



Die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Abteilung "Menschliche und tierische Zellkulturen"

Cord C. Uphoff und Hans G. Drexler
DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
Mascheroderweg 1B, D-3300 Braunschweig, Deutschland

Einleitung

Menschliche und tierische Zellkulturen gewannen in den zurückliegenden Jahren in der Biologie, Medizin und Pharmazie als Modellsysteme zunehmend an Bedeutung. Um dieser Entwicklung zu entsprechen, wurde 1989 innerhalb der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) die Abteilung für menschliche und tierische Zellkulturen und Viren gegründet. Der folgende Bericht befaßt sich mit den Aufgaben dieser Abteilung.

Allgemeine Struktur der DSM

Die DSM wurde 1969 in Göttingen gegründet und hat ihren Sitz seit 1987 in Braunschweig. Das Institut wird zu 90% vom Bundesministerium für Forschung und Technologie (BMFT) und zu 10% vom niedersächsischen Ministerium für Wissenschaft und Kultur finanziert. Geschäftsführender Direktor ist Dr. Kroppenstedt als Nachfolger des langjährigen Leiters und Mitbegründers Dr. Claus. Der DSM steht ein Aufsichtsrat, bestehend aus Repräsentanten des BMFT, des niedersächsischen Landesministeriums für Wissenschaft und Kultur, des niedersächsischen Finanzministeriums, der Universitäten und der biotechnologischen Industrie, vor. Die wichtigsten Aufgaben der DSM sind die langfristige Erhaltung und Bereitstellung biologischen Materials mit bekannten, spezifischen und genetisch stabilen Eigenschaften sowie deren Hinterlegung (Sicherheits- und Patenthinterlegung). Zur Zeit umfaßt der Bestand mehr als 7 000 verschiedene Kulturen von Mikroorganismen, Zelllinien und Viren in genetisch unverändertem und lebensfähigem Zustand (1).



Die DSM beinhaltet nach grob thematischen Gesichtspunkten unterteilt vier verschiedene Bereiche:

- Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Hefen, Plasmide, Phagen), geleitet von Dr. Reiner Kroppenstedt
- Pflanzenviren, geleitet von Prof. Günther Adam
- Pflanzliche Zellkulturen, geleitet von Dr. Heinz Martin Schumacher
- Menschliche und tierische Zellkulturen, geleitet von Dr. Hans G. Drexler

Zellkulturen

Zellkulturen können generell eingeteilt werden in **Kurzzeitkulturen**, die lediglich einige Wochen lebensfähig sind, **Langzeitkulturen**, deren Zellen mehrere Monate überleben und sich vermehren können, und **permanente, kontinuierliche Zelllinien**, die aus immortalen Zellen bestehen. Bei der letztgenannten Gruppe unterscheidet man menschliche, tierische und pflanzliche Zelllinien. Eine einfache Definition menschlicher und tierischer Zelllinien ist etwa die folgende: Zelllinien sind vom Zellspender unabhängig und ununterbrochen in vitro wachsende Zellen.

Die Charakteristika und Vorteile von permanenten Zelllinien sind:

- Monoklonalität der Zellen
- Stabilität der charakteristischen Eigenschaften über einen langen Zeitraum
- theoretisch unbegrenztes Wachstum unter optimalen Bedingungen
- weltweite Verfügbarkeit von identischen Zellen
- Standardisierung der Untersuchungsobjekte
- relativ schnelles und preiswertes Testsystem
- dienen als Modellsysteme, die dem Verhalten des gesamten Organismus in vieler Hinsicht sehr ähnlich sind
- Produktion biotechnologisch und pharmakologisch interessanter Substanzen

Aufgrund dieser vielen Vorteile hat sich die Verwendung von Zelllinien in nahezu allen Bereichen der Biologie und medizinischen Forschung durchgesetzt.

Aufgaben der Zellkultursammlung

Der grundlegende Auf- und stufenweise Ausbau der Abteilung im Hinblick auf Mitarbeiter und Inventar ist mit Ablauf des Jahres 1991 nahezu abgeschlossen. Damit können die Aufgaben der Zellkultursammlung der DSM in vorgesehener Weise ausgeführt werden. Im einzelnen gehören zu den bereits erwähnten allgemeinen Aufträgen der DSM folgende Aufgaben:

- Erwerb von Zelllinien
- Identitäts- und Qualitätskontrolle
- Vermehrung von Zellen
- Charakterisierung von Zelleigenschaften
- Gefrierkonservierung in flüssigem Stickstoff
- Aufbewahrung als Sicherheits-, Patent- und Distributionskulturen
- Sammlung von Daten in einer Datenbank
- Abgabe von Zelllinien auf Anfrage
- Mycoplasmadetektion und -eliminierung als Serviceleistung

Die Arbeiten werden wahrgenommen von 21 Mitarbeitern, wovon sechs Wissenschaftler und fünf technische Assistenten sind. Jeder Wissenschaftler ist Leiter einer Gruppe der folgenden speziellen Arbeitsgebiete: Mycoplasma- und Enzymforschung, Immunologie, Molekularbiologie, Zytogenetik, Zellbiologie und Virologie. Außerdem beschäftigt die Abteilung Diplomanden, Doktoranden und Gastwissenschaftler.

Die Qualitätskontrolle beinhaltet Tests für die folgenden Bestimmungen:

- Viabilitätsstatus
- mögliche Kreuzkontamination zwischen Zelllinien
- mögliche allgemeine mikrobielle Infektion (Bakterien, Pilze)
- mögliche Mycoplasmakontamination im speziellen
- Freiheit von bestimmten Virusinfektionen

Für die Typisierung von Zelllinien werden folgende Bestimmungen angeboten:

- Oberflächenmarkeranalyse (Immunophänotypisierung)
- Chromosomenmarkeranalyse (Karyotypisierung)
- DNA-Fingerabdruck (Genotypisierung)
- Isoenzymanalyse (Speziesbestimmung)

Zelllinien können mittels Kryopräservation aufbewahrt werden. Ein Kälteschutzmittel (Glycerin oder Dimethylsulfoxid) wird der Kultur zugegeben, die dann mit einem computerprogrammierten Einfriergerät mit definierter Abkühlungsgeschwindigkeit eingefroren wird. Die gefrorenen Ampullen werden bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Die drei verschiedenen Hinterlegungsformen für menschliche und tierische Zelllinien bei der DSM sind:

- Allgemeine Hinterlegung (Zellbank): Die Zelllinien sind generell für eine Gebühr erhältlich; die Zelllinie wird in einem Katalog (2) vermerkt sein; vor jeder Auslieferung von



Zelllinien muß sich der Erwerber mit einer DSM-Vereinbarung einverstanden erklären
Zelllinien werden entweder als Lebendkulturen (wachsende Zellen) oder als gefrorene Kulturen (Ampullen auf Trockeneis) abgegeben.

- Sicherheitshinterlegung (Kryobank): Zelllinien können bei der DSM zur Langzeiterhaltung vertraulich hinterlegt werden; die Zellen bleiben weiterhin Eigentum des Hinterlegers; die Zellen sind nicht frei verfügbar und werden nicht im Katalog (2) aufgeführt.
- Patenthinterlegung: Die DSM ist seit dem 28.2.1991 eine international anerkannte Hinterlegungsstelle für zum Patent angemeldete Zellkulturen nach dem Budapester Vertrag der *World Intellectual Property Organization* von 1977. Zelllinien (einschließlich Hybridomas) können nach den Bedingungen und Konditionen des Budapester Vertrages 30 Jahre hinterlegt werden.

Probleme der Zellkultur

Kontaminationen von Zelllinien mit Mycoplasmen scheinen das größte Problem in der Zellkulturtechnik zu sein. Ein erheblicher Anteil von Zelllinien, die die DSM erhält, sind mit Mycoplasmen infiziert. Mycoplasmakontaminationen können schwerwiegende Veränderungen in Zelllinien verursachen. Sie können praktisch jede Eigenschaft von Zellen beeinflussen, z.B. das Zellwachstum, die Zytokinproduktion, den Aminosäure- und Nucleinsäuremetabolismus, chromosomale, Membran- und phänotypische Veränderungen hervorrufen und vieles andere mehr. Massiv kontaminierte Kulturen sind außerdem ein Risiko im Hinblick auf eine mangelhafte Reaktivierung nach der Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff.

Die DSM verwendet routinemäßig drei Methoden zur Detektion von Mycoplasma-kontaminationen:

- direkte DNA-Färbung mit DAPI
- DNA-RNA-Hybridisierungsanalyse und
- mikrobiologische Kultur in Flüssig- und Agarmedium

Andere Methoden wie die indirekte DAPI-Färbung unter Verwendung einer Indikatorzelllinie, Verwendung monoklonaler Antikörper gegen mycoplasmaspezifische Proteine, ein Test zu Enzymaktivitäten von Mycoplasmen und ein ELISA wurden vor kurzem in der Abteilung auf ihre Zuverlässigkeit und Sensitivität für die Anforderungen bei der täglichen routinemäßigen Zellkultur geprüft. Neue und verbesserte Methoden werden unverzüglich nach Bekanntwerden erprobt und mit bestehenden verglichen.



Bei Fällen, in denen es unvermeidlich oder wünschenswert ist, werden Versuche unternommen, die Zellkulturen durch spezielle Antibiotika von der Mycoplasma-kontamination zu befreien. Während der Behandlungsperiode für die Eliminierung der Mycoplasmen wird die Zellkultur besonders überwacht, und nach der Behandlung werden die Zellkulturen streng auf verbliebene oder resistente Kontaminanten untersucht. Des weiteren gehören allgemeine bakterielle Infektionen sowie Infektionen durch Pilze und Kreuzkontaminationen durch andere Zelllinien zu den Problemen der Zellkultur.

Weitere institutionalisierte Zellkultursammlungen sind die European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) in Großbritannien (3), die American Type Culture Collection (ATCC) in den USA (4) und die Japanese Cancer Research Resources Bank (JCRRB) in Japan (5).

Zellkulturtechnik als Alternative zu Tierversuchen

Bei der Suche nach neuen therapeutischen Wirkstoffen gewinnen menschliche und tierische Zellkulturen immer größere Bedeutung unter dem Aspekt der Vermeidung von Tierversuchen. In den letzten Jahren sind Zellkulturen als Alternative zum Tierversuch in der Arzneimittelforschung vermehrt eingesetzt worden und haben eine beträchtliche Reduktion von Tierversuchen erbracht. Auch für toxikologische Untersuchungen werden zunehmend Zellkulturtests entwickelt. Die Weiterentwicklung der Zellkulturtechnik führt immer stärker zu einer Imitation von Organen und des Organismus durch Zellkulturen (6). Die DSM kann durch Bereitstellung, Charakterisierung, Standardisierung, Kontrolle und Aufbewahrung der Zelllinien in entscheidender Weise dazu beitragen, diese Alternative zu Tierexperimenten zu verbreiten und durch einwandfreie und authentische Zelllinien adäquate Ergebnisse zu ermöglichen. Die Entwicklung von Hybridomazellen zur Produktion von Antikörpern ist ein Beispiel zum Ersatz von Tieren durch in vitro-Systeme mit Zelllinien (7,8).

Literatur

- (1) Barbara Lehnberg: DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig. BIOforum 5/1991, 159-161
- (2) Catalogue of Cell Lines. 1st Edition 1992, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland



- (3) Catalogue of Cell Lines and Services. 4th Edition 1991, European Collection of Animal Cell Cultures, Porton Down, Salisbury, England
- (4) Catalogue of Cell Lines and Hybridomas. 6th Edition 1988, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA
- (5) JCRB (Cell) Catalogue: 1988, Japanese Cancer Research Resources Bank, Tokio, Japan
- (6) Willi W. Minuth: Minusheet - eine neue Kulturmethode für anhaftende Zellen unter "natürlichen" Bedingungen. ALTEX (Alternativen zu Tierexperimenten) 15, 1991, 18-30
- (7) Zellen und Computer: Alternativen zum Tierversuch. Bundesministerium für Forschung und Technologie. Hrsg. Projektträger Biologie, Energie, Ökologie, Forschungszentrum Jülich. 1990
- (8) René Fischer & Philippe C. Ferber: Monoklonale Antikörper. *In vitro*-Produktionsmethoden im Vergleich. ALTEX (Alternativen zu Tierexperimenten) 16, 1992 (diese Ausgabe)

Der erste Katalog vom 1. Januar 1992 mit zur Zeit 62 erhältlichen geprüften Zelllinien (weitere in Vorbereitung) von Mensch, Affe, Rind, Schaf, Maus und Hamster kann kostenlos von der DSM bei folgender Adresse bezogen werden (2):
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
Mascheroderweg 1b, D-3300 Braunschweig, Deutschland
Tel. +49-531-618760
FAX +49-531-618750