

FREIE UNIVERSITÄT BERLIN

PRAKTIKUMSBERICHT

Name: [REDACTED]
Anschrift: [REDACTED]
Matrikelnummer: [REDACTED]
Studienfach: B.Sc. Biochemie

Institut: Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin
Arbeitsgruppe: Zelluläre Immunologie (Prof. Dr. Scheffold)

Dauer: [REDACTED]

1 Beschreibung des Instituts und meines Praktikumsplatzes

1.1 Einleitung

Ich habe mein Berufspraktikum am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ) in Berlin absolviert. Das DRFZ liegt auf dem Charité Campus Mitte (CCM) und ist ein Institut der Leibniz-Gesellschaft. Wie dem Namen des Forschungszentrums bereits zu entnehmen ist, zielt die Forschung am DRFZ auf die Bekämpfung rheumatischer Krankheiten ab. Dabei beschäftigen sich die einzelnen Arbeitsgruppen aber nicht nur mit dem Thema „Rheuma“, sondern forschen auch an verwandten Autoimmunerkrankungen, wie Lupus Erythematodes, oder an allgemeinen immunologischen Fragestellungen.

1.2 Gliederung des Instituts

Die Forschung ist aufgeteilt in zwei Programmbereiche: Programmbereich I, der sich mit der Pathophysiologie rheumatischer Entzündungen unter der Leitung von Prof. Dr. Radbruch beschäftigt und Programmbereich II, in dem unter der Leitung von Prof. Dr. Zink die Epidemiologie rheumatischer Erkrankungen, also z.B. mittels statistischer Untersuchungen von Risikofaktoren, erforscht wird. Zusätzlich gibt es am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin sogenannte Liasonarbeitsgruppen, die mit externen Kooperationspartnern zusammenarbeiten. So gibt es Kooperationen mit der Arbeitsgruppe „Rheumatologie und klinische Immunologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Burmester an der Charité, der an der Charité angesiedelten Arbeitsgruppe „Dermatologie, Venereologie und Allergologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Sterry, dem Exzellenzcluster „NeuroCure“ und dem Robert-Koch-Institut.

1.3 Meine Arbeitsgruppe

Die Arbeitsgruppe „Zelluläre Immunologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Alexander Scheffold, in der ich mein Praktikum absolviert habe, ist im Programmbereich I am DRFZ angesiedelt. Zusätzlich stellt die AG Scheffold eine sogenannte Liasonarbeitsgruppe dar, da sie mit der Arbeitsgruppe „Rheumatologie und klinische Immunologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Burmester an der Charité kooperiert und Laboratorien außerhalb des DRFZ innerhalb der Charité unterhält. In der Arbeitsgruppe arbeiten zurzeit 10 Mitarbeiter, davon eine Post-Doktorandin und vier Doktoranden.

Das Hauptforschungsgebiet meiner Arbeitsgruppe liegt in der Kontrollfunktion von T-Zellen bei Autoimmunität und Entzündungen. Dabei liegen die Mechanismen und molekularen Grundlagen der Induktion und Vermehrung von regulatorischen T-Zellen

(T_{Reg}) einerseits und das Verständnis der Kontrolle und der Regulierung von T-Zellen in inflammatorischen Milieu andererseits im besonderen Interesse der Gruppe. In der Vergangenheit konnte die Gruppe zum Beispiel zeigen, dass durch die Aktivierung des Notch-Signalwegs die Expression des antinflammatorischen Zytokins Interleukin-10 in T_H1 - und T_H17 -Zellen induziert wird. Entzündungsfördernde T_H1 - und T_H17 -Zellen können so in entzündungshemmenden T-Helferzellen umgewandelt werden.

1.4 Beschreibung meiner Aufgaben

Eine wichtige Fragestellung der aktuellen Forschung der Gruppe ist dabei, welche Rolle das Lebersinusoid bei der Regulation der T-Zellen spielt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Lebersinusendothelzellen (*Liver sinus endothelial cells, LSECs*) des Lebersinusoids den Notch-Liganden Delta-like 4 exprimieren, mit diesem den Notch-Signalweg aktivieren können und so eine antiinflammatorische Wirkung der T-Zellen induzieren können.

Meine Aufgabe war es nun, die Arbeitsgruppe bei der Charakterisierung der Lebersinusendothelzellen im Hinblick auf die Expression von Zytokinen und Notch-assoziierten Proteinen bei Kultivierung unter Einfluss von proinflammatorischen Stimulantien zu helfen. Meine Hauptaufgabe bestand dabei weniger in der Generierung von Ergebnissen, als in der Etablierung verschiedener Messmethoden und im Aufbau eines Probenpools für zukünftige Experimente der Arbeitsgruppe, da für die ausgiebige Auswertung der Proben schlicht und einfach die Zeit fehlte.

Für die erfolgreiche Durchführung dieses Projekts waren mannigfaltige Laborkenntnisse von Nöten, die ich größtenteils aus dem biochemischen Blockpraktikum an der Universität mitbringen konnte. Neben der notwendigen Feinmotorik und Gedankenleistung beim Pipettieren einer großen Anzahl von Proben, Sicherheit im Umgang mit Substanzen, Sauberkeit und Genauigkeit war, anders noch als in der Universität, ein höheres Organisationstalent gefordert, da ich die zeitliche und logische Planung meiner Versuche selbst vornehmen musste. Im Allgemeinen habe ich mich durch die universitäre Ausbildung sehr gut auf das Praktikum vorbereitet gefühlt.

2 Beschreibung und Reflektion der durchgeführten Arbeiten

2.1 Die angewandten Techniken im Detail

Im Folgenden werden die von mir verwandten Techniken detailliert beschrieben und reflektiert. Ein einzelner Versuch kann in drei größere Arbeitsschritte unterteilt wer-

den: Zellisolation und -kultur, RNA-Extraktion und cDNA-Synthese mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Chain-Reaction (*RT-PCR*), sowie die quantitative Polymerase-Chain-Reaction (*qPCR*) zur Quantifizierung der Expression bestimmter Moleküle.

2.1.1 Zellisolation und -kultur

Die untersuchten Lebersinusendothelzellen wurden aus Mäuselebern aufreingt. Am Anfang der Aufreinigung stand die Präparation der Leber aus weiblichen BL6 Wildtypmäusen. Dazu wurden die Mäuse zunächst betäubt, über zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet und die Leber heraus präpariert. In der Schule und der Universität hatte ich bereits Erfahrungen mit der Präparation von Wirbeltieren gesammelt. Die Tötung des Tieres vor der Präparation war allerdings eine neue Erfahrung für mich, zumal ich als Vegetarier eine generell eher kritische Einstellung zum Töten von Tieren habe. Auch nach dem Töten von genau 81 Mäusen im Rahmen des Praktikums geht mir die Tötung nicht leicht von den Händen. Auch die folgenden Präparation der Mäuse bedarf einiger Überwindung, da durch die kurze Zeitspanne zwischen Tötung und Präparation die tote Maus noch Muskelzuckungen, Bewegungen im Bereich der Darmperistaltik oder andere „Lebenssignale“ zeigen kann. Ethisch stehe ich der Tiertötung zu Forschungszwecken kritisch gegenüber. Ich sehe zwar, dass meine Versuche nicht so ohne weiteres ohne das Töten von Mäusen durchgeführt werden können, ich bin allerdings trotzdem der Meinung, dass die Tiertötung zu Forschungszwecken grundsätzlich verwerflich ist und nur als „Notlösung“ angesehen werden sollte. In jedem Fall hat mich der Gedanke, dass für meine Experimente Mäuse sterben mussten, zu hoher Sorgfalt veranlasst, da ich einerseits möglichst wenig Tiere töten wollte und andererseits den Tod der Tiere durch die Forschungsergebnisse rechtfertigen wollte.

Die weitere Aufreinigung war sehr zeitaufwändig und bedurfte vieler Zwischenschritte. Nach einem Verdau des Lebergewebes mittels einer Collagenase wurden die Leberendothelzellen nach vielen Zentrifugations- und Waschschrte und einer Erylyse in einer Gradientenzentrifugation von den restlichen Leberzellen abgetrennt. Die Lebersinusendothelzellen wurden aus dem bei der Gradientenzentrifugation erhaltenen Endothelzellgemisch durch eine magnetfeldunterstützte Zellsortierung (*MACS, magnet assisted cell sorting*) Sortierung aufgereinigt. Dazu wurde die Lebersinusendothelzellen mit einem gegen den Lebersinusendothelzellmarker CD₁₄₆ gerichteten Antikörper konjugiert, der das Fluorophor *FITC* trägt. An das Fluorophor der markierten Zellen können supraparamagnetische Partikel (*microbeads*) mittel eines Sekundärantikörpers konjugieren. Die so magnetisch markierten Zellen können in einer Trennsäule mit Metallkügelchen, die

sich in einem starken magnetischen Feld befindet, retendiert werden. Die Säule kann gespült werden und man erhält eine nicht-magnetische, negative Fraktion. Entfernt man die Säule aus dem Magnetfeld, können die positiv markierten, aufgereinigten Zellen eluiert werden. Die erhaltene Zellpopulation wurde mittels eines fluoreszenzunterstützten Zellsortierers (*FACS, fluorescence assisted cell sorting*) auf ihre Reinheit hin kontrolliert. Dabei wurde das Verhältnis der positiv *FITC*-markierten zu den negativ *FITC*-markierten Lymphozyten abzüglich Propidium-Iodid-markierter toter Zellen gemessen.

Viele Arbeitsschritte dieses eleganten Aufreinigungsprotokolls hatte ich in dieser Art und Weise in meiner Ausbildung noch nie durchführen können. Besonders die magnetfeldunterstützte Zellsortierung und die *FACS*-Messungen waren für mich neue Methoden. Nach einer Einarbeitungsphase konnte ich jedoch gute Reinheiten und Zellausbeuten vorweisen, was dafür spricht, dass ich die Methoden mittlerweile gut beherrsche.

Die aufgereinigten Zellen wurden in Medium aufgenommen, in einem Kulturschrank inkubiert und gegebenenfalls mit verschiedenen Stimulantien kokultiviert. Während der gesamten Aufreinigung musste ich steril arbeiten, um jegliche Kontamination der Proben mit Bakterien oder anderen Zellen zu vermeiden. Arbeiten in sterilem Umfeld erfordert eine große Sorgfalt und penible Sauberkeit. Da ich keine Kontaminationen in meiner Zellkulturen feststellen konnte, glaube ich das sterile Arbeiten zu beherrschen.

Die Aufreinigung der Lebersinusendothelzellen gestaltet sich sehr zeitaufwändig. Abhängig von der Anzahl der verwandten Lebern benötigte ich für die Aufreinigung der Zellen inklusive der Pipettierung der Stimulantien ohne längere Pause bis zu 11 Stunden. Nach einem solchen Arbeitstag war ich zwar stets sehr erschöpft, aber nicht ermüdet. So anstrengend die Arbeit auch war, sie hat mir großen Spaß gemacht und mir motivierende Herausforderungen gegeben. Eine andere neue Erfahrung war die Arbeit in der Nacht oder am Wochenende. Je nach Stimulationsdauer, Inkubationszeit oder Messdauer musste ich am Wochenende oder um 12 Uhr nachts zur Arbeit ins Labor. Das war zwar nicht schön, aber da das im Forscheralltag eher die Regel als die Ausnahme ist, und zur Generierung von belastbaren Ergebnissen unabdingbar ist, habe ich mich mit dieser Realität angefreundet.

2.1.2 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese mittels RT-PCR

Beide Methoden kannte ich bereits in ähnlicher Art und Weise aus dem universitären biochemischen Blockpraktikum. Was für mich neu war, dass sowohl zur RNA-Extraktion, als auch für die RT-PCR fertige Kits benutzt wurden, die zwar teurer sind, aber gleichbleibende Ergebnisse garantieren und den Zeitaufwand reduzieren.

2.1.3 qPCR zur Quantifizierung der Expression bestimmter Proteine

Die Methode der quantitativen PCR (*qPCR*) war mir bereits aus dem biochemischen Grundpraktikum an der Universität bekannt. In meinem Praktikum ging es jedoch weniger darum Ergebnisse aus den Proben zu generieren. Vielmehr habe ich bestimmte Primer hinsichtlich der Annealing-Temperatur und der eingesetzten Mg^{2+} -Konzentration in der Arbeitsgruppe etabliert und die erfolgreiche Stimulation der LSECs durch die Überprüfung bekannter Expressionsmuster belegt.

Das Ansetzen einer qPCR erfordert eine gute Planung hinsichtlich der Anzahl der zu messenden Proben und ein vorrausschauendes Zeitmanagement, da die Messgeräte meist stark frequentiert und daher oft ausgebucht sind. Auch das Pipettieren einer 96-well Platte bedarf einer guten Konzentrationsfähigkeit um keine Proben zu vergessen, doppelt zu pipettieren oder an die falsche Stelle zu pipettieren.

2.1.4 Arbeitszeiten

Da die einzelnen Arbeitsschritte teilweise sehr langwierig waren und nicht unterbrochen werden konnten, waren Arbeitstage mit mehr als 10 Stunden durchgehender Arbeit nicht die Seltenheit. Zusammenfassend kann man sagen, dass man als Wissenschaftler sehr unregelmäßige Arbeitszeiten hat. War an einem Tag wenig zu tun, konnte ich teilweise auch schon am frühen Nachmittag nach Hause fahren. In guter Erinnerung ist mir ein Arbeitstag, an dem ich auf Grund langer Stimulationzeiten einer Zellpopulation nach einem langen Arbeitstag noch einmal von 23:00 Uhr bis 1:00 Uhr morgens ins Labor musste. Da ich mit diesen Arbeitszeiten späteren Arbeitsleben rechnen kann, war das Praktikum eine gute Vorbereitung darauf.

3 Reflektion der Praktikumsstelle

Am Anfang ist festzuhalten, dass ich mich während meines Praktikums immer sehr wohl gefühlt habe und nie das Gefühl hatte fehl am Platze zu sein. Meiner Betreuerin, [REDACTED] bin ich für die engagierte Betreuung sehr dankbar. Es war nicht immer einfach, da [REDACTED] sehr hohe Anforderungen an saubere, vorrausschauende und zielführende Arbeit gestellt hat und ihrem kritischem Blick wenig entgangen ist. Am Anfang, als ich mit wenig Laborpraxis und unbedarft von der Uni in die Arbeitsgruppe kam, war das Kennenlernen der Methoden, der Thematik und des Laboralltags sehr fordernd, da ich mich in die Materie erst noch neu eindenken musste. Ich habe die Herausforderung aber angenommen und bin meiner Ansicht nach schnell an der Kritik

von [REDACTED] gewachsen. Bei Fragen oder Unklarheiten konnte ich mich immer an sie wenden und konnte mit einer fundierten Antwort rechnen. Dadurch habe ich sehr viel während des Praktikums von [REDACTED] lernen können.

In der Arbeitsgruppe habe ich mich sehr wohl gefühlt. Da die AG aus nur knapp 10 Mitgliedern besteht und ich sehr herzlich aufgenommen wurde, kannte sehr schnell alle Mitglieder persönlich. Auch habe ich die wöchentlichen AG-Besprechungen als sehr konstruktiv, locker und ergebnisreich in Erinnerung. Der Leiter der Arbeitsgruppe, Alex Scheffold, war immer offen für alle meine Anliegen und Sorgen.