

Etablierung einer (Stamm)-Zellbibliothek wilder Tierarten

Von der Zellisolation bis zur Kryokonservierung

Die Fraunhofer-Einrichtung für Marine Biotechnologie und das Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik haben 2004 eine Zellbank gegründet, die sich darauf spezialisiert hat, Stammzellen aus Wildtieren zu archivieren. Im Juni 2008 erhielt diese die offizielle Bezeichnung „Cryo-Brehm“ – Deutsche Zellbank für Wildtiere „Alfred Brehm“. Über ein patentiertes Verfahren werden dafür Stammzellen aus glandulären Geweben isoliert und für die Zukunft kryokonserviert.



Abb. 1: Eine Kopie der Zellen des Lübecker „CRYO-BREHM“ befindet sich in den Kryobehältern der hochmodernen Forschungsbiobank des Fraunhofer IBMT in Sulzbach (Saarland)..

Seit Jahrhunderten bildet das Sammeln und Beschreiben von Proben und Organismen die Basis vieler Wissenschaften wie etwa der Geologie oder Biologie. Mineraliensammlungen und naturkundliche Kabinette bergen wertvolle Materialien, von denen viele ohne die sorgfältige Archivierung unserer Vorfahren unwiederbringlich verloren gegangen wären.

Wollte man das sich stets wandelnde Artenspektrum für die Nachwelt möglichst genau dokumentieren, würde die physiologische und molekulare Beschreibung, die Sequenzierung des Genoms und die Charakterisierung des Stoffwechsels aller Arten Jahre erfordern. Derzeit gibt es für Pflanzen und Tiere, die größer als ein Kubikmillimeter sind, keine Möglichkeit der kompletten Lebendkonservierung. Für Zellen nahezu jeder Herkunft ist dies zweifellos möglich. Zellen

beinhalten alle Informationen über den jeweiligen Organismus, wie Genom, Transkriptom, Proteom etc. Neben differenzierten Zellen besitzt zumindest jedes Wirbeltier Stammzellen, die nicht oder kaum spezialisiert sind und eine hohe Teilungsfähigkeit aufweisen. Damit liefern Stammzellen derzeit die höchste Qualität und vollständigste Dokumentation eines Organismus.

Die Konservierung von Stammzellen verschiedenster Tierarten haben sich die Fraunhofer-Einrichtung für Marine Biotechnologie (EMB) in Lübeck und das Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) in St. Ingbert zur Aufgabe gemacht. Entwicklung und Optimierung von Verfahren zur Gewinnung von Stammzellen aus unterschiedlichen Geweben für die Biotechnologie und Medizin ist eines der Forschungsfelder der



Dipl.-Biol. Stephanie Langner links und M. Sc. Anna Emilia Petschnik rechts, Naturwissenschaftliche Doktorandinnen, Fraunhofer EMB

Fraunhofer EMB. In Kooperation mit dem Tierpark Hagenbeck und den Zoologischen Gärten Rostock und Neunkirchen, sowie der Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei in Born/Darß isolieren die Wissenschaftler hochproliferative Zellen aus Gewebeproben die den Tieren post mortem entnommen werden. Hauptsächliche Organquellen für die Stammzellen sind Pankreas, Speicheldrüse und Haut [1, 2, 3].

Stammzellisolation aus glandulären Geweben

Typische Stammzeleigenschaften sind u. a. die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und das Potential, sich zu spezialisierten Zelltypen zu entwickeln. Glanduläre Stammzellen, insbesondere jene aus dem Pankreas, zeichnen sich überdies durch eine erhöhte Proliferationsrate und pluripotente Differenzierungseigenschaften aus, die für Mensch, Maus und Ratte bereits bewiesen wurden [1, 5, 6]. Um die Stammzellen aus dem Organverband zu isolieren, wird das Gewebe (~2 cm³) zunächst in kleine Fragmente geschnitten, von Fett befreit, und in zwei Schritten in einem Kollagenase supplementierten Medium verdaut. Dazwischen werden verbliebene Gewebestücke gespült und mit chirurgischen Scheren mechanisch zerkleinert. Im Anschluss werden restliche Gewebefragmente durch Auf- und Abpipettieren weiter dissoziiert und durch eine Nylonmembran gefiltert. Nach Zentrifugation und weiterer Reinigungen

werden die Zellen ausgesät und in Dulbecco's modified Eagle's medium, welches mit fötalem Kälberserum (FKS) und Antibiotika angereichert ist, bei entsprechender Temperatur kultiviert. In der Regel werden die Zellen bis zu fünf Mal passagiert, bis sie in Einfriermedium, bestehend aus 90% (v/v) FKS und 10% (v/v) Dimethyl-Sulfoxid, bei -145°C kryokonserviert werden. Langzeitkulturen, etwa mit Stammzellen aus der Kopfniere des Sibirischen Störs, zeigen, dass auch nach 35 Passagen das Proliferationspotential nicht abnimmt und die Zellen so über viele Passagen weiter kultiviert werden können.

Kryokonservierung

Seit mehr als 50 Jahren werden hauptsächlich Spermien, Eizellen und Zellsuspensionen kryokonserviert und können ohne große Beeinträchtigung der Vitalität aufgetaut werden. Da das Einfrieren von Zellen kein natürlicher Vorgang ist, muss dem Einfriermedium ein Gefrierschutzmittel zugegeben werden, welches die Bildung großer Eiskristalle innerhalb und außerhalb der Zelle verhindert.

In den letzten Jahren hat die Entwicklung der Kryokonservierung große Fortschritte gemacht, da sie für den Erhalt von Stammzellen und deren medizinische Nutzung im Rahmen individueller Zelltherapien immer wichtiger wurde. Am Fraunhofer IBMT werden Geräte und Verfahren zur Kryokonservierung von Zellen sowie Konzepte für die Ablage in großen automatisierten Kryobanken entwickelt. So können die Wildtierstammzellen in hochmodernen „Eisbibliotheken“ gelagert und erfasst werden (Abb. 1). In elektronisch identifizierbaren Kryoröhrchen werden Millionen Zellen eines Tieres in automatisch überwachten Kryotanks, die mit flüssigem Stickstoff auf -145°C gekühlt werden, abgelegt. Die Besonderheit liegt darin, dass sich jede Probe in einem Kryoröhrchen befindet, welches fünffach markiert ist, um Verwechslungen auszuschließen. Zu den Markierungsmöglichkeiten gehören unter anderem eine magnetisch lesbare Radar Data Interchange Format (RFID)-Kennung, sowie ein elektronischer Speicherchip im Sockel des Kryoröhrchens, auf dem Informationen über die Probe gespeichert werden können. Mit wachsender Zahl der abgelegten Arten ist mittlerweile eine „lebende Bibliothek“ entstanden, in der die gesamte Information über die Art und speziell über das jeweilige Spendertier archiviert ist.

Nach dem deutschen Zoologen Alfred Brehm, der mit „Brehms-Tierleben“ eine Beschreibung und Sammlung aller be-

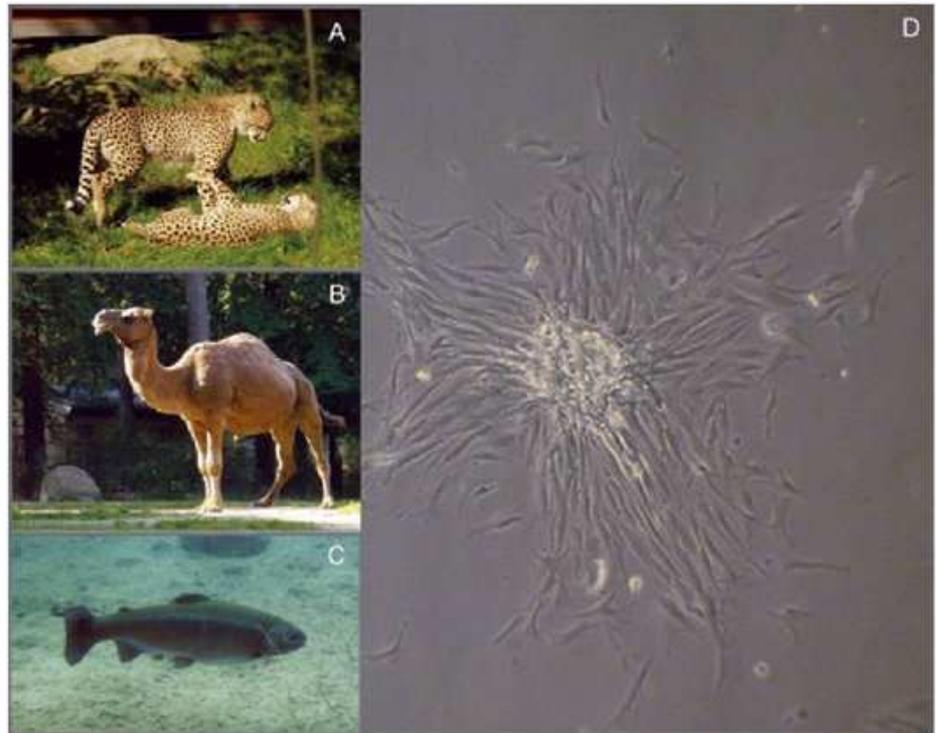


Abb. 2: Der „Cryo-Brehm“ beherbergt neben Zellen von Säugetieren wie dem Geparden (A) und dem Dromedar (B), auch Vogelstammzellen etwa vom Weißnacktenkranich und Zellen von Fischen wie der Regenbogenforelle (C) und Zellen des Zanders (D).

kannten Tiere geschaffen hat, werden nun in Lübeck und Sulzbach (Saarland) unter dem Namen „Cryo-Brehm“ – Deutsche Zellbank für Wildtiere „Alfred Brehm“ Stammzellen aus Wildtieren archiviert. Neben Zellen von Säugetieren, wie dem Schneeleopard oder dem Dromedar, sind auch Vogelzellen z. B. vom Weißnacktenkranich oder dem Steinkauz, aber auch Fischzellen von der Regenbogenforelle und dem Sibirischen Stör in der Sammlung zu finden (Abb. 2). Die Erhaltung der Biodiversität und der Umwelt muss den Grundprinzipien der Natur, also dem steten Wandel und der Anpassung, gerecht werden. Der „Cryo-Brehm“ ist daher kein Ersatz für zoologische Gärten oder den Umweltschutz. Ebenso ist er keine reproduktionsorientierte Bank, sondern die konsequente Ergänzung zur Bewahrung der Natur und stellt die effektivste und die kostengünstigste Form der Erfassung der jeweils vorhandenen Biodiversität dar. In einer Kryobank von etwa 500 m² Fläche können Zellen tausender Arten in vielfachen Kopien abgelegt werden. Dies bedeutet gleichzeitig, dass die Zellen für unterschiedlichste wissenschaftliche Fragestellungen bereitgehalten werden und so einen enormen Wert für die Forschung darstellen. In der Grundlagenforschung könnten diese Zellen bei der Untersuchung von evolutionsbiologischen Fragestellungen von großem Nutzen sein. Darüber hinaus wäre eine Nutzbarmachung bestimmter Gensequenzen, etwa von Resistenzgenen, denk-

bar. Von außerordentlicher Bedeutung könnte die schnelle Mobilisierung der Zellen bei einer Epidemie sein, wenn die Zellen als Testsysteme zum Erforschen und Erproben neuer Medikamente zum Tragen kommen. Des Weiteren könnten solche Testsysteme aufschlussreiche Erkenntnisse über die Auswirkungen bestimmter Gifte auf Wildtiere liefern. Somit stellt der „Cryo-Brehm“ eine wichtige Sammlung robuster Stammzelllinien dar, die neben der Lebendarchivierung der genetischen Vielfalt von Vertebraten auch zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten bietet, deren volle Tragweite vermutlich erst in Zukunft ersichtlich wird.

Referenzen

- [1] Kruse C. *et al.*: *Ann. Anat.* 188 (6), 503–517 (2006)
- [2] Sato A. *et al.*: *Cloning Stem Cell* 9, 191–205 (2007)
- [3] Yu H. *et al.*: *Am. J. Pathol.* 168, 1879–1888 (2006)
- [4] Seaberg R. M. *et al.*: *Nat. Biotechnol.* 22, 1115–1124 (2004)
- [5] Choi Y. *et al.*: *Stem Cells* 22, 1070–1084 (2004)

Kontakt

Dipl.-Biol. Stephanie Langner
 M. Sc. Anna Emilia Petschnik
 Fraunhofer EMB
 Lübeck
 Tel.: 0451/384448-16
 Fax: 0451/384448-12
 stephanie.langner@emb.fraunhofer.de
 anna.petschnik@emb.fraunhofer.de