

Kultivierte Zellen

Eine neue Technik

zur Simulierung eines organspezifischen Milieus

Werkstattbericht

Die Zell- und Gewebekulturtechnik ist genauso alt wie das Automobil. Während jedoch in der Kraftfahrzeugindustrie seit der Jahrhundertwende kontinuierlich leistungsfähigere Motoren und Karosserien mit einem immer größeren Sicherheitsstandard entstanden sind, ist die Zellkultur als eine der zentralen Arbeitstechniken in der biomedizinischen Forschung nur in relativ wenigen und dabei kleinen Schritten vorangekommen. Wichtige methodische Probleme sind noch zu lösen.

Obwohl es inzwischen eine kaum mehr überschaubare Fülle an Veröffentlichungen über kultivierte Zellen gibt, ist es trotz vielfältiger Bemühungen bis heute nicht gelungen, eine entgiftende artifizielle Leber oder Niere auf der Basis von kultivierten Zellen zu bauen. Das gleiche gilt für organ- und speziesspezifische Zellkulturmodelle als eine Alternative zum Tierexperiment, die in akzeptierter und normierter Form bis heute nicht zur Verfügung stehen. Die Beispiele belegen, daß offensichtlich viele der technischen und zellbiologischen Probleme auch in diesem Bereich noch gelöst werden müssen. Die größten Schwierigkeiten bereitet dabei das Phänomen der Dedifferenzierung, bei der ganz wesentliche Eigenschaften von Zellen unter Kulturbedingungen verloren gehen. Ein Blick durch das Mikroskop genügt, um festzustellen, daß Zellen aus einem Organ schon wenige Stunden nach Isolierung in der Kulturschale ihr ursprüngliches Aussehen verlieren. Neben der optischen Veränderung sind aber auch funktionelle Einbußen nachzuweisen. Die Oberflächeneigenschaften gleichen nicht mehr dem Organzustand; damit werden spezifische Transportleistungen eingebüßt, und durch die Drosselung wichtiger Stoffwechselwege können Schadstoffe nicht mehr abgebaut und ausgeschieden werden.

Die Anfänge

Die wesentlichen Impulse zur Entstehung der Zellkulturtechnik gingen um die Jahrhundertwende von der damaligen Entwicklungsphysiologie aus. Man wollte erfahren, welche Mechanismen die Reifung einer befruchteten Eizelle zu einem komplex aufgebauten Organismus mit seinen einzelnen Organen bedingen. Da sich damals Experimente am Säugetierembryo technisch als unmöglich erwiesen, wandte man sich den Amphibien zu. Befruchtete Eizellen von Fröschen und Lurchen

konnten in jedem Weiher gefunden werden. Erleichternd kam hinzu, daß die Eizellen dieser Tiere von Natur aus mit einer Gallerthülle umgeben sind, die die Keime vor Infektionen und den Einflüssen des umgebenden Teichwassers schützt. Mit einer einfachen Lupe konnte die Entwicklung der Keime ohne weitere komplizierte Hilfsmittel beobachtet werden.

Eingriffe mit mikrochirurgischen Werkzeugen zum Entfernen der keimschützenden Gallerthülle an den sich entwickelnden Eizellen brachten die ersten Schwierigkeiten mit sich, wie sie für Zellkulturen typisch sind. Da das umgebende Wasser naturgemäß nicht die gleichen Ionenkonzentrationen und daher nicht den gleichen osmotischen Druck wie das Innere der Zellen hatte, platzten die Zellen nach wenigen Minuten. Zur damaligen Zeit hatte man noch keine konkreten Vorstellungen über das innere Milieu einer Zelle, nicht zuletzt, weil man wichtige Parameter, wie z.B. unterschiedliche Ionenkonzentrationen, nicht messen konnte. Unzählige Versuche über Jahrzehnte und unter Anwendung der kuriossten Chemikalien wurden unternommen, um das Kulturmedium dem inneren Milieu von Zellen anzugleichen. Erst um 1930 waren die ersten standardisierten Salzlösungen verfügbar, mit denen Zellen in einer Kulturschale am Leben gehalten werden konnten.

Da die embryonalen Amphibienzellen einen großen Vorrat an Nahrung in Form von Dotterschollen in sich tragen, mußte man sich in der Anfangsphase der Kulturtechnik vorerst keine Gedanken über die Ernährung der einzelnen Zellen machen. Dies änderte sich jedoch sehr schnell, als sich das Interesse der Wissenschaft von den Amphibienzellen hin zu den Säugetierzellen verlagerte, für die eine isotone Salzlösung zur Ernährung nicht ausreichte. Da um 1930 spezielle Nahrungsbestandteile wie Aminosäuren oder Vitamine als notwendige Bestandteile eines Kulturmediums nur vage oder überhaupt nicht bekannt waren, versuchte man, die Säugetierzellen mit Fleischbouillon oder Embryonalextrakten am Leben zu halten. Die Rezepte für diese Kulturmedien blieb Geheimsache einzelner Forscher. Einer sechzigseitigen Abhandlung des Leningrader Mediziners Zymbal über die Kultur von Nierenepithelzellen sind z.B. keine methodischen Hinweise zu entnehmen, nach denen die einzelnen Experimente heute wiederholt werden könnten.

Die Basis der neuzeitlichen Zellkultur

Bis heute nutzbare wissenschaftliche Impulse

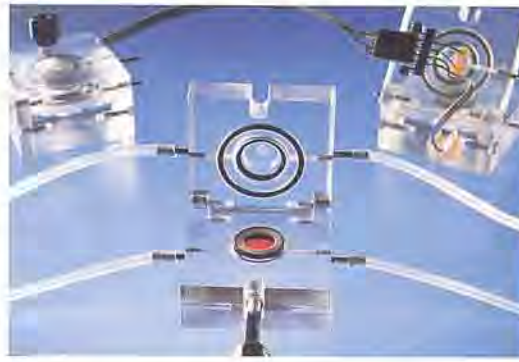
brachten erst wieder die frühen fünfziger Jahre, denn die rasanten Entwicklungen der Virusforschung basierten unmittelbar auf dem Erfolg einer modernen Zellkulturtechnik. Für die Virusvermehrung brauchte man große Mengen an Säugetierzellen, die sich problemlos und ohne viel Arbeitsaufwand vermehren ließen. Grundlage für zahlreiche dieser Untersuchungen war u.a. ein geeignetes Nährmedium für die Zellen, welches der amerikanische Forscher Harry Eagle 1955 schließlich mit 13 Aminosäuren, 6 Salzen und 8 Vitaminen spezifizierte. Mit wenigen Ausnahmen stammen alle der heute gebräuchlichen Kulturmedien aus dieser Zeit.

Neben einem geeigneten Kulturmedium war die zweite wesentliche Voraussetzung für ein züchtiges Vorankommen der Virusforschung ein zuverlässiges Zellmaterial, mit dessen Hilfe sich Viren auf einfache Art unter Kulturbedingungen vermehren ließen. Frisch isolierte Organzellen von Mensch oder Tier waren weniger gefragt, denn sie konnten möglicherweise selbst mit Viren befallen sein und erwiesen sich wegen ihrer begrenzten Lebensdauer als ungeeignet. Viel besser erschienen permanent sich teilende, also tumorartige Zellen, die sich beliebig vermehren ließen und die bis heute per Katalog zu beziehen sind. Von dem Anbieter mit der größten Auswahl an Zellkulturen, der American Type Culture Collection, werden derzeit etwa 3 200 menschliche und tierische Zellstämme offeriert, wobei ein sehr großer Teil davon schon seit den fünfziger Jahren genutzt wird. Weil diese Zellen für die Produktion von Impfstoffen, Medikamenten und Nahrungsmitteln genutzt werden können, sind diese kontinuierlichen Zell-Linien nach wie vor für die Virologie, aber auch für die heutige Biotechnologie von größter Wichtigkeit. Um die Eigenschaften bestimmter Organe zu erfüllen, sind diese Zellen jedoch weniger geeignet, da sie sich wie Tumorzellen permanent vermehren und dabei nicht die gleichen Eigenschaften entwickeln, wie sie in einem Organ vorgefunden werden.

Der Themenwandel in der Zellkulturtechnik

Neben der rein biotechnologischen Massenproduktion von Zellen möchte man heutzutage Zellen erhalten, die in möglichst vielen Punkten diejenigen Funktionen zeigen, die sie ursprünglich einmal innerhalb eines Organs ausübten. Zell- oder Gewebekulturen mit einer entsprechend klar definierten organspezifischen Qualität sind heute z. B. bei der Suche nach einer Alternative zum Tierexperiment gefragter denn je. Pharmakologische und toxikologische Untersuchungen zum Wirkmechanismus einer Substanz können nämlich an einem einzelnen und klar definierten Zelltyp in Kultur exakter durchgeführt werden, als dies an einem komplex aufgebauten Organ möglich ist, das ja aus verschiedenen Zelltypen besteht.

Überraschenderweise gibt es bisher nur ganz wenige solcher organspezifischen Zell- und Gewebekulturen. Ursache dafür ist, daß Zellen sich nach ihrer Isolierung aus einem Organ durch Veränderung ihrer Form, durch Abschalten wichtiger Transportwege und durch Verminderung spezieller Stoffwechselleistungen in einem Dedifferenzie-



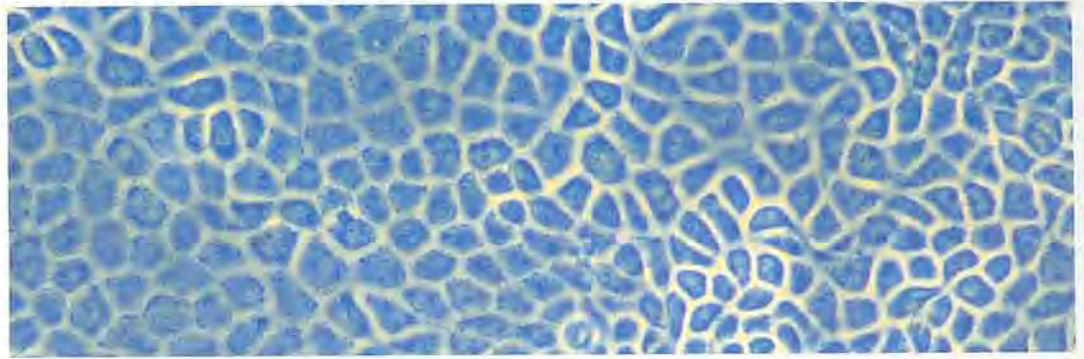
Container für kultivierte Zellen zur kontinuierlichen Registrierung von Stoffwechselleistungen (nach Schadstoffeinwirkung).

rungsprozeß stark verändern. Leberzellen in Kultur z. B. beginnen innerhalb von zwei bis vier Stunden nach der Isolierung aus dem Organverband ihre typischen Entgiftungsfunktionen zu verlieren. Daraus wird ersichtlich, daß zwar kurzfristige Versuche an solchen frisch isolierten Zellen ohne Schwierigkeiten möglich sind, alle längerfristigen Experimente, z. B. mit Arzneistoffen, dagegen mit zunehmender Zeitdauer immer fragwürdiger werden, da die Zellen sich kontinuierlich in ihren Stoffwechselleistungen verändern.

Deshalb gelang es bisher auch nicht, eine funktionsfähige ›künstliche‹ Leber auf der Basis von kultivierten Zellen zu bauen. Aus dem gleichen Grund konnte bisher auch kein Dialyseapparat mit kultivierten Zellen konstruiert werden, dessen Effizienz im Vergleich zu herkömmlichen Geräten enorm gesteigert werden könnte. Aufgrund der Dedifferenzierung konnten Langzeit-Zellkulturen in der Umwelttoxikologie ebenfalls noch nicht Fuß fassen. Gerade in diesem Bereich aber wären organspezifische Zellkulturen wegen der vielen langfristigen Einwirkungen von möglichen Umweltgiften sehr viel sinnvoller zu nutzen als Versuchstiere. Zellkulturen reagieren nämlich auf Schadstoffeinwirkung viel früher, klarer und aussagekräftiger, als dies ein tierischer Organismus mit seinen komplizierten Stoffwechselinteraktionen vermag. Bei einem behandelten Tier sind nämlich versuchsbedingte Beschwerden, insbesondere bei geringen Dosen von Schadstoffen, nicht leicht nachzuweisen. Kultivierte Zellen dagegen reagieren schon bei geringsten Schadstoffgaben prompt durch Volumen-, Plasmamembran- und Adhäsionsänderungen, die mit den unterschiedlichsten Meßmethoden objektiv erfaßt werden können [1].

Der experimentelle Status quo

Wegen der guten optischen Eigenschaften wurden in der Zell- und Gewebekultur ursprünglich Glasgefäße unterschiedlichster Form und Größe verwendet, deren bekanntester Vertreter die Petrischale darstellt. Im Laufe der letzten zwanzig Jahre wurden die Glaswaren jedoch durch Artikel aus Polystyrol ersetzt, die nach Gebrauch wegwerfen werden. Obwohl inzwischen von den verschiedensten Firmen ein kaum mehr überschaubares Sortiment an Einweg-Kulturgefäßen angeboten wird, sollte man meinen, daß damit auch das Grundproblem der Zellkulturtechnik, nämlich der Dedifferenzierungsprozeß gelöst sei. Vergleicht man die Lebenssituation einer Zelle innerhalb unseres Organismus mit einem Milieu unter Labor-



bedingungen in einer Kulturschale, so finden sich aber nicht – wie vermutet – weitgehende Gemeinsamkeiten, sondern überraschende Unterschiede.

Die Organsituation

In den meisten Organen unseres Körpers befinden sich die Zellen in einer sogenannten Kontaktinhibition, das heißt, sie teilen sich nicht fortwährend. Für die Zellkultur ist das von besonderer Bedeutung, da eine teilungsaktive Zelle nicht gleichzeitig eine organspezifische Funktion ausüben kann. Zudem stehen die Zellen in engem Kontakt mit einer besonders attraktiven und die Differenzierung positiv beeinflussenden Unterlage, der Basalmembran oder der perizellulären Matrix. Durch die Blutzirkulation werden alle Zellen kontinuierlich mit Sauerstoff und neuer Nahrung versorgt, während die zellschädigenden Stoffwechselprodukte und das Kohlendioxid über den venösen Blutstrom abgeführt werden. Die Epithelzellen in unserem Körper sind zudem einer ganz besonderen Situation ausgesetzt [2]. Da diese Zellen Körper Räume abgrenzen, sind sie oben und unten völlig unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt. Haut- oder Lungenepithelzellen z.B. kommen von der einen Seite mit Luft in Berührung, während die andere Seite von Blutserum versorgt wird. Nierenepithelzellen werden auf der einen Seite von Harnflüssigkeit, auf der anderen von Blutserum umflossen. Diese oberhalb und unterhalb der Epithelien krass unterschiedlichen Medien weisen ein massives Konzentrationsgefälle auf. Dies bewirkt bei den Epithelzellen eine polare Ausrichtung, mit der Notwendigkeit, eine Barriere mit sehr speziellen Schutz- und Transporteigenschaften zu entwickeln.

Die In-vitro-Situation

Ganz anders stellt sich die Situation unter Kulturbedingungen dar. Werden Epithelien aus einem Organ herausgelöst und in eine Kulturschale

gebracht, so wachsen die Zellen auf einem undurchlässigen und unnatürlichen Kulturschalenboden, auf dem sie sich wie Tumorzellen permanent teilen. Tagelang befinden sie sich in demselben Kulturmedium, ohne daß die Stoffwechselprodukte kontinuierlich entfernt werden. Hinzu kommt, daß die Epithelien von oben und unten mit dem gleichen Kulturmedium versorgt werden. Dadurch befinden sie sich in einem »biologischen Kurzschluß«. Da die Zellen erwiesenermaßen in unserem Körper perfekt funktionieren, unter Kulturbedingungen jedoch innerhalb kürzester Zeit viele ihrer spezifischen Funktionen durch Dedifferenzierung einstellen, muß demnach der Fehler für die mangelhafte Zellqualität bei den unzulänglichen Kulturbedingungen liegen.

Um die Kulturbedingungen der natürlichen Situation besser anzupassen, wurden in den letzten Jahren Kulturgefäße häufig mit Proteinen der Basalmembran oder der extrazellulären Matrix beschichtet. Mit den verschiedenen Kollagentypen sowie mit Fibronectin und Laminin lassen sich weitgehend natürliche Zellunterlagen schaffen, die die Differenzierung der Zellen positiv beeinflussen. Außerdem wurde versucht, Epithelien unter naturähnlichen Bedingungen zu halten, indem die Zellen zusätzlich zur Beschichtung auf Filtern als ein durchlässiger Basalmembranersatz kultiviert wurden.

Die organtypische Zell- und Gewebekultur

Trotz zahlreicher technischer Verbesserungen in der konventionellen Zellkulturtechnik veranlaßten uns viele weiterhin bestehende Mängel, eine neue Strategie für die Entwicklung eines organspezifischen Zellkulturmilieus zu verfolgen:

Erstens sollten die Zellen auf einer individuell auswählbaren und basalmembranähnlichen Oberfläche kultiviert werden. Dazu entwickelten wir eine spezifische Zellhalterung – das *Minusheet* [3], [4].

Zweitens sollten die Zellen unter permanenter

[3] Zellhalterungen mit individuell auswählbaren 13 mm oder 47 mm Unterlagen dienen zur optimalen Zellverankerung.

[4] Die 13 mm Zellhalterungen werden zum Anhaften der Zellen in eine Kulturplatte mit 24 Vertiefungen eingelegt.





Erneuerung des Kulturmediums gehalten werden. Dafür konstruierten wir geeignete Perfusionskammern **5**.

Drittens sollten die Epithelien von oben und unten mit ganz unterschiedlichen Medien versorgt werden, um die gleichen Konzentrationsgefälle zwischen den Zellen zu erzeugen, wie sie innerhalb der einzelnen Organe vorgefunden werden. Dieses Problem lösten wir mit einer Gradienten-Perfusionskammer **6**.

Viertens sollte die neu entwickelte Zellkulturtechnik ohne Anpassungsprobleme auf der traditionellen Zellkulturtechnik mit ihren spezifischen Maßen und Gefäßen aufbauen **7**.

Die Zellhalterung **8**: Sie besteht aus drei Teilen – dem schwarzen und dem weißen Haltering sowie einer geeigneten Zellunterlage. Für ein Kultorexperiment kann somit eine Zellunterlage ausgewählt werden, auf der die Zellen optimal anhaften und ihre spezifischen Eigenschaften entwickeln können. Nach Sterilisation kann die Zellhalterung mit einer Pinzette als ein »verbesserter Kulturschalenboden« in ein beliebiges Gefäß eingelegt werden **9**. Danach wird das Kulturmedium mit den Zellen aufpipettiert. Nach dem Anhaften der Zellen können die Halterungen dann mit einer Pinzette in die jeweiligen organotypischen Versuchsbedingungen überführt werden.

Die Perfusionskammer **5**: Die auf den Zellhalterungen gezüchteten Zellen eignen sich besonders gut für das Durchströmen mit immer frischem Medium. Da die Zellhalterungen flache Scheibchen darstellen, sind sie wie Münzen in den Kammern stapelbar. Auf der Bodenseite einer solchen Kammer kann permanent frisches Kulturmedium eingepumpt und an der Oberseite das verbrauchte Medium wieder abgeführt werden. Genau wie in der Blutbahn lassen sich auf diese Weise besonders gut standardisierbare Kulturbedingungen erreichen.

Die Gradienten-Perfusionskammer **6**: Die Kultivation von Epithelzellen unter nahezu natürlichen Bedingungen ermöglicht schließlich die Gradientenperfusionskammer, bei der die Zellen von oben und unten mit ganz unterschiedlichen Kulturmedien durchströmt werden. Die mit Zellen bewachsene Halterung teilt die Kammer in ein oberes und unteres Kompartiment. Dadurch werden z.B. Nierenzellen auf der einen Seite mit hypotonen und auf der anderen Seite mit hypertonen Medien versorgt. Wie in der Niere kann aber genauso gut auch eine urinähnliche Flüssigkeit von der einen und ein blutähnliches Medium von der anderen



Seite hindurchgeleitet werden. Eine weitere Verbesserung besteht darin, daß sich z.B. Hormone wie unter natürlichen Bedingungen ganz gezielt nur an eine Zellseite heranführen lassen.

Die Perspektive des Biomonitoring

Optimal kultivierte Zellen reagieren auf toxische Substanzen sehr viel schneller, spezifischer und genauer als die meisten bisher bekannten chemotechnischen Analysegeräte. Die Kunst der modernen Zellkultur wird in Zukunft darin bestehen, die lebenden Zellen – in hervorragender Qualität – auf elektronisch leitenden Oberflächen zu züchten und dann die Reaktion dieser Zellen unmittelbar und über einen beliebig langen Zeitraum *on line* abzuleiten, um die einzelnen Meßdaten auf einem Computer zu erfassen **7**.

Mit solchen lebenden Biosensoren ließe sich dann über Monitor feststellen, ob z.B. durch eine chemische Milieuveränderung die Verankerung der kultivierten Zellen untereinander beeinflusst wird, ob die Zellen sich von ihrer Unterlage absetzen und ob ganz spezifische Stoffwechselwege vermehrt oder vermindert arbeiten. Ohne Beeinträchtigung durch die in einem Tier vorhandenen komplexen und dabei relativ langsam ablaufenden Organinteraktionen könnten so Änderungen des Stoffwechsels in Sekunden durch lebende Biochips weitergeleitet, elektronisch verarbeitet, automatisch über einen langen Zeitraum registriert und dabei objektiv interpretiert werden. In der pharmazeutischen Industrie wird diese Technik für das automatisierte und damit schnelle Auffinden pharmakologisch relevanter Substanzen genutzt werden. Solche Biochips ließen sich aber auch an jedem Gewässer zur permanenten Umweltüberwachung einsetzen.

Zu Autor und Thema ► Seite 77



5 Nachdem die Zellen sich auf den Unterlagen festgesetzt haben, werden die Halterungen in Perfusionskulturkammern überführt und für eine beliebig lange Zeit mit Kulturmedium versorgt.

6 Die Zellhalterung teilt die Gradientenperfusionskammer in ein oberes und unteres Kompartiment. Nierenzellen können jetzt wie unter natürlichen Bedingungen mit einem harnähnlichen Medium auf der einen Seite und mit blutähnlichem Medium auf der anderen Seite durchströmt werden.

7 Die Perfusionskulturkammern können an elektronische Durchflußsensoren angekoppelt werden, die ein automatisches und permanentes Biomonitoring ermöglichen.