

## Aus der Forschung: Anatomie

### Prof. Minuth geht neue Wege bei der Kultivierung von hochspezialisierten Zellen

Bahnbrechende Versuche am Institut für Anatomie der Universität Regensburg

Zellkulturen sind zu einem nicht mehr wegzudenkenden Teil der gesamten medizinischen, biologischen und biotechnologischen Forschung geworden. Die wesentlichen Impulse für die enorme Ausbreitung sind darin zu sehen, daß in den letzten Jahrzehnten sehr große technische Fortschritte auf dem Gebiet der Zellkulturmasstechnik und damit bei der Gewinnung biologisch relevanter Stoffe gemacht wurden. Ein weiterer wesentlicher Grund für die Fortentwicklung der Zellkulturtechnik ist darin zu sehen, daß die Tierschützer in den letzten zehn Jahren Zellkulturen als Ersatzmethode zum Tierversuch massiv gefördert und somit zu einem wissenschaftlichen „Umdenkungsprozeß“ beigetragen haben.

Derjenige, der mit Zellkulturen arbeitet, hat meist große Ansprüche an sein in vitro-System, ja häufig eine zu große Erwartung. Das rührt daher, daß die in Kultur genommenen Zellen von Experimentbeginn an eine sehr weit gespannte Ersatzfunktion auszufüllen haben, die mit bisher verwendeten klassischen Methoden nicht befriedigend zu erhalten oder nicht mehr zeitgemäß beantwortet werden konnte. Bei Zellkulturen gilt wie in der freien Marktwirtschaft: besser, schneller, kostengünstiger, also effektiver als mit der vorher verwendeten Technik. Dabei wird viel zu wenig bedacht, daß Zellen bio-soziale Wesen sind, die einer besonderen Hege bedürfen, damit sie überhaupt hochspezialisierte Eigenschaften in Kultur entwickeln können.

Es gibt im wesentlichen drei Gründe, warum Zellen in Kultur gehalten werden:

1. Kultivierte Zellen sollen im Labor oder in der Biotechnologie die Produktion von verschiedensten Stoffen übernehmen. Dazu gehört die Bildung von monoklonalen Antikörpern ebenso wie die Produktion von Pharmaka und Nährstoffen.

Für solche Vorhaben werden sogenannte immortalisierte Zellen verwendet, die sich beliebig vermehren lassen. Ein wesentliches Charakteristikum solcher Zellen ist, daß sie in den meisten Fällen unter relativ einfachen Kulturbedingungen gehalten und vermehrt werden können.

2. Kultivierte Zellen können auch der Isolation bestimmter zelleigener Biomaterie dienen. Dazu gehören z. B. Proteine der perizellulären Matrix, Plasmamembranen, Zellkerne, Mitochondrien und vieles andere mehr. Solche Arbeiten können entweder mit kontinuierlichen Zelllinien durchgeführt werden, oder aber es werden dafür sogenannte Primärkulturen angelegt. Dazu werden die verschiedensten Organe enzymatisch zerkleinert und die gewonnenen Einzelzellen werden in Kulturgefäßen mit mehr oder weniger großem Erfolg herangezogen. Da die in Kultur genommenen Zellen aus ih-

rer ursprünglichen Umgebung herausgenommen wurden, gestaltet sich die Züchtung von den Primärkulturen in vielen Fällen als problematisch. Hinzu kommt, daß die Teilungsfähigkeit dieser Zellen meist sehr stark nachläßt.

3. Kultivierte Zellen sollen als Ersatzmethode zum Tierversuch dienen. Für diese Vorhaben können erstens Versuchstiere eingespart werden und zweitens können klar definierte Zellen viel besser und sinnvoller eingesetzt werden als ein ganzes Tier. Der biochemische Mechanismus eines Pharmakons kann sicherlich an einem einzigen Zelltyp viel sinnvoller geklärt werden als an einem Organ oder an einem ganzen Organismus mit seinen verschiedenen Zelltypen. Dies ist viel zu komplex für eine solche Untersuchung. Kulturexperimente mit klar definierten Zellen werden deshalb in Zukunft wegen ihrer Übersehbarkeit von immer größer werdender Bedeutung für die medizinische, pharmazeutische und kosmetische Industrie sein. Leider zeigt der momentane Stand der Forschung, daß für wirklich organspezifische Fragestellungen bisher nur ganz wenige Zellkulturmodelle zur Verfügung stehen.

Vergleicht man nun die Gründe, aus denen Zellen gezüchtet werden miteinander (Punkte 1–3), so ist zu erkennen, daß an Zellkulturen ganz unterschiedliche Anforderungen gestellt werden. Während unter den Punkten 1 und 2 die Produktion von Biomaterie im Vordergrund steht, möchte man von den unter Punkt 3 kultivierten Zellen eine organspezifische Leistung erhalten. Dies bedeutet, daß es auf der einen Seite für den Experimentator sehr unwichtig erscheint, wie seine Zellen in Kultur aussehen, wenn sie nur genügend Biomaterie produzieren (Punkt 1 und 2). Dagegen ist es für die unter Punkt 3 kultivierten Zellen von entscheidender Bedeutung, welche organspezifischen Eigenschaften in Kultur zu erhalten sind.

#### Organspezifische Leistungen

Wenn Zellkulturen helfen sollen, Tierversuche zu ersetzen, dann müssen in der Kulturschale auch organspezifische Leistungen vorhanden sein. Deshalb sollte man Zellen in der Kultur prinzipiell auch möglichst die gleichen Bedingungen schaffen, wie sie innerhalb eines Organismus vorgefunden werden. Betrachtet man jedoch die seit ca. 50 Jahren gängigen Kulturtechniken, so fällt auf, daß Zellen leider unter recht unnatürlichen Milieu- und Umfeldbedingungen gehalten werden. Dazu drei Beispiele:

Zellen werden im Labormaßstab in verschiedensten Plastikgefäßen kultiviert. Ohne Zweifel, die Zellen haften auf der Innenseite dieser Gefäße recht gut. Es handelt sich hierbei um impermeables

Material. Innerhalb eines Organismus ist diese Art der Zellunterlage nicht zu finden.

Ein weiterer Mangel ist, daß das Kulturmedium häufig mehrere Tage lang nicht gewechselt wird. Dadurch können die Zellen auf unkontrollierbare Weise Stoffwechselendprodukte in ihrer Umgebung ansammeln. In einem Organismus hätte dies katastrophale Folgen, wenn solche Produkte nicht kontinuierlich vom Blutstrom wegtransportiert würden.

Ein weiteres Argument betrifft die Versorgung von kultivierten Zellen mit Kulturmedium. Bei der bisher angewendeten Zellkulturtechnik erhalten die Zellen von allen Seiten das gleiche Kulturmedium. Für Epithelzellen bedeutet dieser Umstand einen permanenten biologischen „Kurzschluß“. Epithelzellen der Niere sind z. B. von der apikalen Seite mit Urin, von der basalen Seite von serumhaltigem Blutmedium umgeben.

Diese in unseren Augen unzulänglichen Kulturbedingungen führen häufig dazu, daß die kultivierten Zellen nicht recht wachsen wollen oder aber ihre organspezifischen Eigenschaften verlieren und somit *dedifferenzieren*. Dieser Vorgang bedeutet, daß Zellen binnen Stunden typische morphologische, physiologische und biochemische Eigenschaften verlieren können. Leider wurde diese Tatsache in den letzten 20 Jahren sowohl von wissenschaftlicher wie auch von tierschützerischer Seite viel zu wenig Bedeutung zugemessen. Die kaum überschaubare Anzahl von Kulturexperimenten mit Organzellen und die wenigen, wirklich zur Verfügung stehenden organspezifischen Zellkulturmodelle zeigen das Problem der Dedifferenzierung. In diesem Wissenschaftsfeld muß deshalb noch in sehr hohem Maße Pionierarbeit geleistet werden.

#### Der Weg aus der Sackgasse

Die bisher angewandte Zellkulturtechnik erscheint u. E. für organspezifische Fragestellungen als nicht mehr zeitgemäß. Es ist nämlich erwiesen, daß Zellen mit einer hohen Differenzierungscharakteristik für ihr Wohlbefinden eine sehr spezifische Unterlage benötigen, eine immer gleichbleibende Qualität am Kulturmedium verlangen und die Stoffwechselendprodukte kontinuierlich entfernt werden müssen. Wünschenswert für viele Zellen ist weiterhin, daß sie einem luminal-basalen Flüssigkeitsgradienten ausgesetzt werden können. Dies bedeutet, daß die Zellen wie unter natürlichen Bedingungen von oben und unten ganz unterschiedliche Kulturmedien erhalten. Für eine solche anspruchsvolle Zellkultur wird ein Perfusionssystem und eine Gradientenkammer mit spezifischen Supporten für ein optimales Anhaften der Zellen benötigt. Die Suche nach solchen kommerziellen Produkten auf dem Fachmarkt ergab, daß eigentlich nur sehr wenig verwertbares Material dem Experten zur Verfügung steht.

## MINUSHEETS entwickelt

Für unsere Arbeiten benötigen wir Zellen, die in möglichst vielen Punkten derjenigen Organstruktur gleichen, aus der sie herkommen. Deshalb versuchen wir, die kultivierten Zellen in einen möglichst hohen Differenzierungszustand zu bringen und diesen über einen möglichst langen Zeitraum auch zu erhalten. Für eine solche Kultivationsarbeit müssen die Zellen

- 1) auf organspezifischen Supporten,
- 2) auf permeablen Oberflächen,
- 3) unter luminal/basalen Flüssigkeitsgradienten,
- 4) unter Perfusionsbedingungen wachsen und
- 5) sollten dann auch noch besonders schnell und leicht von der einen in die andere Versuchsanordnung überführbar sein.

Dieser Anspruch an eine zeitgemäße Zellkultivation ist nur dann sinnvoll, wenn er in einer möglichst einfachen technischen Form realisiert werden kann.

In einem ersten Entwicklungsschritt wurden die sogenannten „MINUSHEETS“ konstruiert (Fig. 1). Es handelt sich hierbei um folienartige, extrem dünne Scheibchen mit einer konzentrischen Halterung. Der Vorteil dieser Scheibchen besteht darin, daß eine Vielzahl von unterschiedlichen Trägermaterialien in Form eines besonders geeigneten Supportes für die jeweiligen Zellen eingesetzt werden kann. Jedes bioverträgliche, membranartige Membranmaterial kann für diese Versuche als Support eingesetzt werden. Ein weiterer besonderer Vorteil besteht darin, daß auch beliebig dünne biologische Häutchen als Support verwendet werden können. Sehr gute Erfahrungen wurden z. B. mit der Capsula fibrosa (Organkapsel) von Säugern gemacht. Solche organspezifischen Supporte haben sich als günstig für die Differenzierung von hoch spezialisierten Zellen erwiesen (1, 2, 3). Der Vorteil der neu entwickelten Methode besteht also darin, daß für jede Zellart eine individuelle Unterlage für die Zellen ausgesucht und verwendet werden kann. Somit dienen die MINUSHEETS als ein in der biologischen Qualität verbesserter Kulturschalenboden.

## Experimentieren mit der neuen Technik

### Einfache Kulturgefäße

Für ein Zellkulturexperiment wird die MINUSHEET-Halterung verwendet, in die eine geeignete Membran als Support für die Zellen eingelegt wird (Fig. 1). Zur besseren Anhaftung der Zellen kann die Membran mit Proteinen der extrazellulären Matrix beschichtet werden. Danach wird das MINUSHEET sterilisiert und in eine 24-well Gewebekulturplatte eingelegt (Fig. 2). Geeignetes Kulturmedium wird jetzt in jede Vertiefung der Kulturplatte einpipettiert, so daß jedes MINUSHEET etwa 2 bis 3 mm mit Kulturmedium überdeckt ist. Danach werden die benötigten Zellen in das Kulturmedium einpipettiert. Nach einer gewissen Zeit lassen sich die Zellen auf dem MINUSHEET nieder, das als Verbesserung des Kulturschalenbodens in das Gefäß ein-

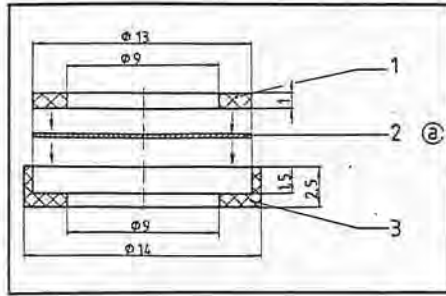


Fig 1: Aufbau eines MINUSHEET für eine 24-well Gewebekulturplatte a) Das Plättchen besteht aus einem Fixierring (1) dem spezifischen und frei auswählbaren Supportmaterial (2) und einem Haltering (3).

gelegt wurde. Für einen beliebigen Zeitraum können jetzt die Zellen auf ihrer spezifischen Unterlage gezüchtet werden.

### Perfusionskammer

Eine besondere Anwendung erfahren die MINUSHEETS mit anhaftenden Zellen in Perfusionsexperimenten. Da die SHEETS keine hohe laterale Wandung besitzen, sondern flache Scheibchen darstellen, sind sie stapelbar. Dadurch können sie leicht, nämlich vergleichsweise wie in einer Geldrolle, gestapelt in eine Bioreaktorkartusche eingesetzt werden (Fig. 3). Nach Verschließen des Reaktorbehälters können jetzt alle eingesetzten MINUSHEETS von unten nach oben mit einem geeigneten Kulturmedium perfundiert werden. Dadurch sind die Zellen auf den MINUSHEETS einem permanenten Flüssigkeitsstrom ausgesetzt. Für Endothelzellen als Auskleidung von Gefäßen oder für Zellen des Auges (Cornea und Conjunktiva) sind solche Kulturbedingungen als ideal anzusehen.

### Gradientenperfusionskammer

Kultivation von Zellen unter nahezu natürlichen Bedingungen ermöglicht die Gradientenperfusionskammer (Fig. 4). Dazu werden die MINUSHEETS mit anhaftenden Zellen aus einfachen Kulturgefäßen (Fig. 2) mittels einer Pinzette in eine Gradientenperfusionskammer überführt. Da das eingelegte MINUSHEET die Kammer in ein apikales und basales Kompartiment teilt, können die Zellen

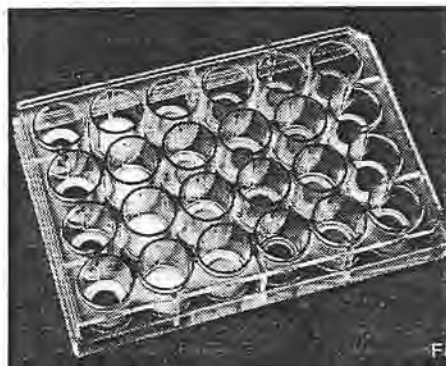


Fig 2: MINUSHEETS können in beliebigen Kulturgefäßen benutzt werden, hier in einer 24-well Gewebekulturplatte. Zum Anhaften der Zellen und zur Ausbildung einer möglichst hohen Differenzierung können ganz individuelle Supportmaterialien verwendet werden.

jetzt von oben und unten ganz separat mit Kulturmedien versorgt werden. Der Vorteil der Methode ist in der beliebigen Variabilität der Perfusion zu sehen. Einmal kann oben und unten mit dem gleichen Kulturmedium perfundiert werden (Fig. 5a), andererseits können wie in einem Organismus ganz unterschiedliche Medien verwendet werden (Fig. 5b).

Die Technik erlaubt eine getrennte apikale und basale Perfusion des Kulturmediums über viele Tage, ja sogar über Wochen. Da apikal und basal mit ganz unterschiedlichen Kulturmedien gearbeitet werden kann, können jetzt auch hypotone und hypertone Kulturmediumgradienten angelegt werden, wie sie auch in

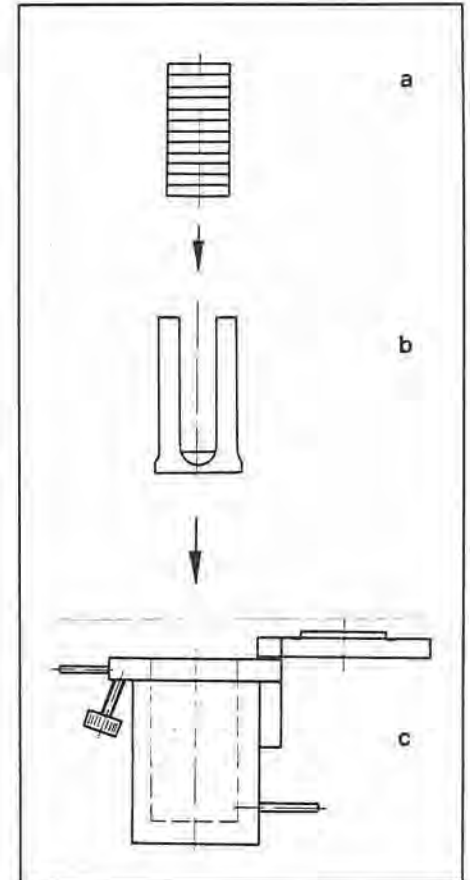


Fig 3: Da die MINUSHEETS sehr flach gehalten sind, lassen sie sich leicht stapeln und in einen Bioreaktor integrieren. a) Ähnlich einer Geldrolle werden die MINUSHEETS in einen geeigneten Halter zur Stabilisierung eingebracht. b) Der Halter wird dann mit den eingelegten MINUSHEETS in ein eigens dafür konstruiertes Bioreaktorgefäß (c) eingelassen. Danach wird der Deckel geschlossen. Der Reaktor kann von basal nach apikal mit Kulturmedium kontinuierlich durchströmt werden.

vielen Organstrukturen vorgefunden werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß von basal oder luminal ganz gezielt Hormone oder Pharmaka kontinuierlich appliziert werden können. Alle diese genannten Versuchsparameter sind mit herkömmlicher Technik nicht oder nur sehr unvollkommen machbar.

### Einige praktische Beispiele

**Niere:** Zellen der Säugerniere können jetzt unter luminalen und basalen Flüssigkeitsgradienten kultiviert werden. Damit lassen sich mit der neuen Technik erstmals die hohen (1200 mOsm) und

niedrigen (150 mOsm) Flüssigkeitsgradienten simulieren, wie sie in der Niere zur Konzentrierung des Harns nötig sind.

**Leber:** Ein weiteres Forschungsfeld sind Leberzellen, die jetzt unter Perfusionsbedingungen kultiviert werden können. Die Methode ermöglicht, daß sich in Kultur ein Blut- und Gallenkompartiment bilden läßt. Dadurch ließen sich von basal Pharmaka oder Toxine zuleiten und so die Pharmakokinetik dieser Substanzen untersuchen.

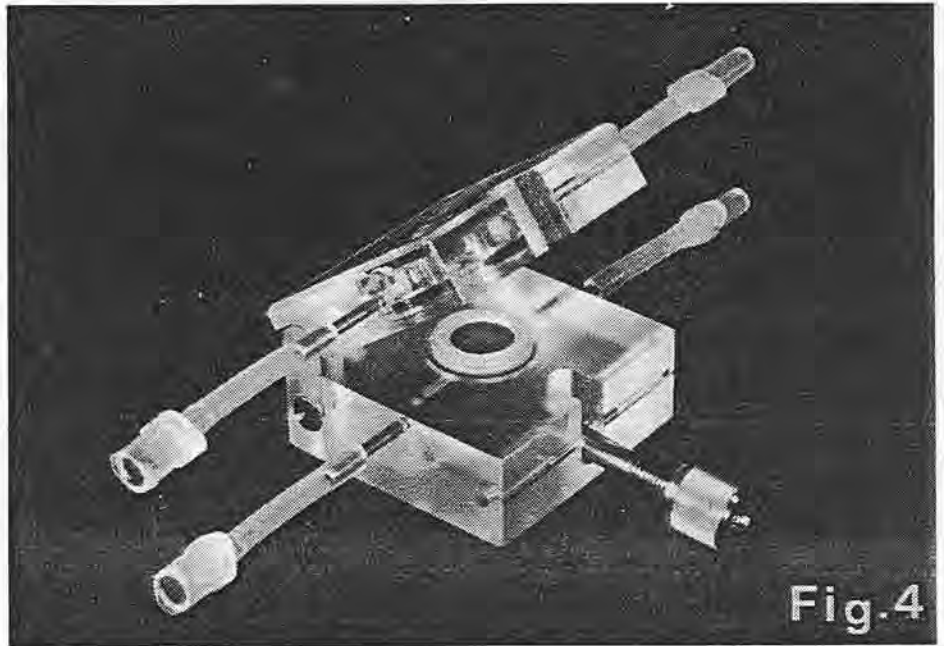
**Innenauskleidung von Blutgefäßen:** Endothelzellen als Innenauskleidung von Gefäßen können jetzt unter ganz natürlichen Bedingungen kultiviert werden. Bisherige Versuche haben gezeigt, daß die Kultivierung dieser Zellen in einfachen Kulturschalen und damit ohne eine Fließbewegung des Kulturmediums eine nur sehr unvollkommene Methode darstellt. Wichtige Beiträge zur Arterioskleroseforschung könnten hier erzielt werden.

**Blut – Hirnschranke:** Mit der neuen Technik ließe sich ganz ideal ein Blut/Hirnschrankenmodell aufbauen. Dazu können Endothelzellen auf der einen Seite, Astrozyten auf der anderen Seite des MINUSHEETS kultiviert werden. Bei Gelingen dieser Versuche ließen sich unter optimalen Modellbedingungen pharmakologische Versuche durchführen, wie sie bisher nicht möglich waren.

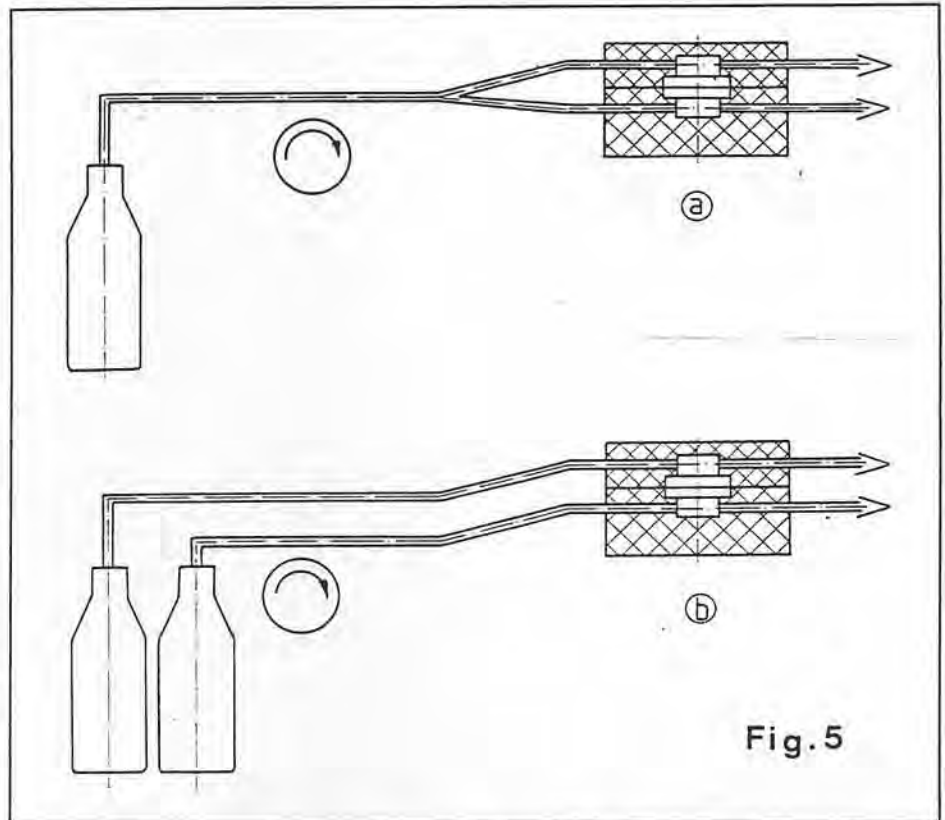
Für alle die genannten Modelle muß experimentelles Neuland beschritten werden. Durch eine sachgerechte Anwendung der neuen Technik kann unseres Erachtens nach ein besonders großes Forschungsfeld eröffnet werden. Die MINUSHEET-Technik konnte dazu beitragen, die Zellkulturmethode entscheidend zu verbessern und sie damit vergleichbar mit den dazugehörigen Organstrukturen werden zu lassen. Denn Zellkulturen sollten in unseren Augen nicht einer verselbstständigten Artefaktenforschung dienen, sondern Bezüge zu demjenigen Organ herstellen, aus dem sie stammen.

#### Weiterentwicklungen sind nötig

Ein besonderes Augenmerk bei der Entwicklung unserer Produkte werden wir auf die Routinetestung von Stoffen im pharmazeutischen Industriebereich richten. Momentan soll eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt, Zellen auf MINUSHEETS in der Gradientenperfusionskammer elektronisch zu vermessen. Damit können von jeder einzelnen Kammer über Tage hinweg die transepitheliale Potentialdifferenz und der Widerstand von wachsenden Zellen gemessen werden. Somit können Wachstum und auch Transportleistung von kultivierten Zellen im on-line Verfahren erfaßt werden. Besonders interessant werden solche Versuche, wenn z. B. die Zellen in den Perfusionskammern (Fig. 4) von basal ein Pharmakon appliziert bekommen. Elektronisch kann jetzt die Änderung von elektrophysiologischen Parametern bestimmt werden. Nach erfolgtem Versuch kann das Pharmakon ausgespült werden und nach einer Erholungsphase können die Zellen erneut genutzt werden. Es ist ein neuer Ansatz in der Zell-



**Fig 4:** Die mit Zellen bewachsenen MINUSHEETS können sehr leicht in eine Gradientenperfusionskammer eingelegt werden. Nach Verschließen der Kammer können die Zellen auf dem MINUSHEETS von oben und unten kontinuierlich mit Kulturmedium durchströmt werden.



**Fig 5:** Die Gradientenperfusionskammer erlaubt eine apikale und basale Durchströmung mit Kulturmedium. a) Es können entweder apikal oder basal das gleiche Kulturmedium (a) oder aber ganz unterschiedliche Medien (b) verwendet werden. Dadurch lassen sich Bedingungen simulieren, wie sie auch innerhalb von Organen vorgefunden werden.

kulturtechnik, daß unter nahezu natürlichen Bedingungen parallel beliebig viele Kulturen in on-line Verfahren elektronisch auf ihre Vitaläußerung hin untersucht werden können.

Viele Einzelheiten müssen an der neu entwickelten Technik noch ausgefeilt und verfeinert, sowie Teilbereiche noch völlig neu entwickelt werden. Diese Entwicklungsarbeit bereitet jedoch sehr viel Vergnügen, da an jedem Realisierungs-

schritt sichtbar wird, wie die verwendeten Zellen unter den der Natur angepaßten in-vitro Bedingungen ganz neue Informationen liefern.

★  
Kontakt:  
Prof. Dr. Will Minuth  
Institut für Anatomie  
Universitätsstraße 31  
D-8400 Regensburg  
Telefon (09 41) 9 43-28 76