

Zwischenbericht zum Forschungsvorhaben:

In vitro-Experimente unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation

C. Blut-Hirn-Schranke

Arbeitspaket 3

Etablierung und Charakterisierung einer primären Zellkultur aus der Ratte als *in-vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke

Universitätsklinik Münster
Klinik und Poliklinik für Neurologie
Albert-Schweitzer-Str. 33
48129 Münster

Projektleitung: PD Dr. med. Peter Young
Autor: Dr. rer. nat. Helmut Franke

Mai 2005

Zielsetzung

Ziel des Forschungsvorhabens ist die Untersuchung der Frage, ob und wie Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke durch hochfrequente Felder der Mobilfunktechnologie beeinflusst werden.

Als in vitro Modell der Blut-Hirn-Schranke werden primäre cerebrale Kapillarendothelzellen der Ratte (RBEC) verwendet. Mit Hilfe eines Screeningverfahrens zur differentiellen Genexpression (Chip Arrays) werden die Einflüsse von Feldern des Mobilfunks (GSM und UMTS, SAR 0.4, 1, 3 und 8 W/kg) auf das Genexpressionsmuster dieses Zellkulturmodells untersucht. Das Screening erfolgt zunächst auf Ebene der mRNA, im weiteren Verlauf des Projekts wird überprüft, ob die Regulationsänderung auf RNA-Ebene zu quantitativen Änderungen auf der Proteinebene führt, ggf. schließen sich weitere protein-biochemische Analysen bestimmter Proteine an.

Durch das in dieser Studie eingesetzte Screeningverfahren können Zielproteine der Blut-Hirn-Schranke identifiziert werden, die durch Felder der Mobilfunktechnologie beeinflusst werden.

Einleitung

Im Rahmen des vom Bundesamt für Strahlenschutz geförderten Vorhabens mit dem Titel: „In vitro-Experimente unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation C. Blut-Hirn-Schranke“ gilt es zunächst eine geeignete Isolationsmethode zur Erstellung einer Primärkultur cerebraler Kapillarendothelzellen zu etablieren und das Endothel und seinen Blut-Hirn-Schranken Phänotyp zu charakterisieren. Als Quellspezies wurde aufgrund des im Vergleich zur Maus größeren Gehirns sowie der grundsätzlichen Verfügbarkeit von Chips des Rattengenoms für die anschließenden Untersuchungen die Ratte ausgewählt.

Methoden

Isolierung und Kultivierung von RBEC

Die Methode zur Isolierung einer primären Zellkultur cerebraler Kapillarendothelzellen aus dem Rattenhirn beruht auf einer von Bowman et al. (1981, 1983) entwickelten Vorschrift zur Präparation von Endothelzellen, die von Hughes und Lantos (1986) optimiert wurde. Uns liegt derzeit eine weiter aktualisierte Vorschrift vor, nach der die Isolierung des Rattenendothels durchgeführt wird. (Preparation of primary rat brain capillary endothelial cell culture, NJ Abbott, PA Revest et al., Blood-Brain Barrier Group, Centre for Neuroscience, GKT School of Biomedical Sciences, King's College, London, unpubliziertes Manuskript). Die Idee dieser Präparationsmethode beruht darauf, einzelne Kapillarfragmente aus dem Säugerhirn zu isolieren. Die Methode ist dabei so ausgerichtet, dass bei der Isolation von Blutgefäßen möglichst nur Kapillargefäße gewonnen werden. Dies begrenzt die Verunreinigung der Primärkultur durch Glattmuskelzellen. Ferner wird der Eintrag von Endothelzellen vom nicht schrankenbildenden Phänotyp aus größeren Gefäßen in die resultierende Zellkultur umgangen. Ausgesät auf Kulturschalen, die mit einer entsprechenden Collagenmatrix beschichtet wurden, wachsen aus den Kapillarfragmenten dann die Endothelzellen von Blut-Hirn-Schranken (BHS)-Phänotyp aus und bilden in der Folge einen dichten Zellrasen.

Immuncytochemie

Zur Identifikation der Endothelzellen diente neben der morphologischen Beurteilung unter dem Phasenkontrastmikroskop die Markierung charakteristischer Epitope (spezifische Erkennungsstellen auf dem Proteinmolekül) mittels Antikörpern. Die Identifikation als Endothel erfolgte mit Hilfe eines Antikörpers gegen das „von Willebrand Faktor-VIII related Antigen“ (vWF-8) und durch Färbung des ebenfalls für Endothelzellen kennzeichnende Vimentin. Zum Nachweis der für die für die Blut-Hirn-Schranke essentielle Barrierefunktion wurden die „tight junction“ Proteine ZO-1 und Occludin angefärbt. Eine Abgrenzung möglicher Verunreinigungen der Kultur mit Fremdzellen erfolgte mit Antikörpern gegen Glattmuskelaktin (α -smooth muscle actin, α SMA) einem Pericytenmarker, GFAP (glial fibrillary acidic protein) einem Marker für Astrocyten und andere Gliazellen und CD11b, einem Makrophagenmarker.

Ergebnisse

Isolation der RBEC:

Die aus zahlreichen aufwändigen Einzelschritten bestehende Isolierung der RBEC erfordert etwa 8 Stunden Zeit. Geschwindigkeitsbegrenzend ist die am Anfang stehende Dissektion des Hirns, die eine Zeit von maximal 2,5 h nicht überschreiten darf, da ansonsten die Lebensfähigkeit der Endothelzellen deutlich abnimmt. Die Isolation von RBEC wurde zunächst mit zwei Tieren zu Übungszwecken durchgeführt. Inzwischen konnte die Arbeitsgeschwindigkeit jedoch deutlich gesteigert werden, so dass 5-6 Tiere eingesetzt werden können. Dies entspricht der Vorgabe, die uns als Maximum für eine Isolation von der Londoner „Blood-Brain Barrier Group“ (Dolman, pers. Mitteilung) genannt wurde.

Morphologische Beurteilung:

Kapillarendothelzellen weisen in vitro ein charakteristisches Erscheinungsbild auf, indem sie einen einschichtigen, aus langgezogenen, spindelförmigen Zellen aufgebauten Zellrasen ausbilden. Anhand von Phasenkontrastaufnahmen wurde die Entwicklung der RBEC in vitro über einen Verlauf von 2 Wochen dokumentiert. Direkt nach der Aussaat sind unter dem Mikroskop zunächst nur Kapillarfragmente zu erkennen, die innerhalb der ersten 2 Tage auf dem Kultursubstrat anhaften und aus denen die Endothelzellen auswachsen. Nach etwa zwei Tagen erkennt man erste Kolonien von Endothelzellen, die die für das Endothel der Blut-Hirn-Schranke typische spindelförmige Morphologie aufweisen. Am fünften Kulturtag sind ca. 50% der Wachstumsfläche mit Zellen bedeckt. Diese bilden im Verlauf von 7-10 Tagen einen nahezu dichten, einschichtigen Zellrasen aus. Vom etwa 12.-14. Tag (div12 = 12 days in vitro) an beginnen sich die RBEC Kulturen nach und nach abzulösen. Dies ist typisch für primäre Kapillarendothelzellkulturen und gibt eine Grenze für die maximale Haltbarkeit der RBEC vor.

Immuncytochemische Charakterisierung:

Zur Charakterisierung der RBEC als Endothelzellen sowie ihres BHS-Phänotyps wurden verschiedene Markerproteine ausgewählt und angefärbt. Zur Identifizierung der Endothelzellen dienten das von-Willebrand-Faktor-VIII related antigen (vWF-8) sowie das Intermediärfilamentprotein Vimentin. Zwar wird Vimentin auch von Fibroblasten gebildet, jedoch sind diese von Endothelzellen klar anhand der

Morphologie zu unterscheiden. Die RBEC-Kultur zeigt die typische, granuläre Anfärbung des vWF-8 Antigens sowie den positiven Nachweis von Vimentin.

Der schrankenbildende Charakter der Zellkulturen wurde anhand von Immunfluoreszenzen der tight-junction Proteine Occludin und ZO-1 nachgewiesen. Die für beide Proteine gleichermaßen typische perizelluläre Färbung an den Zell-Zell Kontakten belegt die Ausbildung von tight-junctions.

Weitere Immunfärbungen sollten die mögliche Verunreinigung mit Fremdzellen untersuchen. Durch die Isolationsmethodik ist es prinzipiell möglich, aus dem die Kapillaren umgebenden Gewebe eine geringe Anzahl an Astrocyten, Pericyten oder Makrophagen in die Kultur einzutragen. Als Marker für Astrocyten wurde das glial acidic fibrillary protein (GFAP) herangezogen. Eine Kontamination der RBEC mit Zellen glialen Ursprungs konnte ausgeschlossen werden. Eine als Positivkontrolle angefärbte Astrocytenkultur zeigte dagegen eine deutliche GFAP-Färbung.

Als am ehesten wahrscheinlich gilt, bedingt durch die Isolierungsmethodik, eine Kontamination mit Pericyten. Diese liegen auf den Kapillargefäßen auf und sind gemeinsam mit der Kapillare von einer Basallamina aus Collagen umhüllt, die erst im 2. Verdauungsschritt des Isolationsprozesses aufgebrochen wird. Im Gegensatz zu allen anderen Zellen des Gehirngewebes können also die Pericyten nicht schon in vorhergehenden Schritten abgetrennt werden. Sie lassen sich über den Marker α -smooth muscle actin (α -SMA) identifizieren.

Ergebnisse der immunocytochemischen Anfärbung des α -SMA in RBEC Primärkulturen zeigten, dass eine geringe Kontamination durch Pericyten beobachtet wurde. Die Kulturen zeigten jedoch eine allgemein geringe Kontaminationsintensität. Oft waren große mit Endothelzellen bewachsene Bereiche ohne positiven α -SMA Nachweis zu finden. Lediglich mit fortschreitender Kulturdauer konnten vermehrt Pericyten angefärbt werden.

Auch eine Kontamination durch Makrophagen konnte durch die negative CD11b-Färbung ausgeschlossen werden.

Diskussion

Für die geplanten Experimente zur Untersuchung der Genexpression an der Blut-Hirn-Schranke in vitro nach Exposition mit elektromagnetischen Feldern des Mobilfunks galt es zunächst, eine Isolierungsmethode für cerebrales Kapillarendothel der Ratte etablieren. Die ausgewählte Isolationsvorschrift konnte erfolgreich in unserem Labor etabliert werden und liefert eine Zellkultur, deren spindelförmige Zellen sich in einzelnen Wirbeln, einschichtig auf dem Kultursubstrat ausbreiten. Die RBEC Kulturen bilden nach etwa 7-10 Tagen einen konfluenten Zellrasen aus und können für maximal 14 Tage kultiviert werden, so dass die EMF Exposition innerhalb dieses Zeitfensters durchzuführen sein wird.

Die morphologischen Eigenheiten der isolierten Zellen sowie der positive Nachweis der Endothelzellmarker vWF-8 und Vimentin erlauben eine eindeutige Identifizierung als Endothelzellen.

Der charakteristische Nachweis der in die Ausbildung von tight-junctions involvierten Proteine Occludin und ZO-1 belegt die barrierebildenden Eigenschaften der Endothelzellen. Für beide Proteine konnte die für diese Zellen typische Lokalisation im Bereich des Zellrandes gezeigt werden. Somit ist sichergestellt, dass die RBEC neben ihrem endothelialen Phänotyp auch BHS-Eigenschaften ausprägen.

Eine Kontamination der Primärkultur von RBEC mit Gliazellen und Makrophagen konnte anhand immunocytochemischer Färbungen ausgeschlossen werden. Ebenso

ist eine Kontamination durch Fibroblasten auszuschließen, da die für Vimentin positiven Zellen jeweils gleichzeitig einen positiven vWF-8 Nachweis zeigten. Der Nachweis von Zellen die α -SMA exprimieren zeigt eine Kontamination mit Pericyten an, wie sie typisch für Primärkulturen von cerebralem Kapillarendothel ist. Der Anteil an Pericyten liegt auch nach längerer Kulturdauer nach Abschätzungen deutlich unter 1% und deckt sich insofern mit dem bisher in unserem Labor erfolgreich zur in vitro-Simulation der BHS genutzten Modell aus porcinen (vom Schwein stammenden) Kapillarendothelzellen.