



Deutschlands frostige Arche

Wie mit modernster Technik Artenvielfalt bewahrt und gleichzeitig die Forschung gefördert wird führt Anja Richter aus.

Seit Pioniere wie Carl von Linné (1707–1778) oder Alfred Brehm (1829–1884) die Grundlage für umfangreiche biologische Sammlungen in den Naturwissenschaften hergestellt haben, stellen diese Kollektionen einen essenziellen Baustein zur Erforschung der Artenvielfalt dar. Im Laufe der Evolution hat die Natur durch Anpassung von Pflanzen und Tieren an stetig verändernde Umweltbedingungen eine kaum beschreibbare Vielzahl faszinierender Lebewesen hervorgebracht, die evolutionär, anatomisch und ökologisch erst mithilfe solcher Sammlungen geordnet, klassifiziert und untersucht werden konnten. Aus dem Grundinteresse für die Bewahrung der Natur entstanden, gekennzeichnet von präzisen Beschreibungen der Objekte, trat der eigentliche Wert der Sammlungen zumeist erst nach dem Tod der Initiatoren zutage. In der Regel handelte es sich bei diesen Archiven jedoch um die Ablage toter Objekte. Inzwischen ist aber auch im Bereich der Natursammlungen ein neues Zeitalter angebrochen, in dem die ersten Sammlungen lebender Materialien entstehen. Dies wurde aufgrund neuer Entwicklungen im Bereich der Lebenswissenschaften und der technischen Wissenschaften möglich.

Stammzellen könne als lebendes Archiv dienen

Bereits 2004 wurde von Prof. Günter R. Fuhr (Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) in St. Ingbert) und Prof. Charli Kruse (Fraunhofer-Einrichtung für Marine Biotechnologie (EMB) in Lübeck) der Grundstein für eine Zellbibliothek gelegt, die zur Erhaltung des Genpools Stamm-, Progenitor- und andere primäre Zellen von Wildtieren nach dem aktuellsten Stand der Technik lebend konserviert. In Kooperationen mit dem Tierpark Hagenbeck (Dr. Stephan Hering-Hagenbeck), den zoologischen Gärten in Rostock (Udo Nagel) und Neunkirchen (Dr. Norbert Fritsch) sowie der Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei in Born/Darß ist seither eine Vielzahl Proben von unterschiedlichen Tierarten in die Sammlung

aufgenommen worden. Seit Juni 2008 trägt sie offiziell den Namen „Deutsche Zellbank für Wildtiere Alfred Brehm“ oder auch kurz „Cryo-Brehm“ in Würdigung eines der bedeutendsten Zoologen der deutschen Wissenschaft – Alfred Brehm. Was aber kann die moderne Biologie heute besser machen als es die Pioniere der Systematik vermochten?

Wie kann man so viele Proben langfristig bewältigen und lebend konservieren?

Das Fraunhofer IBMT in St. Ingbert unter Leitung von Prof. Günter R. Fuhr entwickelt seit mehr als 10 Jahren Geräte und Verfahren zur Kryokonservierung von lebenden Zellen. Dabei stellen umfassende Konzepte zur Ablage der Proben in großen, automatisierten Kryobanken einen wichtigen Schwerpunkt dar. Ein Beispiel dieser Entwicklung ist die Verknüpfung der Probenröhrchen, in denen sich die wertvollen Proben der Tiere befinden, mit einem elektronischen Speicherchip und Transpondern, die jedwede Verwechslung ausschließen. Dazu bedient man sich modernster Techniken der Datenerfassung und -speicherung. So kann beispielsweise über ein RFID (radar data interchange format) eine Kennung der Probe zugeordnet werden und man hinterlegt in einem Speicherchip am Boden der Kryoröhrchen gleich die vollständige Information über Art, Tier, Zelltyp, Zelleigenschaften und allen Informationen ein zweites Mal, die sich sonst, getrennt von den Proben, nur in den Datenbanken befinden.

Die Methode der Kryokonservierung von Zellen ist dem Veterinär zumeist am Beispiel von Spermien für die Reproduktionsmedizin gut bekannt. Sie wird seit mehr als 50 Jahren eingesetzt und stetig weiterentwickelt. Im Rahmen des Cryo-Brehm wird die Kryokonservierung jedoch zur Archivierung von hochproliferativen, multipotenten Stammzellen eingesetzt. Sie werden post mortem innerhalb von 24 Stunden aus dem Gewebe isoliert und kryokonserviert, wo sie dann als Ursprung für mehr als

einen Zelltyp zur Verfügung stehen. Kein Tier wird für die Sammlung getötet.

Warum ausgerechnet Stammzellen?

Dieser Ansatz resultiert aus den Forschungsarbeiten von Prof. Charli Kruse und seinen Mitarbeitern an der Fraunhofer EMB in Lübeck. Diese Spezialisten für glanduläre, adulte Stamm-/Progenitorzellen konnten bereits in vorangegangenen Untersuchungen die enormen Fähigkeiten pankreatischer Stammzellen aus Maus, Ratte und Mensch demonstrieren. Diese Zellen sind nach Isolation aus dem adulten Organismus fähig, sich selbst zu erneuern, können vermehrt werden und spezialisierte Zellen hervorbringen. Typische Funktionen von Stamm-



Anja Richter

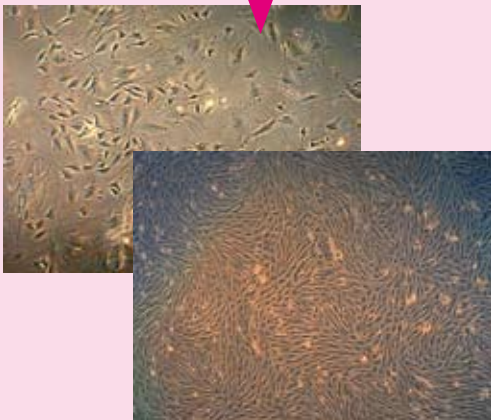
studierte an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg Biologie mit den Schwerpunkten Stammzell- und Entwicklungsbiologie. Seit Juli 2008 ist sie Doktorandin der „Graduate School for Computing in Medicine and Life Sciences“ der Universität zu Lübeck und arbeitet in der Arbeitsgruppe „Zelldifferenzierung“ der Fraunhofer-Einrichtung für Marine Biotechnologie in Lübeck. Schwerpunkt ihrer Arbeit ist die Anwendung glandulärer Stammzellen für zellbasierte Therapien im Bereich der Neuroprothetik.



Gewebeproben verschiedener Spezies werden vom Tierpark Hagenbeck, dem Zoologischen Garten Rostock oder dem Zoologischen Garten Neunkirchen zur Verfügung gestellt.



Die Verarbeitung der Proben im Labor umfasst neben der Entfernung unerwünschter Gewebe wie Federn, Fell oder Fett auch die mechanische Zerkleinerung sowie den enzymatischen Aufschluss des Zielgewebes, sodass eine Zellsuspension entsteht.



Während der anschließenden *In-vitro*-Kultivierung in speziell adaptierten Inkubatoren besitzen die Zellen zu Beginn noch sehr viele verschiedene Morphologien, die sich jedoch mit zunehmender Passagenzahl immer mehr angleichen.

zellen im Organismus sind der Ersatz alter Zellen oder Gewebeneubildung im Rahmen von Heilungsprozessen. Pankreatische Stammzellen zeichnen sich darüber hinaus dadurch aus, dass sie in vielfältiger Weise in Richtung eines der drei Keimblätter differenzieren können. Man kann also aus ihnen verschiedene Zelltypen des Ekto-, Meso- und Endoderms generieren, was dem Differenzierungspotenzial embryonaler Zellen in der Ontogenese ähnelt, die den Ursprung für die etwa 220 verschiedenen Zelltypen eines höheren Tieres bilden.

Mithilfe solcher Zellen ist es erstmals möglich, eine Bank von biologischen Proben anzulegen, die sich bei Verwendung nicht aufbraucht, sondern aufgrund der Vermehrungsfähigkeit der archivierten Zellen immer wieder erneuert werden kann. Dabei werden die Zellen, die für die Untersuchung benötigt werden, erst zum Wachstum angeregt, bis sie sich verdoppelt haben, sodass die eine Hälfte für die Forschung, Therapie oder andere Anwendung verwendet werden kann, während die andere dauerhaft archiviert wird.

Die herausragende Plastizität konnte durch die Analyse weiterer exokriner Drüsen mittlerweile auch für Zellen der submandibularen Speicheldrüse und der Ohrspeicheldrüse gezeigt werden, sodass weitere Organe und Gewebetypen für die Isolierung der zu archivierenden Zellen zu Verfügung stehen.

Ein optimiertes Mikroklima schaffen

Nachdem die Gewebeproben der verstorbenen Tiere aus den genannten zoologischen Einrichtungen im Institut eingetroffen sind, werden sie im Labor zerkleinert und nach präzise vorgegebenen Prozeduren enzymatisch verdaut. Bei diesem Prozess lösen sich die Zellen aus dem Gewebe und es entsteht eine Suspension, aus der dann die geeigneten Zellen herausgefiltert und in die Zellkultur überführt werden können (Kruse, Kajahn *et al.* 2006). Hierfür ist ein Inkubator nötig, der neben der passenden CO₂-Menge in der Atmosphäre auch für die physiologischen Randbedingungen für die Zellen sorgt. Dementsprechend werden beispielsweise Zellen von Vögeln wie dem Weißnackenkranich oder dem Steinkauz bei 40°C kultiviert, wohingegen Zellen des sibirischen Störs oder der Regenbogenforelle bei 20°C am besten gedeihen. Schneeleopard- und Dromedarzellen aller-

dings bevorzugen die 37°C, wie sie typischerweise für Säugerzellen eingestellt werden. Ist eine Zelldichte auf der Oberfläche der Zellkulturflasche von etwa 80 bis 90 Prozent erreicht, werden die Zellen passagiert, d.h., mit Enzymen von ihrer Oberfläche gelöst und nach anschließender Zentrifugation und Resuspendierung in neue, entsprechend größere Zellkulturflaschen überführt. Nachdem mindestens fünf Passagen vollzogen sind, überführt man die nun vielfach vermehrten Zellen in kleinen Portionen in den Kryokonservierungstank. Mit einem Teil der Zellen kann die Forschung arbeiten. Ein zweiter Pool bildet die Biobank zur Erhaltung der Information der Arten. Die Vermehrungspotenz der Zellen ist beeindruckend. So zeigen beispielsweise Zellen aus der Kopfniere des sibirischen Störs selbst nach 35 Passagen keine Einbußen der Teilungsfreudigkeit.

Das Einfrieren in flüssigem Stickstoff ist allerdings kein natürlicher Prozess und somit muss man die Zellen vor solch extremen Umgebungsveränderungen schützen. Da ihnen jegliche Gewebeintegrität fehlt und schon gar keine Regulation über die Homöostase eines Organismus stattfinden kann, ist dies einer der sensibelsten Punkte für die Kryokonservierung. Dementsprechend besteht das Einfrieremedium neben 90% (v/v) fötalem Kälberserum auch zu 10% (v/v) aus Dimethyl-Sulfoxid, das die Bildung großer Eiskristalle beim Abkühlen auf -145°C in der Zelle und ihrer Umgebung verhindert. Viel Know-how liegt in den optimalen Einfrierprotokollen der Fraunhofer- Einrichtungen.

Vielfältige Anwendungen für kryoarchivierte Zellen

Die Methode der Archivierung biologischer Vielfalt durch Lebendzellablage ist nicht nur kostengünstig und effektiv, sondern bietet für die Zukunft Depots an biologischem Material für vielfältige wissenschaftliche Fragestellungen, auch wenn es sich nur um Einzelzellen handelt. Einige Beispiele: (1) Neben den bisher dominierenden evolutionsbiologischen Analysen wird es möglich, sich gezielt Erbinformationen nutzbar zu machen, denkt man beispielsweise an Resistenzgene gegen Viren. (2) Die gezielte Differenzierung in verschiedene Zelltypen ermöglicht einen Einsatz als Testsysteme für Pharmaka wie Xenobiotika oder andere Medikamente. (3) Zur Untersuchung von Umweltgiften

stellen sie eine attraktive Alternative zum lebenden Tier dar. (4) Artsspezifische Infektionserkrankungen können mit den verfügbaren Zellen nicht nur diagnostiziert und studiert, sondern, nutzt man die Zellen als Testsystem für die Vaccinentwicklung, auch bekämpft werden. (5) Entschlüsselt man die Gensequenzen und charakterisiert den Zellmetabolismus, hat man die umfangreichste Information über die entsprechende Art, die zurzeit möglich ist. Diese hier beispielhaft aufgezeigten vielfältigen Möglichkeiten, die eine solche Bibliothek lebender Zellen bietet, zeigen eindrucksvoll die längst bestehende Notwendigkeit für den Aufbau entsprechender Sammlungen. Es ist ein generationenübergreifendes Projekt – wir sammeln heute für unsere Kinder und Kindeskiner, wie es unsere Vorfahren in den naturkundlichen Sammlungen getan haben.

Aus all den hier beschriebenen Ansätzen wird ersichtlich, dass diese lebende Bibliothek in unserer Zeit nicht reproduktionsorientiert eingesetzt werden soll und auch keinen Ersatz für zoologische Gärten oder gar den Umwelt- und Artenschutz darstellt. Es ist ein fundamentales Bestreben des

„Cryo-Brehm“, eine Lebendbibliothek der Vertebraten unserer Biosphäre möglichst umfangreich aufzubauen und gleichzeitig die Zusammenarbeit mit wissenschaftlichen Einrichtungen in aller Welt im Rahmen ihrer Aufzuchtprogramme für seltene Tierarten zu festigen und ihnen mit intensiver molekular- und zellbiologischer Forschung unterstützend zur Seite zu stehen.

→ anja.richter@emb.fraunhofer.de

Literatur

[1] Kruse, C., J. Kajahn, et al. (2006). "Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures." *Ann Anat* 188(6): 503-17.

take home

Historische zoologische Sammlungen dokumentieren bis heute die Artenvielfalt in vielen wertvollen Archiven. Mittels automatisierter Kryokonservierung ist es möglich, lebende Zellen (Stammzellen) verschiedenster Tiere zu archivieren und so für die Nachwelt zu erhalten.

Cryo-Brehm
Deutsche Zellbank für Wildtiere "Alfred Brehm"



Stetig nimmt die Zahl bedrohter Tierarten zu. Der europäischen Bevölkerung ist dies zwar zunehmend bewusst, jedoch existieren aktuell nur wenige erfolgreiche, vor allem ausreichend komplexe Ansätze zur Erhaltung einzelner Arten. Die deutsche Zellbank für Wildtiere „Alfred Brehm“ archiviert unter der Leitung von Prof. Günter R. Fuhr, Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) in St. Ingbert und Prof. Charli Kruse, Fraunhofer-Einrichtung für Marine Biotechnologie (EMB) in Lübeck, an zwei Standorten auf 500 m² Stammzellen verschiedenster Tiere mittels automatisierter Kryokonservierung und erhält sie so für die Nachwelt in einer nahezu kompletten Lebenddokumentation.

Weitere Informationen und Kontakt über: www.emb.fraunhofer.de

Frischer Wind für Ihre Abrechnung!

innovativ & zuverlässig



GELD-ZURÜCK-GARANTIE

BFS – die innovative tierärztliche Verrechnungsstelle

- 100% Ausfallschutz
= finanzielle SICHERHEIT für Ihre Praxis!
- Kostenlose TEILZAHLUNGEN für Ihre Kunden
= hochwertige Behandlungen werden bezahlbar!
- Administrative ENTLASTUNG
= mehr Zeit für das Wesentliche!
- Und vieles mehr ...

Kontaktieren Sie uns.
Wir senden Ihnen gerne ausführliches Informationsmaterial zu:

BFS health finance GmbH | Schleefstraße 1
44287 Dortmund | Telefon 0231 945362-800
Telefax 0231 945362-888 | E-Mail: info@bfs-hf.de

www.bfs-hf.de

BFS finance