

## Kapitel 5: ZÜCHTUNG TIERISCHER ZELLEN

### Inhalt:

GRUNDLAGEN.....	59
WICHTIGE BEGRIFFE.....	60
KULTUREN UND BEDINGUNGEN.....	62
LITERATUR.....	65
LINKS.....	65

### Grundlagen

Wenn Zellen, Gewebe- und Organteile, Organanlagen und Organe außerhalb ihres Organismus in einem künstlich geschaffenen Milieu unter sterilen Bedingungen gehalten oder zur Vermehrung gebracht werden, dann spricht man von Zellkultur.

#### Mit ihnen können grundlegende Erkenntnisse gewonnen werden:

- Sie liefern homogenes Material in fast beliebiger Menge.
- Sie erlauben gezielte Experimente unter kontrollierten Bedingungen wie z. B.: Transport über Membranen, Proteinsynthese, DNA-Synthese, Wirkung von Cytostatika, Virusinfektion, Differenzierung, Zell-Zell-Kommunikation, Carcinogenese
- Sie können in gewissem Umfang Tierversuche ersetzen.
- Sie finden Verwendung bei der Herstellung von Bioprodukten.

#### Zellkulturen sind aber nicht überall einsetzbar:

- Mit ihnen lassen sich komplexere Zusammenhänge nicht untersuchen, z. B.: Blutdruck, hormonelle Wechselwirkungen
- Es muss von Fall zu Fall entschieden werden, ob sie ein vernünftiges Modell für eine bestimmte biologische oder medizinische Fragestellung sein können.

#### Zellkulturen können auf dreierlei Art gezüchtet werden:

*in vitro* d. h. im Glas, was heute aber meist in Plastikschalen, -röhrchen oder -flaschen, aber auch in großen Fermentern geschieht

#### Beispiele:

- Mäusesarkom in Kultur seit 1943: L-Zellen
- Zervixkarzinom des Menschen in Kultur seit 1952: HeLa-Zellen. Heute immer noch sehr weit verbreitete Zelllinie.

- Hybridom-Zelllinien zur Produktion von monoklonalen Antikörpern
- Stammzellen zur Untersuchung von Differenzierungsmechanismen, Embryonalentwicklung, Regeneration und zur Verbesserung der Zelltransplantationstherapie

*ex vivo* d.h. Entnahme und Kultivierung von Organen oder Gewebeteilen als Primärkultur

**Beispiele:**

- Tonsillen (Mandeln) zum Studium von Immunreaktionen
- Biopsien von Tumormaterial zum Testen von Zytostatika

*in vivo* d. h. in einem Tier, das dann als "Brutraum" dient.

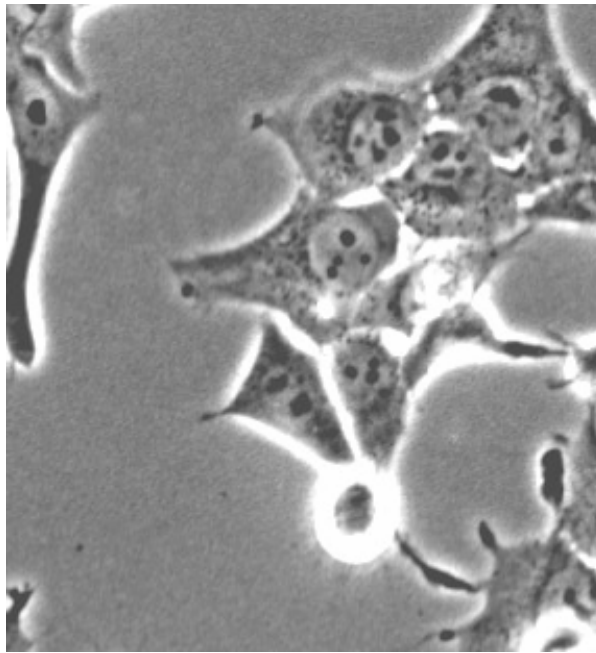
**Beispiele:**

- Ehrlich Aszites Tumor in Ascitesflüssigkeit von Mäusen (Flüssigkeit der Bauchhöhle) seit 1895
- Transplantable Tumoren, die oft subkutan in Versuchstieren gehalten werden.

## Wichtige Begriffe

<b>Zellkultur</b>	Wachstum von Zellen <i>in vitro</i> einschließlich der Kultivierung einzelner Zellen. In Zellkulturen sind die Zellen nicht mehr in Geweben organisiert. Es handelt sich um homogenes Material.
<b>Gewebe</b>	Zusammenschluss von verschiedenartigen Zellen in einem Zellverband, die eine gemeinsame Funktion erfüllen, z.B.: Binde-, Knorpel-, Knochen-, Muskel-, Nervengewebe, Blut.
<b>Gewebekultur</b>	Haltung oder Wachstum von Geweben <i>in vitro</i> , so dass Differenzierung, Struktur und/oder Funktion erhalten bleiben. Heterogenes Zellmaterial d.h. verschiedene Zelltypen sind vorhanden.
<b>Organ</b>	Ist ein Zusammenschluss von Geweben für Leistungen höherer Komplexität. Es ist ein zusammengesetzter Teil des Körpers, der eine Einheit mit bestimmten Funktionen bildet, z.B.: Herz, Lunge, Leber, Niere.
<b>Organkultur</b>	Erhaltung oder Wachstum von Organanlagen, ganzen Organen oder Teilen davon <i>in vitro</i> , so dass Differenzierung möglich ist und Struktur und/oder Funktion erhalten bleiben.
<b>Stammzellen</b>	Eine Stammzelle ist jede noch nicht ausdifferenzierte Zelle eines Embryos, Fetus oder geborenen Menschen, die Teilungs- und Entwicklungsfähigkeit besitzt.

<b>Explantat</b>	Ein Stück von einem Gewebe oder Organ, das zum Anzüchten einer <i>in vitro</i> Kultur entnommen wurde.
<b>Biopsie</b>	Entnahme von Gewebeteilen
<b>Monolayer</b>	Eine einschichtige Lage von Zellen, die auf einem Träger (Plastik, Glas, Faser) wachsen.
<b>Suspensionskultur</b>	Zellen, die in Medium suspendiert, einzeln ohne Kontakt zu einem Träger wachsen.
<b>Klon</b>	Population von Zellen, die durch mitotische Zellteilung aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen ist.
<b>Primärkultur</b>	Die erste Kultur, die von vollständig differenzierten, diploiden Zellen, Geweben oder Organen unmittelbar nach der Entnahme aus einem Organismus angezüchtet wurde (ex vivo-Kultur).
<b>Zelllinie</b>	Mit der ersten Subkultur wird aus einer Primärkultur eine Zelllinie. Sie enthält die verschiedenen Zellen, aus denen die Primärkultur bestand.
<b>Etablierte Zelllinie</b>	Eine Zelllinie kann als permanent bezeichnet werden, wenn sie <i>in vitro</i> unbegrenzt subkultiviert werden kann.
<b>Zellstamm</b>	Ein Zellstamm leitet sich von einer Primärkultur oder einer Zelllinie ab und ist auf spezifische Eigenschaften (wie z.B. Zelloberflächenantigene, Enzyme) hin selektioniert oder kloniert.
<b>Sättigungsdichte</b>	Maximale Zellzahl pro Flächeneinheit, typisch für kontakthibitierte Kultur.
<b>Kontakthibition</b>	Nicht maligne Zellen hören auf zu proliferieren, wenn sie in engen Kontakt mit Nachbarzellen kommen.
<b>Plating efficiency</b>	Prozentsatz der Zellen, die nach Aussäen in geringer Dichte (ohne Zellkontakt) in der Lage sind, sich zu teilen und Kolonien zu bilden. Maßstab für Wachstumsautonomie von Zellen.



**Abb. 31:** HeLa-Zellkulturen als einschichtiger Zellrasen (Monolayerkultur) auf einem Plastiksubstrat

## Kulturen und Bedingungen

### Kulturbedingungen

<b>Medium</b>	Salze: NaCl, KCl, CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub>
	Aminosäuren, Vitamine, Glucose
<b>Puffer</b>	NaHCO <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub> ; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; Zwitter-Ionen (HEPES)
<b>Zusätze</b>	Serum oder Wachstumsfaktoren: FGF (Fibroblasten growth factor), EGF (Epithel), NGF (Nervenzellen), Embryonalextrakt, konditioniertes Medium, Antibiotika, Phenolrot als pH-Indikator
<b>Temperatur</b>	Säuger: 37° C, Vögel: 40° C; Luftfeuchtigkeit
<b>Sterilität</b>	Reine Arbeitsbank, "Clean Bench" mit Laminarströmung
<b>Trägermaterialien</b>	Anwachsen auf einem Träger wie Glas, Kunststoff (Polyacrylamid), Keramik, modifizierte Zucker/Eiweiße
<b>Form des Trägers</b>	Schale, Flasche, Rotationsflasche, Membranen (zwei Reaktionsräume), Mikrocarrier, Fasern, Hohlfasern (Gegenstromprinzip), Folien

## Ansetzen einer Primärkultur

Sie wird mit Explantaten aus menschlichem oder tierischem Gewebe gestartet. Es eignen sich besonders embryonale oder Tumor-Gewebe, da diese auch außerhalb ihres gewohnten Milieus gut wachsen können. Die Gewebestückchen werden mittels einer proteolytischen Enzymlyse (Kollagenase, Trypsin, Pronase) zu Einzelzellen zerlegt und in ein geeignetes Nährmedium überführt. Um zu proliferieren benötigen die Zellen meistens eine feste Oberfläche als Unterlage. Haben die Zellen sich ausreichend vermehrt, dann können sie mit Trypsin von der Unterlage abgelöst werden und in Schälchen oder Flaschen für Versuche oder zur weiteren Vermehrung ausgesät werden.

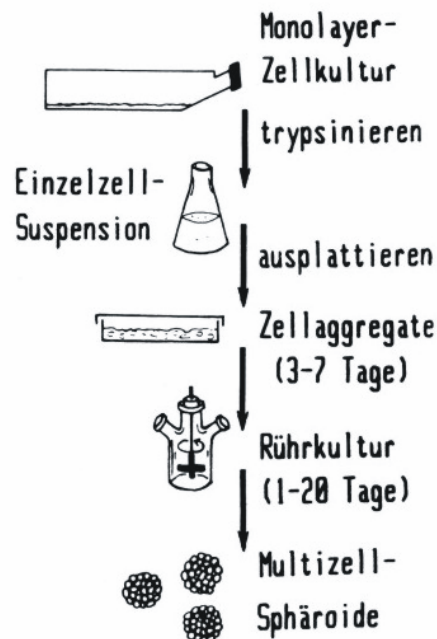
**Monolayer** Als Oberflächenkultur wachsen die Zellen im Allgemeinen in einer zweidimensionalen Schicht von eng aneinander liegenden Zellen, man spricht dann von einem Zellrasen oder einer Monolayer Kultur.

**Einzelzellsuspension** Einige Zellen können ohne Träger als einzelne Zellen in Suspension wachsen.

Sie sind dann zwar weit von ihrer ursprünglichen zellulären Organisation entfernt, liefern aber homogene Populationen, die sich nicht nur für Grundlagenuntersuchungen eignen, sondern auch gut für die Bioproduktion im Fermenter eingesetzt werden können.

**Agar-Kultur** Für die Krebsforschung sind spezielle Zellkulturtechniken entwickelt worden, die beispielsweise dem Nachweis der malignen Entartung der Zellen dienen. Dazu gehört die Proliferation einzelner Zellen zu Zellklonen in einer mit Medium angesetzten Weich-Agar Masse.

**Multizellsphäroide (MZS)** Das Tumorwachstum *in vitro* wird besonders gut mit MZS simuliert. Ende der fünfziger Jahre als knötchenförmige Modelltumore in die Krebsforschung eingeführt (Moscona, 1957), erfreuen sie sich zunehmender Anwendung. Sie weisen Ähnlichkeiten mit Strukturen solider Tumoren *in vivo* auf: Durch das Medium, das den Sphäroid umgibt, wird die Blutflüssigkeit simuliert, außerdem findet man nebeneinander proliferative Zellen, ruhende Zellen und Nekrosebildung (Zelltod durch äußere Einflüsse).



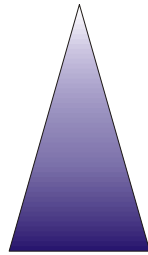
**Abb. 32:** Vorgehensweise beim Ansetzen von Multizell-Sphäroiden

Mit Multizell-Sphäroiden können unterschiedliche funktionelle Probleme untersucht werden, wobei oft die Krebsforschung im Vordergrund steht. Selbst ein so komplexer Vorgang wie die Invasion maligner Zellen in normales Gewebe kann mit Multizell-Sphäroiden aus normalen und malignen Zellen analysiert werden.

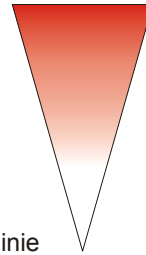
Außerdem stellen Multizell-Sphäroide ein *in vitro* Modellsystem für Organe dar: So formen beispielsweise Leberzellen Multizell-Sphäroide mit den von dem intakten Organ her bekannten Strukturen und typischen Syntheseleistungen. In Multizell-Sphäroiden aus Herzzellen beobachtet man auch regelmäßige Kontraktionen. Die Änderung ihrer Schlagfrequenz ist eine einfach zu messende Reaktion auf die Zugabe von Substanzen, die in diesen Kulturen getestet werden. Aus Suspensionen isolierter Gehirnzellen wachsen Multizell-Sphäroide heran, in denen das Zusammenwirken der unterschiedlichen Zelltypen studiert werden kann.

Mit dieser Art der Zellzüchtung steht also ein Kultursystem von hoher Komplexität zur Verfügung, mit dem die Verhältnisse im Tier wesentlich besser angenähert werden können, als mit den zweidimensional wachsenden Monolayer-Kulturen.

Allgemein gilt für Zellkulturen: je höher der Differenzierungsgrad, desto geringer die Proliferation:

**Proliferation**

Organkultur  
 Gewebekultur  
 Primär-Kultur  
 primäre Zelllinie  
 Tumorzelllinie  
 transformierte Zelllinie

**Differenzierung****Literatur**

1. Culture of Animal Cells  
 R. Ian Freshney  
 Wiley-Liss, New York 2000 (4. Auflage)

**Links**

- [DFG: Naturwissenschaftlich-medizinisches Glossar](#)
- [DFG-Stellungnahme zum Problemkreis "Humane embryonale Stammzellen"](#)
- [Über moderne Stammzellen-Forschung und ihre Bedeutung](#)
- [European Collection of Cell Cultures](#)
- [American Type Culture Collection](#)