

Versuch 3.1 – Lebendzellzählung

Einleitung

In diesem Versuch sollten die Zellen in einer Zellsuspension mit Hilfe der Neubauer Zählkammer ausgezählt werden. Weiterhin wurde berechnet, wie die Suspension verdünnt werden müsste um eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml zu erhalten.

Durch den Farbstoff Trypanblau können tote Zellen aufgrund einer Schädigung der Zellmembran angefärbt werden.

Durchführung

Nach Vorbereitung der Zählkammer wurden $10\mu\text{l}$ der Zellsuspension mit $10\mu\text{l}$ Trypanblau gemischt. Die insgesamt $20\mu\text{l}$ wurden in die Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden nun 16 Kleinquadrate ($1\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm} = 0,1\text{mm}^3$) ausgezählt.

Ergebnisse

Der Mittelwert der lebenden Zellen über zwei Zählungen betrug 72.

Diskussion

Da die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt wurde, ist der gezählte Wert zunächst zu verdoppeln. Die 16 Kleinquadrate haben ein Gesamtvolumen von $0,1\text{mm}^3$. Somit ergibt das 10^4 -fache der ermittelten Anzahl den Wert der Zellen/ml.

$$72 \times 2 \times 10^4 = 1,44 \times 10^6 \text{ Zellen/ml}$$

Zur Einstellung der Zelldichte wurde eine Konzentration von $1,2 \times 10^6$ Zellen angenommen.

Nun wurde folgende Formel genutzt: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

Setzt man alle Werte ein, so erhält man: $V_2 = (1,2 \times 600\mu\text{l}) / 1,0 = 720\mu\text{l}$

Um aus $600\mu\text{l}$ Zellsuspension mit einer Konzentration von $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml eine Suspension mit $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml herzustellen, müssen also $120\mu\text{l}$ Wasser dazu gegeben werden.

Aus zwei gegebenen Zeilen lässt sich leicht erkennen dass es sich bei Jurkat-Zellen um Krebszellen handelt:

Cell type	human T cell leukemia
References	Schneider et al., Int. J. Cancer 19: 621-626

Leukämie („Blutkrebs“) als Zelltyp gibt an dass dies eine Krebszelllinie ist.

Versuch 3.2 – Ermittlung einer Sterbekinetik durch Nekrose

Einleitung

Nekrose ist der entzündliche Zelltod, welcher durch äußere Einflüsse (Schädigung der Membran) hervorgerufen wird. Durch das starke Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid wird die Plasmamembran der Zelle beschädigt. Anhand von Trypanblau können wieder die toten Zellen unter dem Mikroskop beobachtet werden.

Durchführung

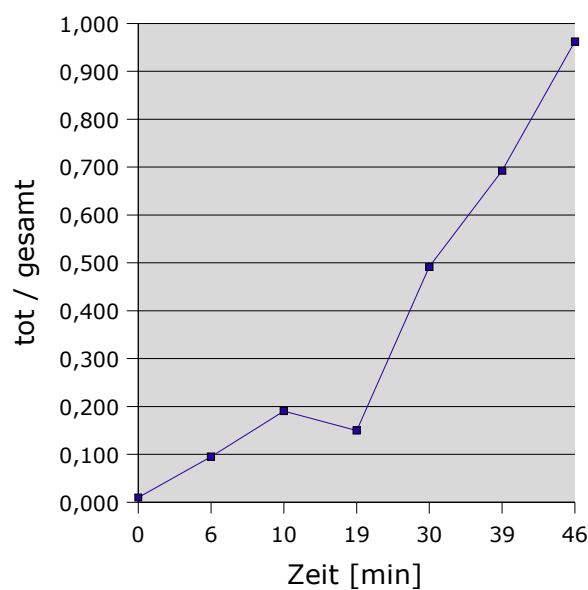
Von der auch im ersten Versuch genutzten Zellsuspension wurden jeweils 200µl in drei separate Reaktionsgefäße gegeben. In eins der Gefäße wurde H_2O_2 im Verhältnis 1:10 gebracht, in ein anderes H_2O_2 im Verhältnis 1:20.

Im Abstand von einigen Minuten wurden nun die Gesamtanzahl der Zellen, sowie die Anzahl der toten Zellen in diesen beiden Gefäßen gezählt.

Ergebnisse

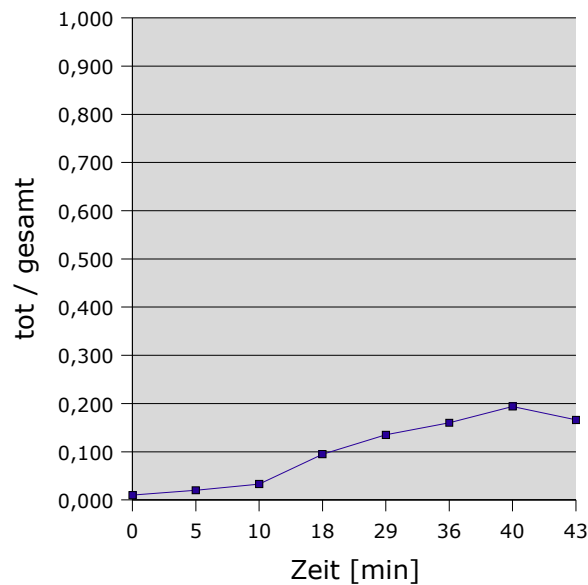
Ergebnisse für H_2O_2 – 1:10

Zeit [min]	6	10	19	30	39	46
Zellen (ges.)	42	42	60	59	26	53
Zellen (tot)	4	8	9	29	18	51
Verhältnis tot/ges	0,095	0,190	0,150	0,492	0,692	0,962



Ergebnisse für H₂O₂ – 1:20

Zeit [min]	5	10	18	29	36	40	43
Zellen (ges.)	50	60	42	37	50	36	30
Zellen (tot)	1	2	4	5	8	7	5
Verhältnis tot/ges	0,020	0,033	0,095	0,135	0,160	0,194	0,166



Diskussion

Zunächst ist zu bemerken dass die Gesamtzahl der gezählten Zellen zum Teil stark schwankt. Dies mag an einer schlechten Durchmischung zwischen den einzelnen Zählungen liegen. Das Wasserstoffperoxid als starkes Oxidationsmittel greift die Membranlipide der Zellen, womit die Membran geschädigt wird und das Trypanblau in die tote Zelle gelangt. In der ersten Kurve gut dargestellt, lässt sich eine schnelle Zunahme der toten Zellen erkennen. Unter heftiger Freisetzung von Sauerstoff über die Versuchsdauer hinweg, sind bei der letzten Zählung nach 46 Minuten nahezu 100% der Zellen tot. Dagegen zeigt die zweite Kurve bei geringerer H₂O₂ Konzentration einen viel weniger steilen Verlauf. Legt man die vorletzte Zählung zugrunde, so sind hier nur rund 20% der Zellen tot. Erklären lässt sich dieser Sachverhalt durch die geringere Konzentration des Oxidationsmittels. So steht im ersten Fall mehr davon zur Verfügung um eine einzelne Zelle anzugreifen. Deswegen verläuft dort die Kurve auch viel steiler. Weiterhin ist der Absolutwert des enthaltenen H₂O₂ im zweiten Fall natürlich geringer. Geht man davon aus dass ein Großteil davon zum Ende des Versuchs bereits verbraucht war, so ergibt sich die Tatsache dass lediglich hier lediglich 20% tote Zellen waren.

Versuch 3.3 – Demonstrationsversuch: Apoptoseinduktion

Einleitung

Die Apoptose als kontrolliertes Sterben einer Zelle ist ein wichtiger Mechanismus für den Organismus. Sie dient zur Formgebung von Geweben und zur Entfernung von Zellen welche ihre Funktion nicht richtig erfüllen.

Durchführung

Als Ligand zur Apoptoseinduktion diente ein Anti-Fas IgM-Antikörper. Durch eine gesteigerte Membranpermeabilität bei einer Apoptose, war es möglich die Zellen anzufärben für welche eine Apoptose induziert war.

Ergebnisse

Beim Betrachten durch das Mikroskop, waren die Zellen als Anhäufung von membranumgebenen Strukturen zu erkennen.

Diskussion