

Untersuchung und Archivierung von Stammzellen aus Wildtieren; hier: Schneeleopard (*Uncia uncia*) und Rothschildgiraffe (*Giraffa camelopardalis rothschildi*)

Examination and recording of stem cells from wild animals; here: Snow Leopard (*Uncia uncia*) and Giraffe (*Giraffa camelopardalis rothschildi*)

Philipp Ciba^a, Stephan Hering-Hagenbeck^b, Udo Nagel^c, Charli Kruse^{a,*}

^a Fraunhofer Institut für marine Biotechnologie, Paul-Ehrlich-Straße 1-3, D-23562 Lübeck

^b Tierpark Hagenbeck Gemeinnützige GmbH, Lokstedter Grenzstraße 2, D-22527 Hamburg

^c Zoologischer Garten Rostock Gemeinnützige GmbH, Rennbahnallee 21, D-18059 Rostock

Eingegangen am 24. Oktober 2009

Abstract

Adult stem cells are characterized by the ability to maintain their population through cell division and concomitantly generate specialized somatic cell types through differentiation. Stem cells generated from the adult pancreas proliferate rapidly *in vitro* and are able to develop into cell types of all three germ layers Kruse et al. (2004). Therefore, these cells are suitable for the application in basic research and applied science. *In vitro*, cells enable the analysis of various scientific subjects under standardized conditions. For instance, they can be applied to establish species specific test systems and diagnostic tools for the assessment of compounds, like pharmaceuticals and xenobiotics, or pathogens. Also, they can be used to investigate how the aforementioned factors act on the cellular level. The detection of specific proteins provides information about the differentiation potential of stem cells and the vitality of the cells. Alterations of these parameters are applicable for the evaluation and analysis of the effect of exogenic factors on cells and the organism. In cooperation with Hagenbecks Tierpark in Hamburg and the zoological gardens in Rostock and Neunkirchen, the Fraunhofer institution for marine biotechnology (EMB) has initiated the establishment of an archive for proliferative cells from wildlife animals. The tissue specimens for the isolation of the cells originate from deceased animals or placental tissue. The archive is continuously growing. Cells from various wildlife animals are

*Korrespondierender Autor. Tel.: +49 451 2903 210; fax: +49 451 2903 213.

E-mail address: charli.kruse@emb.fraunhofer.de (C. Kruse).

added regularly and are permanently stored and cryoconserved. In this study, we report the cultivation and molecular characterisation of adult proliferative cells from a snow leopard (*Uncia uncia*). The characterization was performed detecting cell type specific and metabolism related proteins by means of immunocytochemistry.

Keywords: Adult stem cells; Cryoconservation; Cell culture; Cell biology; Protein expression; Test system; Biodiversity

Einleitung

Adulte Stammzellen sind Zellen, die sich in verschiedenen Geweben erwachsener Organismen befinden, wo sie für den Ersatz untergegangener Zellen verantwortlich sind. Isoliert man solche Zellen aus ihrem Ursprungsgewebe und überführt sie in die Zellkultur, können verschiedene interessante Eigenschaften beobachtet werden. Wesentliche Merkmale sind ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch Zellteilung sowie zur Differenzierung in spezialisierte Körperzellen. Aufgrund dieser Eigenschaften eignen sich adulte Stammzellen, um Zellsammlungen mit einem breiten wissenschaftlichen Anwendungsspektrum anzulegen. Die in jeder Zelle enthaltene genomische DNA ermöglicht die vollständige Dokumentation der genetischen Information des Individuums und der ganzen Art. Aufgrund der Vitalität und Selbsterneuerungsfähigkeit der Zellen kann diese Information immer wieder vervielfältigt werden. Darüber hinaus können lebend abgelegte Zellen zur Untersuchung vielfältiger zellphysiologischer und biochemischer Fragestellungen verwendet werden. In dieser Studie wird die Möglichkeit der zellbiologischen Analyse mittels einer immunocytochemischen Färbung, mit der spezifische Proteine in den Zellen nachgewiesen werden können, anhand von adulten Stammzellen eines Schneeleoparden (*Uncia uncia*) aufgezeigt. Diese Technik erlaubt es zum Beispiel, zelluläre Testsysteme zur Beurteilung der Verträglichkeit und Wirkung von Pharmaka und Xenobiotika oder zum Nachweis und dem Studium artspezifischer Pathogene zu entwickeln.

Material und Methoden

Isolation von Stammzellen und Zellkultur

Eine Gewebeprobe von ca. 15 mm × 15 mm aus dem Pankreas eines 20 Tage alten Schneeleoparden, der in Folge einer Atemwegsinfektion gestorben war, wurde zur Stammzellisolation mittels eines zuvor beschriebenen, patentierten Verfahrens behandelt (Kruse et al., 2004). Die isolierten Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit Dulbecco's Modified Eagle Medium, angereichert mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin, bei 37 °C unter 5% CO₂ kultiviert. Vor dem Erreichen vollständiger Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden die Zellen mittels einer Lösung aus Trypsin/EDTA in Suspension gebracht und im Verhältnis 1:3 in neue Kulturschalen überführt bzw. für die mikroskopische Untersuchung in Objektträger ausgesät. Für die Analyse nicht benötigte Zellen wurden weiter vermehrt und zur Kryokonservierung verwendet.

Kryokonservierung

Um Zellen bei Tiefsttemperaturen lebend zu konservieren, wurden sie in Einfriermedium mit einer Temperatur von 4 °C, bestehend aus 10% Dimethylsulfoxid (Sigma) in FKS, aufgenommen und anschließend in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in eine auf 4 °C vorgekühlte Isopropanolbox eingebracht, und in dieser in einem Tiefkühlschrank mit 1 °C/Minute auf eine Temperatur von –80 °C heruntergekühlt. Anschließend wurden die Kryoröhrchen bei Tiefsttemperaturen in der Atmosphäre flüssigen Stickstoffs gelagert.

Rekultivierung kryokonservierter Zellen

Die in Kryoröhrchen befindlichen Zellen wurden in einem Wasserbad mit einer Temperatur 37 °C schnell aufgetaut und in Kulturmedium aufgenommen. Um das Einfriermedium zu entfernen, wurde die Suspension zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in geeignete Zellkulturgefäße überführt und im Brutschrank kultiviert.

Mikroskopische Analyse

Zum Nachweis von Proteinen mittels immunocytochemischer Färbung wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten mit einer auf –20 °C temperierten Lösung aus Methanol/Aceton (7:3), die den Kernfarbstoff DAPI enthielt, fixiert und permeabilisiert und so der Zellkern angefärbt. Anschließend wurde dreimal mit PBS gespült, um die Fixierungslösung zu entfernen. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine 20 minütige Inkubation mit Ziegennormalserum, das im Verhältnis 1:60 in PBS verdünnt wurde. Nun erfolgte die Reaktion mit den Erstantikörpern, die in geeigneter Verdünnung in TBST+0,1% BSA zu den Zellen gegeben wurden und bei 37 °C in einer feuchten Kammer für eine Stunde inkubierten. Danach wurde dreimal mit PBS gespült und die fluorophormarkierten Zweitantikörper, verdünnt in PBS, aufgetragen. Diese wurden bei 37 °C in einer feuchten Kammer für eine Stunde inkubiert, die Reaktionslösung wurde abgesaugt, die Präparate mit PBS gewaschen, kurz mit destilliertem Wasser gespült und mit Vectashield (Vector Labs) eingedeckt.

Folgende Primärantikörper wurden verwendet: Kaninchen polyklonal anti-human Neurofilament-L, 1:500 (Serotec); Maus monoclonal anti-human α -SMA, 1:100, (DAKO, M0851); Kaninchen polyklonal anti-Vigilin, 1:200 (nicht kommerziell erhältlich); Maus monoklonal anti-KollagenII, 1:20 (DSHB, II-II6b3); Kaninchen polyklonal anti-human Amylase, 1:100 (Calbiochem, 171534); Maus monoclonal anti-Insulin, 0,5 μ g/ml (Dianova 7663); Kaninchen polyklonal anti-human Nestin, 1:250 (Abcam 5968); Maus monoklonal anti-Cytokeratin18, 1:800 (Sigma, C8541). Die folgenden Sekundärantikörper wurden verwendet: FITC-konjugierter anti-Kaninchen IgG, 1:200 (Dianova); Cy3-konjugierter anti-Maus IgG, 1:400 (Dianova).

Ergebnisse

Aus der Pankreasbiopsie wurde eine Zellpopulation isoliert, die *in vitro* kultiviert und aufgrund der schnellen und anhaltenden Proliferation stark expandiert werden konnte. Nach fünf Tagen in der Zellkultur etablierte sich eine adhärent wachsende Zellpopulation. Diese konnte am 21. Tag nach der Isolation erstmals passagiert, d.h. verdünnt und in neuen Kulturgefäßen weiter vermehrt werden. 30 Tage nach der Präparation war eine ausreichende Menge an Zellen vorhanden, um die ersten Proben zur Kryokonservierung zu verwenden. Die Zellpopulation konnte in der folgenden Kulturperiode alle acht Tage passagiert werden. Die Propagation der Zellen wurde bis zur 7. Passage durchgeführt, was die Herstellung eines umfangreichen Bestandes von Zellen ermöglichte, die zur Kryokonservierung bzw. zur zellbiologischen Analyse verwendet wurden. Auch konnten kryokonservierte Zellen aufgetaut, wieder in Kultur genommen und weiter vermehrt werden, ohne dass eine Beeinträchtigung hinsichtlich der Vitalität der Zellen und ihrer Kultivierbarkeit zu beobachten war.

Die immunocytochemische Färbung der Zellen (Abb. 1) zeigte, dass die zur spezifischen Markierung unterschiedlicher Proteine verwendeten, kreuzreaktiven Erstantikörper in verschiedenem Maße an die in den Leopardenzellen exprimierten Proteinen banden. Gegen die Strukturproteine von Nervenzellen (Neurofilament) bzw. glatten Muskelzellen (α -smooth muscle actin, α -SMA) gerichtete Antikörpern führten zur Darstellung ausgeprägter Strukturen mit filamentärer Morphologie, die in einem großen Teil der Zellen detektiert wurden. Das globuläre, cytoplasmatische Protein Vigilin, welches an generellen Transportprozessen innerhalb der Zellen beteiligt ist, wurde in nahezu allen Zellen nachgewiesen. Mit dem gegen das knorpeltypische Protein Kollagen II gerichteten Antikörper wurden vereinzelt Zellen angefärbt. Antikörper, die zum Nachweis der pankreatischen Proteine Insulin und Amylase dienten, ließen die Expression des im exokrinen Pankreas sezernierten Verdauungsenzyms α -Amylase erkennen, wohingegen sich kein Hinweis auf das Vorhandensein des Peptidhormons Insulin ergab, welches im endokrinen Teil des Pankreas gebildet wird. Die Expression des Strukturproteins Nestin, das als Marker für adulte Stammzellen gilt, wurde in einer Vielzahl von Zellen aufgezeigt, während die Färbung mit einem Antikörper gegen Cytokeratin18 keinen Hinweis auf die Expression dieses, ebenfalls für adulte Stammzellen typischen, Proteins ergab. In der durchgeführten Methodenkontrolle (nicht dargestellt) ergab sich keine Färbung, das heißt es wurde kein Fluoreszenzsignal erhalten.

Diskussion

Stammzellen sind unspezialisierte Zellen, die sich durch die Fähigkeiten zur Selbsterneuerung ihres Bestandes mittels Zellteilung sowie zur Bildung spezialisierter Tochterzellen auszeichnen. In der Entwicklung des Organismus wird so, ausgehend von der Zygote, die Bildung von Milliarden Zellen der etwa 220 verschiedenen Zelltypen eines Organismus bewerkstelligt. Diese Leistungen ermöglichen es, in den Geweben des adulten Organismus Reservoirs von Stammzellen aufrecht zu erhalten, aus dem permanent neue, spezialisierte Körperzellen hervorgehen können. So wird die Homöostase und die Regeneration von

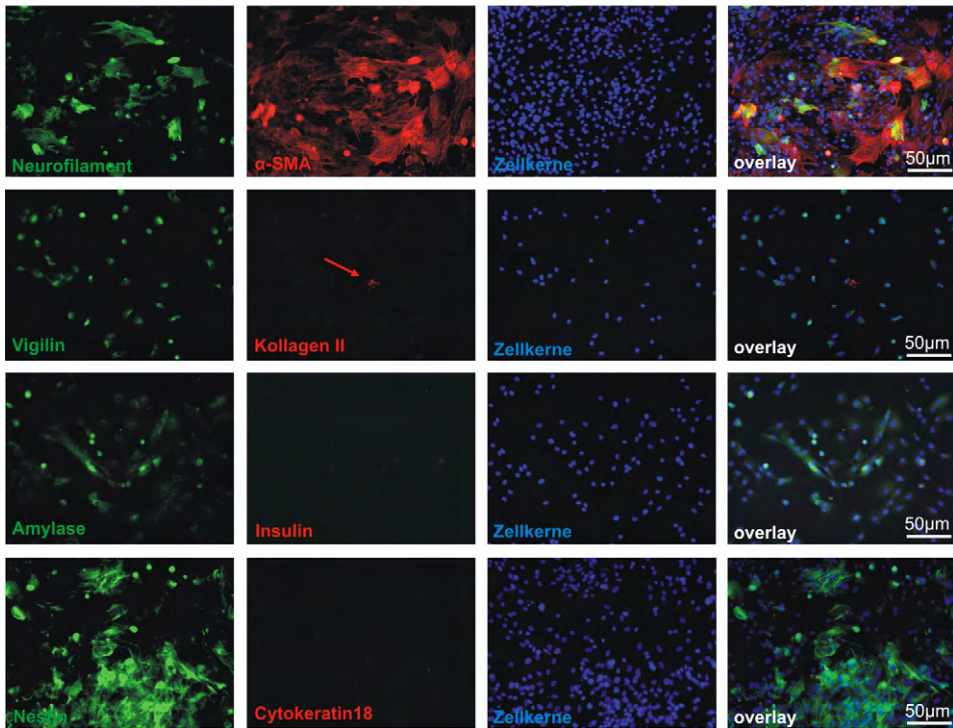


Abb. 1. Immunocytochemische Färbung von adulten pankreatischen Stammzellen eines Schneeleoparden: Jede Probe wurde mittels einer Doppelfärbung hinsichtlich der Expression von zwei Proteinen untersucht (Neurofilament/ α -SMA, Vigilin/KollagenII, Amylase/Insulin, Nestin/Cytokeratin18). In Reihen sind die Aufnahmen der Farbkanäle auf identischen Bildausschnitten abgebildet, die der Darstellung der spezifisch markierten Proteine bzw. der Zellkerne dienen sowie eine Überlagerung der einzelnen Aufnahmen (overlay). Anhand der Überlagerung lässt sich die Koexpression von rot bzw. grün markierten Proteinen in einer Zelle erkennen und durch die Lokalisation der Zellkerne einer bestimmten Zelle zuordnen (Vergrößerung: 20 \times).

Gewebe gewährleistet, sowie im Rahmen von Entwicklungsprozessen neues Zellmaterial bereit gestellt, das zusätzlich ins Gewebe integriert. Zellen mit den genannten Fähigkeiten finden sich in diversen Organen adulter Vertebraten, z.B. in Haut, Knochenmark, Darm und Gehirn. Exokrine Drüsen wie das Pankreas haben sich als Quelle in vitro besonders proliferativer und differenzierungsfreudiger adulter Stammzellen erwiesen. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen sind diese leicht verfügbar und mit geringerem Aufwand im Labor zu kultivieren.

Durch die Verfügbarkeit der in jeder Zelle enthaltenen Erbinformation ist die Möglichkeit genetischer Analysen, z.B. phylogenetischer Studien, gegeben. Daneben besitzen Stammzellkulturen ein sehr breites Anwendungsspektrum. So ermöglichen sie z.B. den Nachweis und die Analyse artspezifischer Pathogene, die Aufklärung pathobiochemischer Vorgänge, die Entwicklung und Erprobung von Pharmaka und Vakzinen oder die Untersuchung ökotoxikologischer Faktoren. Zu diesem Zweck ist es erforderlich, geeignete Parameter zur

Untersuchung und Beurteilung der Zellen zu definieren. In dieser Studie stellen wir eine experimentelle Technik vor, mittels der eine solche Beurteilung möglich ist. Die immunocytochemische Analyse basiert auf dem Nachweis der Expression bestimmter Proteine, die spezifisch in unterschiedlichen Zelltypen vorkommen. So kann der Stammzellzustand durch charakteristisch in Stammzellen vorkommende Eiweiße, bzw. die Differenzierung in spezialisierte Körperzellen anhand der Expression gewebe- bzw. zelltypspezifischer Proteine nachgewiesen werden. Des Weiteren können Marker detektiert werden, die z.B. Auskunft über die Aktivität des Metabolismus der Zellen geben, wie das Protein Vigilin, das am tRNA-Transport beteiligt und nur in translational aktiven Zellen zu finden ist.

Die in dieser Studie nachgewiesenen Neuro- und Muskelfilamente (α -SMA) belegen die Differenzierung der Zellen in Nervenzellen bzw. glatte Muskelzellen. Des Weiteren fiel der Nachweis des Verdauungsenzyms α -Amylase positiv aus, das von spezialisierten Zellen des exokrinen Pankreas synthetisiert wird, während sich kein Hinweis auf eine Differenzierung in insulinproduzierende Zellen des endokrinen Pankreas fand. Vigilin wurde in allen Zellen nachgewiesen, was die Stoffwechselaktivität der Zellpopulation aufzeigte. Der Nachweis des für Knorpelzellen typischen Typ II Kollagen fiel bei einem geringen Anteil der Zellen positiv aus. Das Vorhandensein des filamentären Proteins Nestin, welches als Marker für adulte Stammzellen gilt, wurde durch die Färbungen angezeigt, während Cytokeratin18, welches von unterschiedlichen Typen adulter Stammzellen von Vertebraten exprimiert wird, in dieser Zellpopulation nicht nachgewiesen wurde (Abb. 1). Das vorgefundene Expressionsmuster entspricht dem typischen Bild von primären *in vitro* Kulturen adulter Stammzellen z.B. humaner oder muriner Herkunft. Diese weisen stets ein Gemisch aus undifferenzierten Stammzellen sowie den daraus hervorgegangenen spezialisierten Gewebezellen auf, die zu unterschiedlichen Anteilen in einer Zellpopulation vertreten sind. Die Befunde zeigen das spontane Differenzierungsspektrum der pankreatischen Schneeleopardenstammzellen *in vitro* an und implizieren weit gefächerte Anwendungsmöglichkeiten.

Die Schwierigkeit bei der Untersuchung von Zellen von Wildtieren besteht darin, dass die zur Verfügung stehenden Reagenzien, z.B. die zur Markierung spezifischer Proteine verwendeten Antikörper, in der Regel für menschliche Zellen bzw. Zellen typischer Labororganismen, wie Maus, Ratte und Kaninchen optimiert sind, und ihre Spezifität in anderen Organismen zunächst bestätigt werden muss. Die Tatsache, dass viele Proteine zwischen den Arten strukturell stark konserviert sind, erlaubt es, kreuzreaktive Antikörper für die Untersuchung von Zellen verschiedener Organismen anzuwenden. In dieser Studie zeigen wir, dass eine immunocytochemische Untersuchung von Zellen einer selten im Labor untersuchten Tierart, dem Schneeleopard, mittels kreuzreaktiver Antikörper möglich ist. Stets wurde nur ein Teil der Zellen durch die jeweiligen Erstantikörper markiert, was eine spezifische Bindung der Antikörper nahe legte. Die Morphologie, die sich darstellte, entsprach dem Bild, welches aufgrund der Struktur des nachzuweisenden Proteins zu erwarten war. Die Kontrollfärbungen (nicht dargestellt) fielen stets negativ aus, d.h. sie lieferten kein Fluoreszenzsignal, welches auf ein unspezifisches Binden des fluorophormarkierten Antikörpers zurückzuführen wäre.

Veränderungen im Expressionsmuster oder Einbußen in der Vitalität als Reaktion auf exogene Einflüsse wie Xenobiotica oder Pharmaka können Auskunft über die artspezifische Verträglichkeit solcher Substanzen geben. Die Verwendung von Stammzellkulturen ermöglicht es, wissenschaftlichen Fragestellungen unter standardisierten Bedingungen *in*

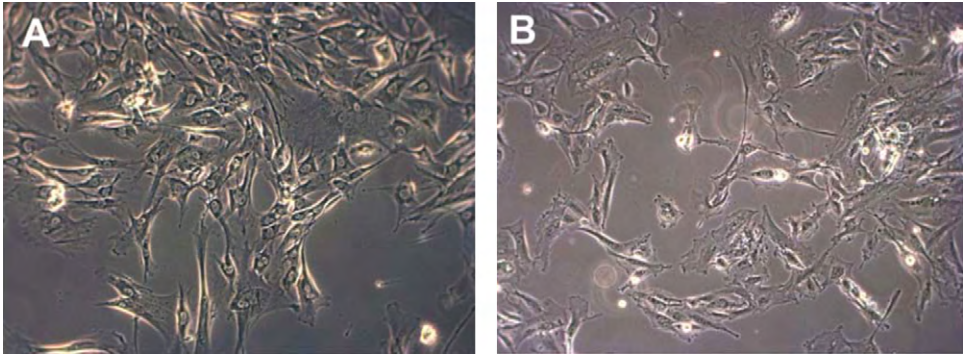


Abb. 2. A und B. Mikroskopische Aufnahmen (Phasenkontrast) von adulten Stammzellen in der Zellkultur. Dargestellt sind pankreatische Stammzellen eines Schneeleoparden (A) und vermehrungsfähige Plazentazellen einer Rothschildgiraffe (B).

in vitro nachzugehen. Die Artspezifität, mit der Analysen durchgeführt werden können, stellt einen klaren Vorteil gegenüber der Verwendung von Zellen gängiger Labortiere dar.

In der jüngeren Vergangenheit wurde durch die Fraunhofer EMB und Hagenbecks Tierpark und den Zoos Rostock und Neunkirchen ein Projekt ins Leben gerufen, das die Langzeitkonservierung vitaler Stammzellen unterschiedlichster Organismen bezweckt. Die hierfür erforderlichen Gewebeproben, z.B. aus der Haut, der Unterkieferspeicheldrüse dem Pankreas oder der Plazenta, stammen von verstorbenen Tieren bzw. fallen bei Geburten an und werden durch die angeschlossenen Tiergärten und Zoos zur Verfügung gestellt. Bis dato konnten bereits Stammzellen aus unterschiedlichen Geweben von etwa 60 Arten, isoliert, in der Zellkultur vermehrt und lebend in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden. Beispiele hierfür sind die adulten Stammzellen aus dem Pankreas eines Schneeleoparden (Abb. 2A) und Zellen aus dem Plazentagewebe einer Rothschildgiraffe (*Giraffa camelopardalis rothschildi*, Abb. 2B). Eine solche Sammlung stellt eine Rücklage an Probenmaterial für Grundlagenwissenschaft und angewandte Forschung dar, aus der jederzeit lebende Zellproben entnommen, *in vitro* vermehrt und zur Analyse sowie zur erneuten Kryokonservierung verwendet werden können. Aufgrund der Vermehrungsfähigkeit vieler Stammzelltypen kann so aus einer Gewebeprobe ein nahezu unbegrenzter Vorrat an Zell- bzw. Probenmaterial generiert werden. Der Bestand verbraucht sich also nicht, und ein Grundbestand an Proben bleibt stets erhalten. Da wir prinzipiell keine Zellen von lebenden Tieren gewinnen, ist der Aufbau dieser Sammlung ein langwieriger Prozess und kann nur funktionieren, wenn viele Partner zusammenarbeiten. Aus diesem Grund bitten wir alle interessierten Tierparks und Zoos, mit uns Kontakt aufzunehmen, um unser Vorhaben zu unterstützen.

Zusammenfassung

Die für Stammzellen typischen Eigenschaften sind die Fähigkeiten, ihren Bestand mittels Zellteilungen zu erneuern und in spezialisierte Tochterzellen zu differenzieren. Aus dem Pankreas gewonnene, adulte Stammzellen teilen sich sehr schnell und können *in vitro*

differenzierte Zelltypen aller drei Keimblätter hervorbringen. Aus diesen Gründen eignen sie sich zur Anwendung in Grundlagenwissenschaft und angewandter Forschung. Zellkulturen ermöglichen die experimentelle Untersuchung unterschiedlichster wissenschaftlicher Fragestellungen unter standardisierten Bedingungen. Des Weiteren können artspezifische Diagnose- und Analysesystemen zur Beurteilung des Effekts und zur Untersuchung der Wirkmechanismen z.B. von Umweltgiften, Pharmaka und Pathogenen auf zellulärer Basis entwickelt werden. Der Nachweis zelltypspezifischer und metabolismusspezifischer Proteine dokumentiert das Differenzierungsverhalten von Stammzellen und kann Auskunft über die Vitalität der Zellen geben. Veränderungen dieser Eigenschaften sind geeignete Parameter zur Untersuchung und Bewertung der Wirkung exogener Einflüsse auf die Zellen und den Organismus.

Die Lübecker Fraunhofer Einrichtung für marine Biotechnologie (EMB) hat begonnen, in Zusammenarbeit mit Hagenbecks Tierpark und den Zoologischen Gärten in Rostock und Neunkirchen, ein Archiv für vermehrungsfähige Zellen von Wildtieren zu erstellen. Die als Zellquelle dienenden Gewebeproben werden toten Tieren oder dem Plazentagewebe entnommen. Dem Archiv werden beständig Stammzellen unterschiedlicher Wildtiere hinzugefügt und dauerhaft lebend kryokonserviert. In dieser Studie wird die Kultivierung und Charakterisierung von adulten pankreatischen Stammzellen eines Schneeleoparden mit molekularen Methoden beschrieben. Diese basiert auf dem Nachweis zelltypspezifischer Proteine mittels einer immunocytochemischen Färbetechnik.

Danksagung

Dieses Projekt wird durch Mittel der EU (Europäischer Fonds für regionale Entwicklung) sowie die Possehlstiftung in Lübeck gefördert.

Schrifttum

Kruse, C., Birth, M., Rohwedel, J., Assmuth, K., Goepel, A., & Wedel, T. (2004). Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas. *Applied Physics*, 79(7), 1617–1624.