

Basic paper

WAS IST

ZELLKULTUR UND WIE FUNKTIONIERT DIE 2D-METHODE?

Inhalt

1. Was ist eigentlich Zellkultur?
2. Welche Zelltypen werden bei Zellkulturen eingesetzt?
 - a. Fibroblasten
 - b. Epithelzellen
 - c. Endothelzellen
 - d. Stammzellen
3. Welche Zellkulturmethoden gibt es?
4. Was brauche ich für eine Zellkultur?
 - a. Temperatur / CO₂ / Feuchtigkeit
 - b. Nährstoffe und Medium
 - c. Kulturgefäße und Sterilwerkbank
5. Troubleshooting:
Was alles schief gehen kann und wie es gelöst wird
 - a. Mykoplasmen
 - b. Mikrobielle Kontamination
 - c. Kreuzkontamination



1. Was ist eigentlich Zellkultur?

Eine Zellkultur ist das Wachstum pflanzlicher und tierischer Zellen außerhalb eines Organismus unter kontrollierten Bedingungen. Zellkultur ist deshalb so beliebt, weil man mit Säugerzellen beispielweise den Einsatz von Tierversuchen verringern oder ganz umgehen kann. Zusätzlich können mittels tierischer Zellen bestimmte für den Menschen wichtige Hormone wie Insulin, schnell und einfach hergestellt werden. Fortführend ist zu sagen, dass man gerade in der medizinischen Forschung durch den Einsatz von Zellkulturen viel über das Verhalten von Krebszellen

herausfinden konnte. Demnach gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten, warum sich mehr und mehr Forscher für diese Thematik entscheiden.

Dieses Basic Paper zeigt nur einen kleinen Ausschnitt aus diesem Forschungsfeld und soll einen ersten Einblick in diese spannende Welt geben. In den nächsten Kapiteln werden verschiedene Arten der Zellkultur, unterschiedliche Zellformen, die wichtigsten Materialien sowie ein kleines Troubleshooting in der Zellkultur vorgestellt.

2. Welche Zelltypen werden bei Zellkulturen eingesetzt?

Es gibt eine Vielzahl und Vielfalt an Organismen, aus denen Zellen isoliert und vermehrt werden können. Wir beschränken uns hier auf vier verschiedene tierische Zellformen, die in fast jedem Zellkulturlabor zum Einsatz kommen.

a. Fibroblasten

Fibroblasten sind ortständige Zellen aus dem lockeren Bindegewebe. Das lockere Bindegewebe ist ein sogenannter „Lückenfüller“. Es umhüllt Nerven und Gewebe und dient zusätzlich als Stütze. Fibroblasten bilden die Komponenten der Interzellularsubstanz und sind besonders in der Grundform des Bindegewebes aktiv. Ihre Hauptaufgabe ist die Bildung von Narbengewebe in zerstörten Gewebearealen. Die Morphologie von Fibroblasten ist spindelförmig oder sternförmig und durch ihre Zytoplasmafortsätze können Fibroblasten in mechanischer und kommunikativer Verbindung zueinanderstehen.

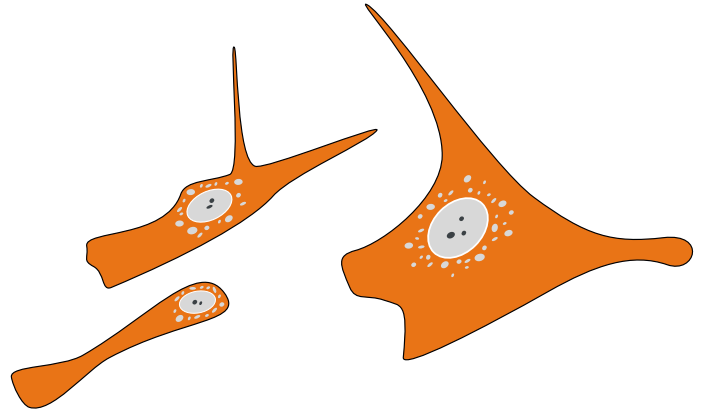


Abb. 1: Fibroblast Mausembryo

b. Epithelzellen

Epithelzellen sind eine Zellgruppe, welche vom Bindegewebe abgetrennt sind und keine Blutgefäße enthält. Epithelzellen haben als Hauptgemeinschaft die Polarität. Polarität heißt hier, dass Epithelzellen eine äußere (apikale) Seite (Haut oder Organoberflächen) und eine dem Lumen/Innenraum (basale) gerichtete Seite besitzen.

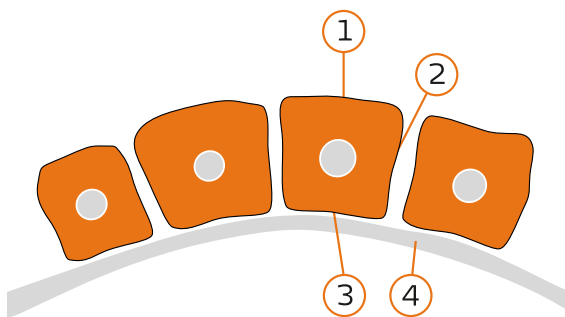


Abb. 2: Polarität einer Epithelzelle in Bezug auf die Oberfläche:
1) apikaler Pol (gerichtet zu äußerem Milieu), 2) seitliche Fläche,
3) basaler Pol (gerichtet zu innerem Milieu), 4) Basalmembran

Die Form von Epithelzellen ist entweder ein- oder mehrschichtig. Die basale Seite ist zudem mit darunter liegenden Geweben verbunden. Epithelzellen übernehmen die unterschiedlichsten Funktionen im Körper, z. B. den mechanischen Schutz durch Reißfestigkeit der Haut, die Sekretion oder die Nährstoffaufnahme im Darmgewebe. Natürlich gibt es morphologische Unterschiede von Epithelzellen. Vereinfacht können diese in zwei Formen eingeteilt werden: einschichtige Epithelien und mehrreihige Epithelien.

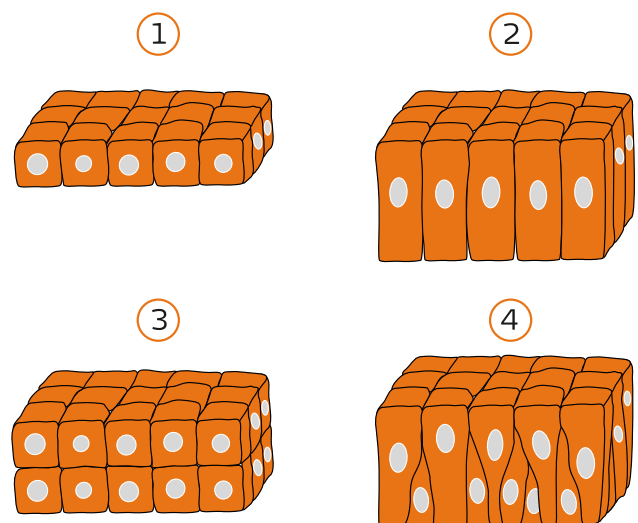


Abb. 3: Verschiedene Formen von Epithelzellen: 1) Kubisches Epithel, 2) Zylinderepithel, 3) Mehrschichtiges isoprismatisches Epithel, 4) Mehrreihiges Epithel

c. Endothelzellen

Diese Zelleinheit kleidet in einer Schicht die Blutgefäße aus. Sie bilden sozusagen eine Barriere zu angrenzendem Gewebe. Durch diese „Grenzbildung“ spielen Endothelzellen beim Stoffaustausch eine große Rolle. Einige wichtige Funktionen sind zum Beispiel die Produktion von Stoffen zur Regulation des Blutdrucks (Stickstoffmonoxid) oder die Regulation des Stoffaustausches von Blut und Gewebe. Da Endothelzellen als Zellverband wachsen und untereinander eine Art Gewebegeflecht bilden, wird die Erscheinungsform durch den Konfluenzgrad bestimmt. Der Konfluenzgrad beschreibt die lückenlose Bedeckung einer Oberfläche mit einer anhaftenden (adhärenten siehe Kapitel 3) Zelllinie. Bis die Zellen also zu 100% eine Oberfläche bedecken, erinnern diese eher den Fibroblasten.

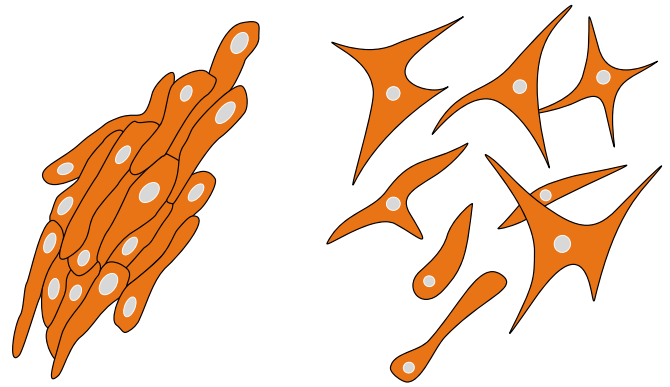


Abb. 4: Konfluenzgrad von Zellen: 1) 100% Konfluenz (100% Bedeckung einer Oberfläche); 2) 50% Konfluenz (50% Bedeckung einer Oberfläche)

d. Stammzellen

Stammzellen sind eine viel diskutierte und spannende Zellgruppe, welche zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich für die Forschung eingesetzt wird. Stammzellen haben die Fähigkeit, sich je nach Umgebung in verschiedene Zellen oder Gewebearten zu entwickeln. Diese werden dann in embryonale Stammzellen (potentiell jegliches

Gewebe) oder adulte Stammzellen (bestimmtes, differenziertes Gewebe) unterschieden. Zusätzlich können Stammzellen identische Tochterzellen bilden, welche sich dann je nach biologischem Milieu in differenzierte Gewebetypen/Zelltypen weiter verändern können.

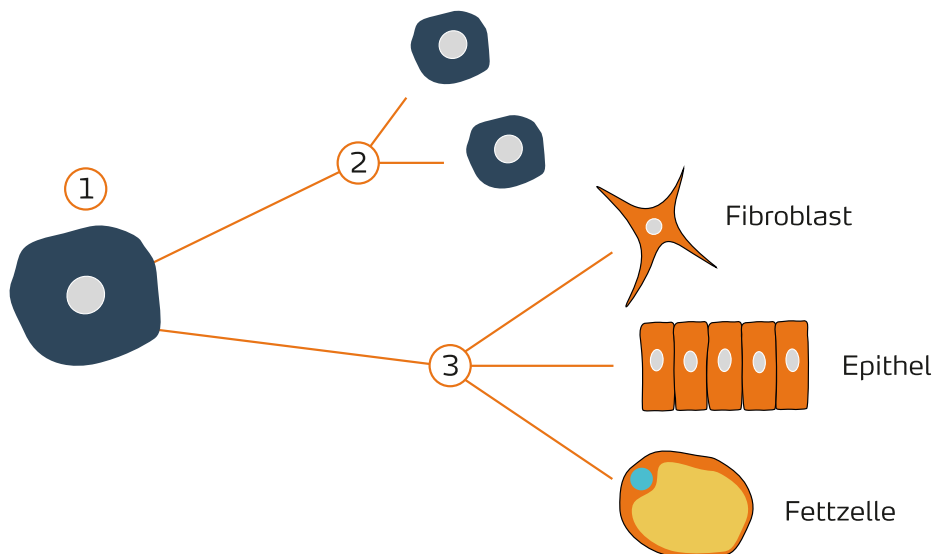


Abb. 5: Asymmetrische Zellteilung einer Stammzelle (1) mit Bildung von identischen Tochterzellen (2), sowie differenzierten Zelltypen (3), hier Fibroblast, Epithel und Fettzelle

3. Welche Zellkulturmethoden gibt es?

Bevor das Zellkultorexperiment startet, ist es ratsam, zu wissen, welche Zellkultur man betreiben möchte und in welcher Form die gewählten Zellen wachsen. Dazu sollte man zwischen verschiedenen Arten der Zellkultur unterscheiden.

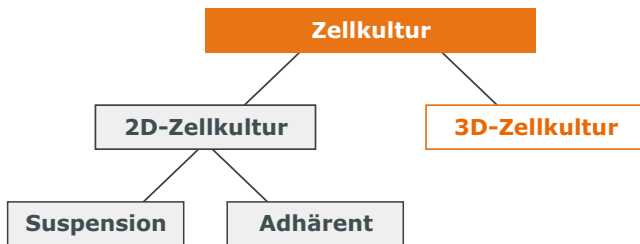


Abb. 6: Methoden der Zellkultur

Die 2D-Zellkultur ist die am meisten angewandte Methode, mit der viele Zellkulturlabore arbeiten. Wie in der Graphik oben dargestellt, kann diese auf zwei Arten erfolgen. Die Physiologie der Zelle bestimmt dabei mehr oder weniger, ob die Kultur als Suspension oder adhärenent stattfindet. In der Suspensionskultur schweben die Zellen im Medium frei, während in der adhärenent Kultur die Zellen in einer Schicht (Monolayer) auf der Oberfläche des Kulturgefäßes anhaften und wachsen.

In der 3D-Zellkultur werden Zellen in dreidimensionalen Strukturen ähnlich den Organen im Körper kultiviert. Dabei berücksichtigt die 3D-Zellkultivierung die Struktur und Ausrichtung von Geweben. Die dreidimensionale Zellkultivierung ist ein ganz eigenes Thema, welches separat betrachtet werden sollte. In dieser Einführung ist die 2D-Zellkultivierung im Fokus.

4. Was genau brauche ich für eine Zellkultur?

Dazu kann zuerst der menschliche Körper betrachtet werden. Um als Mensch lebensfähig zu bleiben, benötigt man Nährstoffe (in Form unterschiedlicher Lebensmittel), Wasser, moderate Temperaturen sowie zeitweise Bewegung. Die gleichen Punkte können grob auf eine Zellkultur übertragen werden. Anders ist natürlich hier, dass der menschliche Körper durch eine künstliche Umgebung ersetzt werden muss. Der Zelle muss alles von außerhalb zur Verfügung gestellt werden, um in ausreichender Weise wachsen und überleben zu können. Im Folgenden werden die Parameter besprochen, welche wichtig für eine erfolgreiche Zellkultur sind.

a. Temperatur / CO₂ / Feuchtigkeit

Die meisten Säugetiere, aus denen viele der im Labor eingesetzten Zellen kultiviert werden, haben ein Körpertemperatur von ca. 37°C. Damit die Zelle nicht das Wachstum einstellt, ist es wichtig einen entsprechenden Brutschrank einzusetzen, welcher genau diese Umgebungstemperatur simulieren und stabil über längere Zeiträume halten kann.

Der pH-Wert in der Umgebung der Zelle ist ein weiterer wichtiger Faktor, der beachtet werden sollte. Viele der verwendeten Säugerzellen fühlen sich in einem pH-Bereich zwischen 7,0–7,4 am wohlsten. Auch hier kann ein Brutschrank in Verbindung mit CO₂ – Begasung (5% Vol. – 20% Vol.) für die beste Umgebung sorgen. Da Zellen in einem Medium herangezüchtet werden und dies nicht verdunsten soll, ist es wichtig, eine hohe Luftfeuchtigkeit (ca. 95%) am Gerät einzustellen.



Abb. 7: Ausschnitt der Bedienoberfläche eines Inkubators mit Parametern

b. Nährstoffe und Medium

Die richtigen Nährstoffe sowie die Auswahl eines geeigneten Mediums sind ein wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Kultivierung von Säugerzellen. Prinzipiell bestehen Medien aus Kohlenstoffquellen, wie Glukose, Stickstoff- und Phosphatquellen sowie Sauerstoff. Zusätzlich werden oft Vitamine, Wachstumshormone und Mineralien hinzugegeben. In einem Zellkulturlabor werden Medien oft in verschiedenen Kategorien eingesetzt. Wenn zum Beispiel Zelllinien nur bestimmte Inhaltsstoffe zum Wachstum benötigen, verwendet man synthetische

Medien, die eine definierte, vorgegebene Konzentration der Inhaltsstoffe haben. Auf der anderen Seite können auch Komplexmedien verwendet werden, in welchen organische Inhaltsstoffe eingesetzt werden, wie z. B. Peptone. Ein universelles Medium gibt es dafür allerdings nicht und man sollte hier eine ausführliche Recherche über die Zelllinie durchführen bzw. die von der Zellbank empfohlenen Medien zur Anzucht verwenden. So ist man immer auf der sicheren Seite. Eine Auswahl von Medien mit den dazugehörigen Zelllinien zeigt die nachfolgende Tabelle:

Tabelle 1: Gängige Medien für die Kultur von Säugerzellen

Zelllinie	Organismus	Medium
CHO-K1 (Epithelzellen)	Maus	F-12 mit 10% FKS
HeLa (Epithelzellen)	Mensch	MEM mit 10% FKS und NEAA
CV-1 (Fibroblast)	Affe	MEM mit 10% FKS
HUVEC (Endothel)	Mensch	F-12K und 10% FKS und 100 µg/ml Heparin

c. Kulturgefäße / Schüttler und Sterilwerkbank

Kulturgefäße gibt es in einer Vielzahl. Hier kann sich der Anwender – je nach Aufgabe oder Zellkulturroutine – für entsprechende Gefäße entscheiden. Die meist verwendeten Gefäße für adhärente Zellkulturen sind Tissue Culture Flaschen (T-Flaschen), die oft aus Polystyrol angefertigt werden und deren Oberfläche durch chemische Behandlung hydrophil ist. Zusätzlich gibt es Schraubverschlüsse mit oder ohne gasdurchlässige Membranen. Hier muss der Anwender darauf achten, ob die Zellkultur CO₂ für das Wachstum benötigt.

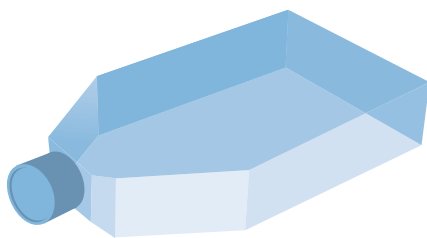


Abb. 8: Tissue Culture Flasche (T-Flasche)

Möchte man Suspensionskulturen anlegen, greift man dementsprechend zu sterilen Erlenmeyerkolben, bei denen das Glas hydrophile Eigenschaften besitzt. Erlenmeyerkolben gibt es in verschiedenen Ausführungen. Dabei differenzieren sich diese in der Zellkultur hauptsächlich durch den Verschluss. Je nach Anforderung werden entweder sterile Stopfen mit einer sterilen Metallkappe auf den Erlenmeyerkolben gesetzt oder man greift zu einem handlichen Schraubverschluss. Beispiele für verschiedene Kolben sind in den folgenden Darstellungen gezeigt.

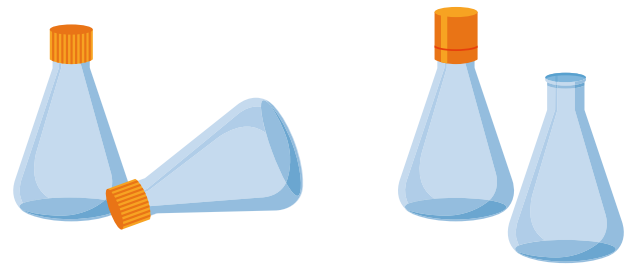


Abb. 9: Erlenmeyerkolben mit Schraubverschluss (links) und mit steriler Metallkappe (rechts)

Zusätzlich muss bei einer Suspensionskultur beachtet werden, dass die schwebenden Zellen bewegt werden müssen, um so ausreichend an die entsprechenden Nährstoffe zu gelangen. Dafür können je nach Stabilität der eingesetzten Zelllinien entweder Orbital- oder Taumelschüttler eingesetzt werden.

Orbitalschüttler eignen sich besonders für Suspensionskulturen mit höheren Volumina. Durch die Möglichkeit bei den meisten Geräten eine höhere Umdrehungszahl einzustellen, werden Medium und Zellen vermischt und es wird für ordentliches Wachstum bei ausreichender Nährstoffversorgung gesorgt. Zu beachten ist hier, dass man Orbitalschüttler für eher weniger sensitive Zelllinien verwenden sollte, da durch hohe Umdrehungszahlen bei hohem Radius heftige Verwirbelungen entstehen.

Für eine sehr sanfte Umspülung von sensiblen Säugerzellen wird gerne der Taumelschüttler eingesetzt. Hier findet die Bewegung in Kombination mit einer sehr geringen Umdrehungszahl in drei Richtungen statt. So bleibt die Suspension in Bewegung ohne „Stress“ auf die Zellen auszuüben.

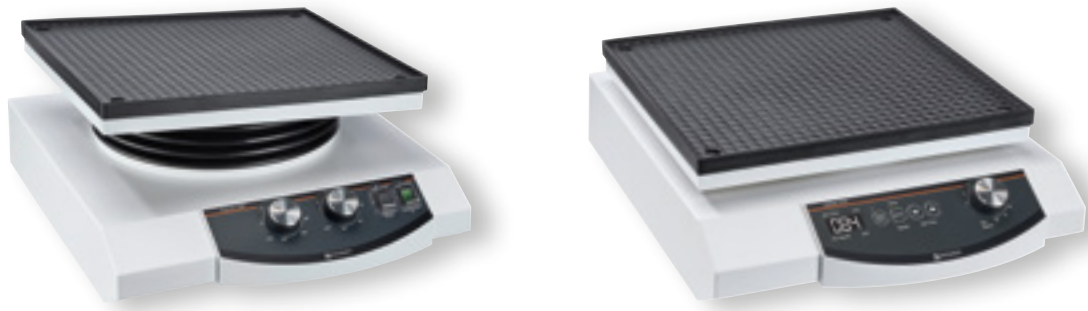


Abb. 10: Polymax 1040 (links): Taumelschüttler mit sanfter Bewegungsform und einer Umdrehungszahl von 2 – 50 U/min; Unimax 1010 (rechts): Orbitalschüttler für optimale Nährstoffversorgung von weniger sensiblen Suspensionskulturen

Sterilwerkbänke sind das „A“ und „O“ in jedem Zellkultur-labor. Es gibt sie je nach Anforderung und Klassifizierung der Labore in verschiedenen Ausführungen. Die Klassifizierung erfolgt nach der Ab- und Zuführung sowie nach der Filterung der Luftströme.

Sicherheitswerkbänke Klasse I haben lediglich einen vertikalen Luftstrom. Hier wird die Raumluft über eine Öffnung über dem Tisch weggesaugt, diese Klasse eignet sich somit nicht wirklich für Zellkulturroutinen. Sicherheitswerkbänke Klasse II sind da schon eher für das Arbeiten mit Zellkulturen geeignet, da hier der Luftstrom gefiltert wird sowie der Anwender durch einen Luftvorhang vor durch austretende Aerosole geschützt wird. Sicherheitswerkbänke Klasse III sind dagegen komplett abgeschlossen und arbeiten mit einem Unterdrucksystem. Der Anwender kann den abgeschlossenen Arbeitsraum lediglich über zwei integrierte Handschuhe bedienen. Diese Werkbänke werden vor allem bei der Herstellung von Medikamenten eingesetzt.



Abb. 11: Sterilwerkbank (Laminar Flow-Werkbank)

5. Troubleshooting: Was alles passieren kann und wie es gelöst wird

Nachdem viel über die entsprechenden Gerätschaften, verschiedene Zelltypen sowie die Wichtigkeit der Medien gesprochen wurde, kann das Zellkulturexperiment starten. Leider geht auch bei bester Vorbereitung der Experimente und Arbeitsweise mal etwas schief. Es gibt verschiedene Probleme, die während der Zellkultur auftauchen können, z. B. mikrobielle Kontamination, Verunreinigungen mit Mykoplasmen, verlangsamtes Wachstum aufgrund physischer Einflüsse u. v. m. Diese Liste könnte endlos erweitert werden. Im Anschluss werden drei der eher häufigen Problematiken besprochen und Ansätze zur Bekämpfung einer Verunreinigung beleuchtet.

a. Mykoplasmen

Mykoplasmen gehören zu der Domäne der Bakterien und sind parasitär bei Wirbeltieren. Der Unterschied zu ande-

ren Prokaryoten ist jedoch, dass diese Art keine Zellwand besitzt. Sie sind zudem viel kleiner als ihre Verwandten und können Sterilfilter passieren, was diese Quälgeister zu einem echten Problem in der Zellkultur macht. Die Identifizierung von Mykoplasmen erfolgt oft leider erst, wenn die Kultur komplett mit diesen überwachsen ist, da Mykoplasmen im Frühstadium nicht lichtmikroskopisch identifiziert werden können.

Welche Schritte können gegen einen Befall eingeleitet werden? Da es sich bei Mykoplasmen um Bakterien handelt, können eine Vielzahl an Antibiotika für die Behandlung eingesetzt werden wie z. B. Gentamycin, Tetracyclin-HCl. Da man als Mensch der größte Verursacher einer Mykoplasmen-Verunreinigung ist, weil sich diese oft in den oberen Nasennebenhöhlen einsiedeln,

sollte man stets auf eine saubere Arbeitsweise achten. Sollte sich trotzdem eine Verunreinigung eingeschlichen haben, gibt es neben der Anwendung von Antibiotika auch andere Ansätze zur Entfernung. Diese verfolgen andere Ansätze wie z.B. die Hemmung der Vermehrung, Auflösung der Zellmembranen oder die Hemmung der Ribosomenaktivität. Wichtig ist, dass man nach Abschluss der Behandlungen eine Polymerase-Kettenreaktion durchführt, um wirklich sicher zu sein, dass sich keine Mykoplasmen mehr in der Kultur befinden.



Abb. 12: Mykoplasmen in der Zellkultur

b. Mikrobielle Kontamination

Neben Mykoplasmen können sich selbstverständlich auch andere Bakterien in einer Zellkultur ansiedeln. Bei dieser Form von Kontamination ist es relativ gleichgültig, um welche Bakterien es sich handelt. Ähnlich wie bei einer Mykoplasmen-Kontamination helfen hier eine Vielzahl an Antibiotika, um sich der Verunreinigung zu entledigen. Bevor diese allerdings „wild“ dem Medium hinzugegeben werden, sollte herausgefunden werden, um welche Bakterien es sich handelt, damit man spezifisch agieren kann. Des Weiteren sollte auch hier wieder auf äußerste persönliche Sauberkeit beim Arbeiten geachtet werden, da sich viele Keime auf der Haut wie z.B. Staphylokokken oder Streptokokken befinden. Zusätzlich hilft es, die Arbeitsumgebung sauber zu halten und auf Desinfektion zu achten.

c. Kreuzkontaminationen

Bei Kreuzkontamination handelt es sich um sogenannte andere eingewanderte Zelllinien, die aufgrund unsteriler Arbeitsweisen in die eigentliche gewünschte Zelllinie gelangt sind. Das bekannteste Beispiel für unentdeckte Kreuzkontamination ist die HeLa-Zelllinie. Diese ist leider durch Vermischung in viele andere, häufig verwendete Zelllinien eingebracht worden. Wie identifiziert man allerdings, dass man sich eine Kreuzkontamination eingefangen hat? Hier helfen vor allem molekularbiologische Techniken, wie zum Beispiel Profiling oder DNA-Fingerprinting. Wenn durch einer dieser Methoden eine Kontamination herausgefunden worden ist, gibt es außer dem Verwerfen der Kultur leider wenig Möglichkeiten, diese zu retten.

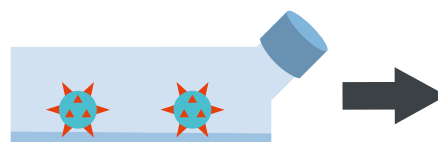
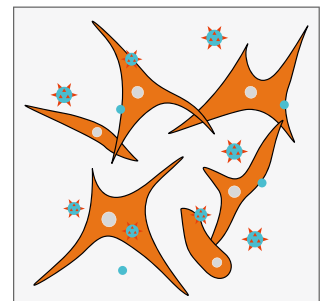


Abb. 13: Mikrobielle Kontamination einer Zellkultur



Resumé

Von einer einzelnen Zelle oder einem isolierten Gewebe bis hin zu einem erfolgreich abgeschlossenem Zellkultur-experiment ist es manchmal ein langer Weg. Selbst wenn in der Zellkultur viele Hürden zu bewältigen sind, lohnt es sich, dieses interessante Forschungsfeld weiter zu prakti-

zieren. Allein dass es möglich ist, mehr über interzelluläre Prozesse herauszufinden oder zum Beispiel die Entstehung von Tumorzellen besser nachzuvollziehen, ist für jeden Forscher und angehenden Wissenschaftler eines der lohnenswertesten Gefühle.

Quellen:

- S. Schmitz, *Der Experimentator: Zellkultur*, 2011, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. Auflage, <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2573-7>
- L.M/H.L/S.Gä, *Lexikon der Biologie: Zellkultur*; www.spektrum.de/lexikon/biologie/zellkultur/71584, (Aufruf: 11.07.2022)
- *Glossar*; Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung; www.helmholtz-hzi.de/de/wissen/glossar/entry/zellkultur/; (Aufruf: 11.07.2022)
- *InCelligence: 3D-Zellkultur: Übersicht und Neuigkeiten*; www.incelligence.de/zellkultur/3d-zellkultur (Aufruf: 11.07.2022)



NOCH FRAGEN

Kontaktieren Sie uns:

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG

+49 9122 9920-0
redaktion@heidolph.de
www.heidolph.com