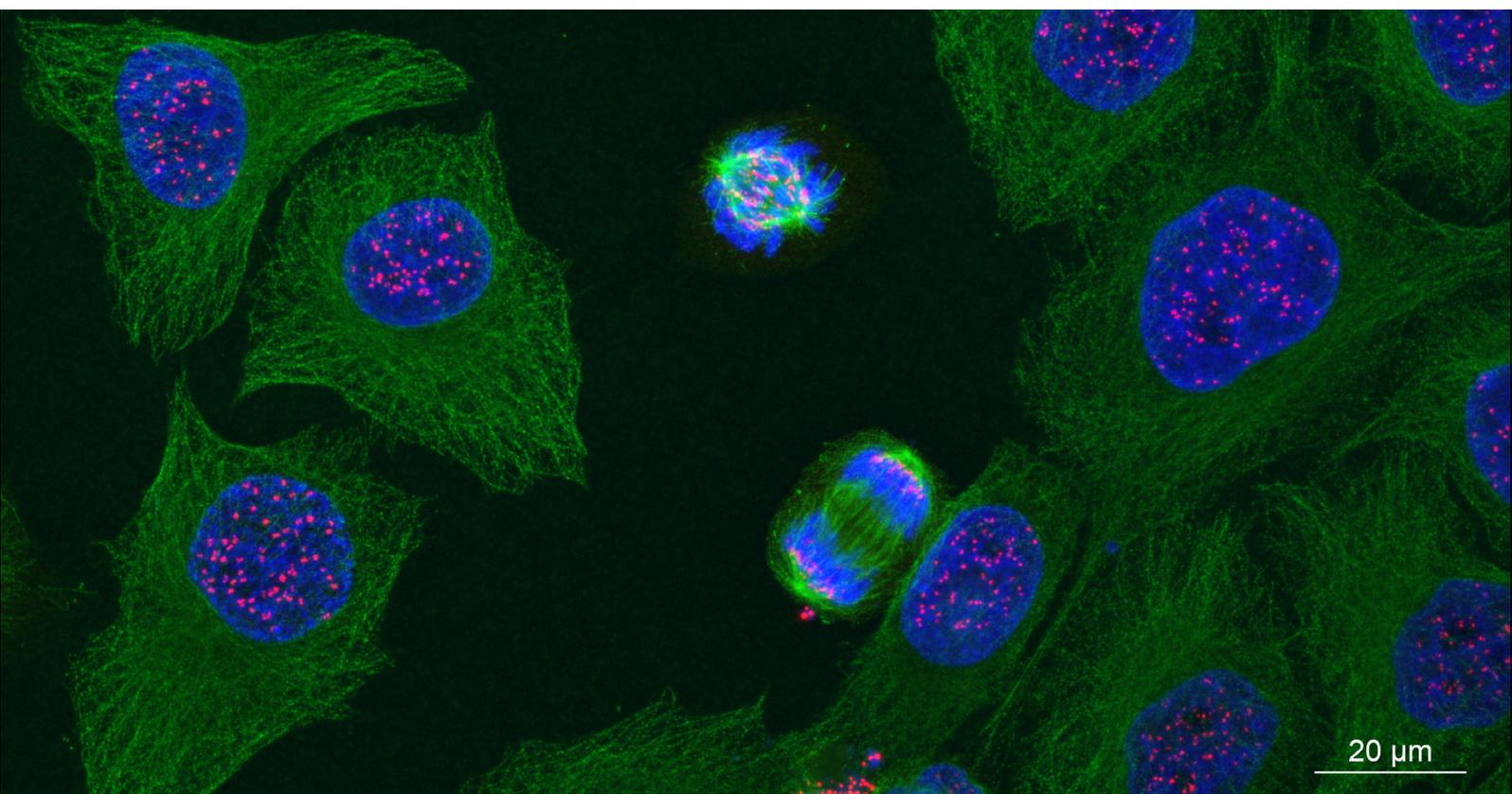


Die meistgenutzten unsterblichen Zelllinien

Eine Einführung



Seeing beyond

Autoren: Dr. Johannes Amon
Der Kommunikator & BitesizeBio, München

Anke Koenen
Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena

Datum: Juli 2022

Unsterbliche Zelllinien werden in der Forschung häufig anstelle von Primärzellen genutzt. Sie bieten einige Vorteile: Sie sind kosteneffektiv, einfach zu verwenden, stellen einen unbegrenzten Materialnachschub zur Verfügung und vermeiden das ethische Dilemma, das mit der Nutzung von tierischem oder menschlichem Gewebe einhergeht. Durch Zelllinien lassen sich außerdem reine Zellpopulationen anlegen, was konsistente Proben und reproduzierbare Ergebnisse ermöglicht. Zelllinien haben die naturwissenschaftliche Forschung revolutioniert: Sie werden bei der Herstellung von Impfstoffen und Antikörpern, der Untersuchung von Arzneimittelmetabolisierung und Zytotoxizität, der Erforschung genetischer Funktionen, der Herstellung von künstlichem Gewebe (z. B. künstliches Hautgewebe) oder auch bei der Synthese von Biomolekülen (z. B. therapeutische Proteine) genutzt. Dieser Ratgeber von ZEISS stellt Ihnen die Grundlagen für die Arbeit mit Zelllinien vor. Ergänzt wird der Überblick mit interessanten Hintergrundinformationen und hilfreichen zusätzlichen Ressourcen.

Es ist an der Zeit, unsere Zellen besser zu kultivieren und von 2D- zu 3D-Modellen überzugehen. Wir müssen versuchen, die Umgebung, in der die Zellen normalerweise leben, genauer zu simulieren. Dann können wir die Umgebung verändern, um Krankheiten nachzuahmen.“ [1]

Menschliche Primärzellen und unsterbliche Zelllinien – ein Vergleich

Um die Entstehung von Krebs zu erforschen und Krebstherapien bzw. die Toxizität von Präparaten und Medikamenten zu testen, nutzen Forscher üblicherweise Zelllinien als Modell für gesundes oder erkranktes Gewebe. Die Entscheidung, ob menschliche Primärzellen oder unsterbliche Zelllinien verwendet werden sollen, hängt von verschiedenen Faktoren ab.

Menschliche Primärzellen werden direkt dem Gewebe gesunder Spender, gespendeten Organen, chirurgischen Proben, fetalem Gewebe oder Verstorbenen entnommen und anschließend in Kultur gebracht. Sie verfügen über dieselbe Morphologie und denselben Phänotypen wie ihre Quelle, können aber auch problematisch sein. Primärzellen in Kultur verfügen häufig nur über eine begrenzte Zahl an Zellzyklen und sterben nach einer gewissen Lebensdauer. Mit fortschreitender Zellalterung zeigen sich außerdem morphologische und funktionelle Veränderungen. Des Weiteren ist auch die Quelle menschlicher Primärzellen begrenzt – möglicherweise kann man kein weiteres Material vom selben Spender erhalten. Dies würde der Wiederholung des Experiments an identischen Zellen durch die Forscher oder der Nutzung derselben Zellen für weitergehende Studien oder Langzeitexperimente entgegenstehen. Hinzu kommt, dass unterschiedliche Zellarten auch unterschiedliche Nährmedien benötigen, um wachsen und überleben zu können.

Weitere Informationen zu primären menschlichen Zelllinien finden Sie bei Richter et al., *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021. [2]

Mit **unsterblichen Zellen** lassen sich diese Probleme größtenteils umgehen. Forscher, die grundlegende biologische Prozesse untersuchen, zelluläre Funktionen manipulieren, neue Methoden umsetzen oder Vor-Screenings durchführen möchten, entscheiden sich meistens für die Nutzung immortalisierter Zelllinien als einfache, kostengünstige und stabile Plattform. Diese werden längere Zeiträume lang unter kontrollierten äußeren Bedingungen in speziellen Gefäßen kultiviert, z. B. Petrischalen, Flaschen oder Multiwellplatten. Kulturmedien mit Nährstoffen und optionalen Zusätzen schaffen die notwendigen Bedingungen für ein optimales Zellwachstum. Unsterbliche Zellen teilen sich unendlich oft, sodass jederzeit ein konstantes Angebot an schnell wachsenden Zellen für Experimente vorhanden ist. Unsterbliche Zellen wurden zuerst in den Fünfzigern des vergangenen Jahrhunderts entdeckt: die bekannte HeLa-Zelllinie. Der Zellbiologe George Otto Gey nahm eine Krebszelle von Henriette Lacks, ermöglichte dieser Zelle das Wachstum und fand schließlich heraus, dass die Zellkultur unendlich lang überleben kann, wenn man ihr Nährstoffe zur Verfügung stellt und eine geeignete Umgebung schafft. Da die ursprünglichen Zellen mit der Zeit einige Mutationen durchliefen, sind heute mehrere verschiedenen Subtypen von HeLa-Zellen vorhanden. Sie alle stammen jedoch von derselben einzelnen Tumorzelle ab.



Abbildung 1 Statue von Henrietta Lacks. Copyright: University of Bristol [3]

	Menschliche Primärzellen	Unsterbliche Zelllinien
Herkunft und Verfügbarkeit	Aus gesundem oder krebsbefallenem Gewebe isoliert, begrenzte Verfügbarkeit	Stammt von einer ursprünglichen Zellkultur ab, käuflich zu erwerben
Eigenschaften und Anwendungen	Genetische Zusammensetzung ist dieselbe wie bei der Gewebequelle; zur Untersuchung der Biologie von Zellen und Gewebe, für pharmazeutische und medizinische Tests	Einheitliche genetische Zusammensetzung über alle Zellen hinweg; konsistente und reproduzierbare Ergebnisse für Impfstoff- und Antikörperproduktion sowie zur Untersuchung genetischer Funktionen
Kultur und Handhabung	Kulturen erfordern spezielle Medien und abgestimmte Bedingungen, schwierige Handhabung	Standard-Nährmedien und -Bedingungen, einfache Handhabung
Morphologie und Phänotyp	Gesunde Zellmorphologie, kann ursprünglichen Phänotyp für eine begrenzte Zeit erhalten	Wichtige morphologische Merkmale fehlen, Veränderungen des Phänotyps
Genom und Seneszenz	Genetisch stabil, begrenzte Selbsterneuerung in Kultur	Verändertes Genom, kann gezüchtet und erweitert werden
Reproduzierbarkeit und Relevanz	Geringe Reproduzierbarkeit, höchst relevant in vivo	Hohe Reproduzierbarkeit, wenig relevant in vivo

Tabelle 1 Vergleich von primären Zellkulturen und unsterblichen Zelllinien.

Arten unsterblicher Zelllinien

In Laboren finden sowohl tierische als auch menschliche Zelllinien häufig Anwendung. Der Hauptunterschied besteht in der Größe: Tierische Zellen können unterschiedlich große Genome aufweisen, abhängig von der Spezies. Das Genom einer menschlichen Zelle verfügt über 3 Milliarden Basenpaare. Außerdem hängt die Anzahl proteinkodierender Gene bei einer Tierzelle von der Spezies ab. Das menschliche Genom besteht aus 20.000 bis 25.000 proteinkodierenden Genen.

Forscher verwenden Tierzellen, um eine Vielzahl von Krankheitsmechanismen zu untersuchen und neue Therapieansätze zu bewerten. Neben der Nutzung für Krankheitsmodelle werden viele tierische Zellen auch für bioindustrielle Zwecke genutzt, wie für die Expression rekombinanter Proteine, die Virusproduktion, den Nachweis von Krankheitserregern und die Toxizitätsbestimmung. Tierzellen können auch Einblicke in die Bereiche Entwicklungsbiologie, intrazelluläre Signalübertragung und genetische Evolution geben.

Tierische Zelllinien	Menschliche Zelllinien
CHO (Ovarien des chinesischen Zwerghamsters)	HeLa (Zervixkarzinom)
COS-7 (Niere der grünen Meerkatze)	SH-SY5Y (Neuroblastom)
Vero (Epithelzellen aus der Niere der grünen Meerkatze)	HEK 293 (embryonale Nierenzelle)
MDCK (Madin-Darby Hundenieren-epithelzellen)	MCF-7 (Mammakarzinom)
Sf-9 (Epithelzelle aus Ovarien eines Nachtfalters)	H1, H9 (embryonale Stammzellen)

Tabelle 2 Überblick über ausgewählte tierische und menschliche Zelllinien

Ausgewählte Beispiele

HeLa-Zelllinie

Die HeLa-Zelllinie ist die erste und auch bekannteste unsterbliche Zelllinie. Diese Zelllinie wurde benannt nach Henrietta Lacks, eine afroamerikanische Frau, die am 4. Oktober 1951 an Krebs verstarb. Im Februar 1951 wurden ihr Zellen aus einem Gebärmutterhals-Tumor entnommen und in Kultur gebracht. Die Zelllinie erwies sich als außergewöhnlich langlebig und vermehrungsfreudig, mit nahezu endloser Teilung. HeLa-Zellen wurden zur Entwicklung des erfolgreichen Polio-Impfstoffs genutzt. Auch heute noch ist der HeLa-Stamm die weltweit meistgenutzte Zelllinie in Forschungslaboren.

Anwendung

Obwohl die HeLa-Zellen anfänglich nur in der Krebsforschung zum Einsatz kamen, wurden mit HeLa-Zellkulturen mittlerweile mehr als 100.000 wissenschaftliche Publikationen in verschiedensten Forschungsgebieten erstellt, darunter Krebsforschung, Zellbiologie, Genetik und Infektionskrankheiten. HeLa-Zellen haben zu vielen medizinischen Durchbrüchen und zur Entwicklung von nahezu 11.000 Patenten beigetragen. Sogar für Entdeckungen, die später mit Nobelpreisen gewürdigt wurden, waren HeLa-Zellen von entscheidender Bedeutung.

Highlights medizinischer Durchbrüche durch HeLa-Zellen:

- Entwicklung des Polio-Impfstoffs: Der Polio-Impfstoff wurde schon in den frühen 1950ern von Jonas Salk entwickelt. Er hatte allerdings Mühe, geeignete Verfahren für Feldversuche zu finden. 1952 dann wurde festgestellt, dass HeLa-Zellen eine ideale Quelle für Wirtszellen sind.
- Erforschung von Leukämie
- Verbesserter Umgang mit Zellkulturen: Während der Massenproduktion und des Vertriebs von HeLa-Zellen für Polio-Impfstofftests entwickelten führende Forscher der Tuskegee University neue Protokolle für Zellkulturen, die u. a. die Verwendung von Inkubatoren und neue Versandwege vorsahen.
- Zählung von Chromosomen: 1953 wurden in einem texanischen Labor versehentlich Zelllinien vermischt. In der Folge konnten die Forscher jedes Chromosom in den HeLa-Zellen, mit denen sie arbeiteten, deutlich sehen und zählen. Daraufhin entwickelten Tijo und Levan eine Technik zur Färbung und Zählung von Chromosomen und wiesen so nach, dass menschliche Körperzellen 23 Chromosomenpaare haben. Heute wissen wir, dass eine Abweichung von dieser Zahl mit verschiedenen genetischen Krankheiten einhergeht.
- Genom-Kartierung: 1965 erschufen Harris und Watkins die ersten Hybride aus menschlichen und tierischen Zellen, indem Sie HeLa-Zellen mit Mauszellen kreuzten.
- HPV-Impfstoff: In den 1980ern fand Harald zur Hausen in den Zellen von Henrietta Lacks humane Papillomviren des Typs HPV 18. Diese Entdeckung führte zur Entwicklung der HPV-Impfung.

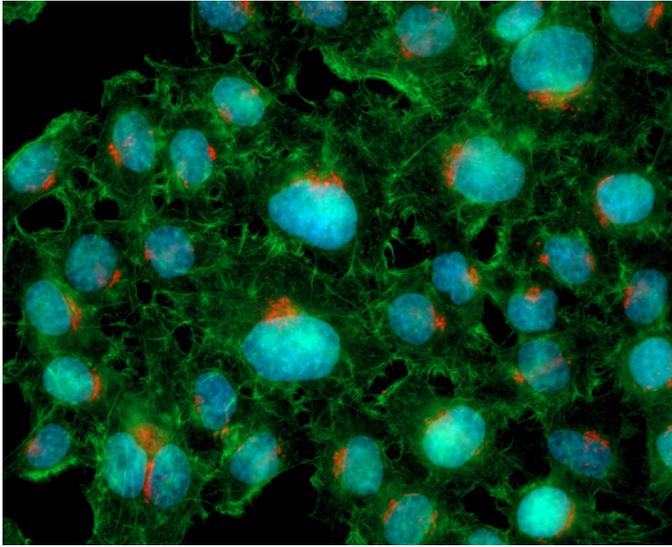


Abbildung 2 Fixierte HeLa-Zellen aus Zellkultur. Blau: DNS (DAPI), grün: F-Aktin (Phalloidin-Alexa Fluor 488), rot: trans-Golgi-Netzwerk (TGN-Alexa Fluor 561).

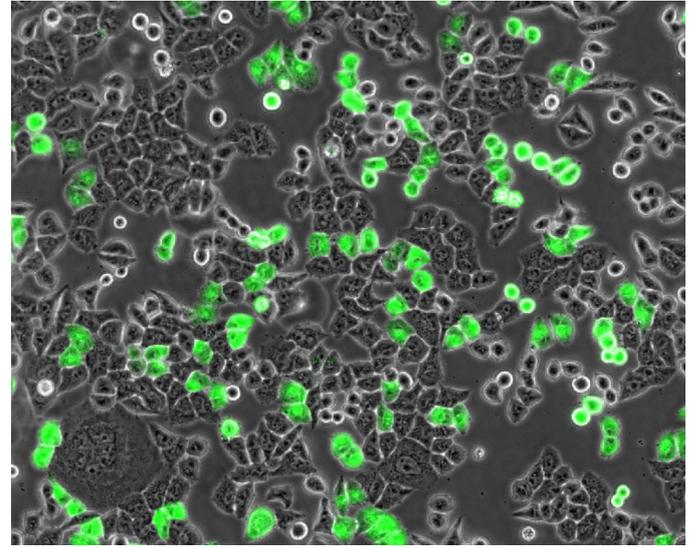


Abbildung 3 HeLa-Zellen mit eingeschleustem GFP-Expressionsplasmid.

Geschichtlicher Exkurs

Es war das Johns Hopkins Hospital in Baltimore, in das Henrietta Lacks ging, nachdem sie einen Knoten in ihrem Unterleib gespürt hatte. Das Krankenhaus wurde 1889 für kranke und ärmere Menschen gebaut und war das einzige größere Krankenhaus in der Region, das auch afroamerikanische Patienten behandelte. Es war nicht ungewöhnlich, dass die Patienten als Forschungsobjekte genutzt wurden – die Ärzte betrachteten dies als angemessene Entschädigung für ihre ansonsten kostenlose Behandlung. Nicht immer wurden die Patienten darüber informiert, dass ihre Daten für die Forschung verwendet wurden.

Lacks Gynäkologe Wesley Telinde hatte eine Theorie über Gebärmutterhalskrebs entwickelt, die im Falle ihrer Richtigkeit die Zahl der Todesfälle durch Gebärmutterhalskrebs drastisch reduzieren hätte können. Während fast alle Experten skeptisch waren, glaubte Telinde, dass das Carcinoma in situ ein Frühstadium des tödlicheren invasiven Karzinoms sei und keine eigenständige Krebsart, die man weniger aggressiv behandeln könne. Er schlug vor, das Carcinoma in situ genauso aggressiv zu behandeln wie invasive Karzinome, um Wachstum und Metastasierung zu verhindern. Um seine Theorie zu beweisen, wollte Telinde im Labor zeigen, dass sich das Carcinoma in situ und das invasive Karzinom gleich verhalten. Er gab eine Probe von Lacks Zervixkarzinom an George Otto Gey, der mit seiner Frau Margaret ein Labor für Gewebekulturforschung betrieb. Die Zellen der Probe sind nicht nur am Leben geblieben, sondern haben sich auch geteilt und alle 24 Stunden ihre Anzahl verdoppelt. Es war die erste menschliche unsterbliche Zelllinie. Bald schon interessierten sich weitere Wissenschaftler für die Entdeckung und George Gey schickte Phiole an Labore auf der ganzen Welt.

HEK 293

Bei HEK 293 handelt es sich um embryonale Epithelzellen aus der menschlichen Niere. Isoliert und erstmals gezüchtet wurden sie in den frühen Siebziger Jahren von dem niederländischen Biologen Alex van der Eb. Sein Postdoc Frank Graham transfizierte die Nierengewebezellen mit Genen des Adenovirus-Typs 5, worauf diese sehr hohe Mengen an rekombinanten Proteinen produzieren. Das Ergebnis war eine pflegeleichte, sich schnell teilende und robuste Zelllinie, die den Ruf hat, sich gut für die posttranslationale Modifikation ihrer heterolog exprimierten Proteine zu eignen. Die Anzahl der Zellen verdoppelt sich etwa alle 36 Stunden. Sie können in Suspension oder als Monoschicht gezogen werden und werden seit vielen Jahren in der zellbiologischen Forschung eingesetzt, da sie stabil wachsen und sich gut für die Transfektion eignen. Wenn sie jedoch über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten werden, verschlechtert sich ihr gesundheitlicher Zustand. Dies kann sich auf die Wachstumsrate und die Translationseffizienz auswirken, sodass Experimente mit HEK-Zellen im Laufe der Zeit weniger zuverlässig werden. Da sie jedoch recht schnell wachsen und einfach zu kultivieren sind, können Forscher einfach neue Zellpassagen anlegen. Für Forscher, die eine Zelllinie benötigen, die große Mengen rekombinanter Proteine produzieren kann, oder als Zellkulturanfänger eine wartungsarme Zelllinie suchen, ist HEK 293 eine gute Wahl.

Anwendung

Aufgrund ihrer Vorteile und Vielseitigkeit ist HEK 293 nach HeLa die am häufigsten genutzte Zelllinie in der Forschung. HEK 293 ist besonders geeignet für:

- Experimente zur transienten und zur stabilen Transformation
- Proteinexpression und -produktion
- Elektrophysiologische Experimente
- Transfektions-Untersuchungen
- Herstellung therapeutischer Proteine und Viren für die Gentherapie

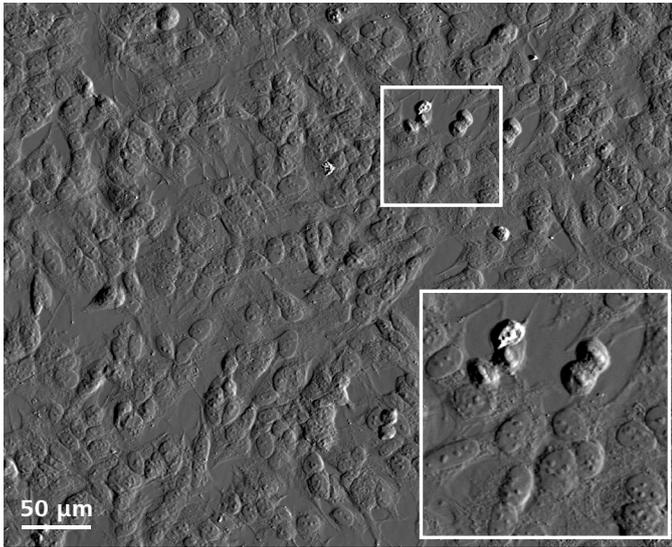


Abbildung 4 SH-SY5Y-Zellen, gezüchtet auf einer 384-Mikrowellplatte. Fünf-Kanal-Bild aus derselben Position, mit Plan-Apochromat 20x/0,95; erweiterte Tiefenschärfe aus Z-Stapel; Phasengradientenkontrast, Overlay-Bild. Probe mit freundlicher Genehmigung von P. Denner, Laboratory Automation Technologies, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE), Bonn.

SH-SY5Y

Ebenfalls in der Forschung verwendet wird SH-SY5Y, eine von menschlichen Zellen abgeleitete Zelllinie. SH-SY5Y entstand durch Subklonierung. Die ursprüngliche Zelllinie, genannt SK-N-SH, wurde aus dem Material einer Knochenmarksbiopsie bei einer vierjährigen Patientin mit Neuroblastom isoliert.

Anwendung

SH-SY5Y-Zellen werden häufig als In-vitro-Modelle für neuronale Funktionen und Differenzierung herangezogen. Die Zellen weisen einen adrenergischen Phänotyp auf, exprimieren aber auch dopaminerge Marker und wurden daher verwendet, um Morbus Parkinson, die Neurogenese und weitere Eigenschaften von Hirnzellen zu erforschen.

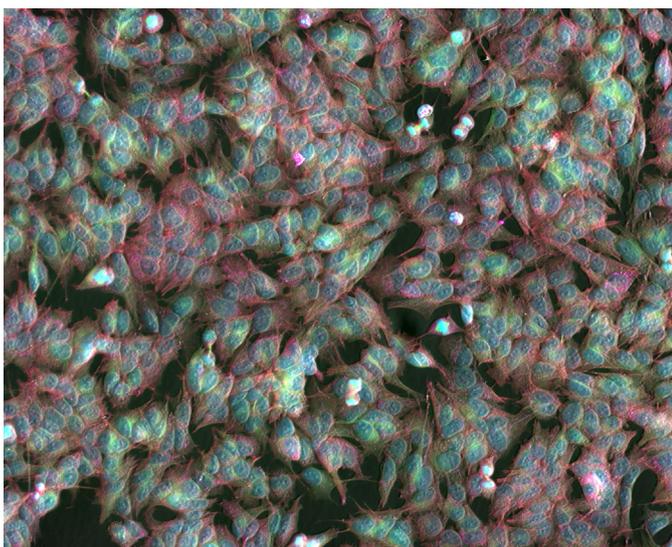


Abbildung 6 SH-SY5Y-Zellen, gezüchtet auf einer 384-Mikrowellplatte. Fünf-Kanal-Bild aus derselben Position, mit Objektiv 20x/0,95. Erweiterte Tiefenschärfe aus Z-Stapel. Hoechst-Chromatin, Anti- α -Tubulin-Antikörper FITC für α -Tubulin (grün), Phalloidin für Aktin (rot), MitoTracker deepRed für Mitochondrien (violett). Probe mit freundlicher Genehmigung von P. Denner, Laboratory Automation Technologies, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE), Bonn.

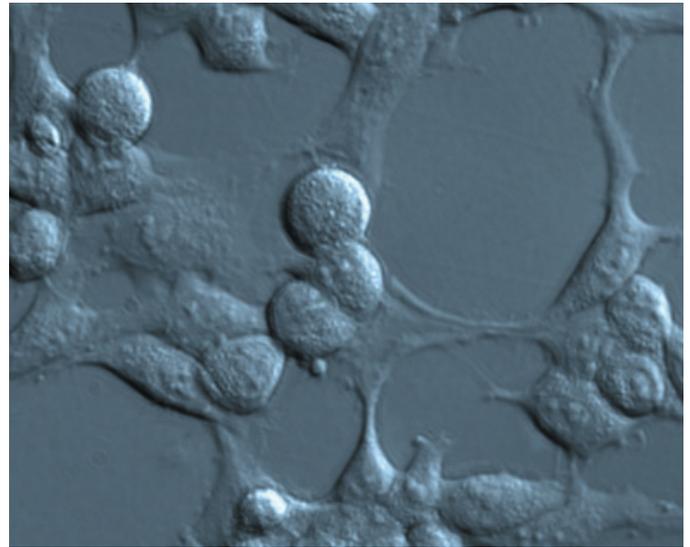


Abbildung 5 HEK-Zellen, PlasDIC; Probe mit freundlicher Genehmigung von C. Lücking, Neurologische Klinik und Poliklinik im Klinikum Großhadern der Universität München.

CHO

Die CHO-Zelllinie besteht aus Epithelzellen und wurde aus den Ovarien des chinesischen Zwerghamsters abgeleitet (CHO = Chinese Hamster Ovary). Die für die biomedizinische Forschung verwendete Unterart des chinesischen Zwerghamsters ist zumeist der *Cricetulus griseus*.



Abbildung 7 Chinesischer Zwerghamster, *Allocricetulus* – stock.adobe.com.

Die ursprüngliche Zelllinie wurde in den 1950ern isoliert. Der chinesische Zwerghamster wurde aufgrund seiner geringen Größe, der kurzen Trächtigkeitsdauer und seiner **für ein Säugtier geringen Anzahl an Chromosomen** gerne als Modellwirt für Kulturen genutzt. Dabei sind die Zellen in der Lage, eine langfristige, stabile Genexpression aufrechtzuerhalten und hohe Proteinerträge zu liefern. Außerdem weist die Hamsterart bei spontanen und endogenen viralen Infektionen eine geringe Inzidenz auf. CHO-Zellen können in Kultur sowohl als adhärenente Zellen als auch als Suspensionszellen gezogen werden.

Anwendung

CHO hat sich zu einer wichtigen Säugetierzelllinie entwickelt, die für die industrielle Produktion von glykosylierten therapeutischen Proteinen und für zytogenetische Toxizitätsbestimmungen verwendet wird.

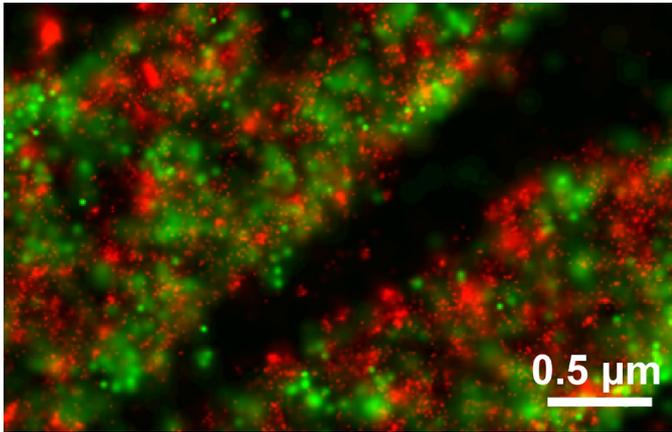


Abbildung 8 Zweifarbige PALM von CHO-Zellen (Ovarienzellen des chinesischen Zwerghamsters). Mit freundlicher Genehmigung von H. Shroff und H. Hess, HHMI Janelia Research Campus, Ashburn, VA, USA.

COS-7

Diese Zelllinien stammen aus Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze. COS-Zellen sind auch als nicht-steroidogene Zellen bekannt. Sie wurden 1981 von Professor Yakov Gluzman erzeugt. Das Akronym „COS“ leitet sich vom englischen „CV-1 in Origin, carrying SV40“ ab, was bedeuten soll, dass die Zellen von CV-1-Zellen (Simian-Virus) abstammen und Simian-Virus 40-Genmaterial in sich tragen. Es wurden drei COS-Zelllinien entwickelt (COS-1, COS-3 und COS-7), von denen zwei besonders häufig verwendet werden (COS-1 und COS-7). In Kultur zeigen COS-7-Zellen charakteristischerweise ein adhärentes Wachstum an Glas- und Kunststoffoberflächen und ähneln Fibroblasten. Die Kombination aus fibroblastenähnlichem Wachstum und Virusanfälligkeit macht COS-7 zu einer guten Wahl für Transfektionsexperimente mit DNA-Plasmiden und Mutationsexperimente mit dem SV40-Virus. Das SV40-Virus wird aufgrund seiner mutmaßlichen Beteiligung an menschlichen Krebserkrankungen weiterhin in der Forschung eingesetzt.



Abbildung 9 Grüne Meerkatze – *Chlorocebus aethiops*; David Havel – stock.adobe.com.

Anwendung

COS-7-Zellen werden häufig zur Untersuchung des Affenvirus SV40 sowie für Transfektionsexperimente zur Herstellung rekombinanter Proteine für die molekularbiologische, biochemische und zellbiologische Forschung verwendet.

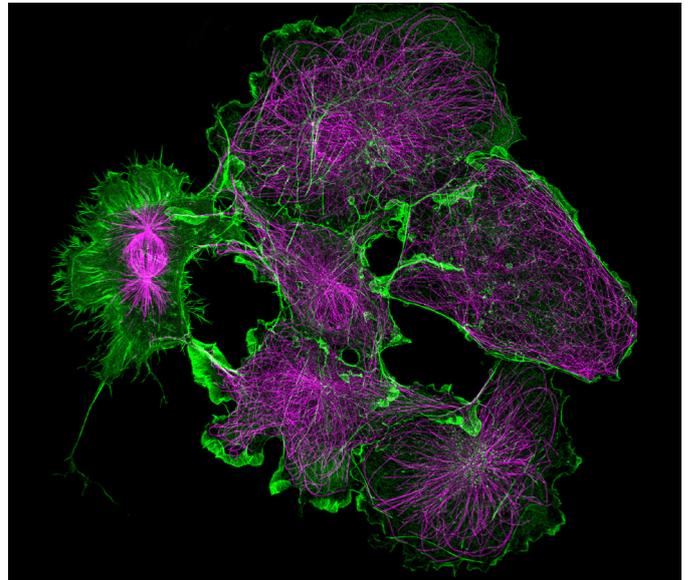


Abbildung 10 COS-Zellen mit markiertem Aktin (grün) und Mikrotubuli (magenta). Probe mit freundlicher Genehmigung von C. Leterrier, Institut de neurophysiopathologie, Faculté des sciences médicales et paramédicales, Marseille, Frankreich.

MDCK

Die Madin-Darby Hundenierenzelle (Madin-Darby canine kidney, MDCK) ist Basis einer Säugetierzelllinie, die in der biomedizinischen Forschung verwendet wird. Isoliert wurde die Zelllinie erstmals 1958 von Stewart H. Madin und Norman B. Darby Jr. aus Epithelzellen des Nierentubulus eines ausgewachsenen Cockerspaniels. Die nach ihnen benannte Zelllinie wurde in erster Linie als Modell für Virusinfektionen bei Säugetierzellen verwendet. MDCK ist eines der wenigen Zellkulturmodelle, das sich für die 3D-Zellkultur und die multizelluläre Umstrukturierung, auch bekannt als verzweigende Morphogenese, eignet.

Anwendung

MDCK-Zellen werden für eine ganze Reihe zellbiologischer Studien verwendet, darunter für die Untersuchung von:

- Zellpolarität
- Zellverbindungen (so genannte Adherens Junctions)
- kollektiver Zellmotilität
- Reaktionen auf Wachstumsfaktoren

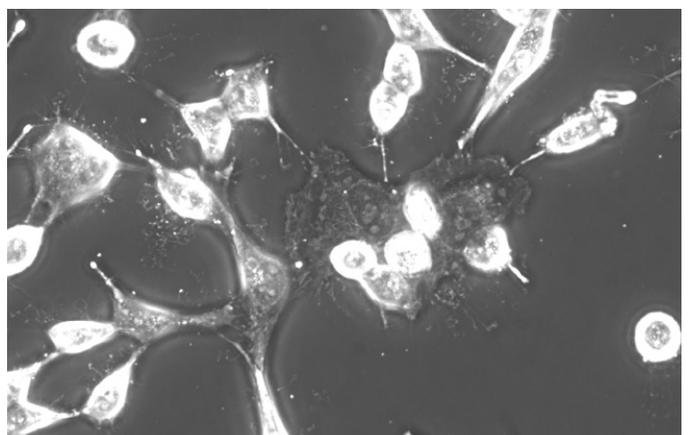


Abbildung 11 DIC, MDCK-Zellen (Hund) – breite Zellbereiche werden bei negativem Phasenkontrast besser sichtbar. Mit freundlicher Genehmigung von R. Nitschke, Life Imaging Center, Universität Freiburg.

Referenzen

- [1] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5414769>
- [2] <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.711381/full>
- [3] <https://www.bristol.ac.uk/research/impact/stories/hela-cells>



Carl Zeiss Microscopy GmbH

07745 Jena, Deutschland

microscopy@zeiss.com

www.zeiss.com/routine