

Abstract: Perfusion culture for simulation of an organotypical environment: Cells and tissues under conventional culture conditions frequently lose typical functional features. This dedifferentiation process starts during the isolation procedure and continues in the stagnant environment within a culture dish. Coating of the cell support with extracellular matrix proteins or the use of filters as basement membrane substitute improve the degree of differentiation, but do not consider the harmful accumulation of metabolic products, growth or paracrine factors and the specific nutritional needs of individual cells and tissues. For the generation of cultured cells and tissues in an organotypical quality a new system was developed. The base are flat cell holder sets – the MINUSHEETS. For optimal adherence and differentiation an individual support is selected and placed between a black holder ring and a white span ring. All kinds of flat filters, nets and membranes with a diameter of 13 or 47 mm fit into the holder sets. After autoclaving they are placed in a culture dish to adhere the cells on the support. Then the holder sets are transferred with a forceps to different kinds of culture containers, which are permanently perfu-

sed with fresh medium. This guarantees a constant nutrition and prevents the accumulation of harmful metabolic products. An atmosphere for epithelial cells adapted to the natural situation is obtained in a gradient container, which is permanently perfused at the apical and basal side with different media.

The system runs with a simple peristaltic pump and a warming plate with pH-stabilized media outside the atmosphere of a CO₂-incubator for weeks and months. Subculturing of cells is not necessary. Adaptation of the culture environment to the natural situation is further obtained by controlling the electrolyte parameters of the culture medium. As compared to human or animal serum specimens a 20-30% deviation in Na⁺, K⁺, Cl⁻ and Ca²⁺ content as comparable to commercially available culture medium was found. In consequence, by adding the missing electrolytes to the culture medium it can be balanced according to the serum values found within an organism. The long term culture experiments under improved culture conditions result in an up to date unknown quality of cultured cells which resemble as near as possible to the situation within an organ.

MINUSHEET-Perfusionskultur: Simulierung eines gewebetypischen Milieus

Will W. Minuth, Sabine Kloth, Joachim Aigner, Pat Steiner / Institut für Anatomie, Universität Regensburg

Zellen und Gewebe in Kultur verlieren häufig binnen Stunden ihre typischen morphologischen, physiologischen und biochemischen Eigenschaften. Dieser Dedifferenzierungsprozess beginnt während der Isolierung von Zellen aus einem Organ und setzt sich aus unterschiedlichen Gründen unter dem statischen Milieu einer Kulturschale fort. Beschichtung der Zellunterlage mit Proteinen der extrazellulären Matrix oder die Verwendung von Filtereinsätzen verbessert zwar die Differenzierungsleistung, berücksichtigt aber nicht die zellschädigende Anhäufung von Stoffwechselmetaboliten und Wachstumsfaktoren, sowie die speziellen Ernährungsbedürfnisse einzelner Zellen. Deshalb versuchen wir die Qualität von Zell- und Gewebekulturen zu verbessern, indem wir ein organspezifisches Environment erzeugen. Dazu entwickelten wir ein neues System. Grundlage dafür sind flache Zellträger, die sogenannten MINUSHEETS. Zum Differenzieren der Zellen können darin individuell auswählbare und damit optimale Unterlagen zur Verankerung eingelegt werden. Dann werden die Halterungen autoklaviert und die jeweiligen Zellen aufpipettiert. Alternativ kön-

nen Gewebeschnitte wie in einem Sandwich durch zwei dünne Netze in dem Zellträger in Position gehalten werden. Die Zellträger werden dann in Kulturcontainer überführt, die permanent mit frischem Medium durchströmt werden. Epithelzellen zum Beispiel werden in Gradientencontainern, wie unter natürlichen Bedingungen, von oben und unten mit ganz unterschiedlichen Medien versorgt. Für die Perfusionskultur werden nur eine Peristaltikpumpe und ein Wärmetisch benötigt. Da pH-stabilisierte Medien verwendet werden, arbeitet das System für Wochen und Monate außerhalb eines CO₂-Inkubators und ohne eine Subkultivation. Zusätzliche Anpassung der Kulturbedingungen wird durch eine Analyse der Medien und eine erforderliche Angleichung der Elektrolyte an die natürliche Zellumgebung erreicht.

Das Ergebnis ist eine mit anderen Methoden bisher nicht erreichte organotypische Qualität von Langzeitkulturen. Dadurch eröffnen sich völlig neue Perspektiven zum Tissueengineering und für Untersuchungen zur chronischen Intoxikation von Zellen und Geweben.

Out of the organ into the test tube: Seit Jahrzehnten ist es mittlerweile Routinetätigkeit, Zellen mechanisch und enzymatisch aus einem Gewebeverband zu isolieren und in Kultur zu bringen [1,2]. Dabei läßt man die Zellen meist auf dem Boden eines Kulturgefäßes anhaften und bewirkt durch Zugabe von Serum oder Wachstumsfaktoren ins Medium eine möglichst schnelle Vermehrung. Werden solche proliferierenden Kulturen in funktionellen Experimenten ver-

wendet, so zeigt sich jedoch häufig, daß die Zellen unerwartet reagieren. Verglichen mit intakten Geweben und Organen haben die Zellen in Kultur typische Eigenschaften verloren (Abb. 1) [3,4]. Dieser Vorgang wird als Dedifferenzierung bezeichnet. Verursacht wird dies durch die unzulänglichen Kulturbedingungen, da die Zellen vor ihrer Isolierung aus dem jeweiligen Gewebe und Organ perfekt arbeiteten.

Eine Qualitätsverbesserung von kultivier-

ten Zellen, verbunden mit einem Erhalt von organotypischen Eigenschaften kann auf ganz unterschiedliche Weise erfolgen. Besonders gute Erfolge werden durch die Anpassung der Kulturbedingungen an das natürliche Environment erzielt. Dazu gehören das Beschichten von Zellunterlagen mit Proteinen der extrazellulären Matrix [5,6], die Simulierung einer artifiziellen Basalmembran mit Filtereinsätzen [7] und die permanente Durchströmung der Kulturen

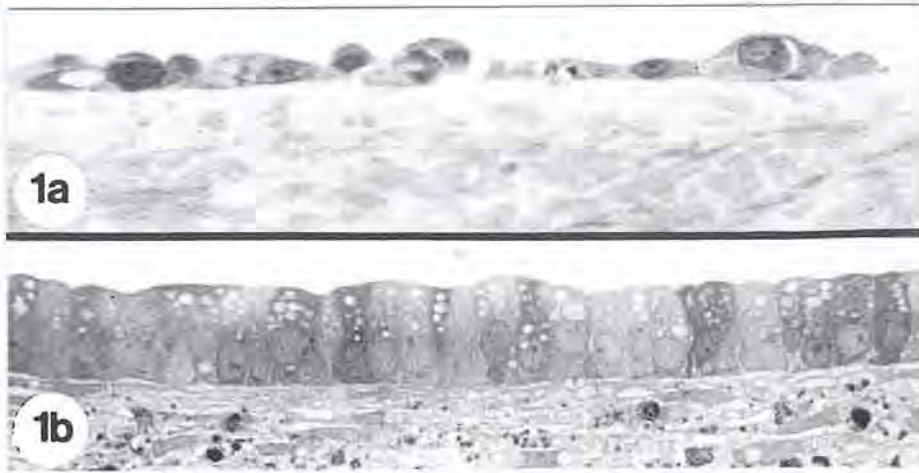


Abb. 1: Kultivierte Sammelrohrepithelzellen der Niere auf einer ungeeigneten Kollagenunterlage (a) und auf einem nierenspezifischen Support (b). In beiden Fällen werden vitale Zellen vorgefunden. Während die Zellen auf einer ungeeigneten Kollagenunterlage ihre polare Differenzierung verlieren (a), bildet sich auf dem nierenspezifischen Support (b) ein tight-Epithel aus, wie es innerhalb der Niere vorgefunden wird.

mit frischem Medium, wie dies beispielsweise in Hohlfasermusername erfolgt [8]. Da die Anwendung aller drei recht unterschiedlichen Methoden jeweils nur in getrennten Versuchsansätzen möglich ist, entwickelten wir eine einfach zu handhabende und vor allem kompatible Technik. Damit wird eine individuelle Anpassung des ursprünglichen Milieus für kultivierte Zellen und Gewebe möglich [9,10,11]. Das neue Konzept umfaßt:

1. Die Auswahl einer individuellen Zellunterlage zur optimalen Zellverankerung und Differenzierung.
2. Die kontinuierliche Versorgung der Kulturen mit frischem Medium zur Aufrechterhaltung der Konstanz von Nährstoffen und zur Ableitung von stoffwechselschädigenden Metaboliten und parakrinen Faktoren.
3. Die physiologische Exposition von Epithelzellen in ihrem natürlichen luminal-basalen Mediumgradienten zur Ausbildung einer perfekten Abdichtung und polaren Differenzierung.
4. Die Anpassung des Kulturmediums an die Bedürfnisse der jeweiligen Organzellen in einer Elektrolytbalance, die mitogenen Streß unterdrückt.

Eine geeignete Unterlage ist die Voraussetzung für eine organotypische Zelldifferenzierung

Die Differenzierung von kultivierten Zellen und Gewebe kann entscheidend durch die Zellverankerung und damit durch die gewählte Unterlage beeinflusst werden

[5,7,12]. Aus diesem Grunde wurden flache Zellträger, die MINUSHEETS entwickelt (Abb. 2). Sie bestehen aus einem schwarzen Haltering und einem weißen Spannring. Dazwischen wird das individuell ausgesuchte Zellunterlagematerial eingelegt. Hierfür eignen sich beliebige Filtermembranen, Netze, Stoffe oder Vliese mit einem Durchmesser von 13 oder 47mm. Mit dieser Technik kann z.B. sehr einfach das Verankerungsverhalten von Zellen untersucht werden [13]. Dazu wurden MDCK Zellen auf dem Kulturschalenmaterial Po-

lystyrol (Thermanox) und auf Glas, Nylon sowie auf verschiedenen Polycarbonatmembranen gezüchtet. Die Kulturen wurden neben transparenten auch auf völlig undurchsichtigen Unterlagen gezüchtet. Zur Visualisierung wurden die Zellkerne mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie Propidiumiodid markiert. Damit konnte die Verteilung der Zellen sehr leicht mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Diese Tests ergaben u.a., daß es im Vergleich zu Polystyrol noch eine Vielzahl von Unterlagen gibt, auf denen MDCK Zellen ein viel besseres, aber auch ein sehr viel schlechteres Anheftungsverhalten zeigen. Bezogen auf diesen spezifischen Zelltyp läßt dies Rückschlüsse zur Bioverträglichkeit des Unterlagematerials zu.

Statische Kulturbedingungen versus Perfusion

Damit bei angesetzten Kulturen möglichst schnell ein konfluenter Zellrasen entsteht, werden dem Medium meist Serum [4] und Wachstumsfaktoren beigefügt [6]. Dadurch werden die Zellen angeregt, sich möglichst schnell und damit auch so oft wie möglich zu teilen, weil ja die mitogen wirkenden Stimuli unablässig einwirken. Eine Zelle, die sich permanent teilt, kann gleichzeitig aber keine Differenzierung zeigen [14]. Anhand des Generationszyklus einer Zelle ist nämlich zu sehen, daß die Zellteilung (Mitose) und die Differenzierung (Interphase) nicht parallel verlaufende, sondern hintereinander folgende Ereignisse sind. Zudem

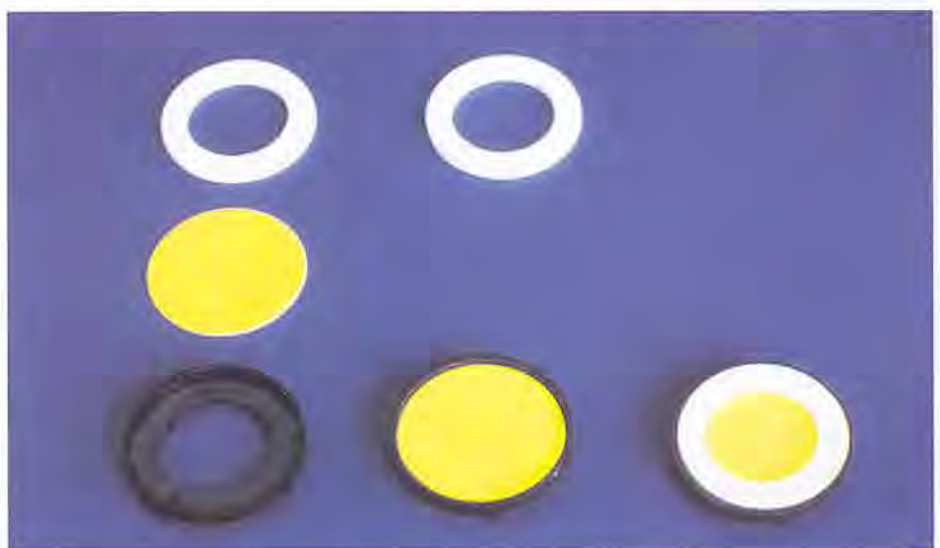


Abb. 2: MINUSHEETS: Die Zellträger bestehen aus einem schwarzen Haltering und einem weißen Spannring. Dazwischen wird eine individuell ausgesuchte Zellunterlage mit einem Durchmesser von 13 oder 47 mm eingelegt. Danach werden die MINUSHEETS autoklaviert und die Zellen aufpipettiert.

werden bei vielen gesunden Geweben Zellteilungen selten beobachtet. Somit befinden sich eine Vielzahl von Zellen in einer postmitotischen „Funktionsphase“. Deshalb sollte für die Generierung einer differenzierten Organzelle in Kultur unbedingt die Generationsdauer des jeweiligen Zelltyps berücksichtigt werden. Aus diesem Grunde gehen wir in zwei Schritten vor. In einem ersten Schritt werden die Zellen auf den MINUSHEETS auf klassische Art vermehrt. Zur Differenzierung aber werden die Zellen dann in einem zweiten Schritt in Kulturcontainer überführt, wo sie permanent mit frischem Kulturmedium durchströmt werden (Abb. 3).

Durch Weglassen der mitogen wirkenden Stimuli wird versucht, die Zellen in der organtypischen Interphase des Zellzyklus zu halten. Deshalb wird in den meisten Fällen auf die Zugabe von Serum oder Wachstumsfaktoren zum Medium



Abb. 3: Perfusionscontainer; nach dem Anwachsen der Zellen auf den MINUSHEETS, werden sie in Kulturcontainer eingesetzt, die permanent mit frischem Medium durchströmt werden.

verzichtet. Durch die permanente Erneuerung des Kulturmediums wird zudem das Angebot an Nährstoffen kontrollierbar und die differenzierungsschädliche Akkumulation von Stoffwechselmetaboliten und parakrin gebildeten Faktoren vermieden. Primärkulturen können in den Perfusionscontainer mit dieser Methode in der für sie typischen Kontaktinhibierung über Wochen und Monate ohne eine Subkultivation gehalten werden [15].

Generierung einer natürlichen Umgebung für kultivierte Epithelzellen

In allen Organen unseres Körpers sind Epithelzellen als biologische Barriere zwischen zwei sehr unterschiedlich zusammengesetzten Kompartimenten angesiedelt. Dabei ist es alleinige Aufgabe der Epithelzellen zu entscheiden, ob ein Austausch von Molekülen zwischen dem luminalen und basalen Kompartiment stattfinden soll und welche Stoffe dabei zwischen oben und unten ausgetauscht werden. Um diese natürliche Umgebung für kultivierte Epithelzellen zu erzeugen, wurde ein Gradientencontainer entwickelt (Abb. 4).

Die auf einem MINUSHEET anhaftenden Epithelzellen werden dazu mit einer Pinzette in die Gradientenkammer eingelegt, dann wird der Deckel geschlossen. Die Kammer wird durch das MINUSHEET und

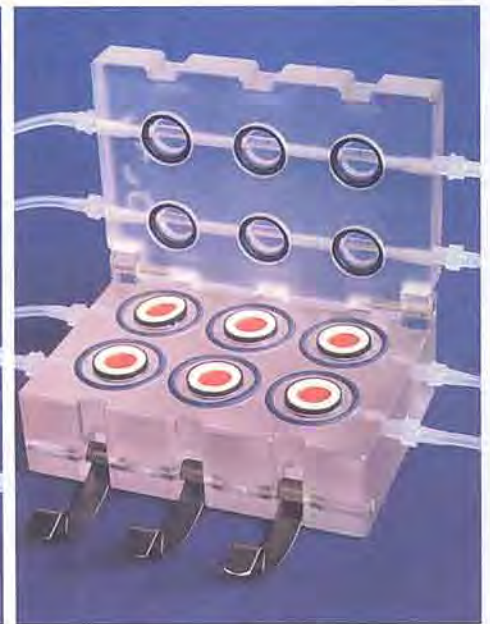
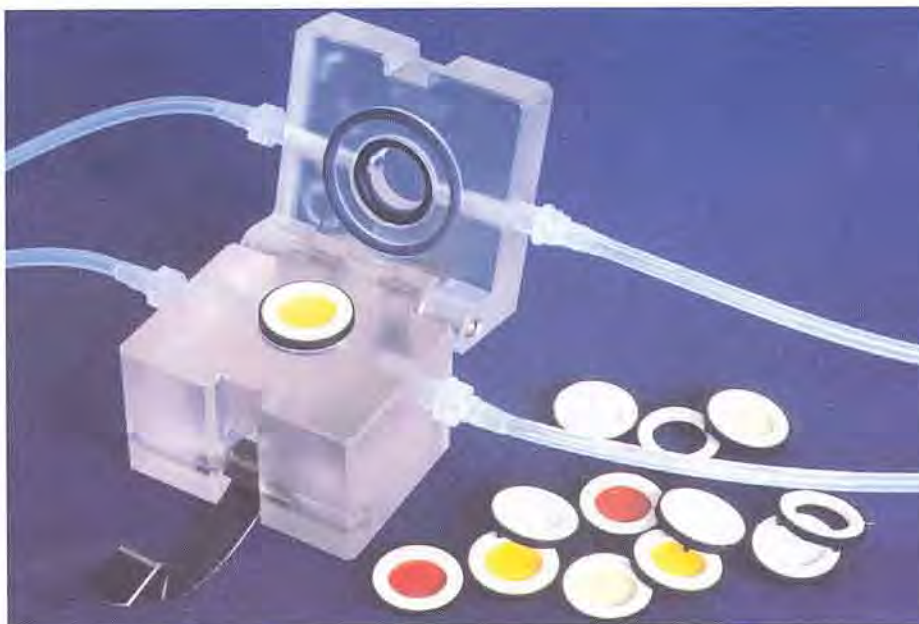


Abb. 4: Gradientenkulturcontainer für 1 (links) und 6 (rechts) MINUSHEETS: Die auf individuellen Unterlagen kultivierten Zellen können in eine Gradientenkammer eingelegt werden, wo sie wie unter natürlichen Bedingungen von oben und unten mit ganz unterschiedlichen Kulturmedien kontinuierlich versorgt werden.



Abb. 5: Mikroskopkammer für Perfusionskulturen: Zellen oder Gewebe lassen sich entweder peripher auf den gläsernen Abdeckungen oder im Zentrum der Kammer auf dem MINUSHEET-Zellträger kultivieren. Dadurch können Kulturen plan oder dreidimensional expandiert werden. Zudem können mit dieser Methode Epithelien von unten und oben mit ganz unterschiedlichen Medien durchströmt werden.

den darauf wachsenden Zellen in ein oberes und unteres Kompartiment geteilt. Luminal und basal können ganz unterschiedliche Kulturmedien perfundiert und somit individuelle organspezifische Bedingungen simuliert werden.

Dieselben Versuche können auch mit einer neu entwickelten Mikroskopkammer durchgeführt werden (Abb. 5). Ohne ein Öffnen der Kammer läßt sich z.B. der jeweilige Zustand der Zellen unter Perfusionskulturbedingungen mit einem Mikroskop kontrollieren. Es stellt sich bei solchen Experimenten die prinzipielle Frage, warum die Epithelzellen während der Kultur luminal und basal mit ganz unterschiedlichen Medien versorgt werden sollen. Epithelzellen haben aufgrund der vielfältigen Barriere- und Transportaufgaben in unserem Körper polar differenzierte Zelleigenschaften entwickelt. Dadurch können z.B. spezielle Ionen auf der einen Epithelseite angereichert werden, während die Konzentration dieser Moleküle auf der anderen Seite abnimmt. Es baut sich ein Gradient auf, in dem jede Epithelzelle weiß, wie sie ihre polare Differenzierung auszurichten hat. Die Bildung und Aufrechterhaltung eines permanenten Gradienten kann jedoch nur funktionieren, wenn eine perfekte Abdichtung in Zusammenarbeit mit den jeweiligen Nachbarzellen gewährleistet ist. Werden z.B. Epithelzellen aus diesem natürlichen Gradienten entnommen und in einer Kulturschale von oben und unten mit dem gleichen Kulturmedium versorgt, dann fehlt den Zellen diese polare Orientierung, d.h. sie befinden sich in einem biologischen Kurzschluß. Eine Folge davon ist die mangelhafte Ab-

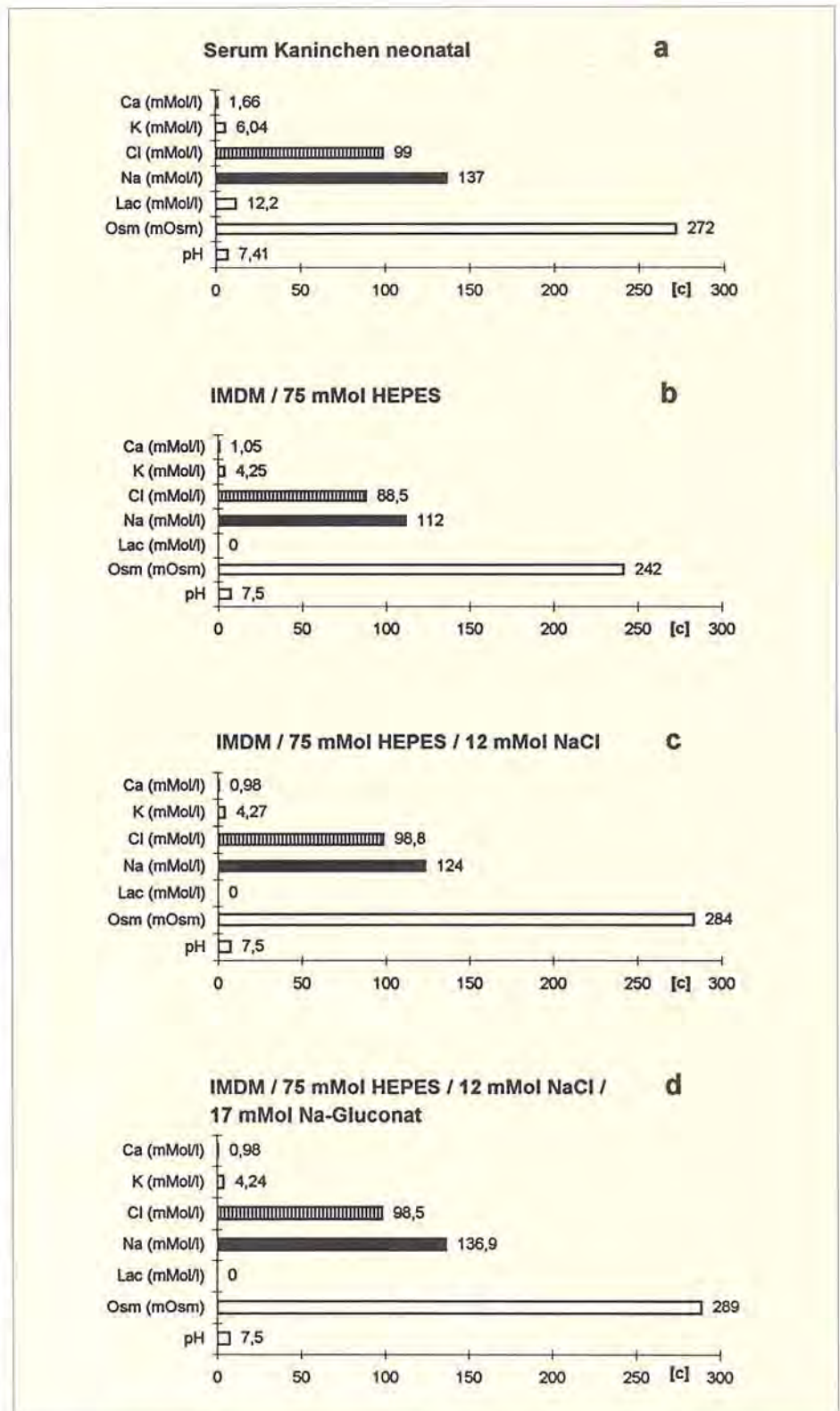


Abb. 6: Angleichung des Kulturmediums an spezies- und organspezifische Bedingungen. Mit einem Stat Profile 9 Plus-Gerät wurden Elektrolyte, Laktat, Osmolarität und pH von neonatalem Kaninchenserum (a), von Iscove's Modified Dulbeccos Medium (IMDM) (b), von IMDM mit 12mMol/l NaCl (c) sowie mit 12mMol/l NaCl und 17mMol/l supplementiertem Na-Gluconat gemessen. Damit kann der Na⁺-Wert in IMDM dem Na⁺-Wert des Kaninchenserums angepaßt werden.

dichtung der Tight junctions und eine häufig zu beobachtende geringgradige Expression typischer Transportfunktionen.

Anpassung des Kulturmediums an die in-vivo Situation

Neben der geeigneten Unterlage für kultivierte Zellen und einer kontinuierlichen Nährstoffversorgung durch Perfusion sollte die Zusammensetzung des Kulturmediums für den jeweiligen Zelltyp überprüft und gegebenenfalls angepasst werden. Dies läßt sich sehr leicht z.B. mit dem Blutgasanalysator Stat Profile 9 Plus (Nova Biomedical, Adam Opel Str. 194, 63304 Rödermark) durchführen. Da Nierenzellen aus neugeborenen Kaninchen für unsere aktuellen Versuche verwendet werden, dient das Serum dieser Tiere als Orientierungswert für das extrazelluläre Milieu (Abb. 6). Mit dem Stat Profile 9-Gerät lassen sich aus einer unverdünnten 200 µl Probe des Kaninchenserums (Fig.6a) oder des Kulturmediums (Fig.6b-d) folgende Parameter bestimmen: pH, pCO₂, pO₂, Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺ sowie der Laktatgehalt und die Osmolarität des Kulturmediums.

Aus der Literatur bekanntes Medium für die Kultivierung von Nierenzellen sind MEM, DMEM und IMDM [16]. Bei der Messung von kommerziell erhältlichem IMDM einer Firma A (Abb. 6b) stellten wir zu unserem Erstaunen fest, daß diese Medien in keinem der Elektrolytparameter mit den Serumwerten (Abb. 6a) von neonatalen oder adulten Kaninchen übereinstimmen. Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, weichen die meisten Elektrolytwerte des Kulturmediums von denen des Serums zwischen 10 und 25% ab. Für Na⁺ wurden im Serum 137 mMol/l gemessen (Abb. 6a), im Kulturmedium dagegen nur 112 mMol/l (Abb. 6b). Die Zugabe von 10% fötalem Kälberserum brachte in keinem Fall eine Anpassung der Elektrolytzusammensetzung an die Serumwerte der Kaninchen. Ebenso konnte mit Medien der Firma B und C keine Ähnlichkeit der Elektrolytparameter an die jeweiligen Serumwerte gefunden werden.

Aus diesem Grund versuchen wir jetzt, einzelne Elektrolytparameter z.B. durch Zugabe von NaCl (Abb. 6c) oder Na-Gluconat (Abb. 6d) den jeweiligen Elektrolyt-Serumwerten (Abb. 6a) anzupassen. Dabei kommt es außerdem zu einer Angleichung des Osmolaritätswertes an die Serumwerte. Bei Verwendung von kultivierten Nierene epithelien in den Gradientencontainern (Abb. 4) gelten z.B. die Serumdaten als Richt-

wert für das Medium auf der basalen Zellseite, während gemessene Urinelektrolytwerte als Maß für das luminale Medium verwendet werden.

Man mag einwenden, daß sich die meisten verwendeten Zellen bisher sehr gut in den verwendeten Kulturmedien vermehren ließen, auch wenn die Elektrolytzusammensetzung und die Osmolarität nicht mit den entsprechenden Serumwerten übereinstimmt. Dabei ist zu bedenken, daß die Erhöhung des Na⁺- bzw. Erniedrigung des K⁺-Gehaltes [17] oder eine Veränderung der Osmolarität [18] die Zellen im Vergleich zu Kontrollen ähnlich gut proliferieren läßt, wie dies mit Wachstumsfaktoren zu erreichen ist [6,19].

Bei organtypischen Kulturexperimenten sollte deshalb besonders berücksichtigt werden, daß sich viele dieser Zellen nicht dauernd teilen, sondern daß sie in einer monate- oder sogar jahrelangen Kontaktinhibition der Interphase verweilen. Verglichen mit der Organsituation stehen nämlich nur in dieser Interphase die typischen Organfunktionen der Zelle zur Verfügung. Deshalb versuchen wir das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung von Zellen in Kultur dem jeweiligen Proliferationszyklus der Organzellen durch Entzug oder Zugabe von mitogenen Stimuli anzupassen.

Die neue Technik eröffnet organtypisches Tissueengineering und Untersuchungen zur chronischen Intoxikation

Neue Methoden müssen bessere Ergebnisse als bisher liefern und zudem zukunftsorientierte Experimente möglich machen. Hierzu einige Beispiele: Mit der entwickelten Technik gelang es zum ersten Mal, ein klar definiertes Epithel aus dem Sammelrohrethel der Säugerniere mit seinen unterschiedlichen Zelltypen zu generieren und in der organtypischen Kontaktinhibition über Wochen und Monate zu halten [20]. Damit werden z.B. erstmals Versuche zum chronischen Nierenversagen unter Kulturbedingungen möglich.

Es gelang außerdem, proliferierendes mikrovaskuläres Endothel der Säugerniere erstmalig unter Kulturbedingungen am Leben zu erhalten [21]. Dadurch können wachstumsfördernde bzw. wachstumshemmende Einflüsse bei der Entstehung des renalen Gefäßsystems in vitro und unter bisher nicht gekannten organtypischen Bedingungen untersucht werden [22]. Im zahn-

medizinischen Bereich kann jetzt z.B. Mundschleimhaut vor einer geplanten großflächigen Operation entnommen und für Wochen unter Perfusionskulturbedingungen konserviert werden [23]. Inzwischen kann die Entnahmestelle verheilen. Die in Perfusionskultur konservierte Gingiva kann dann zum eigentlichen Operationstermin zur zusätzlichen Abdeckung von Wundflächen implantiert werden.

In der entwickelten Gradientenkammer (Abb. 4) sind neuerdings realitätsnahe Untersuchungen zur Verträglichkeit von Medikamenten bei der Zahnbehandlung möglich geworden [24]. Dazu läßt man auf der einen Seite von Dentinscheiben Mesenchymzellen wachsen. Auf der anderen Seite der Zahnscheibe können beliebige Behandlungs- und Füllmaterialien aufgetragen werden. Sterben die Mesenchymzellen in der „Pulpahöhle“ ab, so hat die jeweilige Testsubstanz die Bioverträglichkeitsprüfung nicht bestanden.

Möglich wurde mit der entwickelten Perfusionskultur erstmalig auch die Gewinnung von gewebetypischen Knorpel für chirurgische Implantationszwecke [25,26,27]. Das dabei aus dem Patienten isolierte und in der Perfusionskultur generierte Knorpelgewebe besteht aus den typischen Chondronen und extrazellulären Matrixproteinen, wie z.B. dem unveränderten Kollagen Typ II.

Da bei diesem Tissueengineering-Verfahren patienteneigene Zellen verwendet werden, sind Abstoßungs- und Entzündungsvorgänge nach Implantation des Gewebes im Hals-Nasen-Ohrbereich auf ein Minimum reduziert. In klassischen Kulturschalen sind all diese Experimente bisher nicht gelungen.

Anmerkung:

Die Untersuchungen wurden unterstützt von der deutschen Forschungsgemeinschaft (Mi 331/4-1). Besonderer Dank gilt der technischen Mitarbeit von Frau E. Eckert. 1992 wurde das Projekt mit dem Philip Morris Forschungspreis „Herausforderung Zukunft“ ausgezeichnet.

Das Kultursystem ist zu beziehen über: MINUCELLS and MINUTISSUE Vertriebs GmbH, Starenstraße 2, D-93077 Bad Abbach, Fax: 09405-4427.

Korrespondenz:

Will W. Minuth, Universität Regensburg, Institut für Anatomie, Universitätsstr. 31, D-93053 Regensburg, Fax: 0941-943 2868.

MINUSHEET-Perfusionskultur
 BIOTECHNICA in Hannover, 10.-12. Oktober 1995
 Halle 2 / Stand B 34



Literatur:

- [1] Gebelein, C.G.; in *Biotechnological Polymers - medical, pharmaceutical and industrial applications*. Technomic Publishing Company, Basel (1993).
- [2] Doyle, A. et al.; in *Cell & Tissue Culture. Laboratory Procedures*. John Wiley & Sons, Chichester (1993).
- [3] 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).
- [4] Koechlin, 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).
- [5] 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).
- [6] 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).
- [7] 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).
- [8] 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).
- [9] Minuth, W.W.; US-patent No. 5, 190, 878 - Apparatus for cultivating cells (1993).
- [10] Minuth, W.W.; Patent Nr. DE 3923279 - Vorrichtung für die Kultivierung von Zellen (1991).
- [11] Minuth, W.W.; R. Dermietzel, 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).
- [12] Kizer, N.L.; B. Lewis, B.A. Stanton: Electrogenic sodium absorption and chloride secretion by an inner medullary collecting duct cell line (mIMCD-K2). *Am. J. Physiol.* 268: F347-355 (1995).
- [13] Minuth, W.W.; V. Majer, S. Kloth, R. Dermietzel: Letter to the Editor/Growth of MDCK cells on non-transparent supports. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30A: 12-14 (1994).
- [14] Gelfant, S.: Cycling-non cycling cell transitions in tissue aging, immunological surveillance, transformation and tumor growth. *Int. Rev. Cytol.* 70: 1-25 (1981).
- [15] Minuth, W.W.; W. Fietzek, S. Kloth, J. Aigner, P. Herter, W. Röckl, M. Kubitz, G. Stöckel, R. Dermietzel: Aldosterone modulates PNA binding cell isoforms within renal collecting duct epithelium. *Kidney Int.* 44: 537-544 (1993).
- [16] Isabelle M.E.; S. Githens, R. L. Moses, C. K. Bartell: Culture of rat renal medullary tissue in media made hyperosmotic with NaCl and urea. *J. Exp. Zool.* 269: 308-318. (1994).
- [17] Walsh-Reitz M.M.; H.N. Aithal, F.G. Toback: Na regulates growth of kidney epithelial cells induced by lowering extracellular K concentrations. *Am. J. Physiol.* 247: C321-C326 (1984).
- [18] Itoh T.; A. Yamauchi, A. Miyai, K. Yokoyama, T. Kamada, N. Keda, Y. Fujiwara: Mitogen-activated protein kinase and ist activator are regulated by hypertonic stress in Madin-Darby Canine Kidney cells. *J. Clin. Invest.* 93: 2387-2392 (1994).
- [19] Anderson, R.J.; H.T. Sponcel, R. Breckon, T. Marcell, J.P. Hoefler: Transforming growth factor- β 1 regulation of signal transduction in two renal epithelial cell lines. *Am. J. Physiol.* 265: F584-F591 (1993).
- [20] Aigner J.; S. Kloth, M. Kubitz, M. Kashgarian, R. Dermietzel, W.W. Minuth: Maturation of renal collecting duct cells in vivo and under perfusion culture. *Epith. Cell Biol.* 3: 70-78 (1994).
- [21] Kloth, S.; A. Schmidbauer, M. Kubitz,

za, H.A. Weich, W.W. Minuth: Developing renal microvasculature can be maintained under perfusion culture conditions. *Eur. J. Cell. Biol.* 63: 84-95 (1994).

[22] Kloth S.; C. Ebenbeck, M. Kubitz, A. Schmidbauer, W. Röckl, W.W. Minuth: Stimulation of renal microvascular development under organotypic culture conditions. *The FASEB Journal* 9: 963-967 (1995).

[23] Lehmann P.: Morphologische und immunhistochemische Untersuchungen von humaner Gingiva in der Perfusionskultur zur Langzeitkonservierung. Dissertation, Universität Regensburg (1995).

[24] Schmalz, G.; P. Garhammer, H. Schweik: A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J. Endodontics* 21: xx (1995). in press.

[25] 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).

[26] Bujia, J.; M. Sittinger, G. Burmester: Züchtung menschlichen Knorpelgewebes mit Hilfe einer Perfusionskammer. *Laryngo-Rhino-Otol.* 73: 577-580 (1994).

[27] Bujia, J.; M. Sittinger, W.W. Minuth, C. Hammer, G. Burmester, E. Kastenbauer: Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer fleeces and perfusion culture. *Acta Otolaryngol.* 115: 307-310 (1995).

Erstautor:

Prof. Dr. Will W. Minuth.
 Geboren 1949, Abitur 1968, Studium der Biologie an der Universität zu Köln. 1971 Studienaufenthalt an der Universität Helsinki in Finnland und Erlernen der Zellkulturtechnik. Diplom 1974, Promotion 1978. Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin und am Anatomischen Institut der Universität Heidelberg. 1985 Habilitation für Anatomie, 1986 Ernennung zum Professor. 1989 Professur für Anatomie an der Universität Regensburg. Wissenschaftliche Tätigkeit in mehreren Sonderforschungsbereichen, Forschergruppen und Einzelprojekten der Deutschen Forschungsgemeinschaft über die Entwicklung funktioneller Eigenschaften von Nierenzellen. 1992 Verleihung des Philip Morris Forschungspreises Herausforderung Zukunft.