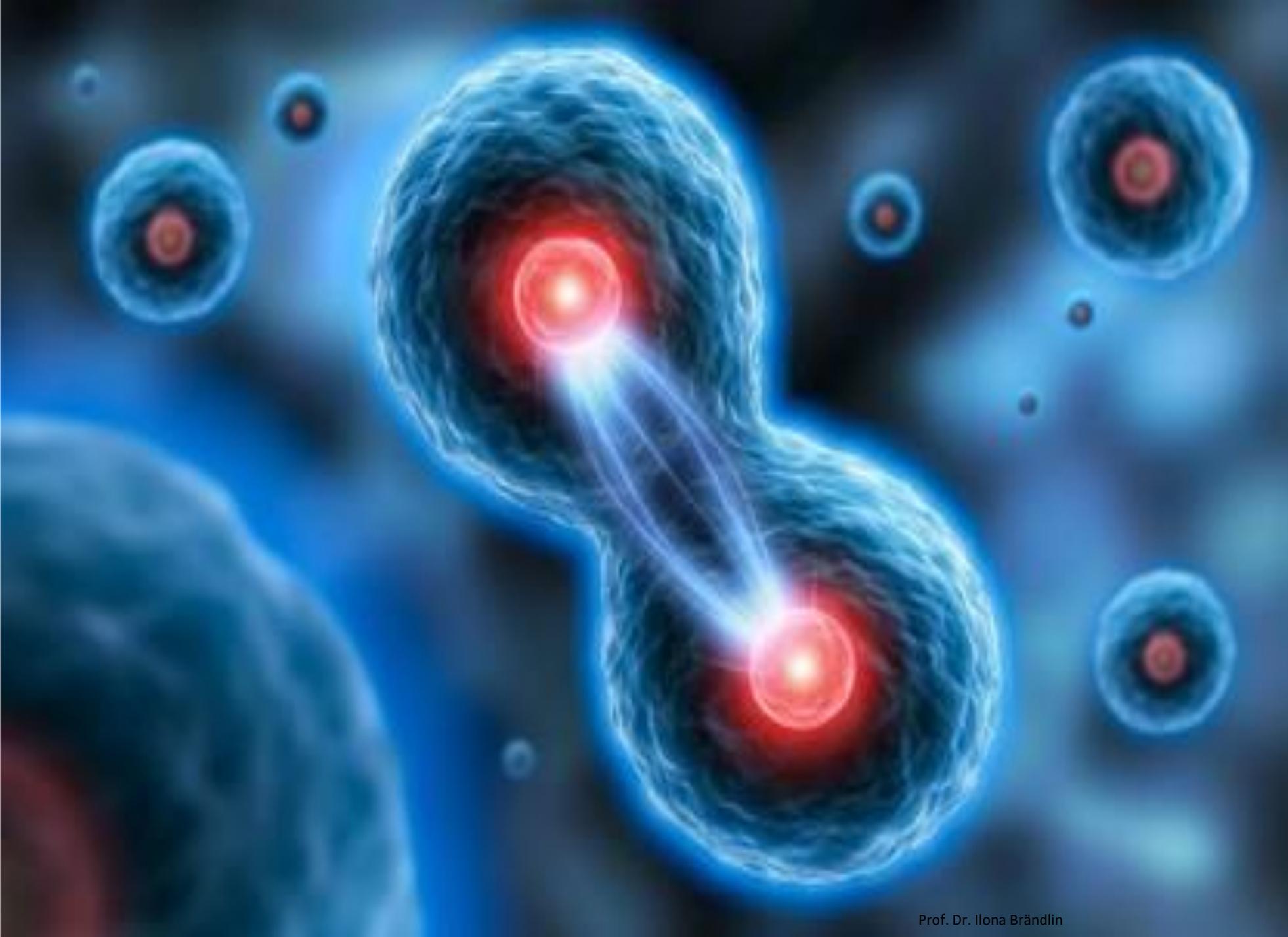


Zellkulturtechnik
Fachbereich 2, Informatik und
Ingenieurwissenschaften
Studiengang Bioverfahrenstechnik

Prof. Dr. Ilona Brändlin
ilona.braendlin@fb2.fra-uas.de



Bücher und Organisatorisches



Hardin / Bertoni / Kleinsmith
Beckers Welt der Zelle

Lehrbuch
8., aktualisierte Auflage 2015.
Buch, mit Online-Zugang. XXV, 1254 S.
Hardcover
Pearson Deutschland ISBN 978-3-86894-222-4
Format (B x L): 20 x 27,1 cm
Gewicht: 2573 g

Bücher und Organisatorisches



Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff

Molekularbiologie der Zelle

Seitenzahl

1676

Erscheinungsdatum

05.04.2017

ISBN

978-3-527-34072-9

Verlag

Wiley-VCH

Auflage

6. Auflage

Ist auch online über unsere Bibliothek, als E-Book, zu haben!!!!

Bücher und Organisatorisches



© 2013

Zell- und Gewebekultur

Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen

Autoren: Gstraunthaler, Gerhard, Lindl, Toni

Bücher und Organisatorisches

- Berechtigung zum Labor: Sicherheitseinweisung und schriftlich geprüfte Vorleistung

Prüfungsleistungen:

- ZKT-Klausur: 90 min
- Abgabe eines Protokolls über die Versuche im Labor (in Form einer Bachelorthesis)

PW: campUAS: ZKT22/23

Inhalte

1. Einführung in die Zellkultur

2. Struktur und Funktion der Zelle (Physiologie), Kompartimentierung

3. Zelltypen, primäre/permanente Zellen

4. Intrazelluläre Transportsysteme - Membransysteme

5. Proliferation - Zellzyklus (ZZ) – ZZ-Kontrolle

6. Apoptose - Nekrose

7. Zellkulturtechniken

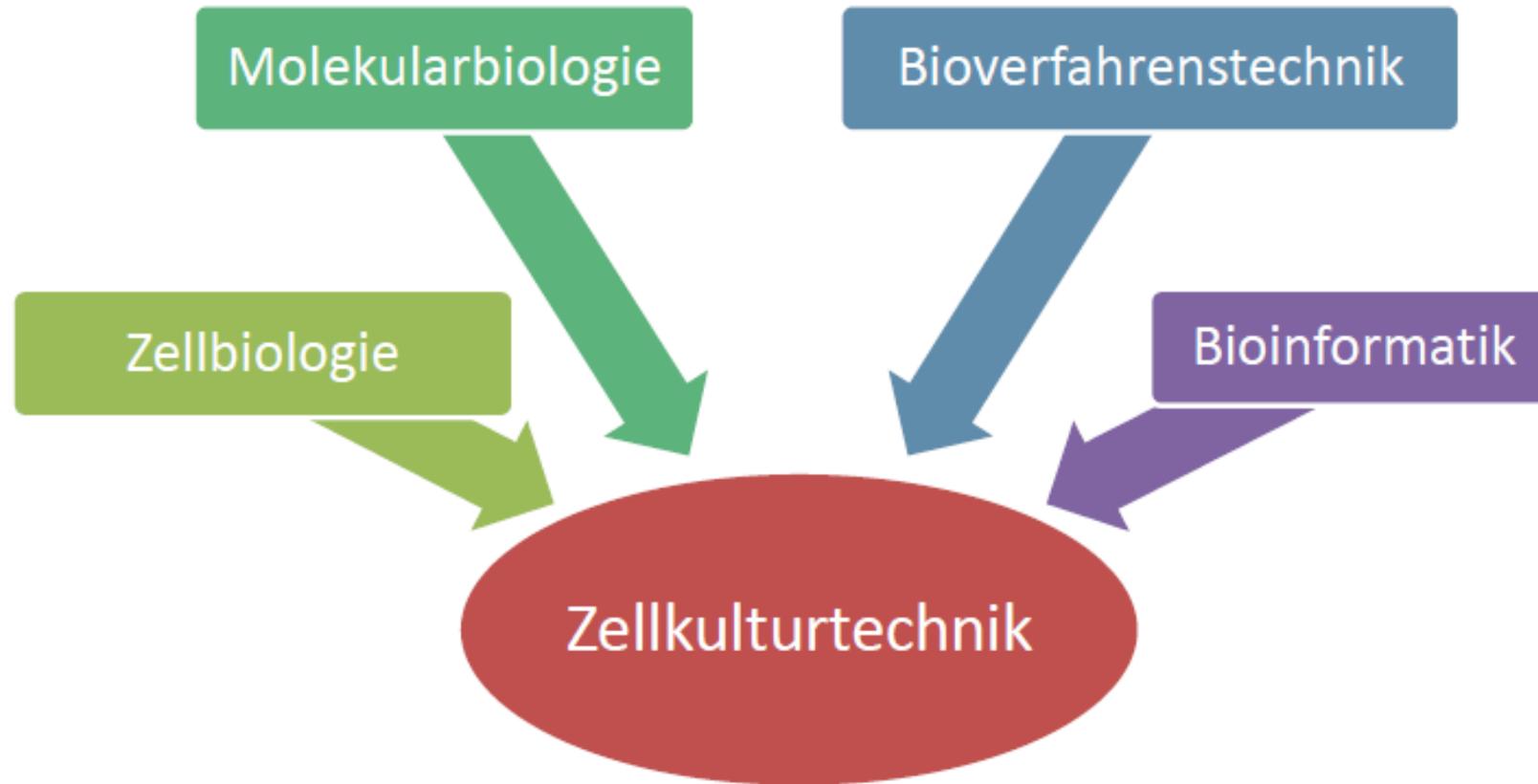
8. Stammzellen

9. Tissue-Engineering

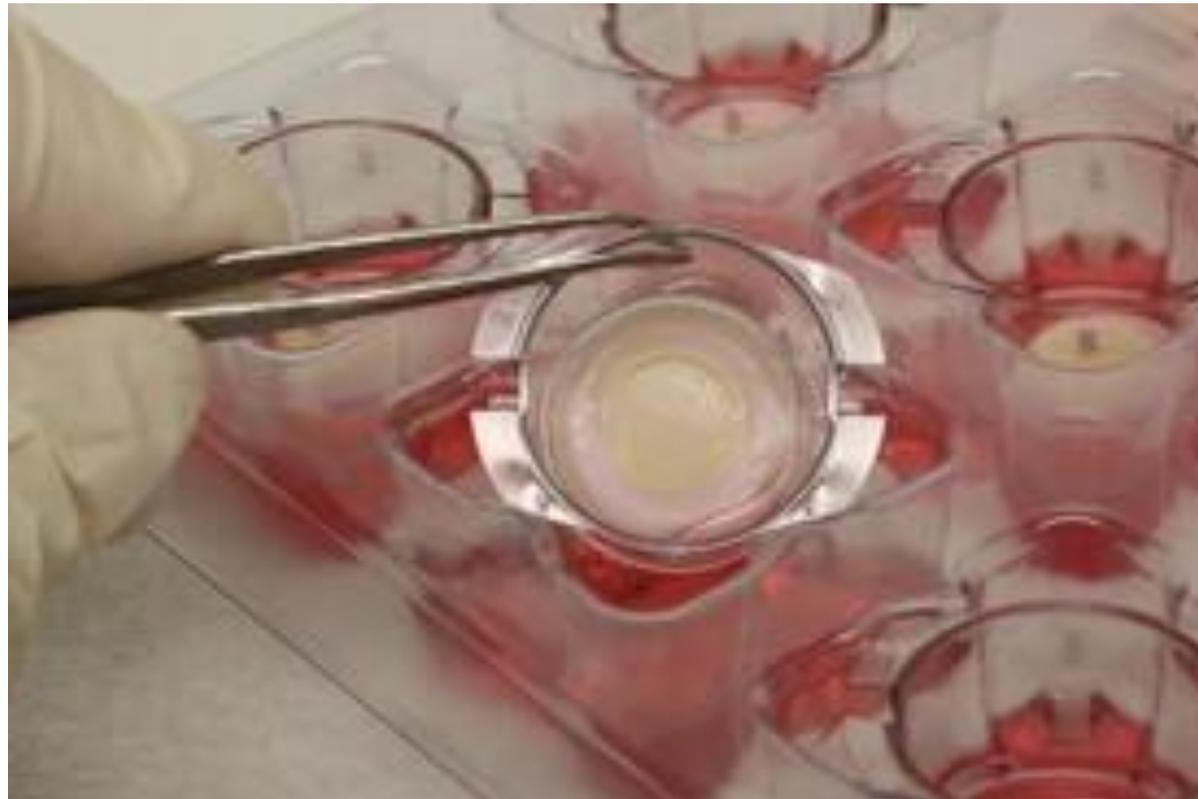
10. Mechanismen der Signaltransduktion

11. Einführung in die Immunologie und Antikörperproduktion





Einführung in die Zellkultur



Hautmodelle © Christian Zoschke

Auszug aus dem Modulhandbuch

Den Studierenden werden Grundkenntnisse in

molekularer und klassischer Zellbiologie und Zellkulturtechnik vermittelt.

- Die Vorlesung führt in die grundlegenden Aspekte der Zellbiologie ein.
- Diese sind insbesondere die Grundlagen der klassischen Zellbiologie,
 - wie die Zelle und Organellen, Zellmembran (Aufbau, Funktion),
 - Aufreinigung der Membranproteine/Micellenbildung,
 - Molekularen Mechanismen der Transportvorgängen vom Zellkern- ER-Golgi-Golgi-Organellen/Membran,
 - Zytoskelett, Zellzyklus, Apoptose- Nekrose und deren Nachweis, Mechanismen der Signaltransduktion,

Auszug aus dem Modulhandbuch

- Biomarker
- Einführung in die Immunologie und Antikörperproduktion.
- Die Zellkulturtechnik beschäftigt sich mit verschiedenen Zelllinien (Bsp. Charakterisierung- Primärzellen-Differenzierung- permanente Zellen - Aging- Stammzellen),
- die Medien (Auswahl- Zusammensetzung), sowie
- die Laborausstattung und verschiedene Arbeitstechniken (Passage, Zellzahlbestimmung, Wachstumskurve, Viabilitätstest,
- Kryokonservierung,
- Single cell technology,
- Tissue-engineering und
- Vermeidung von Kontaminationen

Zellkultur -Einführung

- **Definition:**

Eine Zellkultur ist die *in vitro* Aufrechterhaltung humaner, tierischer oder pflanzlicher Zellen in einem Nährmedium **außerhalb** des Organismus

- **Ziel:**

Die *in vitro* Modellierung der *in vivo* Vorgänge

- **Vorteil:**

genau kontrollierbare, wiederholbare Versuchungskonditionen sichern können

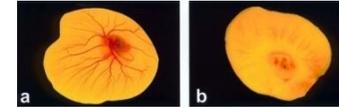
Historischer Überblick

- Erste Gewebekultur (Kultivierung erster neuronaler Gewebeexplanate von Froschembryonen) 1907 beschrieben (Harrison)

→ *in vivo* → *in vitro*

- Die Zellkulturtechnik ist vor allem durch Entwicklungen im Bereich Krebs/Tumorforschung und Produktion von Impfstoffen geprägt und „gepusht“ worden
- später war vor allem die gentechnische Manipulation (Rekombinationstechnik) die treibende Kraft
- darüber hinaus standen auch zunehmend *in vitro* Tests und Verständnis grundlegender Mechanismen (Wachstum, Apoptose, Differenzierung) im Vordergrund

Historischer Überblick



1885: Roux: die Medullar (Mark) – Scheibe eines Hühnerembryos für einige Tage in warmer Salzlösung zu erhalten

1900: Harrison: Gewebesteilchen aus dem Mark von Froschembryonen in Froschlymphe explaniert. Die Nervenzellen überlebten nicht nur einige Wochen, es sprossen auch Axone aus

Problem der damaligen Gewebekultivierung:

→ Kontamination durch Bakterien

1912: Carrel : Herzmuskelzellen aus einem Hühnerembryo in Langzeitkultur durch aseptisches Arbeiten (vor der Antibiotika Entdeckung ca.1940)

1945: Dulbecco: Isolation einzelner Zellen aus Gewebeverbänden mit Hilfe proteolytischen Enzyme

Historischer Überblick

1950's:

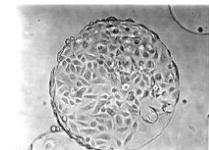
Zellkultur für Grundlagenforschung:

Gey, 1952:

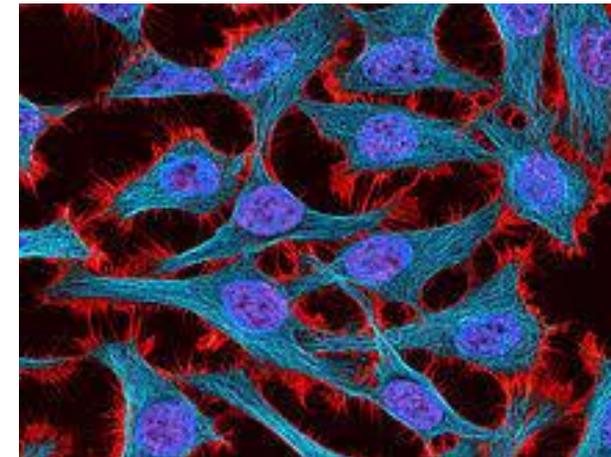
erste humane Zelllinie: **HeLa** (Henrietta Lacks): Cervix
Karzinom

- rasches Wachstum

- Kontaminationen in vielen Labors



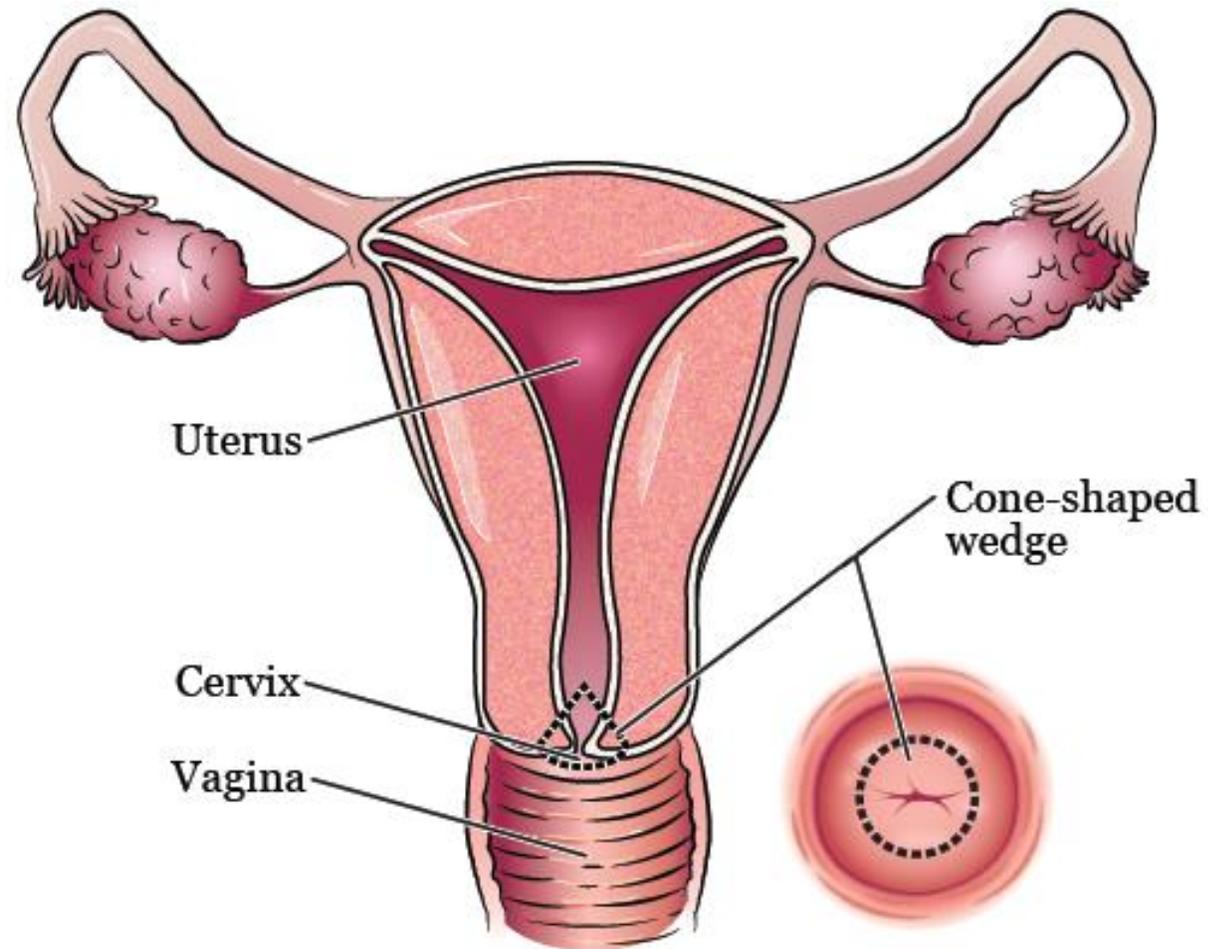
HeLa (Henrietta Lacks): Cervix Carzinom



menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs) und die ersten menschlichen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde. Die Zellen waren vom humanen Papillomvirus 18 (HPV18) befallen.

Der Gendefekt konnte inzwischen aufgeklärt werden: Die Zellen waren sowohl durch ein virales Protein (Onkogen E6 oder E7), das den p53-Tumorsuppressor inaktiviert, als auch durch eine Mutation im Humanen Leukozyten-Antigen (HLA) der Supergenfamilie auf Chromosom 6 zu Tumorzellen entartet.

Cervix



**HENRIETTA
LACKS:
THE WOMAN
WITH THE
IMMORTAL
CELLS**



Historischer Überblick

1950´s:

Zellkultur für Grundlagenforschung:

Gey, 1952:

erste humane Zelllinie: **HeLa** (Henrietta Lacks): Cervix Karzinom)

- rasches Wachstum
- Kontaminationen in vielen Labors

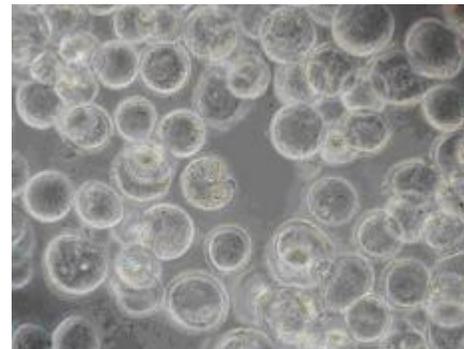
Eagle 1955:

erste chemisch definierte Medien (MEM)

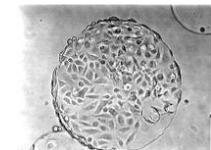
- Konsistenz, Reproduzierbarkeit (weltweit)
- Sterilisierung
- Reduzierte Kontamination

Grace, 1962:

entwickelt Methoden zur Kultivierung von Insekten Zelllinien



Sf-9 ist eine immortalisierte Insekten-Zelllinie aus Ovar-Zellen von *Spodoptera frugiperda*, einer Nachtfalterart, die zur Familie der Eulenfalter (Noctuidae) und zur Ordnung der Schmetterlinge (Lepidoptera) zählt. Diese wird in der Biotechnologie zur Produktion von rekombinanten Proteinen verwendet.

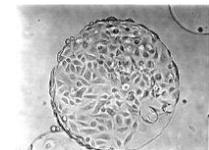


Historischer Überblick

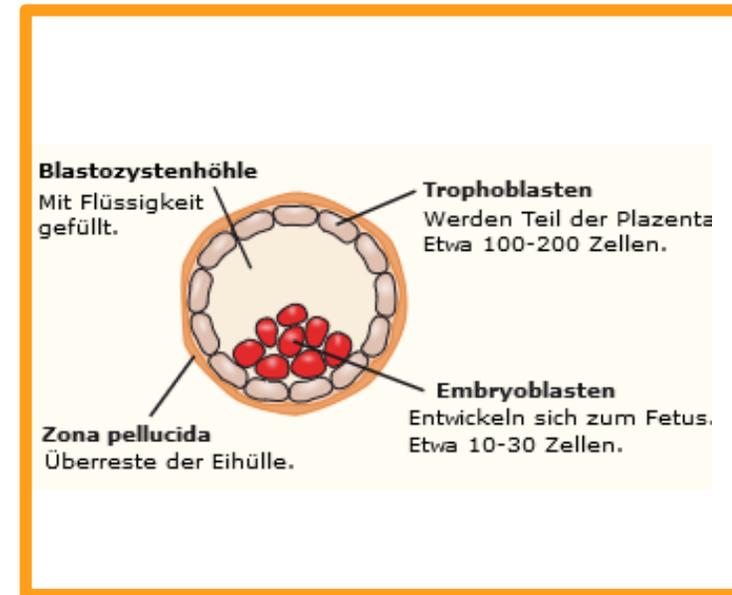
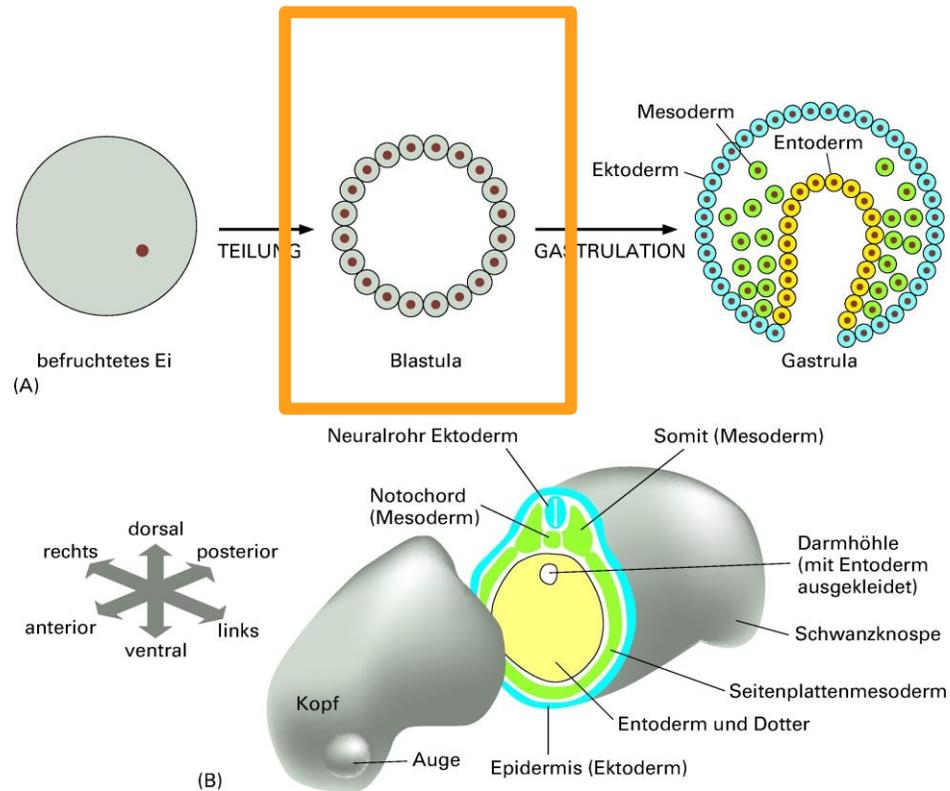
Graham, van der Eb 1973: erste Transfektionen an kultivierten Zellen

Köhler und Milstein, 1975: erste Zellfusion (Hybridomatechnik) → monokl. Ab

Martin und Evans, 1981: erste embryonale Maus-Stammzellen aus der Blastozyste



Embryonalentwicklung

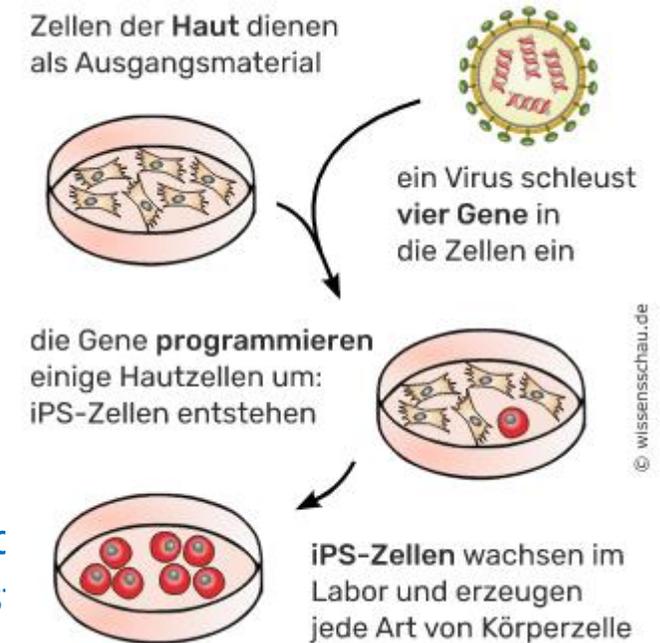


Historischer Überblick

- Graham, van der Eb 1973: erste Transfektionen an kultivierten Zellen
- Köhler und Milstein, 1975: erste Zellfusion (Hybridomatechnik) → monokl. Ab
- Martin und Evans, 1981: erste embryonale Maus-Stammzellen aus der Blastozyste
- Thomson et al., 1998:
Ab 2000:
(2006-2012)

Japaner Shinya Yamanaka

Bei seinen ersten Versuchen benutzte Yamanaka ein verändertes Virus, um die vier Gene – auch Yamanaka-Faktoren genannt – in Gewebezellen zu transportieren. Doch dieses Virus konnte Krebs auslösen und erzeugte in den ersten Tierversuchen oftmals Tumore. Heute verfügen Forscher über zahlreiche andere Möglichkeiten, um iPS-Zellen zu erzeugen – das Krebsrisiko ist nun stark vermindert.



Wozu werden Zellkulturen gebraucht?

- Zur Nachbildung und Untersuchung der *in vivo* Verhältnisse
- Klärung der Fragen:
 - wie wachsen Zellen (unter welchen Bedingungen)
 - wann und warum hören sie damit auf
 - was benötigen sie zum Wachstum
 - wie und wodurch tritt der Zelltod ein
 - Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge
- Heute vor allem in den Bereichen der
 - Tumorforschung und
 - *in vitro* Tests sowie für
 - gentechnische Veränderung
 - Produktion von rekombinanten Proteinen

Wozu werden Zellkulturen gebraucht?

Grundlagenforschung:

- Physiologie der Zellen: wie funktioniert eine gesunde Zelle?

Medizin:

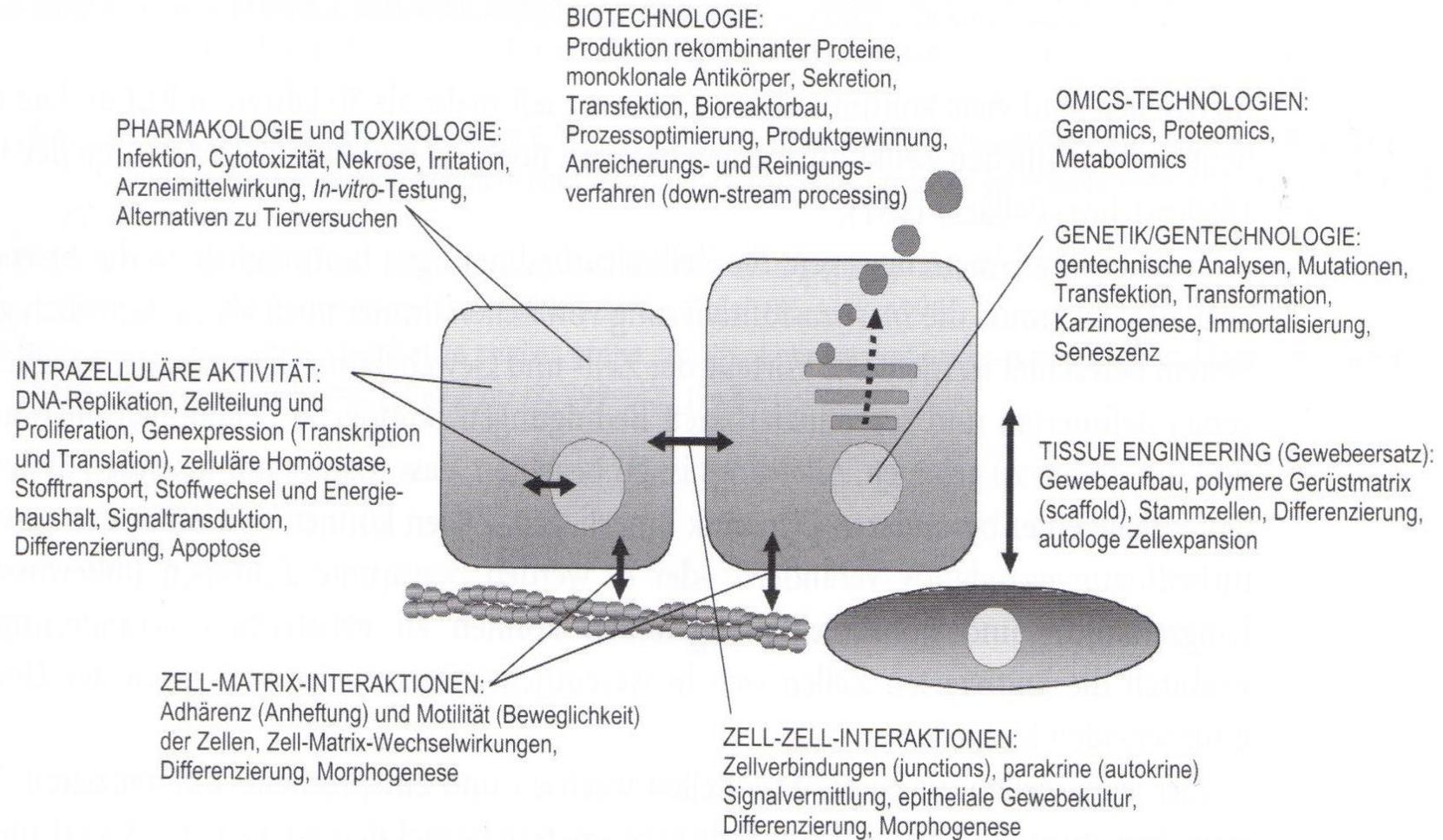
- Diagnostik
- Tissue engineering (Haut, Knochen, Blutgefäße, Nerven)

Toxikologie:

- Zytotoxizitätstests
- Substanzprüfung
- Genotoxizitätstests
- Reproduktionstoxikologie

Industrie: Produktion pharmazeutischer Proteine

- Monoklonale Antikörper
- Hormone (EPO, FSH=Follikel
stimulierendes Hormon, Sexualhormon)
- Enzyme (α -Glucosidase)
- Impfungen (Polio)

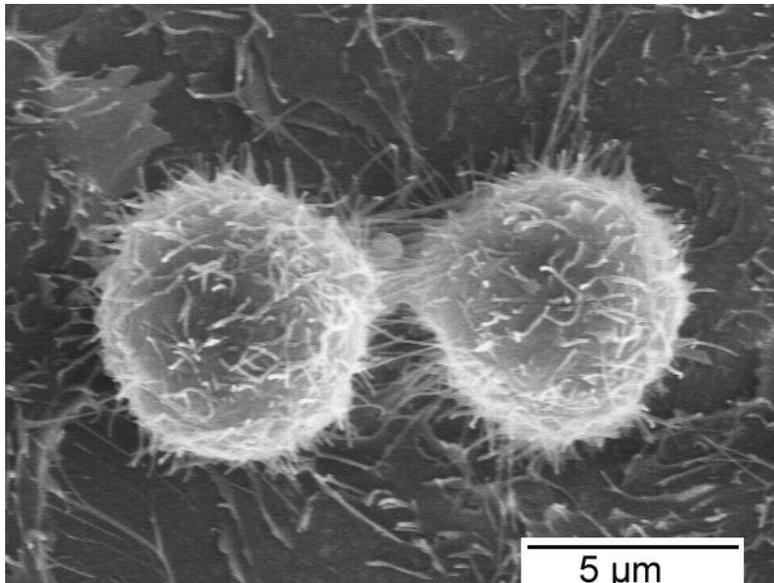


Tierversuche

versus



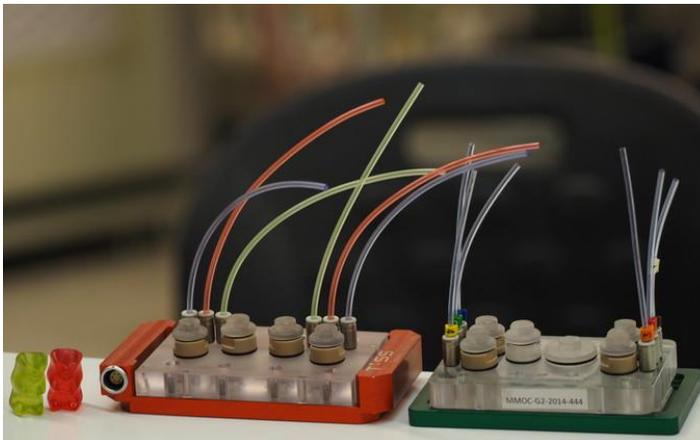
Zellkultur





Zellkultur, als Alternativen zum Tierversuch

- Für die Forschung ist das Tier als Modellorganismus bislang jedoch häufig unverzichtbar
- So liefern Tierversuche wichtige Informationen darüber, ob und wie Medikamente wirken und ob einzelne Chemikalien für den Menschen giftig sind.
- Daraus ergibt sich ein Dilemma – zwischen dem Sicherheitsbedürfnis und Erkenntnistreben des Menschen auf der einen und dem Schutz des Tieres auf der anderen Seite.



Human on a Chip - auf diesem kleinen Chip wird simuliert, wie Arznei im menschlichen Organismus wirken würde. © TissUse GmbH



Alternativen zum Tierversuch

Tierversuchen sind in Deutschland rechtlich enge Grenzen gesetzt. Sie müssen genehmigt werden und gelten nur dann als ethisch vertretbar, wenn sie auf das unerlässliche Maß beschränkt bleiben.

So sind Pharmaunternehmen bei der Wirkstoffprüfung dazu verpflichtet, Tierversuche zu vermeiden, falls geeignete Alternativmethoden zur Verfügung stehen.

"3R"-Konzept

- Tierversuche durch alternative Methoden zu ersetzen (*Replacement*, Ersatz).
- Wenn dies nicht möglich ist, soll die Zahl der benötigten Tiere zumindest auf ein Minimum beschränkt werden (*Reduction*, Verringerung).
- Zudem geht es darum, das Leiden der eingesetzten Tiere zu verringern und aus dem einzelnen Tierversuch so viele Informationen wie möglich zu gewinnen (*Refinement*, Verfeinerung).

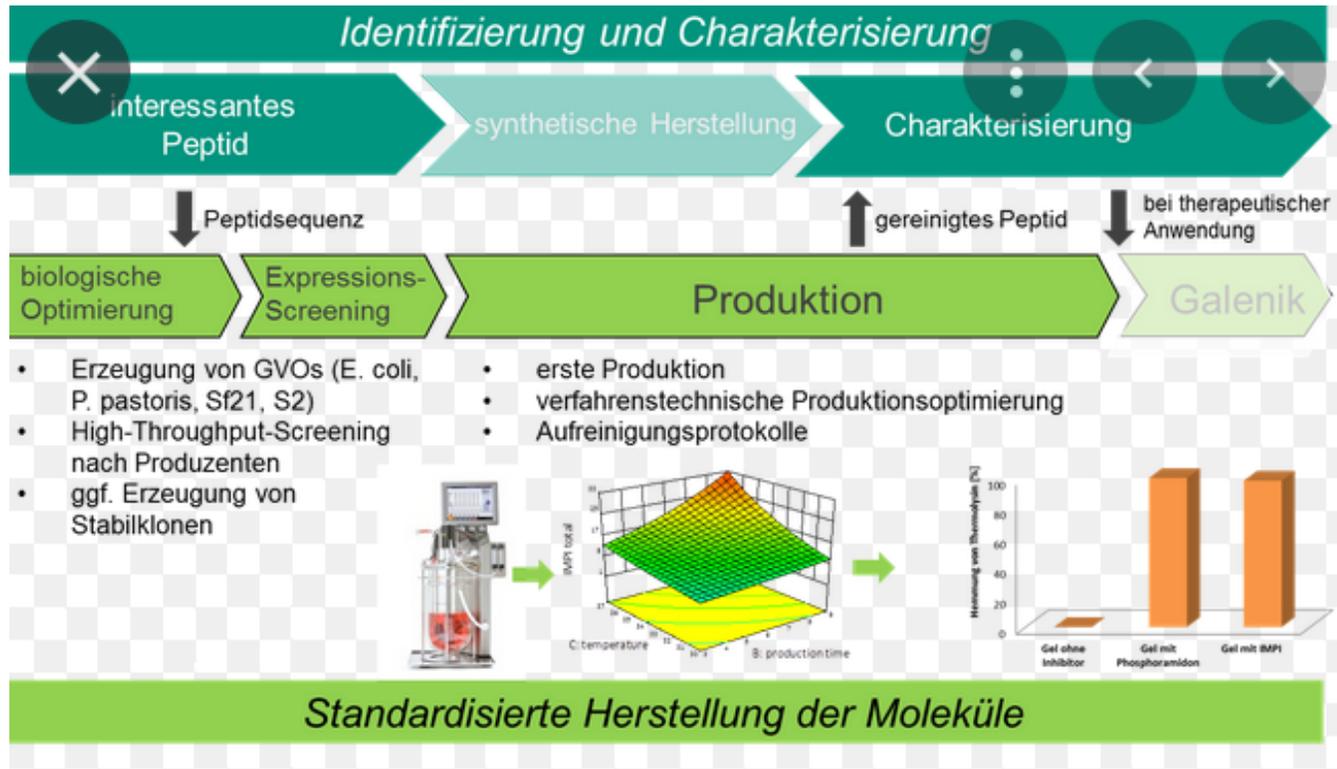
Zellkultur, als Alternativen zum Tierversuch

- Wenige (primäre Zellkulturen) bis keine Tiere werden getötet oder einer toxischen Noxe ausgesetzt
- für spezifische Fragestellungen: Erforschung intrazellulärer Prozesse (Signaling bei der Krebsentstehung, Fremdstoff-Metabolismus)
- effizientes Screening einer großen Anzahl von Testsubstanzen
- Verringerung der bei Tierversuchen benötigten Tiere (Ergänzungsmodell/ Vorversuch zum Tierversuch)
- schnell (rasche Gewinnung großer Datenmengen), billig

Warum tierische Zellen/humane Zellen und nicht Mikroorganismen?

- Mikroorganismen wie z.B. Bakterien können keine Glycosylierung vornehmen, dies ist aber gerade bei der Produktion von pharmazeutischen Proteinen wichtig
- Hefen können posttranslationale Modifikationen (PTM) durchführen, die Glycosylierungsmuster sind allerdings nicht human-kompatibel
- für Medikamenten-Screening werden bevorzugt humane (primäre) Zellen eingesetzt (Übertragbarkeit der Ergebnisse)
- Insektenzellen sind serumfrei und werden für die Produktion rekombinanter Proteine benützt – alle PTMs sind vorhanden, einzig die N- Glycosylierung ist unterschiedlich im Vergleich zu Säugetieren: Sie ist deutlich homogener und simpler, was auf die Aktivität meist nur geringen Einfluss hat, gleichzeitig aber für die Strukturbiologie von Vorteil ist, da sich leichter Proteinkristalle formen.

Prozessentwicklung/-kontrolle, Produktion von Proteinen und Viruspartikeln



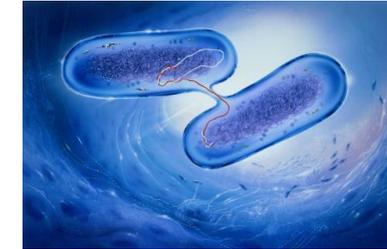
Galenik - Definition: Als Galenik bezeichnet man die Wissenschaft von der Zubereitung und Formgebung von Arzneimitteln aus Wirk- und Hilfsstoffen einschließlich ihrer technologischen Prüfung.

Warum tierische Zellen/humane Zellen und nicht Mikroorganismen?

1970´s: rekombinante DNA Technologie: Plasmide -*E.coli*:

Massenproduktion von Proteinen:

- rasches Wachstum
- geringe Kontamination



Probleme:

- keine posttranslationalen Modifikationen möglich (Glykosylierung, Acetylierung, Carboxylierung.....)
- Faltung
- Speicherung der Proteine in „Inclusion bodies“, keine Sekretion
- limitierte DNA Größe

→ Säugierzellen und Hefezellen für große, komplexe Proteine

Vorteile der Zell-/Gewebekultur

TABLE 1.1. Advantages of Tissue Culture

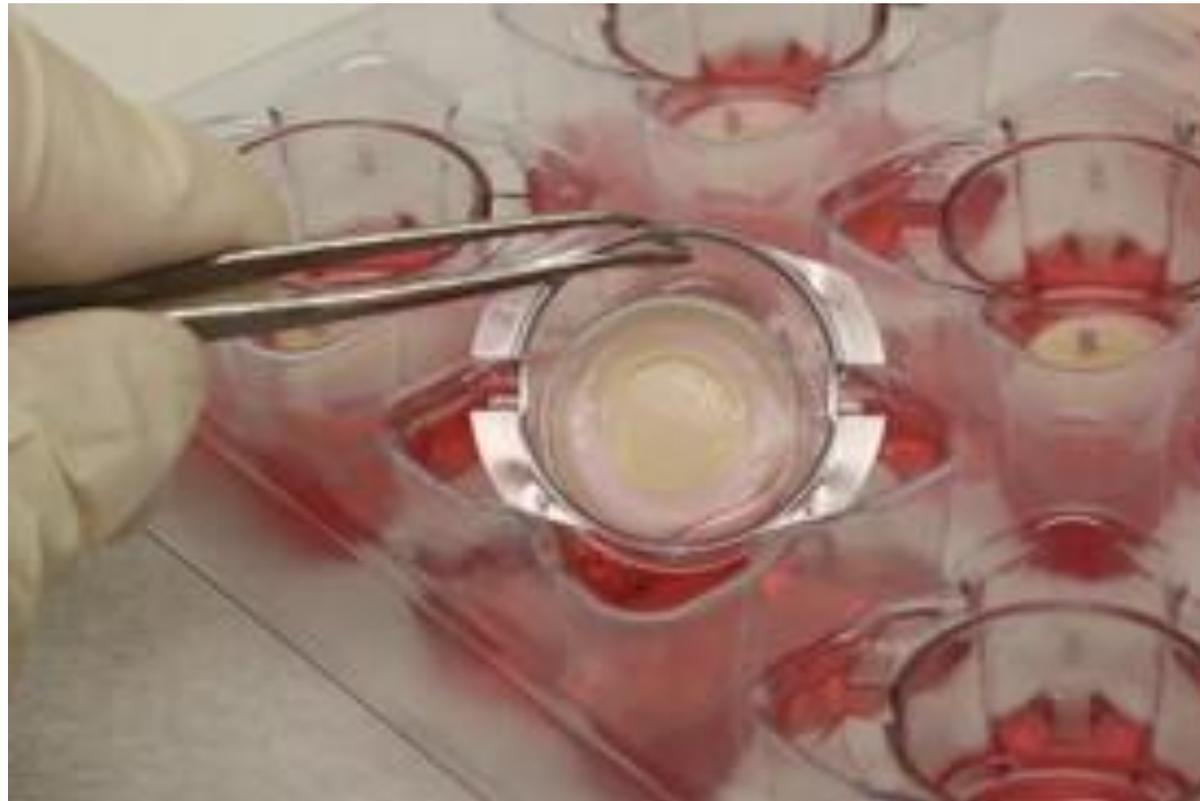
Category	Advantages
Physico-chemical environment	Control of pH, temperature, osmolarity, dissolved gases
Physiological conditions	Control of hormone and nutrient concentrations
Microenvironment	Regulation of matrix, cell-cell interaction, gaseous diffusion
Cell line homogeneity	Availability of selective media, cloning
Characterization	Cytology and immunostaining are easily performed
Preservation	Can be stored in liquid nitrogen
Validation & accreditation	Origin, history, purity can be recorded
Replicates and variability	Quantitation is easy
Reagent saving	Reduced volumes, direct access, lower cost
Control of C × T	Ability to define dose, concentration, and time
Mechanization	Available with microtitration and robotics
Reduction of animal use	Cytotoxicity and screening of pharmaceuticals, cosmetics, etc.

Einschränkungen der Zell-/Gewebekultur

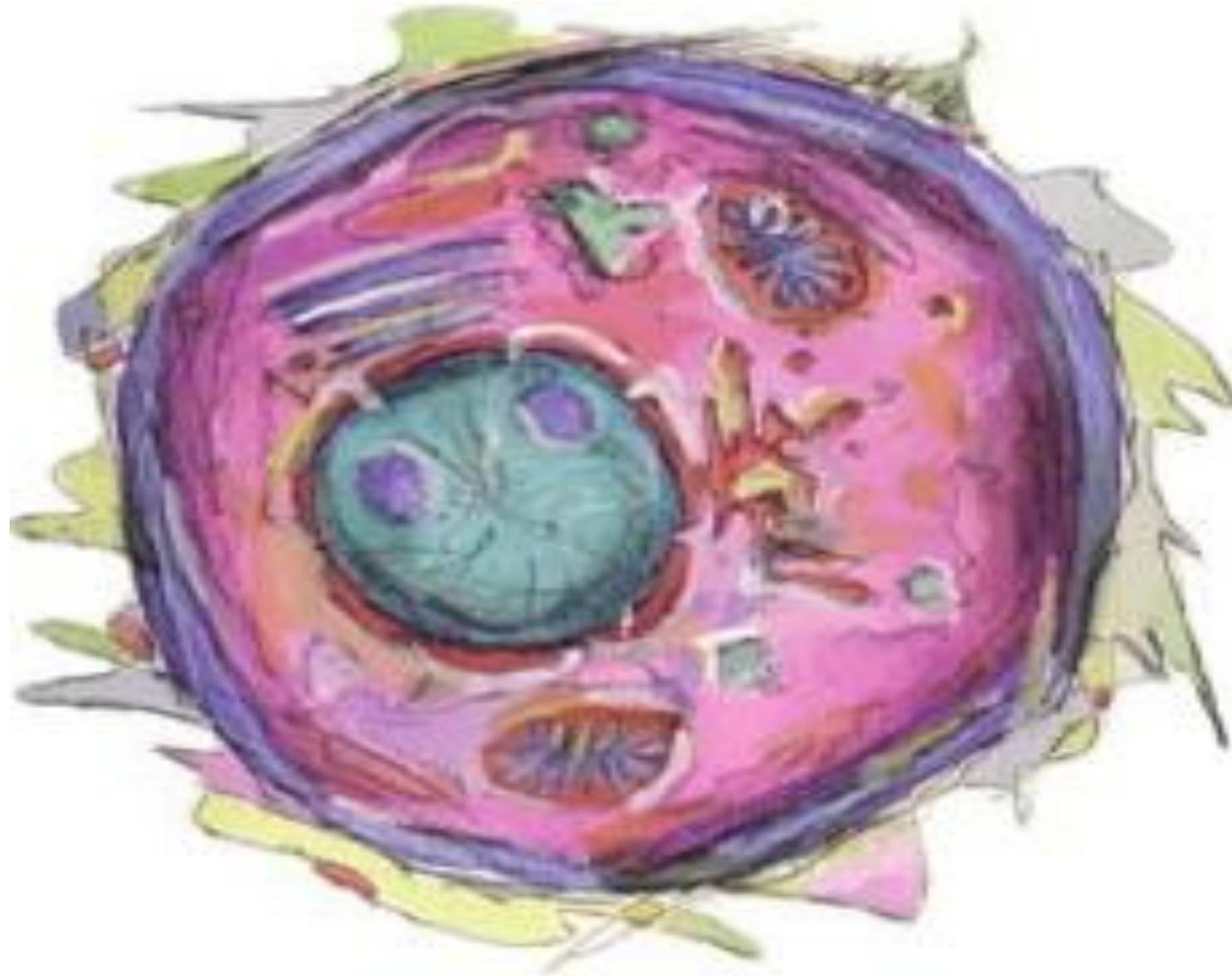
TABLE 1.2. Limitations of Tissue Culture

Category	Examples
Necessary expertise	Handling Chemical contamination Microbial contamination Cross contamination
Environmental control	Workplace Incubation, pH control Containment and disposal of biohazards
Quantity and cost	Capital equipment Consumables Medium, serum, plastics
Genetic instability Phenotypic instability	Heterogeneity, variability Dedifferentiation Adaptation Selection
Identification of cell type	Expression of markers Histology, cytology Geometry and microenvironment

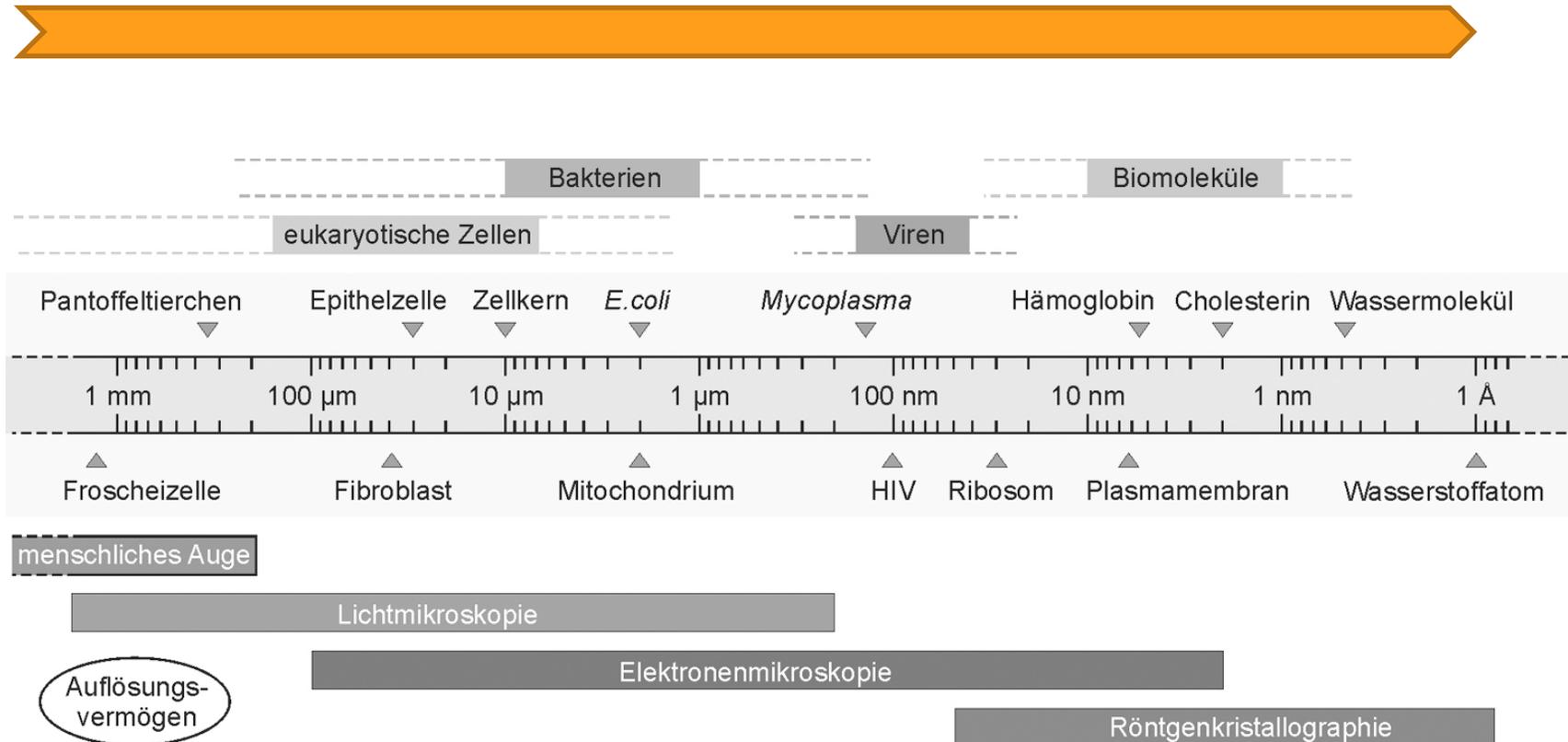
Zellbiologie – Physiologie der Zelle



Hautmodelle © Christian Zoschke



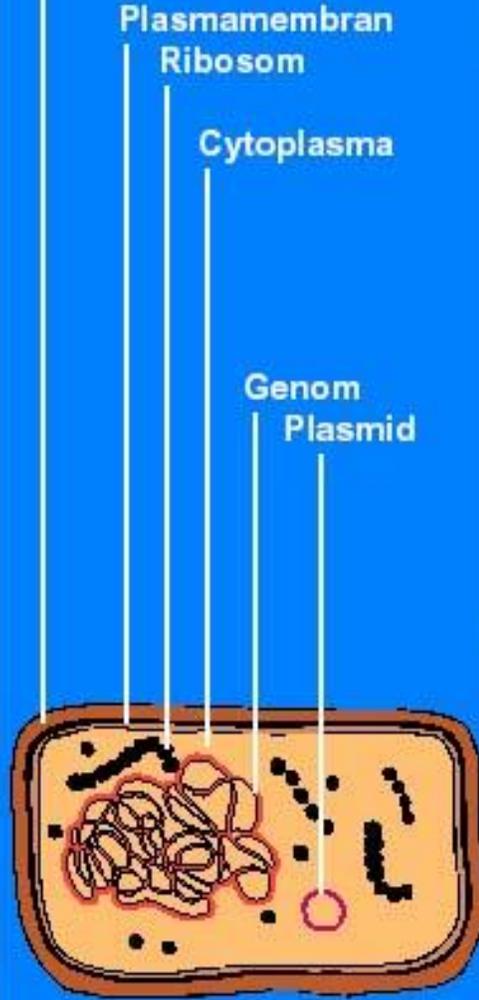
Größenverhältnisse



Aus Müller-Esterl, *Biochemie*, © 2004 Elsevier GmbH

Bakterienzelle

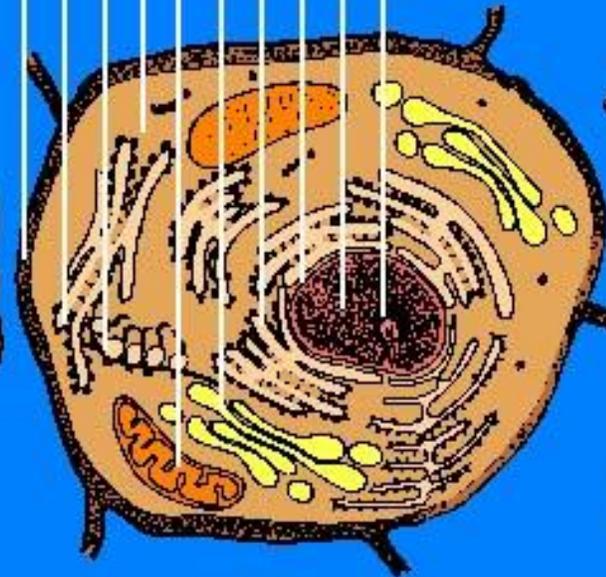
Zellwand



1 μm

Tierzelle

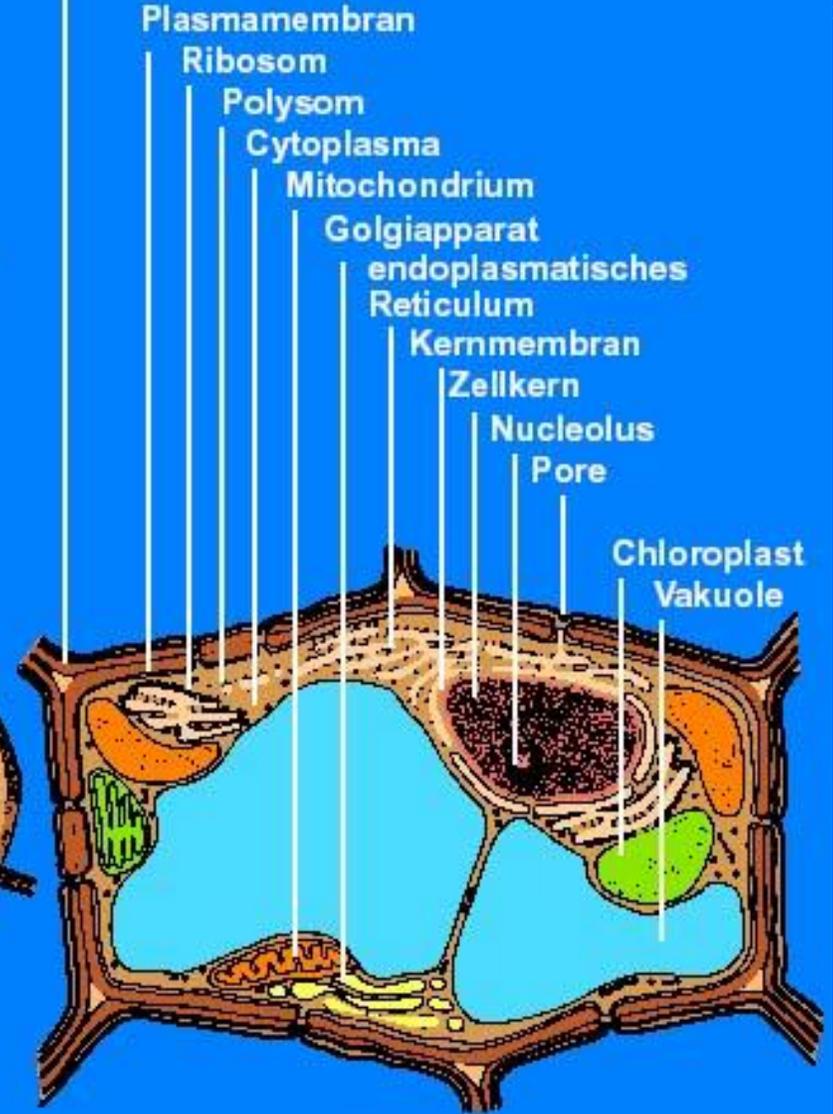
Plasmamembran
Ribosom
Polysom
Cytoplasma
Mitochondrium
Golgiapparat
endoplasmatisches Reticulum
Kernmembran
Zellkern
Nucleolus



10 μm

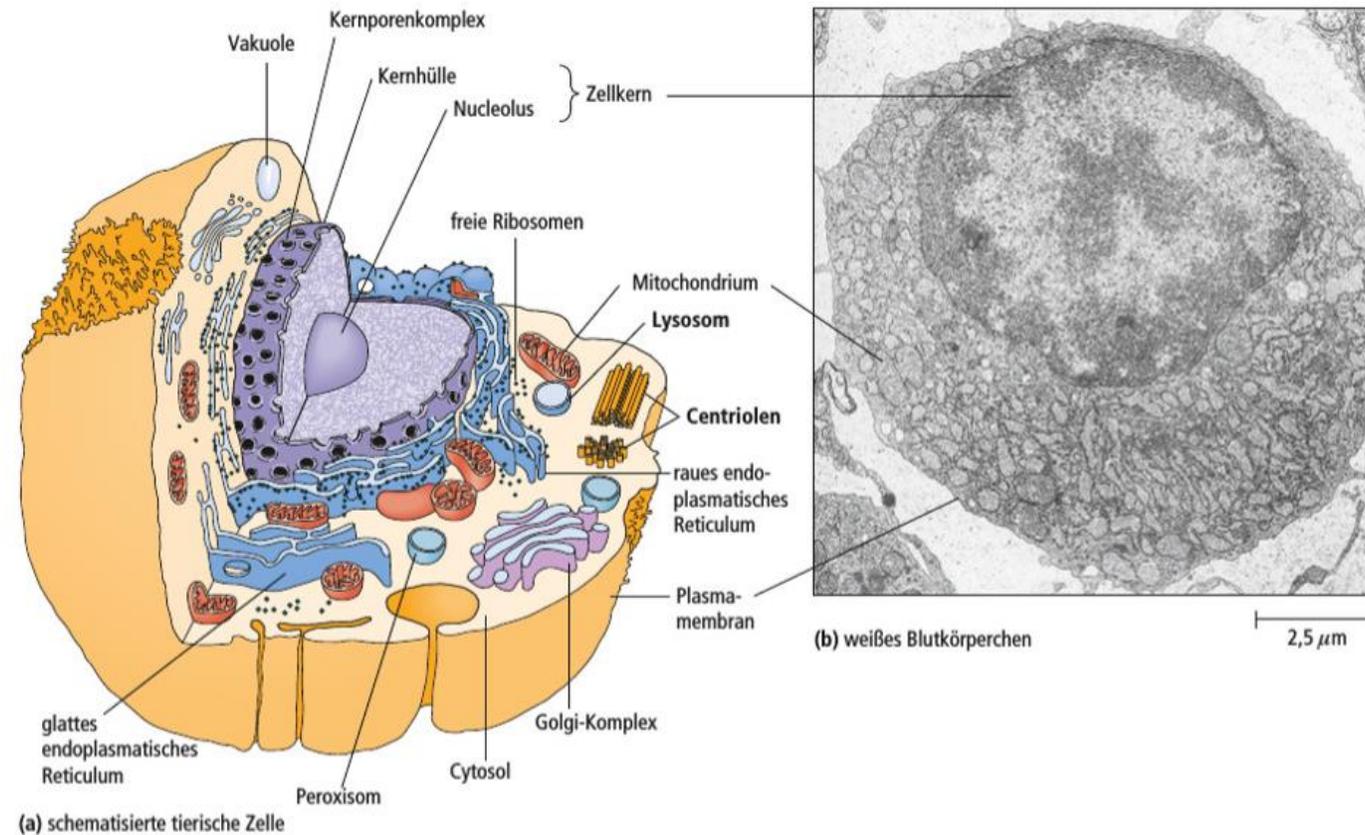
Pflanzenzelle

Zellwand

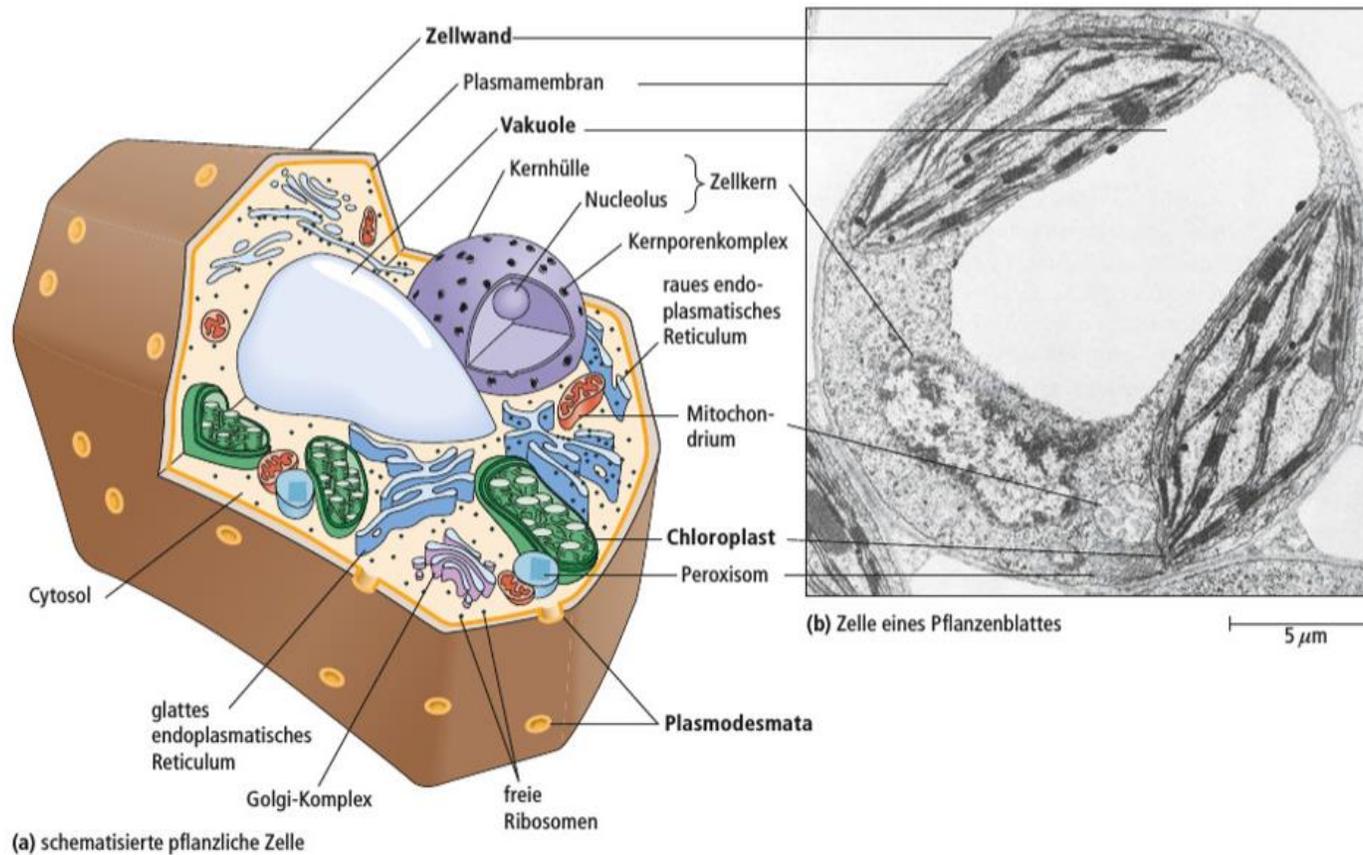


10 μm

Schematisch tierische Zelle



Schematisch pflanzliche Zelle



Der multizelluläre Organismus



Der Mensch besteht aus einer Vielzahl **unterschiedlichster Zellen**, die für ihre jeweiligen Aufgaben spezialisiert sind.

Die meisten dieser Zelltypen können unter geeigneten Bedingungen **auch außerhalb** des Organismus kultiviert werden.

➔ Der Organismus kann als „Staatsystem“ dieser Zellen angesehen werden.

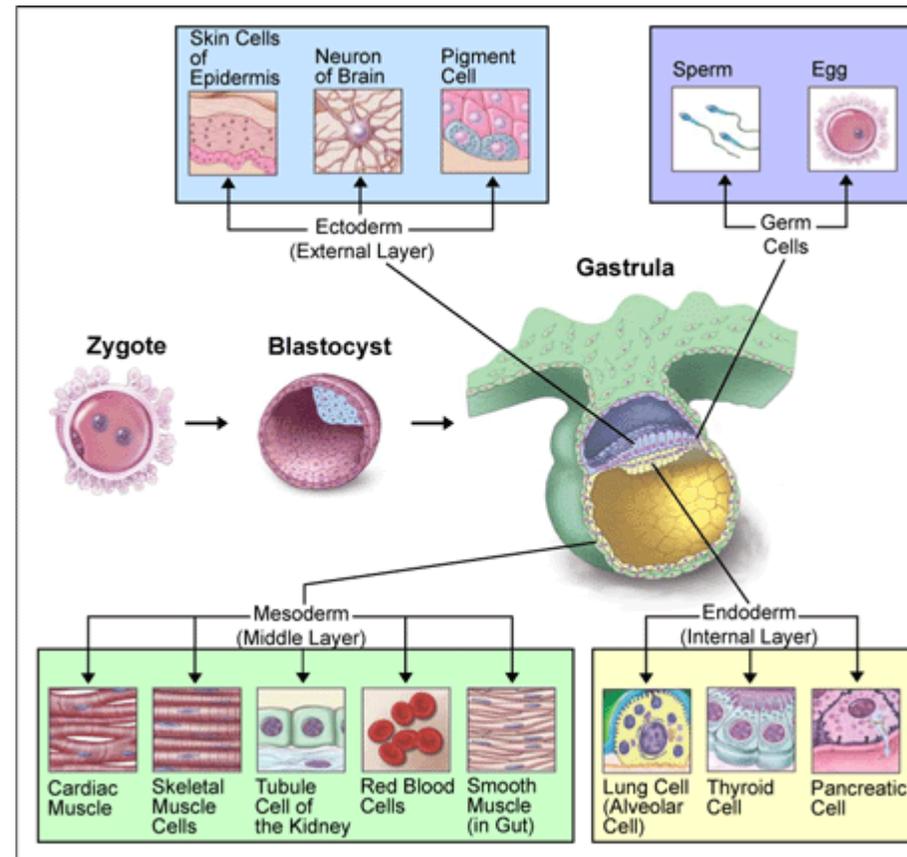
Entstehung der verschiedenen Zelltypen

→ über 200 verschiedene Zelltypen im menschlichen Körper.



bauen zusammen eine Vielzahl verschiedener Gewebstypen auf:

- ✓ Epithelien
- ✓ Bindegewebe
- ✓ Muskeln
- ✓ Nervengewebe



Embryologie

Die meisten Gewebe enthalten eine Mischung von Zelltypen.

Zelltypen 1: Bindegewebe, Fett- und Knochenzellen

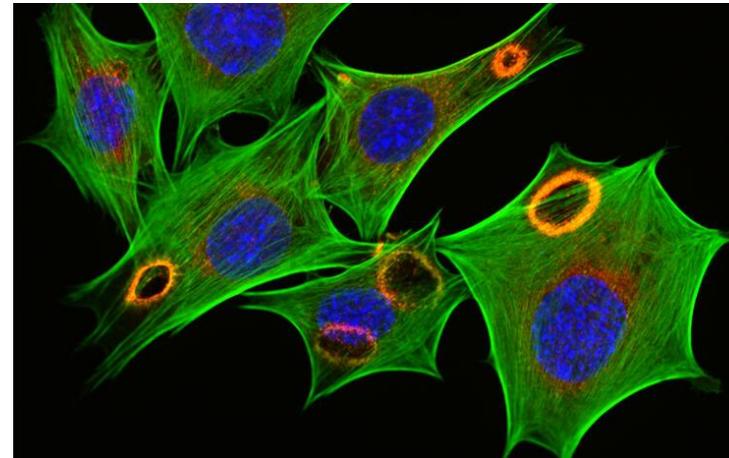
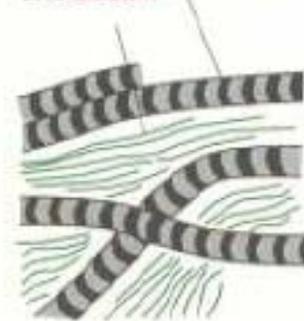
Fibroblasten

Die Zwischenräume im Körper zwischen Organen und Geweben sind ausgefüllt mit Bindegewebe, das hauptsächlich aus zähen Proteinfasern in einem sie umgebenden Polysaccharidgel besteht. Diese **extrazelluläre Matrix** wird vor allem von Fibroblasten abgeschieden.



Fibroblasten im losen Bindegewebsverband

Zwei Haupttypen extrazelluläre Proteinfasern sind **Kollagen** und **Elastin**.



Fibroblasten, spezifische Zellen des Bindegewebes, die mit Wachstumsfaktoren stimuliert wurden. Eine Fluoreszenzfärbung zeigt das Aktinzytoskelett (grün), den Zellkern (blau) und das Protein Cortactin (rot). Cortactin lokalisiert an der dorsalen (oberen) Zellmembran in ringförmigen vertikalen Wellen, die sich wie ein Feuer ausbreiten und das Aktinzytoskelett innerhalb weniger Minuten umbauen.

© Fabian Lukas (AG Tanja Maritzen, FMP)

Zelltypen 1: Bindegewebe, Fett- und Knochenzellen

Knochen wird von Zellen aufgebaut, die man **Osteoblasten** nennt. Sie sezernieren eine extrazelluläre Matrix, in die später Calciumphosphat-Kristalle eingelagert werden.

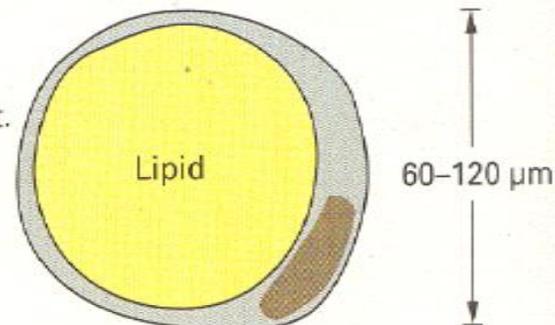
Calciumsalze werden in die extrazelluläre Matrix eingelagert.



Osteoblasten, die über Zellfortsätze zusammenhängen

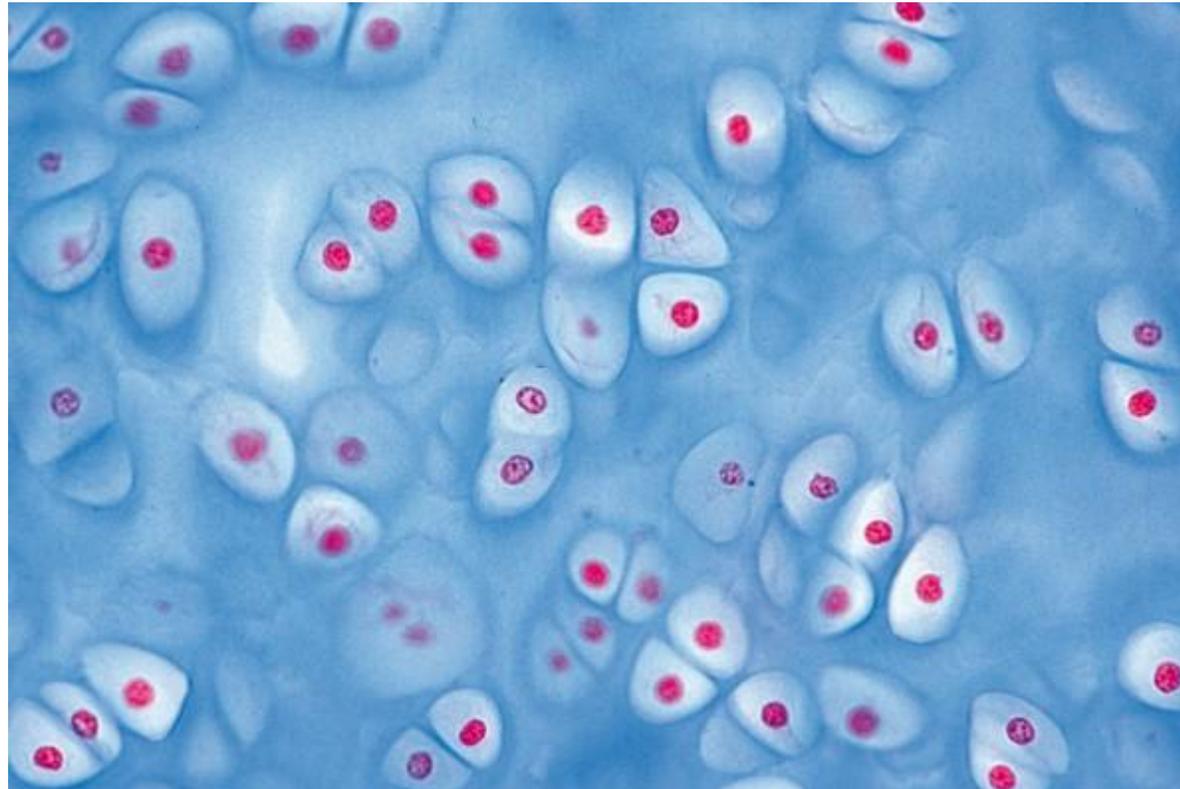
extrazelluläre Matrix

Fettzellen sind mit die größten Zellen im Körper. Sie produzieren und speichern Fett. Zellkern und Cytoplasma werden von dem eingelagerten Fett ganz an den Rand der Zelle gedrückt.



Knochen: Osteoblasten, Osteoklasten, Fettgewebe: Adipozyten

Zelltypen 1: Knorpelzellen (Chondrozyten)



"Hyaliner Knorpel v. Säugetier, quer. Knorpelzellen"

<https://lms.de/detail/index/sArticle/6381>

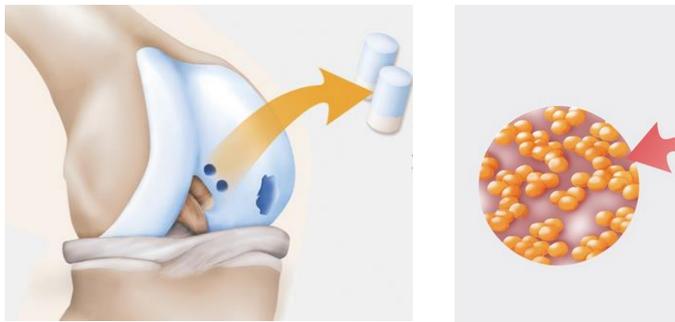
Knorpeldefekte: Stand der Technik

1. Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT)
2. Autologe matrixinduzierte Chondrogenese (AMIC)
3. Matrixgestützte autologe Chondrozyten Transplantation (MACT)

Knorpeldefekte: Stand der Technik

1. Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT):

- erste Anwendung 1994 in Schweden:
- Bei diesem Verfahren wird arthroskopisch aus einem nichttragenden Gelenkbereich ca. 200 mg vollschichtiger Knorpel entnommen.
- Nach steriler Anzucht einer ausreichenden Zellzahl *in vitro*
- werden die Chondrocyten in die operativ vorbereitete Defektkammer unter einen zuvor aufgenähten Periostlappen injiziert



Phänotypisch stabile Chondrocyten können nach ihrer Retransplantation *in vivo* überleben und einen qualitativ hochwertigen Knorpel regenerieren.

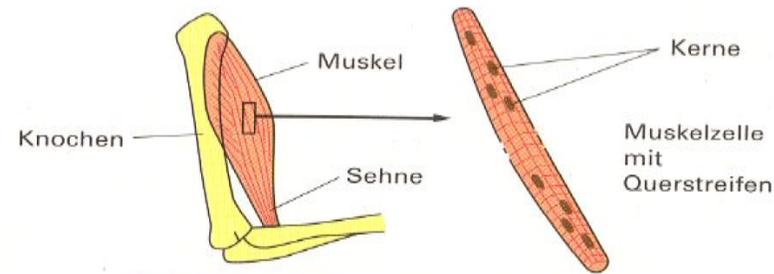
Das entstehende Knorpelgewebe zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu hyalinem Gelenkknorpel und wird daher in der Fachliteratur auch als hyalinartig oder „hyaline-like“ bezeichnet. Im Gegensatz zu Faserknorpel kann es bis zu 90 % und mehr der Festigkeit des gesunden hyalinen Knorpels erreichen

Zelltypen 2: Muskelzellen

MUSKEL

Muskelzellen erzeugen durch Kontraktion mechanische Kraft.
Bei Wirbeltieren gibt es drei Haupttypen:

Skelettmuskel – Er bewegt Gelenke durch schnelle und kräftige Kontraktion. Jeder Muskel ist ein Bündel von Muskelfasern, von denen wiederum jede eine enorm große vielkernige Zelle ist.



Glatter Muskel – Dieser findet sich im Verdauungstrakt, in Blase, Arterien und Venen, und ist zusammengesetzt aus dünnen, langen (nicht gestreiften) Zellen mit je einem einzigen Kern.

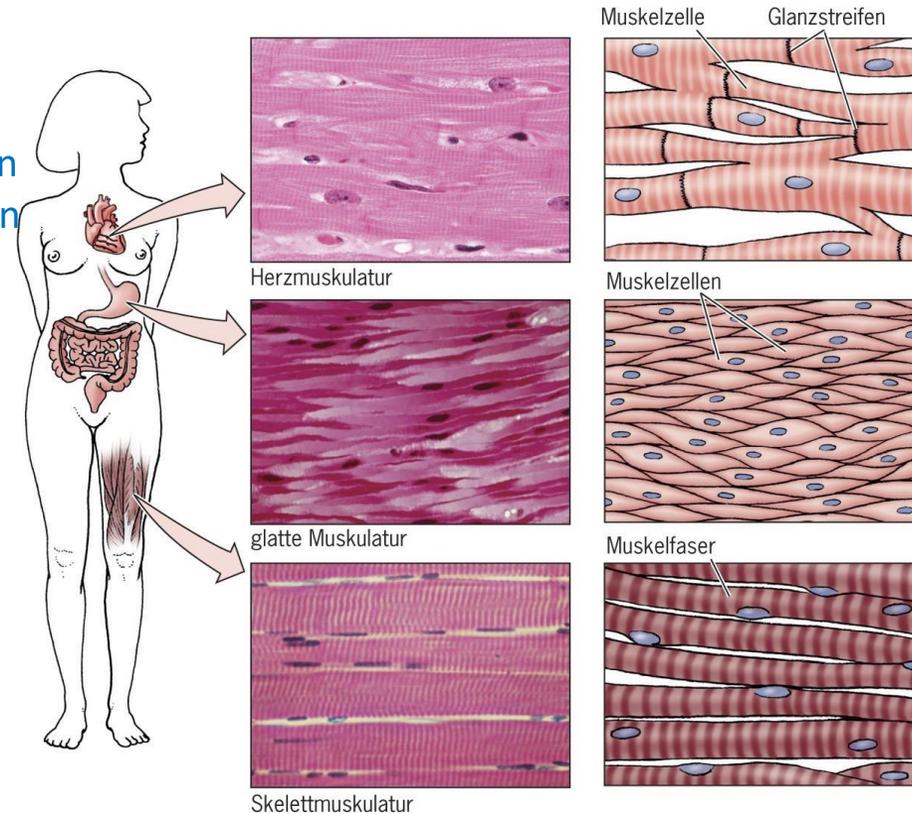


Herzmuskel – Er nimmt eine Mittelstellung zwischen glattem und Skelett-Muskel ein und bewirkt den Herzschlag. Benachbarte Zellen sind durch elektrisch leitende Verbindungen gekoppelt, so daß die Zellen sich synchron kontrahieren.

Zelltypen 2:

Die drei Muskeltypen in der Übersicht

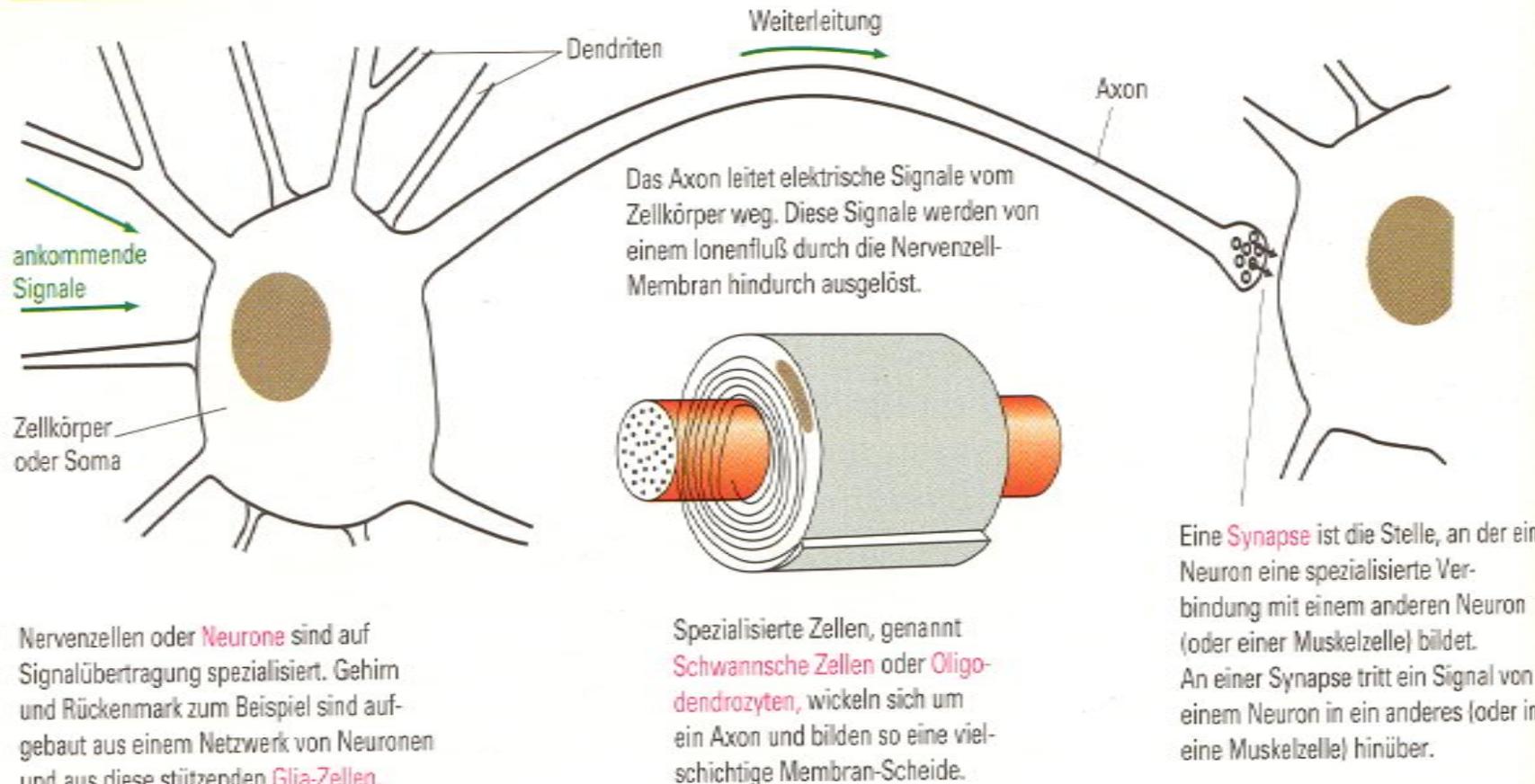
- Beim Herzmuskel (oben) verzweigen sich die Zellen und erzeugen ein Geflecht, das Zug- oder Bruchbelastungen standhält; Glanzstreifen sorgen für eine starke mechanische Verbindung zwischen den Zellen.
- Beim glatten Muskel (Mitte) sind die Zellen gewöhnlich in Schichten angeordnet.
- Der Skelettmuskel (unten) besteht aus Muskelfasern, die im Lichtmikroskop deutlich quergestreift erscheinen; sie sind sehr lang und dünn und stellen ein vielkerniges, durch Verschmelzen zahlreicher Muskelzellen entstandenes Syncytium dar. (Linke Spalte: lichtmikroskopische Aufnahmen).



<https://bewegungsapparatjilainya.wordpress.com/das-muskelgewebe/>

Zelltypen 3: Neurone, Glia und Oligodendrozyten

NERVENGEWEBE



Nervenzellen oder **Neurone** sind auf Signalübertragung spezialisiert. Gehirn und Rückenmark zum Beispiel sind aufgebaut aus einem Netzwerk von Neuronen und aus diese stützenden **Glia-Zellen**.

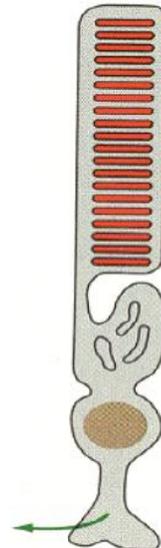
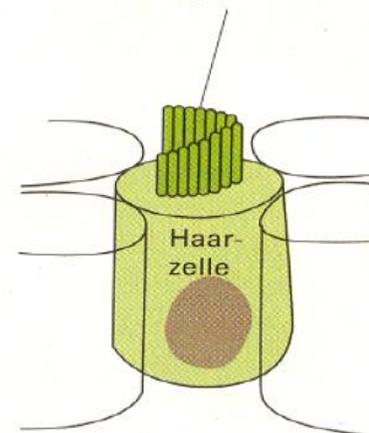
Spezialisierte Zellen, genannt **Schwannsche Zellen** oder **Oligodendrozyten**, wickeln sich um ein Axon und bilden so eine vielschichtige Membran-Scheide.

Zelltypen 4: Sinneszellen

SINNESZELLEN

Mit die komplexesten Zellen im Wirbeltierkörper sind die, die äußere Reize wahrnehmen. **Haarzellen** des inneren Ohres sind primäre Schalldetektoren. Als abgewandelte Epithelzellen tragen sie spezielle Mikrovilli (Stereocilien) auf ihrer Oberfläche. Werden diese durch Schallschwingungen bewegt, so entsteht ein Signal, das zum Gehirn fortgeleitet wird.

Stereocilien sind sehr steif, weil sie mit Actin-Filamenten vollgepackt sind.



Stäbchen in der Retina des Auges sind Nervenzellen, die darauf spezialisiert sind, auf Licht zu reagieren. Die lichtempfindliche Region enthält viele Membranscheibchen, in deren Membranen das lichtempfindliche Protein Rhodopsin eingelagert ist. Licht erzeugt ein elektrisches Signal, das zu anderen Nervenzellen weitergeleitet wird.

Zelltypen 5: Epithelzellen

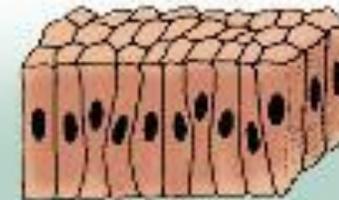
Arten von Epithel



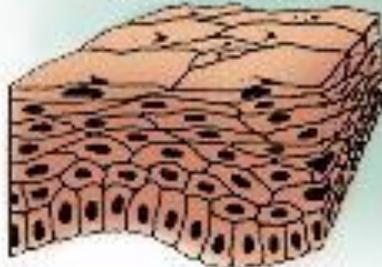
Einschichtiges
Plattenepithel



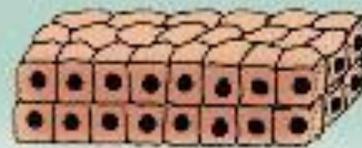
Kubisches
Epithel



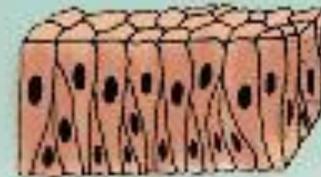
Zylinderepithel



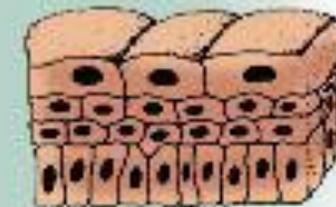
Mehrschichtiges
Plattenepithel



Mehrschichtiges
isoprismatisches Epithel



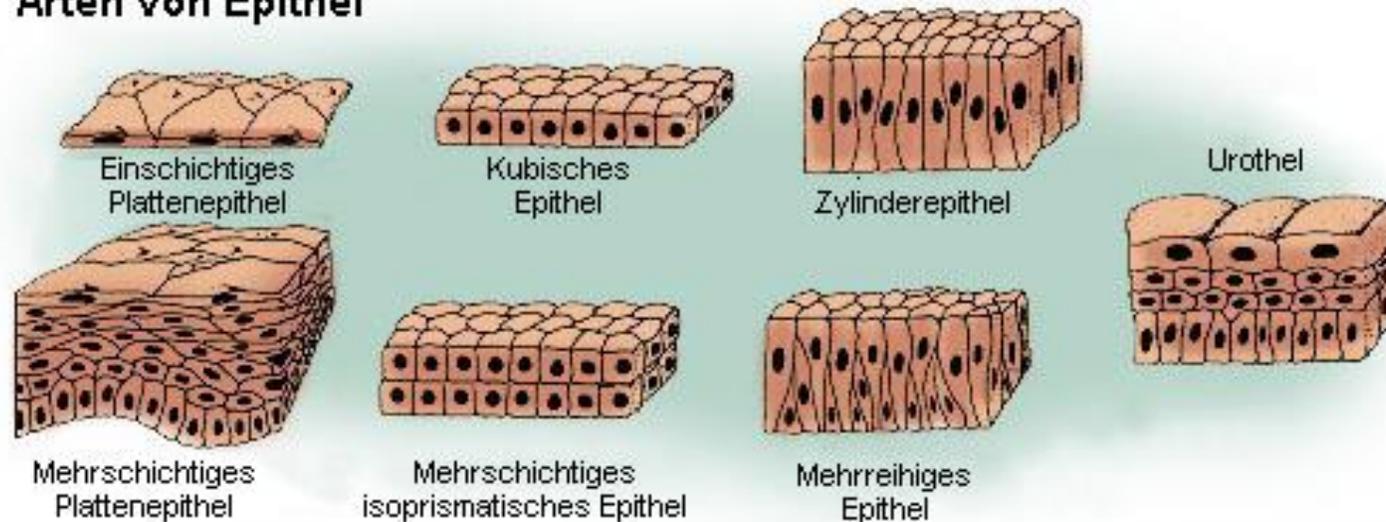
Mehrreihiges
Epithel



Urothel

Zelltypen 5: Epithelzellen

Arten von Epithel



Einschichtiges Epithel:

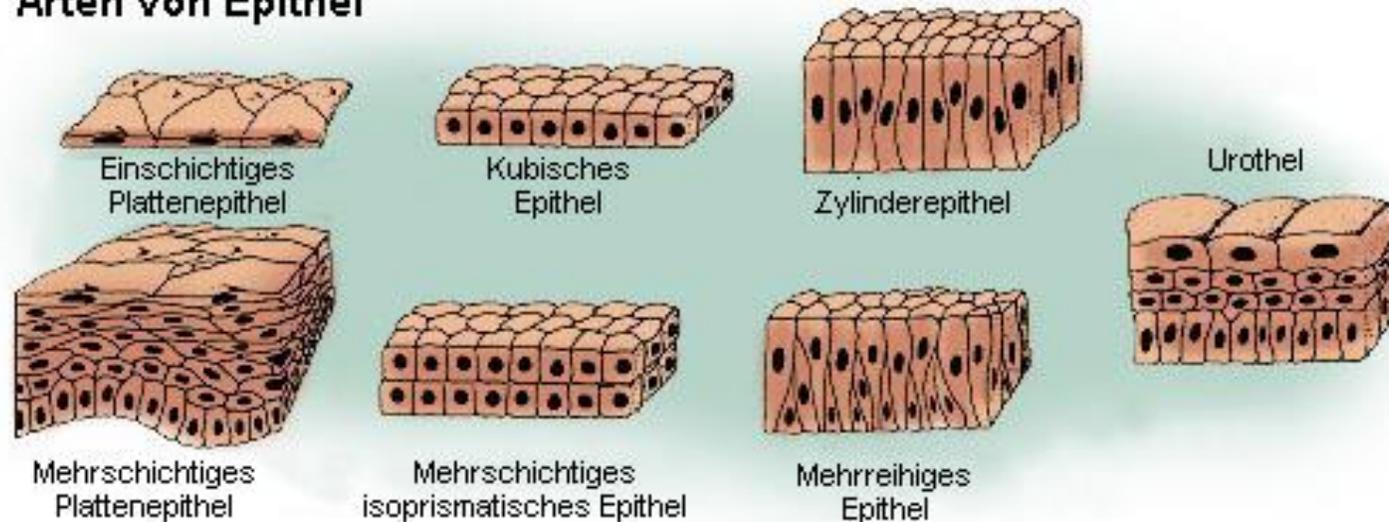
Epitheliale Auskleidung der Blut- und Lymphgefäße,

Barriere- und Transportfunktionen (Magenschleimhaut ,zylindrisch)

aktive Transportaufgaben (Nierentubuli, kubisch)

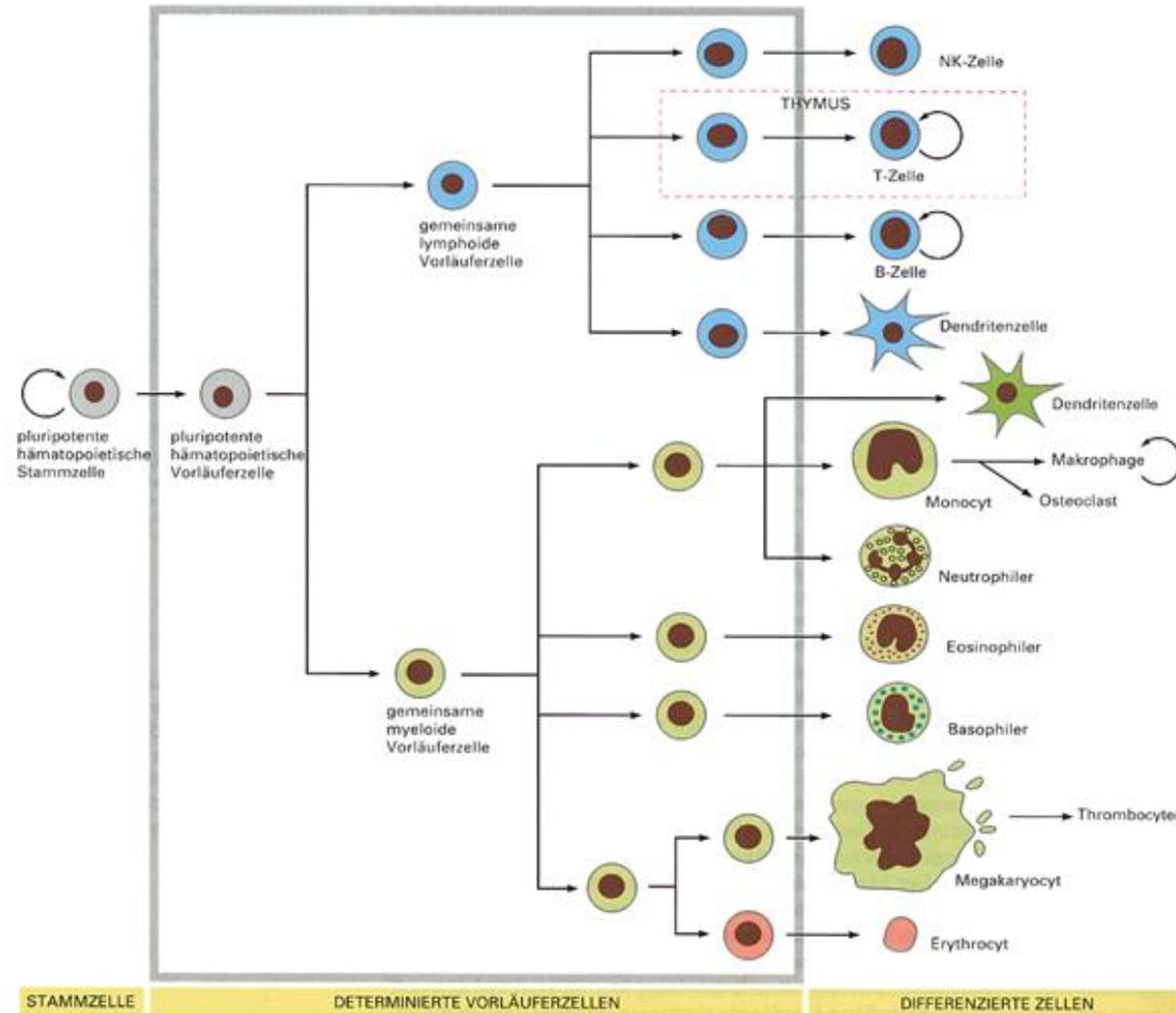
Zelltypen 5: Epithelzellen

Arten von Epithel



- Mehrschichtiges Epithel:** liegen viele (mehr als zehn) Zellschichten übereinander
Mundhöhle, Speiseröhre, Analkanal → starker Beanspruchung
- Mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel: Epidermis
- Mehrreihige Epithel ist noch einschichtig: Atemwegsepithel

Zelltypen 6: Blutzellen

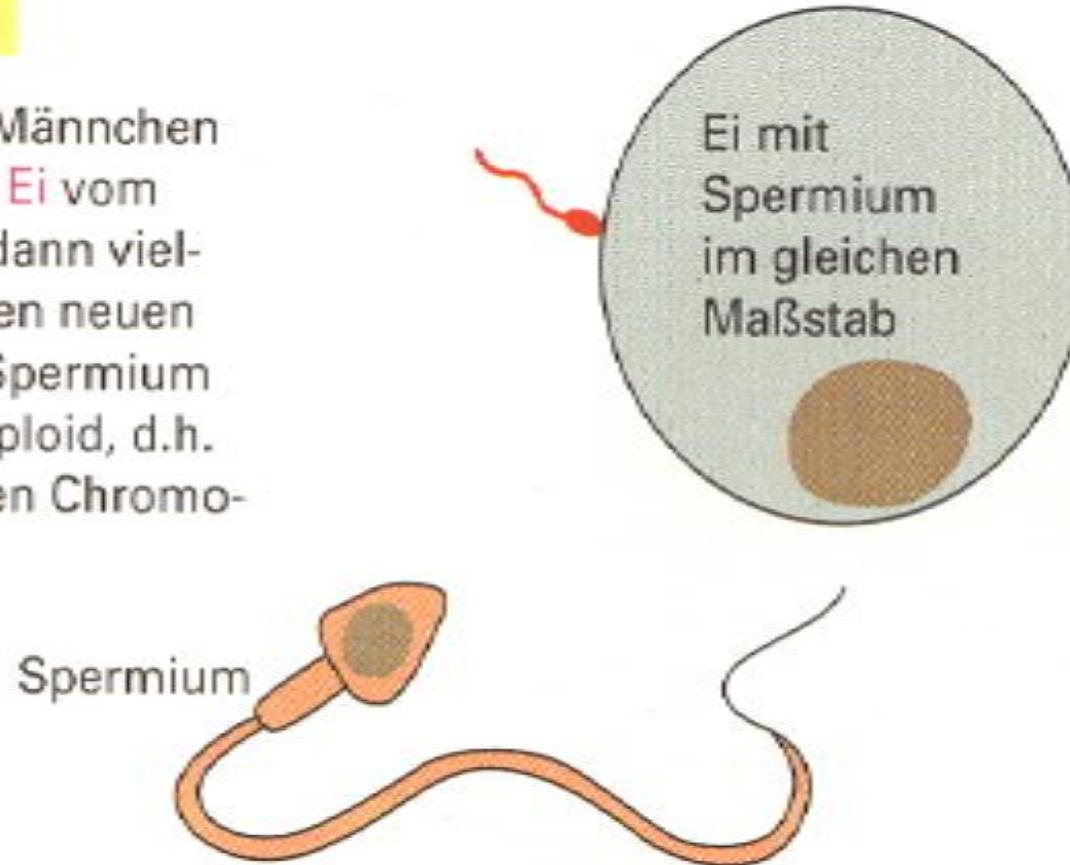


"Molekularbiologie der Zelle", 4. Auflage, Alberts/Johnson/Lewis/Raff/Roberts/Walter, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2004

Zelltypen 7: Keimzellen

KEIMZELLEN

Ein **Spermium** vom Männchen verschmilzt mit dem **Ei** vom Weibchen, das sich dann vielfach teilt und so einen neuen Organismus bildet. Spermium und Ei sind beide haploid, d.h. sie tragen nur je einen Chromosomensatz.



Tumorzellen

Mutationen

meist in Genen der Zellzykluskontrolle

Aktivatoren, "*gain of function*" (Proto-Onkogene)

Kontrollproteine, "*loss of function*," (Tumorsuppressoren)

Selektionsvorteil gegenüber Nachbarzellen

lokale Proliferation

benigner Tumor

gutartig, lokal begrenzt

oftmals vom Körper eingekapselt

maligner Tumor

weitere Mutationen notwendig

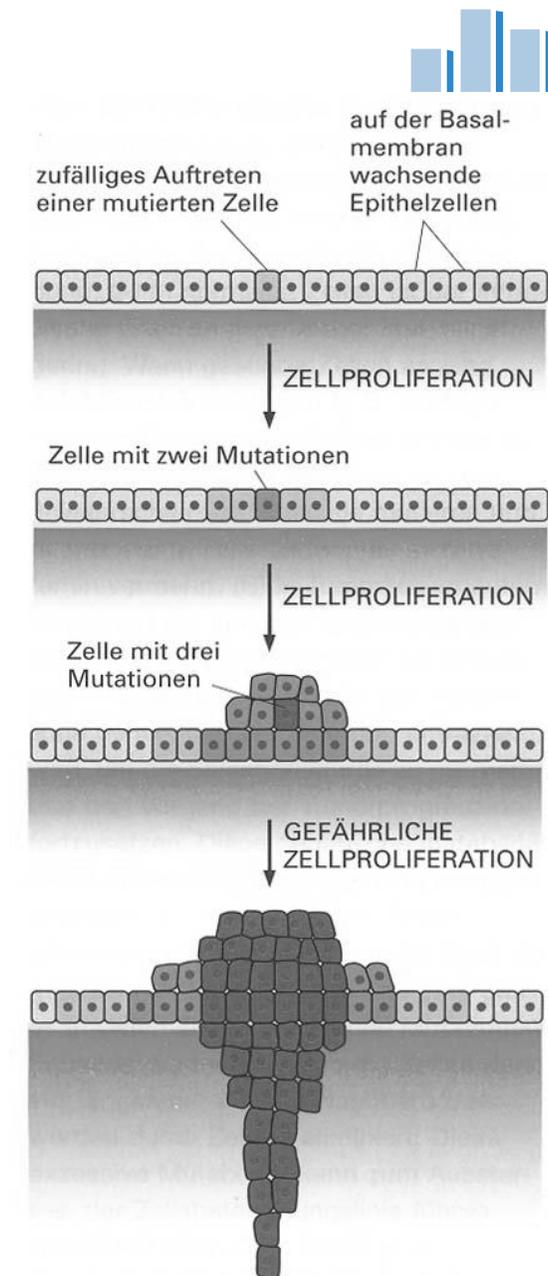
induziert Angiogenese zur Blutversorgung

bösartig, Metastasenbildung:

Ablösung aus Zellverband

Migration in Lymph- oder Blutgefäße

Adhäsion und Migration in Zielgewebe



Häufig benutzte Zelllinien in der Zellkulturtechnik

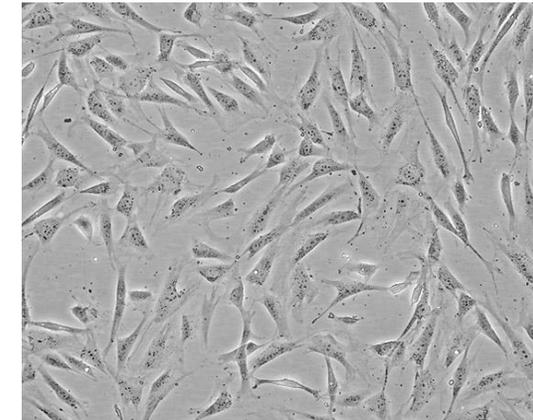


<http://www.i-a-z-zellkultur.de/>

Häufig benutzte Zelllinien in der Zellkulturtechnik

Zelllinie der Maus

Zelllinie	Herkunft	Verwendung/ Bemerkung
NIH 3T3	Swiss Mouse Embryo Fibroblasten	DNA- Transfektionen
Balb/3T3	Mouse embryo	Kontakthemmung nicht tumorigen



George Todaro's group at the National Cancer Institute established the NIH 3T3 cell line in 1969. Image courtesy of ATCC

Häufig benutzte Zelllinien in der Zellkulturtechnik

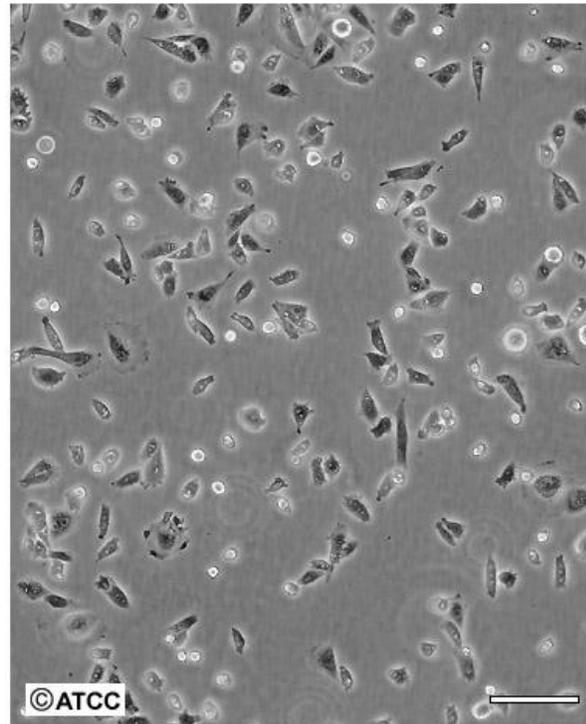
Zelllinie der Hund, Hamster, Affe

CHO	Chinese Hamster Ovarialepithel	Antikörper- entwicklung
MDCK	Hund Nierenepithel	normal
Cos-7	African green monkey - Nierenfibroblasten	SV-40 Viren Propagation

Häufig benutzte Zelllinien in der Zellkulturtechnik

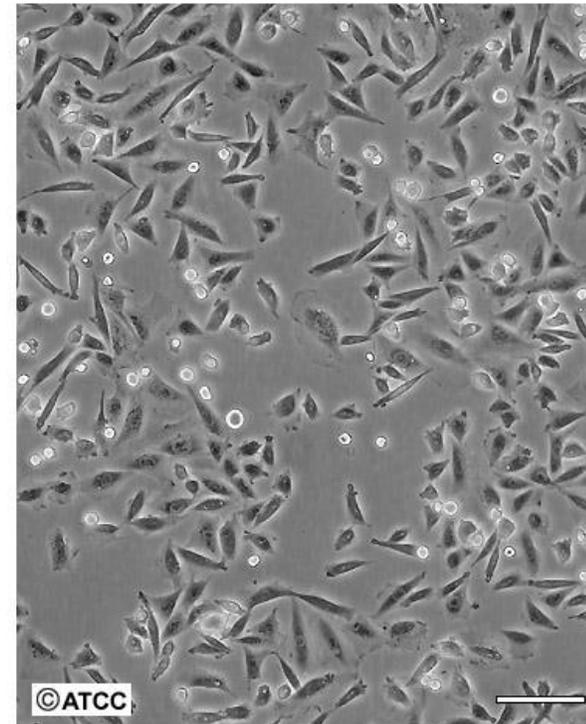
Zelllinie der Hund, Hamster, Affe

ATCC Number: **CCL-61**
Designation: **CHO-K1**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Häufig benutzte Zelllinien in der Zellkulturtechnik

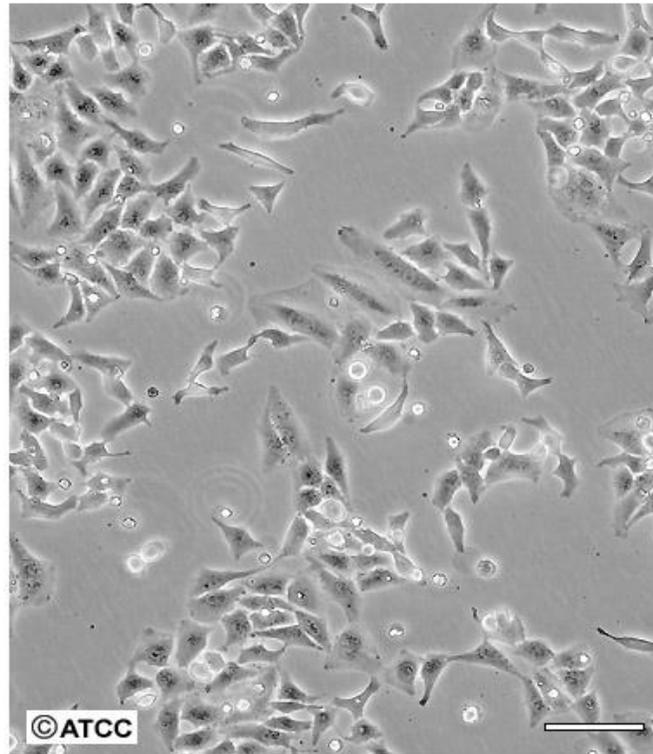
Zelllinie des Menschen

Zelllinie	Herkunft	Verwendung/ Bemerkung
HeLa	Cervix-Carcinom Epithel	DNA- Transfektionen
Jukart 16	Lymphoblasten	Kontakthemmung, Nicht tumorigen
MCF-7	Adenocarcinom der Brust	Hormonresponsiv
HEK 293	Human Embryonic Kidney cells	Standard-Zelllinie

Häufig benutzte Zelllinien in der Zellkulturtechnik

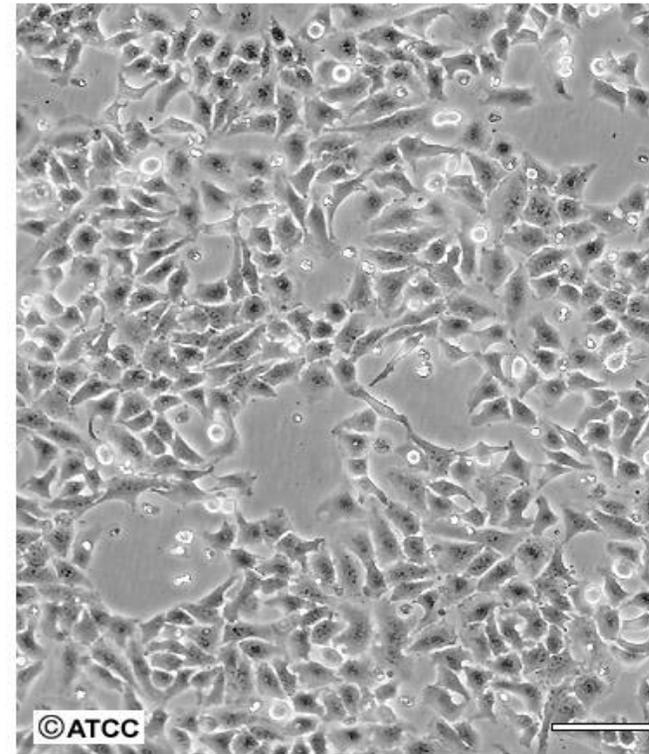
Zelllinie des Menschen

ATCC Number: **CCL-2**
Designation: **HeLa**



© ATCC
Low Density

Scale Bar = 100µm



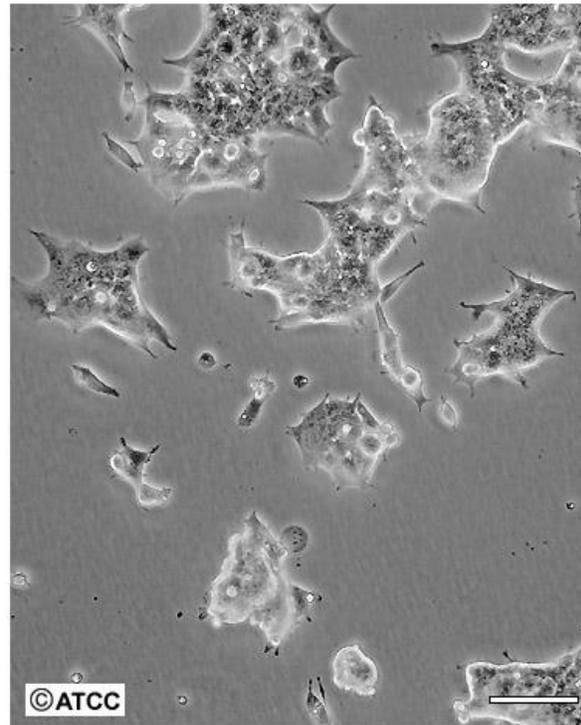
© ATCC
High Density

Scale Bar = 100µm

Häufig benutzte Zelllinien in der Zellkulturtechnik

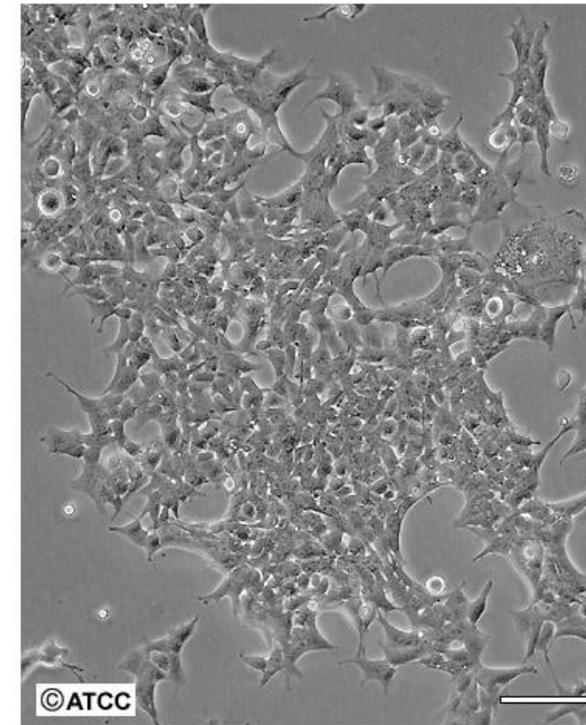
Zelllinie des Menschen

ATCC Number: **CRL-1573**
Designation: **293**



Low Density

Scale Bar = 100µm



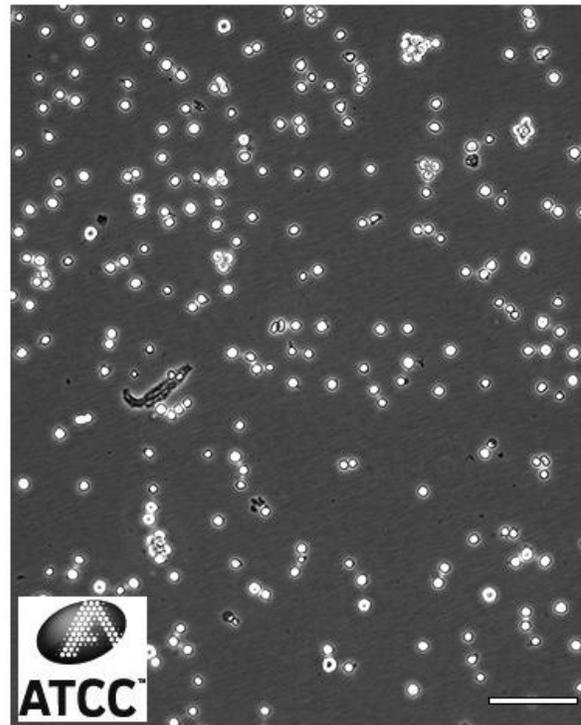
High Density

Scale Bar = 100µm

Häufig benutzte Zelllinien in der Zellkulturtechnik

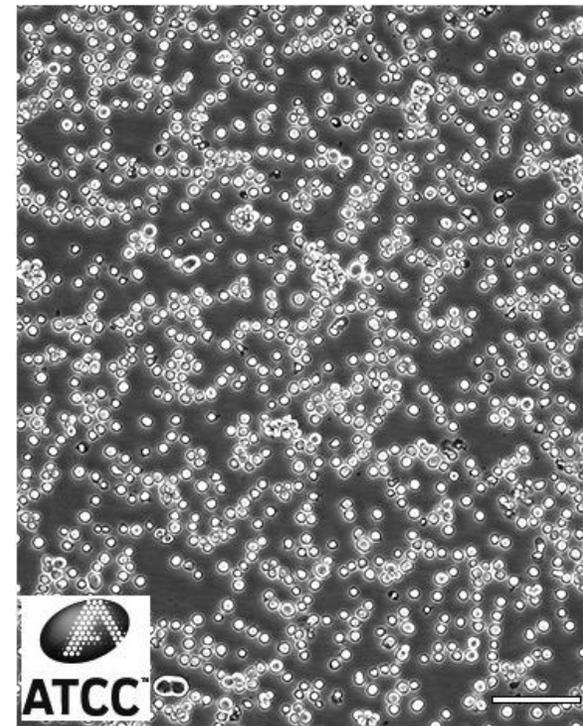
Zelllinie des Menschen

ATCC Number: **CRL-2901™**
Designation: **BCL2 (S87A) Jurkat**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

primäre/permanente Zellen

Begriffs-Definitionen

Eine **Zellkultur** unterscheidet sich von einer **Gewebekultur**:

- durch das Vorliegen von **Einzelzellen** bei Beginn der Kultivierung

Primärkultur

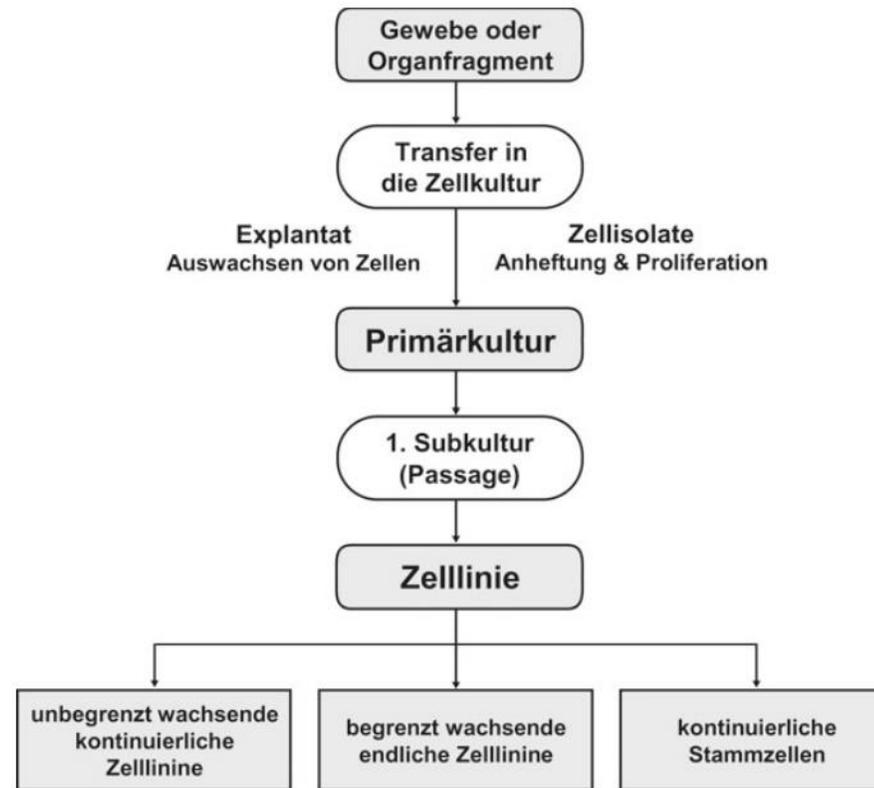
Zellen, die unmittelbar aus einem Organismus
entnommen
und *in vitro* kultiviert werden



Aus dieser Primärkultur können wiederum
Subkulturen (Passagen) angelegt werden

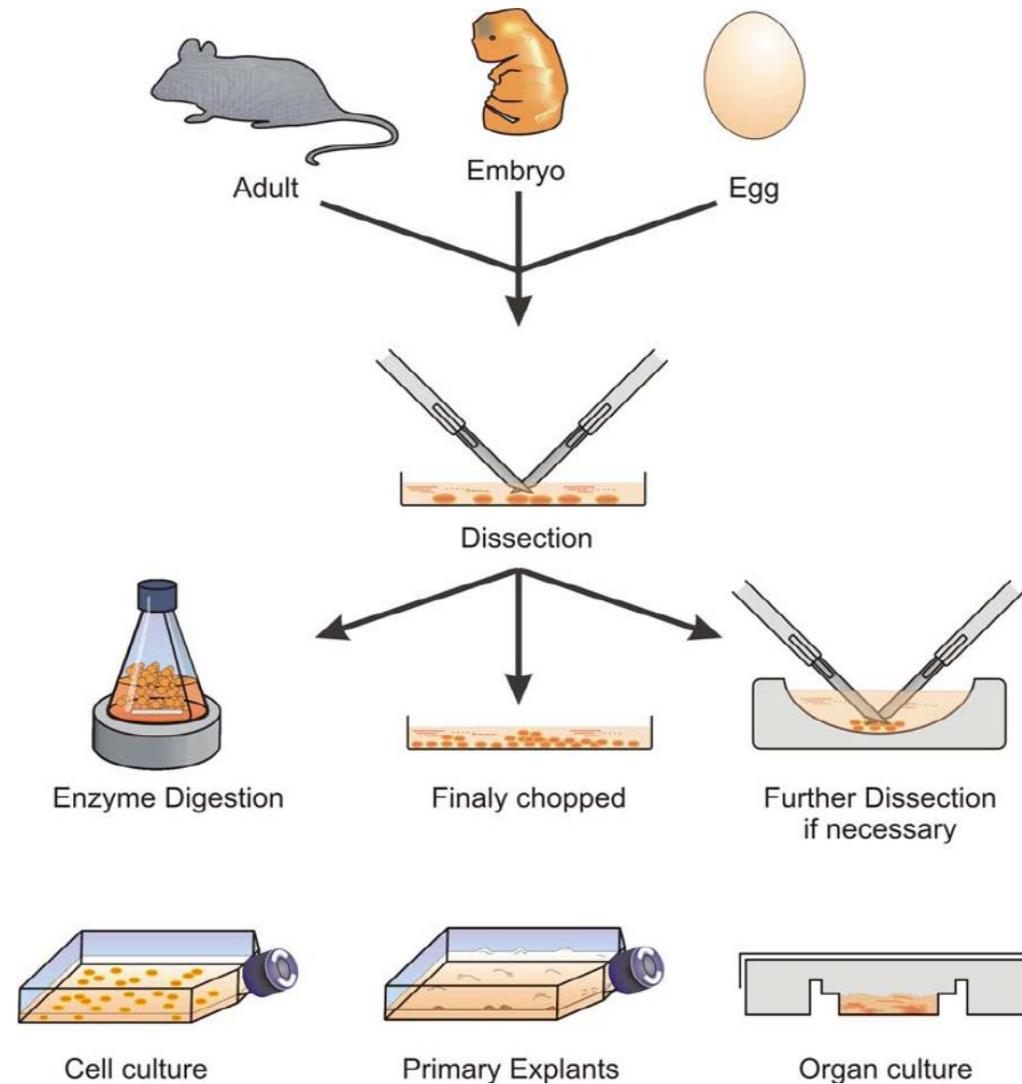
Begriffs-Definitionen

Primärkulturen und Zelllinien

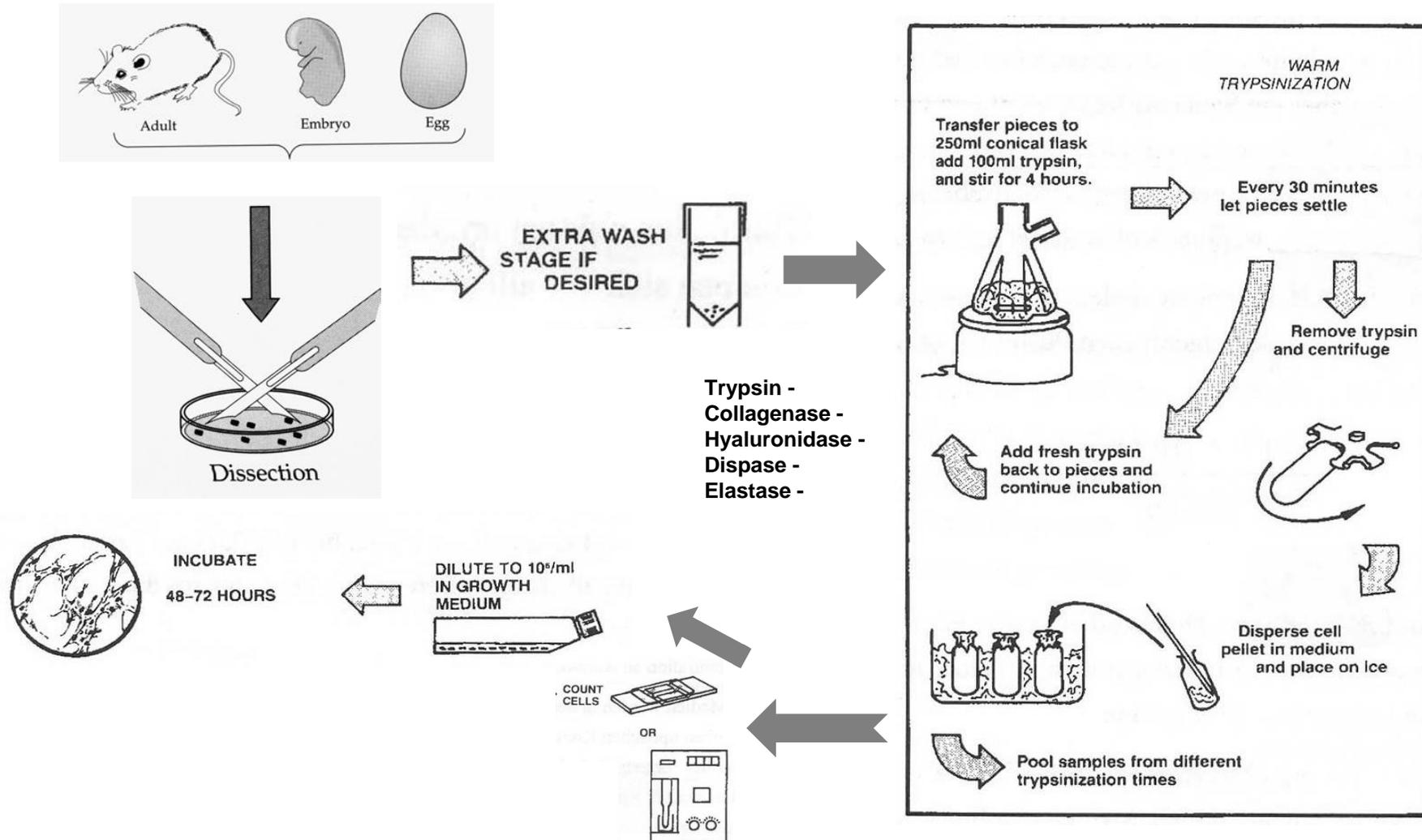


Anlegen einer Primärkultur und Definition der daraus entstehenden Zelllinien (modifiz. nach Davis, 2011).

Gewinnung primärer Zelllinien



Gewinnung primärer Zelllinien



Gewinnung primärer Zelllinien

A. Präparationsmethoden:		
Art der Zellisolierung	Methode	Literatur
enzymatisch	Perfusion von Geweben und Organen mit spezifischen Protease- oder Peptidase-lösungen, Sammeln der Zellen im Effluat und Kultivierung der herausgelösten Zellen	
Aufreinigung	Zentrifugation der (enzymatisch gewonnenen) Zellsuspension im Dichtegradienten, Isolierung und Kultivierung der Zellen aus spezifischen Banden; Isolierung von Blutzellen im Dichtegradienten	Gesek et al., 1987 Lash and Tokarz, 1989 Scott et al., 1986 Vinay et al., 1981
mechanisch	Mikrodissektion: z. B. Mikrodissektion von Tubulusfragmenten der Niere und Auswachsen nephronspezifischer Zellen unter geeigneten Kulturbedingungen	Horster, 1980 Horster and Sone, 1990 Wilson and Horster, 1983
immunologisch	Immunodissektion: Anheftung einer Zellpopulation an Kulturschalen, die mit spezifischen Antikörpern vorbeschichtet wurden	Helbert et al., 1997 Smith and Garcia-Perez, 1985 Spielman et al., 1987
	Immunoselektion: Anreicherung einer Zellpopulation durch Bindung an spezifische Antikörper, die an magnetische Mikropartikel gekoppelt sind	Baer et al., 1997 Pizzonia et al., 1991

Gewinnung primärer Zelllinien

B. Selektionsmethoden:	
Selektionsdruck durch geeignete Medien und Wuchsbedingungen	Literatur
Auswahl geeigneter Kulturparameter, abgestimmt auf die jeweiligen „physiologischen“ Eigenschaften des Gewebes bzw. Organs	
→ serumfreie Zellkultur: spezifische, hormonelle Stimulation des gewünschten Zelltyps bei gleichzeitiger Unterdrückung unerwünschten Fibroblastenwachstums	Gstraunthaler, 2003 Barnes et al., 1987
→ <i>D</i> -Valin-haltige Selektionsmedien: spezifische Selektion von (Nieren)Epithelzellen, die eine <i>D</i> -Aminosäure-Oxidase exprimieren	Gilbert and Migeon, 1975, 1977 Pollegioni et al., 2007
→ glucosefreie Medien: Selektion proximaler Nierenepithelzellen, welche zur Gluconeogenese befähigt sind	Courjault-Gautier et al., 1995 Gstraunthaler and Handler, 1987 Jung et al., 1992
→ hyperosmolare Kulturbedingungen: spezifische Selektion von Zellen des Nierenmarks, welche in hyperosmolarem Milieu überleben	Burg, 1995 Handler and Kwon, 1993

primäre Zellkultur



<https://www.youtube.com/watch?v=N0iftyYqM38>

primäre Zellkultur

....aus normalem Gewebe: geeignetes, festes Substrat für die Anheftung

....aus dem Blut: Suspension (T-Zellen: Jurkat)

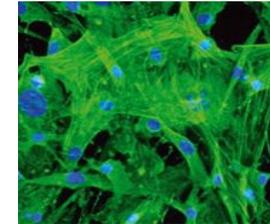
....aus Tumorgewebe: festes Substrat, Suspension

direkt aus dem Organismus entnommen

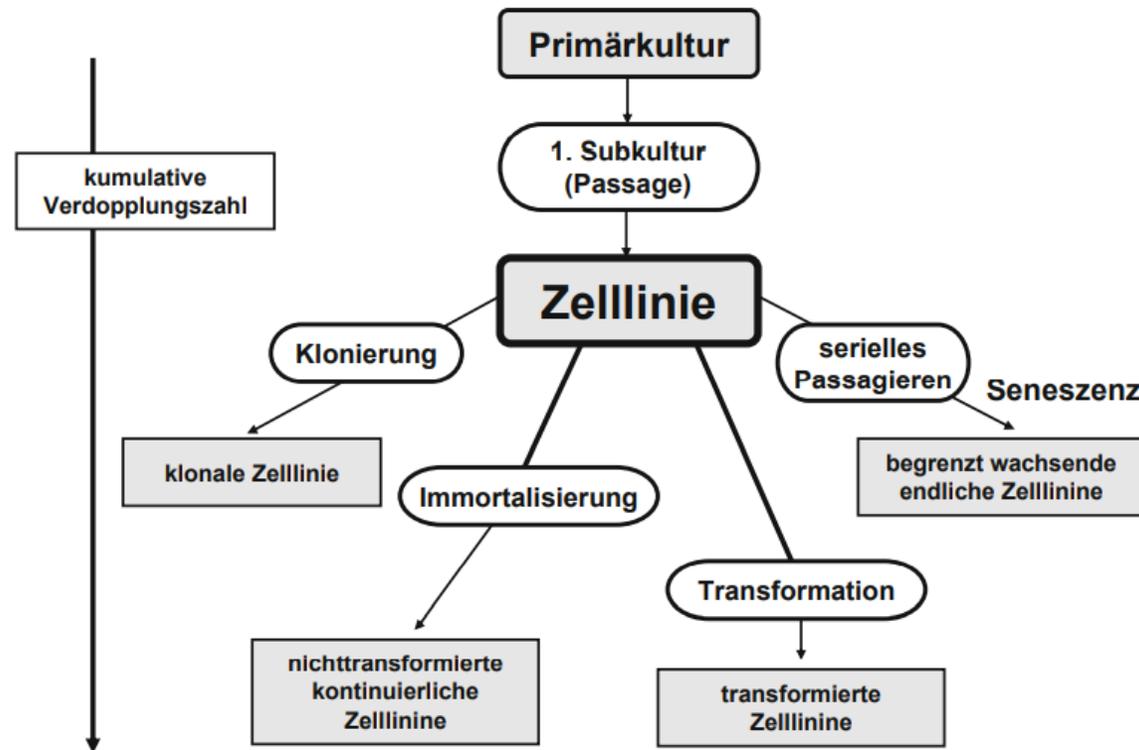
Vorteile: hohe Authentizität, Differenzierung

Nachteile: begrenzte Kultivierbarkeit
geringe Teilungsrate / Zellzahl
höhere Heterogenität

Anwendung: Analysen bestimmter Zelltypen
Tissue Engineering
Genetische Manipulation an Mäusen
Regenerationsexperimente



Etablierung verschiedener Zelllinien



permanente Zelllinien

ursprünglich aus Organismus entnommen:

Langzeit-Kultivierung möglich durch:

- Immortalisierung
- direkt aus Tumorzellen gewonnen
- zufällige / spontane Immortalisierung
- aktive Immortalisierung (genetische Manipulation)

Vorteile: unbegrenzte Teilungsfähigkeit
meist einheitlichere Zellpopulation

Nachteile: oftmals Entartungen (Chromosomen-Anomalien; Mutationen)
De-Differenzierung

Anwendung: biochemische Analysen (hohe Zellzahlen)
Zellzyklus-Analysen
Standardmethoden der Zellbiologie
allgemein zellbiologische Fragen

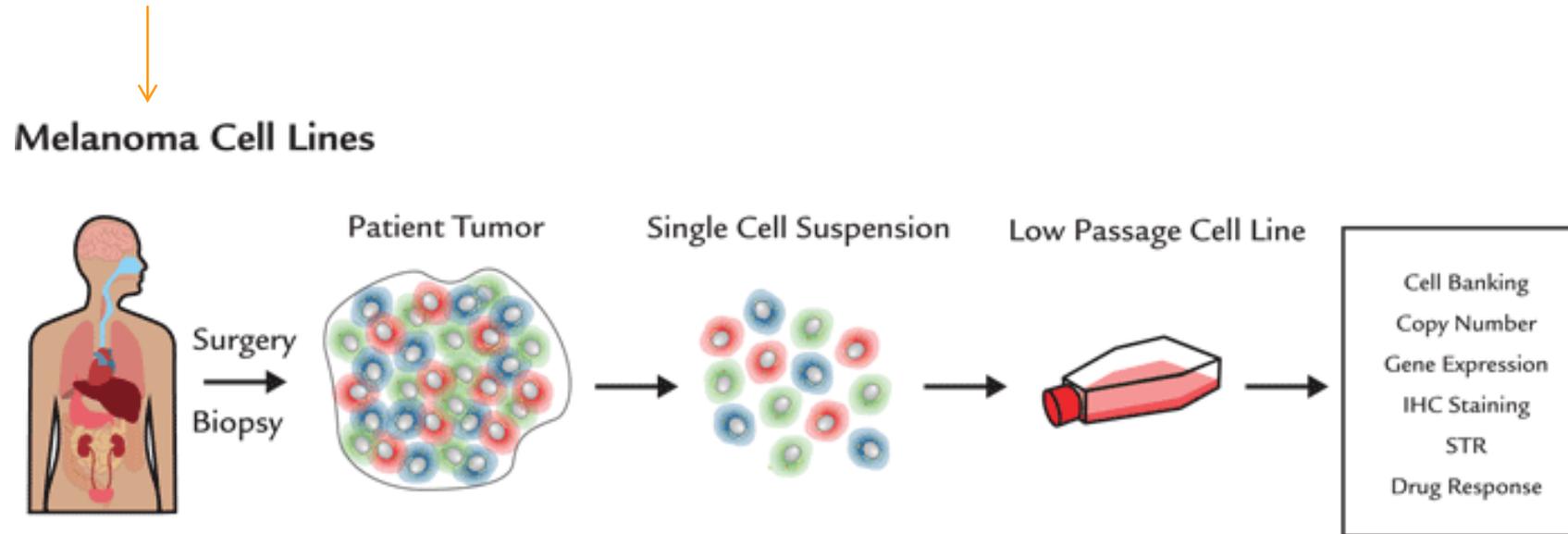
permanente Zelllinien

Spontane Mutationsraten *in vitro*: *selten*

- Strategien zur Immortalisierung (Unsterblichkeit): Mutation
 - Bestrahlung mit γ -Strahlen (T-T Dimere und Strangabbruch bei der Replikation)
 - Telomerase-Überexpression
 - Hybridomzellen
 - Virustransformation (HPV11)
 - Transfektion mit Onkogenen:

Onkogen: Gen, welches durch eine Mutation zur Krebsentstehung beiträgt

Beispiel: Permanente Zellen



Entwicklung der Melanom-Zelllinien.

Nach wenigen Passagen werden die Zellen katalogisiert und ihre Eigenschaften mit Bezug zu Chromosomenanzahl, Genexpression, Tumorbiomarkern, STRs und Empfindlichkeit gegenüber Medikamenten analysiert.

Quelle des Zellmaterial

Kauf permanenter Zellkulturen von **Zellbanken**:

ATCC: American Type Culture Collection

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

ECACC: European Collection of Cell Cultures –UK

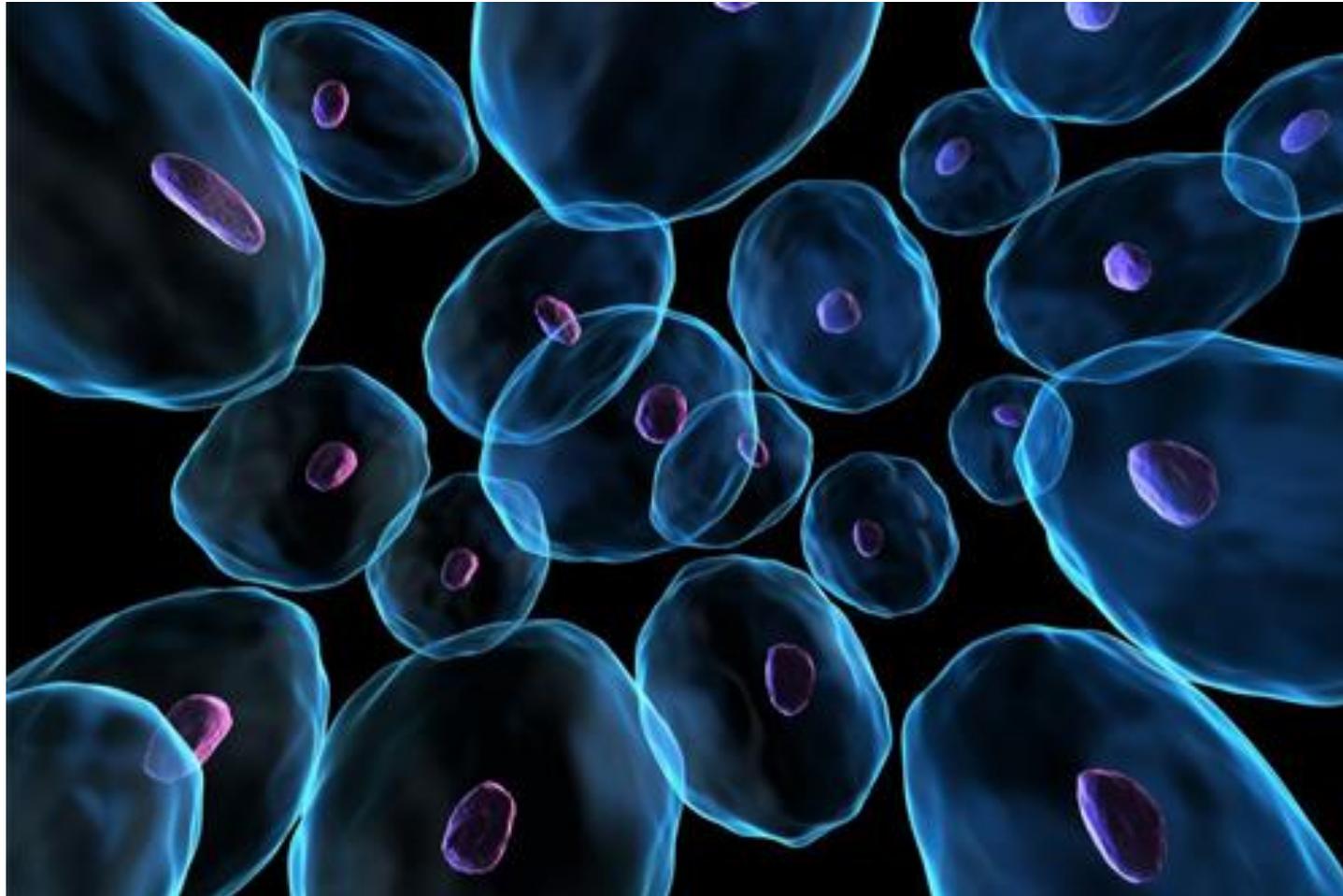
www.cell-line.com

-primäre Zellkultur

- permanente Zelllinien

Zusammenfassung

- prinzipiell sind alle Zelltypen kultivierbar
- Kulturbedingungen müssen weitestgehend der *in vivo* Situation entsprechen
- Zellkultur ermöglicht differenzielle Analysen, kann aber die Komplexität des Organismus nicht ersetzen
- Wahl der Zelltypen und Kulturen (Primärkultur vs. etablierte Zell-Linie) ist abhängig von der Fragestellung
- Immortalisierte Zell-Linien weisen in unterschiedlichem Maße tumorigene Eigenschaften auf



<https://neurolab.eu>