz injiziert. Nach 48 Stunden wird die Injektion des Giftes wiederholt, diesmal jedoch intraperitoneal.

Durch die gleichzeitige Eingabe des Proteins und des Toxins erfolgt eine Autoimmunreaktion, die sich auch gegen das körpereigene Protein richtet. Hierdurch kommt es zur autoimmunen Enzephalomyelitis.

Sollten die Mikroglia vorläuferzellen tatsächlich Entzündungsherde im Organismus bekämpfen können, so müssten sie vermehrt in den betroffenen Organen und besonders im Gehirn anzufinden sein. Dabei ist nicht nur von Interesse, in welchen Organen, Organteilen oder Geweben sich die Zellen befinden, sondern auch, in welcher Anzahl. Dazu werden den EAE-Mäusen GFP-markierte Mikroglia vorläuferzellen injiziert. Nach einigen Tagen werden die zu untersuchenden Organe dann entnommen. Um die Organe zu fixieren und zu konservieren, werden die Tiere zuvor perfundiert.

Perfusion

Bei der Perfusion wird das Tier zunächst betäubt. Nach dem Öffnen des Brustkorbes wird eine Kanüle mit PBS in die linke Herzkammer eingeführt, während die Wand der rechten Herzkammer geöffnet wird. Dadurch ist es möglich, das Blut auszuspülen und durch PBS zu ersetzen. Das Fortschreiten dieser Reinigung kann an der Entfärbung der Organe (vor allem der Leber) beobachtet werden. Nachdem ein Großteil des Blutes ausgewaschen wurde, wird das PBS auf selbem Wege durch Paraformaldehyd (PFA) ersetzt, wodurch die Gewebe fixiert werden. Die entnommenen Organe können anschließend für immunhistochemische Färbung verwendet werden.

Immunhistochemische Färbung

Eine andere Methode zum Nachweis der Mikroglia-Vorläuferzellen in bestimmten Geweben ist die immunhistochemische Färbung. Bei der immunhistochemischen Färbung oder auch Antikörperfärbung handelt es sich um eine Methode, bei der bestimmte Strukturen durch Antikörper markiert und sichtbar gemacht werden können. Die Gewebeschnitte werden dafür fixiert. Nun wird der Primärantikörper aufgebracht, welcher an die zu untersuchenden Strukturen bindet. Der zweite Antikörper, der Sekundärantikörper, der die Farbreaktion hervorruft, bindet an den Primärantikörper. Durch diese Zwei-Schritt-Methode wird das spezifische Signal gewonnen. Durch diese Methode kann man bestimmte Strukturen in Gewebeschnitten erkennen, zum Beispiel Mikroglia in Gehirn und Milz von Mäusen. Bilder davon befinden sich im Anhang.

Durchflusszytometrie

Eine andere Methode, die ich lernen durfte, war die sogenannte Durchflusszytometrie. Dabei passieren die Zellen einen Laserstrahl, wobei jede Zelle aufgrund ihrer Zellgröße, Struktur und gegebenenfalls Fluoreszenz-Streulicht emittiert. Die Zellen können somit aufgrund ihrer Eigenschaften sortiert bzw. gezählt werden. Hierbei kommt es so genannter Fluorescence Assisted Cell Sorter (FACS) zum Einsatz.

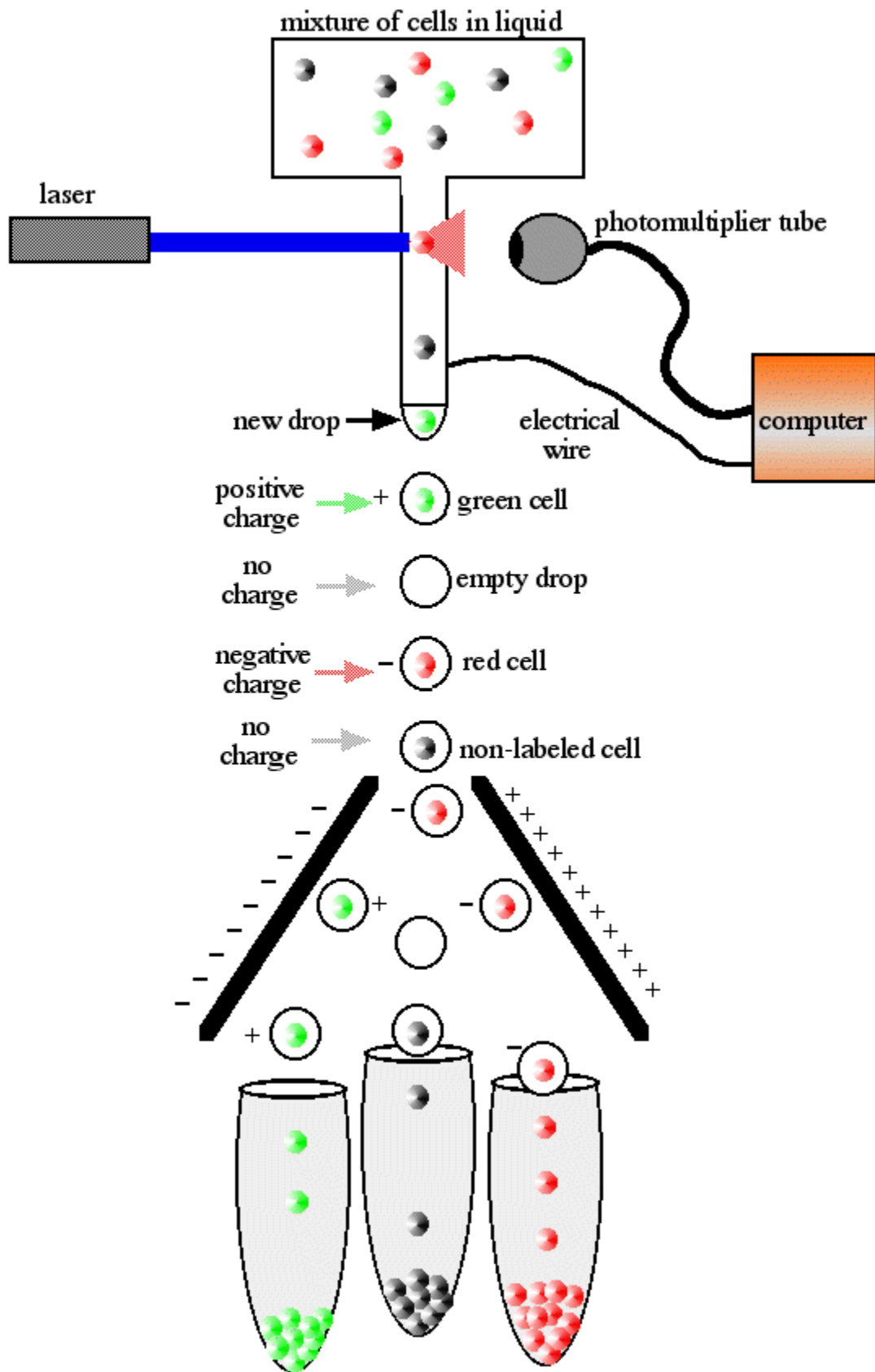


Abb. 2: Fließschema zum FACS; Quelle: www.bio.davidson.edu

Fazit

Einen Monat lang hatte ich die Gelegenheit, den Forschern dieser Arbeitsgruppe bei ihrer Arbeit über die Schulter zu blicken und auch selbst an einigen Experimenten teilzunehmen. Für die Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft, die alle Mitglieder der Arbeitsgruppe in diesen vier Wochen mir gegenüber zeigten, möchte ich mich an dieser Stelle nochmals bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei meiner Betreuerin Isabella Napoli.

Bedanken möchte ich mich auch beim Förderverein der Biologieolympiade e.V. sowie dem Verband Deutscher Biologen e.V., die mir dieses Praktikum ermöglichten.

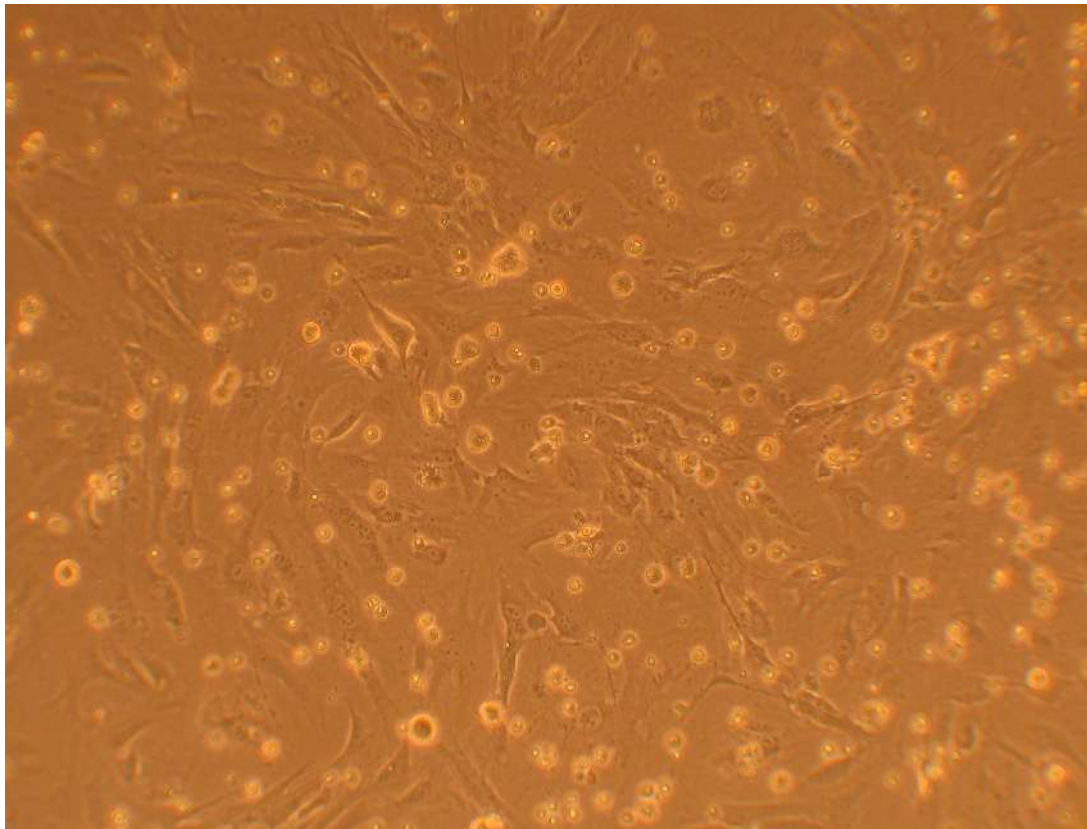


Abb. 3: MEF – Zellen (mouse-embryonic-fibroblast) als dienen im Experiment als Nährzellen für die Stammzellen.; 1 Tag alt, 19. Juli 2006; Lichtmikroskop

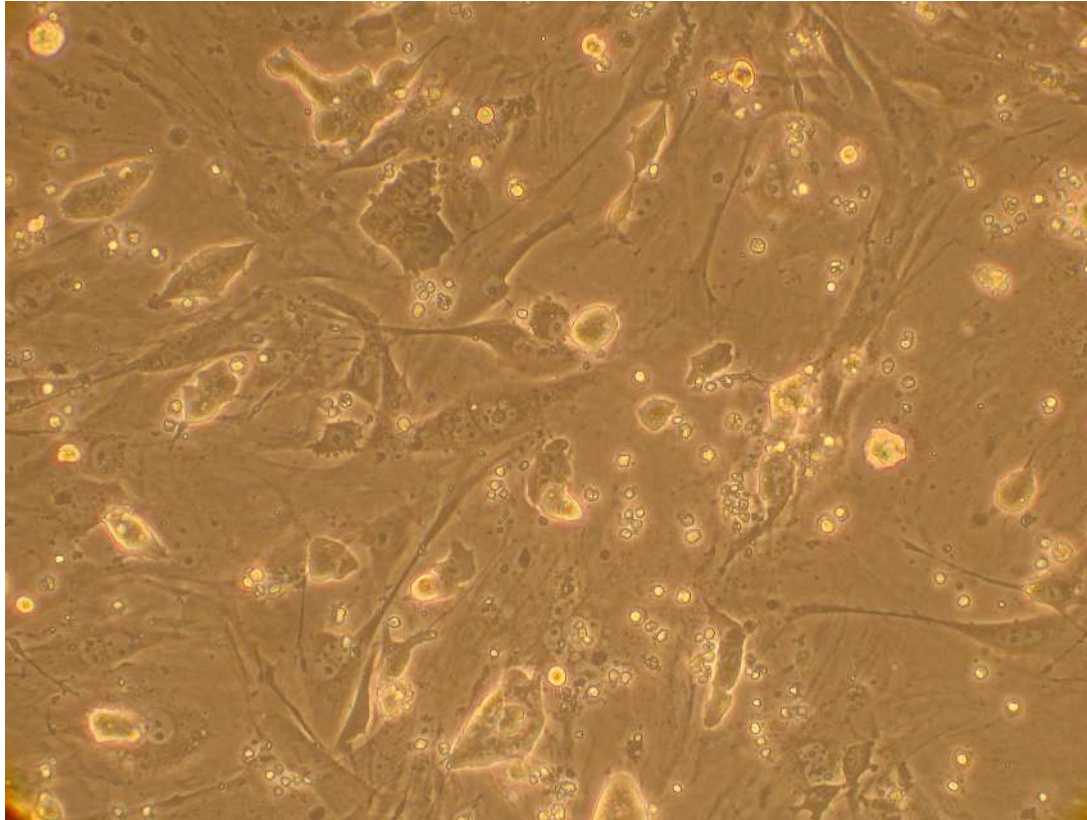


Abb.4: ES- Zellen (embryonale Stammzellen); 0 Tage alt; 20. Juli;
Lichtmikroskop

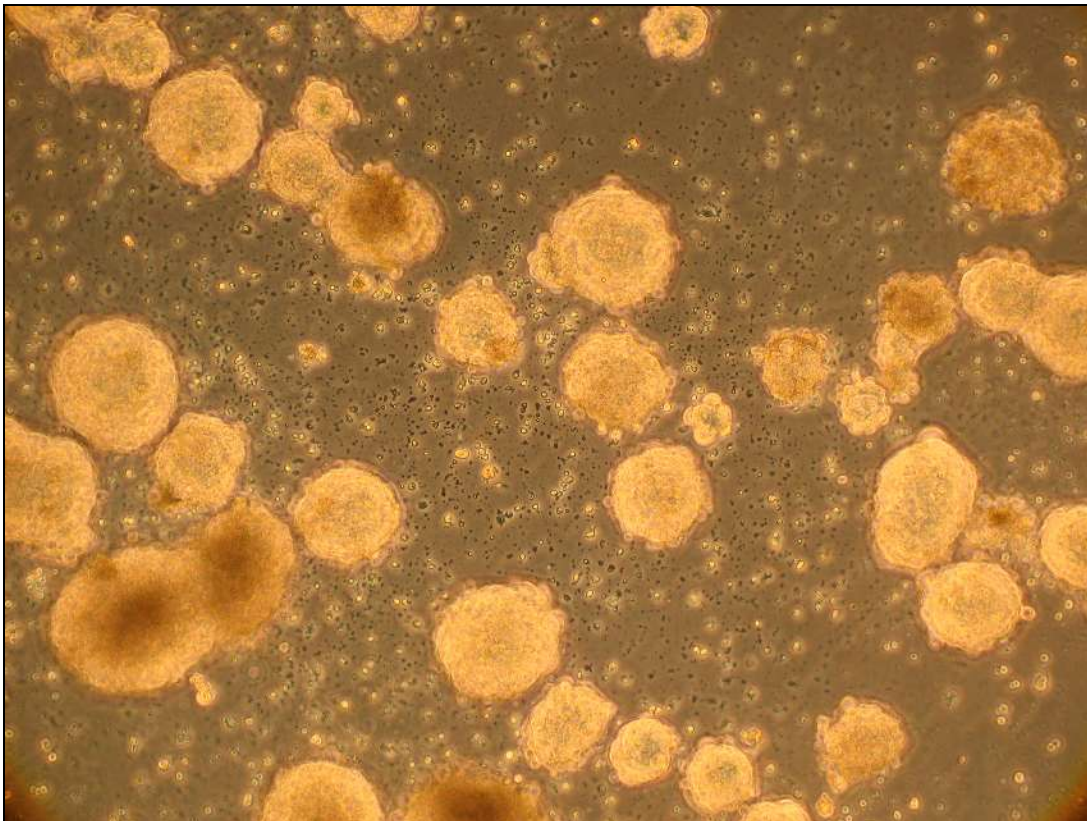


Abb. 5: Die Zellen werden nun in Suspensionskultur gehalten, das heißt,
die Zellen sind nicht mehr adherent, sondern schweben im Medium. Ohne

den Kontakt zu einer festen Oberfläche aggregieren sie und bilden Zell-Zell-Kontakte aus, die zusammen mit Zelltyp-spezifischen Faktoren ihre Differenzierung begünstigen. Hält man die Zellen unter diesen Bedingungen, entstehen bald Zellklumpen, die sowohl undifferenzierte als auch differenzierte Zellen enthalten. Zellklumpen, die sowohl differenzierte als auch undifferenzierte Zellen enthalten; Tag 6, 25. Juli 2006; Lichtmikroskop

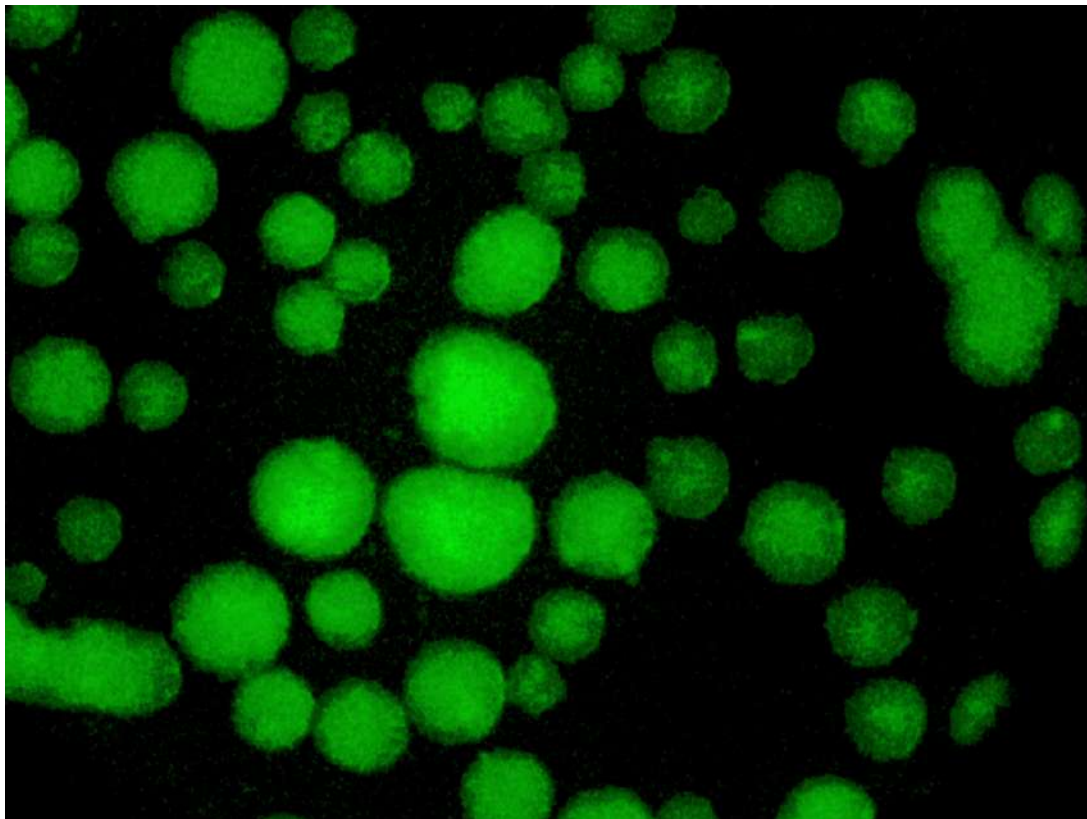


Abb. 6: GFP—markierte EB-Zellen unter UV-Licht; mit freundlicher Genehmigung von Isabella Napoli

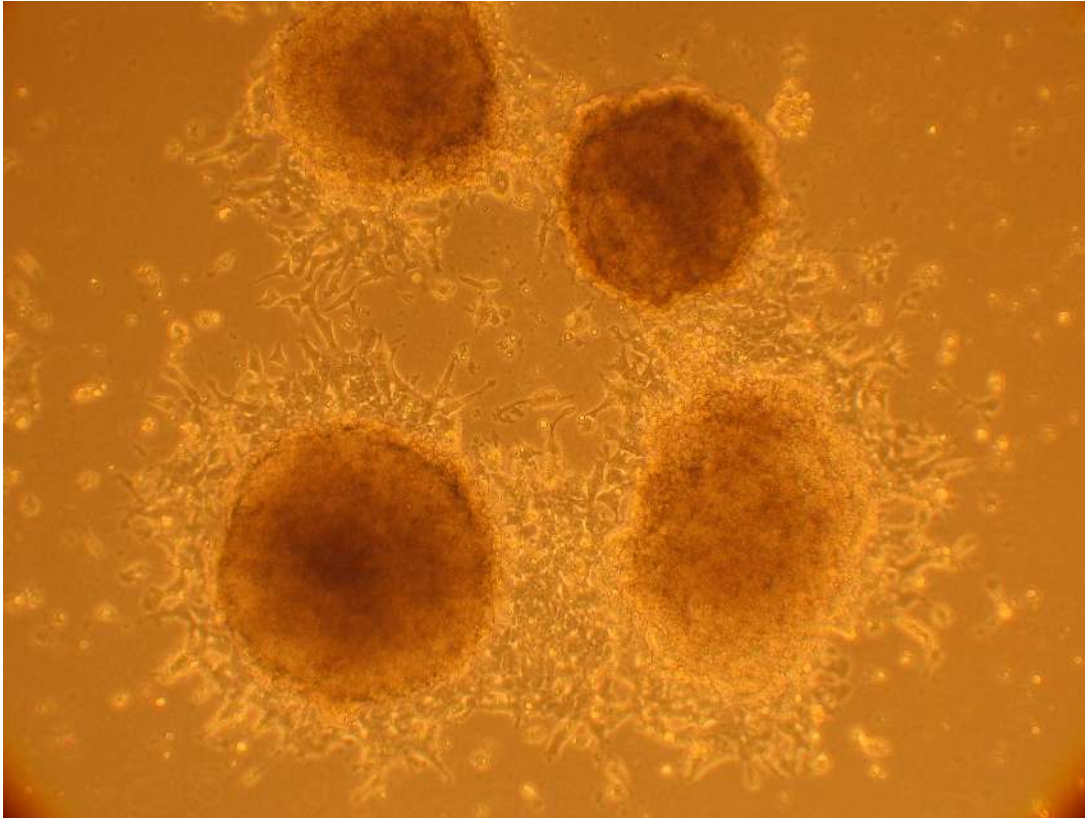


Abb. 7: EB-Zellen, von denen sich differenzierte Zellen absondern.; Tag 12, 31. Juli 2006; Lichtmikroskop

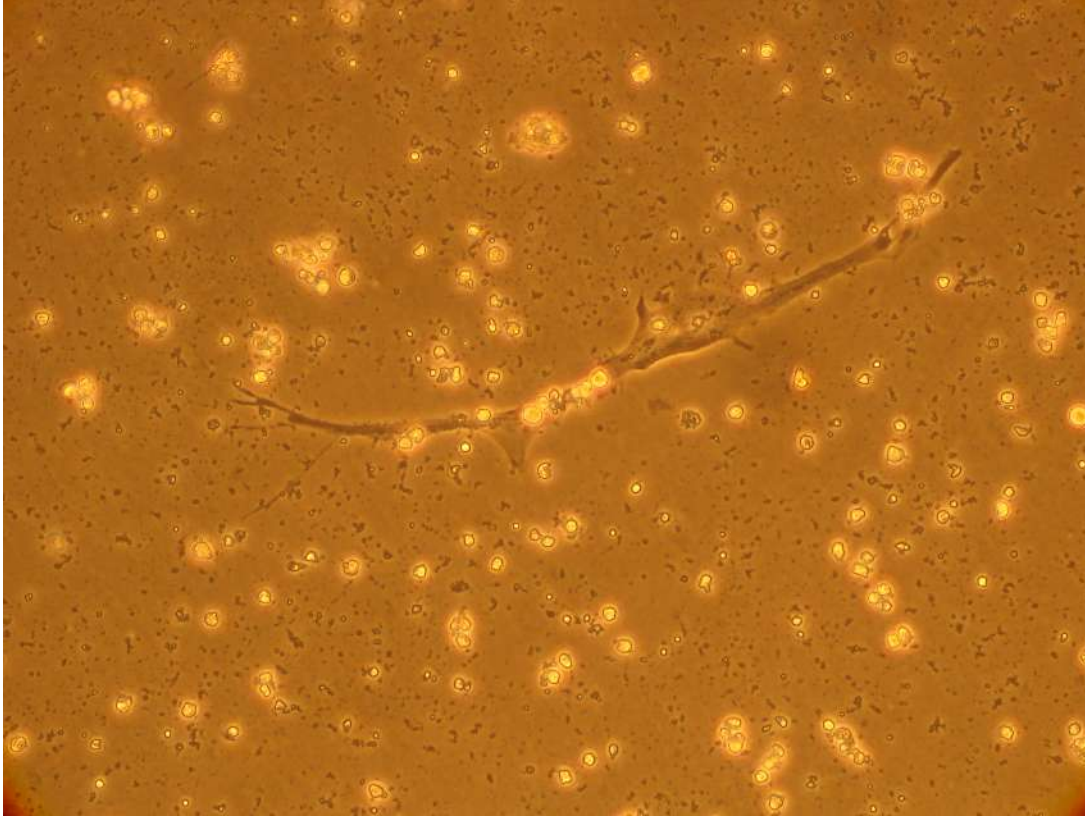


Abb. 8: Die adherenten Zellen werden nun mit einem Medium kultiviert, welches eine Selektion auf nestin-positive Zellen begünstigt. Nestin ist

ein Intermediärfilament, welches in neuronalen Zellen vorkommt. Es erfolgt daher eine Selektion in die neuronale Richtung.

Tag 20, 8.August 2006

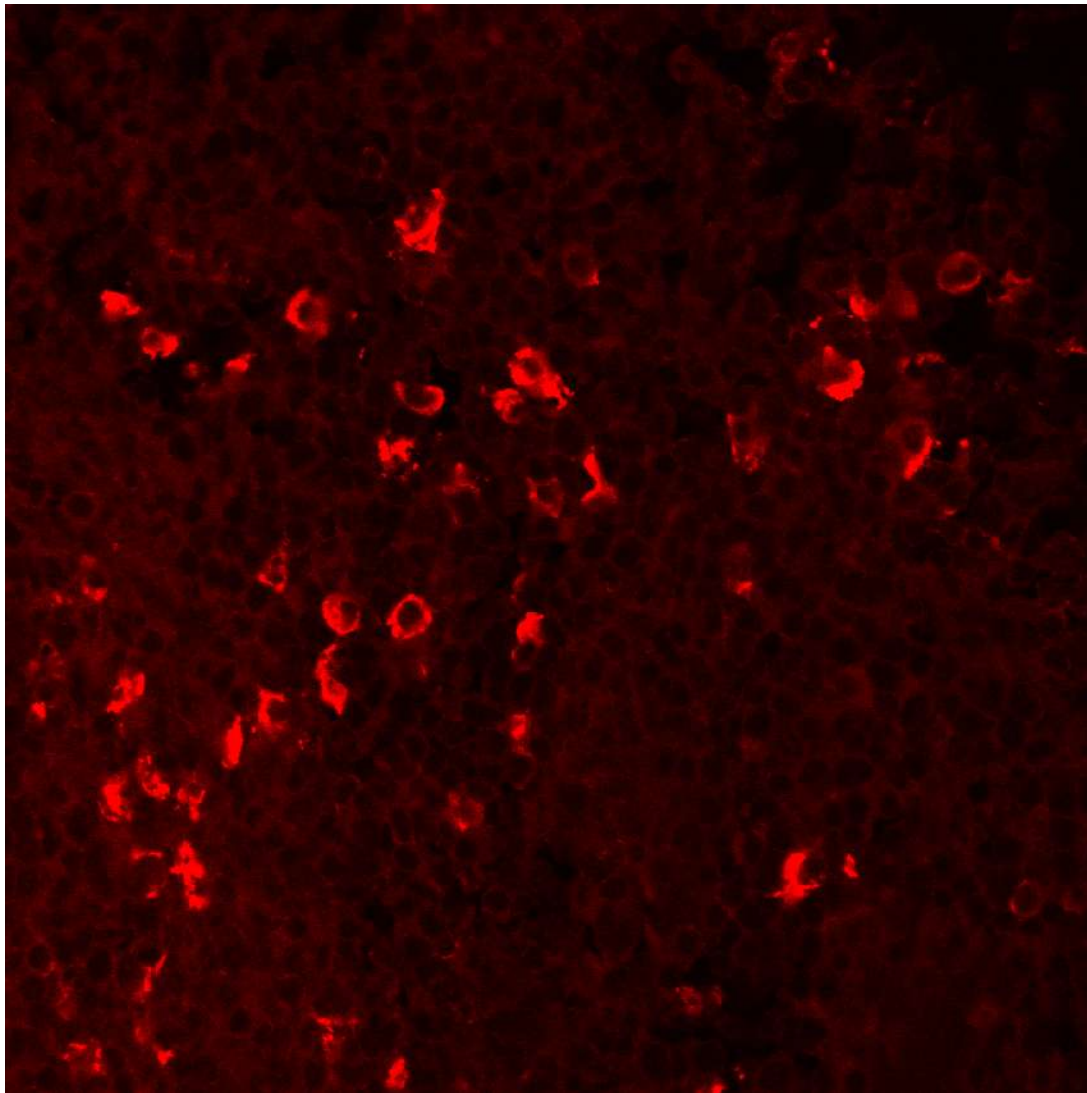


Abb. 9: Immunhistochemische Färbung einer EAE-Maus-Milz mit CD11b und Cy3 zur Sichtbarmachung von Mikroglia. ;Vergrößerung 60fach