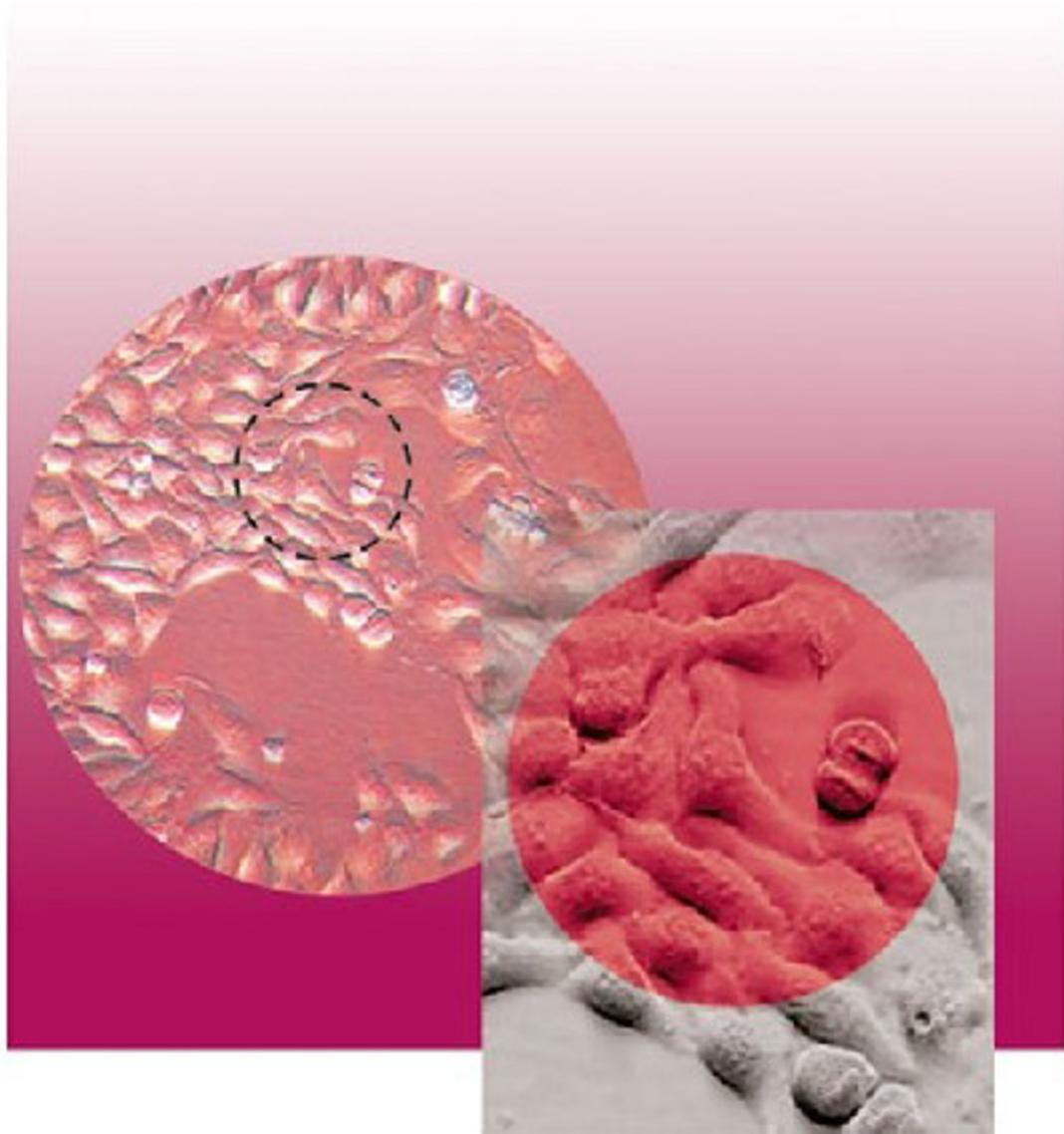


Hans Jürgen Boxberger

WILEY-VCH

Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur

Einführung in Grundlagen und Techniken



Hans Jürgen Boxberger
**Leitfaden für die Zell- und
Gewebekultur**

200 Jahre Wiley – Wissen für Generationen

John Wiley & Sons feiert 2007 ein außergewöhnliches Jubiläum: Der Verlag wird 200 Jahre alt. Zugleich blicken wir auf das erste Jahrzehnt des erfolgreichen Zusammenschlusses von John Wiley & Sons mit der VCH Verlagsgesellschaft in Deutschland zurück. Seit Generationen vermitteln beide Verlage die Ergebnisse wissenschaftlicher Forschung und technischer Errungenschaften in der jeweils zeitgemäßen medialen Form.

Jede Generation hat besondere Bedürfnisse und Ziele. Als Charles Wiley 1807 eine kleine Druckerei in Manhattan gründete, hatte seine Generation Aufbruchsmöglichkeiten wie keine zuvor. Wiley half, die neue amerikanische Literatur zu etablieren. Etwa ein halbes Jahrhundert später, während der „zweiten industriellen Revolution“ in den Vereinigten Staaten, konzentrierte sich die nächste Generation auf den Aufbau dieser industriellen Zukunft. Wiley bot die notwendigen Fachinformationen für Techniker, Ingenieure und Wissenschaftler. Das ganze 20. Jahrhundert wurde durch die Internationalisierung vieler Beziehungen geprägt – auch Wiley verstärkte seine verlegerischen Aktivitäten und schuf ein internationales Netzwerk, um den Austausch von Ideen, Informationen und Wissen rund um den Globus zu unterstützen.

Wiley begleitete während der vergangenen 200 Jahre jede Generation auf ihrer Reise und fördert heute den weltweit vernetzten Informationsfluss, damit auch die Ansprüche unserer global wirkenden Generation erfüllt werden und sie ihr Ziel erreicht. Immer rascher verändert sich unsere Welt, und es entstehen neue Technologien, die unser Leben und Lernen zum Teil tiefgreifend verändern. Beständig nimmt Wiley diese Herausforderungen an und stellt für Sie das notwendige Wissen bereit, das Sie neue Welten, neue Möglichkeiten und neue Gelegenheiten erschließen lässt.

Generationen kommen und gehen: Aber Sie können sich darauf verlassen, dass Wiley Sie als beständiger und zuverlässiger Partner mit dem notwendigen Wissen versorgt.



William J. Pesce
President and Chief Executive Officer



Peter Booth Wiley
Chairman of the Board

Hans Jürgen Boxberger

Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur

Einführung in Grundlagen und Techniken



WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Autor

Dr. Hans Jürgen Boxberger
Technische Universität Dresden
Institut für Mikrobiologie
01062 Dresden

Alle Bücher von Wiley-VCH werden sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autoren, Herausgeber und Verlag in keinem Fall, einschließlich des vorliegenden Werkes, für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler irgendeine Haftung

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.d-nb.de>> abrufbar.

© 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

Printed in the Federal Republic of Germany

Gedruckt auf säurefreiem Papier

Satz primustype Robert Hurler GmbH, Notzingen

Druck betz-druck GmbH, Darmstadt

Bindung Litges & Dopf GmbH, Heppenheim

Umschlaggestaltung Adam Design, Weinheim

ISBN 978-3-527-31468-3

Für Carl Frederic

Inhaltsverzeichnis

1	Geschichte und Bedeutung der Zellkultur	1
1.1	Das biologische Zeitalter	1
1.2	Die mühseligen Anfänge	2
1.3	Die zukünftige Schlüsseltechnologie	3
2	Das Zellkulturlabor und seine Einrichtung	5
2.1	Was ist ein Laboratorium?	5
2.2	Allgemeine Ausstattung eines Zellkulturlabors	5
2.3	Die Arbeitsbereiche eines Zellkulturlabors	8
2.3.1	Der Reinigungsbereich	8
	Reinigung	9
2.3.2	Der Sterilisationsbereich	10
	Dampfsterilisation im Autoklaven	10
	Sterilisation durch trockene Hitze	13
2.3.3	Der Präparationsbereich	14
2.3.4	Der sterile Arbeitsbereich	15
2.4	Die technische Ausstattung im Zellkulturlabor	15
	Eine kleine Gerätekunde	15
2.4.1	Der sterile Arbeitsplatz	16
	Sicherheitswerkbank der Klasse I	16
	Sicherheitswerkbank der Klasse II	17
	Sicherheitswerkbank der Klasse III	18
	Reine Werkbänke	18
	Reine Werkbänke mit horizontaler und vertikaler Luftführung	18
	Zubehör für sterile Sicherheitswerkbänke	18
	Allgemeine Regeln zum Betrieb von reinen Werkbänken und Sicherheitswerkbänken der Klassen I und II	19
2.4.2	Feucht- bzw. Begasungsbrutschränke	21
	Temperatur	22
	Heizungssysteme	22
	Luftfeuchtigkeit	23
	Begasung mit CO ₂ und anderen Gasen	24

	CO ₂ -Mess- und Regelsysteme	25
	Ausstattung und Wartung von Feucht- bzw. Begasungsbrutschränken	26
	Manuelle Brutraumdesinfektion	27
	Zusätzlicher Kontaminationsschutz	28
2.4.3	Das Lichtmikroskop	29
	Funktionsprinzip des Durchlichtmikroskops	30
	Das inverse Lichtmikroskop	30
	Das Phasenkontrastverfahren	31
	Einstellung und Wartung eines Phasenkontrastmikroskops	33
	Das Fluoreszenzmikroskop	34
2.4.4	Zentrifugieren	35
	Festwinkelrotor	36
	Ausschwingrotor	37
	Ausstattung und Wartung	38
2.4.5	Kühlgeräte	39
	Laborkühlschrank	39
	Tiefkühltruhen	39
	Ausstattung und Wartung	41
2.4.6	Heizsysteme	42
	Wasserbad	42
	Heizplatte	42
2.4.7	Laborwaage	44
2.4.8	pH-Meter	45
2.4.9	Reinstwasserversorgung	45
2.4.10	Literatur	47
2.4.11	Informationen im Internet	48
3	Sicheres Arbeiten im Zellkulturlabor	49
3.1	Gefährdungen im Zellkulturlabor	49
3.1.1	Allgemeine Gefährdungen	49
	Brand- und explosionsgefährliche Stoffe	50
	Elektrische Anlagen	50
	Mechanische Gefährdung	51
	Hitze und Kälte	51
	Allgemeine Gefahrstoffe	51
3.1.2	Gefährdung durch biologische Agenzien	52
3.1.3	Gefährdungspotenziale und Risikogruppen	53
3.1.4	Sicherheitsstufen	54
3.1.5	Persönliche Laborhygiene	57
	Schutzkleidung	57
	Händedesinfektion	58
	Arbeiten im sterilen Bereich der Werkbank	59
3.2	Allgemeine Regeln für das sterile Arbeiten im Zellkulturlabor	61
3.2.1	Pipettieren	62

	Serologische Pipetten	63
	Pasteurpipetten	65
	Mikropipetten	65
3.2.2	Gießen	68
3.2.3	Flambieren	69
3.2.4	Ultraviolettes Licht	69
3.2.5	Arbeiten mit Schutzhandschuhen	70
3.2.6	Sterilfiltration	71
3.2.7	Verbrauchsmaterial aus Glas und Kunststoff	72
	Zellkulturartikel aus Glas	72
	Zellkulturartikel aus Kunststoff	74
	Zell- und Gewebekulturflaschen	75
	Petrischalen	77
	Testplatten	78
3.2.8	Chemische Desinfektionsmittel	78
3.3	Literatur	80
3.4	Informationen im Internet	81
4	Nährmedien für die Zellkultur	83
4.1	Zusammensetzung von Standardmedien	84
	Einfache Medien	88
	Komplexe Medien für serumarme Applikation	89
4.2	Medienzusätze	91
	L-Glutamin	91
	Natriumpyruvat	93
	Nichtessentielle Aminosäuren (NEA)	93
	Natriumhydrogencarbonat (Natriumbicarbonat)	93
	HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure)	96
	Phenolrot	97
4.3	Serum	97
	Die Herkunft des Serums und seine industrielle Fertigung	97
	Die Inhaltsstoffe des Serums	99
	Nachteile von fetalem Kälberserum (FKS)	99
4.3.1	Alternative Seren	101
4.3.2	Serumfreie Zellkultur	101
4.3.3	Adaption von Zellen an serumfreie Kulturbedingungen	102
4.3.4	Handhabung von Serum	103
	Der Einkauf	103
	Lagerung und Handhabung	104
	Hitzeinaktivierung	105
4.4	Zubereitung eines gebrauchsfertigen Zellkulturmediums	106
4.4.1	Flüssigmedium	107
4.4.2	Medienkonzentrat	108
4.4.3	Pulvermedium	109
4.4.4	Hitzestabile Medien	110

- 4.5 Was man sonst noch beachten sollte 111
- 4.6 Literatur 111
- 4.7 Informationen im Internet 112

- 5 Routinemethoden in der Zellkultur etablierter Zelllinien 113**
- 5.1 Auftauen tiefgefrorener Zellkonserven 118
 - Direkte Aussaat der aufgetauten Zellen 118
 - Aussaat der Zellen nach Zentrifugation 119
- 5.2 Optische Kontrolle der Zellkultur 120
- 5.3 Mediumwechsel 124
 - 5.3.1 Mediumaustausch bei adhärenenten Kulturen 126
 - 5.3.2 Mediumaustausch bei Suspensionskulturen 127
- 5.4 Subkultivierung (Passagieren) 128
 - 5.4.1 Subkultivierung adhärenenter Zellen 128
 - Ablösen adhärenenter Zellen mit Trypsin/EDTA 132
 - 5.4.2 Subkultivierung von Suspensionszellen 135
- 5.5 Zellzahlbestimmung 136
- 5.6 Vitalitätstest 140
- 5.7 Qualitätskontrolle 141
 - Färbemethode nach Giemsa (für adhärenente Zellen) 142
 - Färbemethode mit Kristallviolett (für adhärenente Zellen) 142
- 5.8 Kryokonservierung 143
- 5.9 Literatur 147
- 5.10 Informationen im Internet 147

- 6 Umgang mit kontaminierten Zellkulturen 149**
- 6.1 Die feindlichen Bataillone: Bakterien, Pilze und Viren 149
 - 6.1.1 Kurzer Abriss der Mikrobiologie 150
 - 6.1.2 Evolution und Systematik der Mikroorganismen 151
 - 6.1.3 Winzige Zellen – gigantische Stoffwechselleistungen 152
- 6.2 Bakterien 153
 - 6.2.1 Gestalt, Funktion und Aufbau der Bakterienzelle 153
 - 6.2.2 Die Hauptgruppen der Eubacteria 154
 - 6.2.3 Wachstum und Differenzierung der Eubacteria 154
- 6.3 Die optische Identifizierung einer bakteriellen Kontamination 155
- 6.4 Antibiotika und ihre Wirkungsweise 160
 - 6.4.1 Die Zellwandsynthese hemmende Antibiotika 161
 - 6.4.2 Die Proteinbiosynthese hemmende Antibiotika 161
- 6.5 Auswahl und Dosierung von Antibiotika in der Zellkultur 162
- 6.6 Antibiotika – notwendig oder überflüssig? 165
- 6.7 Mycoplasmen 166
 - 6.7.1 Gestalt, Funktion und Aufbau der Mycoplasmenzelle 167
 - 6.7.2 Mycoplasmen in der Zellkultur 168
 - 6.7.3 Auswirkungen eines Mycoplasmenbefalls auf Zellkulturen 169

	Auswirkungen auf die Zellen	169
	Auswirkungen auf die Zellkerne	170
	Chromosomenveränderungen	170
6.7.4	Wichtige Indizien für einen Mycoplasmenbefall	170
6.7.5	Diagnose durch Mycoplasmentests	171
	Mikrobiologische Kulturmethode	171
	Fluoreszenznachweismethode	171
	Lichtmikroskopie	171
	Elektronenmikroskopie	172
	Autoradiographie	172
	Mycoplasmennachweis mit MycoTect® von Invitrogen	172
	Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	172
	Kontaminationsquellen	173
6.7.6	Behandlung befallener Zellkulturen	173
6.8	Gestalt, Funktion und Aufbau der eukaryotischen Mikrobenzelle	175
6.8.1	Zellkulturrelevante Pilze (Fungi) und Hefen	177
6.8.2	Wachstum von Hefen und Pilzen	177
6.8.3	Die optische Identifizierung einer Pilzinfektion	178
6.8.4	Antimycotika	179
6.8.5	Sporen – ein stetiger Anlass zur Sorge	179
6.9	Virale Kontamination	180
6.10	Prionen	181
6.11	Kreuzkontaminationen	182
6.12	Literatur	183
6.13	Informationen im Internet	184
7	Spezielle Methoden in der Zellkultur	185
7.1	Klonierung von Zellen	185
7.2	Synchronisierung einer Zellkultur	186
7.2.1	Synchronisieren durch Abkühlen	187
7.2.2	Synchronisieren durch Mangelmedium	187
7.2.3	Synchronisation durch Abklopfen mitotischer Zellen	187
7.2.4	Zellsynchronisation durch chemische Blockierung	188
7.3	Zellkultur auf Filtermembranen	188
7.4	Zellkultur auf biologischen Membranen	191
7.5	Zellkultur auf extrazellulärer Matrix	192
7.6	Dreidimensionale Zellkulturen	195
7.7	Sphäroide	196
7.8	Perfundierte Zellkultur	199
7.9	Ein Wort zum Schluss	201
7.10	Literatur	201
7.11	Informationen im Internet	202

Anhänge 203

- I Glossar 205
- II Arbeitsvolumina für Zellkulturgefäße 218
- III MUSTER: Hautschutzplan und Händedesinfektion 220
- IV MUSTER: Hygieneplan Nach BioStoffV § 11 221
- V Hygieneplan, Beispiel 2 222
- VI Nützliche Internetadressen 223
- VII Schlechtes Zellwachstum in der Kultur:
Fehlerursachenanalyse und -beseitigung 226

Sachverzeichnis 227

Vorwort

Mancher wird sich angesichts dieser Neuerscheinung vielleicht fragen, ob es nötig war, ein weiteres Buch über Zellkultur herauszubringen. Schließlich ist das Angebot an einschlägiger Literatur in den vergangenen Jahren ständig erweitert worden. Die zahlreichen Ermunterungen und Anregungen, die ich über die Jahre hinweg erfahren habe sowie die freundliche Unterstützung durch den Verlag haben mich letztlich bewogen, den Leitfaden für die Zellkultur zusammenzustellen. Einige Vorgaben sollten dabei Berücksichtigung finden:

- Der Inhalt des Leitfadens orientiert sich an den Bedürfnissen von Technischen Assistentinnen und Assistenten sowie von Biologielaborantinnen und -laboranten, die in der Ausbildung oder am Beginn ihrer beruflichen Laufbahn stehen, mithin noch nicht über eine mehrjährige Laborpraxis verfügen. Diese Zielgruppe schließt in der Regel auch Studentinnen und Studenten mit ein, die zur Erstellung ihrer Diplom- oder Doktorarbeiten ein Zellkulturlabor nutzen.
- Erfreulicherweise sehen nun auch die Lehrpläne der Gymnasien und Berufsschulzentren eine intensive und ernsthafte Beschäftigung mit lebenden Zellen im Zuge der berufsvorbereitenden Ausbildung vor. Es liegt daher nahe, der wachsenden Zahl von interessierten Schülern und Praktikanten sowie Biologielehrern eine Anleitung zur Arbeit mit Zellkulturen an die Hand zu geben.
- Im Mittelpunkt stehen vornehmlich die grundlegenden Methoden und Techniken, die man für die Arbeit im Zellkulturlabor unbedingt kennen und beherrschen sollte. Die weitaus meisten Anwender der Zellkulturtechniken wollen nicht einfach nur vom Blatt ablesen, wie ein bestimmtes Ziel im Labor erreicht werden kann. Sie wollen die Zusammenhänge kennen lernen, um zu verstehen, warum sich dieses so und jenes eben anders verhält. Deshalb wird auf eine ausführliche Darstellung des physikalischen, chemischen und physiologischen Hintergrunds der Zellkultur Wert gelegt anstatt auf eine rein beschreibende Sammlung von Arbeitsprotokollen. Nicht zuletzt sollen die Leserinnen und Leser zu einem kritischen, problembewussten, aber auch zu einem phantasievollen Umgang mit lebenden Zellen und Geweben ermuntert werden. Eine Auswahl spezieller und weiterführender Methoden und Techniken wird in Kapitel 7 vorgestellt.
- Von einigen der in diesem Buch vorgestellten Methoden existieren in der Literatur mehrere Modifikationen. Ich habe mich stets für jene Varianten entschieden, die sich in der Praxis gut bewährt haben. Dennoch können Abänderungen in Einzelfällen sinnvoll oder notwendig sein.

- Es ist leider eine betrübliche Tatsache, dass immer mehr Artikel deutschsprachiger Autoren selbst in deutschen Fachzeitschriften in englischer Sprache veröffentlicht und Vorlesungen für eine überwiegend deutschsprachige Studentenschaft zunehmend in unbeholfenem Englisch gehalten werden. In dieser Entwicklung sieht eine wachsende Zahl von Wissenschaftlern einen schwerwiegenden Nachteil für den Forschungs- und Ausbildungsstandort Deutschland. Ich freue mich deshalb besonders, dass der Wiley-Verlag dem vielfach geäußerten Wunsch nach einer deutschen Ausgabe gefolgt ist und diesen Leitfaden in der vorliegenden Form herausbringt.
- Nicht zuletzt ist es mir ein Anliegen, die Lesefreude der Nutzerin und des Nutzers – bei aller gebotenen Sachlichkeit und Genauigkeit des Inhalts – auch nach längerer Lektüre erhalten zu wissen. Da Fremdwörter bekanntlich so heißen, weil sie den meisten Lesern fremd sind, wird auf ihren flächendeckenden Gebrauch verzichtet. Da jedoch auch die Zellbiologie wie jede andere Wissenschaft nicht ohne eine stattliche Anzahl von Fachausdrücken auskommt, werden die unumgänglichen Fachbegriffe im Text „übersetzt“ oder im Glossar erläutert. Auf weiterführende Literatur wird am Ende eines jeden Kapitels hingewiesen.

Herzlich danken möchte ich meiner Frau für ihre Geduld und Nachsicht während der Erstellung des Manuskripts. Den Mitarbeitern des Wiley-Verlags, Frau Nussbeck und Herrn Dr. Sendtko sowie allen ungenannten Personen, gilt mein besonderer Dank für die freundliche Unterstützung und verständnisvolle Zusammenarbeit. Herzlichen Dank auch an alle Firmen und Personen, die durch Überlassung von Bildmaterial zum Gelingen des Leitfadens beigetragen haben. Allen Leserinnen und Lesern bin ich für Verbesserungsvorschläge und kritische Hinweise dankbar.

Dresden, im September 2006

Hans Jürgen Boxberger

1

Geschichte und Bedeutung der Zellkultur

1.1

Das biologische Zeitalter

Leben wir im Zeitalter der Biologie? In seiner Neigung zum Ordnen und Klassifizieren hat der Mensch vergangene Epochen stets unter dem Gesichtspunkt herausragender gesellschaftlicher und kultureller Errungenschaften betrachtet. Begriffe wie „Eisenzeit“ oder „Neuzeit“ sind jedermann geläufig. Die fortschreitende Entwicklung der modernen Wissenschaften hat die letzten zwei Jahrhunderte vornehmlich geprägt. Stand das 19. Jahrhundert allgemein im Zeichen aufblühender Technik, bahnbrechender medizinischer Entdeckungen und der Emanzipierung der Naturwissenschaften, gehen wir kaum fehl, wenn wir das 20. Jahrhundert als das Atom- und Computerzeitalter bezeichnen.

Trotz der ungeheuren Leistungen, die auf den Gebieten der Physik und der Chemie vollbracht wurden, hat sich die Biologie in den Jahrzehnten seit 1953, als James Watson, Francis Crick und Maurice Wilkins die Desoxyribonukleinsäure (DNS) als Träger der genetischen Information entdeckten, unaufhaltsam eine Schlüsselposition erobert. Dass dem nicht immer so war, demonstriert die Tatsache, dass ein Nobelpreis für Biologie vom Stifter nicht vorgesehen war und merkwürdigerweise bis heute nicht ausgelobt wird. Dennoch konnte die „klassische“ Biologie dank ihrer engen Bindung an die Medizin und die zunehmende gegenseitige Durchdringung mit den anderen naturwissenschaftlichen Disziplinen zu dem avancieren, was man heute in Ermangelung klarer Abgrenzungskriterien als Biowissenschaften bezeichnet. Nicht wenige sehen deshalb mit dem 21. Jahrhundert das Zeitalter der Biotechnologie anbrechen.

Ob sich diese Vision bewahrheitet, soll dahingestellt bleiben. Kaum zu bestreiten ist hingegen die Tatsache, dass insbesondere der Zellbiologie in dem neuen wissenschaftlichen Gebäude mit seinen zahlreichen Räumlichkeiten eine fundamentale Bedeutung zukommt. Betrachten wir die zahlreichen biowissenschaftlichen Teildisziplinen genauer, stellen wir fest, dass die Beschäftigung mit Zellen darin eine mehr oder weniger zentrale Rolle spielt. Die Zell- und Gewebekultur bildet gewissermaßen die Basis, auf der die gesamte Biotechnologie aufbaut.

In der Tat sind in den letzten Jahrzehnten Zellkulturen zu einem der wichtigsten Werkzeuge in der zellbiologischen, virologischen und immunologischen Forschung sowie in der Tumorforschung geworden. Die enormen Fortschritte in der

Grundlagenforschung, der Medizin und der Pharmazie wären ohne die Verwendung von Zellkulturen nicht möglich gewesen.

1.2

Die mühseligen Anfänge

Obwohl uns die Zellkultur als eine sehr moderne und mit großem technischen Aufwand betriebene Methode erscheint, reichen ihre Wurzeln weit zurück. Man macht sich kaum noch eine Vorstellung von den nahezu unüberwindlichen Schwierigkeiten und Hindernissen, mit denen sich die Pioniere seinerzeit konfrontiert sahen. Es dürfte nicht übertrieben sein, wenn man aufgrund der äußerst unzureichenden Voraussetzungen von einer Erfolgsquote von höchstens 1 % ausgeht. Die großen Probleme bei dem Versuch Zellen lebend in Kultur zu halten, ließen ahnen wie komplex die Lebensvorgänge auf der mikroskopischen und auf der molekularen Ebene tatsächlich sind. Heute wissen wir um die Vielschichtigkeit der Ursachen, die im Laufe eines langwierigen Erkenntnisprozesses nach und nach mühsam und von zahlreichen Rückschlägen begleitet aufgedeckt wurden.

Jedes komplex organisierte Lebewesen – ob Mensch, Tier oder Pflanze – entsteht aus einer einzelnen Zelle, der befruchteten Keimzelle. Durch kontinuierliche Teilung und Differenzierung entwickelt sich ein komplizierter Organismus aus zahlreichen, miteinander in wechselseitiger Beziehung stehender Zellen. Ärzte und Wissenschaftler waren von Anfang an bestrebt, diesen Vorgang auch künstlich im Labor („*in vitro*“) durchführen und studieren zu können. Zum einen wollte man die Mechanismen der Krankheitsentstehung, zum anderen die entwicklungsbiologischen Vorgänge aufdecken und untersuchen. Die ersten „Zellkulturen“ beschaffte man sich mit dem Kescher aus einem Tümpel. Amphibienlaich – das weiß jeder, den der Forscherdrang in jungen Jahren mit dem Marmeladenglas voller Froscheier nach Hause trieb – verlangt außer genügend Wasser keine besonderen Vorkehrungen. Unendlich schwieriger erwiesen sich hingegen die lebenserhaltenden Maßnahmen bei frisch isolierten Zellen oder Gewebeproben! Selbst Krebszellen, deren Teilungsaktivität ungehemmt vonstatten geht, konnten in einer Kulturschale kaum am Leben erhalten werden.

Man muss sich vergegenwärtigen, dass nahezu alle heute bekannten Parameter der Zellphysiologie damals unbekannt waren. Über die Nährstoffe, die ein Mensch zum Leben braucht, lagen gesicherte Erkenntnisse vor. Welche Ansprüche jedoch eine Zelle hinsichtlich der Versorgung und der Darreichungsform stellen mochte, darüber herrschte größte Unsicherheit. Da einer Zelle kaum feste Kost zugemutet werden konnte und eine Kultur in wasserloser Umgebung in kurzer Zeit vertrocknet, versuchte man es zunächst mit so kuriosen Flüssigkeiten wie Boullion aus Rindfleisch. Die Rinderbrühe konnte sich in der Zellkultur jedoch nicht durchsetzen. In erstaunlicher Vorausahnung der tatsächlichen Gegebenheiten experimentierte man nun mit Blutflüssigkeit und Lymphe, um die Kulturbedingungen für Säugerzellen soweit wie möglich der natürlichen Situation anzupassen.

Während die Nährstofffrage zumindest vorläufig gelöst schien, sah man sich mit einem anderen, kaum weniger bedeutenden Problem konfrontiert: den allgegen-

wärtigen Mikroorganismen, die sich als lästige Kommensalen („Mitesser“) in fast allen Zellkulturen trotz sorgsamster Abschirmung erfolgreich einnisten konnten. Da eine schlagkräftige Abwehrstrategie in Form von Antibiotika noch nicht zur Verfügung stand, muss die Verlustrate außergewöhnlich hoch gewesen sein.

Verglichen mit den Schwierigkeiten bei der Bereitstellung von Nährstoffen und der Aufrechterhaltung steriler Bedingungen war die Versorgung der Kulturen mit Wärme in geeigneten Behältern eine durchaus lösbare Aufgabe. Die Temperatur wurde mittels Thermometer und Raumheizung auf dem erforderlichen Niveau gehalten. Ein einfacher Kasten, ausgestattet mit einer Schale Wasser und einer Kerze kann als Urahn aller Brutschränke betrachtet werden.

1.3

Die zukünftige Schlüsseltechnologie

Versuch und Irrtum bestimmten noch bis weit in die erste Hälfte des 20. Jahrhunderts die meisten Experimente mit Zellen. Erst die Entwicklung spezieller Kulturmedien und die Entdeckung der Antibiotika erlaubten den Zellforschern eine adäquate Nährstoffversorgung ihrer Zellkulturen sowie eine gezielte Bekämpfung mikrobieller Infektionen bzw. deren Vorbeugung. Die Zahl der erfolgreich in Kultur genommenen Zellen konnte ständig gesteigert werden. Infolge der rasanten Entwicklung auf dem Gebiet der Labortechnik und der immens verfeinerten Analysemethoden hat die Zellkultur mittlerweile einen Stand erreicht, der es erlaubt, komplexe Primär- und Gewebekulturen *in vitro* zu etablieren.

Besonders durch die stürmische Entwicklung der Biotechnologie gewann die Zellkultur, auch die pflanzliche Zell- und Gewebekultur, in der letzten Dekade des 20. Jahrhunderts ständig an Bedeutung. Konzentrierte sich das Interesse der Zellbiologen und Mediziner ursprünglich nur auf die Vorgänge in der einzelnen Zelle, untersucht man heute auch komplizierte Zusammenhänge in Zellverbänden und Geweben. Diese lassen sich meist nur in mehrschichtigen Cokulturen studieren, in denen z. B. sowohl Epithelzellen als auch Bestandteile ihrer natürlichen Umgebung (Basallamina, extrazelluläre Matrix, Fibroblasten) vorhanden sein müssen.

Schließlich sei noch darauf hingewiesen, dass die Zellkultur das Leiden von Tieren verringern hilft, indem sie Tierversuche überflüssig macht. Laut einer Statistik des Bundeslandwirtschaftsministeriums konnte die Zahl der Tierversuche in Deutschland von 1989 bis 1997 um mehr als 40% reduziert werden. Im Jahr 1996 wurden knapp 1,5 Mio Wirbeltiere in der Arzneimittelforschung „verbraucht“. Diese Zahl erscheint riesig, im Vergleich zur Situation vor 20 Jahren ist das jedoch eine Reduzierung um ca. 3 Mio Tiere pro Jahr. Es darf dennoch nicht verschwiegen werden, dass aufgrund der neuen EU-Chemikalienpolitik, die für Tausende von Stoffen neue toxikologische Untersuchungen vorsieht, seit Anfang der 1990er Jahre die Zahl der Versuchstiere wieder auf mehr als 2 Mio pro Jahr angewachsen ist. Die Bedeutung der Zellkultur als Alternative zu Tierversuchen wächst dennoch ständig. So stellte die EU-Kommission im Jahr 2003 neue Arzneimitteltests auf der Basis von Zellkulturen vor, die preiswerter und genauer sein sollen als der herkömmliche Test an Kaninchen.

Die moderne Zellkultur hat die Kinderkrankheiten ihrer Anfangsphase weit hinter sich gelassen und ist zu einem unverzichtbaren Werkzeug nicht nur für die Biologie und Medizin geworden. Zellkulturen werden zunehmend auch für technische Fragestellungen, z. B. in der Biotechnologie, Gentherapie oder in der Materialforschung eingesetzt. Sie werden sich auch in Zukunft weiterentwickeln und ein spannendes Betätigungsfeld nicht nur für Zellbiologen bleiben.

2

Das Zellkulturlabor und seine Einrichtung

2.1

Was ist ein Laboratorium?

Wie jedes andere Gewerbe benötigt auch die praktische wissenschaftliche Tätigkeit einen geeigneten Arbeitsraum, ein Laboratorium oder Labor.

Unter einem Labor im Allgemeinen verstehen wir einen Raum, in dem von Fachleuten oder unterwiesenen Personen Arbeiten zur Erforschung und Nutzung medizinischer, naturwissenschaftlicher oder technischer Vorgänge durchgeführt werden.

Nicht selten wird das Labor auch zu Ausbildungszwecken genutzt. Den für den Umgang mit lebenden Zellen geeigneten Arbeitsbereich bezeichnen wir als Zellkulturlabor.

Als die Wissenschaftler ihr Labor noch im Straßenanzug mit Zylinder und Monokel betraten, gab es kaum Vorschriften darüber, wie ein Labor einzurichten sei. Inzwischen hat die Bürokratie eine Vielzahl an Normen, Rechtsvorschriften, technischen Regeln, Verordnungen, nationalen Gesetzen und EU-Richtlinien produziert, mit denen sich die Betreiber von Forschungsstätten bei der Ausstattung von Laboratorien befassen müssen. Die überwiegende Mehrheit des Laborpersonals wird kaum mit der Neueinrichtung eines Zellkulturlabors beauftragt werden und die rechtlichen Grundlagen in ihrem vollen Umfang würdigen können. Meist sind die Arbeitsbedingungen, unter denen Zellkultur betrieben werden soll, bereits vorgegeben. Dennoch sollten wir uns die wichtigsten Grundanforderungen an die Einrichtung eines Zellkulturlabors vergegenwärtigen, um gegebenenfalls Mängel erkennen und beseitigen zu können.

2.2

Allgemeine Ausstattung eines Zellkulturlabors

Wie wir noch sehen werden, erfordert die Arbeit mit Zellen zum Teil sehr unterschiedliche Laborstandards. Schon wenn wir uns in einer Forschungseinrichtung nach der Lage des Zellkulturlabors erkundigen, fällt auf, dass dieser Arbeitsbereich gewöhnlich nicht in ein molekularbiologisches oder genetisches Labor integriert ist. Meist werden wir einen separaten Raum vorfinden, der einen etwas abgescho-

teten Eindruck auf den Besucher macht. Dieser Umstand ist kein Zeichen dafür, dass es sich bei den Zellbiologen um ausgesprochen eigenbrötlerische Naturen handelt. Die Gründe für die Lage des Zellkulturlabors, abseits der anderen Laborräume, liegen vielmehr in den besonderen Ansprüchen und Notwendigkeiten, die sich zwangsweise aus dem Umgang mit lebenden Zellen ergeben.

Zunächst muss der Laborraum genügend Bewegungsfreiheit, StellflächeGeräte sowie genug Stauraum für Verbrauchsmaterial bieten. Bei einem völlig mit Geräten zugestellten Labor und so engen Verkehrswegen, dass sich ein Mensch mit durchschnittlicher Körpergröße nur unter äußerster Anstrengung hindurchzuwinden vermag, versteht es sich von selbst, dass unter derartigen Verhältnissen viele Bestimmungen zur Arbeitssicherheit außer Kraft gesetzt sind. Hier kann es nicht ausbleiben, dass Arbeitsfreude und Motivation der Mitarbeiter auf der Strecke bleiben. Allen im Labor arbeitenden Personen sollte eine ausreichend bemessene Arbeits- und Verkehrsfläche zustehen. Die Bewegungsfläche (auch Bedienfläche genannt) vor einem Labortisch muss mindestens 0,45 m und die Verkehrsfläche (d. h. die Wege durch das Labor) mindestens 0,55 m Breite aufweisen (Abb. 2.1 a und b). Je nach Anzahl der im Labor arbeitenden Personen oder der Verteilung der Labormöblierung im Raum muss die Verkehrsfläche entsprechend großzügiger bemessen sein.

Darüber hinaus hat der Betreiber für ausreichend Flucht- und Rettungswege zu sorgen und diese eindeutig und dauerhaft kenntlich zu machen. Diese lebensrettenden Einrichtungen dürfen auf keinen Fall blockiert werden, zum Beispiel mit einer davor abgestellten 80 kg schweren Kohlendioxidflasche. Die Türen zum Laborbereich dürfen nur nach außen aufschlagen, da es ansonsten im Falle einer Havarie zu dem gefürchteten „Diskothekeneffekt“ (mehrere Flüchtende behindern sich gegenseitig und geraten in Panik) kommen könnte. Ferner müssen Sichtfenster in den Türfüllungen ungehinderten Ein- und Ausblick gewähren. Mitunter werden Laborunfälle nur von den außen Vorübergehenden bemerkt. Es wäre also sträflich leichtsinnig, das Sichtfenster mit den Urlaubsgrüßen der Kolleginnen und Kollegen, Plakaten o. ä. zu verdecken. Bewusstlose oder verletzte Personen könnten im Ernstfall nicht rasch genug geborgen und versorgt werden.

Eine angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor ist nicht überall eine Selbstverständlichkeit. Sowohl hohe Lufttemperaturen wie im Treibhaus als auch ähnlich niedrige Temperaturen wie im Iglu sind nicht selten anzutreffen und beeinträchtigen das Wohlbefinden und die Gesundheit der Betroffenen. Es trifft zwar zu, dass das Arbeiten im Tageslicht angenehmer ist als an einem fensterlosen Arbeitsplatz im Keller. Intensive Sonnenbestrahlung, vor allem im Sommer, sorgt jedoch zusammen mit der unvermeidlichen Abwärme zahlreicher elektrischer Geräte schnell für Temperaturen jenseits der 30 °C-Marke. Man halte nur die Hand über das Lampenhaus eines Mikroskops, um zu ahnen, wie viel elektrische Energie im Labor als „Wärmeabfall“ anfällt. In einem Labor, das auf der gesamten Ost- und Südseite bis zur Decke reichende Panoramafenster, aber keine Klimaanlage hat, wird der Vorsatz, stets mit Schutzkleidung zu arbeiten, auf eine harte Probe gestellt.

Da sich aus Gründen, die später noch Erwähnung finden werden, beim Arbeiten mit Zellkulturen das Öffnen der Fenster verbietet, sollten zumindest elektrisch betriebene Rollos oder Blenden vorhanden sein, die je nach Sonneneinstrahlung he-



(a)



(b)

Abb. 2.1 Doppelarbeitsstisch mit großzügiger Verkehrsfläche.

rabgelassen werden können. Sonnenblenden an der Fensteraußenseite sind übrigens weitaus effektiver, da sie die Sonnenstrahlen bereits vor der Fensterscheibe abweisen und somit einer Aufheizung vorbeugen. Innenrollos verdunkeln zwar den Raum, verhindern jedoch kaum den unerwünschten Temperaturanstieg. Technische Lüftungseinrichtungen einen achtfachen Luftwechsel pro Stunde erlauben, kombiniert mit einer Klimaanlage, bieten derzeit den höchsten Komfort. Allerdings muss dafür Sorge getragen werden, dass die Systeme einwandfrei eingeregelt und justiert sind, da ansonsten der gegenteilige Effekt auftritt. Unangenehm kalte Zugluft im Labor ist der Gesundheit ebenso unzutraglich wie Cabrio fahren im November.

Aus Großraumbüros ist bekannt, dass Lüftungs- und Klimaanlage zu regelrechten Keimschleudern werden können. Da der Eintrag von Staub und somit auch von Keimen in ein Zellkulturlabor so gering wie möglich gehalten werden sollte, muss die zugeführte Luft einen Filter passieren, der die Kleinstpartikel erfolgreich zurückhält.

Die bisher angeführten Beispiele gelten für Laboratorien im Allgemeinen. Da die biologischen Arbeitsstoffe, mit denen wir experimentieren, mit unterschiedlichen Risiken behaftet sein können, werden wir uns in Kapitel 3 ausführlicher mit den speziellen Anforderungen an ein Zellkulturlabor zu beschäftigen haben.

2.3

Die Arbeitsbereiche eines Zellkulturlabors

In einem Zellkulturlabor müssen die unterschiedlichsten Arbeitsgänge sinnvoll miteinander kombiniert und durchgeführt werden. Es kann deshalb keine in sich geschlossene Raumeinheit darstellen. Wie wir in Kapitel 3 noch sehen werden, besitzt das Thema Sterilität an unserem Arbeitsplatz einen Stellenwert, der nicht hoch genug eingeschätzt werden kann. Im Gegensatz zu anderen Labors, wo die Gerätschaften nur einen hinreichenden Sauberkeitsgrad aufweisen müssen, ist die Zellkultur auf absolute Sterilität angewiesen. Dazu zählen zum einen Präparierbesteck, Pipetten und Flaschen, zum anderen Flüssigkeiten und Substanzen, mit denen die Zellen in unmittelbarem Kontakt kommen. Damit diese Arbeitsmittel jederzeit in der gewünschten Qualität zur Verfügung stehen, bedarf es spezieller Vorbereitungen, die in eigens dafür eingerichteten Arbeitsbereichen getroffen werden. Wir wollen uns in den folgenden Abschnitten näher mit deren Sinn und Zweck beschäftigen. (Da ein näheres Eingehen auf technische und physikalische Details den begrenzten Rahmen dieses Buchs sprengen würde, seien dem interessierten Leser die Fachliteratur über Gerätetechnik, die Broschüren der Internationalen Vereinigung für Soziale Sicherheit (IVSS) sowie der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie empfohlen.)

2.3.1

Der Reinigungsbereich

Die Reinigung und Sterilisation von Laborutensilien erfolgt häufig in einer Spülküche. Sie kann in einer zentralen Serviceeinheit untergebracht sein. Große Zellkul-

turlabors verfügen mitunter über separate Spülküchen, wo ausschließlich Gebrauchsmaterial für ihren speziellen Bedarf behandelt wird. Aus der Sicht des Zellzüchters besitzt eine solch exklusive Reinigungseinrichtung natürlich viele Vorzüge: Das gesamte Inventar ist auf seine Bedürfnisse abgestimmt, das Personal weiß, worauf es ankommt und er braucht sich nicht „hinten anzustellen“.

Reinigung

Da zentrale Spülküchen auch andere Labors bedienen, deren Ansprüche an die Reinheit nicht ganz so hoch sein müssen, sollten wir dafür Sorge tragen, dass unsere Wünsche gewissenhaft erfüllt werden. Wer möchte schon ein teures Auto oder ein rassiges Motorrad einer nicht ordentlich geführten Hinterhofwerkstatt überantworten? Beginnen wir also damit, dass wir die Spülküche gründlich inspizieren:

- Macht der Raum einen sauberen und aufgeräumten Eindruck?
- Sind Fußboden und Wände gefliest?
- Gibt es einen Wasserabfluss im Boden?
- Ist für einen wirksamen Dampfabzug gesorgt?
- Wird die vorgeschriebene Wasserqualität (z. B. aqua purificata) verwendet?
- Sind die für unsere Zwecke geeigneten Reinigungs- und Trocknungsautomaten vorhanden?

Falls wir in Zweifel ziehen müssen, dass diese Punkte erfüllt werden, besteht die Gefahr, dass wir unsere Zellkulturflaschen nur unzureichend sauber zurückbekommen. Eine unsaubere Spülküche mit „permanenter Waschküchenatmosphäre“ verkommt rasch zur Brutstätte für Wärme und Feuchtigkeit liebende Pilze. Über kontaminierte Laborutensilien würden diese Keime ständig in unsere Kulturen gelangen und zu einem lang anhaltenden, frustrierenden Ärgernis werden.

Die Anforderungen an die Reinheit von Laborglas können sehr unterschiedlich sein. Zwar ist das Reinigen von Laborglas auch manuell möglich, ein Höchstmaß an Sicherheit und Sauberkeit gewährleistet jedoch nur das maschinelle Verfahren, da sich der Reinigungsablauf dokumentieren und nachprüfen lässt. Gerade die Biotechnologie stellt an die rückstandsfreie Reinigung von Glaswaren höchste Ansprüche. Es ist deshalb ratsam, das Spülküchenpersonal über den besonderen Status unserer Glaswaren zu informieren. Werden sie zusammen mit gewöhnlichen Laborgläsern gereinigt, können Rückstände des aggressiven Spülmittels am Glas haften bleiben. Später, wenn wir zum Beispiel Nährmedium darin aufbewahren, können diese in Lösung gehen. Selbst Spuren von Detergenzien beeinflussen beispielsweise die Enzymreaktionen von Zellen und lassen die Kulturen absterben. Wir tun also gut daran, die Spülküche darauf hinzuweisen, die Zellkulturgläser separat zu spülen und spezielle Reinigungs- und Neutralisationsmittel zu verwenden. Es empfehlen sich alkalische Reiniger ohne Tenside und saure Neutralisatoren (z. B. auf der Basis von Zitronensäure), frei von Phosphaten, stickstoffhaltigen Komplexbildnern und Tensiden. Bei biologisch kontaminiertem Laborglas mit infektiösen Rückständen ist zudem eine chemische Desinfektion mit fungiziden, bakteriziden und Virus inaktivierenden Reinigungsmitteln vorgeschrieben. Diese Spülmittel sind im Laborbedarfshandel erhältlich. Hersteller von Laborspülma-