

Ein biomedizinisches Forschungsinstitut ohne Zellkulturlabor besitzt beinahe Seltenheitswert. Meistens werden mit den kultivierten Zellen zwei ganz unterschiedliche Fragestellungen bearbeitet [1–4]. Im einen Fall möchte man mit *kontinuierlichen Zelllinien möglichst viele Zellen vermehren*, um eine möglichst große Menge Zellsubstanz, sezernierter Antikörper, extrazellulärer Matrixproteine oder sonstiger in das Kulturmedium abgegebene Stoffwechselprodukte zu ernten. Im anderen Fall kommt es bei vielen Kulturexperimenten gar nicht so sehr auf die Anzahl der kultivierten Zellen an, vielmehr möchte man relativ *wenige Zellen von besonders guter Qualität* erhalten.

Für diese Fragestellung werden häufig sog. *Primärkulturen* herangezogen. Bei dieser Methode werden einzelne Zellen aus ihrem Organverband herausgelöst und in Kultur gebracht, um unter *In-vitro*-Bedingungen an einem klar definierten Zelltyp eines Organs eine spezifische Leistung und Reaktion zu untersuchen. Während im ersten Fall die Kultur großer Zellmengen mit den kontinuierlichen Zelllinien keinerlei Probleme mehr bereitet, bleiben die *organspezifischen Kulturen* in ihrer Qualität und Verfügbarkeit in der Mehrzahl der Fälle hinter den Erwartungen zurück.

Schwierigkeiten bei konventionellen Primärkulturen

Welche Gründe gibt es für die mangelnde Qualität der kultivierten Zellen? Eine Primärkultur wird im typischen Fall angelegt, indem einzelne Zellen *aus dem Gewebeverband enzymatisch herausgelöst* und nach mehreren Waschschritten in 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 nach Qualität der Kulturbedingungen kann ein *konfluenter Monolayer-Zellrasen* erwartet werden, der dann für die geplanten *In-vitro*-Experimente verwendet wird. Häufig jedoch erfolgt eine Enttäuschung. Obwohl die Kulturen gut proliferieren und kontaminationsfrei aufgezogen wurden, reagieren die kultivierten Zellen nicht in der gleichen Weise, wie sie vom Organ bekannt ist, aus dem die Zellen ursprünglich stammen [1, 2]. Die Zellen haben ihr *Aussehen* verändert, die *Reaktion auf Hormone und Pharmaka* ist anders, *Enzymsy-*

Perfusionszellkultur*

Eine neue Methode für organspezifische pathologische und toxikologische Untersuchungen

W. W. Minuth

Ein Problem der konventionellen Zellkultur stellt die Neigung zur *Dedifferenzierung* der sich teilenden Zellen dar. Bedingt durch eine ungenügende Anheftung der Zellen am Boden der Kulturgefäße und eine diskontinuierliche Ernährung war es bislang nicht möglich, Zellen *naturalistischen Bedingungen* auszusetzen. Bei der hier vorgestellten Zellkulturtechnik werden die Zellen auf einer Trägermembran (synthetisch oder natürlich) kultiviert, die in eine spezielle Halterung eingespannt ist. Neu entwickelte Kulturkammern ermöglichen die kontinuierliche Erneuerung des Kulturmediums. Darüber hinaus können die Zellen auf ihrer Ober- und Unterseite unterschiedlichen Medien ausgesetzt werden. Der Einfluß von zugesetzten Hormonen auf die Differenzierung der kultivierten Zellen kann unter organspezifischen Bedingungen untersucht werden.

steme werden nicht mehr exprimiert, und spezielle *Oberflächenantigene* gingen verloren. Diese Veränderungen können schon innerhalb weniger Stunden nach der Isolierung der Zellen auftreten. Der Verlust solcher spezifischen Eigenschaften von kultivierten Zellen wird als *Dedifferenzierung* oder *Entdifferenzierung* bezeichnet [7, 8].

Dedifferenzierung

Die Ursachen der zellulären *Dedifferenzierung* sind vielfältig. Man muß davon ausgehen, daß Organzellen „soziale Wesen“ sind. Werden diese durch Nachbarschaftsbeziehungen „behüteten“ Zellen aus ihrer natürlichen Umgebung herausgenommen, dann verlieren sie ihre Nachbarschaftskontakte sowie ihre natürlichen Anhaftungsstellen. Sowohl die *Zell-Zell-Kontakte* als auch die *Verankerung auf der Basalmembran oder perizellulären Matrix* gehen verloren. Epithelzellen sind unter natürlichen Bedingungen zudem von oben und unten ganz unterschiedlichen Milieubedingungen ausgesetzt. Werden diese *polarisierten Zellen* nun in Kulturgefäße überführt, so erhalten sie von allen Seiten das gleiche Kulturmedium, d. h., sie sind von nun an einem permanenten „biologischen Kurzschluß“ ausgesetzt. In Kultur beginnen die Zellen sich zu *teilen*, was sie innerhalb eines Organs nicht oder nur sehr selten tun. Sie unterliegen jetzt nicht mehr der sog. *Kontaktinhibi-*

tion, wie sie innerhalb eines intakten Organs oder Gewebeverbands gegeben ist. *Eine Zelle aber, die sich teilt, kann nicht gleichzeitig in differenzierter Form vorliegen.*

Perfusionszellkultur

Die unzureichende Qualität der kultivierten Nierenzellen in unserem Arbeitsbereich veranlaßte uns, eine grundlegend neue Zellkulturmethode zu erarbeiten [9–12]. Mit dieser Methode sollten Milieubedingungen erzeugt werden, wie sie auch innerhalb der Niere oder in anderen Organen vorgefunden werden. Dazu sollten die Zellen auf einer individuell auswählbaren Unterlage mit permanent erneuertem Kulturmedium bzw. mit unterschiedlichen Kulturmedien von oben und unten versorgt werden.

Anforderungen

Unsere Arbeitsgruppe ist speziell an der Regulation des Salz- und Wasserhaushalts in der Niere interessiert. Für unsere Untersuchungen sollten deshalb Zellen aus dem Sammelrohr der Säugerniere kultiviert werden, die in möglichst vielen Eigenschaften den Sammelrohrzellen in der Niere entsprechen [6].

* Referat anlässlich des 7. Deutschen MTA-Kongresses vom 10. bis 12. März 1993 in Mannheim.

Für dieses Experiment sollten die Zellen erstens zur optimalen Differenzierung auf einer individuell auswählbaren Unterlage, möglichst der Basalmembran, gezüchtet werden. Zweitens sollten die Zellen unter permanenter Erneuerung des Kulturmediums gehalten werden, um anfallende toxisch wirkende Stoffwechselprodukte kontinuierlich entfernen zu können. Drittens sollten die Sammelrohrzellen von oben und unten mit unterschiedlichen Medien umströmt werden.

Minusheet-Zellhalterung

In einem ersten Entwicklungsschritt wurden die sog. Minusheets (Minucells und Minutissue GmbH, Bad Abbach; Abb. 1) konstruiert [10, 11]. Es handelt sich hierbei um dünne Ringe mit einer konzentrischen Halterung zur Aufnahme der Zellunterlage. Der wesentliche Vorteil dieser Halterung besteht darin, daß für jede Zelle eine Vielzahl unterschiedlicher Trägermaterialien für die optimale Differenzierung der Zellen vor dem eigentlichen Experiment eingesetzt werden kann. Jedes bioverträgliche, membranartige Material mit einem Durchmesser von 13 mm bzw. 47/50 mm eignet sich für diese Versuche. Ein weiterer 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 Säugern gemacht [9]. Es kann aber genauso die *Chorion-allantois-Membran* aus Hühnereiern verwendet werden.

Abb. 1: Zusammenbau eines Minusheets: Für die Montage werden drei Teile benötigt: der schwarze Halterungsring, die Zellunterlage und der weiße Spannring. Die Zellunterlage wird mit einer Pinzette in den schwarzen Halterungsring eingelegt, dann wird der weiße Spannring eingedrückt.



Perfusionskulturbehälter

In einem zweiten Entwicklungsschritt wurden für die Minusheets verschiedene Zellkulturbehälter konstruiert, die eine permanente Erneuerung des Kulturmediums erlauben. Diese Zellkulturbehälter können außerhalb des Sterillabors in jedem beliebigen Raum betrieben werden [11]. Benötigt werden lediglich eine Peristaltikpumpe (wie sie für die Säulenchromatographie verwendet wird) und ein Wärmetisch zum Strecken von Paraffinschnitten. Diese Geräte sind meist in jedem zellbiologischen Labor vorhanden.

Verbindung zwischen neuer und alter Zellkulturtechnik

Die hier vorgestellte neu entwickelte Zellkulturtechnik sollte auf der traditionellen Technik aufbauen. Deshalb sind die kompatiblen Minusheet-Zellhalterungen sowohl in klassischen Zellkulturgefäßen (z. B. den 24-Well-Kulturplatten) wie auch in den neuen Perfusionskulturbehältern verwendbar. Sie bilden somit eine Brücke zwischen der konventionellen und der neuen Zellkulturmethode.

Minusheets in klassischen Kulturgefäßen

Für die neue Zellhalterung werden drei Teile benötigt – der schwarze und der weiße Ring sowie die Zellunterlage (Abb. 1). Je nach Bedarf wird für jedes Experiment eine Zellunterlage ausgewählt, auf der die Zellen sich gut anheften können und optimal differenzieren. Die ausgewählte Membran (z. B. aus Polycarbonat mit einem Durchmesser von 13 mm) wird mit einer Pinzette in den schwarzen Halterungsring eingelegt. Danach wird der weiße Spannring mit der Pinzette in die schwarze Halterung eingepreßt. Die Montage ist damit beendet und das Minusheet kann je nach Material der eingelegten Membran autoklaviert oder z. B. in 70 % Ethanol sterilisiert werden. Danach wird die Halterung 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 aufpipettiert. Die Zellen lassen sich nach kurzer Zeit auf dem Minusheet



Abb. 2: Nach der Sterilisation werden die Minusheets in eine 24-Well-Kulturplatte eingelegt. Sie dienen hier als ein verbesserter Kulturschalenboden mit beliebigen Zellunterlagen zum optimalen Differenzieren der Zellen. Medium und Zellen werden auf das Minusheet aufpipettiert. Nach Anheften der Zellen können die Minusheets in Perfusionsbehältern weiterverwendet werden.

nieder. Bis zum völligen Anhaften können die Zellen auf ihrer spezifischen Unterlage in jedem gewöhnlichen CO₂-Inkubationsschrank beliebig lange gehalten werden.

Der Perfusionskulturbehälter

Die auf den Minusheets kultivierten Zellen eignen sich besonders gut für Perfusionskulturexperimente (Abb. 3). Da die Minusheets keine hohe seitliche Wandung besitzen, sondern flache Scheibchen darstellen, sind sie wie Münzen stapelbar. Mit einer feinen Pinzette können sie sehr leicht aus der Kulturschale entnommen und in einen Perfusionskulturbehälter eingesetzt werden. Nach Schließen des Deckels wird das Kulturmedium auf der Bodenseite des Gefäßes mit 1 ml/h eingepumpt und an der Oberseite wieder abgeführt. So werden die Zellen unter standardisierten Bedingungen einem permanenten Flüssigkeitsstrom aus frischem Kulturmedium ausgesetzt.

Die Gradientenperfusionskammer

Eine Kultur von Epithelzellen unter nahezu natürlichen Bedingungen ermöglicht die Gradientenperfusionskammer (Abb. 4), welche im oberen und unteren Abschnitt von unterschiedlichen Kulturmedien durchströmt wird. Zur benutzerfreundlichen Bedienung müssen während des Öffnens und Schließens der Kammer keine Schläuche ent- bzw. gekoppelt werden. Nach dem Öffnen der Kammer werden die mit Zellen bewachsenen Minusheets mit

einer Pinzette in die Kammervertiefung eingesetzt. Beim Schließen des Deckels wird die Zellhalterung automatisch zentriert und die Kammer dicht verschlossen. Da das mit Zellen bewachsene Minusheet die Kammer in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilt, können die Zellen jetzt von oben und unten separat mit unterschiedlichen Kulturmedien umströmt werden. Auf diese Weise können z. B. *hypotone oder hypertone Gradienten* angelegt werden, wie sie in der Niere und in vielen anderen Organen vorkommen. Es können aber auch von der einen Seite urinähnliche und von der anderen Seite blutähnliche Medien zugeführt werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß jetzt entweder von basal oder von luminal *Hormone, Wachstumsfaktoren oder Pharmaka* kontinuierlich und vor allem unter annähernd physiologischen Bedingungen appliziert werden können. Dies war mit der bisherigen Zellkulturtechnik in diesem Ausmaß nicht möglich.

Renale Zellkultur

Die Perfusionskultur von embryonalen Sammelrohrzellen der Säugerniere ergab eine bisher nicht gekannte Qualität der Differenzierung [10–12].

Vorkultur renaler Zellen

Dünne *Capsula-fibrosa-Häutchen* der Niere von neugeborenen New-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

Abb. 3: Permanente Durchströmung der Kulturen mit immer neuem Medium ermöglicht der Perfusionskulturbehälter. Mit einer Pinzette werden die Minusheets eingesetzt.



in 24-Well-Kulturplatten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) kultiviert, dann wachsen die Zellen der Sammelrohranlagen aus. Die Sammelrohrzellen überwachen das gesamte Explantat und bilden innerhalb von 24 Stunden *ein polar differenziertes Epithel* von vielen Quadratmillimetern. Die Vorkultur dieser Epithelien wurde in einem Gewebekulturschrank (Heraeus, Hanau) bei 37 °C und in feuchtigkeitsgesättigter Luftatmosphäre (5% CO₂/95% Luft) durchgeführt.

Perfusionskultur

24 Stunden nach Beginn der Vorkultur wurden sechs Minusheet-Zellhalterungen mit Sammelrohrepithelien mit einer feinen Pinzette in den Perfusionsbehälter überführt und – ähnlich wie Münzen in einer Geldrolle – gestapelt. Durch den unteren Einströmkanal und den oberen Ausströmkanal kann für beliebig lange Zeit frisches Kulturmedium durch den Perfusionsbehälter strömen. In unserem Fall wurden die Sammelrohrepithelien mit IMDM/25 mM HEPES und 1% *antibiotisch-antimykotischer Lösung* (Gibco Life Technology, Eggenstein, FRG) für 13 Tage perfundiert. Das Medium wurde in Glasflaschen (500 ml, Schott, Mainz), die mit speziellen Schraubkappen versehen waren, aufbewahrt. Medienflaschen, Kulturbehälter und Auffangflasche wurden über Standard-Luer-Verschlüsse verbunden. Die Durchströmungsrate des Kulturmediums betrug während der gesamten Versuchsdauer 1 ml/h.

Als Kontrollmedium diente IMDM/25 mM HEPES mit 1% antibiotisch-antimykotischer Lösung. In den einzelnen Versuchen wurden dem Medium *Aldosteron* (1×10^{-7} M), *Vasopressin* (1×10^{-6} M) oder *Insulin* (1×10^{-6} M) beigefügt. (Sämtliche Medien wurden von Gibco-BRL Life Technologies, Eggenstein, bezogen; Aldosteron [Aldocorten] von Ciba Geigy, Wehr/Baden, Vasopressin [AVP] und Insulin von Sigma, Deisenhofen.)

Einflüsse des Mediums auf die Zelldifferenzierung

Mit unseren bisherigen Experimenten konnten wir zeigen, daß in der Perfusionskultur neben hellen *Principal Cells* in unterschiedlichem Ausmaß auch dunkle *Intercalated Cells* entstehen [10–12], wie sie von der Niere bekannt sind [5]. Histochemische Analysen mit *fluoreszierendem Peanut-Agglutinin* ergaben, daß die dunklen Zellen dem β -Typ der

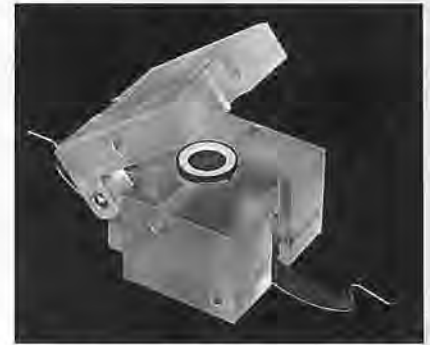


Abb. 4: Gradientenperfusionskammer mit einem eingelegten Minusheet. Sie ermöglicht die Simulation einer natürlichen Umgebung, da die Kulturen von oben und von unten mit ganz unterschiedlichen Medien durchströmt werden können.

Intercalated Cells zugeordnet werden können [13]. Die Bildung der dunklen Zellen vom β -Typ konnte mit Hormonzusätzen beeinflusst werden. Während in Kontrollen ohne Hormonzusatz nur etwa 8% dunkle Zellen gefunden wurden, konnten in mit Aldosteron behandelten Epithelien 72% und in mit Aldosteron + Insulin behandelten sogar 90% dunkle Zellen festgestellt werden. Dagegen wurden in Epithelien, die mit Aldosteron + Vasopressin behandelt wurden, nur 44% dunkle Zellen gefunden. Vasopressin oder Insulin alleine vermochten nur 15% dunkle Zellen zu induzieren. Die Versuche belegen, daß das Steroidhormon *Aldosteron die Bildung dunkler*

Ich habe
das Register der Krankheiten
angesehen und habe
Sorgen und
traurige Vorstellungen
nicht darunter gefunden,
das ist sehr unrecht.

Georg Christoph Lichtenberg

Zellen zu steuern vermag [12]. Derartige Ergebnisse waren mit der bisherigen Zellkulturmethode nicht zu erzielen.

Mögliche Anwendungsgebiete

Nierenepithelien

Mit der hier vorgestellten Methode lassen sich in Zukunft völlig neue Versuche durchführen. Epithelien der Säugerniere können jetzt von luminal und von basal in unterschiedlichen Medien kultiviert werden. Damit lassen sich z. B. erstmals die hohen (1200 mOsm) und niedrigen (150 mOsm) *Flüssigkeitsgradienten simulieren*, wie sie im kortikopillären Verlauf der Niere an den Epithelien vorgefunden werden.

Leberzellen

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

Endothel von Blutgefäßen

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

Modell der Blut-Hirn-Schranke

Mit der neuen Technik ließe sich ideal ein Modell der Blut-Hirn-Schranke 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 Permeationsversuche mit den verschiedensten Substanzen durchführen, um festzustellen, ob diese Substanzen die artifizielle Blut-Hirn-Schranke überwinden können.

Fazit

Die hier vorgestellte Technik könnte in Zukunft dazu beitragen, organspezifische Zellkulturen entscheidend zu verbessern und damit die kultivierten Zellen auch den dazugehörigen Organstrukturen vergleichbarer zu machen.

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. Minuth, 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. Minuth, 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., Herfer, P., Röckl, W., Kubitz, 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).

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

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. Will W. Minuth
Anatomisches Institut der Universität
Regensburg
Universitätsstraße 31
D-93053 Regensburg

Fakten & Thesen

- Organspezifische Zellkulturen dienen der Untersuchung spezifischer Leistungen und Reaktionen differenzierter Zellen unter In-vitro-Bedingungen.
- Ein Problem bei organspezifischen Primärkulturen stellt die Dedifferenzierung (Verlust der Polarität von Epithelzellen durch Lösen der Zell-Zell-Kontakte) sich teilender Zellen dar.
- Eine neu entwickelte Zellhalterung ermöglicht die Anzucht organspezifischer Zellen auf frei wählbaren Zellunterlagen.
- Mit der neuen Zellhalterung können die Zellen in einer Perfusionskulturkammer kontinuierlich mit frischem Kulturmedium versorgt werden.
- Die Gradientenperfusionskammer ermöglicht es, polarisierte Zellkultur-Monolayer auf ihrer Ober- bzw. Unterseite mit unterschiedlichen Medien zu umspülen.
- In der Perfusionszellkultur von Sammelrohrzellen der Säugerniere ergab sich eine gemischte Kultur aus Principal und Intercalated Cells.
- Weitere Untersuchungsmöglichkeiten sind der Aufbau eines Modells der Blut-Hirn-Schranke, die Untersuchung von Endothelzellen oder von Leberzellen unter körpernen Bedingungen.