

Allgemeine Informationen zur Behandlung der Primärkultur

Präparation der Spinalganglien aus der Ratte:

Die Spinalganglien liegen parallel angeordnet neben dem Rückenmark und enthalten die Zellkörper der primären afferenten Neurone und die Anfänge ihrer Fortsätze. Das heißt, die Spinalganglien empfangen die Informationen vom sensiblen System.

Sie werden auch Hinterwurzelganglien bezeichnet, da über die hintere Wurzel zum Rückenmark sensorische Informationen weitergegeben werden, während über die vordere Wurzel motorische Signale geleitet werden.

Nachdem ein sensorisches Signal in einem primären afferenten Neuron entstanden ist, wird es weitergeleitet zu einem sekundären Neuron im Rückenmark und von dort ins Gehirn. Die Übermittlung des Signals zwischen den Neuronen geschieht ausschließlich über Neurotransmitter.

Die Anzahl der Neurone eines Spinalganglions ist segmentspezifisch.

In den Spinalganglien sind die Zellkörper von Satellitenzellen umgeben, während die Axone von Schwann – Zellen umhüllt sind. Außen sind die Spinalganglien von einer bindegewebigen Kapsel überzogen (*Dura mater*).

Die Größe der sensorischen Einheiten in den Spinalganglien hängt von der zu übertragenden Modalität ab. Das heißt, je feinfühler das Organ ist, desto größer ist die sensorische Einheit in den Spinalganglien und je gröber das sensorische Signal ist, desto kleiner ist die sensorische Einheit.

Es werden 3 Wahrnehmungen unterschieden:

Die enterozeptive Wahrnehmung, auch als Oberflächensensibilität bezeichnet, teilt sich noch ein Mal in protopathische (fein) und epikritische (grob) Wahrnehmung.

Die propriozeptive Wahrnehmung gilt als Tiefenwahrnehmung, während die interozeptive Wahrnehmung aus den Eingeweiden kommt und beim gesunden Menschen unter der Bewusstseinsschwelle liegt.

Im Praktikum werden die Spinalganglien präpariert, indem das Rückenmark aus der Ratte entfernt wird und so Zugang zu den Bereichen neben dem Rückenmark erhalten wird. In kleinen Vertiefungen sind unter dem Mikroskop dann deutlich die Spinalganglien als kleine ovale Kügelchen zu erkennen. Sie werden vorsichtig mit der Pinzette herauspräpariert und zerkleinert.

Kultivierung der Zellen aus den Spinalganglien:

Die aus der Ratte präparierten Spinalganglien werden zerkleinert, um das Herauslösen der einzelnen Zellen zu erleichtern. Anschließend werden die Fragmente der Spinalganglien mit Collagenase und Trypsin behandelt. Die Collagenase zerstört das Collagengerüst, während das Trypsin für die Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte sorgt. Nach weiteren Schritten erhält man eine Lösung mit einzelnen Zellen, die auf lamininbeschichteten Plättchen ausplattiert werden. Die Plättchen werden in 4-Well-Platten aufbewahrt. Das Laminin sorgt dafür, dass die Zellen an das Glasplättchen binden und eine Kultur bilden können.

Anschließend werden die Zellen mit M10 als Nährmedium und NGF (nerve-growth-factor) behandelt, die für ein optimales Wachstum der Zellen sorgen.

Aus diesen Zellen entsteht dann die sogenannte Primärkultur. Das heißt, es entsteht eine Kultur, die von Zellen ausgeht, welche direkt aus dem Ursprungsgewebe stammen.

In der Mikrobiologie und der Virologie wird eine Primärkultur als Kultur von Zellen definiert, die unmittelbar aus einem tierischen oder menschlichen Organ gewonnen wurden.

Immunhistochemische Färbung:

Für das Praktikum wichtig sind die kultivierten Schmerz- und Satellitenzellen. An ihnen wird die immunhistochemische Färbung durchgeführt. Allerdings ist es wichtig zu wissen, dass Zellen in einer Primärkultur nur für kurze Zeit den realen physiologischen Zustand, in dem sie im Gewebe vorliegen beibehalten. Schon nach 1-3 Tagen fangen die Zellen an, Proteine zu exprimieren, die sie *in vivo* nicht exprimiert hatten. Dadurch ändert sich das Expressionsmuster der Zellen in Primärkultur erheblich. Ein Beispiel, das auch bei der im Praktikum angelegten Primärkultur auftritt ist die Expression des Ionenkanals TRPV1 (=Capsaicin-Rezeptor). Viele Neurone exprimieren dieses Kanalprotein erst nach einigen Tagen in Primärkultur.

In diesem Praktikum werden 3 Zellbestandteile gefärbt:

- 1.) Zellkernfärbung mit DAPI (4'-6-Diamino-2-phenylindol). DAPI bindet über die kleine Furche spezifisch an die Basen Adenin und Thymin in der DNA. Das Fluorophor wird von Licht der Wellenlänge 355-360nm angeregt und hat sein Fluoreszenzmaximum bei 450nm. Bei Verwendung von DAPI muss vorsichtig gearbeitet werden, da es mutagen ist!!!
- 2.) Färbung des Proteins S100, die sich in den Satellitenzellen befindet. Die Satellitenzellen sind unter dem Mikroskop leicht an ihrer länglichen Form zu erkennen.
- 3.) Färbung des Capsaicin-Rezeptors. Er befindet sich in den großen rundlichen Schmerzzellen und wird auch VR1 genannt. Dieser Schmerzrezeptor reagiert auf zwei Signale: Zum einen wird er durch Hitze (>45°C) aktiviert und erzeugt Verbrennungsschmerz. Er reagiert aber auch auf die Substanz Capsaicin, die an den Kanal bindet und ihn dadurch öffnet. Capsaicin befindet sich z.B. in Paprika und Chili und wird als scharf schmeckend empfunden. Die Reaktion auf diese Substanz ist eine Hitze-/Schmerzwahrnehmung.

Prinzip der Antikörperfärbung:

Im Gegensatz zu der Färbung mit DAPI, bei der die Substanz einfach kurz auf die Zellen gegeben wird, ist die Färbung mit Antikörpern komplizierter.

Erklärung am Beispiel eines gesuchten Proteins (funktioniert bei Rezeptor, Kanal,... ebenso): Das gesuchte Protein wird aus der Ratte isoliert und in gelöster Form einem Tier anderer Art, z.B. einer Maus injiziert. In der Maus wird die Substanz, da sie körperfremd ist, als Antigen erkannt, und es werden Antikörper gegen Epitope des Proteins gebildet. Dies sind die sogenannten Erst-Antikörper. Sie binden spezifisch an das gesuchte Protein.

Um Erst-Antikörper in der Immunhistochemie sichtbar zu machen, benutzt man Tierart-spezifische Zweitantikörper. Anti-Maus-Zweitantikörper erhält man z.B. indem man eine Ziege mit gereinigten IgG-Proteinen einer Maus immunisiert. Die von der Ziege gebildeten anti-IgG-Antikörper werden dann fluoreszenzmarkiert und können dazu verwendet werden, in Mäusen hergestellte Erstantikörper immunhistochemisch darzustellen.

Im Verlauf der Färbung folgt die Bildung des Komplexes dem Prinzip:

Der Erst-Antikörper bindet spezifisch an das gesuchte Protein, der Zweit-Antikörper mit dem Fluorophor bindet spezifisch an den Erst-Antikörper.

Die eigentliche Visualisierung des Expressionsortes des gesuchten Proteins geschieht nicht durch den Erst-Antikörper, sondern durch den Zweit-Antikörper, da dieser das Fluorophor trägt.

Die Färbung dient dazu, Zellen sichtbar zu machen, die das Protein beinhalten, für das man sich interessiert. Mit dieser Methode (Immunhistochemie) kann untersucht werden, welche Substanzen, Rezeptoren, Kanäle,... von Zellen exprimiert werden, was dann Rückschlüsse auf die Funktion der Zellen zulässt.

Im Praktikum verwendete Antikörper:

Der in diesem Praktikum an S100 bindende Erst-Antikörper stammt aus der Maus. Der an diesen Erst-Antikörper bindende Zweit-Antikörper aus der Ziege. Er heißt Alexa Fluor 488goat anti-mouse und reagiert mit dem Fc-Feld der schweren Kette der Maus-IgG. Die Zweit-Antikörper Lösung ist grüngelb und muss vor Licht geschützt werden, da dieser Antikörper das Fluorophor trägt, welches bei Licht ausbleicht.

Das Absorptionsmaximum des Zweit-Antikörpers liegt bei 497nm (blau), sein Emissionsmaximum bei 518nm (grün).

Im Fall der Capsaicin-Rezeptors stammt der Erst-Antikörper aus dem Kaninchen und der an diesen bindende Zweit-Antikörper aus der Ziege. Der Zweit-Antikörper heißt Alexa Fluor 568goat-anti rabbit und reagiert mit den schweren Ketten vom IgG des Kaninchens, sowie mit allen leichten Ketten von Immunglobulinen. So ist die Wahrscheinlichkeit für eine Bindung und dadurch Visualisierung sehr hoch.

Der Antikörper hat sein Absorptionsmaximum bei 579nm (grün-gelb) und sein Emissionsmaximum bei 601nm (rot). Die Lösung ist pink und muss wegen des Fluorophors ebenfalls vor Licht geschützt werden.

Obwohl der Zweit-Antikörper im Fall des Capsaicin-Rezeptors ebenfalls aus der Ziege stammt ist er nicht identisch mit dem im Fall des S100!! Wäre dies der Fall, wäre eine spezifische Färbung nicht mehr möglich.

Die Zweit-Antikörper unterscheiden sich in ihrer spezifischen Bindung an die Erst-Antikörper, in ihren Bindungsarten und in ihren Asorptions- und Emissionsmaxima.

Wachstum von Zellen:

Zusätzlich zur immunhistochemischen Färbung, soll auch noch das Wachstum vom Zellen in einer Primärkultur untersucht werden.

Dazu werden einige Zellen auf Plättchen mit Raster ausplattiert, die dann nicht gefärbt werden. Anhand des Rasters kann das tägliche Wachstum der Zellen leicht verfolgt werden.