

Organ-spezifisches Environment für kultivierte Zellen und Gewebe

Organo-typical environment for cultured cells and tissues

W. W. MINUTH, S. KLOTH, J. AIGNER, M. SITTINGER, W. RÖCKL, Regensburg*

Key words: Gewebe, Zellen, Kultur, Perfusion, Organtypische Qualität

Tissue, cells, culture, perfusion, organo-typical quality

Zusammenfassung

Bei der Kultur von Zellen oder Geweben gehen typische morphologische, physiologische und biochemische Eigenschaften verloren. Dieser Dedifferenzierungsprozess beginnt während der Isolierung und setzt sich unter den statischen Kulturmediumbedingungen auf dem Boden der Plastikkulturgefäße während der gesamten Zeit fort. Das Beschichten der Gefäße mit Proteinen der extrazellulären Matrix, die Verwendung von Filtereinsätzen oder die Herstellung von dreidimensionalen Kollagenschwämmen verbessert zwar die Situation, berücksichtigt aber nicht die komplexen Einwirkungen von Differenzierungsfaktoren oder Cytokinen und die speziellen Ernährungsbedürfnisse einzelner Zellen oder Gewebe. Eine konventionelle Kulturschale spiegelt nicht das Environment eines Organs oder Gewebes wider. Zur Qualitätsverbesserung von Cytocharakteristika entwickelten wir deshalb ein System, mit dem Zellen oder ganze Gewebe unter individuell angepaßten und damit organotypischen Bedingungen gehalten werden können. Das System beinhaltet kompatible Zellträger, die eine Auswahl von individuellen Unterlagen zum optimalen Anhaften und Differenzieren der Zellen ermöglichen. Die Anzucht der Zellen auf den Trägern erfolgt in bisher üblichen Kulturgefäßen. Danach werden die Träger in spezielle Container überführt, die permanent mit Kulturmedium durchströmt werden. Gradienten

tencontainer erlauben wie unter natürlichen Bedingungen die Ernährung von Epithelien mit unterschiedlichen Medien von unten und oben. Das in sich geschlossene System arbeitet auf einem Labortisch. Benötigt werden pH-stabilisiertes Kulturmedium, eine Peristaltikpumpe und eine Wärmeplatte. Ohne Subkultivierung können Zellen oder Gewebe über besonders lange Zeiträume von Wochen und Monaten in einer Qualität gehalten werden, wie dies unter konventionellen Bedingungen nicht möglich war. Besonders interessant werden die Anwendungen im pharmakologischen, toxikologischen und arbeitsmedizinischen Bereich, wo chronische Einflüsse von Substanzen oder Materialien unter organähnlichen Bedingungen untersucht werden sollen.

Summary

If cells are taken out of an organ and brought in culture, normally they lose morphological, physiological and biochemical features. This dedifferentiation process starts during the isolation procedure and continues during the whole culture period under the stagnant liquid environment at the bottom of tissue culture plasticware. The use of filters as basement membrane substitute, the coating of culture ware with extracellular matrix proteins or the preparation of threedimensional collagen gels improve the situation, but do not consider the paracrine influence of cytokines and specific nutritional needs of individual cell types. As a consequence, we constructed a new system to adapt as far as possible cell and tissue cultures to an organo-typical environment. It works with a compatible cell carrier arrangement, which allows an individual selection of supports for an optimal cell adhesion and differentiation. Then the cell carriers are placed in specific containers, which are permanently perfused with medium. Gradient containers make the perfusion at the upper and lower side of epithelia with different media possible. The system runs

with a peristaltic pump and a warming table out of the atmosphere of an incubator with pH-stabilized media. Without any subculturing of cells or tissues the chronic influence of drugs can be studied over month in a quality not obtained before.

Einleitung

In der Biomedizin und Biotechnologie sind effiziente Zell- und Gewebekulturen heute gefragter denn je [1]. Meistens werden Zellen und Gewebe mit dem Ziel kultiviert, so schnell wie möglich eine genügend große Menge an Biomaterial für die Untersuchung zur Synthese eines Proteins oder z.B. für die Klärung des Steuermechanismus eines Ionenkanals zu erhalten [2]. Die Effizienz des Kultursystems wird zuerst an der Zellzahl und dann meist an einer einzelnen Funktion gemessen. Betrachtet man die Vielfalt an verfügbaren Zelllinien und deren Anwendungsbreite, die sich zwischen ein paar Mikrolitern in einer Klonierplatte und Tausenden von Litern in einem Bioreaktor bewegen, so scheinen technischen Schwierigkeiten bei der Kultivierung im wesentlichen gelöst zu sein. Wenn die kultivierten Zellen z.B. einen Antikörper in zufriedenstellender Menge produzieren, besteht kein Grund weitergehender Qualitätsansprüche an die Zellen zu erheben [1, 3].

Ganz anders sieht jedoch der Qualitätsanspruch bei organspezifischen Zellkulturen aus. Dazu werden Zellen und Gewebe in Kultur gebracht, um spezifische Organfunktionen oder Gewebeinteraktionen ohne die interferierenden Einflüsse eines Organismus zu untersuchen [4]. Modelle mit kultivierten Leber-, Lungen- oder Nierenzellen für die Wirkstoffprüfung sollen möglichst den gleichen funktionellen Phenotyp an Zelle beinhalten, wie er auch in den einzelnen Organen eines Tieres oder des Menschen vorgefunden wird. Besonders wichtig ist dabei, daß die in vitro Experimente auf die Organsituation übertragbar sind [5]. Der gleiche Anspruch für Übertragbarkeit gilt für Kulturen, die zur

* Prof. Dr. Will Minuth, Dr. S.Kloth, J. Aigner, M. Sittinger, W. Röckl, Universität Regensburg, Institut für Anatomie, Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg

Bioverträglichkeitsprüfung von neuen Gelenkmaterialien, künstlichen Blutgefäßen oder zahntechnischen Implantaten benötigt werden [1]. Qualitätsstandard für alle diese Kulturen sollte sein, daß der direkte Vergleich der Kulturexperimente mit den Gegebenheiten innerhalb eines Körpers möglich wird. Die Ideallösung würde somit beinhalten, daß die Kulturen alle diejenigen Eigenschaften aufweisen, wie sie auch innerhalb unseres Körpers vorgefunden werden. Zahlreiche Experimente jedoch haben gezeigt, daß typische Eigenschaften der Zellen während ihrer Isolierung aus dem Organ und der darauffolgenden Kultur verlorengehen [6]. Dieser unberechenbare Dedifferenzierungsprozeß wird durch eine ungenügende Zellverankerung, statisches Kulturmedium, unphysiologische Ernährungsbedingungen, sowie durch eine unbalancierte Interaktion von Cytokinen in den Kulturgefäßen verursacht [5]. Die Verwendung von verschiedenen Filtern als Basalmembranersatz oder die Beschichtung von Kulturschalenböden mit Proteinen der extrazellulären Matrix verbesserte zwar die Qualität der kultivierten Zellen, löste aber nicht wirklich und in allen Bereichen das Problem der Dedifferenzierung [7, 8, 9]. Da bei den Hollow fiber Systemen [5] optimale Basalmembranmaterialien nicht ausgewählt werden können und bei spheroidalen oder dreidimensionalen Kulturen in konventionellen Kulturgefäßen das Microenvironment mit seinen spezifischen Cytokininteraktionen nicht individuell beeinflusst werden kann, entwickelten wir ein System, mit dem organotypische Kulturbedingungen für adherente Zellen unter sehr einfachen Bedingungen simuliert werden können [11, 12].

Die Strategie für ein organotypisches Environment

Um die Verankerung und Differenzierung von Zellen zu optimieren, ist eine für den entsprechenden Zelltyp und für das jeweilige Experiment besonders geeignete Unterlage erforderlich. Aus diesem Grund wurden flache Zellträger entwickelt, die ganz individuell mit geeigneten, also der jeweiligen Zellart angepaßten Unterlagen ausgestattet werden können. Die Zellunterlage, z.B. ein Polycarbonat-Filter wird in diesen Träger eingespannt (Abb. 1) und nach dem Autoklavieren in ein Kulturgefäß gelegt (Abb. 2). Die Zellen werden auf den Filter aufpipettiert, um anzuhafte. Anstatt eines Filters können wie in einem Sandwich z.B. auch zwei Nylonnetze zum Fixieren eines dünnen Gewebeschnittes in den Zellträger eingelegt werden. Die mit Zellen bewachsenen Träger werden dann

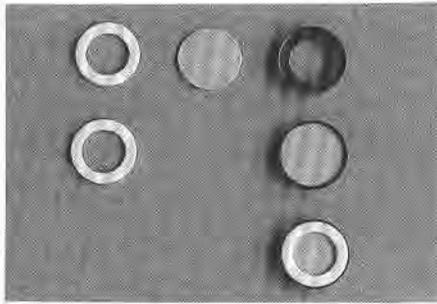


Abb. 1: Spezielle Träger ermöglichen die individuelle Auswahl von Zellunterlagen für ein optimales Anheften und Differenzieren. Der Zellträger besteht aus drei Teilen: einem schwarzen Haltering, dem ausgewählten Zellunterlagematerial mit einem Durchmesser von 13 oder 47 mm und einem weißen Spannring. Zusammengesetzt wird der Zellträger, indem das Zellunterlagematerial in den schwarzen Haltering eingesetzt und mit dem weißen Spannring fixiert wird.

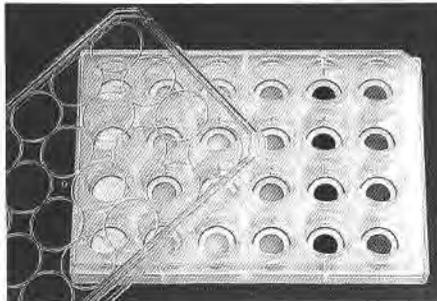


Abb. 2: Nach dem Autoklavieren werden die Zellträger mit den optimierten Unterlagen als verbesserter Kulturschalenboden in eine 24-Well-Platte eingelegt, dann werden die Zellen aufpipettiert.

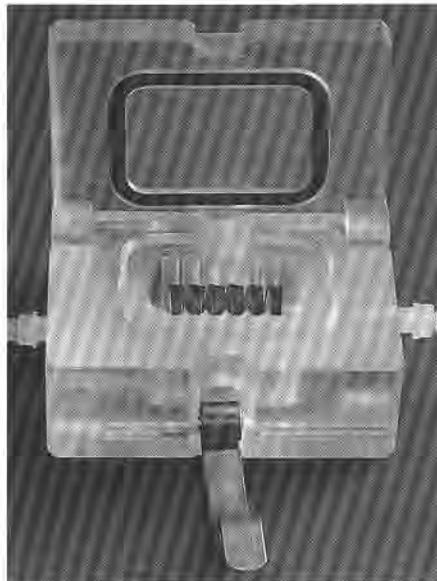


Abb. 3: Perfusionkultur mit Zellen auf speziellen Zellträgern. Nach dem Anheften der Zellen auf der jeweiligen Unterlage können die Träger mit einer Pinzette in Perfusionkultur-Container überführt werden. Kulturmedium wird zur Bodenplatte gepumpt, strömt zwischen den Zellträgern hindurch und verläßt an der oberen Seite den Container. Zellen und Gewebe lassen sich für Wochen und Monate ohne eine Subkultivation halten.

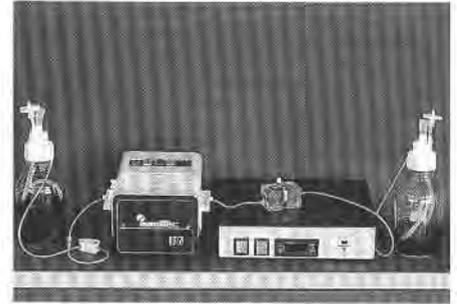


Abb. 4: Das Kultursystem arbeitet auf einem Labortisch. Das Kulturmedium wird von der links stehenden Flasche über eine Peristaltikpumpe angesaugt und in den Perfusionkultur-Container gepumpt. Eine Wärmeplatte sorgt für die richtige Temperatur von 37°C. Das verbrauchte Kulturmedium wird in der Flasche auf der rechten Seite gesammelt. Da pH-stabilisierte Medien verwendet werden, arbeitet das System mit einfachsten Mitteln außerhalb eines Inkubators.

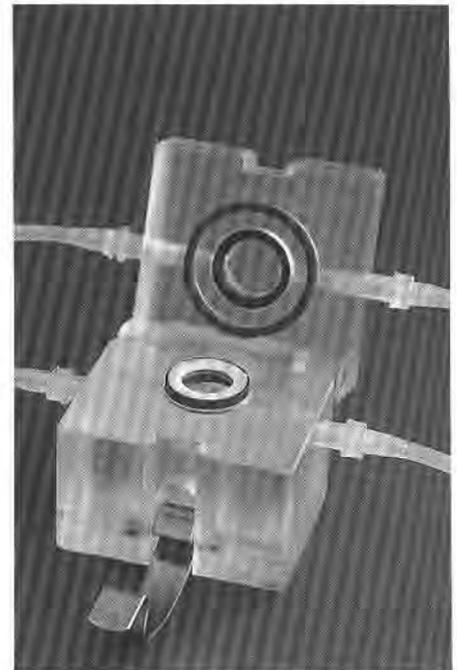


Abb. 5: Epithelzellen können in einem Gradientencontainer wie unter natürlichen Bedingungen von der basalen und apikalen Seite mit unterschiedlichen Medien durchströmt und über besonders lange Zeiträume kultiviert werden.

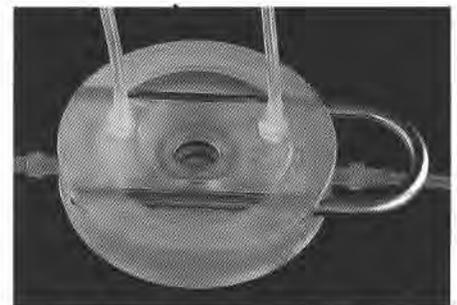


Abb. 6: In einer Mikroskopkammer werden die Zellen auf den Trägern von der oberen und unteren Seite mit Medien durchströmt. Mit einem inversen Mikroskop lassen sich die auf den Trägern gewachsenen Zellen sehr leicht nachweisen.

mit einer Pinzette in verschiedene Container eingelegt (Abb. 3, 5, 6), wo sie wie unter natürlichen Bedingungen permanent mit frischem Kulturmedium versorgt werden (Abb. 4). Eine langsam laufende Peristaltikpumpe erneuert das Kulturmedium in den Containern und eine Wärmeplatte sorgt für die richtige Temperatur von 37°C. Da HEPES-gepufferte, Leibowitz oder andere pH-stabilisierte Medien verwendet werden, ist es möglich, das gesamte in sich geschlossene System außerhalb der Atmosphäre eines CO₂-Incubators auf einem Labortisch für viele Wochen oder Monate zu betreiben.

Zellträger ermöglichen die Auswahl einer optimalen Unterlage

Es konnte in vielen Untersuchungen gezeigt werden, daß der Phänotyp einer Zelle durch unterschiedliche Zellunterlagen beeinflusst wird [3]. Aus diesem Grund haben wir Zellträger entwickelt, bei denen ganz individuell die Unterlage ausgewählt und ausgetauscht werden kann (Abb. 1). Der Zellträger besteht aus einem schwarzen Haltering, in welchen das ausgewählte Unterlagematerial für die Zellen selbst eingesetzt werden kann. Eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Materialien wie Glas, Papiere, Folien, Filter, Netze, oder Stoffe mit einem Durchmesser von 13 oder 47 mm eignen sich als Einsatz in die Zellträger, daneben können auch ausgestanzte biologische Häutchenpräparate wie die Capsula fibrosa der Niere als ausgezeichnete Zellunterlagen dienen [13]. Die Zellträger werden entsprechend des eingesetzten Zellunterlagematerials autoklaviert oder in Flüssigkeiten wie in Äthanol oder Formalin sterilisiert. Die Verwendung von unterschiedlichen Zellunterlagematerialien in den Zellträgern unter sonst gleichen Versuchsbedingungen ermöglicht eine schnelle Ermittlung des optimalen Wachstums und Differenzierungsverhaltens der Zellen.

Kultur und optische Kontrolle der Zellen auf den Zellträgern

Nach der Sterilisation werden die Zellträger mit einer feinen Pinzette in eine Kulturschale gelegt (Abb. 2). Die Zellen werden in einem kleinen Volumen Kulturmedium auf die Zellunterlage aufpipettiert. Man läßt die Zellen dann für eine gewisse Zeit anhaften und sich ausbreiten. Wenn transparente Zellunterlagen in den Zellträgern verwendet werden, kann das Wachstum mit einem inversen Mikroskop und Phasenkontrastoptik untersucht werden. Wenn Zel-

len auf undurchsichtigen Unterlagen kultiviert wurden, wird der Zellträger kurz in 70% Ethanol eingetaucht, dann z.B. mit Propidiumiodid oder einem fluoreszierendem Antikörper markiert. Der Zellträger wird anschließend mit der bewachsenen Seite nach unten gedreht und mit einem inversen Mikroskop betrachtet, welches mit einer entsprechenden Epifluoreszenzoptik ausgerüstet ist [13].

Container für die Perfusionskultur

Die Verwendung einer optimalen Zellunterlage ist nur eine der wichtigen Voraussetzungen für die optimale Differenzierung von Zellen unter Kulturbedingungen. Verbessert wird die gesamte Situation für Zellen, wenn sie kontinuierlich neues Medium erhalten und zellschädigende Stoffwechselprodukte entfernt werden. Offensichtlich wird die Synthese parakriner Faktoren unter Perfusionsbedingungen kontrollierbarer als unter den statischen Kulturmediumbedingungen in einer Kulturschale [8, 10]. Um diese Faktoren bei den weiteren Experimenten zu berücksichtigen, wurden Container für die Perfusionskultur entwickelt (Abb. 3, 5, 6). Nach Öffnung des Deckels werden die mit Zellen bewachsenen Träger mit einer feinen Pinzette in die Container eingesetzt (Abb. 3). Über Silikonschläuche, Luerverbindungen und speziellen Schraubverschlüssen wird die Verbindung zu zwei Medienflaschen hergestellt (Abb. 4). Eine Peristaltikpumpe fördert das Kulturmedium von der Vorratsflasche zur Bodenplatte des Containers. Das Medium fließt zwischen den Zellträgern hindurch und verläßt auf der oberen Seite den Container. Es hängt von dem jeweiligen Experiment ab, wie schnell das Kulturmedium durch den Container hindurchfließen soll und innerhalb welchem Zeitraum das Medium komplett ausgetauscht wird. Bei der Perfusion eines Containers mit 6 x 13 mm Zellträgern (Abb. 3) erhielten wir bei einer kontinuierlichen Fließgeschwindigkeit von 1 ml/h Medium optimale Differenzierung von Tubuluszellen [14, 15] und endothelialen Zellen [16] der neonatalen Kaninchen-niere. Andere Autoren benutzten eine „stop and go“ Perfusion mit höheren Durchströmungsraten als 1 ml/h für die Generierung von Knorpelgewebe [17].

Da die mitotische Aktivität der Zellen unter Perfusionsbedingungen reduziert wird und dadurch der natürlichen Situation angepaßt wird, können foetales Kälberserum oder Wachstumsfaktoren reduziert oder sogar weggelassen werden. Häufig kann Serum von adulten Tierspezies verwendet werden [8].

Perfusionskultur von Epithelien mit unterschiedlichen Medien von unten und oben

Alle Epithelien in unseren Organen funktionieren als kontrollierende Barriere zwischen zwei ganz unterschiedlichen physiologischen Kompartimenten. Um solche naturalistische Bedingungen zu simulieren, werden Epithelien z.B. für einen Tag auf einem Zellträger in einer Kulturschale vor-kultiviert. Dann werden die Zellträger für 14 Tage in einen Gradientencontainer überführt (Abb. 5). Die Epithelzellen trennen den Gradientencontainer in ein oberes und unteres Kompartiment, die beide wie unter natürlichen Bedingungen mit ganz unterschiedlichen Medien durchströmt werden können. Renale Epithelien können so von der luminalen Seite mit urinhaltigem, von der basalen Seite mit serumhaltigem Medium durchströmt werden. Die Gegenwart eines Mediumgradienten simuliert die natürliche Situation, unterstützt die polare Differenzierung und hält vektorielle Transportfunktionen aufrecht.

Apikale und basale Perfusion von unterschiedlichen Medien unter optischer Kontrolle

Neben einer immunhistochemischen Kontrolle von kultivierten Zellen ist es für viele Anwendungen wünschenswert, die Zellen während ihres Wachstums oder während eines pharmakologischen Versuchs lichtmikroskopisch kontrollieren zu können (Abb. 6). Die auf den Trägern gewachsenen Zellen können auf zweierlei Weise untersucht werden. Bei Benutzung transparenter Zellunterlagen werden die Träger in eine Kulturschale gelegt und mit einem inversen Mikroskop analysiert. Die Zellträger können aber auch in eine spezielle Mikroskopkammer eingesetzt werden. Genau wie beim Gradientencontainer (Abb. 5) können die Zellen in der Mikroskopkammer von der oberen Seite und der unteren Seite mit gleichen oder unterschiedlichen Medien durchströmt und gleichzeitig mit einem inversen Mikroskop beobachtet werden (Abb. 6).

Experimentelle Fortschritte

Es ist ein schon lang gehegter Wunsch der Wissenschaft, Zellen und Gewebe unter organähnlichen Bedingungen zu kultivieren. Seit vielen Jahren ist bekannt, daß das Durchströmen der Kulturen mit Medium [18], die Auswahl eines geeigneten Ersatzes für die Basalmembran [7, 9] und die

Anpassung des Mikroenvironments die Qualität von kultivierten Zellen entscheidend beeinflusst [5]. Diese Erkenntnisse werden bis heute nur sehr zögernd berücksichtigt. Tatsache ist aber auch, daß die Simulierung eines organotypischen Environments für kultivierte Zellen mit den gegenwärtig angebotenen Plastikkulturgefäßen nicht möglich ist. Hat die Industrie ein rechtzeitiges Reagieren auf Verbesserungen in der Kulturtechnik versäumt oder fehlte es bei der Simulierung eines natürlichen Environments für kultivierte Zellen an den ausreichenden Ideen? – Wahrscheinlich standen die relativ unhandlichen und kompliziert anmutenden Gerätschaften einer weiten Verbreitung im Wege [18]. Aus diesem Grunde heraus, versuchten wir ein zeitgemäßes System zur Erzeugung eines organotypischen Mikroenvironment für kultivierte Zellen zu entwickeln, das möglichst einfach und überschaubar zu bedienen ist (Abb. 4) und vor allem auf der traditionellen Kulturtechnik aufbaut (Abb. 2). Unser Arbeitsziel war die Qualitätsverbesserung von kultivierten Zellen und Geweben. Deshalb kümmerten wir uns auch ausschließlich um Kulturexperimente, die den bisher angewandten Techniken ungenügende Ergebnisse erbrachten.

Heterogen zusammengesetztes Epithel in Perfusionskultur

Experimentelle Untersuchungen zeigten, daß das embryonale Sammelrohrepiteil unter Perfusionskulturbedingungen zu einem heterogen zusammengesetzten Epithel reifte, wie es auch in der erwachsenen Niere vorgefunden wird [14,15]. Unter diesen Versuchsbedingungen stehen die epithelialen Zellen unter einer Kontakthinderung, werden deshalb nicht subkultiviert und können über Monate wie unter den natürlichen Bedingungen in der Niere gehalten werden. Mit der konventionellen Kulturtechnik gelangen solche Experimente nicht.

Embryonales Endothel des mikrovaskulären Systems der Niere

Mit immunhistochemischen Methoden und einem Antikörper gegen das Antigen EnPo I im mikrovaskulären System der Niere konnte z.B. gezeigt werden, daß embryonale Endothelzellen unter Perfusionskulturbedingungen das gleiche Netzwerk an Gefäßstrukturen ausbilden, wie dies auch in der sich entwickelnden Niere vorgefunden wird. Zum ersten Mal ist damit das embryonale Gefäßsystem für experi-

mentelle Untersuchungen unter Kulturbedingungen über Wochen zugänglich geworden [16]. Solche Kulturen können nun genutzt werden, um den Einfluß von Wachstumsfaktoren oder den Effekt toxischer und chronischer Einflüsse auf embryonale Zellen ohne eine Subkultivation zu untersuchen. Mit der konventionellen Kulturtechnik konnten diese Experimente nicht durchgeführt werden.

Bioengineering von Knorpelgewebe für die chirurgische Implantation

Humane Chondrocyten konnten in bioabbaubaren Vliesen kultiviert werden. Nach kurzer Zeit hüllten sich die Chondrocyten wie unter natürlichen Bedingungen mit extrazellulärer Matrix ein und synthetisierten z.B. die gleichen Kollagenfibrillen, wie sie auch im Knorpelgewebe eines Organismus gefunden werden [17]. Kein Umschalten der natürlichen Kollagensynthese Typ II wurde beobachtet. Die Chondrocyten in Perfusionskultur zeigten z.B. die gleichen morphologischen und zellbiologischen Eigenschaften, wie sie auch im nativen Knorpelgewebe gefunden wurden. Dieses bioengineerte Knorpelgewebe soll in Zukunft als chirurgisches Implantationmaterial verwendet werden. In Experimenten unter konventionellen Kulturbedingungen konnte die Differenzierung des Knorpelgewebes nicht erreicht werden.

Fazit

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Kulturexperimente unter Perfusionskulturbedingungen möglich wurden, die mit konventioneller Technik nicht gelangen. Unsere prinzipielle Erfahrung lautet: Die Qualität von kultivierten Zellen kann stark verbessert werden, wenn eine optimale Unterlage für die Zellen verwendet wird, wenn das Subkultivieren unterlassen wird und wenn die Kulturen permanent mit neuem Medium durchströmt werden. Qualitätssteigerung bei kultivierten Zellen und Geweben wird erreicht, indem die natürliche Umgebung der Zellen simuliert wird. Dies hilft das Problem der Dediifferenzierung von kultivierten Zellen zu lösen und wird dadurch in Zukunft den Bau von artifiziellen Geweben und Organen erleichtern.

Die Untersuchung wurde unterstützt von der Deutsche Forschungsgemeinschaft (Mi 331/2-5). Besonderer Dank gilt der technischen Mitarbeit von Frau Marion Kubitzka. 1992 wurde das Projekt mit dem Philip Morris Forschungspreis Herausforderung Zukunft ausgezeichnet.

Alle Teile des neuen Kultursystems sind zu beziehen über MINUCELLS and MINUTISSUE Vertriebs GmbH, Starenstr. 2, D-93077 Bad Abbach.

Literatur

- [1] GEBELEIN, C. G.: Biotechnological Polymers – medical, pharmaceutical and industrial applications. Technomic Publishing Company, Basel (1993)
- [2] SUZUKI, M.; K. TAKAHASHI, M. IKEDA, H. HAYAKAWA, A. OGAWA, Y. KAWAGICHI, O. SAKAI: Cloning of a pH-sensitive K⁺ channel possessing two transmembrane segments. *Nature* 367: 642–645 (1994)
- [3] DOYLE, A. et al.: Cell & Tissue Culture. Laboratory Procedures. John Wiley & Sons, Chichester (1993)
- [4] SINGHVI, R.; A. KUMAR, G. P. LOPEZ, G. N. STEPHANOPOULOS, D. I. C. WANG, G. M. WHITESIDES, D. E. INGBER: Engineering Cell Shape and Function. *Science* 264: 696–698 (1994)
- [5] JAUREGUI, H. O.; S. NAIK, H. SANTANGINI, J. PAN, D. TRENKLER, C. MULLON: Primary Cultures of Rat Hepatocytes in Hollow Fiber Chambers. *Vitro Cell. Dev. Biol.* 30A: 23–29 (1993)
- [6] KOEHLIN, N.; M. PISAM, P. POUJEOL, M. TAUC, A. RAMBOURG: Conversion of a rabbit proximal convoluted tubule (PCT) into a cell monolayer: ultrastructural study of cell dedifferentiation and redifferentiation. *Eur. J. Cell. Biol.* 54: 224–236 (1991)
- [7] ZUK, A.; K. S. MATLIN, E. D. HAY: Type I collagen gel induces Madin-Darby canine kidney cells to become fusiform in shape and lose apical-basal polarity. *J. Cell Biol.* 108, 903–919 (1989)
- [8] TAUB, M.; Y. WANG, T. M. SZCZESNY, H. K. KLEINMANN: Epidermal growth factor or transforming growth factor is required for kidney tubulogenesis in matrigel cultures in serum-free medium. *Natl. Acad. Sci.* 87: 4002–4006 (1990)
- [9] BUTOR, C.; J. DAVOUST: Apical to Basolateral Surface Area Ratio and Polarity of MDCK Cells Grown on Different Supports. *J. Exp. Cell. Res.* 203: 115–127 (1992)
- [10] ANDERSON, R. J.; H. T. SPONSEL, R. BRECKON, T. MARCELL, J. P. HOEFFLER: Transforming growth factor-1 regulation of signal transduction in two renal epithelial cell lines. *Am. J. Physiol.* 265: F584–F591 (1993)
- [11] MINUTH, W. W. US-patent No. 5, 190, 878 – Apparatus for cultivating cells (1993)
- [12] MINUTH, W. W. Patent Nr. DE 3923279 – Vorrichtung für die Kultivierung von Zellen (1991)
- [13] MINUTH, W. W.; V. MAJER, S. KLOTH, R. DERMETZEL: Letter to the Editor/Growth of MDCK cells on non-transparent supports. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30A: 12–14 (1994)

-
- [14] MINUTH, W. W.; R. DERMETZIEL, S. KLOTH, B. HENNERKES: A new method culturing renal cells under permanent superfusion and producing a luminal-basal medium gradient. *Kidney Int.* 41: 215–219 (1992)
- [15] MINUTH, W. W.; W. FIETZEK, S. KLOTH, J. AIGNER, P. HERTER, W. RÖCKL, M. KUBITZA, G. STÖCKEL, R. DERMETZEL: Aldosterone modulates PNA binding cell isoforms within renal collecting duct epithelium. *Kidney Int.* 44: 537–544 (1993)
- [16] KLOTH, S.; A. SCHMIDBAUER, M. KUBITZA, H. A. WEICH, W. W. MINUTH: Developing renal microvasculature can be maintained under perfusion culture conditions. *Eur. J. Cell. Biol.* 63: 84–95 (1994)
- [17] SITTINGER, M.; J. BUJIA, W. W. MINUTH, C. HAMMER, G. R. BURMESTER: Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials*: 15,6: 451–456 (1994)
- [18] ROSE, G. G.: *Atlas of Vertebrate Cells in Tissue Culture*. Academic Press, New York-London, pp. 121–318 (1970)