

MINUSHEET – Mehr Effizienz bei Zellkulturen

W. W. Minuth

1 Die weite Anwendung der konventionellen Zellkultur

Biomedizinische Forschung ohne ein Zellkulturlabor ist fast nicht mehr denkbar. Zwei ganz unterschiedliche Fragestellungen werden mit den kultivierten Zellen bearbeitet (1–4). Einerseits möchte man mit kontinuierlichen Zelllinien möglichst viele Zellen gewinnen, um eine möglichst große Menge an Zellsubstanz, sezernierten Antikörpern, an synthetisierten Medikamenten oder sonstigen in das Kulturmedium abgegebenen Bioprodukten zu ernten. Andererseits kommt es bei vielen Kulturexperimenten gar nicht so sehr auf die Menge der kultivierten Zellen an, vielmehr möchte man für toxikologische oder funktionelle Fragestellungen eine besonders gute Qualität von relativ wenigen Zellen erhalten. Für diese Experimente werden neben den kontinuierlichen Zelllinien häufig die sogenannten Primärkulturen herangezogen. Bei dieser Methode werden einzelne Zellen aus ihrem komplexen Organverband herausgelöst und in Kultur gebracht, um unter *in vitro* Bedingungen an einem klar definierten Zelltyp und ohne die Interaktionen eines Organs eine spezifische Funktion zu untersuchen. Während im ersten Fall die Kultur von großen Zellmengen mit den kontinuierlichen Zelllinien nach Auffassung der Biotechnologen keinerlei Probleme mehr bereitet, liegen die organspezifischen Kulturen in der Mehrzahl der Fälle mit ihrer Qualität und Verfügbarkeit weit hinter dem, was eigentlich von ihnen erwartet werden könnte.

1.1 Die Zellkultur genügt häufig nicht den Qualitätsansprüchen

Wo sind die Gründe für eine mangelnde Qualität an kultivierten Zellen zu suchen? Eine Primärkultur wird im typischen Fall angelegt, indem einzelne Zellen aus dem Gewebeverband enzymatisch herausgelöst werden und nach mehreren Waschschritten in petrischalenähnliche Kulturgefäße aus durchsichtigem Polystyrol überführt werden (3). Die isolierten Zellen haften auf dem angebotenen Kulturschalenboden mehr oder weniger gut an und beginnen sich zu teilen. Je nach Herkunft der Zellen und je nach Zusammensetzung des Kulturmediums kann unter optimalen Bedingungen ein konfluenter Monolayerzellrasen erwartet werden, der dann für die geplanten *in vitro* Experimente Verwendung findet. Häufig jedoch folgt die Enttäuschung. Obwohl die Kulturen gut proliferieren und kontaminationsfrei aufgezogen wurden, reagieren die kultivierten Zellen nicht in der gleichen Weise, wie dies vom Organ her

bekannt ist, aus dem die Zellen ursprünglich herkommen (1, 2). Die Zellen haben vielfach ihr typisches Aussehen verändert, die Reaktion auf Hormone oder Pharmaka ist anders als im Organ, Enzymsysteme sind herunterreguliert oder gar nicht mehr exprimiert und spezielle Oberflächenantigene gingen verloren. Diese Veränderungen an kultivierten Zellen können schon innerhalb von wenigen Stunden nach ihrer Isolierung auftreten. Der Verlust von solchen spezifischen Eigenschaften an kultivierten Zellen wird als Dedifferenzierung oder Entdifferenzierung bezeichnet (7, 8).

1.2 Das Phänomen der Dedifferenzierung:

Die Ursachen für eine solche zelluläre Dedifferenzierung sind vielfältig. Man sollte davon ausgehen, daß Organzellen in gewisser Weise «soziale Wesen» sind. Werden die von den Nachbarschaftsbeziehungen behüteten Organzellen aus ihrer natürlichen Umgebung herausgerissen, dann verlieren sie ihre dreidimensionale Orientierung. Die Zell-Zell-Kontakte wie auch die Verankerung auf der Basalmembran oder der perizellulären Matrix gehen verloren. Speziell polarisierte Zellen benötigen eine individuelle Atmosphäre. Epithelzellen aus der Niere z. B. sind unter natürlichen Bedingungen von oben dem urinhaltigen und unten einem serumhaltigen, also zwei ganz unterschiedlichen Milieubedingungen ausgesetzt. Werden diese polarisierten Zellen in Kulturgefäße überführt, so erhalten sie von nun an von allen Seiten das gleiche Kulturmedium, d. h. sie sind einem permanenten «biologischen Kurzschluß» ausgesetzt. In Kultur gebracht, beginnen die Zellen sich dann permanent zu teilen, was sie innerhalb eines Organs nur sehr selten taten. Sie unterliegen jetzt nicht mehr der sogenannten Kontaktinhibition, wie sie innerhalb eines gesunden Organs oder Gewebeverbandes gegeben ist. Eine Zelle aber, die sich teilt, kann gleichzeitig nicht in differenzierter Form vorliegen. – Kurz und gut:

2 Die Notwendigkeit – ein neues Konzept

Die unzureichende Differenzierungsqualität unserer eigenen kultivierten Nierenzellen veranlaßte uns, eine grundlegend neue Zellkultur-Methode zu erarbeiten (9–12). Mit dieser Methode sollten Milieubedingungen erzeugt werden, wie sie auch innerhalb der Niere oder auch in anderen Organen vorgefunden werden.

2.1 Mehr Effizienz – Perfusionskultur

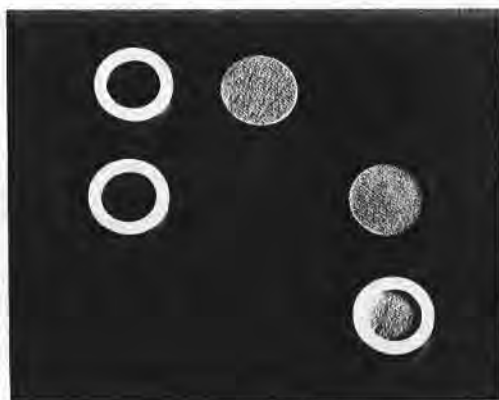
Unsere Arbeitsgruppe ist an der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes in der Niere interessiert. Für unsere Untersuchungen sollten deshalb Zellen aus dem Sammelrohr der Säugerniere kultiviert werden, die in möglichst vielen Punkten den Sammelrohrzellen in der Niere entsprachen (6). Für diese Experimente gab es drei Vorgaben: Erstens sollten die Zellen auf einer individuell auswählbaren Unterlage

zu optimalen Differenzierungen gezüchtet werden können. Diese Zellunterlage sollte möglichst der natürlichen Basalmembran entsprechen. Zweitens sollten die Zellen unter permanenter Erneuerung des Kulturmediums gehalten werden, um anfallende und möglicherweise toxisch wirkende Stoffwechselprodukte kontinuierlich entfernen zu können. Außerdem sollten dadurch die parakrinen und autokrinen Sekretionsmechanismen besser kontrollierbar werden. Drittens sollten die Sammelrohrzellen von oben und unten mit ganz unterschiedlichen Medien durchströmt werden, um möglichst naturalistische Bedingungen zu erzeugen.

In einem ersten Entwicklungsschritt wurden die sogenannten «MINUSHEETS» konstruiert (Abb. 1) (10, 11). Es handelt sich hierbei um zwei dünne Ringe mit einer konzentrischen Halterung zur Aufnahme der jeweiligen Zellunterlage. Im Vergleich zu bisherigen Membranfiltereinsätzen besteht der wesentliche Vorteil der von uns konstruierten Halterung darin, daß für jede Zellart eine Vielzahl von ganz unterschiedlichen Trägermaterialien für die optimale Differenzierung der Zellen vor dem Experiment selbst eingesetzt werden kann. Jedes bioverträgliche, membranartige Material mit einem Durchmesser von 13 mm oder 47 mm eignet sich für diese Versuche. Ein weiterer besonderer Vorteil der Minusheets besteht darin, daß auch beliebig dünne biologische Häutchen als Zellunterlage in der Ringhalterung verwendet werden können. Sehr gute Erfahrungen wurden z. B. mit der Capsula fibrosa von Säugernieren gemacht (9). Es kann aber genau so gut die Chorion allantois Membran aus Hühnereiern verwendet werden.

In einem weiteren Entwicklungsschritt wurden für die Minusheets verschiedene Zellkulturbehälter konstruiert, die während der Kultur eine permanente Erneuerung des Kulturmediums erlauben. Diese Zellkulturbehälter können außerhalb des Sterilabors in jedem beliebigen Raum betrieben werden (11). Benötigt werden nur pH-stabilisiertes Kulturmedium, eine Peristaltikpumpe für die Säulenchromatographie und ein Wärmetisch aus der Histologie. Diese Teile sind normalerweise in jedem zellbiologischen Labor zu finden. Das gesamte neue Kultursystem kann somit außerhalb eines CO₂-Inkubators betrieben werden. Ohne eine Sub-Kultivation las-

Abb. 1: Zusammenbau eines MINUSHEETS: Für die Montage werden 3 Teile benötigt, der schwarze Halterungsring, die Zellunterlage und der weiße Ring. Die Zellunterlage wird mit einer Pinzette in den schwarzen Halterungsring eingelegt, dann wird der weiße Spannungring eingedrückt – fertig.



sen sich Zellen und Gewebe über Wochen und Monate unter organtypischen Bedingungen kultivieren.

2.2 Die Verbindung zwischen neuer und konventioneller Zellkulturtechnik

Die neu entwickelte Zellkulturtechnik sollte ohne Kompatibilitätsprobleme auf der traditionellen Zellkulturtechnik aufbauen. Deshalb sind die kompatiblen MINUSHEET-Zellhalterungen sowohl in klassischen Zellkulturgefäßen z. B. den 24-well Kulturplatten (Abb. 2) wie auch in den neuen Perfusionskulturbehältern (Abb. 3, 4) verwendbar. Sie bilden somit eine Brücke zwischen der konventionellen und neuen Zellkulturmethode.

Verwendung der MINUSHEETS in klassischen Kulturgefäßen: Für die MINUSHEET-Zellhalterung werden drei Teile benötigt: der schwarze und weiße Haltering, sowie die Zellunterlage. Je nach Bedarf wird für ein Experiment eine Zellunterlage ausgewählt, auf der die Zellen sich gut anhaften können und optimal differenzieren. Die ausgewählte Membran, z. B. aus Polycarbonat und mit einem Durchmesser von 13 mm wird mit einer Pinzette in den schwarzen Halterungsring eingelegt (Abb. 1). Danach wird der weiße Ring mit der Pinzette in die schwarze Halterung eingepreßt. Die Montage ist damit beendet und das MINUSHEET kann entsprechend der eingelegten Membran autoklaviert bzw. in 70% Ethanol sterilisiert werden. Danach wird



Abb. 2: Nach der Sterilisation können die MINUSHEETS in eine 24-well Kulturplatte eingelegt werden. Sie dienen hier als ein verbesserter Kulturschalenboden mit beliebigen Zellunterlagen zum optimalen Anhaften und Differenzieren der Zellen. Medium und Zellen werden auf die MINUSHEETS aufpipetiert. Nach Anheften der Zellen können die MINUSHEETS in Perfusionskulturbehältern weiterverwendet werden.

das MINUSHEET mit einer Pinzette in jedes beliebige Zellkulturgefäß, z. B. in eine 24-well Gewebekulturplatte eingelegt (Abb. 2). In der Gewebekulturplatte dient das MINUSHEET als verbesserter Kulturschalenboden zum optimalen Anheften der Zellen. Auf die Zellunterlage werden dann das Kulturmedium und die Zellen aufpipetiert. Die Zellen lassen sich nach kurzer Zeit auf dem MINUSHEET nieder. Bis zum völligen Anhaften können die Zellen auf ihrer spezifischen Unterlage in einem CO₂-Inkubationsschrank beliebig lange gehalten werden.

2.3 Der neue Arbeitstandard

Der Perfusionskulturbehälter: Die auf den MINUSHEETS kultivierten Zellen eignen sich besonders gut für Perfusionskulturexperimente (Abb. 3). Da die MINUSHEETS keine hohe laterale Wandung besitzen, sondern flache Scheibchen darstellen, sind sie wie Münzen leicht stapelbar. Mit einer feinen Pinzette können die mit Zellen bewachsenen MINUSHEETS sehr einfach aus der Kulturschale (Abb. 2) entnommen und in einen Perfusionsbehälter eingesetzt werden (Abb. 3). Nach Schließen des Deckels wird das Kulturmedium auf der Bodenseite des Gefäßes mit 1 ml/h eingepumpt und an der Oberseite wieder abgeführt. Damit werden die Zellen unter einem permanenten Flüssigkeitsstrom mit immer neuem Kulturmedium ausgesetzt. Durch die Zuführung mit immer frischem Kulturmedium werden besonders gut standardisierbare Kulturbedingungen erreicht.

Die Gradientenperfusionskammer: Die Kultivierung von Epithelzellen unter nahezu natürlichen Bedingungen ermöglicht die Gradientenperfusionskammer (Abb. 4), bei der die Zellen von oben und unten mit ganz unterschiedlichen Kulturmedien durchströmt werden können. Zur benutzerfreundlichen Bedienung müssen während dem Öffnen und Schliessen der Kammer keine Schläuche gekoppelt werden. Ein einfach zu öffnender Federverschluß dichtet die Kammer ab. Nach dem Öffnen der Kammer werden die mit Zellen bewachsenen MINUSHEETS mit einer Pinzette in die Kammervertiefung eingesetzt. Durch Absenken des Deckels wird das MINUSHEET automatisch zentriert und die Kammer dicht verschlossen. Da das mit Zellen bewachsene MINUSHEET die Kammer jetzt in ein oberes und unteres Kompartiment teilt, können die

Abb. 3: Permanente Durchströmung der Kulturen mit immer neuem Medium ermöglicht der Perfusionskulturbehälter. Mit einer Pinzette werden die MINUSHEETS eingesetzt. Nach Schließen des Deckels können die Kulturen mit Medium durchströmt werden. Die Schläuche zeigen den Verlauf des Kulturmediums.



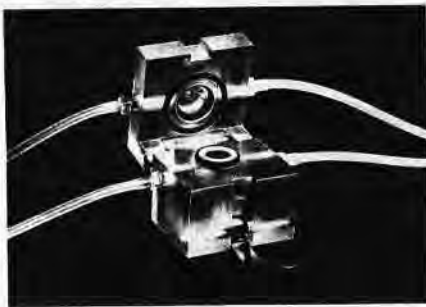


Abb. 4: Die Gradientenperfusionskulturkammer mit einem eingelegten MINUSHEET ermöglicht die Simulation einer natürlichen Organumgebung, weil Epithelkulturen von oben und unten mit ganz unterschiedlichen Medien durchströmt werden können.

Zellen von oben und unten separat mit ganz unterschiedlichen Kulturmedien durchströmt werden. Damit können z. B. hypotone oder hypertone Kulturmediumgradienten angelegt werden, wie sie in der Niere und in vielen anderen Organen vorkommen. Es können aber auch von der einen Seite eine urinähnliche und von der anderen Seite eine blutähnliche Nährflüssigkeit appliziert werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß jetzt entweder von basal oder luminal Hormone, Wachstumsfaktoren oder Pharmaka kontinuierlich und vor allem unter ganz realitätsnahen Bedingungen appliziert werden können. Alle die aufgeführten Experimente waren mit der bisherigen Zellkulturtechnik in dieser besonders weiten Anwendung nicht möglich.

3 Die neue Qualität an renaler Zellkultur

Die Perfusionskultur von embryonalen Sammelrohrzellen der Säugerniere ergab für unsere Arbeitsgruppe eine bisher nicht gekannte Qualität an Differenzierungsleistung (10–12).

3.1 Vorkultur der renalen Zellen

Dünne Capsula fibrosa Häutchen der Niere von neugeborenen Zew Zealand Kaninchen (6) wurden in eine spezielle MINUSHEET-Halterung eingespannt (10). Die häutchenartigen Präparate bestanden aus der Capsula fibrosa, nephrogenem Blastem, S-shaped bodies und den Sammelrohrampullen. Werden solche Zellpräparate in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM/25 mM HEPES) mit 10% fetalem Kälberserum in 24-well Kulturplatten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) kultiviert, dann wachsen die Zellen der Sammelrohranlagen aus. Die Sammelrohrzellen überwachsen das gesamte Explant und bilden innerhalb von 24 Stunden ein polar differenziertes Epithel von vielen mm^2 . Die Vorkultur dieser Epithelien wurde in einem Heraeus Gewebekulturschrank (Hanau, FRG) bei 37°C und in feuchtigkeitsgesättigter Luftatmosphäre (5% CO_2 /95% Luft) durchgeführt.

3.2 Perfusionskultur

24 Stunden nach Beginn der Vorkultur wurden sechs Sammelrohrethelien auf der MINUSHEET-Zellhalterung mit einer feinen Pinzette in den Perfusionskulturbehälter überführt (Abb. 3) und ähnlich wie Münzen in einer Geldrolle gestapelt. Durch einen unteren Einstromkanal und einen oberen Auslaß kann für beliebig lange Zeit jetzt immer frisches Kulturmedium durch den Perfusionskulturbehälter durchströmt werden. In unserem Fall wurden die Sammelrohrethelien mit IMDM/25 mM HEPES und 1% antibiotisch-antimykotischer Lösung (Gibco Life Technology, Eggenstein, FRG) für 13 Tage mit immer neuem Medium perfundiert. Dabei wurden die Zellen nicht subkultiviert. Das Medium wurde in Schott Glasflaschen (500 ml), die mit speziellen Schraubkappen versehen waren, aufbewahrt. Medienflaschen, Kulturbehälter und Auffangflasche wurde über Silikonschläuche mit einem Innendurchmesser von 1 mm über Standard-Luerverschlüsse verbunden. Die Durchströmungsrate des Kulturmediums betrug während der gesamten Versuchsdauer 1 ml/h.

3.3 Perfusionskulturmedien

IMDM/25 mM HEPES mit 1% antibiotisch-antimykotischer Lösung diente als Kontrollmedium. Aldosterone (1×10^{-7} M), Vasopressin (1×10^{-6} M), und Insulin (1×10^{-6} M) wurden den Medien in den einzelnen Versuchen beigelegt.

Sämtliche Kulturmedien wurden von Gibco-BRL Life Technologies (Eggenstein, FRG), Aldosteron (Aldocorten) von Ciba Gegby Wehr (Baden, FRG), Vasopressin (AVP) und Insulin von Sigma (Deisenhofen, FRG) bezogen.

3.4 Ergebnisse

Mit unseren bisherigen Experimenten konnten wir zeigen, daß in der Perfusionskultur neben hellen Principal-Cells in unterschiedlichem Ausmaß auch dunkle Intercalated Cells zu erzeugen sind (10–12), wie dies von der Niere her bekannt ist (5). Histochemische Analysen mit fluoreszierenden Peanut-Agglutinin ergaben, daß die dunklen Zellen dem β -Typ der Intercalated Cells zugeordnet werden können (13). Die Anzahl der dunklen Zellen vom β -Typ konnte mit hormonellen Zusätzen beeinflusst werden: Während in Kontrollen ohne Hormonzusatz nur etwa 8% dunkle Zellen gefunden wurden, konnte in Aldosteron behandelten Epithelien 72% und in Aldosteron/Insulin behandelten sogar 90% dunkle Zellen festgestellt werden. Dagegen wurden in Aldosteron/Vasopressin behandelten Epithelien nur 44% dunkle Zellen gefunden. Vasopressin oder Insulin allein vermochte nur 15% dunkle Zellen zu bilden. Die Versuche belegen, daß überraschenderweise das Steroidhormon Aldosteron die Bildung von dunklen Zellen zu steuern vermag (12). Derartige Ergebnisse waren mit der bisherigen Zellkulturmethode nicht zu erzielen.

4 Allgemeine Perspektiven mit der neuen Technik

Mit der vorgestellten Methode lassen sich ganz neue Versuche in Zukunft durchführen. Epithelien der Säugerniere können jetzt von luminal und basal in ganz unterschiedlichen Flüssigkeiten kultiviert werden. Damit lassen sich z. B. mit der neuen Technik erstmals die hohen (1200 m Osm) und niedrige (150 m Osm) Flüssigkeitsgradienten simulieren, wie sie im corticopapillären Verlauf der Niere an den Epithelien vorgefunden werden.

Ein weiteres Forschungsfeld sind Leberzellen, die mit der Perfusionsmethode ohne Subkultivation über einen Zeitraum von mehreren Monaten kultiviert werden können. Die Methode ermöglicht außerdem, daß sich in Kultur ein Blut- und Gallenkompartiment experimentell aufbauen läßt. Dadurch lassen sich z. B. von einer Seite der Zellen Pharmaka zuleiten und auf der anderen Seite könnte dann das metabolisierte Produkt kontinuierlich untersucht werden.

Endothelzellen als Innenauskleidung von Blutgefäßen können jetzt unter nahezu natürlichen Bedingungen kultiviert werden, da sämtliche rheologische Streßfaktoren wie Fließgeschwindigkeit und Druck auf eine sehr einfache Art simuliert werden können.

Mit der neuen Technik ließe sich ganz ideal ein Blut/Hirnschrankenmodell aufbauen. Dazu könnten Endothelzellen auf der einen Seite, Astrozyten auf der anderen Seite der MINUSHEETS kultiviert werden. Unter optimalen Bedingungen ließen sich in der Gradientenkammer dann Permetationsversuche mit den verschiedensten Substanzen durchführen, um festzustellen, ob diese Substanzen die artifizielle Blut-Hirnschranke überwinden können.

Facit

Die neue Perfusionskulturmethode liefert mehr Effizienz in der Zellkulturtechnik als bisher verfügbar. Adherente Zellen können in hoher Differenzierungsqualität, unter eindeutig standardisierbaren Bedingungen, sowie unter organspezifischen Milieuverhältnissen gehalten werden. Bis zu 50% des Kulturmediums können mit der neuen Technik eingespart werden. Alle Teile des Zellkultursystems sind keine Einwegartikel, sondern beliebig oft wiederverwertbar. Die MINUSHEET-Technik kann in Zukunft dazu beitragen, organspezifische Zellkulturen entscheidend zu verbessern und damit die kultivierten Zellen auch vergleichbarer mit den dazugehörigen Organstrukturen werden zu lassen.

Anmerkung

Alle Teile der MINUSHEET-Technik sind jetzt in Serie aufgelegt und zu beziehen über **Minucells und Minutissue GmbH**, Starenstr. 2, D-8403 Bad Abbach, FRG.

Die Untersuchung wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Mi 331/2-5). Besonderer Dank gilt meiner technischen Mitarbeiterin Frau Marion Kubitzka. Die neue Zellkulturmethode wurde 1992 mit dem **Philipp Morris Forschungspreis Herausforderung Zukunft** ausgezeichnet.

Literatur

1. Gstraunthaler, G.J.A., Epithelia cells in tissue culture, *Renal. Physiol. Biochem.* II: 1-42 (1988).
2. Horster, M., Tissue culture in nephrology: potential and limits for the study of renal disease, *Klin. Wochenschr.* 58: 965-973 (1980).
3. Jakoby, W.B., Pastan, I.H., Cell culture, *Methods Enzymology* 58, Academic press (1979).
4. Kreisberg, J.I., Wilson, P.D., Renal cells in culture, *J Electron Mic Tech* 9: 235-263 (1988).
5. Kriz, W., Kaissling B., Structural organization of the mammalian kidney, in Seldin, D.W., Giebisch, G. (Hrsg), *The kidney: physiology and pathophysiology*, Raven Press, New York: 265-306 (1985)
6. Minutz, W.W., Neonatal rabbit kidney cortex in culture as tool for the study of collecting duct formation and nephron differentiation, *Differentiation* 36: 12-22 (1987).
7. Minutz, W.W., Gilbert, P., The expression of specific proteins in cultured renal collecting duct cells, *Histochem* 88: 435-441 (1988).
8. Minuth, W.W., Gilbert P., Gross, P., Appearance of specific proteins in the apical plasma membrane of cultured renal collecting duct epithelium after chronic administration of aldosterone and vasopressin, *Differentiation* 38: 194-202 (1988).
9. Minuth, W.W., Rudolph U., A compatible support system for cell culture in biomedical research, *Cytotechnology* 4: 181-189 (1990).
10. Minuth, W.W., Dermietzel R., Kloth S., Hennerkes B., A new method culturing renal cells under permanent superfusion and producing a luminal-basal medium gradient, *Kidney Int.* 41: 215-219 (1992).
11. Minuth, W.W., Stöckl G., Kloth S., Dermietzel R., Construction of an apparatus for perfusion cell cultures which enables in vitro experiments under organotypic conditions, *Eur. J. Cell. Biol.* 57: 132-137 (1992).
12. Minuth, W.W., Fietzek W., Kloth S., Aigner J., Herter, P., Röckl, W., Kubitzka, M., Stöckl G., Dermietzel R., Aldosterone modulates PNA binding cell isoforms within renal collecting duct epithelium. *Kidney Int.* 44: 537-544 (1993).
13. Schwartz, G.J., Satlin, L.M., Bergman, J.E., Fluorescent characterization of collecting duct cells: a second H⁺-secreting type, *Am. J. Physiol.* 255: F1003-F1014 (1988).