

Versuchsdurchführung: Zellbesiedlung von Spinnenseide (Gruppenpraktikum im Labor der medizinischen Hochschule Hannover)

Hintergrund:

In der rekonstruktiven Chirurgie besteht ein Bedarf an Ersatzgeweben um die funktionelle und strukturelle Gesundheit des Körpers aufrechtzuerhalten oder wiederherzustellen. Durch schwere Verletzungen, Tumoroperationen oder angeborene Anomalien kommt es zu Gewebeerlusten, die unter Umständen durch Eigen- oder Fremdgewebespenden nicht auszugleichen sind. Die Folgen sind teilweise massive Beeinträchtigungen des Erscheinungsbildes des Patienten, die seine gesellschaftliche Wiedereingliederung erschweren und sich negativ auf die Selbstwahrnehmung auswirken, sowie funktionelle Ausfälle, die entsprechende Behinderungen mit sich bringen.

Das Ziel einer interdisziplinären Forschungsrichtung, des Tissue engineering, ist es daher durch Züchtung von Ersatzgeweben für eine patientenschonende Abhilfe zu sorgen. Dabei sollen Zellen auf eine passende Matrix angesiedelt werden und durch eine Vielzahl von stimulierenden Bedingungen zur Bildung des entsprechenden Gewebes angeregt werden. Die Matrix muss dabei mehrere Bedingungen erfüllen, so darf sie nicht das Zellwachstum behindern und muss das Anheften der Zellen erleichtern. Sie muss körperverschmelzbar sein und darf keine massive immunologische Reaktion auslösen. Die schrittweise, langsame Abbaubarkeit der Matrix durch die körpereigenen Zellen soll im späten Heilungsverlauf dazu führen, dass das eingesetzte Gewebe nach und nach durch körpereigenes Gewebe vollständig abgelöst wird.

Die Spinnenseide bietet alle aufgezählten Vorteile. Neben einer großen Attraktivität für Zellen weist sie zudem auch noch günstige mechanische Eigenschaften auf, die dieses Material zu einer vielversprechenden Matrix im Tissue engineering werden lassen. Dazu ist es notwendig, dass durch entsprechendes Gewinnen und Verweben der Fäden Grundgerüste hergestellt werden, die mit den Zellen wunschgemäß besiedelt werden können. Im Versuch soll daher eine Matrix aus Spinnenseide hergestellt werden. Sie wird anschließend mit Fibroblasten besiedelt. Danach erfolgt eine Stimulation der Zellen mit biologischen aktiven Signalproteinen, die die Zellen unterschiedlich beeinflussen. Als Auswertung soll eine fluoreszenzbasierte Vitalfärbung (LIVE/DEAD Assay) vorgenommen werden. Der LIVE/DEAD Assay basiert auf der Tatsache, dass lebende Zellen einen zugesetzten nicht-fluoreszierenden Farbstoff durch Enzyme zu einem grün fluoreszierenden Farbstoff umwandeln. Tote Zellen dagegen nehmen einen Farbstoff auf, der durch die beschädigten Zellmembranen toter Zellen eindringen kann, aber nicht in lebende Zellen. Der Farbstoff verbindet sich mit den Nukleinsäuren des Zellkerns der toten Zellen und fluoresziert dann rot.

Versuchsdurchführung:

Block 1: Herstellen der Matrix.

Bereitstellen: Spinne, Kasten zum Einfangen, Mullbinde, Stecknadeln, Kurbelmaschine samt Auflage für die Spinne, Pinzetten, kleiner Rahmen zum Aufwickeln, Futtertier, Autoklav

Die Spinnen werden vorsichtig mittels einer kleinen Plastikbox aus dem Netz genommen. Dabei ist sorgfältig darauf zu achten, dass die Beine des Tieres nicht beschädigt werden. Um die Spinne besser handhaben zu können, wird sie eine Zeit bei 4°C gelagert, bis sie in eine Kältestarre fällt. Das Einsetzen der Starre ist durch häufige Blickkontrollen zu überprüfen.

Die Spinne wird dann auf dem Rücken liegend mittels einer Mullbinde und Stecknadeln so fixiert, dass der Hinterleib mit der Spinndrüse frei zugänglich ist, das Tier sich aber nicht herauswinden kann. Dabei ist wiederum sorgfältig darauf zu achten, dass das Tier nicht beschädigt wird.

Der aus der Spinndrüse hängende Faden wird mit einer Pinzette ergriffen und an der Kurbelmaschine befestigt. Die Maschine wird in Gang gesetzt und der Faden wird aufgekurbelt. Dabei sollte ein Rahmen so umwickelt werden, dass ein engmaschiges Gittermuster entsteht. Die Fadengewinnung wird bei zunehmender Unruhe des Tieres beendet. Die Spinne wird in ihr eigenes Netz zurückgesetzt und mit einem Futtertier belohnt.

Der umwickelte Rahmen wird vor der weiteren Verwendung autoklaviert.

Block 2: Zellbesiedlung:

Bereitstellen: Zellkulturarbeitsbank, Handschuhe, Wasserbad 37°C, Zellinkubator, Mikroskop, Absaugpumpe, 70% Ethanol in Sprühflasche, Zentrifuge, Zellkulturflasche mit Fibroblasten (NIH3T3), Zählkammer, Zentrifugenöhrchen (15 ml), Trypanblau-Lösung, Zellkulturmedium (DMEM mit 10% FKS und Pen/Strep), phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Trypsin/EDTA-Lösung, Einwegpipetten, Pipettierhilfe, Eppendorfpipette (10-100 µl, 100-100 µl), Pipettenspitzen (gelb, blau), Eppendorfreaktionsgefäße, sterile Pasteurpipetten im Köcher, mit Spinnenseide bewickelte Rahmen, beschichtete Zellkulturschale.

Die Arbeitsflächen und alle bereitgestellten Gegenstände sowie die Handschuhe werden mit 70% Desinfektionslösung gereinigt. Das Reinigen wird jeweils nach Bedarf wiederholt, bevor Gegenstände oder die Hände in den Sterilbereich gebracht werden. Alle Arbeitsschritte an offenen Gefäßen erfolgen im sterilen Arbeitsbereich.

Das Medium wird zum Anwärmen ins Wasserbad gestellt. Die Zellkulturflasche wird aus dem Inkubator genommen und unter dem Mikroskop kurz auf Dichte und Vitalität der Zellen kontrolliert. Dann wird die Flasche in den sterilen Arbeitsbereich eingebracht. Die Zellen werden mit 2ml PBS gewaschen. Die Waschlösung wird mit dem Absaugschlauch, auf den eine sterile Pasteurpipette gesteckt wurde, abgesaugt. 2 ml Trypsinlösung werden aufgebracht und ebenfalls abgesaugt, so dass ein leichter Flüssigkeitsfilm zurückbleibt. Die Flasche wird verschlossen und für 5 Minuten in den Inkubator gestellt. Dann wird das Ablösen der Zellen mit dem Auge (wegschwimmen eines weißlichen Filmes) und unter dem Mikroskop (abgerundete Zellen, die schwimmen) verfolgt. Dabei wird die Flasche leicht geschüttelt oder gegen den Rand geklopft.

Die abgelösten Zellen werden in 10ml Medium aufgenommen und bei 300 g für 5 Minuten in 15 ml Zentrifugenröhrchen bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Es sollte ein weißliches Zellpellet erkennbar sein. Der Überstand wird wie zuvor abgesaugt. Das Pellet wird in 5ml Medium aufgenommen. 50 µl der Zellsuspension werden mit einer Eppendorffpipette entnommen und in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben. Dann werden 50 µl Trypanblaulösung dazugesetzt. Trypanblau ist ein blauer Farbstoff, der nicht in der Lage ist gesunde Zellmembranen zu durchdringen. Eine intensive Blaufärbung von Zellen weist daher auf tote Zellen hin. Lebendige Zellen werden von diesem Farbstoff nicht beeinträchtigt. Die Probe wird bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. 20 µl der gefärbten Suspension werden an den Rand des Deckglases der Neubauerzählkammer pipettiert. Man sucht bei vierzigfacher Vergrößerung unter dem Mikroskop das eingravierte Gitter der Zählkammer und schaltet danach auf eine hundertfache Vergrößerung um. Die hellblau gefärbten Zellen werden in 4

unterschiedlichen Großquadraten gezählt. Die Zellzahl pro 1 ml Suspension wird nach der folgenden Formel berechnet:

Der Mittelwert der ausgezählten Großquadrate x 10000 / tatsächliche Verdünnung

Die Zellen werden anschließend so verdünnt, dass sich eine Konzentration von 10^6 Zellen pro Milliliter ergibt. Der bewickelte Rahmen wird auf den Boden der beschichteten Zellkulturschale gelegt. 100µl Zellsuspension wird nun vorsichtig auf den Rahmen aufgebracht. (Optional können verschiedene Verdünnungen getestet werden.)

Eine Zellkulturschale wird geschlossen und vorsichtig in den Inkubator gestellt. Eine weitere wird bei Raumluft inkubiert. Nach einer Stunde werden 2 ml Medium zugesetzt.

Block 3: LIVE/DEAD Assay und Auswertung

Bereitstellen: Zellkulturarbeitsbank, Handschuhe, 70% Ethanol in Sprühflasche, Fluoreszenzmikroskop, LIVE/DEAD Reagenzien, Vortex, Eppendorfpipette (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau), Zentrifugationsröhrchen (15 ml), sterile Pasteurpipetten im Köcher, Absaugpumpe, Inkubator

Die Arbeitsflächen und alle bereitgestellten Gegenstände sowie die Handschuhe werden mit 70% Desinfektionslösung gereinigt. Das Reinigen wird jeweils nach Bedarf wiederholt, bevor Gegenstände oder die Hände in den Sterilbereich gebracht werden. Alle Arbeitsschritte an offenen Gefäßen erfolgen im sterilen Arbeitsbereich.

Die Ansätze werden zunächst lichtmikroskopisch ausgewertet und photodokumentiert. Beobachtungen notieren. Gibt es Unterschiede zwischen den Ansätzen?

Dann wird das LIVE/DEAD Reagenz angemischt. Dazu werden die Reagenzien Calcein AM und Ethidiumhomodimer-1 (EthD-1) aus dem Gefrierschrank genommen und auf Raumtemperatur gebracht. 10 µl EthD-1 werden zu 5 ml PBS gegeben und gut auf dem Vortexer gemischt. 2,5 µl Calcein AM werden dazugegeben und wieder gut gemischt.

Die Ansätze werden in den Sterilbereich gebracht und das Medium durch Absaugen entfernt. Dann werden 500µl der gemischten Reagenz auf die Ansätze aufgebracht. Die Zellen werden 30-45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. 10 min vor Ablauf der Inkubationszeit wird die Fluoreszenzlampe des Mikroskops angeschaltet. Die Zellen werden unter Fluoreszenzlicht betrachtet und photodokumentiert. Die Beobachtungen werden festgehalten. Entsprechen die Ergebnisse den lichtmikroskopischen Beobachtungen?