

Inhaltsverzeichnis

	Vorwort	VI
	Danksagungen	VII
1	Die Geschichte der Zellkultur	1
	Meilensteine in der Zellkultur	1
2	Zellbiologische Grundlagen	9
2.1	Die Entdeckung des Hayflick-Limits	9
2.2	Zelluläre Seneszenz <i>in vitro</i>	12
2.3	Der Zellzyklus	14
	2.3.1 Die Phasen des Zellzyklus	14
	2.3.2 Die Regulation des Zellzyklus	17
2.4	Zelltod	22
	2.4.1 Mord oder Selbstmord – das ist hier die Frage	22
	2.4.2 Phasenverlauf der Apoptose	25
	2.4.3 Schlüsselmoleküle der Apoptose	25
	2.4.4 Signalwege der Apoptose	27
2.5	Krebsentstehung	30
	2.5.1 Fehlregulation des Zellzyklus	31
	2.5.2 Fehlregulation der Zelltodmechanismen	32
	2.5.3 Immortalisierung	33
3	Was braucht man für die Einrichtung eines Zellkulturlabors?	39
3.1	Räumlichkeiten	39
	3.1.1 Der Reinigungsbereich	39
	3.1.2 Der Vorbereitungsbereich	40
	3.1.3 Der Sterilbereich	40
3.2	Geräte für den Sterilbereich	41
	3.2.1 Mikrobiologische Sicherheitswerkbank und Reinraumwerkbank	41
	3.2.2 Der Brutschrank	44
	3.2.3 Weitere im Sterilbereich benötigte Geräte	47
3.3	Zellkulturgefäße	49
3.4	Kostenübersicht	49
4	Relevante Regelwerke	51
4.1	Allgemeine Regelwerke für den Laborbetrieb	51
	4.1.1 Biostoffverordnung (BiostoffV)	52
	4.1.2 Gefahrstoffverordnung (GefStoffV)	55
	4.1.3 Gentechnikgesetz (GenTG)	59
4.2	Richtlinien und Grundsätze	63
	4.2.1 Gute Laborpraxis	63
	4.2.2 Gute Zellkulturpraxis	67
4.3	DIN-Normen	68
	4.3.1 DIN EN 12469	68
	4.3.2 DIN 12980	69
4.4	Spezielle Regelwerke für den Laborbetrieb	70

4.4.1	Verordnung zum Schutz der Mütter am Arbeitsplatz (Mutterschutzrichtlinienverordnung)	70
5	Zellkulturen, Zelllinien und deren Einsatzmöglichkeiten	73
5.1	Welche Arten von Zellkulturen gibt es?	73
5.1.1	Die Primärkultur	74
5.1.2	Die permanente Zellkultur	76
5.1.3	H-TERT-immortalisierte Zelllinien	78
5.1.4	Adhärente Zellkultur und Suspensionskultur	80
5.2	Morphologische Merkmale von Zellkulturen	80
5.2.1	Epithelzellen	81
5.2.2	Endothelzellen	83
5.2.3	Bindegewebszellen	84
5.3	Einsatzmöglichkeiten für Zellkulturen	86
5.4	Zellkultursysteme als Ersatz für Tierversuche	87
6	Steriltechnik und Subkultur	91
6.1	Aseptische Arbeitsweise	91
6.1.1	Arbeiten unter der Sicherheitswerkbank	92
6.2	Sterilisationsverfahren	95
6.2.1	Verfahren mit feuchter Hitze	96
6.2.2	Verfahren mit trockener Hitze	98
6.2.3	Sterilfiltration	100
6.2.4	Sterilisation durch Strahlung	100
6.3	Mediumwechsel und Subkultur	102
6.3.1	Mediumwechsel	102
6.3.2	Subkultur	103
7	Medien	107
7.1	Basalmedien und Minimalmedien	107
7.1.1	BME	107
7.1.2	MEM (Eagle's MEM)	107
7.1.3	Alpha MEM	107
7.1.4	DMEM	108
7.1.5	HAM's F-10 und F-12	108
7.1.6	5a-Medium und McCoy's 5a	108
7.1.7	RPMI 1640	109
7.1.8	L-15-Medium (Leibovitz's Medium)	109
7.2	Komplett- und Fertigmedien	109
7.2.1	Chang-Medium BMC und MF	110
7.2.2	AmnioGrow Plus	110
7.2.3	Medien für die Chromosomenanalyse	110
7.3	Definierte, serumfreie und proteinreduzierte Medien	111
7.3.1	Medium 199	111
7.3.2	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	111
7.3.3	MCDB-Medien	111
7.3.4	MegaCell und Advanced Medien	112
7.3.5	PANSERIN-Medien	114
7.4	Thermostabile Medien	114

7.5	Zelltypspezifische Spezialmedien	115
7.5.1	Insektenmedien	115
7.5.2	Makrophagenmedien	115
7.5.3	Endothelmedien	115
7.5.4	Stammzellmedien	116
7.5.5	Medien für die Embryokultur	116
8	Zellkultursupplemente und andere Zusätze	119
8.1	Seren	119
8.1.1	Definiertes Serum	120
8.1.2	Serumersatz	121
8.1.3	Hitzeinaktivierung von Serum	122
8.2	Aminosäuren	123
8.3	Natriumhydrogencarbonat	124
8.4	Salze und Puffer	125
8.5	Antibiotika	126
8.6	Antimykotika	129
8.7	Antibiotikum-Antimykotikum-Kombinationsprodukte	130
9	Adhäsion und Detachment	131
9.1	Die extrazelluläre Matrix und ihre Bedeutung für die Zell-Matrix-Adhäsion	131
9.2	Zelluläre Adhäsionsmoleküle	136
9.3	Zell-Substrat-Adhäsion	138
9.4	Detachment	139
9.4.1	Detachment-Lösungen	139
10	Kontaminationen in der Zellkultur	145
10.1	Mycoplasmen	145
10.2	Andere Bakterien	150
10.3	Bakterielle L-Formen	152
10.4	Nanobakterien	153
10.5	Pilze und Hefepilze	155
10.6	Hefen	157
10.7	Viren	158
10.8	Kreuzkontaminationen und falsch identifizierte Zelllinien	160
10.8.1	Kreuzkontaminationen	161
10.8.2	Falsch identifizierte Zelllinien	161
10.9	Zum Schluss	162
11	Diagnose und Beseitigung von Kontaminationen	165
11.1	Mycoplasmen	166
11.1.1	Diagnose von Mycoplasmen	166
11.1.2	Beseitigung von Mycoplasmen	177
11.2	Bakterien	179
11.2.1	Diagnose von Bakterien	179
11.2.2	Beseitigung von Bakterien	180
11.3	Bakterielle L-Formen	182
11.3.1	Diagnose von L-Bakterien	182
11.3.2	Beseitigung von L-Bakterien	182

11.4	Nanobakterien	183
11.4.1	Diagnose von Nanobakterien	183
11.4.2	Beseitigung von Nanobakterien	184
11.5	Pilze, Hefepilze und Hefen	185
11.5.1	Diagnose von Pilzen, Hefepilzen und Hefen	185
11.5.2	Beseitigung von Pilzen, Hefepilzen und Hefen	186
11.6	Viren	187
11.6.1	Diagnose von Viren	187
11.6.2	Beseitigung von Viren	189
11.7	Kreuzkontaminationen und falsch identifizierten Zelllinien	189
11.7.1	Diagnose von Kreuzkontaminationen und falsch identifizierte Zelllinien	190
11.7.2	Beseitigung von Kreuzkontaminationen und falsch identifizierten Zelllinien	191
12	Kryokonservierung und Langzeitlagerung von Zellen.	193
12.1	Grundlagen des Tiefgefrierens.	193
12.2	Gefrierschäden	195
12.3	Gefrierschutzmittel	196
12.3.1	Penetrierende Gefrierschutzmittel	197
12.3.2	Nicht penetrierende Gefrierschutzmittel	199
12.4	Einfrieren von Zellen	199
12.4.1	Vorbereitende Arbeiten.	200
12.4.2	Einfriermedium	200
12.5	Lagerung von eingefrorenen Zellen.	202
12.6	Auftauen von Zellen.	202
12.7	Geräte für die Kryokonservierung	203
12.8	Kontaminationsrisiko	205
13	Zellbiologische und Routinemethoden.	207
13.1	Zellzählung	207
13.1.1	Kombinierte Zellzählung und Vitaltest mit Trypanblau im Häemocytometer	207
13.1.2	Automatisierte Zellzählung mit einem Zellzählgerät.	210
13.2	Zellvitalität und Cytotoxizität von Testsubstanzen	212
13.2.1	LDH-Test	212
13.2.2	XTT-Test	214
13.3	Populationsverdopplungszeit	216
13.4	Darstellung und Anfärbung von Chromosomen	217
13.4.1	Historisches zur Entdeckung der Chromosomen und zur Entwicklung der Präparationstechnik	218
13.4.2	Das Prinzip der Methode	219
	Was bewirkt die hypotone Lösung?	220
	Was bewirkt die Fixierung?	221
	Standardprotokoll für die Chromosomenpräparation aus einer primären Lymphocytenkultur	222
	Nützliche Hinweise	223
13.4.3	Giemsa-Färbung	223
13.4.4	Bestimmung des mitotischen Index	225

14	Moderne Techniken in der angewandten Zellkultur	227
14.1	Downregulation von Genen durch RNA-Interferenz (RNAi)	227
14.1.1	Die Entdeckung von RNAi	228
14.1.2	Wie funktioniert der RNAi-Mechanismus?	228
14.1.3	Durchführung eines RNAi-Experiments	229
14.1.4	Kritische Punkte in einem RNAi-Experiment	235
14.1.5	Schlussbemerkungen	236
14.2	<i>In vitro</i> -Differenzierung am Beispiel mesenchymaler Stammzellen	237
14.2.1	Was sind Stammzellen?	237
14.2.2	Mesenchymale Stammzellendifferenzierung	238
14.2.3	Schlussbemerkungen	243
15	Fortbildungsmöglichkeiten	245
15.1	Institut für Biologie und Medizin (IFBM)	245
15.2	Institut für angewandte Zellkultur (IAZ)	246
15.3	<i>in vitro</i> -Institut für Molekularbiologie	247
15.4	PromoCell Academy	248
15.5	IBA Akademie	249
15.6	Klinkner & Partner	249
16	Nützliche Adressen und Informationen	251
16.1	Zellbanken für die Beschaffung von Zellen	251
16.1.1	American Type Culture Collection (ATCC)	251
16.1.2	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	252
16.1.3	European Collection of Cell Cultures (ECACC)	252
16.1.4	Humane Brustkrebszelllinien der Universität von Michigan (SUM-LINES)	252
16.1.5	Interlab Cell Line Collection (ICLC)	253
16.1.6	Coriell Cell Repositories	253
16.1.7	Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB)	253
16.1.8	National Laboratory for the Genetics of Israeli Populations	254
16.1.9	Common Access to Biological Resources and Information (CABRI)	254
16.1.10	Culture Collection University of Göteborg (CCUG)	255
16.2	Dienstleistungen rund um die Zellkultur	255
16.2.1	Institut für angewandte Zellkultur (IAZ)	255
16.2.2	Cell Culture Service (CCS)	255
16.2.3	Minerva Biolabs	256
16.2.4	Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT)	256
16.2.5	Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM)	257
16.3	Datenbanken	257
16.3.1	Cell Line Database (CLDB)	258
16.3.2	European Searchable Tumor Line Database (ESTDAB)	258
16.3.3	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD)	258
16.4	Gebrauchte Laborgeräte	259
16.4.1	AnaKat Institut für Biotechnologie	260

16.4.2	Laborgerätebörse	261
16.4.3	Simec	261
16.4.4	TECHLAB	261
16.5	Weitere nützliche Adressen	261
16.5.1	Relevante Regelwerke für die Arbeit mit Zellkulturen.....	261
16.5.2	Der Experte für Nanobakterien in Europa	262
16.5.3	Anbieter für Ultra-Tiefkühltruhen	262
Anhang		
	Geräte für die Zellkultur	263
	Index	281