

1. EINFÜHRUNG

1.1. PFLANZLICHE ZELLEN AUS ZELLKULTUR-SYSTEMEN

In dieser Übungseinheit werden spezielle pflanzliche Zellen behandelt, die außerhalb des intakten Organismus in einem geeigneten Nährmedium unter sterilen Bedingungen *in vitro* („im Reagenzglas“) kultiviert werden. Das Ziel bei der Verwendung von **Zell (oder Gewebe-)kultur-Systemen** ist meist, die physiologische oder biochemische Reaktionsweise von bestimmtem Zellmaterial unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen und die dabei gewonnenen Ergebnisse und Schlußfolgerungen auf die Bedingungen des intakten Organismus zu übertragen, um dessen Lebensprozesse besser zu verstehen. In Nährmedien mit bekannter chemischer Zusammensetzung, wie sie heute in einer Vielzahl von Varianten verfügbar sind, ist es so dann möglich, die Wirkung der einen oder anderen Komponente (z.B. von Hormonen oder Wachstumsfaktoren u.a.m.) auf den Stoffwechsel oder das Wachstum von Zellen (bzw. Geweben) zu erfassen, indem sie hinzugefügt oder weggelassen wird.

Von den verschiedensten Pflanzenarten lassen sich isolierte Zellen relativ leicht als Suspension in einer flüssigen Nährlösung kultivieren. Im einfachsten Fall kann dies in einem Erlenmeyer-Kolben erfolgen. Man bezeichnet diese Form der Kultivierung als **Zellsuspensionskultur** (Abb. 1).



Abb.1 Pflanzliche Zellsuspensionskultur

Die Erlenmeyer-Kolben müssen bei der Suspensionskultur ständig leicht bewegt werden, um eine Belüftung der Zellen zu gewährleisten. Dies geschieht im Labormaßstab in der Regel auf einem Rotationsschüttler.

Die Pflanzenzellen in einer Suspensionskultur bleiben praktisch unbegrenzt teilungsfähig und können über lange Zeit in einem vitalen Zustand erhalten bleiben, sofern man in regelmäßigen Abständen durch Subkultivierung auf frische Nährlösung die durch das Teilungswachstum zunehmende Zelldichte verdünnt und gleichzeitig die an Nährstoffen verarmte Nährlösung erneuert.

Anwendung des pflanzlichen Zellkulturverfahrens:

- **Pflanzenzüchtung**
Pflanzenzellen sind als totipotente Zellen befähigt, sich in Kultur unter geeigneten Bedingungen wieder zu ganzen Pflanzen mit allen Geweben zu entwickeln. Da in der Pflanzenzüchtung häufig die Gewinnung einer großen Zahl von genetisch identischen Einzelpflanzen für die Erstellung von Kreuzungen und deren Vermehrung im Vordergrund steht, ist die pflanzliche Zellkultur zu einem wichtigen Hilfsmittel der praktischen Pflanzenzüchtung geworden.
- **Produktion von Pflanzeninhaltsstoffen**
Aus pflanzlichen Zellkulturen können in bestimmten Fällen wertvolle Pflanzeninhaltsstoffe gewonnen werden, die in der Medizin, der Pharmazie, der Nahrungsmittel- oder Kosmetikindustrie mannigfaltige Verwendung finden. Ein Problem bei der Applikation pflanzlicher Zellkulturen zur Herstellung nutzbarer Inhaltsstoffe ist allerdings, daß von vielen Stoffen die in den entsprechenden Zellkultursystemen nachweisbaren Konzentrationen zu niedrig sind, um eine wirtschaftlich sinnvolle Nutzung in Betracht zu ziehen. Kommerziell erfolgreicher sind hingegen Projekte, mit pflanzlichen Zellkulturen die Transformation billiger Synthesestufen in wirtschaftlich wertvolle Endprodukte durchzuführen. Eine solche Umwandlung zugeführter Stoffe in Kulturen nennt man **Biotransformation**. So können beispielsweise bestimmte Zell-Linien vom *Fingerhut* zugeführte herzwirksame Glykoside durch das Einfügen von Substituenten oder Zuckern zu Verbindungen verändern, die als Herzmittel Verwendung finden.

1.2. NACHWEIS DER ZELLVITALITÄT

Die Überprüfung der Vitalität (Lebensfähigkeit) von Zellen ist in der zellbiologischen Forschung häufig eine notwendige Ergänzung. So ist es beispielsweise bei physiologischen Untersuchungen wichtig, während des Versuchsablaufes zu testen, ob die Zellen am Leben bleiben. Eine besondere Bedeutung hat der Vitalitätsnachweis, wenn die Reaktion von Zellen auf ungünstige Außenbedingungen (Stress) untersucht wird, wie z.B. die Auswirkungen von extremen Temperaturen (Hitze, Kälte, Frost), UV-Strahlung, Ozon, Schwermetallen u.a.m. Für eine Interpretation stressphysiologischer Versuchsergebnisse ist die Bestimmung der Überlebensrate der Zellen unverzichtbar.

In ähnlicher Weise wird der Vitalitätsnachweis bei Zellkulturen angewendet, um den Einfluss von pharmazeutischen Wirkstoffen (potentielle Medikamente, Chemotherapeutika u.a.m.) oder Umwelt-

chemikalien (Pestizide, Fungizide u.a.m.) zu testen (**in-vitro-Toxizitätsprüfung**).

Zur Überprüfung der Zellvitalität sind einige unterschiedliche Methoden entwickelt worden. Für Routineuntersuchungen haben sich Methoden bewährt, die auf der Bestimmung der Membranintegrität beruhen. Die **Exklusionsmethode** beispielsweise basiert auf der Tatsache, dass bei lebenden Zellen bestimmte geladene Farbstoffe nicht durch die intakte Zellmembran in das Zellinnere gelangen können, während sich tote Zellen mit geschädigter Zellmembran mit den betreffenden Farbstoffen anfärben.

Andere Methoden zur Bestimmung der Zellvitalität beruhen auf dem Nachweis der Integrität der Mitochondrien oder der Messung der Aktivität intrazellulärer Enzyme, wie z.B. von Oxidoreduktasen und Hydrolasen. Auch die Morphologie der Zellen kann analysiert werden, um vitale Zellen von geschädigten Zellen zu unterscheiden. So können beispielsweise Veränderungen am Cytoskelett sehr empfindlich zellschädigende Einflüsse anzeigen.

2. PRÄPARATIONSANLEITUNGEN

2.1. Nachweis der Vitalität von Tabak-Zellen aus einer Suspensionskultur durch Trypanblaufärbung

Der Trypanblaufärbetest ist der am weitesten verbreitete Test auf die Lebensfähigkeit von Zellen nach der Exklusionsmethode. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der erst nach Schädigung der Membranen in die Zellen eintreten kann und dann als Anion an Zellproteine bindet.

Herstellung und Beobachtung der Präparate

Jeder Arbeitsgruppe wird ein Röhrchen mit einer Zellsuspension der Zell-Linie BY2 vom *Tabak* zur Verfügung gestellt.

Der Vitalitätsfärbetest mit Trypanblau soll einerseits mit Zellen bei physiologischer Raumtemperatur durchgeführt werden (Kontrollzellen) und andererseits mit Zellen, die bei erhöhter Temperatur einem Hitzestress ausgesetzt waren.

Durchführung der Hitzestressbehandlung:

Von der Tabak-Zellsuspension pipettiert man mit der bereitgestellten Pipette in ein kleines Reaktionsgefäß, bis dieses ungefähr zur Hälfte gefüllt ist und verschließt es danach dicht mit dem dazugehörigen Deckel. Das Reaktionsgefäß wird mit den Zellen in eine freie Position eines thermostatisierten Metallblocks gestellt und bei 55° C 30 min. lang inkubiert. Danach lässt man das Reaktionsgefäß auf Raumtemperatur abkühlen.

Herstellung und Beobachtung der Präparate:

Die Zellen werden auf einem mit Polylysin beschichteten Objektträger immobilisiert. Dazu pipettiert man einen Tropfen Zellsuspension (Kontrollzellen bzw. die Hitzestressbehandelten Zellen) auf den dafür beschrifteten Kreis des Objektträgers (vom Tutor verlangen, **Abb. 2**). Die Zellen 10 min. sedimentieren lassen und danach die überschüssige Suspension abgiessen. Den Objektträger in klarem Leitungswasser schwenken. Danach die Unterseite des Objektträgers mit einem Papiertaschentuch trockenwischen, den Objektträger auf der Auflage in einer Feuchteammer positionieren und einen Tropfen Trypanblau-Lösung aufbringen sodass der lackfreie Kreis des Objektträgers bedeckt ist.

Den Farbstoff 10 min. einwirken lassen und danach den Objektträger in ein Becherglas mit Leitungswasser tauchen. Das Leitungswasser erneuern und den Objektträger solange darin schwenken, bis kein weiterer Farbstoff abgelöst wird.

Die Unterseite des Objektträgers und die Bereiche ausserhalb des Kreises mit einem Papiertaschentuch trocknen. Einen Tropfen Leitungswasser auf den Mittelkreis aufbringen und das Präparat mit einem Deckglas schliessen.

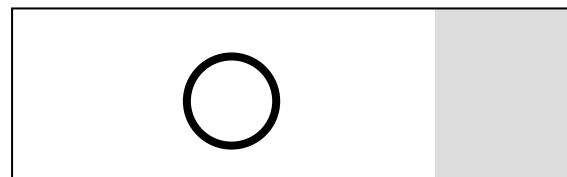


Abbildung 2

Dokumentation

Bei schwacher Vergrößerung soll eine Übersichtszeichnung von der Ausbildung der Zellfäden in der Suspension angefertigt werden.

Ermitteln Sie in beiden Proben die Zahl der lebensfähigen (nicht gefärbten) Zellen in einer gesamten Population von 100 Zellen.