

R. Ian Freshney
Tierische Zellkulturen

R. Ian Freshney

Tierische Zellkulturen

Ein Methoden-Handbuch



Walter de Gruyter
Berlin · New York 1990

Titel der Originalausgabe

Culture of Animal Cells
A Manual of Basic Technique
Second Edition
Alan R. Liss, Inc. New York
Copyright ©1987 Alan R Liss, Inc.

Autor

R. Ian Freshney
Department of Medical Oncology
Cancer Research Campaign Laboratories
University of Glasgow

Übersetzer

Dr. med. Silvia-Renate Goan
Dr. rer. nat. Manfred Schütt
Dr. rer. nat. Hildegunde Schunck
Dr. sc. Michael Theile
Dr. rer. nat. Helga Wählte

Redaktion

Dr. rer. nat. Manfred Schütt

Das Buch enthält 178 Abbildungen und 41 Tabellen.

Die Abbildungen auf dem Einband sind Ausschnitte der
Abb. 16.1 auf S. 210.

© Copyright 1990 by Walter de Gruyter & Co.,
D-1000 Berlin 30.

Dieses Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes ist ohne Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen. Printed in Germany.

Satz und Druck: Tutte Druckerei GmbH, Salzweg-Passau.
Bindung: Lüderitz & Bauer GmbH, Berlin. Einbandentwurf:
Hansbernd Lindemann, Berlin.

☉ Gedruckt auf säurefreiem Papier, das die US-ANSI-Norm über Haltbarkeit erfüllt.

CIP-Titelaufnahme der Deutschen Bibliothek

Freshney, R. Ian:
Tierische Zellkulturen: ein Methoden-Handbuch /
R. Ian Freshney. [Übers.: Silvia-Renate Goan ...].
– Berlin ; New York : de Gruyter, 1990
Einheitssacht.: Culture of animal cells <dt.>
ISBN 3-11-011560-3

Bemerkungen zur deutschsprachigen Ausgabe

Die Kultivierung von Säugerzellen hat sich von einem Spezialgebiet – für relativ wenige Experten – zu einer sehr weit verbreiteten, angewandten Methode in der Medizin und Biologie entwickelt. Nicht nur in der Forschung werden zahlreiche Probleme (z. B. Regulation von Zell- und Virusvermehrung) an Zellkulturen untersucht. So sind Zellkulturen in der Medizin auch zur Prognostik und Diagnostik zu verwenden; in den Hygiene-Instituten werden sie zur Typisierung von Krankheitserregern eingesetzt, in der Pharmakaentwicklung als frühe Testsysteme genutzt (Reduzierung von Tierversuchen). Zellkulturen bewähren sich schließlich auch als effektive Produktionsmittel – insbesondere im Zusammenhang mit der Gentechnik – zur Herstellung von Wirkstoffen, Vakzinen etc.

Die Entwicklung der Zellzüchtung hat sich von einer vorwiegend auf Empirie aufgebauten Methode (Beispiel: Einsatz von Serum ohne Kenntnis der Wirkung) zu einer Methode mit fester wissenschaftlicher Grundlage vollzogen. Bedingt durch die vielfältigen und für verschiedene Zellarten unterschiedlichen Ansprüche an Medien, Substrate und andere Bedingungen – sowie deren Wechselwirkungen – hat die Zellzüchtung – vielleicht stärker als andere Methoden – manchmal den Charakter des Undurchsichtigen, Unerklärbaren, vielleicht sogar des etwas Mystischen beibehalten. Auch

dem Experten passiert es, daß Zellen plötzlich schneller, anders oder aber auch gar nicht wachsen, ohne daß ihm bewußt ist, an der Methode etwas geändert zu haben. Um so wünschenswerter und wichtiger ist daher ein Buch wie das vorliegende, in dem das Handwerk des Zellzüchters im Detail beschrieben wird, sogenannte Binsenwahrheiten nicht ausgespart bleiben und mögliche Probleme besonders erwähnt werden. Die jahrzehntelangen Erfahrungen des Autors in Forschung und Lehre bedingen seine hohe Kompetenz und finden im Buch vielfältigen Ausdruck. Das Methoden-Handbuch wird damit zu einem idealen Leitfaden für den Anfänger und ist daneben eine wertvolle Hilfe und ein Berater für den Experten, der über den Rand seines Spezialgebietes hinaussehen möchte.

Die Übersetzung und die redaktionelle Bearbeitung erfolgte durch Mitarbeiter des Zentralinstitutes für Molekularbiologie der Akademie der Wissenschaften, Berlin-Buch. Besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Gesa Haedenkamp (München) für ihre Sorgfalt und Mühe bei der kritischen Durchsicht des Manuskriptes.

Berlin, 1990

Prof. Dr. *P. Langen*
Leiter der Abteilung Zellkinetik
Zentralinstitut für Molekularbiologie
Berlin-Buch

Aus dem Vorwort zur 2. Auflage

Bei der Überarbeitung des Methoden-Handbuches wurde weiterhin auf die Betonung praktischer Aspekte der Zellzüchtung Wert gelegt. Die theoretischen Grundlagen sind nur dann diskutiert worden, wenn es für das Verständnis der Methode notwendig erschien.

Größere Veränderungen wurden bei der Beschreibung serumfreier Medien vorgenommen, da diese seit der 1. Auflage größere Akzeptanz erlangt haben und auch im Handel zu erwerben sind. Parallel dazu, und in vielen Fällen auch als direkte Konsequenz, ist die Kultur spezifischer Zelltypen – wie z. B. von epidermalen Keratinozyten, Melanozyten und Mammaepithel – möglich geworden; Arbeitsvorschriften für diese speziellen Zellkulturen wurden daher aufgenommen.

Um eine genaue Beschreibung der Gebiete zu ermöglichen, für die ich mich nicht kompetent genug hielt, habe ich die Mitarbeit von einigen anderen Kollegen in Anspruch genommen. Mittels ihrer Hilfe und Erfahrung war es möglich, weitere Methoden auszuarbeiten. Diese Vorschriften betreffen sowohl neue Technologien, wie die somatische Zellhybridisierung und die Produktion von Hybridoma-Zellen, als auch die Kultur spezieller Zelltypen. Ich bin diesen neuen Mitarbeitern sehr dankbar, da durch sie der Rahmen des Buches erweitert werden konnte.

In den meisten der Fälle werden die angegebenen Arbeitsvorschriften den Ansprüchen der Benutzer genügen, ohne zusätzliche Literatur studieren zu müssen. Bei sehr aufwendigen und komplexen Methoden wurden weiterführende Literaturzitate angegeben. Intensiver behandelt wurden auch die Zytotoxizitätstests und die Kultur von Tumorzellen – besonders die menschlicher Tumoren – in Anlehnung an die Methoden, wie sie gegenwärtig in Krankenhäusern, Laboratorien, in der Biotechnologie und in der Arzneimittelindustrie Eingang gefunden haben.

Zusätzlich zu den Mitarbeitern, die ich bei den eben genannten spezielleren Arbeitsvorschriften schon erwähnte, bin ich wiederum zu Dank verpflichtet: meinen Kollegen vom „Department of Medical Oncology“, unter ihnen Jane Plumb, Stephen Merry, Carol McCormick, Alison Mackie und Ian Cunningham; desgleichen einer Reihe von graduierten und nichtgraduierten Studenten, unter ihnen John McLean, Alison Murray, Jim Müller, Iain Singer, Barbara Christie und Alan Beveridge, die mit Fakten und Ideen geholfen haben. Während ich versucht habe, ihre Fragen zu beantworten,

wurde ich angeregt, stärker über die Bedürfnisse der Benutzer des Buches nachzudenken.

Dank schulde ich auch Frau Rae Fergusson, die das Manuskript schneller tippte, als ich es bereitstellen konnte, und dabei meine schlechte Handschrift und unleserlichen Korrekturen mit unglaublicher Genauigkeit handhabte.

Vor allem danken möchte ich auch meiner Frau und meiner Familie für ihre andauernde Hilfe und Unterstützung. Sie leisteten viel praktische Hilfe, gaben Ratschläge und moralische Unterstützung.

R. Ian Freshney

Aus dem Vorwort zur 1. Auflage

Die Gewebekultur ist keine neue Technik. Einfache Methoden entstanden bereits zu Beginn unseres Jahrhunderts, durchliefen eine Etappe einfacher Erprobung und in den 50er Jahren eine Phase der Expansion. Die derzeitige Spezialisierung ist vor allem mit der Erforschung von Kontrollmechanismen und Differenzierungsfunktionen verknüpft. Den gegenwärtigen Trends entsprechend behandeln die verfügbaren neueren Gewebekulturbücher vor allem spezialisierte Techniken, während die Beschreibung grundlegender Arbeitsgänge ein wenig vernachlässigt wird.

Beim Schreiben dieses Handbuches war es mein Ziel, dem Anfänger ausreichende Informationen über die Handhabung grundlegender Techniken zu vermitteln. Es wird vorausgesetzt, daß der Leser über Grundkenntnisse der Anatomie, Histologie, Zellphysiologie und der Biochemie verfügt. Erfahrungen in der Gewebekultur sind dagegen nicht erforderlich. Das Buch soll sich als nützlich im Praktikum für fortgeschrittene Studenten erweisen, auch sollen Promovenden angesprochen werden. Es ist sowohl als Einführung in die Theorie der Methoden und in die Biologie der kultivierten Zelle wie auch als praktische Arbeitsanleitung gedacht. Zwangsläufig konnten bedeutsame Entwicklungen der letzten Jahre, z. B. die Produktion monoklonaler Antikörper in Hybridoma-Kulturen, nur kurz beschrieben werden – Literaturzitate sollen das weitere Studium ermöglichen.

Eine Liste von Reagenzien und Handelsfirmen bildet den Abschluß des Buches. Gelegentlich wird ein Fir-

menname auch im Text verwendet. Zumeist wird jedoch auf den Handelsindex verwiesen.

Weitere Anhänge umfassen ein Glossar, eine Liste von Zellbanken, das Sachwortverzeichnis und die im Text angeführten Literaturzitate.

Bei der Vorbereitung, ein Buch wie das vorliegende zu schreiben, ist es unvermeidlich, zusätzlich zu den eigenen Kenntnissen die Hilfe und Ratschläge vieler anderer zu nutzen, an die ich mich sowohl während der direkten Arbeit am Buch wie auch in den 20 Jahren seit meiner ersten Kontakte mit dem Arbeitsgebiet gewendet habe. Wie auf vielen anderen Gebieten gibt es auch in der Gewebekultur Erfahrungen, die nirgendwo dokumentiert sind, jedoch bei Begegnungen und auf Tagungen – häufiger noch in geselliger Runde nach Tagungen – mündlich übermittelt werden. Es mag daher vorkommen, daß ich derartige Hinweise oder Informationen wie meine eigenen wiedergebe und nicht durch Anführung eines möglicherweise existierenden Literaturzitates gebührend würdige. In all diesen Fällen möchte ich denen danken, die bewußt oder unbewußt zu meinem eigenen Erfahrungsschatz auf diesem Fachgebiet beigetragen haben.

Da es unmöglich ist, sich all derer zu erinnern, die in den letzten zwei Jahrzehnten mein gegenwärtiges Verständnis des Gebietes beeinflußt haben, möchte ich jene nennen, die besondere Erwähnung verdienen. Zuallererst ist dies Dr. John Paul, der mich mit gesundem Menschenverstand und praktischem Sinn in dieses Fachgebiet einführte, das – bei korrekter Handhabung – eine sehr präzise Disziplin sein kann. Ich schulde ihm meinen aufrichtigen Dank, als sein einstiger Schüler und jetziger Mitarbeiter und Freund.

In den Jahren meiner Tätigkeit am Beatson Institut hatte ich das Privileg, mit vielen Kollegen, sowohl ständigen Mitarbeitern als auch Besuchern, zusammenzuarbeiten und an ihrer Erfahrung in der Handhabung neuer Methoden, mit denen ich sonst nicht in Berührung gekommen wäre, teilzuhaben. In einigen Fällen sind diese Kollegen im Text oder in den Abbildungslegenden erwähnt, aber ich hoffe, daß auch alle, die namentlich nicht genannt sind, meine Dankbarkeit erkennen werden.

Unter denen, die namentlich genannt werden sollen, befinden sich diejenigen, mit denen ich in den letzten Jahren besonders eng zusammengearbeitet habe, die mir bei meinen eigenen Forschungsarbeiten geholfen und manche Ergebnisse, die in diesem Buch verwendet werden, erarbeitet haben. Unter ihnen sind Diana Morgan, Elaine Hart, Margaret Frame, Alistair McNab, Irene Osprey und Sheila Brown. Andere, mit denen ich nur

kurz zusammengearbeitet habe, über deren Arbeit aber berichtet wird, waren Mohammad Hassanzadah, Peter Crilly, Fadik Akturk, Metyn Guner, Fahri Celik, Aileen Sherry, Bob Shaw und Carolyn MacDonald.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch vielen Kollegen aus Glasgow und anderswo für hilfreiche Ratschläge und Zusammenarbeit. Unter vielen anderen waren David G. T. Thomas, David I. Graham, Michael Stack-Dunne, Peter Vaughan, Brian McNamee, David Doyle, Rona MacKie, Kenneth C. Calman und der verstorbene John Maxwell Anderson, mit dem mich meine erste klinische Zusammenarbeit verbindet.

Ich muß auch betonen, daß ich das Glück hatte, in anderen Laboratorien von den Erfahrungen anderer, wie etwa von Robert Auerbach, Richard Ham und Wally McKeehan, zu lernen. Dankbar bin ich auch den „Flow Laboratories“ für ihre Hilfe und Unterstützung anlässlich der Durchführung von Gewebekultur-Kursen und der Möglichkeit, dabei meine Kenntnisse auf diesem Gebiet zu erweitern.

Ich möchte meine Dankbarkeit ausdrücken gegenüber Paul Chapple, der mich zuerst zum Schreiben eines Buches über Grundtechniken der Gewebekultur überredete, und auch gegenüber vielen anderen, unter ihnen Don Dougall, Wally und Kerstin McKeehan, Peter del Vecchio, John Ryan, Jim Smith, Rob Hay, Charity Waymouth, Sergey Federoff, Mike Gabridge und Dan Lundin für Hilfe und Hinweise bei der Vorbereitung des Manuskriptes.

Danken möchte ich auch Frau Donna Madore für die Übertragung meines oft unleserlichen Manuskriptes, Frau Marina LaDuke für fachmännisches Photographieren, Frau Diane Leifheit für die Hilfe bei Illustrationen und Frau Jane Gillies für das Anfertigen der Zeichnungen. Mein Dank gilt auch Frau Norma Wallace für das Schreiben des endgültigen Manuskriptes.

Es würde sich nicht ziemen, dieses Vorwort ohne einen besonderen Dank an meine Frau Mary, meine Tochter Gillian und meinen Sohn Norman zu beenden. Ich genoß nicht nur zu Hause ihre Zuneigung und ihr Verständnis – auch wenn ich diese manchmal nicht verdiente – sondern ich profitierte von den Früchten ihrer täglichen Arbeit: Zeichnen von Diagrammen, Sammeln von Literaturzitate, Suchen und Ordnen von Methoden und Informationen. Die Erfahrung meiner Frau hierbei sowie zahllose Stunden des Lesens, Überarbeitens und Sammelns von Informationen machten ihren Anteil an diesen Arbeiten unentbehrlich.

R. Ian Freshney

Inhaltsverzeichnis

| | | | |
|--|-----------|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis..... | XV | 4.1.10 Kryokonservierung von Zellen | 31 |
| 1 Einführung | 1 | 4.2 Nützliche Laborausrüstung | 32 |
| 1.1 Geschichte der Gewebekultur | 1 | 4.2.1 Laminarbox (Reinraumwerkbank)..... | 32 |
| 1.2 Vorteile der Gewebekultur | 3 | 4.2.2 Zellzählgeräte | 32 |
| 1.2.1 Kontrolle des Kulturmilieus..... | 3 | 4.2.3 Vakuumpumpen | 32 |
| 1.2.2 Charakterisierung und Homogenität der Probe | 3 | 4.2.4 CO ₂ -Inkubatoren | 33 |
| 1.2.3 Wirtschaftlichkeit | 3 | 4.2.5 Medienpräparation und Qualitäts- kontrolle | 35 |
| 1.3 Nachteile der Gewebekultur | 3 | 4.2.6 Mikroskope | 35 |
| 1.3.1 Sachkenntnis und Erfahrung | 3 | 4.2.7 Temperaturlaufzeichnung..... | 35 |
| 1.3.2 Zellausbeute..... | 4 | 4.2.8 Magnetrührer | 35 |
| 1.3.3 Instabilität | 4 | 4.2.9 Rollerapparaturen | 35 |
| 1.4 In-vitro-Besonderheiten..... | 4 | 4.2.10 Pipettierhilfen und automatische Pipetten..... | 36 |
| 1.5 Definitionen | 4 | 4.2.11 Mechanische Hilfen und Automatisierung. | 36 |
| 2 Biologie der kultivierten Zelle | 7 | 4.3 Nützliche Zusatzgeräte | 37 |
| 2.1 Kulturmilieu | 7 | 4.3.1 Tiefkühlgeräte | 37 |
| 2.2 Anlegen einer Zellkultur | 7 | 4.3.2 Spülmaschinen..... | 38 |
| 2.3 Entwicklung von Zelllinien | 7 | 4.3.3 Fernsehanlagen („closed-circuit tele- vision“) | 40 |
| 2.4 „Krise“ und Entstehung kontinuier- licher Zelllinien..... | 9 | 4.3.4 Koloniezählgeräte..... | 40 |
| 2.5 Entdifferenzierung | 10 | 4.3.5 Zellgrößenbestimmung | 41 |
| 2.6 Was ist eine kultivierte Zelle? | 12 | 4.3.6 Zeitraffer-Mikrokinematographie..... | 41 |
| 2.7 Funktionelles Milieu | 12 | 4.3.7 Programmierbare Zelleinfriergeräte..... | 42 |
| 3 Planung und Einrichtung eines Gewebekultur- laboratoriums | 15 | 4.3.8 Elutriationszentrifugen | 42 |
| 3.1 Steriler Arbeitsbereich..... | 15 | 4.3.9 Durchflußzytrophotometer | 42 |
| 3.2 Inkubation | 19 | 4.4 Verbrauchsmaterial..... | 42 |
| 3.3 Präparation und Vorbereitung..... | 23 | 4.4.1 Pipetten..... | 42 |
| 3.4 Reinigung..... | 23 | 4.4.2 Kulturgefäße | 42 |
| 3.5 Aufbewahrung und Lagerung | 24 | 5 Technik des aseptischen Arbeitens | 45 |
| 3.6 Bauliche Gestaltung und Ausstattung..... | 24 | 5.1 Ziele des aseptischen Arbeitens..... | 45 |
| 4 Laborausrüstung | 25 | 5.2 Ruhige Zonen | 45 |
| 4.1 Notwendige Laborausrüstung | 25 | 5.3 Arbeitsflächen | 47 |
| 4.1.1 Inkubatoren | 25 | 5.4 Persönliche Hygiene..... | 47 |
| 4.1.2 Inkubationstemperatur | 25 | 5.5 Pipettieren | 47 |
| 4.1.3 Dampfsterilisatoren | 26 | 5.6 Steriles Arbeiten | 48 |
| 4.1.4 Kühl- und Tiefkühlschränke | 27 | 5.6.1 Abwischen | 48 |
| 4.1.5 Mikroskope | 27 | 5.6.2 Verschließen | 48 |
| 4.1.6 Reinigungs-ausrüstung | 27 | 5.6.3 Abflammen..... | 48 |
| 4.1.7 Heißluftsterilisatoren und Trocken- schränke | 28 | 5.6.4 Gießen..... | 48 |
| 4.1.8 Wasserreinigung | 29 | 5.7 Laminarbox (Reinraumwerkbank)..... | 48 |
| 4.1.9 Zentrifugen..... | 31 | 5.8 Standardprozedur des aseptischen Arbeitens | 50 |
| | | 6 Sicherheit im Laboratorium und Biorisiken | 53 |
| | | 6.1 Allgemeine Sicherheit | 53 |

| | | | | |
|----------------------------|--|----|---|---|
| 6.1.1 | Glasgeräte und scharfe Gegenstände | 53 | 8 Vorbereitung und Sterilisation | 89 |
| 6.1.2 | Toxische Chemikalien | 53 | 8.1 | Vorbereitung und Sterilisation von |
| 6.1.3 | Gase | 53 | | Geräten |
| 6.1.4 | Flüssiger Stickstoff | 54 | 8.1.1 | Glasgeräte |
| 6.2 | Feuer | 55 | 8.1.2 | Pipetten |
| 6.3 | Strahlung | 55 | 8.1.3 | Schraubkappen |
| 6.4 | Biorisiken | 56 | 8.1.4 | Sonstige Gerätschaften |
| | | | 8.1.5 | Alternative Sterilisationsmethoden |
| 7 Kulturbedingungen | | 59 | 8.1.6 | Auswahl der Detergenzien |
| 7.1 | Substrat | 59 | 8.1.6.1 | Reinigungseffizienz |
| 7.1.1 | Glas | 59 | 8.1.6.2 | Qualität von Kulturflächen |
| 7.1.2 | Einwegplastikmaterialien | 59 | 8.1.6.3 | Zytotoxizität |
| 7.1.3 | Mikroträger | 60 | 8.2 | Vorbereitung und Sterilisation von |
| 7.1.4 | Sterilisation von Plastikmaterialien | 60 | | Reagenzien und Medien |
| 7.1.5 | Andersartige künstliche Substrate | 60 | 8.2.1 | Wasser |
| 7.1.6 | Vorbehandelte Oberflächen | 60 | 8.2.2 | Physiologische Salzlösungen |
| 7.1.6.1 | Collagenbeschichtung | 61 | 8.2.3 | Medien |
| 7.1.6.2 | Gelatinebeschichtung | 62 | 8.2.4 | Herstellung und Sterilfiltration sonstiger |
| 7.1.7 | Feederschichten | 62 | | Reagenzien |
| 7.1.8 | Dreidimensionale Matrizes | 63 | 8.2.5 | Sterilfiltration |
| 7.1.9 | Nichtadhäsive Substrate | 64 | 8.2.6 | Sterilitätsprüfung |
| 7.1.10 | Flüssig-Gel- und Flüssig-Flüssig- Grenzschichten | 64 | 8.2.7 | Wachstumstests |
| 7.1.11 | Perfundierte Mikrokapillaren | 65 | 8.2.8 | Lagerung |
| 7.1.12 | Kulturgefäße | 65 | 8.3 | Gewinnung und Vorbereitung von Serum |
| 7.2 | Gasphase | 69 | 9 Gewebedissoziation und Primärkultur | 109 |
| 7.2.1 | Sauerstoff | 69 | 9.1 | Isolierung des Gewebes |
| 7.2.2 | Kohlendioxid | 70 | 9.1.1 | Mäuseembryonen |
| 7.3 | Medien und Supplemente | 71 | 9.1.2 | Hühnerembryonen |
| 7.3.1 | Physikalische Eigenschaften | 71 | 9.1.3 | Menschliches Biopsiematerial |
| 7.3.1.1 | pH-Wert | 71 | 9.2 | Primärkulturen |
| 7.3.1.2 | Herstellung von pH-Standards | 71 | 9.2.1 | Kultur von Primärexplantaten |
| 7.3.1.3 | Pufferung | 72 | 9.2.2 | Enzymatische Gewebedissoziation |
| 7.3.1.4 | Osmolalität | 72 | 9.2.3 | Dissoziation in warmem Trypsin |
| 7.3.1.5 | Temperatur | 73 | 9.2.4 | Trypsinierung bei 4°C |
| 7.3.1.6 | Viskosität | 73 | 9.2.5 | Organanlagen des Hühnerembryos |
| 7.3.1.7 | Oberflächenspannung und Schaum- bildung | 73 | 9.2.6 | Andere enzymatische Methoden |
| 7.3.2 | Mediumbestandteile | 73 | 9.2.7 | Mechanische Dissoziation |
| 7.3.2.1 | Physiologische Salzlösungen | 73 | 9.2.8 | Trennung lebender und nicht lebens- fähiger Zellen |
| 7.3.2.2 | Definierte Medien | 74 | 10 Haltung der Kulturen – Zelllinien | 129 |
| 7.3.3 | Serum | 75 | 10.1 | Nomenklatur |
| 7.3.4 | Serumfreie Medien | 78 | 10.2 | Routinemethoden |
| 7.3.4.1 | Selektionsmedien | 80 | 10.2.1 | Mediumwechsel |
| 7.3.4.2 | Nachteile | 81 | 10.2.2 | Volumen, Mediumtiefe und Oberfläche |
| 7.3.4.3 | Serumersatz | 82 | 10.2.3 | Erhaltungsmedium |
| 7.3.4.4 | Auswahl und Entwicklung eines serum- freien Mediums | 83 | 10.2.4 | Mediumwechsel oder „Füttern“ einer Kultur |
| 7.3.4.5 | Herstellung serumfreier Medien | 83 | 10.2.5 | Subkultivierung |
| 7.3.4.6 | Schlußfolgerungen | 84 | 10.2.6 | Vermehrung in Suspension |
| 7.4 | Auswahl von Medium und Serum | 84 | 10.3 | Schlechtes Zellwachstum |
| 7.4.1 | Chargenreservierung | 85 | 11 Klonierung und Selektion spezifischer Zellarten | 139 |
| 7.4.2 | Prüfen von Serum | 86 | 11.1 | Klonierung |
| 7.5 | Sonstige Zusätze | 86 | | |
| 7.6 | Inkubationstemperatur | 87 | | |

| | | | | | |
|--|--|-----|--|--|-----|
| 11.1.1 | Klonieren durch Verdünnung..... | 139 | 13.5 | RNA- und Proteingehalt..... | 183 |
| 11.1.2 | Stimulation der Plattiereffizienz..... | 141 | 13.6 | Enzymaktivität..... | 183 |
| 11.1.3 | Multischalen..... | 143 | 13.7 | Antigenmarker..... | 186 |
| 11.1.4 | Halbfeste Medien..... | 143 | 13.7.1 | Indirekte Immunfluoreszenztechnik..... | 186 |
| 11.1.4.1 | Klonieren in Agar..... | 143 | 13.7.2 | Indirekte Peroxidasetechnik..... | 187 |
| 11.1.4.2 | Klonieren in Methocel über Grundagar..... | 146 | 13.7.3 | Peroxidase-Antiperoxidase-Technik (PAP)..... | 187 |
| 11.1.5 | Isolierung von Klonen..... | 146 | 13.8 | Differenzierung..... | 187 |
| 11.1.5.1 | Monolayerklone – Multischalen..... | 146 | 14 Induktion der Differenzierung..... | 189 | |
| 11.1.5.2 | Klonierringe..... | 146 | 14.1 | Stadien der Determination und Differen- zierung..... | 189 |
| 11.1.5.3 | Bestrahlung..... | 148 | 14.2 | Proliferation und Differenzierung..... | 190 |
| 11.1.5.4 | Isolierung von Klonen aus halbfesten Medien..... | 148 | 14.3 | Determination und Differenzierung..... | 191 |
| 11.1.5.5 | Andere Isolierungsmethoden..... | 149 | 14.4 | Differenzierungsmarker..... | 192 |
| 11.2 | Selektionsmedien..... | 149 | 14.5 | Induktion der Differenzierung..... | 193 |
| 11.3 | Isolierung genetischer Varianten..... | 149 | 14.5.1 | Lösliche Induktoren..... | 193 |
| 11.4 | Wechselwirkung mit dem Substrat..... | 151 | 14.5.2 | Zelluläre Wechselwirkungen..... | 193 |
| 11.4.1 | Selektive Anheftung..... | 151 | 14.5.3 | Zell-Matrix-Wechselwirkungen..... | 194 |
| 11.4.2 | Selektives Ablösen..... | 152 | 14.5.4 | Polarität und Zellform..... | 195 |
| 11.4.3 | Beschaffenheit des Substrates..... | 152 | 14.6 | Differenzierung und Malignität..... | 195 |
| 12 Physikalische Methoden der Zelltrennung..... | 157 | | 14.7 | Praktische Aspekte..... | 195 |
| 12.1 | Methoden auf der Grundlage der Zellgrö- ße und Sedimentationsgeschwindigkeit .. | 157 | 14.7.1 | Präparation von Collagengel..... | 196 |
| 12.1.1 | Spontansedimentation bei 1 g..... | 158 | 14.7.2 | Beschichtung von Oberflächen mit vernetztem Collagen..... | 197 |
| 12.1.2 | Elutriationszentrifugation..... | 162 | 15 Der transformierte Phänotyp..... | 199 | |
| 12.2 | Methoden auf der Grundlage der Zell- dichte..... | 164 | 15.1 | Was ist Transformation?..... | 199 |
| 12.2.1 | Isopyknische Sedimentation..... | 164 | 15.2 | Anheftungsunabhängigkeit (Substrat- unabhängigkeit)..... | 201 |
| 12.3 | Methoden auf der Grundlage der Fluo- reszenz..... | 166 | 15.2.1 | Klonierung in Suspension..... | 201 |
| 12.4 | Weitere Methoden..... | 169 | 15.2.2 | Kontakthemmung und Dichtebegrenzung des Wachstums..... | 202 |
| 13 Charakterisierung von Zelllinien..... | 171 | | 15.2.3 | Wachstum auf konfluenten Monolayern .. | 203 |
| 13.1 | Einführung..... | 171 | 15.3 | Genetische Veränderungen..... | 205 |
| 13.1.1 | Identifizierung der Spezies..... | 171 | 15.4 | Zellprodukte und Serumabhängigkeit ... | 205 |
| 13.1.2 | Linien- oder gewebespezifische Merkmale | 171 | 15.4.1 | Tumorangiogenesefaktor..... | 207 |
| 13.1.3 | Unikale Marker..... | 172 | 15.4.2 | Plasminogen-Aktivator..... | 207 |
| 13.1.4 | Transformation..... | 172 | 15.5 | Invasives Wachstum..... | 207 |
| 13.2 | Morphologie..... | 172 | 15.6 | Tumorentstehung..... | 208 |
| 13.2.1 | Färbung..... | 172 | 16 Kontamination..... | 209 | |
| 13.2.2 | Kulturgefäße für zytologische Unter- suchungen an Monolayerkulturen..... | 174 | 16.1 | Arten mikrobieller Kontamination..... | 209 |
| 13.2.3 | Zytologische Untersuchungen an Suspensionskulturen..... | 174 | 16.1.1 | Kontrolle von Kulturen auf Mykoplas- men..... | 210 |
| 13.2.3.1 | Ausstriche..... | 174 | 16.1.2 | Fluoreszenztechnik zum Nachweis von Mykoplasmen..... | 211 |
| 13.2.3.2 | Zentrifugation..... | 175 | 16.1.2.1 | Monolayerkulturen..... | 211 |
| 13.2.3.3 | Tropfentechnik..... | 176 | 16.1.2.2 | Suspensionskulturen und infizierte Medien..... | 212 |
| 13.2.3.4 | Filtration..... | 176 | 16.1.3 | Alternative Methoden zur Bestimmung von Mykoplasmen..... | 212 |
| 13.2.4 | Photographie..... | 177 | 16.2 | Nachweis mikrobieller Kontamination .. | 213 |
| 13.3 | Chromosomenanalyse..... | 177 | 16.3 | Kreuzkontamination..... | 216 |
| 13.3.1 | Chromosomenpräparation..... | 178 | 16.4 | Schlußfolgerungen..... | 216 |
| 13.3.2 | Chromosomenbänderung..... | 179 | | | |
| 13.3.2.1 | G-Banden..... | 179 | | | |
| 13.3.2.2 | Q-Banden..... | 180 | | | |
| 13.4 | DNA-Gehalt..... | 183 | | | |

| | | | |
|---|-----|--|-----|
| 17 Instabilität, Variation und Langzeitlagerung ... | 219 | 19.2.1.3 Sonstige Verfahren | 253 |
| 17.1 Kulturmilieu | 219 | 19.2.2 Langzeittests (Überlebenstests) | 253 |
| 17.2 Selektives Wachstum, Transformation und Alterung | 219 | 19.3 Mikrotitration | 255 |
| 17.3 Genetische Instabilität | 219 | 19.4 Metabolische Tests | 260 |
| 17.4 Kryokonservierung von Zellen | 220 | 19.5 Wechselwirkungen von Substanzen | 261 |
| 17.4.1 Auswahl einer Zelllinie | 220 | 19.6 Screening kanzerostatischer Substanzen | 261 |
| 17.4.2 Standardisierung von Medien und Serum | 221 | 19.6.1 Prognostische Tests | 261 |
| 17.4.3 Einfrieren von Zellen | 221 | 19.6.2 Kultursysteme | 261 |
| 17.4.4 Auftauen der Zellen | 227 | 19.7 Mutagenität | 262 |
| 17.5 Zellbanken | 229 | 19.8 Karzinogenität | 262 |
| 18 Quantitative Erfassung und ihre experimentelle Realisierung | 231 | 20 Kultivierung spezieller Zellarten | 265 |
| 18.1 Zellzählung | 231 | 20.1 Epithelzellen | 265 |
| 18.1.1 Hämozytometer | 231 | 20.1.1 Epidermale Zellen | 265 |
| 18.1.2 Elektronische Partikelzählung | 233 | 20.1.2 Mammaepithelzellen | 268 |
| 18.1.2.1 Arbeitsweise des Coulter-Counters | 233 | 20.1.3 Cervixepithelzellen | 269 |
| 18.1.2.2 Bedienung des Coulter-Counters (Modell DI) | 234 | 20.1.4 Darmepithelzellen | 270 |
| 18.1.3 Färbung der Monolayer | 236 | 20.1.5 Leberparenchymzellen | 271 |
| 18.2 Zellmasse | 236 | 20.1.6 Pankreasepithelzellen | 273 |
| 18.3 DNA-Gehalt | 237 | 20.1.7 Nierenepithelzellen | 274 |
| 18.3.1 Bestimmung des DNA-Gehalts von Zellen mit Hoechst 33258 | 237 | 20.1.8 Bronchial- und Trachealepithelzellen | 274 |
| 18.3.2 Bestimmung des DNA-Gehalts von Zellen mit DAPI | 237 | 20.1.9 Prostataepithelzellen | 275 |
| 18.4 Proteingehalt | 238 | 20.2 Mesenchymzellen | 277 |
| 18.4.1 Zellaufschluß | 238 | 20.2.1 Bindegewebszellen | 277 |
| 18.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry | 238 | 20.2.2 Fettzellen | 277 |
| 18.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford | 238 | 20.2.3 Muskelzellen | 277 |
| 18.4.4 Proteinsynthese | 239 | 20.2.4 Knorpelzellen | 279 |
| 18.4.5 DNA-Synthese | 240 | 20.2.5 Knochenzellen | 280 |
| 18.5 Vorbereitung von Proben für Enzym- und Immunoassays | 241 | 20.2.5.1 Explantatkulturen | 280 |
| 18.6 Parallelproben | 241 | 20.2.5.2 Monolayerkulturen von dissoziierten Zellen | 281 |
| 18.7 Wachstumszyklus | 241 | 20.2.6 Endothelzellen | 281 |
| 18.7.1 Latenzphase (lag-Phase) | 243 | 20.3 Neuroektodermale Zellen | 283 |
| 18.7.2 Exponentielle Phase (log-Phase) | 243 | 20.3.1 Neuronalzellen | 283 |
| 18.7.3 Plateauphase | 244 | 20.3.2 Gliazellen | 285 |
| 18.8 Plattiereffizienz | 245 | 20.3.3 Endokrine Zellen | 285 |
| 18.9 Klonaler Wachstumstest mit der Ver- dünnungstechnik | 245 | 20.3.4 Melanozyten | 286 |
| 18.10 Markierungsindex | 246 | 20.4 Hämatopoetische Zellen | 287 |
| 18.11 Mitose-Index | 248 | 20.5 Keimzellen | 292 |
| 18.12 Zellzykluszeit (Generationszeit) | 248 | 20.6 Minimal-Deviation-Tumorzellen | 293 |
| 18.13 Zytometrie | 249 | 20.7 Teratomzellen | 293 |
| 19 Zytotoxizitäts- und Vitalitätstests | 251 | 21 Kultivierung von Tumorgewebe | 295 |
| 19.1 Grenzen der In-vitro-Methoden | 251 | 21.1 Materialentnahme | 295 |
| 19.2 Art des Testsystems | 251 | 21.2 Dissoziation | 296 |
| 19.2.1 Kurzzeittests (Vitalitätstests) | 252 | 21.3 Primärkulturen | 296 |
| 19.2.1.1 Farbstoffausschlußtests | 252 | 21.4 Charakterisierung | 297 |
| 19.2.1.2 Farbstoffaufnahmetests | 252 | 21.5 Entwicklung von Zelllinien | 298 |
| | | 21.6 Allgemeine Methoden | 298 |
| | | 21.7 Selektionskulturen | 298 |
| | | 21.7.1 Selektionsmedien | 299 |
| | | 21.7.2 Selektive Substrate | 299 |
| | | 21.7.3 Konfluente Feederschichten | 299 |
| | | 21.7.4 Klonierung in Suspension | 301 |
| | | 21.7.5 Histotypische Kulturen | 301 |

| | | | | | |
|-----------|---|------------|----------------------------|---|------------|
| 21.7.6 | Xenotransplantate | 302 | 23.4 | Kultur von Poikilothermenzellen | 329 |
| 21.7.7 | Kryokonservieren | 302 | 23.5 | Synchrone Zellkulturen | 329 |
| 22 | Dreidimensionale Kultursysteme | 303 | 23.5.1 | Zellseparation | 330 |
| 22.1 | Organkulturen | 304 | 23.5.2 | Blockade des Zellzyklus | 330 |
| 22.1.1 | Gas- und Nährstoffaustausch | 304 | 23.6 | Zeitraffer-Mikrokinematographie | 330 |
| 22.1.2 | Strukturelle Integrität | 304 | 23.6.1 | Videobandaufnahmen | 331 |
| 22.1.3 | Wachstum und Differenzierung | 305 | 23.6.2 | Zeitraffer-Filmaufnahmen | 332 |
| 22.1.4 | Grenzen der Organkultur | 305 | 23.7 | Amniozentese | 333 |
| 22.1.5 | Arten von Organkulturen | 305 | 23.8 | Fusion somatischer Zellen | 335 |
| 22.2 | Histotypische Kulturen | 309 | 23.8.1 | Selektion von Hybridklonen | 337 |
| 22.2.1 | Schwammtechniken | 309 | 23.9 | Gentransfer | 337 |
| 22.2.2 | Kapillarperfusion | 309 | 23.10 | Produktion monoklonaler Antikörper ... | 340 |
| 22.2.3 | Reaggregation und Sphäroide | 310 | 23.11 | Molekulare Hybridisierung in situ | 343 |
| 22.2.4 | Filtertechniken | 311 | 23.12 | Präparation und Nachweis von Viren ... | 346 |
| 23 | Spezielle Techniken | 315 | 23.13 | Schlußbetrachtung | 348 |
| 23.1 | Massenkulturtechniken | 315 | 24 | Reagenzien | 349 |
| 23.1.1 | Suspensionskulturen | 315 | 25 | Zellkultur-Bedarfsartikel | 355 |
| 23.1.2 | Monolayerkultur | 318 | 25.1 | Hersteller oder Lieferanten | 355 |
| 23.1.2.1 | Nunclon-„Zellfabrik“ (Wannenstapel) ... | 318 | 25.2 | Adressen | 358 |
| 23.1.2.2 | Rollerkultur | 320 | 26 | Glossar | 365 |
| 23.1.2.3 | Spiral-Kulturgefäß | 321 | Literaturverzeichnis | 371 | |
| 23.1.2.4 | Mikroträger (engl. „microcarrier“). | 321 | Register | 395 | |
| 23.2 | Lymphozytenpräparation | 324 | | | |
| 23.2.1 | Blastentransformation | 324 | | | |
| 23.3 | Autoradiographie | 325 | | | |

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|-------|--|------|--|
| BME | Eagle's Basalmedium (engl. „basal medium Eagle“) | HuS | Humanserum |
| BSS | gepufferte, isotonische Salzlösung (engl. „balanced salt solution“) | IGF | insulinähnlicher Wachstumsfaktor (engl. „insulin-like growth factor“) |
| CAM | Chlorio-Allantois-Membran | IL | Interleukin |
| CEA | karzinoembryonales Antigen (engl. „carcinoembryonic antigen“) | LDL | engl. „low-density-lipoprotein“ |
| CFC | koloniebildende Zelle (engl. „colony forming cell“) | MEM | Minimalmedium (engl. „minimal essential medium“) |
| CMC | Carboxymethylcellulose | MEMS | MEM modifiziert für Suspensionskulturen (ohne Ca ²⁺) |
| CMF | calcium- und magnesiumfreie(s) Salzlösung bzw. Medium | MGF | Melanozytenwachstumsfaktor (engl. „melanocyte growth factor“) |
| CPE | zytopathischer Effekt (engl. „cytopathic effect“) | MSA | engl. „multiplication stimulating activity“ |
| cpm | Impulse pro Minute (engl. „counts per minute“) | MSH | melanozytenstimulierendes Hormon |
| CSF | koloniestimulierender Faktor (engl. „colony stimulating factor“) | MTT | 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolylblau |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol | MTX | Methotrexat |
| DBSS | Dulbecco's gepufferte Salzlösung, auch für HBSS ohne NaHCO ₃ gebraucht (engl. „dissection BSS“) | NGF | Nervenwachstumsfaktor (engl. „nerve growth factor“) |
| DHFR | Dihydrofolatreductase | NKS | neonatales Kälberserum |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | PAP | Peroxidase-Antiperoxidase |
| dpm | Zerfälle pro Minute (engl. „disintegrations per minute“) | PBE | plaquebildende Einheit (engl. „plaque forming ability“ pfa oder „plaque forming unit“ pfu) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure | PBS | phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. „phosphat buffered saline“) |
| EGF | epidermaler Wachstumsfaktor (engl. „epidermal growth factor“) | PBSA | DBSS ohne Calcium und Magnesium |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure | PBSB | calcium- und magnesiumhaltige Lösung zur Komplettierung von PBSA |
| EtOH | Ethanol | PCA, | Perchloressigsäure (engl. „perchloric acid“) |
| FACS | engl. „fluorescence activated cell sorter“ | PCE | |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat | PDGF | Plättchenwachstumsfaktor (engl. „platelet derived growth factor“) |
| FKS | fetales Kälberserum | PE | Plattiereffizienz (engl. „plating efficiency“), auch für PBS-EDTA gebraucht |
| FSH | follikelstimulierendes Hormon | PEG | Polyethylenglycol |
| GBSS | Gey's gepufferte Salzlösung | pfu | s. PBE |
| GFAP | saures fibrilläres gliales Protein (engl. „glial fibrillary acidic protein“) | PHA | Phythämagglutinin |
| HAT | Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin | PMS | Phenazinmethosulfat |
| HBSS | Hanks' gepufferte Salzlösung | PTFE | Polytetrafluorethylen |
| HCG | engl. „human-chorionic-gonadotropin“ | PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure | PWM | Pokeweed-Mitogen |
| HGPRT | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase | RITC | Rhodaminisothiocyanat |
| HS | Pferdeserum (engl. „horse serum“) | RSA | Rinderserumalbumin |
| | | SDS | Natriumdodecylsulfat (engl. „sodium dodecyl sulfate“) |
| | | SSC | citratgepufferte Kochsalzlösung (engl. „standard saline citrate“) |

XVI Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|--------------------|---|------------|--|
| TCA, TCE TGF | Trichloressigsäure (engl. „trichloroacetic acid“) transformierender Wachstumsfaktor (engl. „transforming growth factor“) | TPA TSH | Gewebeplasminogenaktivator (engl. „tissue plasminogen activator“) thyreoideastimulierendes Hormon, Thyreotropin |
|--------------------|---|------------|--|

1 Einführung

1.1 Geschichte der Gewebekultur

Die Gewebekultur wurde zu Beginn unseres Jahrhunderts (Harrison 1907; Carrel 1912) als eine Methode entwickelt, die es erlaubt, das Verhalten von Zellen unabhängig von systemischen Variationen, die im Tier sowohl bei normaler Homöostase als auch unter der Belastung eines Experimentes auftreten können, zu studieren. Wie der Name besagt, werde die Methode zuerst mit undissoziierten Gewebestücken erprobt; das Wachstum war beschränkt auf die Auswanderung von Zellen aus dem Explantat und gelegentliche Mitosen unter diesen ausgewanderten Zellen. Da die Arbeit mit Primärexplantaten mehr als 50 Jahre dominierte, ist es nicht überraschend, daß der Name „Gewebekultur“ beibehalten wurde, obwohl die explosionsartige Ausdehnung des Fachgebietes seit etwa 1950 vorwiegend auf der Arbeit mit Kulturen dispergierter Zellen beruht.

In diesem Buch wird der Ausdruck „Gewebekultur“ als generischer Term verwendet, der sowohl die Organkultur als auch die Zellkultur umfaßt. Mit „Organkultur“ wird immer eine dreidimensionale Kultur eines unzerlegten Gewebes bezeichnet, in der einige oder alle der *in vivo* bestehenden histologischen Charakteristika dieses Gewebes erhalten bleiben. Der Ausdruck „Zellkultur“ bezieht sich auf Kulturen, die von vereinzelt Zellen des Originalgewebes, von einer Primärkultur, einer Zelllinie oder einem Zellstamm durch enzymatische, mechanische oder chemische Dissoziation erhalten werden. Der Term „histotypische“ Kultur impliziert, daß die Zellen durch Reassoziierung erneut eine dreidimensionale gewebeähnliche Struktur ausbilden, z. B. in Perfusionskulturen durch Überwachsen einer Einzellschicht (engl. „monolayer“), durch Reaggregation in Suspension oder durch Infiltration einer dreidimensionalen Matrix wie etwa einem Collagengel.

Harrison wählte den Frosch als Gewebequelle, wahrscheinlich deshalb, weil die Zellen eines kaltblütigen Tieres keiner Inkubation bedürfen. Da auch die Geweberegeneration bei niederen Vertebraten stärker ausgeprägt ist, glaubte er möglicherweise, daß Wachstum eher eintreten würde als bei Säugergeweben. Obgleich seine Technik neues Interesse an der *In-vitro*-Kultivierung von Geweben ausgelöst haben dürfte, folgten nur wenige spätere Bearbeiter seinem Beispiel in der Wahl der Spezies. Der von den medizinischen Wissenschaften ausgehende Stimulus lenkte das weitere Interesse auf

warmblütige Tiere, deren normale und pathologische Entwicklung dem Menschen näher steht. Die Verfügbarkeit verschiedenster Gewebe, von denen zudem viele gut in Kultur wuchsen, machte das bebrütete Hühnerei zum bevorzugten Objekt; die Entwicklung der modernen Versuchstierzucht und im besonderen die Züchtung genetisch einheitlicher Nager machten dann Säugergewebe zum favorisierten Material. Während Hühnerembryonen die Anlage von Primärkulturen verschiedenster Zelltypen ermöglichen, hat Nagergewebe den Vorteil, kontinuierliche Zelllinien zu bilden (Earle et al. 1943).

Der Nachweis, daß auch menschliche Tumoren Ausgangspunkt für kontinuierliche Zelllinien sein können (z. B. HeLa: Gey et al. 1952), förderte das Interesse an Humangeweben, das später noch weiter verstärkt wurde durch die klassischen Untersuchungen von Hayflick und Moorhead (1961) mit normalen, in der Lebensdauer begrenzten Zellen.

Viele Jahre lang wurden die niederen Vertebraten und die Invertebraten weitgehend ignoriert, obwohl einzigartige Aspekte ihrer Entwicklung (Geweberegeneration bei Amphibien, Metamorphose bei Insekten) sie zu attraktiven Objekten für das Studium der molekularen Grundlagen der Entwicklung machten. Erst in neuerer Zeit haben die Erfordernisse der Landwirtschaft und der Schädlingsbekämpfung toxikologische und virologische Untersuchungen an Insekten angeregt, und die schnelle Entwicklung von Fischfarmen verlangte nach detaillierteren Kenntnissen über die normale Entwicklung und Pathogenese bei Fischen.

Trotz dieses wiederauflebenden Interesses blieben Gewebekulturen der niederen Vertebraten und Invertebraten ein sehr spezielles Gebiet, und das Hauptaugenmerk galt weiterhin den Vogel- und Säugergeweben. Dies hat natürlich die Entwicklung der Kunst und Wissenschaft der Gewebekultur beeinflusst. Vieles von dem, was in den folgenden Kapiteln beschrieben wird, reflektiert dies ebenso wie eigene persönliche Erfahrungen. Empfehlungen für die Inkubation und die physikalischen und biochemischen Eigenschaften von Medien werden auf Homoiotherme bezogen; Hinweise auf Modifikationen für die Arbeit mit poikilothermen Tieren erfordern weiterführende Literaturrecherchen. Etwas detaillierter wird diese Problematik in einem späteren Kapitel diskutiert. Viele der grundlegenden Arbeitstechniken (steriles

Arbeiten, Präparation und Sterilisation der Medien, Anlage von Primärkulturen, Selektion und Präparation von Zellen, quantitative Bestimmungen u. a.) lassen sich jedoch mit nur geringfügigen Modifikationen ebenso auf Poikilotherme anwenden.

In Abbildung 1.1 sind Untersuchungsgebiete zusammengefaßt, für die sich Gewebekulturen besonders eignen:

- intrazelluläre Aktivitäten, z. B. Replikation und Transkription von Desoxyribonucleinsäure (DNA), Proteinsynthese, Energiestoffwechsel,
- intrazelluläre Stofftransporte, z. B. von Ribonucleinsäure (RNA) vom Kern zum Zytoplasma, Translokation von Hormon-Rezeptor-Komplexen, Fluktuationen im Metabolitenpool,
- „Ökologie“, z. B. Ernährung, Infektionen, viral oder chemisch induzierte Transformationen, Arzneimittelwirkungen, Reaktionen auf externe Reize, Sekretion spezieller Produkte und
- Zell-Zell-Wechselwirkungen, z. B. embryonale Induktion, Zellpopulationskinetik oder Zell-Zell-Adhäsion.

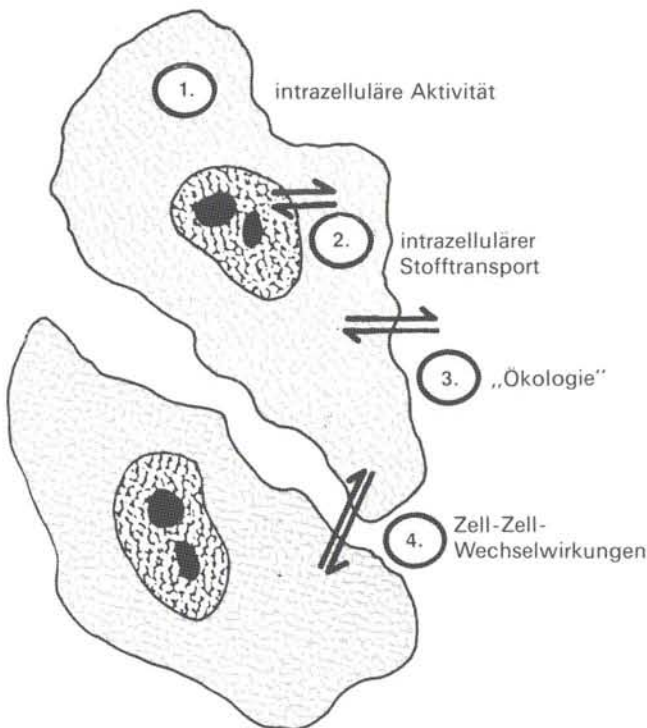


Abb. 1.1 Forschungsgebiete der Gewebekultur

Die Entwicklung der Gewebekultur als moderne, anspruchsvolle Technik wurde wesentlich durch die Bedürfnisse zweier Hauptrichtungen der medizinischen Forschung vorangetrieben: die Produktion antiviraler Impfstoffe und die Erforschung des Wesens der Neoplasie. Die Standardisierung der Bedingungen und Zelli-

nien für die Produktion und Bestimmung von Viren bedeutete zweifellos einen starken Impuls für die Entwicklung moderner Gewebekulturmethode, besonders für die Produktion großer Zellmengen für biochemische Analysen. Dies und andere technische Weiterentwicklungen, die aus der kommerziellen Verfügbarkeit zuverlässiger Medien und Sera und der dank Antibiotika und Reinraumtechnik verbesserten Kontaminationskontrolle resultierten, machten die Gewebekultur einem großen Interessentenkreis zugänglich.

Über die Krebsforschung und Virologie hinaus waren inzwischen auch andere Forschungsgebiete weitgehend auf Gewebekulturtechniken angewiesen. Die Einführung der Zellfusionstechniken (Barski et al. 1960; Soreuil und Ephrussi 1961; Littlefield 1964; Harris und Watkins 1965) und gentechnischer Methoden etablierten die somatische Zellgenetik als Kernstück der genetischen Analyse höherer Organismen einschließlich des Menschen und trugen über die Hybridomatechnik zur Produktion monoklonaler Antikörper wesentlich zur Entwicklung der Immunologie bei, die ihrerseits bereits von Zellkulturtechniken für Nachweisverfahren und der Entwicklung hämatopoetischer Zelllinien abhängig war.

Die mit Hilfe der Hybridomatechnik (Köhler und Milstein 1975) gewonnenen Einblicke in den Wirkungsmechanismus der Antikörper und die daraus resultierende reziproke Information über die Struktur des Epitopes waren – wie die Technik der Zellfusion selbst – der Auftakt für einen ganzen Bereich neuartiger Untersuchungen auf dem Gebiet der Genmanipulation. Diese haben viele grundlegende Informationen über die Kontrolle der Gentranskription ergeben, und eine neue, unermessliche Technologie erwuchs aus der Fähigkeit, nutzbare Gene in prokaryotische Zellen zu transferieren. Zelluläre Produkte, wie Wachstumshormon, Insulin und Interferon, wurden gentechnisch gewonnen; das Fehlen posttranskriptionaler Modifikationen bei Bakterien, wie der Glycosylierung, ließ die Säugerzellen jedoch als geeignetere Vehikel erscheinen. Der Transfer geeigneter Gene in normale menschliche Zellen, um sie in kontinuierliche Zelllinien zu überführen (s. Kap. 2.4) und zur Bildung pharmazeutisch wertvoller Stoffe zu veranlassen, wird profunde Auswirkungen auf die Arzneimittelindustrie haben, die nur von derzeit noch nicht erkennbaren radikalen Innovationen der organisch-chemischen Synthese übertroffen werden können. Andere Interessengebiete betreffen das Studium zellulärer Wechselwirkungen und intrazellulärer Kontrollmechanismen der Zelldifferenzierung und Entwicklung (Auerbach und Grobstein 1958; Cox 1974; Finbow und Pitts 1981) und Versuche zur Analyse der Nerventätigkeit (Bornstein und Murray 1958; Minna et al. 1972; Kingsbury et al. 1985). Der Fortschritt in der neurologischen Forschung konnte jedoch nicht von den Arbeiten mit neuronalen Zelllinien profitieren, denn bislang ist die

Vermehrung von Neuronen *in vitro* nicht möglich, es sei, man macht Gebrauch von transformierten Zellen (s. Kap. 20.3.1).

Gewebekulturmethoden wurden auch für viele Routineanwendungsbereiche in Medizin und Industrie nutzbar gemacht. Die Chromosomenanalyse von Zellen, die durch Amniozentese aus dem Mutterleib gewonnen werden (s. Kap. 23.7), kann beim ungeborenen Kind genetische Schäden aufzeigen, virale Infektionen können qualitativ und quantitativ an Monolayerkulturen geeigneter Wirtszellen bestimmt werden (s. Kap. 23.12), und die toxischen Effekte pharmazeutischer Produkte und potentieller Umweltgifte können in Kolonie- oder anderen *In-vitro*-Tests gemessen werden (s. Kap. 19).

Weitere Anwendungen der Gewebekultur bei medizinischen Problemen könnten sich aus dem Befund ergeben, daß in Kulturen epidermaler Zellen funktionell differenzierte Zellschichten (engl. „sheets“) entstehen (Green et al. 1979) oder daß endotheliale Zellen in Kultur Kapillaren formen können (Folkamn und Haudenschild 1980), woraus Möglichkeiten für die Autotransplantation und plastische Chirurgie unter Verwendung patienteneigener Zellen erwachsen (Pittelkow und Scott 1986).

Obwohl offensichtlich das Studium zellulärer Aktivitäten in Gewebekulturen viele Vorteile bietet, muß bei der Auflistung der Vorzüge auch den Grenzen gebührende Beachtung geschenkt werden, um den Sinn für reale Perspektiven zu erhalten.

1.2 Vorteile der Gewebekultur

1.2.1 Kontrolle des Kulturmilieus

Wie bereits angedeutet, bestehen die zwei Hauptvorteile in der Kontrollierbarkeit des physikalisch-chemischen Milieus (pH-Wert, Temperatur, osmotischer Druck, O₂- und CO₂-Tension), welches sehr genau überwacht werden kann, und in der Kontrolle der physiologischen Bedingungen, die relativ konstant gehalten, aber nicht immer definiert werden können. Die meisten Zelllinien bedürfen noch einer Komplettierung des Mediums durch Serum oder andere wenig definierte Bestandteile. Diese Zusätze neigen zu chargenabhängigen Variationen (Olmsted 1967; Honn et al. 1975) und enthalten unbekannte Stoffe, wie Hormone und andere Regulatorsubstanzen. Nach und nach werden die essentiellen Bestandteile des Serums jedoch identifiziert, wodurch dessen Ersatz durch definierte Komponenten möglich wird (Birch und Pirt 1971; Ham und McKeehan 1978; Barnes und Sato 1980; Barnes et al. 1984; Maurer 1986) (s. a. Kap. 7).

1.2.2 Charakterisierung und Homogenität der Probe

Gewebeproben sind immer heterogen. Sogar Parallelproben eines Gewebes variieren in ihrer zellulären Zusammensetzung. Da die Zellen bei jedem Transfer wahllos vermischt werden und der Selektionsdruck der Kulturbedingungen die Entstehung einer homogenen, aus dem vitalsten Zelltyp bestehenden Kultur begünstigt, erscheint die kultivierte Zelllinie nach ein oder zwei Passagen von homogener oder zumindest uniformer Beschaffenheit. Die von den Subkulturen erhaltenen Stichproben sind daher identisch, und die Charakteristika der Linie bleiben für einige Generationen erhalten; falls die Zelllinie in flüssigem Stickstoff gelagert wird, ist dies für unbegrenzte Zeit möglich. Wegen der weitgehenden Identität der Parallelproben reduziert sich auch die Notwendigkeit für eine statistische Analyse der Varianz.

1.2.3 Wirtschaftlichkeit

Kulturen können einem Reagens in geringer und definierter Konzentration unmittelbar ausgesetzt werden, wobei auch der Zutritt zu den Zellen direkt erfolgt. Es resultiert ein geringerer Substanzbedarf als nach Injektion *in vivo*, bei der > 90 % des Reagens durch Exkretion und Verteilung in Gewebe, die nicht untersucht werden, verloren gehen. Testverfahren mit vielen Variablen und Kontrollen sind billiger und umgehen die rechtlichen, moralischen und ethischen Probleme des Tierexperiments.

1.3 Nachteile der Gewebekultur

1.3.1 Sachkenntnis und Erfahrung

Da tierische Zellen viel langsamer wachsen als die Mehrzahl der üblichen kontaminierenden Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Hefen), müssen die Kulturmethoden unter streng aseptischen Bedingungen durchgeführt werden. Im Gegensatz zu Mikroorganismen kommen Zellen multizellulärer Tiere nicht isoliert vor und sind daher auch in Kultur nicht in der Lage, unabhängig von einem komplexen Milieu, durch welches Blutplasma und interstitielle Flüssigkeit simuliert werden, zu existieren. Dies bedeutet, daß ein gewisses Maß an Sachkenntnis und Erfahrung notwendig ist, um die Erfordernisse des Systems richtig einzuschätzen und auftretende Probleme zu erkennen. Mit Gewebekulturen sollte man sich nicht nur gelegentlich befassen, um ein oder zwei Experimente durchzuführen.

1.3.2 Zellausbeute

Eine wesentliche Beschränkung der Gewebekultur liegt im Aufwand an Arbeit und Material, der für die Produktion einer relativ kleinen Gewebemenge erforderlich ist. Ein reales Maximum für die in einem Ansatz zu erreichende Zellmenge sind 1–10 g, wenn die Arbeiten in einem der meist üblichen kleinen Laboratorien mit zwei bis drei Mitarbeitern durchgeführt werden. Mit wenig Mehraufwand können mit den Einrichtungen eines großen Laboratoriums 10–100 g erhalten werden; Mengen über 100 g erfordern industrielle Produktionsmethoden (Pilotanlagen), die den meisten Laboratorien zwar nicht zur Verfügung stehen, mit Hilfe spezieller Einrichtungen aber auch zugänglich sind.

Die Kosten für die Produktion von Zellen in Kultur sind etwa zehnmal höher als die bei Verwendung von tierischem Gewebe. Es müssen daher zwingende Gründe vorliegen, wenn größere Mengen eines Gewebes (> 10 g) durch Kultur gewonnen werden sollen. Die Aufwendungen für kleinere Mengen (≤ 10 g) sind zwar leichter im Rahmen der laufenden Kosten aufzubringen, trotzdem sollten immer die Möglichkeiten der Miniaturisierung einer Testmethode oder präparativen Prozedur beachtet werden. Im Hinblick auf die reduzierten Manipulationszeiten, Volumina, Zentrifugationszeiten usw. sind Halbmikro- oder Mikromethoden häufig schneller und können oft auch leichter automatisiert werden (s. Kap. 19.3).

1.3.3 Instabilität

Ein wesentliches Merkmal vieler kontinuierlicher Zelllinien ist deren Instabilität, die aus der Labilität ihres aneuploiden Chromosomensatzes resultiert. Aber auch bei genetisch stabilen Kurzzeitkulturen können durch die Heterogenität der Zellpopulation (unterschiedliche Wachstumsraten) von einer Passage zur anderen Veränderungen auftreten. Diese Problematik wird ausführlicher in den Kapiteln 10 und 17 behandelt.

1.4 In-vitro-Besonderheiten

Viele Verhaltensunterschiede zwischen Zellen in Kultur und ihren Pendanten *in vivo* resultieren aus der Auflösung der dreidimensionalen Geometrie und der Vermehrung auf einem zweidimensionalen Substrat. Spezifische, für die Histologie des Gewebes charakteristische zelluläre Wechselwirkungen gehen verloren; die Zellen breiten sich aus, werden mobil und beginnen in vielen Fällen zu proliferieren, wobei die Wachstumsfraktion der Zellpopulation anwächst. Wenn eine Zelllinie entsteht, repre-

sentiert sie u. U. nur ein oder zwei Zelltypen, viele heterotypische Wechselwirkungen sind demzufolge verlorengegangen.

Im Kulturmilieu fehlen auch verschiedenste systemische Komponenten, die *in vivo* in die homöostatische Regulation einbezogen sind; vor allem betrifft dies solche des Nerven- und des endokrinen Systems. Außerhalb dieser Kontrollmechanismen kann der Metabolismus der Zelle *in vitro* zwar konstanter als *in vivo* sein, er ist jedoch nicht wirklich repräsentativ für das Gewebe, von dem die Zellen stammen. Das Erkennen dieser Situation hat zur Integration einer Anzahl von Hormonen in die Kulturmedien geführt (s. Kap. 7.3.2), und es ist wahrscheinlich, daß sich diese Entwicklung fortsetzt.

Der Energiestoffwechsel vollzieht sich *in vitro* weitgehend über die Glycolyse; der Citronensäure-Zyklus spielt – obwohl funktionsfähig – eine geringere Rolle.

Es ist nicht schwer, viele weitere Unterschiede zwischen den Umweltbedingungen einer Zelle *in vitro* und *in vivo* aufzufinden. Dies hat oft dazu geführt, daß die Gewebekultur ziemlich skeptisch beurteilt wurde. Obwohl die Existenz solcher Unterschiede nicht bestritten werden kann, muß doch betont werden, daß viele spezifische Funktionen in Kultur exprimiert werden und diese daher ein wertvolles Hilfsmittel der Forschung wird, vorausgesetzt, daß die Grenzen des Modells beachtet werden.

Herkunft der Zellen. Wenn Differenzierungsmerkmale verlorengehen, aus welchen Gründen auch immer, ist es schwierig, die kultivierten Zellen den funktionellen Zellen des Gewebes, aus dem sie stammen, zuzuordnen. Für die Charakterisierung sind stabile Markierungsmerkmale erforderlich (s. Kap. 13); zusätzlich kann eine Modifizierung der Kulturbedingungen erforderlich werden, damit diese Merkmale auch exprimiert werden (s. Kap. 2 und 14).

1.5 Definitionen

Es gibt drei Hauptmethoden, um eine Kultur anzulegen (Schaeffer 1984) (s. Kap. 26 und Abb. 1.2):

- Bei *Organkulturen* bleibt der *in vivo* bestehende charakteristische Aufbau des Gewebes zumindest teilweise erhalten (s. Kap. 22.1). Die Beibehaltung einer sphärischen oder dreidimensionalen Struktur wird begünstigt, wenn das Gewebe an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Gasphase auf einem gegebenenfalls schwimmenden Stützgewebe (Netz, Gitter, Gel) kultiviert wird.
- Bei Kultur von *Primärexplantaten* läßt man Gewebestückchen an Glas oder Plastik adhären, wodurch das Auswandern und Auswachsen von Zellen aus

dem Explantat in der Ebene des festen Substrates begünstigt wird (s. Kap. 9.2.1).

- *Zellkultur* bedeutet, daß ein Gewebe oder die von einem Primärexplantat ausgewachsenen Zellen mechanisch oder enzymatisch zu einer Zellsuspension dispergiert werden und dann entweder als adhärenente Einzelschicht (Monolayer) auf einem festen Substrat oder als Suspension im Kulturmedium kultiviert werden (s. Kap. 9.2 und 10).

Organkulturen bewahren die zellulären Wechselwirkungen des Ursprungsgewebes und neigen daher auch zur Ausprägung ursprünglicher Differenzierungsmerkmale. Da Organkulturen nicht intensiv wachsen (Zellproliferation ist auf die Peripherie des Explantates und vorwiegend auf embryonale Gewebe beschränkt), können sie auch nicht vermehrt werden. Für jedes Experiment werden daher frische Explantate benötigt. Im Vergleich zur Arbeit mit Zellkulturen resultieren daraus vermehrter

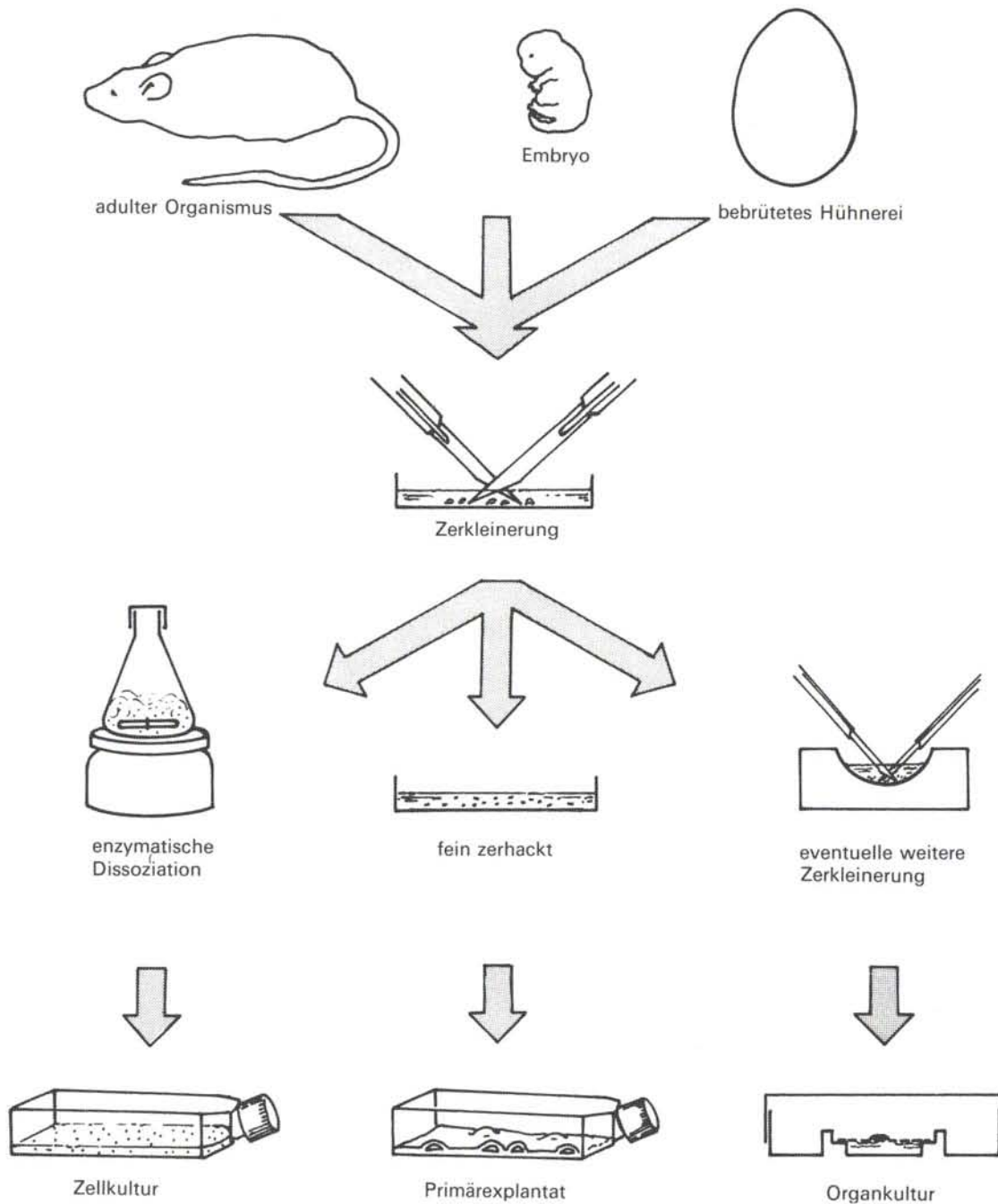


Abb. 1.2 Haupttypen der Gewebekulturen

Arbeitsaufwand und geringere Reproduzierbarkeit. Auch die Quantifizierung der Ergebnisse ist schwieriger und die Menge des Materials, das kultiviert werden kann, wird limitiert durch die Dimension der Explantate ($\leq 1 \text{ mm}^3$) und den Arbeitsaufwand, der für die Präparation des Materials und das Anlegen der Kultur erforderlich ist.

Es muß jedoch betont werden, daß Organkulturen spezifische histologische Wechselwirkungen bewahren, ohne die es schwierig wäre, Charakteristika des Gewebes zu reproduzieren.

Zellkulturen können mit Primärexplantaten oder Suspensionen vereinzelter Zellen angesetzt werden. Auf Grund der meist ausgeprägten Zellproliferation ist die Vermehrung (Propagation) von Zelllinien möglich. Sofern eine signifikante Wachstumsfraktion vorliegt (s. Kap. 18.10), kann eine Einzellschicht (Monolayer) nach enzymatischer Dissoziation oder eine Zellsuspension durch einfaches Verdünnen in neue Kulturgefäße überführt (subkultiviert) werden. Die im Verlauf der Subkultivierung („Passage“) entstandenen Tochterkulturen sind der Beginn einer „Zelllinie“.

Entstehung einer Zelllinie aus einer Primärkultur bedeutet, daß

- die Zellzahl über mehrere Generationen zunimmt,
- Zellen oder Zellarten mit vergleichbar hoher Wachstumskapazität dominieren werden, so daß
- Uniformität der Zellpopulation resultiert.

Wenn eine Zelllinie charakterisierbar ist, bleiben diese Charakteristika für den überwiegenden Teil der begrenzten Lebenszeit der Linie erhalten. Die Entstehung von „kontinuierlichen“ oder (in veralteter Terminologie) „etablierten“ Zelllinien ist in der Regel mit einer phänotypischen Veränderung oder „Transformation“ verknüpft und wird in den Kapiteln 2 und 15 behandelt.

Wenn Zellen einer Kultur durch Klonierung oder andere Methoden selektiert werden, bezeichnet man die entstehende Sublinie als „Zellstamm“, der dann eine detaillierte Charakterisierung erfordert. Zelllinien oder Zellstämme können als adhärente Einzellschichten (Monolayer) oder in Suspension gezüchtet werden. *Monolayerkultur* bedeutet, daß die Zellen an einem zur Verfügung stehenden Substrat angeheftet sind und sich normalerweise auch in diesem Zustand vermehren. *Anheftungsabhängigkeit* (englisch „anchorage dependence“)

heißt, daß Anheften an das Substrat (und in gewissem Maße auch Ausbreiten der Zellen auf dem Substrat) Grundvoraussetzung für eine Zellproliferation ist. Monolayerkulturen sind für die meisten normalen Zellen die übliche Kulturform. Eine Ausnahme bilden lediglich die reifen hämatopoetischen Zellen. *Suspensionskulturen* leiten sich von Zellen ab, die ohne Anheftung (engl. „anchorage independence“) überleben und proliferieren können, eine Fähigkeit, die auf hämatopoetische Zellen, transformierte Zelllinien und Zellen maligner Tumoren beschränkt ist. Es kann jedoch nachgewiesen werden, daß ein kleiner Anteil von Zellen, der zur Proliferation in Suspension befähigt ist, in vielen normalen Geweben vorkommt.

Die Identität dieser Zellen ist unklar, jedoch wird eine Beziehung zum Kompartiment der Stammzellen oder nichtdeterminierten Vorläuferzellen postuliert, wobei impliziert wird, daß einige der kultivierten Zellen Präkursorpools aus dem Ursprungsgewebe repräsentieren. Die Allgemeingültigkeit dieses Konzepts wird ausführlicher im nächsten Kapitel diskutiert. Im Hinblick darauf, daß sich die meisten differenzierten Zellen normalerweise nicht teilen, ergibt sich die Frage, ob kultivierte Zelllinien für das *in vivo* vorkommende Kompartiment der Vorläuferzellen repräsentativer sind als für voll differenzierte Zellen.

Da Zellkulturen sowohl in Form uniformer Zellsuspensionen wie auch als Monolayer vermehrt werden können, bieten sie bezüglich Quantifizierung, Charakterisierung und Parallelprobenahme viele Vorteile; hinsichtlich Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen entbehren sie jedoch der Möglichkeiten, die Organkulturen bieten. Aus diesem Grunde wurde vielfach versucht, dreidimensionale Zellstrukturen mit suspendierten Zellaggregaten („Sphäroiden“) oder zellreichen Perfusionenkulturen (s. Kap. 22.2) zu rekonstruieren. Viele der neueren Entwicklungen in der Gewebekultur entspringen dieser Einsicht in die Bedeutung spezifischer zellulärer Wechselwirkungen in homogenen oder heterogenen Zellpopulationen *in vitro*. Die Entwicklung könnte bezeichnend sein für den Übergang von einer Ära der fundamentalen Molekularbiologie, in der Regulationsprozesse auf zellulärer Ebene bearbeitet wurden, zu einer Ära der Zell- und Gewebepathologie, in der dieses Wissen auf integrierte Zellpopulationen angewendet wird.

2 Biologie der kultivierten Zelle

2.1 Kulturmilieu

Die Eignung von Zellkulturen als Modell für die Untersuchung physiologischer Zellfunktionen ist häufig angezweifelt worden. Das andersartige Milieu der Zellkultur, das sich von den *In-vivo*-Bedingungen in vielerlei Hinsicht unterscheidet, bedingt z. B. Probleme bei der Charakterisierung des Zelltyps. Zellen, die normalerweise *in vivo* nicht proliferieren, tun dies in der Zellkultur. Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen sind reduziert, weil Zelllinien in Kultur die Heterogenität und die dreidimensionale Architektur der Zellen im Gewebeverband nicht aufweisen. Außerdem unterscheidet sich das Kulturmilieu auch hinsichtlich der hormonellen und der Nährstoffzusammensetzung von demjenigen im Organismus. Die genannten Umstände bedingen, daß in Zellkulturen die Anheftung, Migration und Proliferation wenig differenzierter Zellen stärker gefördert werden, als die Expression spezieller Zellfunktionen. Letztere erfordert geeignete Kulturbedingungen, bestimmte Nährstoffe und Hormone, wie auch ein geeignetes Substrat (s. Kap. 14.5). Vor der Behandlung dieser speziellen Fragen sollen zunächst die Ereignisse erörtert werden, die die Entstehung einer Primärkultur und einer daraus abgeleiteten Zelllinie begleiten (s. Abb. 2.1).

2.2 Anlegen einer Zellkultur

Techniken für das Anlegen von Primärzellkulturen werden im Kapitel 9.2 beschrieben. Solche Primärzellkulturen können entweder aus Zellen bestehen, die in der Kultur aus Gewebestückchen herauswachsen, oder aus enzymatisch oder mechanisch zu Einzelzellsuspensionen aufgelösten Geweben gewonnen werden. Unabhängig von der angewendeten Methode ist dies der erste in einer Reihe selektiver Prozesse (Tab. 2.1), die schließlich zur Entwicklung einer relativ einheitlichen Zelllinie führen. Beim primären Gewebeexplantat ist die Selektion gegeben durch die Kapazität einer Zelle, vom Explantat auszuwachsen, während in Einzelzellsuspensionen Zellen nur dann das Ausgangsmaterial für eine Primärkultur bilden können, wenn sie den Gewebeaufschluß nach der jeweils angewendeten Technik unbeschädigt überstanden haben und dann im Monolayer adhärent oder in Suspension weiterleben können.

Bleibt die Primärkultur länger als nur einige Stunden am Leben, dann erfolgt ein weiterer selektierender Schritt. Der Anteil proliferierender Zellen steigt an, einige weitere Zelltypen überleben, proliferieren aber nicht, während andere unter den gegebenen Kulturbedingungen nicht überleben können. So verändert sich die anteilige Zusammensetzung der Kultur aus den verschiedenen Zellpopulationen fortlaufend, bis im Falle einer Monolayerkultur das zur Verfügung stehende Kultursubstrat besetzt ist. Nach Erreichen der Konfluenz (d. h., die zur Verfügung stehende Fläche eines Kulturgefäßes ist bewachsen, die Zellen befinden sich in engem Kontakt miteinander) verringert sich der Anteil kontakthemmbarer Zelltypen, während die Zahl der Zellen, die durch den Kontakt zu benachbarten Zellen wenig oder nicht im Wachstum gehemmt werden, langsam zunimmt (s. Kap. 10.2.1 und 15.2.2). Spontan- oder virustransformierte Zellen überwachsen die nichttransformierten. Wird durch häufiges Passagieren (Umsetzen in weitere Kulturgefäße) die Zelldichte niedrig gehalten, so kann der normale Phänotyp, z. B. in Kulturen von Mäusefibroblasten, erhalten bleiben. Bei hoher Zelldichte würden Spontantransformanten die normalen Zellen überwachsen (Todaro und Green 1963; Brouty-Boyé et al. 1979, 1980).

Manche Merkmale spezialisierter Zellfunktionen sind besonders in konfluenten Primärkulturen deutlich ausgeprägt. In diesem Stadium zeigt die Kultur morphologisch die größte Ähnlichkeit mit dem Ursprungsgewebe.

2.3 Entwicklung von Zelllinien

Nach der ersten Struktur oder Passage (Abb. 2.1) wird die Primärkultur zur Zelllinie (s. Kap. 10.1), die kontinuierlich vermehrt und subkultiviert werden kann. Mit jeder weiteren Passage nimmt der Anteil der rasch proliferierenden Zellen zu, während nicht oder nur langsam proliferierende Zellpopulationen ausgedünnt werden. Dies wird besonders deutlich nach der ersten Subkultur, denn die proliferative Kapazität der Zelltypen korreliert mit deren Fähigkeit, das Trauma der Trypsinierung und des Transfers zu überstehen.

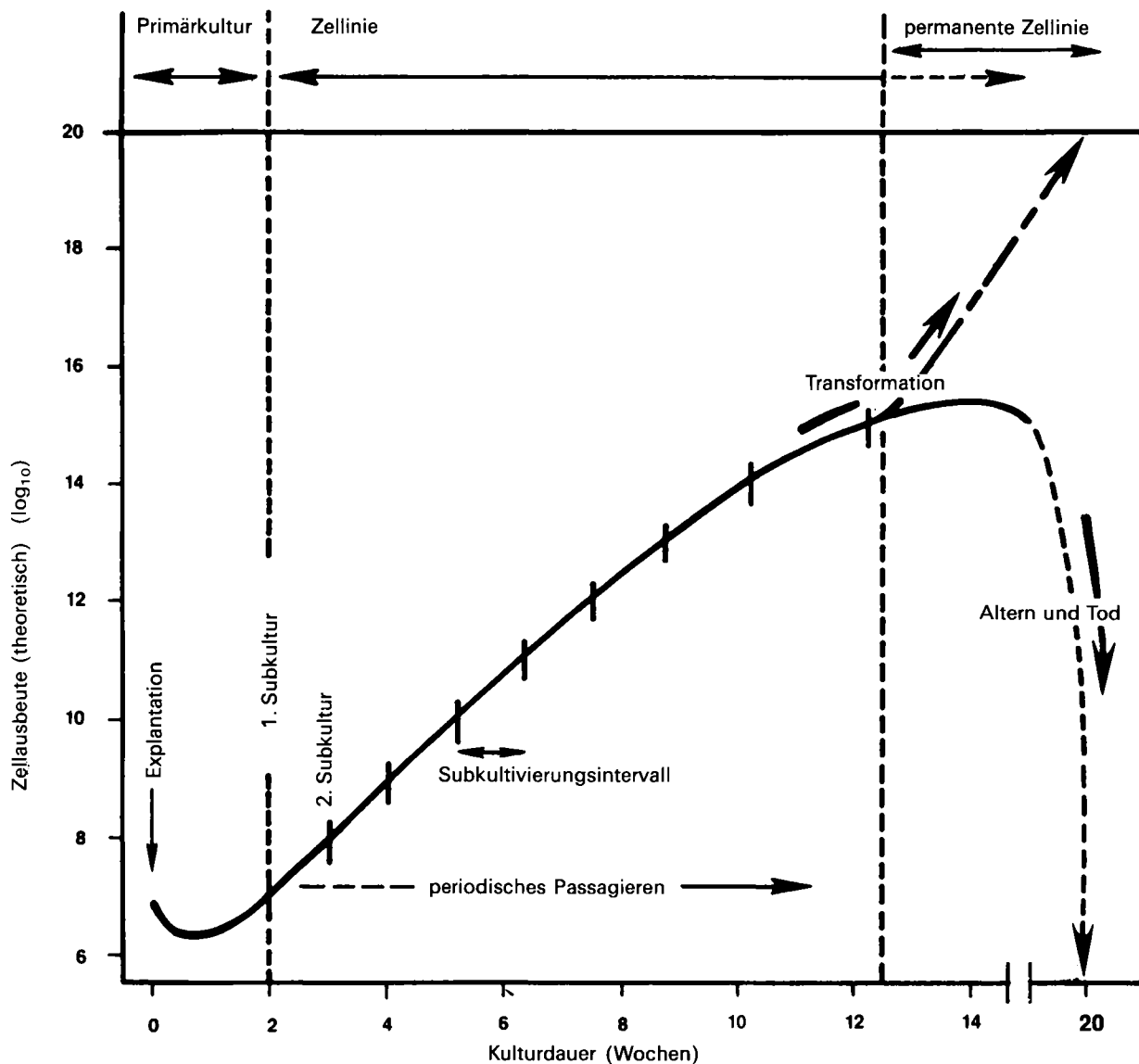


Abb. 2.1 Entwicklung einer Zelllinie. Für eine hypothetische Zellkultur ist auf der Ordinate die Zellvermehrung (keine Verminderung beim Passagieren vorausgesetzt) in logarithmischem Maßstab, auf der Abszisse die Kulturdauer linear angegeben. Der Zeitpunkt der Entstehung einer kontinuierlichen Linie ist mit 12 1/2 Wochen angegeben, er kann in differenti-

Kulturen aber auch zu jeder beliebigen anderen Zeit eintreten. Analog kann auch das Altern zu irgendeinem Zeitpunkt beginnen; bei menschlichen diploiden Fibroblasten ist dies jedoch nach 30–60 Verdopplungen der Zellzahl oder – in Abhängigkeit von der Generationszeit – nach 20 Wochen Kultur am wahrscheinlichsten.

In der dritten Passage präsentiert sich die Kultur als stabile, ziemlich abgehärtete und rasch wachsende Zellpopulation, in der jedoch weiterhin Selektion und Wandlung des Phänotyps anhalten. In Gegenwart von Serum und beim Fehlen spezifischer Selektionsbedingungen überwachsen häufig mesenchymale, aus Bindegewebsfibroblasten oder vaskulären Elementen entstandene Zellen die Kultur. Diesem Umstand ist die Entstehung einer Reihe häufig verwendeter Zelllinien zu verdanken, so z. B. die der menschlichen Lungenfibroblastenlinie WI38 (Hayflick und Moorhead 1961), der Babyhamster-Nierenfibroblastenlinie BHK21 (McPherson und Stoker 1962) (Tab. 2.1), wie auch der vielleicht

bekanntesten L-Zellen, einer Subkutisfibroblastenlinie von einer mit Methylcholanthren behandelten Maus (Earle et al. 1943; Sanford et al. 1943). Andererseits besteht eine der größten Herausforderungen seit Einführung der Gewebekultur darin, ein derartiges Überwachsen empfindlicher oder langsam proliferierender Zellarten, wie etwa von Leberparenchymzellen oder epidermalen Keratinozyten zu verhindern. Zumeist waren ungeeignete Kulturbedingungen die Ursache für dieses Problem, das inzwischen durch den Einsatz selektiver Medien und Substrate überwunden werden konnte, wodurch die Kultivierung vieler spezieller Zelllinien möglich geworden ist (s. Kap. 20).

Tabelle 2.1 Ursachen und Merkmale der Selektion bei der Entstehung von Zelllinien

| Stadium | Selektionsbeeinflussende Faktoren |
|---------------------------|---|
| Isolierung | mechanische oder enzymatische Schädigung |
| Primärkultur | Auswachsen (Migration) bei Explantaten Anheftung und Ausbreitung bei enzymatischer Dissoziation |
| Subkultivierung | Trypsinempfindlichkeit Nährstoff-, Hormon- und Substratlimitierungen |
| Propagation als Zelllinie | relative Wachstumsraten differenter Zellarten Einfluß der Zelldichte auf das Überwiegen des normalen oder transformierten Phänotyps (s. Text) Nährstoff-, Hormon- und Substratlimitierungen |
| Altern, Transformation | Absterben normaler Zellen Überwachsen durch transformierte Zellen |

2.4 „Krise“ und Entstehung kontinuierlicher Zelllinien

Die meisten Zelllinien können unverändert über eine begrenzte Anzahl von Generationen passagiert werden. Danach „altern“ und sterben sie, oder es entstehen kontinuierliche (permanente) Linien (s. Abb. 2.1). Die Fähigkeit einer Zelllinie zum kontinuierlichen Wachstum ist anscheinend bedingt durch das Ausmaß ihrer genetischen Variabilität. Menschliche Fibroblasten bleiben während ihrer gesamten Lebenszeit in Kultur überwiegend euploid und werden nie zu kontinuierlichen Linien (Hayflick und Moorhead 1961), während Mäusefibroblasten und auch Zellkulturen aus menschlichen oder tierischen Tumoren oft aneuploid sind und sich häufig zu kontinuierlichen Zelllinien entwickeln. Die diesem veränderten Wachstumsverhalten zugrunde liegende Umwandlung wird allgemein als „*In-vitro*-Transformation“ bezeichnet (s. Kap. 15) und kann spontan auftreten oder auch chemisch oder viral induziert sein.

Kontinuierliche Linien sind gewöhnlich aneuploid, die Chromosomenzahl liegt zwischen den diploiden und den tetraploiden Werten (Abb. 2.2), wobei auch innerhalb der Population hinsichtlich Zahl und Form der Chromosomen deutliche Variationen auftreten (Heteroploidie) (s. Kap. 15.3 und 17.3). Bis jetzt ist nicht bekannt, ob später als kontinuierliche Linien permanent wachsende Zellen schon im primären Explantat in geringer Anzahl vorhanden sind oder ob sie im Verlauf der

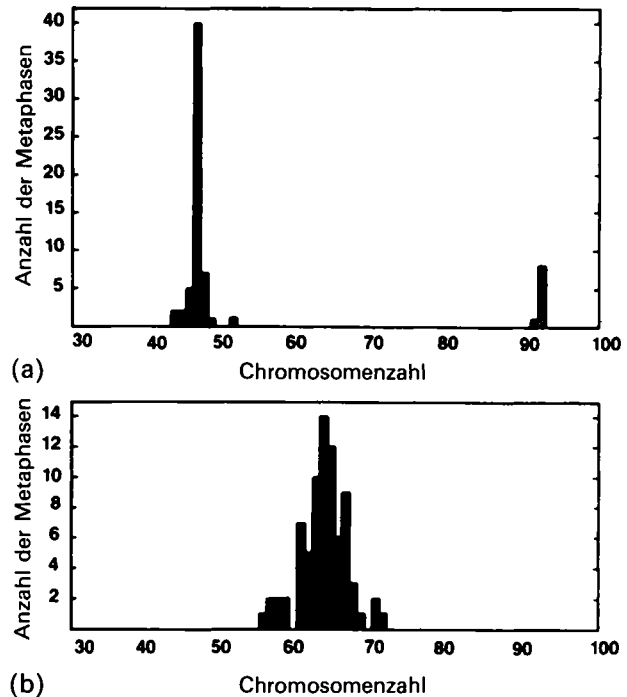


Abb. 2.2 Chromosomenzahl von nichtkontinuierlichen und kontinuierlichen Zelllinien. a) normale menschliche Gliazelllinie, b) kontinuierliche Zelllinie eines menschlichen metastasierenden Melanoms.

Kultivierung *in vitro* aus einer oder mehreren transformierten Zellen hervorgehen. Aus zellkinetischer Sicht ist letzteres wahrscheinlicher, da permanente Linien auch zu einem relativ späten Zeitpunkt im „Leben“ der Kultur entstehen können, also lange nachdem die Nachkommen einer einzigen zur fortlaufenden Proliferation befähigten Zelle die Kultur hätten überwachsen müssen. Aber auch das Vorkommen von Subpopulationen, die zur Transformation prädisponiert sind und zu einem unbestimmten Zeitpunkt zum Ausgangspunkt einer permanenten Linie werden, ist nicht ausgeschlossen.

Der Prozeß der Herausbildung einer kontinuierlichen Linie wird als „Transformation“ bezeichnet, weil die Kultur morphologische und wachstumskinetische Veränderungen durchmacht, aber auch weil die Entstehung einer permanenten Linie häufig von einer Zunahme der Tumorigenität der Zellen begleitet ist. Etablierte Zelllinien haben zahlreiche Eigenschaften, die auch mit der malignen Transformation (s. Kap. 15) verbunden sind, wie z. B. erniedrigter Serumbedarf, verringerte Dichtehemmung des Wachstums, Fähigkeit zu Wachstum in halbfesten Medien, Aneuploidie (s. a. Tab. 10.3) usw. Ähnliche morphologische und Verhaltensänderungen treten bei Zellen auch nach chemisch oder viral induzierter Transformation auf.

Viele, wenn nicht die meisten normalen Zellarten sind nicht zur Transformation *in vitro* fähig. Das klassische Beispiel stellen normale menschliche Fibroblasten dar (Hayflick und Moorhead 1961), die während ihrer ge-

samten Lebenszeit *in vitro* euploid bleiben und zu einem kritischen Zeitpunkt (gewöhnlich nach 50 Generationen) aufhören, sich zu teilen, obwohl sie noch, wie in Einzelfällen beobachtet, etwa 18 Monate lang vital bleiben können. Menschliche Gliazellen (Pontén und Westermark 1980) und Hühnerfibroblasten (Hay und Strehler 1967) verhalten sich ähnlich. Andererseits zeigten epidermale Zellen bei der Optimierung der Kultivierungsbedingungen in zunehmendem Maße die Fähigkeit zu längerem Wachstum (Grenn et al. 1979) und können so möglicherweise zur Umwandlung in kontinuierliche Linien gebracht werden. Es könnte hier ein Zusammenhang mit der Kapazität dieses Zelltyps zur Selbsterneuerung *in vivo* bestehen. Lymphoblastoide Zellen mit ähnlich hoher regenerativer Kapazität werden *in vitro* gleichfalls ohne größeren Aufwand zu kontinuierlichen Linien (Moore et al. 1967), allerdings wird in diesen Fällen eine ursächliche Transformation durch das Epstein-Barr-Virus angenommen.

Kontinuierliche Zelllinien weisen oft eine anhaltende genetische Instabilität auf. Dies veranlaßt zu der Annahme, daß die prädisponierende Bedingung für ein permanentes Wachstum in Kultur in der einer Zelllinie inhä-

renten genetischen Variabilität bestehen könnte. Allgemeines Merkmal vieler permanenter Linien menschlicher Herkunft ist ein subtetraploider Chromosomensatz (s. Abb. 2.2). Ausführlicher werden genetische Variabilität und Instabilität im Kapitel 17 behandelt.

2.5 Entdifferenzierung

Entdifferenzierung *in vitro* bedeutet, daß differenzierte Zellen in der Kultur ihre spezifischen Funktionen verlieren. Es bleibt aber offen, ob undifferenzierte Zellen der gleichen Herkunft (Abb. 2.3) differenzierte Zellen mit geringerer proliferativer Kapazität überwachsen oder ob das Fehlen geeigneter Induktoren (Hormone, Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen) eine Deadaptation (den reversiblen Verlust spezifischer Zellfunktionen) verursacht (s. Kap. 14). Tatsächlich können beide Umstände zutreffen. Die permanente Proliferation kann undifferenzierte Vorläuferzellen selektieren, die ohne ein geeignetes induktives Milieu nicht zur funktionellen Differenzierung gelangen können.

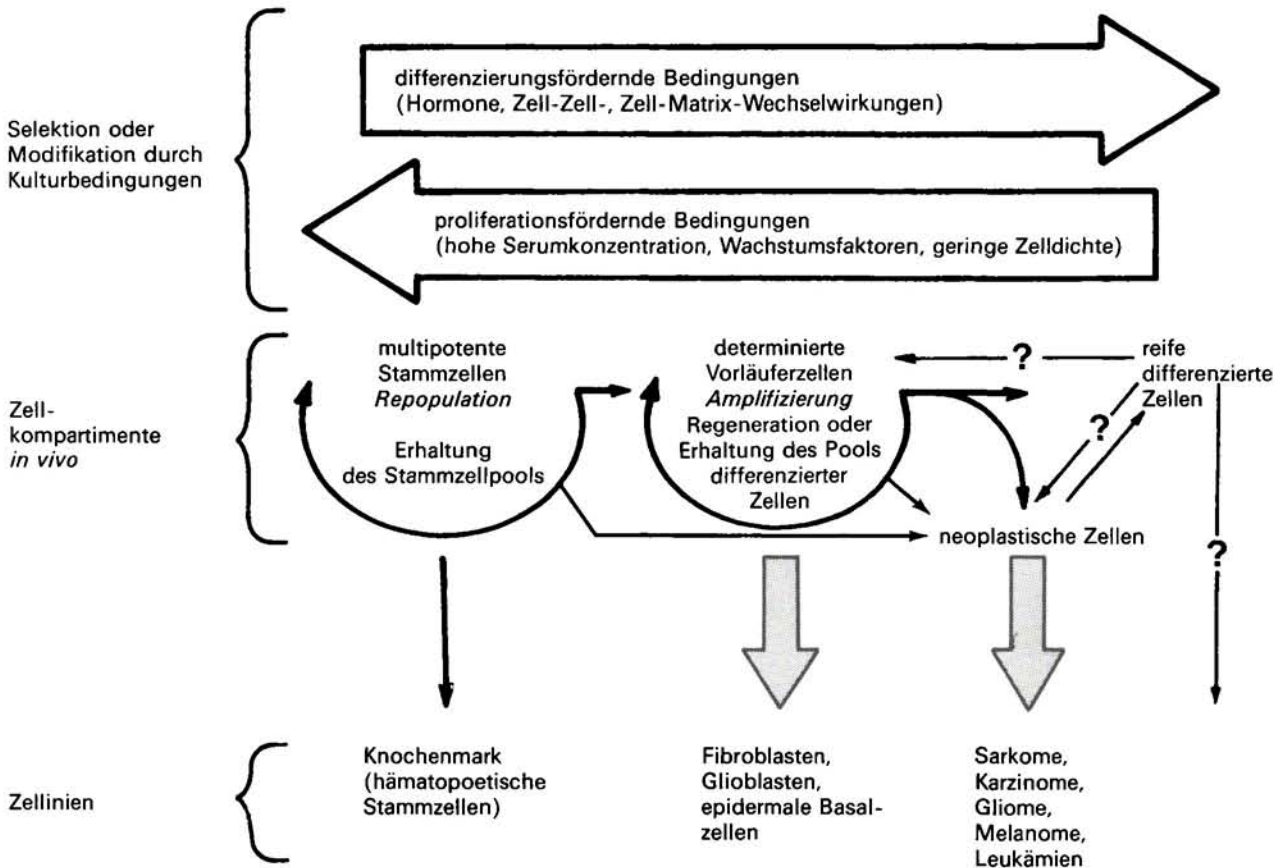


Abb. 2.3 Entstehung von Zelllinien. Mit wenigen Ausnahmen (z. B. differenzierte Tumorzellen) selektieren die Kulturbedingungen das proliferierende Zellkompartiment des Gewebes oder induzieren die Reversion partiell differenzierter Zellen in den Präkursorstatus. Neoplastische Zellen und Zelllinien kön-

nen zwar von differenzierten Zellen abstammen, wahrscheinlicher ist jedoch ihre Ableitung von malignen Vorläuferzellen, die ihre Teilungsfähigkeit auch während der Differenzierung beibehalten.

Es ist wichtig, zwischen Entdifferenzierung, Deadaptation und Selektion zu unterscheiden. Eine *entdifferenzierte Zelle* hat ihre spezifischen Funktionen irreversibel verloren. Ein Hepatozyt würde z. B. seine charakteristischen Enzyme (Arginase, Aminotransferasen u. a.) nicht mehr bilden, kein Glycogen speichern und auch keine Serumproteine sezernieren; einmal verlorene Funktionen wären nicht wieder induzierbar. *Deadaptation* hingegen setzt voraus, daß die Synthese eines spezifischen Produktes oder andere Merkmale einer spezialisierten Funktion unter regulatorischer Kontrolle von Hormonen, Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen stehen und reinduziert werden können, wenn die geeigneten Milieubedingungen geschaffen werden. Michalopoulos und Pitot (1975) und Sattler et al. (1978) konnten bei Hepatozyten in normalen Rattenleberzellkulturen die Synthese von Aminotransferasen durch den Zusatz

von Hormonen (Insulin, Hydrocortison) und Herstellung geeigneter Matrixbedingungen (Collagen) reinduzieren. Diese und weitere Untersuchungen unterstützen die Annahme, daß unter entsprechenden Kulturbedingungen eine Reihe verschiedener Zelltypen *in vitro* zur Expression ihrer spezifischen Funktionen gebracht werden können (Tab. 2.2). Gleichzeitig verliert das Konzept der Entdifferenzierung als Erklärung für den Verlust spezialisierter Zellfunktionen in der Zellkultur zunehmend an Wahrscheinlichkeit.

Die Induktion spezifischer Funktionen durch geeignete Kulturbedingungen setzt auch das Vorhandensein der entsprechenden Zellarten in der Kultur voraus. In den frühen Versuchen an Leberzellkulturen war das Überwachsen durch Bindegewebsfibroblasten oder Endothelzellen aus Blutgefäßen oder Sinusoiden eine der Ursachen für die mangelnde Expression von Hepatozy-

Tabelle 2.2 Zelllinien und Zellstämme, die *in vitro* Differenzierungsmerkmale exprimieren

| Ursprung | Zelllinie | Spezies | Marker ¹ | Referenz |
|------------------------------|---------------|---------|---|--|
| <i>Primärzelllinien</i> | | | | |
| Retina, pigmentiert | Retina | Huhn | Pigmentbildung | Coon und Cahn (1966) |
| Calvaria | Knorpelzelle | Huhn | Knorpelsynthese | Coon und Cahn (1966) |
| Epidermis | Keratinozyten | Maus | Verhornung | Fusenig und Worst (1975) |
| Epidermis | Keratinozyten | Mensch | Verhornung | Rheinwald und Green (1975) |
| Skelettmuskel | | Huhn | Myogenese, KP | Richler und Yaffe (1970) |
| Hypothalamus | CC7 | Maus | Neurophysin, Vasopressin | De Vitry et al. (1974) |
| <i>Permanente Zelllinien</i> | | | | |
| Milz | Friend | Maus | Hämoglobin | Scher et al. (1971) |
| Hepatom | H-4-11-E-C3 | Ratte | Tyrosin-Aminotransferase | Pitot et al. (1964) |
| myeloide Leukämie | K562 | Mensch | Hämoglobin | Anderson et al. (1979a,b) |
| myeloide Leukämie | HL60 | Mensch | Phagozytose NTB-Reduktion | Olsson und Ologson (1981) |
| Gliom | C6 | Ratte | GFAP, GPDH | Benda et al. (1968) |
| Gliom | MOG-CCM | Mensch | GFAP, GPDH | Balmforth et al. (1986) |
| Hypophysentumor | GH2, GH3 | Ratte | Wachstumshormon | Buonassisi et al. (1962) |
| Nebennierentumor | | Ratte | Steroide | Buonassisi et al. (1962) |
| Melanom | B16 | Maus | Melanin | Nilos und Makarski (1978) |
| Neuroblastom | C1300 | Ratte | Neuriten | Liebermann und Sachs (1978) |
| Niere | MDCK | Hund | Kuppelbildung, Transport | Rindler et al. (1979) |
| Niere | LLCV-PK1 | Schwein | Na ⁺ -abhängige Glucoseaufnahme | Hull (1976); Saier (1984) |
| Plazenta | | Mensch | Choriongonadotropin | Cou (1978) |
| Teratokarzinom | verschiedene | Maus | verschiedene | Martin (1975) |
| Myelom | verschiedene | Maus | IgG | Horibata und Harris (1970) |
| Lungenarterie | CPAE | Rind | Faktor VIII, ACE | Del Vecchio und Smith (1981) |
| Vorhaut | Melanozyten | Mensch | Melanin | Gilchrest et al. (1984, 1985) (s. Kap. 20) |
| Knochenmark | WEHI-3B D+ | Maus | Morphologie | Nicola (1987) |
| Nebennierenrinde | | Rind | Steroide | Simonian et al. (1987) |
| Brustdrüse | MCF-7 | Mensch | Kuppelbildung, α -Lactalbumin | Soule et al. (1973) |
| Milz | CT11-2, HT-1 | Maus | IL-2 | Gillis und Smith (1977a, b) |

¹ KP = Kreatinin-Phosphokinase, NTB = Neotetrazoliumblau, GFAP = saures fibrilläres Gliaprotein (engl. „glial fibrillary acidic protein“), GPDH = Glycerolphosphat-Dehydrogenase, IgG = Immungammaglobulin, ACE = Angiotensin-II-konvertierendes Enzym (engl. „angiotensin II converting enzyme“), IL-2 = Interleukin-2

tenfunktionen. Mit verbesserten Gewebeaufschlußtechniken (Berry und Friend 1969) und unter optimierten Kulturbedingungen (Michalopoulos und Pitot 1975; Guguen-Gillouzo et al. 1983) können Hepatozyten *selektiv* angereichert werden. Epidermale Zellen können gleichfalls zum *selektiven* Wachstum in der Zellkultur gebracht werden, wenn konfluente Feederschichten (Rheinwald und Green 1975) oder Selektionsmedien (Peehl und Ham 1980; Tsao et al. 1982) benutzt werden. Weitere Beispiele, wie die erfolgreiche Anzucht von Brustdrüsen- und Kolonepithel auf Feederschichten (Freshney et al. 1982), die Isolierung von Nierenepithelzellen durch Selektion mit D-Valin (Gilbert und Migeon 1975) oder der Einsatz zytotoxischer Antikörper zur Abtrennung unerwünschter Zellen (Edwards et al. 1980), beweisen, daß die selektive Kultivierung spezieller Zellen kein unlösbares Problem mehr darstellt. Die verschiedenen Selektionstechniken werden in den Kapiteln 11.2, 12 und 21.7 behandelt.

2.6 Was ist eine kultivierte Zelle?

Die Frage nach der tatsächlichen Natur einer in Kultur wachsenden Zelle kann nicht ohne weiteres beantwortet werden. So kann die Expression von Differenzierungsmarkern unter dem Einfluß von induzierenden Kulturbedingungen bedeuten, daß die kultivierten Zellen ausgereift sind und zur Synthese spezieller Proteine nur der geeigneten Induktion bedürfen. Die Kultur könnte aber auch aus Vorläufer- oder Stammzellen bestehen, die zwar proliferieren können, aber solange undifferenziert bleiben, bis geeignete Milieubedingungen hergestellt werden, unter denen einige oder alle Zellen zu differenzierten Zellen ausreifen.

Es mag sich als praktikabel erweisen, eine Zellkultur als im Gleichgewicht befindliches Gemisch von multipotenten Stammzellen, undifferenzierten, aber bereits determinierten Vorläuferzellen und reifen, differenzierten Zellen anzusehen (siehe Abb. 2.3). Das Gleichgewicht könnte sich in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen verschieben. Unter dieser Annahme würden regelmäßige Passagen bei relativ geringer Zelldichte die Proliferation fördern und die Differenzierung vermindern, während hohe Zelldichte, niedriger Serumgehalt des Kulturmediums und der Zusatz geeigneter Hormone die Differenzierung fördern und die Proliferation hemmen würden.

Im Sinne der obigen Prämisse wird die Zusammensetzung einer Zellkultur durch ihre Herkunft bestimmt. So werden Zelllinien aus embryonalen Geweben anteilig mehr Stamm- und Vorläuferzellen enthalten und zu intensiverer Selbsterneuerung fähig sein als Kulturen aus adulten Geweben. Analog sollten Kulturen aus Gewe-

ben, die sich *in vivo* ständig regenerieren (Epidermis, intestinales Epithel, hämatopoetische Zellen), wegen ihres Gehaltes an Stammzellen *in vitro* unter geeigneten Bedingungen unbegrenzt überleben, während Kulturen aus Geweben, die sich nur unter Streßbedingungen erneuern (Fibroblasten, Muskel- und Gliagewebe), lediglich Vorläuferzellen enthalten und daher nur eine begrenzte Lebensdauer haben.

Die Identität einer Zelle in der Kultur wird also nicht nur durch ihre Abstammung (hämatopoetische Zelle, Hepatozyt, Gliazelle usw.), sondern auch durch ihre Position in ihrer Differenzierungslinie (Stammzelle, determinierte Vorläuferzelle oder reife differenzierte Zelle) bestimmt. Mit Ausnahme von Mäuseratomen und zwei oder drei anderen Zelltypen niederer Vertebraten ist zumindest unwahrscheinlich, daß Zellen *in vitro* ihren Typ ändern (transdifferenzieren) können. Sie können jedoch ihr Differenzierungsstadium wechseln, in einigen Fällen sogar reversibel.

Zellen aus Tumorgeweben müssen sich nicht nach diesen Regeln verhalten. So können Rattenhepatomzellen *in vitro* proliferieren und gleichzeitig Differenzierungsmerkmale exprimieren. Je mehr sie aber dem normalen Phänotyp entsprechen, um so mehr werden sie durch eine induzierte Differenzierung im Wachstum gehemmt. Die Beziehung zwischen Differenzierungsstadium und proliferativer Kapazität bei Tumorzellen ist zwar weniger ausgeprägt, jedoch nicht aufgehoben (B16-Melanomzellen produzieren mehr Pigment bei hoher Zelldichte und niedriger Proliferationsrate als unter umgekehrten Bedingungen); eine Umwandlung des Zelltyps (Transfer zwischen verschiedenen Differenzierungslinien) ist bisher nicht sicher nachgewiesen (s. a. Kap. 14.3).

2.7 Funktionelles Milieu

Seit der Einführung der Gewebekulturen sind die Kulturbedingungen auf das Erreichen von zwei Hauptzielstellungen ausgerichtet worden:

- Produktion von Zellen durch kontinuierliche Proliferation und
- Erhaltung spezialisierter Zellfunktionen.

Das in den 50er und 60er Jahren unseres Jahrhunderts schlagartig angestiegene Interesse an zellulärer und molekularer Biologie und Virologie richtete sich hauptsächlich auf grundlegende intrazelluläre Prozesse, wie die Regulation der Proteinsynthese. Dazu wurden große Zellmengen benötigt. Später erlaubte die Entwicklung solcher Techniken, wie der molekularen Hybridisierung und des Gentransfers, mehr Gewicht auf das Studium der Regulation spezialisierter Funktionen zu legen.

Während der Bedarf an einer Massenproduktion tierischer Zellen bestehen blieb, wurde nun auch der Schaffung von Kulturbedingungen, die eine kontrollierte Expression von Differenzierungsleistungen zuließen, mehr Aufmerksamkeit geschenkt.

Es ist seit langem bekannt, daß spezifische Zellfunktionen *in vitro* länger erhalten bleiben, wenn die dreidimensionale Struktur des Gewebes erhalten bleibt, wie z. B. in der Organkultur (s. Kap. 22.1). Leider können Organkulturen nicht vermehrt werden, sie müssen für jedes Experiment neu präpariert werden und sind schlechter quantifizierbar als Zellkulturen. Aus diesem Grund wurden zahlreiche Versuche unternommen, um dreidimensionale Strukturen wiederherzustellen, z. B. in perfundierten Monolayerkulturen (Kruss et al. 1970; Knazek et al. 1972; Whittle und Kruse 1973; Gullino und Knazek 1974; Knazek 1974). Um Merkmale der natürlichen Umgebung im Gewebeverband zu reproduzieren, wurden Zellen auch auf oder in einer speziellen Matrix, wie Collagen (Michalopoulos und Pitot 1975; Burwen und Pitelka 1980; Yang et al. 1981), Cellulose (Leighton 1951), Gelatineschwamm (Douglas et al. 1976), oder einer aus natürlichen Gewebematrix-Glycoproteinen, wie Fibronectin, Chondronectin und Lami-

nin (Reid und Rojkind 1979; Gospodarowicz et al. 1980; Kleinman et al. 1981), bestehenden Matrix kultiviert (s. Kap. 7.1.6). Trotz gewisser Limitierungen sind diese Techniken aber doch vielversprechend für die Untersuchung gewebespezifischer Funktionen, weil sie sowohl homotypische Zellwechselwirkungen und Zell-Matrix-Wechselwirkungen zulassen als auch die Ausbildung heterotypischer Zellwechselwirkungen ermöglichen.

Die Ausbildung normaler Gewebefunktionen *in vitro* ist eine Voraussetzung für die Untersuchung pathologischer Vorgänge, wie z. B. der Demyelinisierung oder der malignen Invasion in der Zellkultur. Grundsätzlich können Zellen in ihrem Verhalten aber nur dann ihrem Ursprungsgewebe zugeordnet werden, wenn sie *in vitro* eine normale Funktion aufrechterhalten. Für eine korrekte Zuordnung ist nicht in allen Fällen die vollständige Expression des differenzierten Phänotyps erforderlich, oft reicht schon der Nachweis eines einzigen typspezifischen Oberflächenantigens aus. Eine umfassendere Ausprägung funktioneller Eigenschaften wird aber dann erforderlich, wenn die Position einer Zelle in ihrer Differenzierungslinie korrekt lokalisiert werden soll oder ein relevantes *In-vitro*-Modell ihrer natürlichen Funktion angestrebt wird.

3 Planung und Einrichtung eines Gewebekulturlaboratoriums

Ein grundlegendes Erfordernis, das die Gewebekulturtechnik von den meisten anderen Laboratoriumstechniken unterscheidet, ist die unbedingte Einhaltung aseptischer Bedingungen. Diese Anforderung resultiert aus dem relativ langsamen Wachstum kultivierter tierischer Zellen im Vergleich zu den meisten potentiellen Kontaminanten. Mit der Einführung der Laminarboxen (Reinraumwerkbänke) wurde das aseptische Arbeiten entscheidend vereinfacht und ist nun auch in normalen Laborräumen möglich (s. u. sowie Kap. 4 und 5).

Im Gewebekulturlaboratorium müssen die folgenden sechs wichtigsten Funktionen gewährleistet sein: steriles Arbeiten, Inkubation, Vorbereitung, Reinigung, Sterilisation und Lagerung (Tab. 3.1).

Der sterile Arbeitsbereich sollte sich an einem Ende des Raumes befinden, Abwasch- und Sterilisationszonen am anderen, dazwischen die Bereiche für Vorbereitung, Lagerung und Inkubation. Günstig ist, wenn Abwasch-, Sterilisations- und Präparationsbereich beiein-

ander liegen, Vorratsschränke und Inkubatoren müssen vom Sterilbereich aus leicht zugänglich sein.

3.1 Steriler Arbeitsbereich

Der sterile Arbeitsbereich sollte sich in einem ruhigen Teil des Labors befinden und nur für Zellkulturarbeiten genutzt werden. Er darf weder ein Durchgangsraum sein, noch sonst durch Störungen beeinträchtigt werden, die Staub oder Luftzug verursachen könnten. Wenn Laminarboxen nicht zur Verfügung stehen, sind ein separater Raum oder eine Kabine am besten geeignet. Der Arbeitsplatz in seiner einfachsten Form als kunststoffbeschichtete Tischfläche sollte weiß oder grau sein, um das Betrachten von Kulturen oder Gewebepräparaten und eine optische Beurteilung des pH-Wertes des Kulturmediums (falls Phenolrot als Indikator verwendet wird) zu

Tabelle 3.1 Einrichtungen eines Gewebekulturlaboratoriums

| Minimalanforderungen (unbedingt erforderlich) | Wünschenswerte Ausrüstung (vorteilhaft) | Hilfreiche Zusatzausrüstung |
|---|--|---|
| Sterilbereich: sauber und ruhig, kein Durchgangsverkehr | gefilterte Belüftung (Klimaanlage) | CO ₂ - und Druckluftleitung |
| Trennung von Tierstall und mikrobiologischen Labors | Wärmeraum mit Temperaturlaufzeichnung | Lageraum für Plastikmaterialien |
| Präparationsbereich | Mikroskopiererraum | Isolierraum für Biorisiko-Arbeiten |
| Lagerkapazität: Flüssigkeiten (bei Raumtemperatur, 4°C, -20°C), Glasachen (Regale), Plastikmaterialien (Regale), Kleinteile (Schubfächer), seltener gebrauchtes, spezielles Zubehör (Schränke), Chemikalien (bei Raumtemperatur, 4°C, -20°C; zusammen mit Lösungen, aber in geschlossenen Behältern über Trocknungsmitteln) | Dunkelkammer | Vorratsbehälter für Flüssigstickstoff (≈ 500 l) |
| Platz für Inkubator(en) | Abstelltisch am Sterilarbeitsplatz | |
| Platz für Behälter mit Flüssigstickstoff | separater Vorbereitungsraum | |
| Spülbereich (nicht notwendigerweise im Gewebekulturlabor, aber benachbart) | separater Sterilisationsraum | |
| | Lageraum für Druckgasflaschen | |

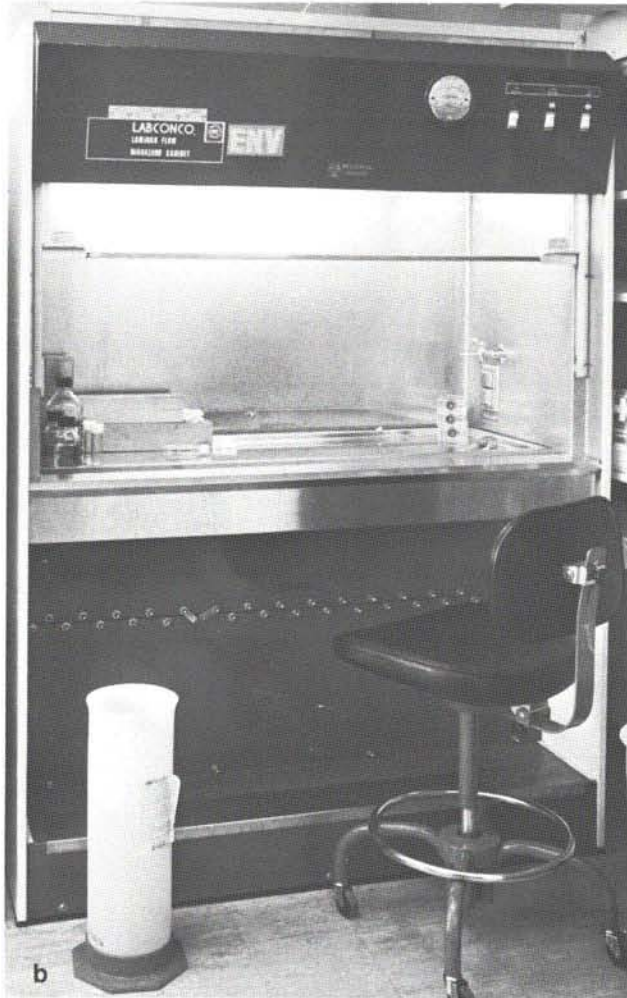


Abb. 3.1 Laminarboxen. a) Horizontalbox, b) Vertikalbox (Sicherheitsbox)

ermöglichen. Sterilarbeitsplätze sind keine Lagerplätze und auch darüber angebrachte Regale bleiben ausschließlich Gerätschaften vorbehalten, die zur Sterilar-

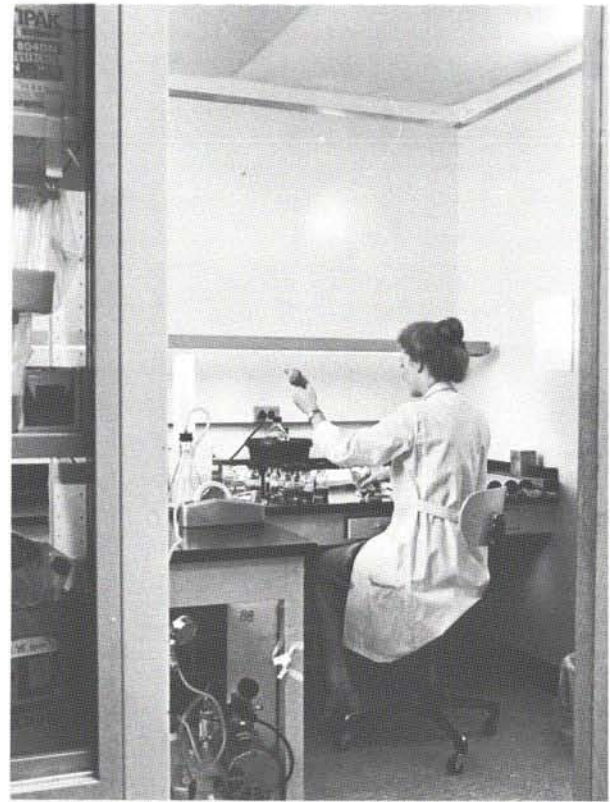


Abb. 3.2 Sterilkabine. Der Raum wird von der Decke her steril belüftet und insgesamt als Sterilarbeitsplatz betrachtet.

beit unmittelbar benötigt werden. Die Arbeitsfläche kann entweder frei stehen oder mit einem Plastikklebeband an einer anstoßenden Wand abgedichtet werden.

Es ist praktisch, dicht am sterilen Arbeitsbereich eine Tischfläche zu positionieren, die den Raum teilt oder gegen den übrigen Laborraum abgrenzt und auch zum Aufstellen eines Zellzählgerätes, Mikroskopes oder anderer Geräte dient (s. Abb. 3.3, 3.4 und 3.5). Auch für sterile Glassachen, Plastikmaterialien, Schraubkappen, Stopfen, Spritzen u.a. können auf diese Weise Unterbringungsmöglichkeiten in Schubfächern oder Regalaufsätzen geschaffen werden. Weitere Ausrüstungsgegenstände, z.B. eine Ampullenabschmelzvorrichtung und eine kleine Tischzentrifuge, komplettieren diesen Bereich, der alle ständig gebrauchten Gerätschaften bereithalten soll.

Laminarboxen (Reinraumwerkbänke). Die Benutzung einer Laminarbox (s. Kap. 26), in der sterile Luft über die Arbeitsfläche geblasen wird (Abb. 3.1, s. Kap. 4.2.1 und 5.7), gewährleistet steriles Arbeiten besser und billiger als ein separater Sterilraum. Einzelboxen sind vorzuziehen, da sie beweglich sind und die Experimentatoren voneinander isolieren. Jedoch sind steril belüftete Räume ebenfalls geeignet (Abb. 3.2). Beim Arbeiten an der Box befinden sich nur die Arme im Sterilbereich, während man in einem Sterilraum selbst Teil des Sterilberei-

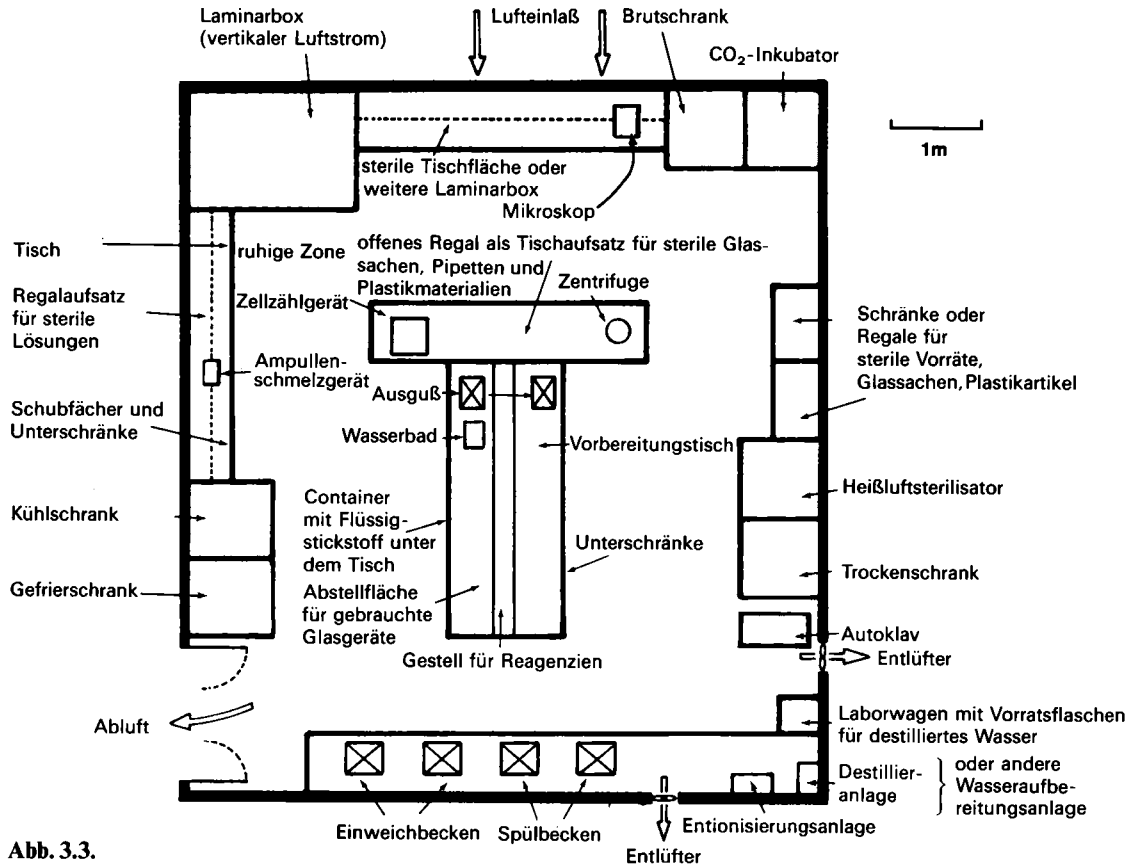


Abb. 3.3.

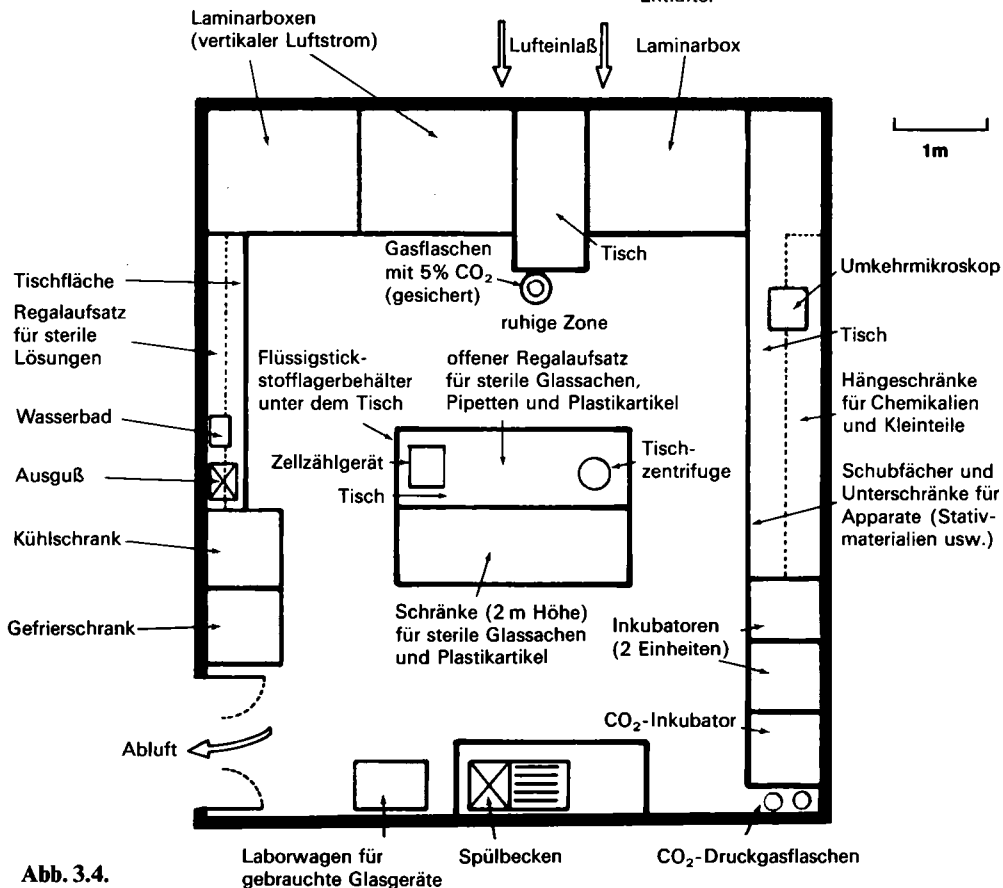


Abb. 3.4.

Abb. 3.3 Einrichtungsvorschlag für ein einfaches, in sich abgeschlossenes Zellkulturlabor für 2-3 Mitarbeiter. Die gestrichelten Bereiche bezeichnen den Standort beweglicher Geräte.

Abb. 3.4 Zellkulturlabor für 5-6 Personen. Reinigungs- und Präparationsbereich liegt außerhalb des Raumes. Die gestrichelten Bereiche bezeichnen den Standort beweglicher Geräte.

ches ist. Wegen der größeren Bewegungsfreiheit ist hier, speziell beim Umgang mit großen Geräten und Apparaturen (Rollerflaschen, Fermentern), zur Verminderung der Kontaminationsgefahr mehr persönliche Sorgfalt erforderlich, z. B. das Tragen von Kopfbedeckungen und spezieller Bekleidung.

Die nach den Erfordernissen ausgewählte Box – Standgerät oder Tischaufsatz – muß ausreichende Beinfreiheit gewährleisten und unter dem Gerät Platz bieten für Pumpen, Absaugvorrichtungen u. a., Rollen unter den Standgeräten erleichtern ein eventuell nötiges Umstellen. Stühle müssen eine höhenverstellbare Sitzfläche und eine Rückenlehne haben und möglichst nahe an die Arbeitsfläche gestellt werden können, um ein bequemes Arbeiten in der Box zu garantieren. Außerdem sollte neben jeder Box eine Abstellfläche von mindestens 300 × 500 mm vorhanden sein für Geräte, die nicht unmittelbar benötigt werden.

Es ist ein nützliches Prinzip, im Gewebekulturlaboratorium einen „Sterilitätsgradienten“ anzustreben. Sind

alle erforderlichen Funktionen in einem Raum unterzubringen, dann empfiehlt es sich, die Sterilboxen an der der Tür gegenüberliegenden Seite aufzustellen. Reinigung und Aufbereitung von Glasgeräten und Reagenzien, Zentrifugation usw. werden aber an der anderen Seite ausgeführt (Abb. 3.3 und 3.4). Dieses Prinzip gilt besonders dann, wenn Laminarboxen nicht zur Verfügung stehen. Falls vorhanden, erleichtern diese jedoch, vor allem bei horizontalem Luftstrom, die Aufrechterhaltung des Sterilgradienten. Die Einrichtung eines kleinen Raumes oder einer Kabine für den Umgang mit infektiösen Materialien kann zusätzlich erforderlich werden (Abb. 3.5). Dieser Bereich muß dann durch eine Tür (Schiebetür) oder eine Luftschleuse vom Gewebekulturlaboratorium abgetrennt sein und mit eigenen Geräten (Inkubator, Kühl- und Tiefkühlschrank, Zentrifuge usw.) ausgerüstet werden. Außerdem ist hier eine spezielle Sicherheitsbox mit separater Belüftung und Pathogenfalle erforderlich (ausführliche Beschreibung s. Kap. 6.4).

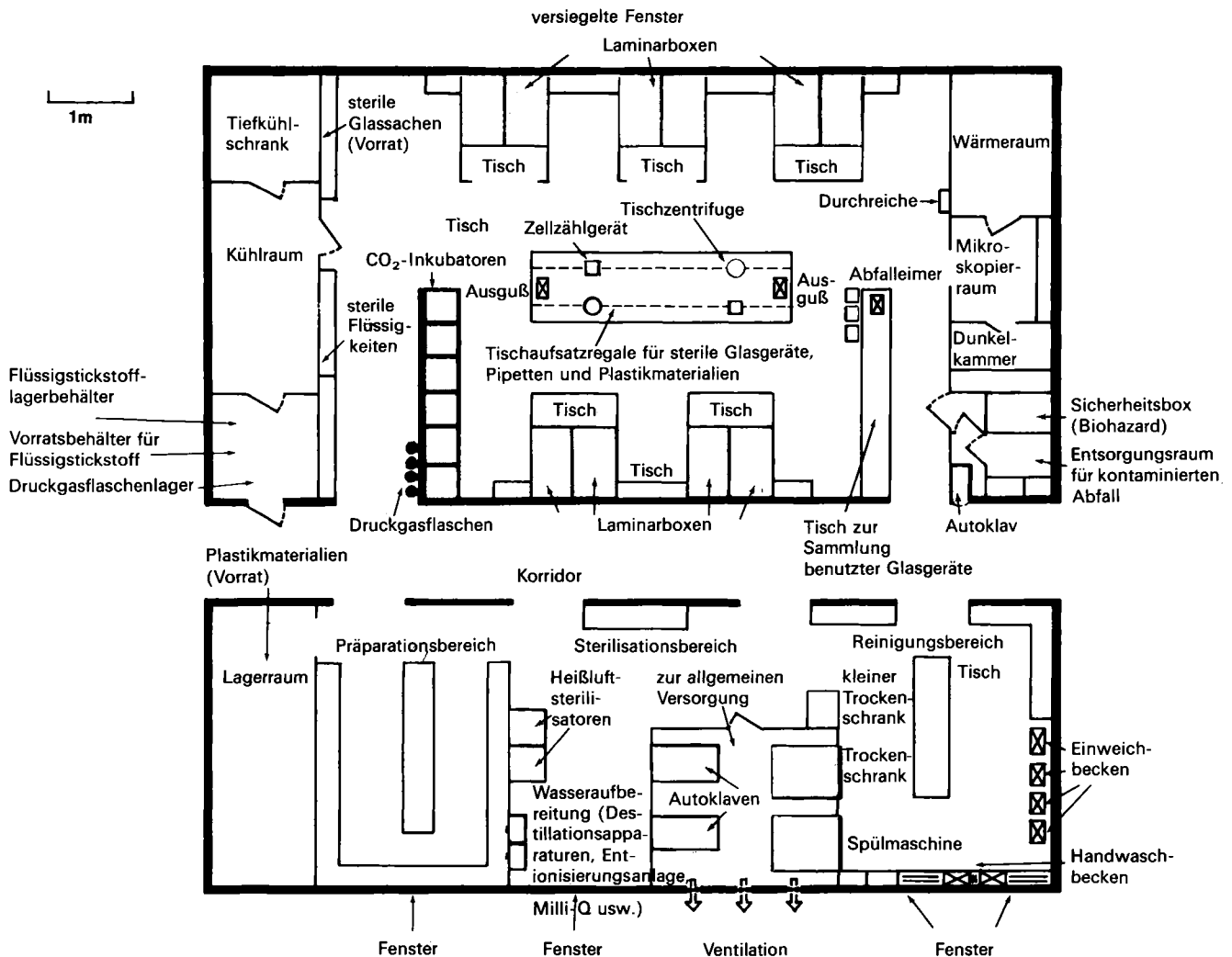


Abb. 3.5 Großes Zellkulturlabor mit angrenzendem Reinigungs-, Sterilisations- und Präparationsbereich, ausreichend für 20–30 Personen. Die gestrichelten Bereiche bezeichnen nicht zum Mobiliar gehörende Geräte.

3.2 Inkubation

Die Anforderungen an die Sauberkeit des Inkubationsbereiches sind nicht so hoch wie für den sterilen Arbeitsbereich. Durchzug sollte jedoch vermieden werden, um saubere Luft zu gewährleisten und sporenbeladenen Staub oder Aerosole zu reduzieren.

Die Inkubation kann in Brutschränken oder in thermostatkontrollierten Wärmeräumen erfolgen. Brutschränke oder Inkubatoren sind platzsparend; werden aber mehr als zwei benötigt, dann ist die Einrichtung eines Wärmeräumes ökonomischer und bequemer. Beim Öffnen der Tür sinkt in Inkubatoren die Tempera-

tur schneller und erreicht anschließend langsamer den Sollwert als in Wärmeräumen. Grob gerechnet werden $0,2 \text{ m}^3$ (200 l) Inkubationsraum mit $0,5 \text{ m}^2$ Ablagefläche pro Mitarbeiter benötigt. Inkubatoren mit geregelter CO_2 -Begasung und einstellbarer Luftfeuchte (s. Kap. 4.2.4) gehören inzwischen zur Standardausrüstung aller Gewebekulturlaboratorien.

Wärmeraum. Ein Wärmeraum kann in einem zur Verfügung stehenden benachbarten Raum oder, bei ausreichendem Platz, auch im Gewebekulturlabor selbst eingerichtet werden (Abb. 3.6). Er muß nicht besonders ausgebaut werden, sollte aber so wärmeisoliert sein, daß

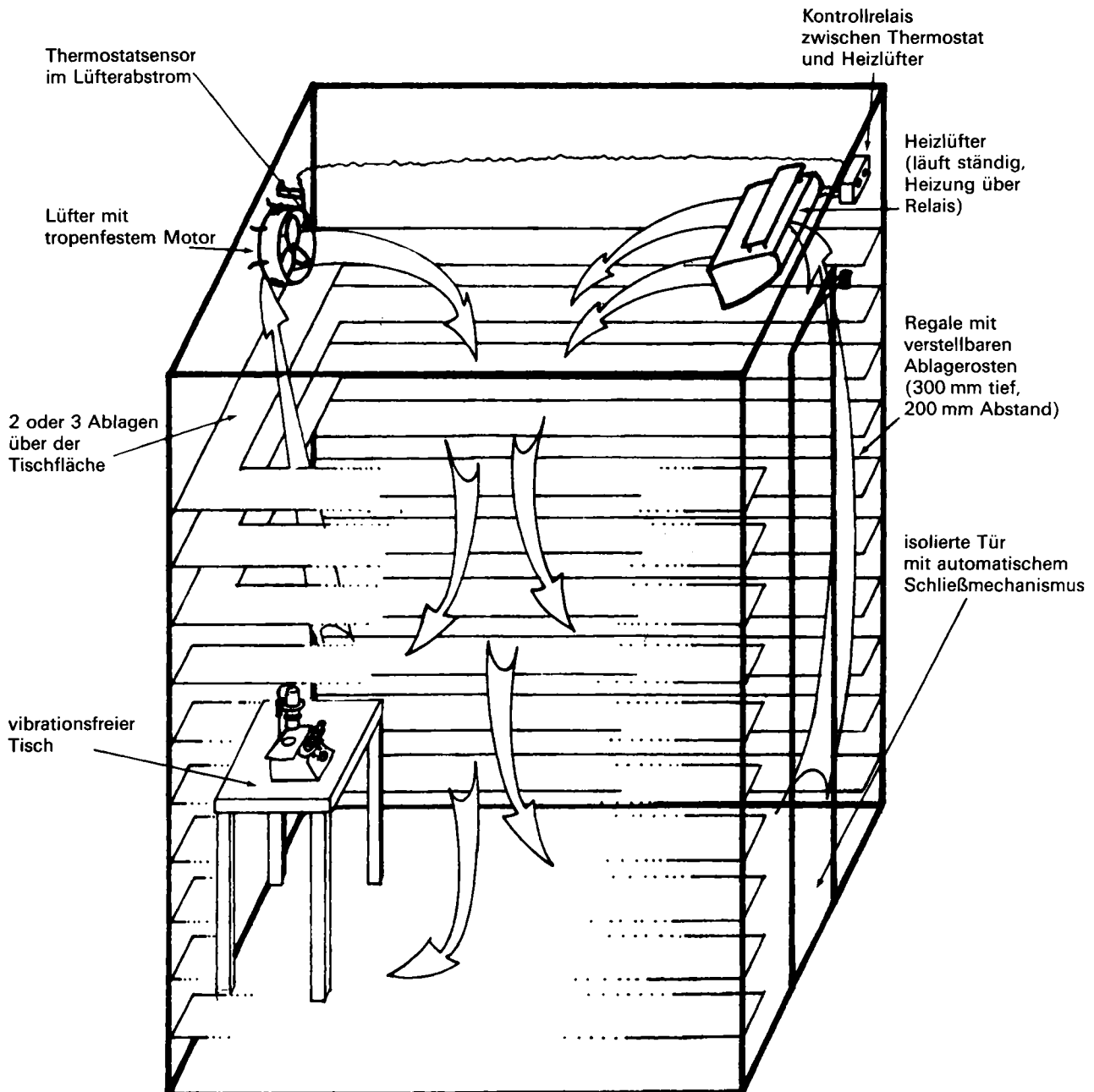


Abb. 3.6 Einrichtungsvorschlag für einen einfachen Wärmeraum. Die Pfeile veranschaulichen die Luftzirkulation (nach einem Originalentwurf von Dr. John Paul).

an den Wänden keine „Kälteinseln“ auftreten. Wenn Wärmeisolation erforderlich ist, müssen mit Plastik beschichtete Wandplatten durch eine 50 mm starke Isolierschicht aus Glasfaser, Mineralwolle oder feuerfestem Kunststoffschäum von der Wand getrennt sein. Die Befestigungselemente für die Wandverkleidung sind zu markieren, um das spätere Anbringen von Halterungen für Regalteile zu erleichtern. Das Durchbiegen der Ablagebretter wird verhindert, wenn im horizontalen Abstand von 500–600 mm Wandhaken angebracht werden.

Die erforderliche Raumgröße darf im Hinblick auf künftige Entwicklungen nicht unterschätzt werden. Zu beachten ist auch, daß ein großer Brutraum nur unwesentlich teurer ist als ein kleiner. Der Platzbedarf kann nach der momentan benötigten Ablagefläche berechnet werden. Wurden die Zellkulturarbeiten gerade erst begonnen, dann muß künftig mit einem fünf- bis zehnfach größeren Platzbedarf gerechnet werden, bei bereits längerfristig laufenden Arbeiten genügt es, eine zwei- bis vierfache Kapazität zu planen. Die Fachhöhe der Regale sollte 200–300 mm betragen, unten gelegene Fächer sollten jedoch weiter (450 mm), oberhalb Augenhöhe gelegene enger (250–300 mm) sein. Höhenverstellbare oder festmontierte Ablageroste gewährleisten eine gute Luftzirkulation. Sie müssen frei von Beulen und Unebenheiten und exakt horizontal ausgerichtet sein.

Hölzernes Mobiliar ist ungeeignet, weil es sich in der Wärme verziehen kann und schwer keimfrei zu halten ist.

Eine kleine Arbeitsfläche (möglichst aus rostfreiem Edelstahl oder mit Kunststoffurnier) sollte im Wärmerraum vorhanden sein, um ein Mikroskop mit zugehörigem Transformator und die zu begutachtenden Kulturflaschen darauf abstellen zu können. Wenn Zellzyklus-Synchronisierungsexperimente oder sonstige Sterilarbeiten bei 36,5 °C durchzuführen sind, muß ein Platz für eine kleine Laminarbox (300 × 300 oder 450 × 450 mm Filterabmessung), entweder als Tischaufsatzgerät oder an der Wand verankert, vorhanden sein. Gegebenenfalls kann auch ein Standgerät (nicht länger als 1 m) im Raum aufgestellt werden. Der Gebläsemotor sollte tropfenfest sein und nicht kontinuierlich laufen, denn die entwickelte Wärme kann im Brutraum dazu führen, daß der Motor durchbrennt.

Für die Beleuchtung sind Glühlampen den Leuchtstoffröhren vorzuziehen, da letztere einen Zerfall von Mediumbestandteilen verursachen können. Außerdem funktionieren einige Typen in warmen Räumen nicht.

Die Temperatur muß ständig in einem Toleranzbereich von $\pm 0,5$ °C geregelt werden. Eine wirksame Temperaturkontrolle ist abhängig von der

- Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit der Meßgeräte,
- Lokalisation des Meßfühlers,
- Luftzirkulation im Raum,

- richtigen Isolierung und
- zusätzlichen Wärmeezeugung durch andere Geräte (Rührer u. a.)

im Wärmerraum.

Heizquellen. Die am besten geeigneten Wärmequellen sind Heizlüfter, wobei je nach Raumgröße Haushalts- oder Industriegeräte einzusetzen sind. Je nach Isolierung werden für 20 m³ 2–3 kW (oder zweimal 1,0–1,5 kW) Leistung benötigt. Der Lüfter des Gerätes sollte ständig laufen und das Heizelement über einen Proportionalregler betrieben werden (s. u.).

Luftzirkulation. Ein zweiter, an der dem Heizlüfter gegenüberliegenden Seite des Wärmerraumes angebrachter Ventilator erzeugt einen entgegengesetzten Luftstrom und gewährleistet so optimale Zirkulation. In Räumen, die größer als 2 × 2 m sind, können Luftstromleitvorrichtungen erforderlich sein. In quadratischen Räumen ist das Ausfüllen der Ecken, wie in Abbildung 3.6 dargestellt, einfach und platzsparend. Ein langgestreckter, rechteckiger Raum kann durch eine an einer Schmalseite eingezogene „falsche Wand“ entsprechend hergerichtet werden, wobei aber ausreichende Isolierung und für das Anbringen von Regalen ausreichende Festigkeit zu gewährleisten ist.

Thermostaten. Die verwendeten Thermostaten sollten nach dem Proportionalregler-Prinzip arbeiten, d. h. über ein Relais, das die Heizung proportional zur Differenz zwischen Raumtemperatur und Sollwert regelt. Wird die Tür geöffnet und die Temperatur sinkt, dann erfolgt schnelle Aufheizung. Eine Überwärmung wird dadurch vermieden, daß die Heizleistung immer geringer wird, je mehr sich die Raumtemperatur dem Sollwert nähert.

Wenn möglich, sind zwei Thermostaten parallel zur getrennten Regelung zweier Heizlüfter zu installieren, so daß die Funktion eines Gerätes bei Ausfall durch das andere übernommen wird (Abb. 3.7). Der regulierende Thermostat wird mit einem engen Regelbereich von z. B. 0,4 °C ($\pm 0,2$ °C) auf die gewünschte Temperatur von 36,5 °C eingestellt, während der zweite, d. h. der Sicherheitsthermostat, auf eine geringfügig niedrigere Temperatur eingestellt ist und in Funktion tritt, wenn die Temperatur unter den Regelbereich des ersten Thermostaten abfällt. Kontrolllampen in jedem Regelkreis zeigen den Funktionszustand an. Zusätzlich sollte in jedem Heizkreis ein Überwärmeschutz vorhanden sein, der beim Erreichen von 38,5 °C die Heizung abschaltet und Alarm auslöst (Abb. 3.8). Die Thermostatsensoren müssen an Stellen mit guter Luftzirkulation, z. B. am Luftabstrom des zweiten laufenden Ventilators, angebracht sein. Vorzugsweise sind rasch reagierende, hochlei-

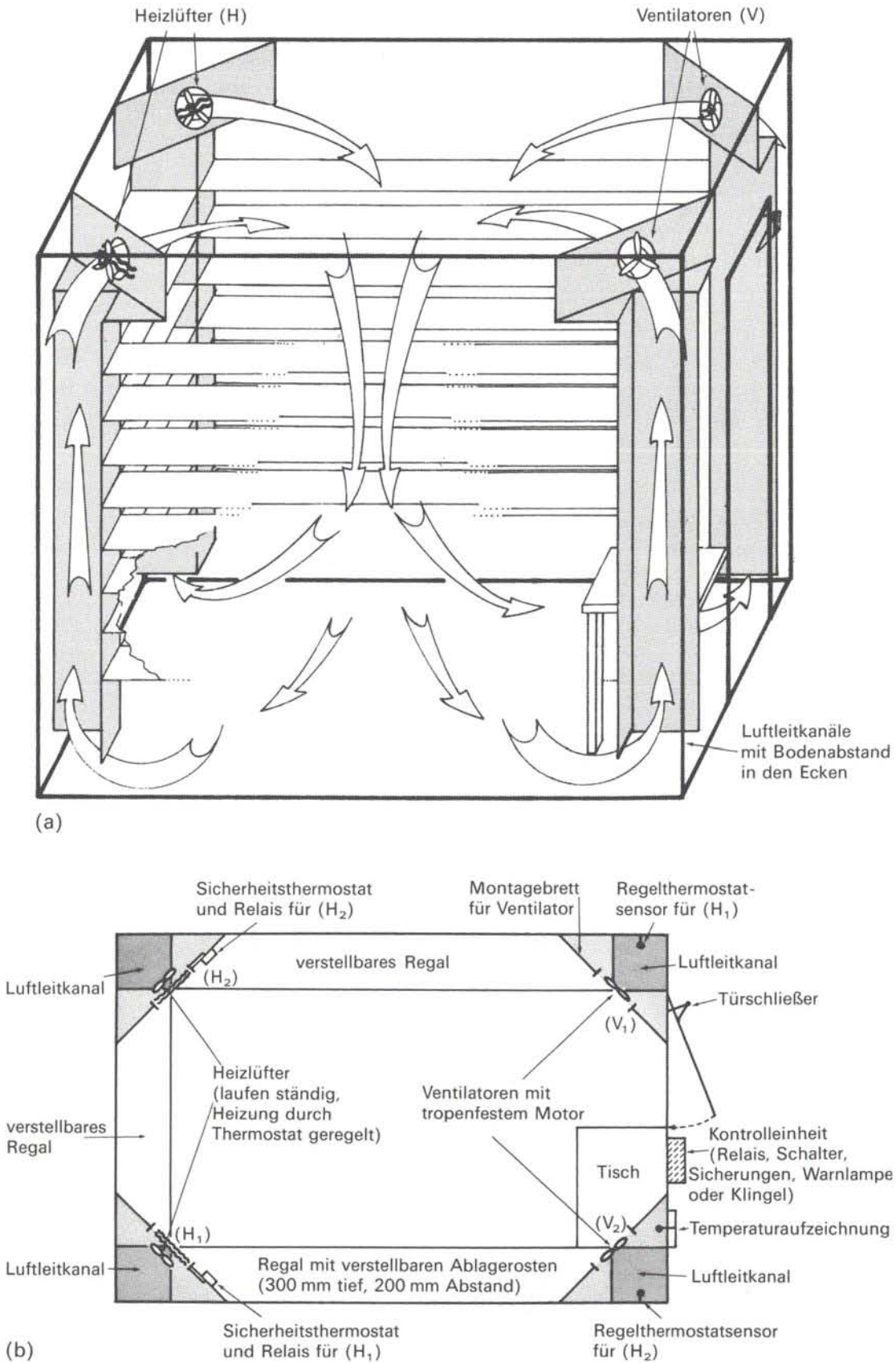


Abb. 3.7 Wärmerraum mit zwei Heizkreisen und Sicherheitsthermostaten. a) Seitenansicht, b) Draufsicht. Die Pfeile veranschaulichen die Luftzirkulation.

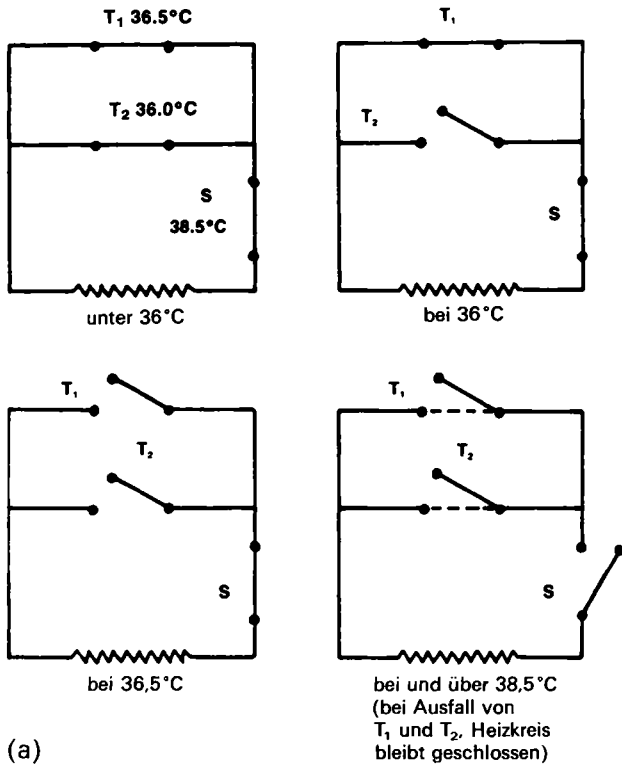
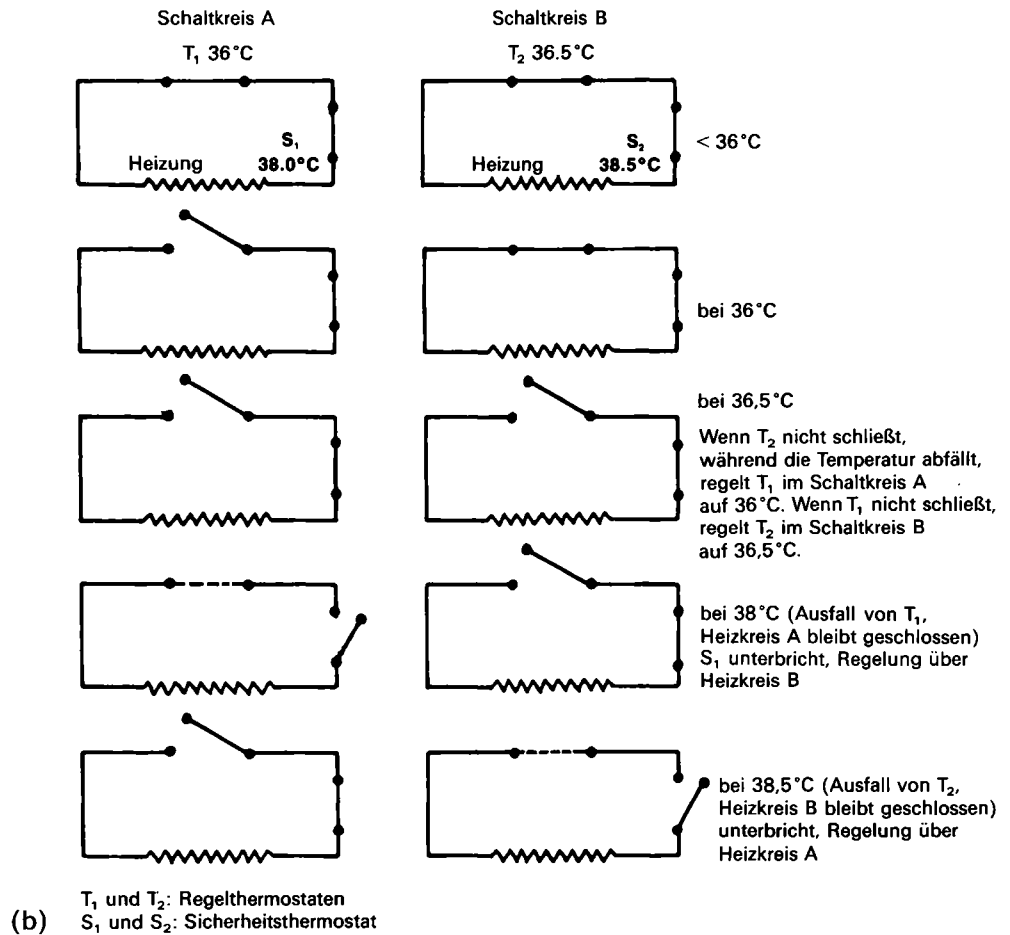


Abb. 3.8 Schaltpläne mit Regel- und Sicherheitsthermostaten für Wärmeräume entsprechend Abb. 3.6 und 3.7. Als Schalter fungieren durch Thermostaten oder Thermistoren gesteuerte elektronische Relais. T_1 und T_2 = Regelthermostaten; S_1 und S_2 = Sicherheitsthermostaten. a) einfacher Heizkreis, b) Dualheizkreis.



stungsfähige Temperaturmeßfühler (Thermistoren oder Thermolemente) zu verwenden.

Überwärmung. Angesichts der Notwendigkeit eines raschen Temperatenausgleichs im Wärmeraum darf die Gefahr einer Überwärmung nicht außer acht gelassen werden. Überwärmung kann auftreten:

- bei hoher Umgebungstemperatur im Labor infolge klimatischer Gegebenheiten oder
- durch wärmeerzeugende Geräte, wie Rührer, Rollerapparaturen, Laminarboxen usw., im Wärmeraum selbst.

Der Gebrauch derartiger Apparaturen ist daher im Brutraum zu vermeiden, oder es muß für ausreichende Wärmekonvektion durch zusätzliche thermostatgesteuerte Ventilatoren oder eine Klimaanlage gesorgt werden. In jedem Fall muß hier der Thermostat mindestens 2°C unter dem Sollwert des Heizlüfter-Thermostaten eingestellt werden, damit dieser die Temperatur reguliert.

Zugang zum Wärmeraum. Sind ein Proportionalregler, gute Luftzirkulation und ausreichende Heizung gewährleistet, kann auf eine Luftschleuse verzichtet werden. Die Wärmeraumtür sollte jedoch gut isoliert (gefüllt mit Kunststoffschäum oder Glasfaser), leichtgängig, gut schließend und möglichst mit automatischem Türschließer ausgerüstet sein. Empfehlenswert ist eine Durchreiche zum sterilen Arbeitsbereich, die auf beiden Seiten mit Ablageflächen für Kulturgefäße versehen ist. Die Verschlussklappe der Durchreiche sollte ebenfalls wärmeisoliert sein. Das Entstehen von „Kälteinseln“ auf den Regalen im Brutraum wird vermieden, wenn sich die Durchreiche über dem Arbeitsplatz befindet.

Ein Temperaturschreiber ist so anzubringen, daß die Ablesung für die im Gewebekulturlabor Arbeitenden leicht möglich wird. Eine wöchentliche Auswertung des Kontrollstreifens ist i. allg. ausreichend. Wenn möglich, werden neben dem Schreiber oder an einem anderen gut sichtbaren Platz Warnlampen für Über- und Unterschreitung des Temperaturkontrollbereichs installiert.

3.3 Präparation und Vorbereitung

In kleineren Gewebekulturlaboratorien kann eine aufwendige Medienpräparation vermieden werden, wenn geeignete käufliche Kulturmedien aus zuverlässiger Quelle erhältlich sind. Während große Laboratorien mit mehr als 50 Mitarbeitern ihre Medien aus ökonomischen Gründen wahrscheinlich selbst herstellen, werden kleinere Unternehmen es vorziehen, ihren Bedarf mit käuflichen Fertigmedien zu decken. Dadurch reduziert

sich der Aufwand für Präparationsarbeiten auf die Herstellung und Abfüllung von Salzlösungen, EDTA-Lösung usw. sowie auf die Bereitstellung von Wasser. Hinzu kommen Arbeiten wie das Verpacken von Schraubkappen und anderen kleinen Gerätschaften, die zur Sterilisation vorbereitet werden. Obwohl der Präparationsbereich sauber und ruhig sein sollte, ist steriles Arbeiten hier jedoch nicht erforderlich.

Stehen zuverlässige käufliche Medien nicht zur Verfügung, dann muß für die Medienherstellung ein ausreichend großer Platz reserviert werden, der mit Labor- und Feinwaage, pH-Meter und möglichst auch einem Osmometer ausgerüstet ist. Zum Lösen der Medien und zum Rühren und Abfüllen der Lösungen muß ausreichende Tischfläche vorhanden sein. Wenn möglich sollte im sterilen Arbeitsbereich eine gesonderte Laminarbox mit horizontalem Luftstrom für das Filtrieren und Abfüllen steriler Flüssigkeiten bereitgestellt werden. In einem Brutschrank muß Platz für die Inkubation von Medien in Nährbrühe oder auf Anzuchtplatten zur Sterilitätskontrolle vorhanden sein. Hitzebeständige Lösungen und Materialien können auf der nichtsterilen Seite des Labors autoklaviert oder heißluftsterilisiert werden.

3.4 Reinigung

Glasreinigung und -sterilisation werden nach Möglichkeit außerhalb des Gewebekulturlabors vorgenommen, weil die bei diesen Arbeiten entstehende Hitze und hohe Luftfeuchtigkeit nicht abgeführt werden kann, ohne die optimale Belüftungsintensität zu überschreiten. Autoklaven und Destillierapparate sind daher nach Möglichkeit in separaten Räumen mit wirksamer Ventilation aufzustellen. Im Abwaschbereich ist ausreichende Kapazität für das Spülen der Glasgeräte und – falls vorgesehen – Raum für eine automatische Spülmaschine einzuplanen. Viel Tischfläche wird auch für das Abstellen von Körben mit Glassachen, das Sortieren von Pipetten und das Verpacken des Sterilisiergutes benötigt, ebenso Platz für einen Pipettenspüler und einen Trockenschrank. Wenn Abwasch und Sterilisation im Gewebekulturlabor selbst durchgeführt werden müssen, sollte dies in größtmöglicher Entfernung vom sterilen Arbeitsbereich und nur bei ausreichender Ventilation geschehen.

Oft erweisen sich kleine Laborwagen als nützlich beim Einsammeln von schmutzigen Glassachen und zum Verteilen des sterilisierten Vorrates, sie erfordern jedoch selbst einen Abstellplatz.

3.5 Aufbewahrung und Lagerung

Sterile Lösungen werden entweder bei Raumtemperatur (Salzlösungen, Wasser usw.), bei 4 °C (Medien) oder bei – 20 bis – 70 °C (Serum, Trypsin-, Glutaminlösung usw.) aufbewahrt. Lagerkapazität ist auch für sterile Glassachen (Medien- und Kulturflaschen, Pipetten), sterile Plastikmaterialien (Kulturflaschen, Mikrotiterplatten, Petrischalen, Röhrchen, Spritzen, Schraubkappen, Stopfen usw.), Filtrationsgefäße, große Vorratsflaschen, Handschuhe, Abfallbeutel u. a. m. erforderlich. All diese genannten Materialien sollten vom sterilen Arbeitsbereich aus leicht zugänglich sein. Kühl- und Gefrierschränke werden auf der nichtsterilen Seite des Labors aufgestellt, weil deren Türen und Kompressoren Luftbewegungen verursachen und demzufolge Staub und Pilzsporen aufwirbeln können. Wartung und periodisches Abtauen der Geräte erfordern zudem Aktivitäten, die vom sterilen Arbeitsbereich besser ferngehalten werden.

Wesentlich bei der Vorratslagerung steriler Materialien ist, daß ein bequemer Zugang die Entnahme und Wiederauffüllung des Bestandes erleichtert. Dafür sind Schränke, die sich nach zwei Seiten öffnen lassen, besonders geeignet, weil die Entnahme von der einen und das Nachfüllen von der anderen Seite aus vorgenommen werden kann. Transportable Vorratsbehälter oder Tablets, die bei Bedarf ausgetauscht werden, haben sich ebenfalls als praktisch erwiesen.

Für die Vorratshaltung muß möglichst viel Platz zur Verfügung stehen, weil dann ökonomische Großeinkäufe möglich sind und auch das Risiko vermindert wird, daß Bestände an speziellen Materialien erschöpft sind, bevor sie ersetzt werden können. Der ungefähre Bedarf an Lagerkapazität pro Mitarbeiter kann mit 200 l bei 4 °C und 100 l bei – 20 °C angenommen werden. In kleinen Arbeitsgruppen liegen die Werte höher – und zwar bei 250 l Lagerkapazität im Kühlschrank und bei 150 l in der Tiefkühltruhe (– 20 °C). Diese Angaben beziehen sich auf Stauraum, außerdem sollte aber noch die Mitbenutzung von Kühl- und Tiefkühlräumen – falls vorhanden – gewährleistet sein.

Generell sind Tiefkühlgeräte einem Tiefkühlraum vorzuziehen. Sie sind leichter zu reinigen und zu warten und bei Ausfall leichter zu ersetzen.

3.6 Bauliche Gestaltung und Ausstattung

Die vorgesehenen Räume sollten mit einer Industrie- oder Büroraum-Luftfilteranlage ausgerüstet sein. Die Reinigung wird erleichtert, wenn das Mobiliar entweder mit der Unterkante am Boden abschließt oder den Zugang zum darunter befindlichen Fußboden nicht behindert. Der Boden wird zweckmäßigerweise mit Polyvinyl oder einem anderen stauabweisenden Material bedeckt. Ein in der Mitte des Raumes gelegener Fußbodenabfluß erlaubt bei entsprechender Absenkung des Bodens den großzügigen Einsatz von Wasser und schützt darüber hinaus die Einrichtung vor Überschwemmungen durch defekte Destillieranlagen, Autoklaven oder Spülbecken.

Besteht die Möglichkeit, das Gewebekulturlabor und die Bereiche für Vorbereitung, Reinigung und Sterilisation räumlich zu trennen, dann sollte dies weitestgehend geschehen. Eine Fußbodendrainage in allen Räumen ist auch hier zu empfehlen, am dringlichsten ist jedoch die Installation im Spül- und Sterilisationsbereich. Sind Reinigung und Sterilisation in getrennten Räumen untergebracht, dann ist es ratsam, diese benachbart oder im gleichen Stockwerk einzurichten. Dazwischenliegende Stufen oder Schwellen würden den Einsatz von Laborwagen behindern. Ideal geeignet sind auf einem Korridor unmittelbar gegenüberliegende Räume (siehe Abb. 3.5) (bezüglich Spülbecken, Einweichbäder usw. s. Kap. 4).

Der begehbare Raum des Labors muß dem zu erwartenden Durchgangsverkehr (Personen, Transport von Reagenzien, Abwasch, Wagen usw.) entsprechen, einen leichten Zugang zu den Vorratsschränken und problemloses Abräumen der verschmutzten Gerätschaften ermöglichen. Türöffnungen müssen ausreichend breit und hoch sein, damit alle Ausrüstungsgegenstände, besonders die Laminarboxen, passieren können.

Zwangsläufig ist der Platz das größte Problem, und Kompromisse werden unvermeidlich sein, aber ein wenig Vorausdenken kann viel Platz und damit auch Nerven sparen.

4 Laborausüstung

Die spezifischen *Ausrüstungsgegenstände* eines Gewebekulturlabors können, wie die der meisten Laboratorien, in folgende drei Kategorien eingeteilt werden:

- notwendige, ohne die ein Arbeiten nicht möglich ist,
- nützliche, die die Arbeit erleichtern, beschleunigen und die Produktivität erhöhen und
- vorteilhafte, die die Arbeitsbedingungen verbessern, rascher Ermüdung vorbeugen, ausgeklügelte Analysen ermöglichen und ganz allgemein die Arbeit attraktiver machen.

Nach dieser Rangfolge ist die Ausrüstung für Zellkulturlaboratorien in Tabelle 4.1 zusammengestellt. Stehen die genannten Gegenstände zur Verfügung, dann sind vor allem zwei Aspekte zu berücksichtigen:

- Die Geräte müssen in den dafür vorgesehenen Raum gebracht werden können (Zugang), und
- es muß Platz zur Aufstellung vorhanden sein (Unterbringung).

Bezugsquellen für die Laborausüstung sind in Kapitel 25 aufgeführt.

4.1 Notwendige Laborausüstung

4.1.1 Inkubatoren

Ein Inkubator muß ausreichend groß sein (etwa 200 l pro Nutzer) sowie mit Luftumwälzung, einem Temperaturregler mit einer Toleranz von $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ und einem Sicherheitsthermostaten ausgerüstet sein, der die Heizung bei Überwärmung abschaltet – oder besser: regelt – wenn der erste Heizthermostat versagt. Ein Inkubator sollte korrosionsbeständig, d. h. aus rostfreiem Edelstahl (für Trockeninkubatoren ist auch eloxiertes Aluminium geeignet) und leicht zu reinigen sein. Vorteilhaft ist ein Doppelschrank mit vertikal angeordneten, individuell regelbaren Untereinheiten, weil bei Ausfall oder bei erforderlicher Reinigung der einen die andere noch benutzt werden kann.

4.1.2 Inkubationstemperatur

Die *optimale* Temperatur für Zellkulturen ist abhängig:

- von der Körpertemperatur der Spezies, von der die Zellen stammen,
- von regionalen Temperaturabweichungen (Hautzellen vertragen z. B. niedrigere Temperaturen) und
- von der Berücksichtigung eines Sicherheitsbereiches, um geringe Schwankungen bei der Temperaturregelung des Brutschrankes zu tolerieren.

Die *empfohlene* Temperatur für die meisten menschlichen und Warmblüterzelllinien liegt daher aus Sicherheitsgründen etwas unterhalb der Körpertemperatur bei $36,5^{\circ}\text{C}$.

Wegen der höheren Körpertemperatur der Vögel zeigen aviäre Zellen maximales Wachstum bei $38,5^{\circ}\text{C}$. Sie wachsen aber auch bei $36,5^{\circ}\text{C}$, nur langsamer.

Kultivierte Zellen vertragen erhebliche Temperaturabfälle; sie können mehrere Tage bei 4°C überleben oder auch eingefroren und auf -196°C abgekühlt werden (s. Kap. 17). Dagegen tolerieren sie Temperaturen von mehr als 2°C über „normal“ – nur für wenige Stunden und sterben bei 40°C und darüber rasch ab.

Epidermale Zellen der Maus wachsen besser bei einer etwas niedrigeren Temperatur, z. B. 33°C .

Zellen poikilothermer Tiere zeigen generell eine größere Temperaturtoleranz, sollten aber bei einer konstanten Temperatur innerhalb des normalen Körpertemperaturbereiches der jeweiligen Spezies gehalten werden. Dazu sind mit Kühlung und Heizung ausgerüstete Inkubatoren erforderlich, denn die benötigte Temperatur kann, z. B. bei Fischzellen, unterhalb der Umgebungstemperatur liegen. Die Kühlkapazität sollte so bemessen sein, daß sie die Temperatur auf mindestens 2°C unter die Raumtemperatur senken kann, damit die Regelung über den empfindlicher reagierenden Heizkreis erfolgt.

Gegebenenfalls können Zellkulturen wechselwarmer Tiere auch bei Zimmertemperatur gehalten werden, wegen der möglichen Schwankungen der Umgebungstemperatur ist dies jedoch nicht zu empfehlen.

Die Inkubationstemperatur sollte auf $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ genau geregelt werden, wobei Temperaturkonstanz wichtiger ist als die Genauigkeit der Temperatureinstellung. Zellen können zwischen 33 und 39°C wachsen, wenn auch mit unterschiedlicher Wachstumsrate und Stoffwechselaktivität. Wichtig ist aber Temperaturkonstanz im Verlauf der Kultur und an allen Stellen des Inkubators. Wasserbäder bieten diesbezüglich die besten Bedingungen. Es besteht jedoch Kontaminationsgefahr, weil die

Tabelle 4.1 Gewebekulturausstattung

| Minimalbedarf (notwendig) | Wünschenswerte Geräte (nützlich) | Nützliche Zusatzausstattung |
|--|---|---|
| Inkubator (Brutschrank) | Laminarbox(en) vertikal, horizontal, Sicherheitsbox | –70 °C- Tiefkühlschrank |
| Sterilisator (Autoklav, Druck- Schnell- kochtopf, Heizschrank) | Zellzählgerät | Glaswaschmaschine |
| Kühlschrank | Vakuumpumpe | Fernsehanlage |
| Tiefkühlschrank (für Lagerung bei –20 °C) | CO ₂ -Inkubator | Umkehrmikroskop(e) |
| Umkehrmikroskop | Laborwaage und Mikrowaage | Koloniezählgerät |
| Einweichwanne oder Spülbecken | pH-Meter | Zentrifuge für große Volumina |
| Tiefes Spülbecken | Osmometer | Zellgrößenanalysator (z. B. Coulter ZB-Serie) |
| Pipettenzylinder | Phasenkontrast- und Fluoreszenz- mikroskop(e) | Ausrüstung für Zeitraffermikroki- matographie |
| Pipettenwaschanlage | transportabler Temperaturrecorder | Interferenzkontrastmikroskop |
| Destillations- oder Wasseraufberei- tungsanlage | eingebauter Temperaturrecorder in Heißluftsterilisator und Autoklav | Folienschweißgerät (für Sterilabpak- kungen zur Langzeit lagerung) |
| Tischzentrifuge | Rollerapparatur für Rollerkultur | Einfrierautomat (zum kontrollierten Einfrieren von Zellen) |
| Lagerbehälter mit Flüssig-N ₂ (35 l, 1500–3000 Ampullen) | Magnetrührer für Suspensionskultur | Hefter für Zertifikate der Kryokonser- ven und Kataloge |
| Vorratsbehälter für Flüssig-N ₂ (25 l) | Pipettentrockner | Elutriationszentrifuge und -rotor |
| | Pipettenstopfer | Durchflußzytophotometer (FACS) |
| | Wagen zum Einsammeln benutzer Glassachen und zum Verteilen neuer und gereinigter Geräte | Densitometer |
| | Pipettierhilfen | Dichtegradientenmischer (zur Gra- dientenseparation von Zellen) |
| | Pipettoren oder andere automatische Dispenser und Verdüner | |
| | separater Heißluftsterilisator und Trockenschrank | |

Kulturflaschen zur optimalen Temperierung untergetaucht werden müssen. Deswegen werden sie selten benutzt und Inkubatoren bevorzugt. Andererseits gewährleistet Luftumwälzung durch einen Ventilator im Inkubator guten Temperatenausgleich. Außerdem sollten die Kulturen auf perforierten Einschüben und nicht auf dem Boden oder zu dicht an den Wänden des Gerätes plziert werden. Die Temperaturkontrolle in Wärmräumen wird in Kapitel 3.2 besprochen.

4.1.3 Dampfsterilisatoren

Das einfachste Gerät dieser Kategorie ist der handelsübliche *Schnellkochtopf*, in welchem 10⁵ Pa Überdruck erzeugt werden. Obwohl auch kompliziertere Dampfsterilisatoren erhältlich sind, sollte die vorrangige Erwägung bei der Anschaffung eines solchen Gerätes seine Kapazität sein: Entspricht sie den gegebenen Erfordernissen? Ein einfacher Tischautoklav (Abb. 4.1 a) kann u. U. aus-

reichen; größere Modelle mit Zeitschalter und der Möglichkeit, vor und nach der Sterilisation zu evakuieren (Abb. 4.1 b), bieten jedoch ein größeres Fassungsvermögen und sind vielseitiger einsetzbar. Wasser, Salzlösungen u. ä. werden ohne Evakuierung autoklaviert. Trockenes Sterilisiergut (Instrumente, Tupfer, Schraubkappen usw.) erfordert ein Evakuieren der Kammer vor dem Autoklavieren, damit der heiße Dampf gleichmäßig durchdringen kann. Nach erfolgter Sterilisation sollte ebenfalls evakuiert werden, um den Dampf zu entfernen und das anschließende Trocknen zu beschleunigen. Andernfalls können Rückstände aus dem Kondenswasser zu Verunreinigungen führen. Um dieses Risiko zu vermeiden, sollte generell entionisiertes oder destilliertes Wasser zum Betrieb des Autoklaven benutzt werden.

Wird eine hohe Sterilisationskapazität benötigt (300 l oder mehr), dann empfiehlt sich die Anschaffung zweier kleiner Autoklaven eher als die eines großen. So steht während des Routineeinsatzes oder bei plötzlichem Ausfall eines Gerätes noch ein weiteres funktionstüchti-