

Abstract: Minusheet — a new technique to culture highly differentiated cells under natural environment

The value of cultured cells in biotechnical, pharmaceutical or cell biological research depends on the degree of terminal cell differentiation. In conventional Petridishes or tissue culture plates it is difficult to achieve culture conditions which resemble the in situ situation of intact tissue, as regards optimal cell adhesion, exchange of nutrients and metabolic products. The limitations of conventional culture conditions prompted us to develop procedures equipment which optimize the in vitro environment of cultured cells. The advantages are: The cells can be kept on individual and interchangeable support materials for optimal cell attachment. By continuous perfusion of the cells with medium, a defined nutrient concentration can be maintained throughout the whole culture period. One type of the new cell culture container can be perfused with different media at the apical and basal side of the cultures, thus mimicing the natural environment that applies for epithelial monolayers.

Kultivierung differenzierter Zellen unter natürlichen Bedingungen

Professor Dr. Will W. Minuth
 Institut für Anatomie, Universität Regensburg

Die Zellkultivierung im Labormaßstab wird seit 50 Jahren nahezu unverändert betrieben. Zwar haben die Einmalkulturgefäße aus Plastik die Petrischalen aus Glas abgelöst, doch wurde das Prinzip der Technik weitgehend beibehalten. Anders sieht die Problematik aus, wenn von Zellen eine organspezifische Leistung abverlangt wird und dabei die Zellen nicht recht wachsen wollen. Dies ist sehr häufig bei Primärkulturen zu beobachten.

Wir kultivieren Zellen in einem möglichst hohen Differenzierungszustand, um daran als Alternative zum Tierexperiment Teilfunktionen eines Organs zu untersuchen. Dazu müssen die Zellen und die Bedingungen in Kultur möglichst vergleichbar werden mit demjenigen Milieu eines Organs, welches untersucht werden soll.

Das kritische Laborgespräch

Befragt man nun eine Zelle, nämlich unseren Labor-Maxl, der mit den klassischen Techniken in eine Einmalkulturschale pipettiert wurde, nach seinem Wohlbefinden, so könnte folgender Dialog geführt werden (Abb. 1):

1. „Maxl, wie fühlst Du Dich in Deiner Kulturschale?“ — „Es geht; im Organ habe ich mich wohler gefühlt, viele Kollagene und andere perizellulären Matrixproteine gaben mir Halt. Hier, in der Schale, steht mir nur der impermeable Boden aus Polystyrol zur Verfügung.“ (Abb. 1, oben)

2. „Maxl, wie gefällt Dir das Kulturmedium?“ — „Na ja; wachsen kann man schon darin, aber in den letzten 40 oder 50 Jahren hätte man sich auch was Bes-

seres einfallen lassen können. Aber das nur nebenbei, hier in der Kulturschale erhalte ich von oben und unten das gleiche Medium. Dies bedeutet für mich als Epithelzelle einen permanenten biologischen Kurzschluß.“ (Abb. 1, Mitte)

3. „Maxl, wie sieht es mit der regelmäßigen Versorgung von Hormonen oder Wachstumsfaktoren aus?“ — „Katastrophal, weil das Kulturmedium oft mehrere Tage lang nicht gewechselt wird. Deshalb sinkt die Bioverfügbarkeit von Additiven rapide und wird schließlich unkontrollierbar. Außerdem fallen schon nach kurzer Zeit Stoffwechselprodukte an, die toxisch sind und mich ziemlich beißen.“ (Abb. 1, unten) Beim Schließen der Kulturschale ruft mir Maxl eine letzte Bemerkung zu: „Die Kollegen aus den vielen kontinuierlichen Zell-Linien werden über meine Argumente natürlich schmunzeln, weil die ja schon über 40 Jahre unter einfachsten Bedingungen wachsen und als die unproblematischen Beispiele angeführt werden. Aber denkt man an die vielen Primärkulturen, die nur recht unvollkommen und in sehr kleiner Auswahl als eine zufriedenstel-

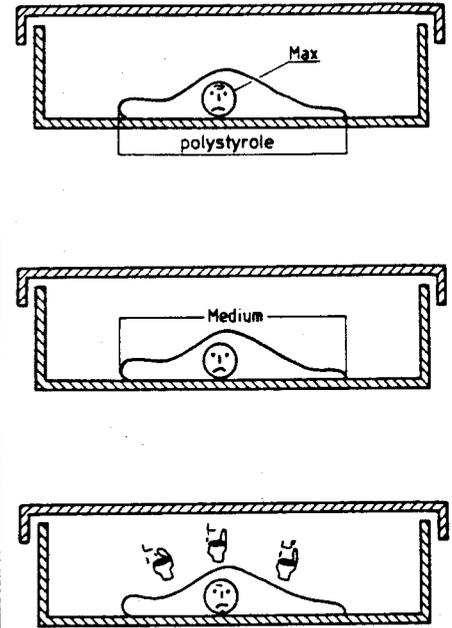


Abb. 1 (oben): „Max“ als Musterzelle in einer Kulturschale aus Polystyrol, das seiner Meinung nach nicht den natürlichen Bedingungen einer Basalmembran entspricht (Mitte): „Max“ beklagt sich, daß das Kulturmedium von oben und unten in gleicher Weise herangeführt wird. Epithelzellen wachsen immer an Flächen, wo oben und unten ganz verschiedene Medien vorkommen (unten): „Max“ stöhnt über die unkontrollierbaren Bedingungen in der Kulturschale, wenn über mehrere Tage das Medium nicht gewechselt wird

lende Alternative zum Tierexperiment verfügbar sind, so sprechen meine Argumente eine deutliche Sprache. Host mi?“ (Versteht Du mich?). Die Argumente von unserem Maxl gingen mir nicht mehr aus dem Kopf. Nach vielen Überlegungen mußte ich akzeptieren, daß die bisher angewandte Zellkulturtechnik für die vielen neuen organspezifischen Fragestellungen als nicht mehr zeitgemäß anzusehen ist. Für solche organspezifischen Kultivationsarbeiten müssen die Zellen

1. auf individuell auswählbaren Unterlagen,
2. auf permeablen und möglichst transparenten Unterlagen,
3. unter Perfusionsbedingungen,
4. unter luminalen/basalen Flüssigkeitsgradienten angesiedelt werden
5. und besonders leicht und schnell von der einen in eine andere Versuchsanordnung überführbar sein.

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

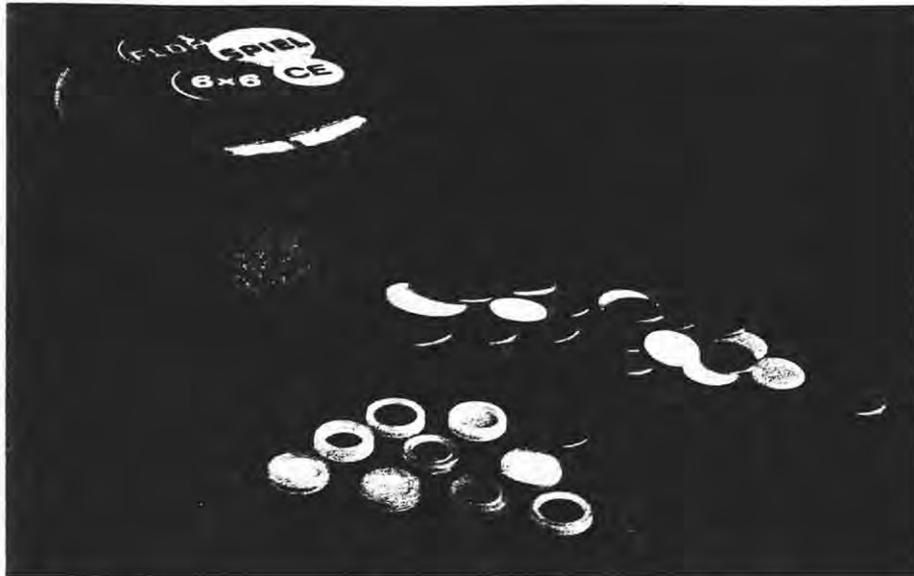


Abb. 2: Die Minusheets im Vordergrund sind dem Flohspiel nachempfunden

Das neue Konzept

In einem ersten Entwicklungsschritt wurden die sogenannten Minusheets konstruiert (Minuth und Rudolph 1990; Abb. 2). Es handelt sich hierbei um folienartige, extrem dünne Scheibchen mit konzentrischen Halterungen, die beliebig oft wiederverwendet werden können. Ein weiterer Vorteil dieser Scheiben besteht darin, daß beliebiges

Material für das Anhaften der Zellen selbst eingesetzt werden kann. So können sowohl nicht transparente wie auch transparente, impermeable oder permeable Membranen mit einem Durchmesser von 13 mm für das individuelle Experiment verwendet werden.

In die Halterung können aber auch extrem dünne biologische Häutchen eingespannt werden, wie zum Beispiel die

Capsula fibrosa von Nieren oder die Chorionallantoismembran aus Hühnereiern. Solche organspezifischen Supporte haben sich zum Beispiel als extrem günstig für die Differenzierung von hoch spezialisierten Zellen erwiesen. Ein weiterer Vorteil der Minusheet-Methode besteht darin, daß die beliebig auswählbaren Trägermaterialien zusätzlich mit Proteinen der zellulären oder extrazellulären Matrix beschichtet werden können, um ein besseres Anhaften von Zellen zu ermöglichen.

1. In der einfachen Anwendung können die individuell montierten Minusheets in beliebige Kulturgefäße eingelegt werden (Abb. 3). Sie dienen hier als ein verbesserter Kulturschalenboden. Nach Einlegen der Minusheets werden Kulturmedium und die gewünschten Zellen in das Gefäß pipettiert. Wenn die Zellen auf den Minusheets angehaftet sind, können die verschiedenen Experimente fortgeführt werden.

2. Da sich die Minusheets leicht stapeln lassen, ist es möglich, sie in kleine Bioreaktoren einzusetzen, in denen die Zellen auf sehr einfache Weise dann kontinuierlich mit Medium perfundiert wer-

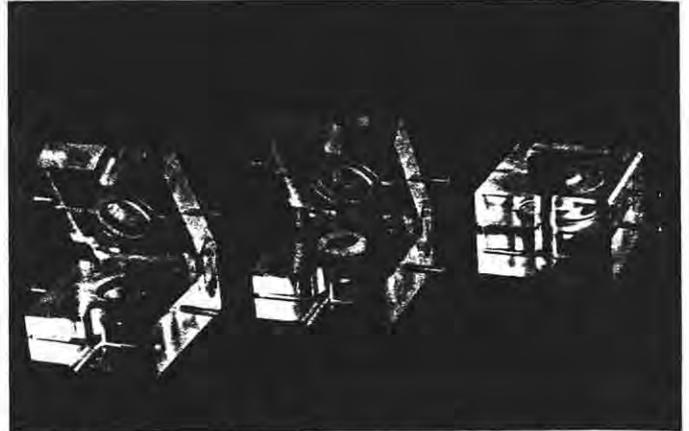
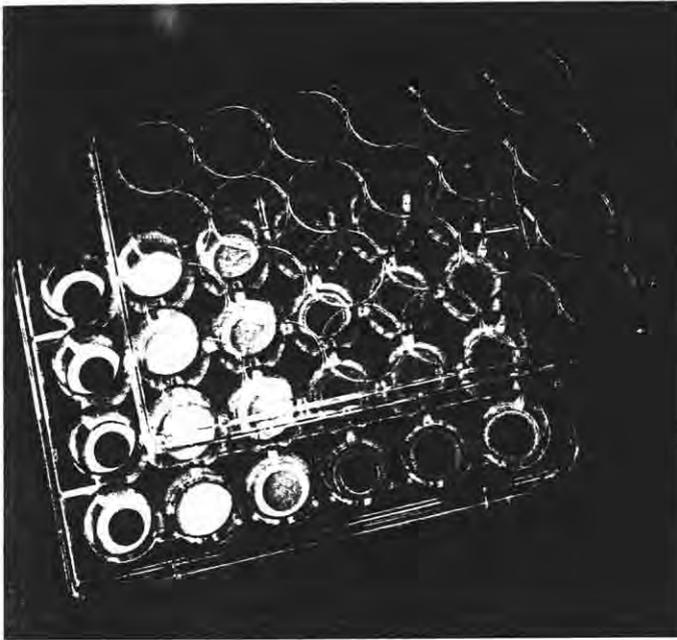


Abb. 5 (oben): Die Minusheets können in eine Gradientenperfusionskammer eingelegt werden. Damit können die auf den Minusheets wachsenden Zellen von oben und unten mit unterschiedlichen Medien durchströmt werden

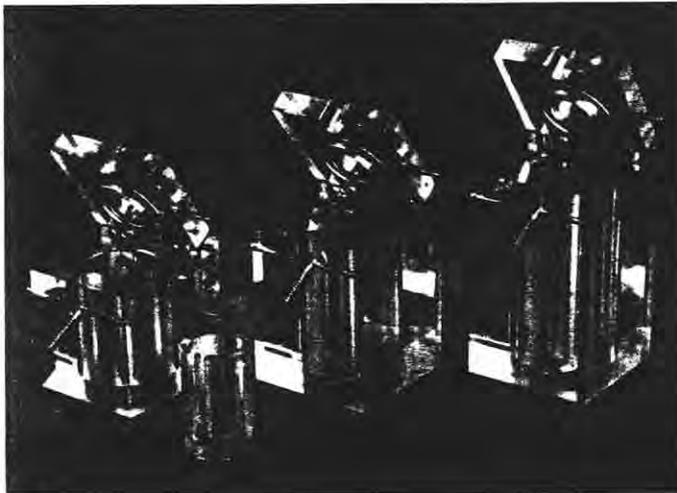


Abb. 3 (links oben): Die Minusheets können in allen kommerziellen Kulturgefäßen zur Verbesserung des Schalenbodens eingelegt werden. Für jeden individuellen Zelltyp kann eine speziell ausgesuchte Anhaftungsunterlage in die Ringhalterung eingelegt werden. Die unterschiedliche Färbung des Sheets läßt die große Vielfalt der Experimentiermöglichkeiten erkennen. Die Minusheets sind außerdem beliebig oft wiederzuverwerten

Abb. 4 (links): Mit einer Pinzette können die Minusheets binnen Sekunden von Kulturschalen überführt, in einen Halter eingelegt und dabei beliebig hoch gestapelt werden. Der Halter wird in einem Perfusionsreaktorgefäß unterschiedlicher Größe eingesetzt. Nach Schließen des Deckels kann die Perfusionskultur beginnen. Zu erkennen sind Reaktoren für mindestens 6, 12, und 24 Minusheets

den (Abb. 4). Dazu werden die Sheets in einer Halterung gestapelt. Die Halterung wird in das eigentliche Reaktorgefäß eingeführt. Nach Schließen des Deckels kann mit der Perfusion begonnen werden. Nach Belieben kann der Reaktor geöffnet werden, um einzelne Minusheets herauszunehmen oder neue einzusetzen.

3. Die Minusheets können mit den anhaftenden Zellen in eine Gradienten-Perfusionskammer überführt werden (Abb. 5). Dadurch wird eine getrennte apikale und basale Perfusion über Tage ermöglicht. Die Methode erlaubt, daß luminal und basal mit ganz unterschiedlichen Kulturmedien gearbeitet werden kann. Es können nämlich hypotone und hypertone Gradienten angelegt werden. Außerdem können kontinuierlich sowohl von basal, aber auch von luminal Hormone oder zu testende Pharmaka appliziert werden. Die beschriebenen Perfusionsversuche

lassen sich in Serie mit beliebig vielen Kammern durchführen. Wir entwickeln zur Zeit eine Methode, die es erlaubt, jede einzelne Kammer elektrisch/elektronisch zu vermessen. Dadurch können von jeder Kammer über Tage hinweg die transepitheliale Potentialdifferenz und der Widerstand der Zellen gemessen werden. Somit können Wachstum und Transportleistung von epithelialen Zellen on-line erfaßt werden. Besonders interessant werden die Versuche, wenn zum Beispiel von basal allen Zellen in mehreren Gradienten-Perfusionskammern parallel ein Pharmakon appliziert wird. Elektronisch kann jetzt in allen Kammern gleichzeitig die Änderung der elektrophysiologischen Parameter bestimmt werden. Nach erfolgtem Versuch kann das Pharmakon ausgespült und eine neue Testsubstanz appliziert werden. Es ist ein neuer Ansatz in der Zellkulturtechnik, daß unter nahezu natürlichen Be-

dingungen parallel beliebig viele Kulturen im on-line Verfahren elektronisch auf ihre Vitaläußerung hin untersucht werden können.

4. Die Minusheets können von den Perfusionskammern oder einfachen Kulturgefäßen in eine spezielle mikroskopische Halterung überführt werden. Da bei den Sheets keine hohe laterale Wand vorhanden ist, wird von oben ein ungehindertes Arbeiten mit Mikropipetten möglich. Gleichzeitig werden die Zellen von apikal und basal mit Kulturmedium durchströmt.

Die zukünftige wissenschaftliche Entwicklung

Mit der von uns entwickelten Technik lassen sich ganz neue experimentelle Fragen in der Zellkulturtechnologie bearbeiten. Dies wird dadurch ermöglicht, daß Zellen unter nahezu natürlichen Bedingungen in Kultur gehalten werden können, nämlich auf individuell

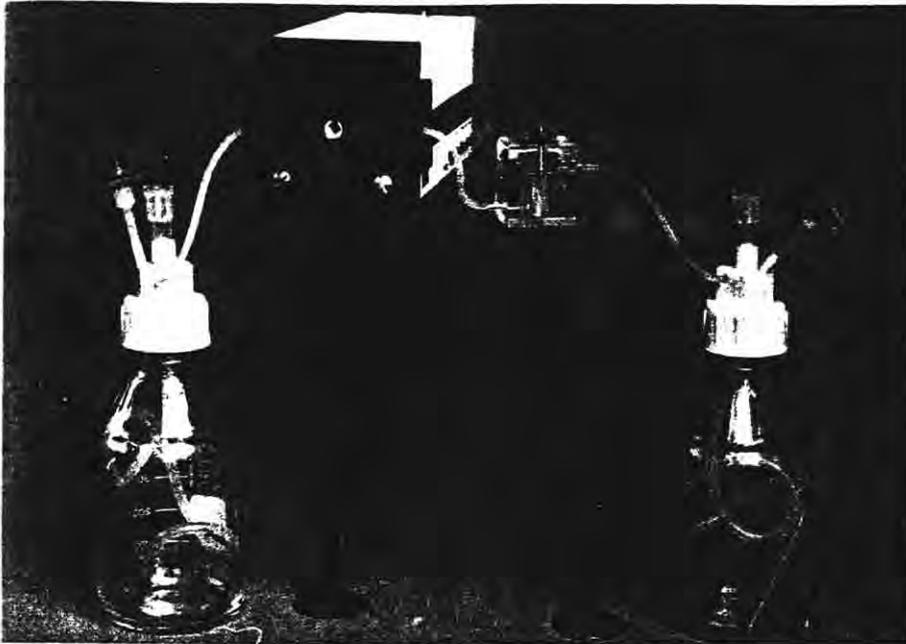


Abb. 6: Semischematische Darstellung einer einfachen Perfusionskultur mit Mediumvorratsflasche (links), Laborpumpe, Perfusionsreaktor (siehe Abb. 3) und einer Mediumabfallflasche (rechts)

auswählbaren Unterlagen, unter permanenten Perfusionsbedingungen und unter ganz unterschiedlichen Flüssigkeitsgradienten. Diese Parameter in vitro können so gewählt werden, wie sie auch innerhalb eines Organismus vorgefunden werden. Hier einige Beispiele:

1. Wir versuchen, klar definierte Zellen der Säugerniere unter luminalen und basalen Flüssigkeitsgradienten zu kultivieren. Dazu lassen sich mit unserer Technik erstmals besonders gut die hohen luminalen und basalen Salz- und Flüssigkeitsgradienten simulieren, wie sie in der Niere zur Konzentrierung des Harns notwendig sind.

2. Es sollen Leberzellen unter Perfusionsbedingungen kultiviert werden, um zu überprüfen, ob sich hier ein Blut- und Gallenkompartiment bildet. Mit unserer Technik lassen sich dann zum Beispiel Toxine oder Pharmaka von basal zuleiten, und man könnte genauestens die Pharmakokinetik unter nahezu natürlichen Bedingungen simulieren und studieren.

3. Wir wollen Endothelzellen im Perfusionsexperiment kultivieren. Die bisherigen Versuche haben unseres Erachtens gezeigt, daß die Kultivierung in Kulturschalen ohne einen rheologischen Streß nur eine sehr unvollkommene Methode darstellt. Über perfun-

dierte Endothelzellkulturen sind uns bisher nur wenige Befunde bekannt.

4. Mit unserer Technik läßt sich unseres Erachtens nach ideal ein Blut/Hirnschrankenmodell aufbauen. Falls diese Versuche gelingen, dann ließen sich unter optimalen Bedingungen pharmakokinetische Versuche durchführen, wie sie bisher nicht möglich waren.

Für alle diese Modelle muß bei der Entwicklung in hohem Maße experimentelles Neuland beschritten werden. Wir vertreten die Auffassung, daß durch die sachgerechte Anwendung unserer Technik ein besonders großes Forschungsfeld eröffnet werden kann. Hinzu kommt, daß unsere Technik prinzipiell dazu beitragen kann, viele Zellkulturmethoden zu verbessern und sie damit vergleichbarer werden zu lassen mit den dazugehörigen Organstrukturen.

Verkauf: Minucells und Minutissue, Katharina Lorenz-Minuth, Neue Welt 1, D-8401 Hohengebraching, Telefon 09405/4427.

Messeausstellung: Biotechnica '91, Stand C22/D21

Literatur

W. W. Minuth, Ulrike Rudolph (1990): A compatible support system for cell culture in biomedical research. *Cytotechnology* 4: 181-189