

---

# In vitro Alternativen zum Tierversuch - Möglichkeiten und Probleme

W. W. Minuth, J. Aigner, B. Kubat, S. Kloth, W. Röckl, M. Kubitzka

Seit Jahren liegt der Verbrauch von Versuchstieren bei ca. 2 Millionen pro Jahr in Deutschland (Tierschutzbericht, 1993). Dabei stellt sich die Frage, warum prinzipiell nicht mehr in vitro Alternativen wie z.B. Zellkulturen zur weiteren Reduktion von Tierversuchen eingesetzt werden. Uns selber überrascht allerdings der stagnierende Verbrauch an Versuchstieren nicht, weil die Zellkulturen bisher in den meisten Fällen nicht das gehalten haben, was man sich erhofft hatte. Die Zellkulturmodelle waren bisher nicht genügend entwickelt und standardisiert, es fehlte außerdem an der Übertragbarkeit von der in vitro Situation auf die Bedingungen in einem menschlichen Organismus. Damit sind die meisten in vitro Alternativen bis heute nicht geeignet, die qualitativ anspruchsvollen Anforderungen zur Ablösung eines Versuchs am Tier zu erfüllen.

*Der Anspruch an eine moderne organotypische Zellkultur:* Ziel unserer wissenschaftlichen Bemühungen ist die Gewinnung möglichst optimaler, also organotypischer Zellkulturen. Bisher ist es nämlich nicht möglich, unter in vitro Bedingungen Zellen und Gewebe in der gleichen Qualität zu züchten, wie diese innerhalb eines Organismus vorgefunden werden (Paul, 1980; Lindl und Bauer, 1989). Erst mit solchen klar definierten und qualitativ hochwertigen Kulturen wird es in Zukunft möglich sein, in vitro Experimente unmittelbar auch auf einzelne Organfunktionen eines Menschen oder eines Tieres zu übertragen. Trotz einer 50jährigen Erfahrung mit Zellkulturen ist die Wissenschaft von diesem Idealbild einer organ- oder gewebetypischen in vitro Simulierung noch sehr weit entfernt. Belegt ist dieses Argument durch eine auffallende Diskrepanz einerseits zwischen der riesigen Anzahl von bisher durchgeführten Zellkulturversuchen und andererseits den bis zum heutigen Tag nicht zur Verfügung stehenden organspezifischen und damit auch auf den Menschen übertragbaren Zellkulturmodellen.

Wenn Experimente am Tier durch Versuche mit kultivierten Zellen ergänzt oder in Zukunft vielleicht sogar einmal in bestimmten Bereichen ersetzt werden sollen, dann muß in einem allerersten Schritt die Qualität der Ersatzmethode, also in diesem Fall

die angewandte Zellkultur, überprüft werden. Es muß prinzipiell die Frage gestellt werden, ob die gegenwärtigen Zellkulturen überhaupt als Ersatzmethode dienen können, ob der Austausch einen Sinn macht und das Zellkulturmodell nicht schon in den allerersten Ansätzen wegen einer mangelhaften Qualität zum Scheitern verurteilt ist. In einem Resümee unserer 10-jährigen Forschungsarbeiten sollen deshalb die experimentellen Erfahrungen beim Arbeiten mit kultivierten Nierenzellen geschildert werden. Dabei soll vor allem sehr kritisch beleuchtet werden, wie schwierig es ist, eine organ- und gewebespezifische Qualität an Zellkulturen zu gewinnen, und welche unvermutete Labilität diese Zellkulturen besitzen.

*Der einfache und klassische Weg - Zellen zur Vermehrung von Biomaterie:* Zellkulturen werden schon seit etwa 50 Jahren fast unverändert und deshalb routinemäßig in der biomedizinischen Forschung eingesetzt (Jakoby und Pastan, 1979; Spier und Griffiths, 1990). Insbesondere in der Virologie und zur Produktion von Impfstoffen waren Zellen gefragt, die sich auf möglichst einfache Art vermehren ließen (Dulbecco und Freeman, 1959). Da ja die Vermehrung von Biomaterie bei diesen Versuchen im Vordergrund stand, waren permanent sich teilende Zellen, die sogenannten Zelllinien, das ideale Arbeitsmodell (Hay et al., 1992). Wichtig für diese Arbeiten war, daß die Zellen jederzeit verfügbar waren und sich ohne viel Aufwand vermehren ließen. Dabei war es nebensächlich, welche sonstigen anderen Eigenschaften die Zellen noch aufwiesen und ob sie eine Ähnlichkeit zu einer speziellen Organzelle hatten. Heute stehen ca. 3500 solcher kontinuierlichen Zelllinien zur Verfügung, die per Katalog bestellt werden können. Diese Zellen sind zum unentbehrlichen Hilfsmittel bei der biotechnologischen Herstellung von Impfstoffen und Medikamenten geworden (Primrose, 1990), zudem sind sie bei der Gefahrstoffabschätzung als toxikologische in vitro Modelle nicht mehr wegzudenken (Balls et al., 1991).

Da die kontinuierlichen Linien aus transformierten Zellen bestehen, die sich permanent teilen, haben sie die Eigenschaften von Tumorzellen angenommen und unterscheiden sich damit sehr wesentlich von Organzellen. Es gingen spezielle Funktionseigenschaften der ursprünglichen Organzellen verloren, und z.T. ganz andere Eigenschaften wurden angenommen (Doyle et al., 1993).

Aus der Vielzahl der kontinuierlichen Zelllinien gibt es zum Beispiel keinen einzigen Stamm, der eindeutig einem definierten Nephronsegment einer tierischen oder menschlichen Niere mit all seinen typischen Eigenschaften entspricht. Erschwerend kommt bei der Auswahl einer kontinuierlichen Zelllinie die Speziesproblematik hinzu. Es gibt z.B. keine vergleichbaren kontinuierlichen Zelllinien von unterschiedlichen Spezies, auch nicht aus der Kaninchenniere, obwohl an diesem Tier die Mehrzahl aller bisher bekannten funktionellen Daten erarbeitet wurde. Ausdrücklich soll an dieser Stelle betont werden, daß sich keine einzige Zelllinie für unsere Versuche am Sammelrohr der Kaninchenniere als geeignet erwies. So mußten wir aufgrund des

Fehlens stabiler tierischer und humaner Zelllinien an schwierig zu erstellenden Primärkulturen, also an aus dem Organ isolierten und in Kultur gebrachten Zellen arbeiten. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sind jedoch für uns zum unschätzbaren wissenschaftlichen Erfahrungswert geworden.

*Die Planung für eine in vitro Alternative:* Bei dem Entwurf einer Alternative zum Tierexperiment stellt man sich vor, an klar definierten Zellen unter Kulturbedingungen Experimente durchzuführen, die an einem ganzen Organismus oder einem Organ aufgrund der komplexen Bedingungen nicht sinnvoll oder möglich sind. Ohne interferierende Einflüsse soll z.B. die Steuerung bestimmter Ionenkanäle, die Resorption von Nährstoffen oder die Verstoffwechslung einer Substanz untersucht werden. Die an den Kulturen gewonnenen Ergebnisse sollen dann auf körpereigene, also unsere menschlichen Funktionen übertragen werden. Die Frage ist, ob organspezifische Zellkulturmodelle verfügbar sind, die diesen Zielvorgaben gerecht werden.

Bei der Literaturrecherche in Datenbanken fällt auf, daß es unzählige wissenschaftliche Arbeiten in der biomedizinischen Forschung gibt, die als Hilfsmittel kultivierte Zellen verwenden. In den meisten Arbeiten sind die positiven Seiten der Kulturen beschrieben, dagegen sind meist nur sehr wenig oder gar keine Informationen über die fehlenden Eigenschaften erläutert. Dies ist ein besonders wichtiger Punkt, weil eben die verbliebenen Teilfunktionen in den Zellkulturmodellen nicht ausreichen, um das Funktionsspektrum einer intakten tierischen und menschlichen Zelle zu ersetzen. Es ist eine seit langer Zeit bekannte Tatsache, daß sehr wesentliche Funktionen einer Zelle unter in vitro Bedingungen häufig schon binnen Stunden nach der Isolierung aus dem Organ verloren gehen, d.h. die Zellen befinden sich im Zustand der Dedifferenzierung (Minuth und Gilbert, 1988). Es ist außerdem bekannt, daß unter den konventionellen Kulturbedingungen solche wichtigen Funktionscharakteristika bisher nicht wieder zurückgewonnen werden können. Trotz vielfältiger Bemühungen ist es beispielsweise bis heute weltweit nicht gelungen, ein entgiftendes Leberorgan oder eine künstliche Niere auf der Basis von kultivierten Zellen zu bauen, da sowohl viele technische und zellbiologische Probleme in diesem Bereich noch nicht gelöst sind, als auch das Problem der Dedifferenzierung nicht im Griff ist. Deshalb ist es für den Sachkenner auch nicht verwunderlich, daß es Zellkulturmodelle für die Simulation von tierischen oder menschlichen Gewebefunktionen als eine in vitro Alternative in akzeptierter und normierter Form bis zum heutigen Tage nicht geben kann.

*Der Prüfstand für kultivierte Zellen ist vielfach noch nicht in Sicht:* Für niemanden besteht heute ein Zweifel, daß aus dem Organ isolierte und in Kultur genommene Zellen das ideale Mittel wären, um Funktionsprüfungen von Substanzen unter standardisierten Bedingungen und ohne die Interaktion eines Organismus zu untersuchen. Viele Male haben wir miterlebt, daß voller Enthusiasmus Zellkulturen für

diesen Zweck mit großem Personal-, Geld- und Zeitaufwand angelegt wurden. Aufgrund mangelhafter Qualität haben sich diese Kulturen leider in den meisten Fällen nicht durchgesetzt. Man entdeckte immer wieder aufs Neue, daß die kultivierten Zellen auf gezielte Reize nur noch schwach oder gar nicht mehr reagierten. Dadurch konnten die gewünschten Untersuchungen nicht wie geplant durchgeführt werden. Es wurde z.B. nicht berücksichtigt, daß permanent sich teilende und damit schnell wachsende Zellen wichtige Funktionseigenschaften einbüßen und somit keine organotypischen Funktionen mehr ausüben können. Die Mehrzahl der Zellen eines Organismus befindet sich nämlich nicht in einer Teilungs- oder Proliferationsphase, sondern in der Funktionsphase. Außerdem besitzt das Milieu einer Petrischale keine Ähnlichkeit mit dem Organmilieu. An keiner Stelle unseres Körpers sitzen Zellen einer gas- oder flüssigkeitsundurchlässigen Oberfläche wie in einer Kulturschale auf, zudem fehlt ihnen ein ständiger Flüssigkeitsaustausch. Normalerweise werden dadurch funktionsregulierende, also stimulierende oder hemmende Faktoren angeflutet und permanent Stoffwechselschlacke entfernt. Da die Zellen permanent mit ihrer Umwelt kommunizieren, sind sie in ihrer Funktion von ihrem umgebenden Milieu abhängig. Beispiele anhand von kultivierten Nierenzellen sollen zeigen, wie bestimmte Eigenschaften unter Kulturbedingungen erhalten wurden und durch welche Faktoren ganz wesentliche Funktionen verloren gingen.

*Gut gemachte Zellkulturen haben bei Untersuchungen an komplex aufgebauten Stoffwechselorganen viel mehr Chancen als Versuche an Tieren:* Die Niere ist das zentrale Organ für die Aufrechterhaltung des Säure-Basengleichgewichts, des Elektrolyt- und des Wasserhaushaltes (Brenner und Rector, 1991). Diese vielfältigen Funktionen werden durch ein komplexes Organ ausgeführt, das aus mindestens 25 verschiedenen Zelltypen aufgebaut ist. Pro Tag entstehen in der Niere etwa 180 l Primärharn, der zu 85% im Nephron verstoffwechselt wird. Die restlichen 15% werden im Verbindungstubulus und im Sammelrohrsystem aufbereitet. Der Natriumanteil, der pH und die Osmolarität des auszuscheidenden Urins werden dabei von drei verschiedenen Zelltypen, den Principal Cells (helle Hauptzellen) und zwei verschiedenen Typen Intercalated Cells (dunkle Zwischenzellen), gesteuert (Kaissling und Kriz, 1979). Von besonderem experimentellen Interesse ist die Untersuchung biochemischer und physiologischer Wirkungen des Salztransportes durch das Steroidhormon Aldosteron (Garg und Narang, 1988) und des Wasseraustausches durch das Peptidhormons Vasopressin (Lankford et al., 1991). Während elektrophysiologische Untersuchungen an einzelnen Zellen des Sammelrohrs in der Niere sich relativ einfach durchführen lassen, scheiterten viele zellbiologischen Untersuchungen an dem komplexen Aufbau des Organs. Es ist nämlich relativ schwierig, aus dem heterogen zusammengesetzten Gewebe eine ausreichende Menge einer homogenen Zellpopulation für die Experimente in kurzer Zeit zu gewinnen. In diesem Fall bietet

sich die Etablierung eines Zellkulturmodells an. Zu diesem Zweck wurde von uns das Sammelrohrethel aus der reifenden und erwachsenen Kaninchenniere isoliert und auf unterschiedliche Arten kultiviert (Abb.1; Minuth, 1987; Kubat, 1993). Beim Vergleich der Kulturen mit der Organsituation fanden sich überraschende Qualitätsunterschiede.

*Die polare Differenzierung als prinzipielle Qualitätsanforderung für kultivierte Epithelzellen:* Die Voraussetzung für ein funktionsfähiges Epithelgewebe ist dessen polare Differenzierung. Darunter versteht man eine räumlich festgelegte Geometrie der einzelnen Zellen. Mit ihrer basalen Seite haften die Zellen innerhalb der Niere auf einer speziellen durchlässigen Proteinunterlage, der Basalmembran (Abb. 1a). Darunter liegt ein Flüssigkeitsraum, über den die Zellen mit Nährstoffen versorgt werden. Mit ihrer oberen Seite bilden die Epithelien eine Grenzschicht zu dem Urinraum. Die Epithelzellen haben dabei die spezielle Aufgabe, eine Barriere zu bilden. In den Nieren dienen alle Epithelien dazu, die harnpflichtigen Substanzen in den Urinraum zu sezernieren und dafür zu sorgen, daß diese nicht wieder zurückgelangen können. Gleichzeitig müssen sie aber auch dafür sorgen, daß mit dem Urin nicht wertvolle Stoffe ausgeschieden, sondern für den Organismus zurückgewonnen werden. Aus diesem Grund sind in die Zelloberflächen selektive Transportpumpen und Kanäle eingebaut, so daß nur bestimmte Stoffe durch die Zellen hindurchgelassen werden, während andere Substanzen nicht passieren können. Damit Substanzen nicht unkontrolliert an den Epithelzellen vorbeigelangen können, muß eine abdichtende Barriere zwischen den einzelnen Zellen ausgebildet werden, die sogenannte Tight junction (Frömter und Diamond, 1972).

Zur Gewinnung von Epithelzellen für die Kultur sind eine Reihe von Präparations-schritten notwendig. Zuerst werden die Sammelrohrtubuli aus der Niere isoliert und von anderen Nephronabschnitten getrennt. Danach werden die Zellen vereinzelt. Dadurch werden die Zellen nicht nur von ihrer natürlichen Basalmembranunterlage abgelöst, sondern es werden auch die Zell- Zellverbindungen aufgebrochen. Die ursprünglich geometrisch gebauten Zellen runden sich bei diesem Vereinzelvorgang ab. Infolgedessen verteilen sich auch die auf der oberen und unteren Zellseite gelegenen Transportsysteme völlig untypisch auf der gesamten Zelloberfläche (Pisam und Ripoché, 1976). Werden diese Zellen nun in eine Kulturschale überführt, so haften sie nach kurzer Zeit auf dem Boden an und beginnen sich zu teilen. Ein Großteil der gewonnenen Zellen gewinnt seine ursprüngliche Geometrieform und damit seine funktionelle Polarisierung nicht ohne weiteres wieder zurück (Abb.1c). Während die Zellen im Organ natürlicherweise eine geometrische Form (Abb.1a) innehatten, so gleichen sie auf dem Boden einer Kulturschale jetzt mehr einem Spiegelei, dessen Dotter als höchster Punkt die Lage des Zellkerns im Lichtmikro-

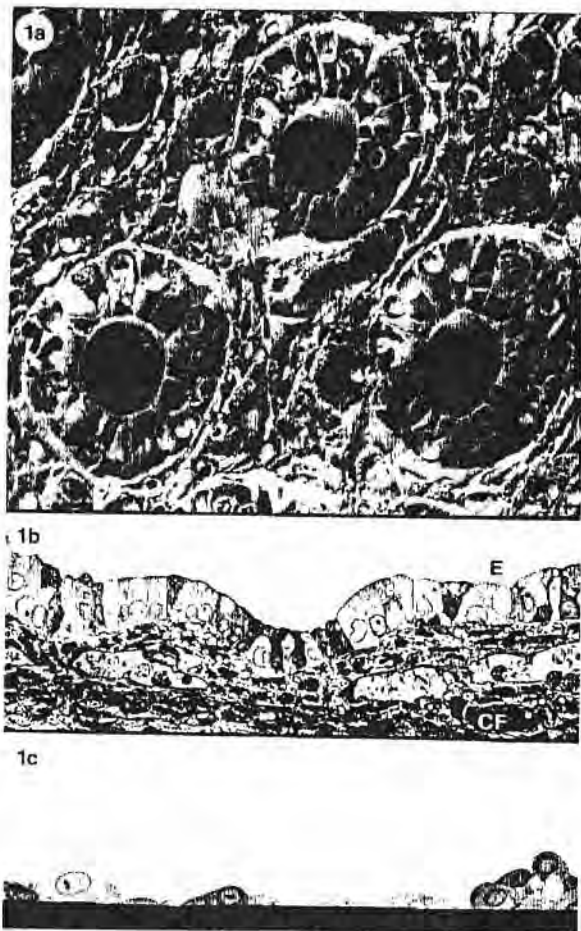


Abb. 1: Mikroskopische Darstellung von Sammelrohren aus der Niere (a), kultiviertem Sammelrohrepithel (E) auf der nierentypischen Capsula fibrosa-(CF) Unterlage (b) und kultivierten Sammelrohrzellen auf dem Boden einer Kulturschale (c). a) Bei den drei im Querschnitt dargestellten Sammelrohren ist mit dem Rasterelektronenmikroskop deutlich das urinführende Lumen zu erkennen. b) Das auf der Capsula fibrosa-Unterlage kultivierte Sammelrohrepithel zeigt deutlich die gleiche polare Differenzierung der Zellen wie im Sammelrohr der Niere. c) Dagegen ist die polare Differenzierung zu einem großen Teil verlorengegangen, wenn die Zellen wie ein Spiegelei auf dem Boden einer Plastikculturschale gehalten werden. Vergrößerung: a) x 600; b) x 900; c) x 1200

skop widerspiegelt. Heute weiß man, daß der Boden einer Kulturschale zum Anhaften der Zellen und für die Ausbildung von speziellen Zelleigenschaften nicht ausreicht. Zur Verbesserung der Zelleigenschaften muß deshalb eine Unterlage verwendet werden, die der natürlichen Basalmembran nahekommt und auf dem die Zellen ihre ursprünglichen Eigenschaften entwickeln können. Als besonders wertvolle Zellunterlage hat sich bei unseren Versuchen die dünne kollagenhaltige Organkapsel der Niere, die Capsula fibrosa, erwiesen (Abb. 1b; Minuth, 1987).

In der Kulturschale fanden sich bei unseren Sammelrohr-Zellkulturen ein geschlossener Zellrasen (Abb. 1c). Obwohl die Zellen keine typische Pflastersteinform aufwiesen, sondern untypisch flach waren, fanden wir bei der Mehrzahl der Zellen eindeutig die abdichtende Barriere, die Tight junctions. Um Aussagen zur Abdichtungsfähigkeit dieser Tight junctions zu erhalten, wurden die Zellen elektronenoptisch untersucht. Im Organ besteht die Abdichtung aus speziellen Proteinfäden, die sich gürtelförmig um jede Zelle ziehen (Frömter und Gebler, 1977). Auch an kultivierten Zellen ist eine solche Abdichtung zu finden, die den Sammelrohrzellen einer erwachsenen Niere entspricht. Dabei muß aber besonders darauf hingewiesen werden, daß solche abdichtende Barrieren nur bei kultivierten Zellen gefunden werden, die auf einer organtypischen Unterlage wachsen, nämlich der Capsula fibrosa der Niere (Abb. 1b). Werden dagegen die Zellen auf einem einfachen, unbehandelten Kulturschalenboden kultiviert, dann bilden sich nur sehr unvollständige Abdichtungen aus (Kubat, 1993). Die Versuche belegen somit eindeutig, daß die Ausbildung einer funktionellen Abdichtung allein schon durch die Unterlage der kultivierten Zellen beeinflußt werden kann. Für den Anwender bedeutet dies, daß die Qualität der kultivierten Zellen geachtet werden muß, da sie entscheidenden Einfluß auf das Ergebnis seiner Transportuntersuchungen am Epithelgewebe hat.

*Die Ausbildung von speziellen Transporteigenschaften:* Ein weiteres wichtiges Qualitätskriterium für die Epithelzellen ist, ob die organspezifischen Transporteigenschaften während der Kultur erhalten geblieben sind, oder ob wichtige Funktionen verlorengehen. Zu den charakteristischen Eigenschaften der Principal Cells des Sammelrohrepithels gehört u.a. die Fähigkeit, Natrium und Wasser aus dem Urin für den Organismus zurückzugewinnen (Zeidel, 1993). Natriumionen gelangen dabei durch spezielle Kanäle (Brown et al., 1989) auf der oberen, d.h. apikalen Seite in das Innere der Zelle und werden auf der unteren Seite durch eine spezielle Pumpe, der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, in das Bindegewebe herausgepumpt (Ridderstrale et al., 1988). Die Natriumaufnahme kann durch das Steroidhormon Aldosteron über diese Kanäle stimuliert und durch Amilorid gehemmt werden (Marunaka et al., 1992; Schuster, 1993).

Das positive Beispiel - Salztransport: Wir konnten zeigen, daß die Wirkung von Aldosteron sehr gut mit unseren kultivierten Sammelrohrepithelien untersucht wer-

den konnte (Gross et al., 1986; Minuth et al., 1986). Solche Untersuchungen wären an der Niere unmöglich gewesen. Als ganz neuer Befund konnte z.B. gezeigt werden, daß Aldosteron die Abdichtung der Epithelien sehr wesentlich beeinflußt (Minuth et al., 1988). Die Wirkung des Hormons setzte viel früher als bisher angenommen ein (Minuth et al., 1987), da schon nach etwa 15 Minuten eine deutliche Steigerung des Natriumtransportes nach Aldosteronzugabe festgestellt wurde (Minuth et al., 1988; Minuth et al., 1989).

Das negative Beispiel - Wassertransport: Während funktionelle Untersuchungen zum Salztransport mit den kultivierten Sammelrohpithelien zahlreiche neue Ergebnisse und Perspektiven lieferten, ergaben Versuche zum Wassertransport nicht die erwarteten Resultate (Tab. 1; Minuth et al., 1986; Kubat, 1993). Der Wassertransport in den Sammelrohrzellen kann durch das antidiuretische Hormon Vasopressin verstärkt werden (Lankford et al., 1991). Das resorbierte Wasser gelangt dabei durch spezielle Wasserkanäle bzw. Aggrephoren ins Innere der Zellen und wird auf der basolateralen Zellseite wieder herausgepumpt. Mit dem Elektronenmikroskop sind solche Wassereintrittsstellen an Zellen in der Niere zu erkennen (Kubat, 1993). Bei Sammelrohrzellen, die auf dem Boden von Kulturgefäßen gehalten wurden, sind diese Kanäle nicht mehr zu erkennen (Tab. 1). Dies bedeutet, daß die Zellen in der Kulturschale die Wasserkanäle als ihr typisches Charakteristikum verloren haben. Dafür sind bei Sammelrohrzellen, die auf der nierenspezifischen Unterlage kultiviert wurden, die Wassereintrittsstellen wieder deutlich zu finden. Trotz der vorhandenen Wasserkanäle sind diese Zellen nicht mehr fähig, vermehrt Wasser zu transportieren. Bei diesen

Tab. 1: Beispiele für die unterschiedliche Ausbildung des hormonabhängigen Adenylatcyclasesystems zum Wassertransport in der Niere und bei kultivierten Sammelrohrzellen, die auf einer organspezifischen Unterlage und auf dem Boden einer Kulturschale gehalten wurden. Da bei beiden Zellkulturen wichtige Teile des Transportsystems nicht ausgebildet sind, eignen sie sich deshalb auch nicht für Experimente zum Wassertransport.

Vasopressin bewirkt	Principal Cells in der Niere	SR-Primärkulturen auf Capsula fibrosa	SR-Primärkulturen auf Plastik
Aggrephorenbildung	+	+	-
aktive Adenylatcyclase	+	+	-
Rezeptorkopplung mit der Adenylatcyclase	+	-	-

SR: Sammelrohr



Zellen wird nämlich die regulatorische Untereinheit eines den Wassertransport stimulierenden Enzyms, der Adenylatcyclase, nicht mehr funktionsfähig ausgebildet (Minuth et al., 1986).

*Spezielle Antikörper als Erkennungsmarker differenzierter Sammelrohrzellen:* Die Ausbildung von spezifischen Eigenschaften einer Zelle ist zwangsläufig mit der Bildung von zelltypischen Proteinen gekoppelt. Mit dem Wissen, daß kultivierte Zellen in Kultur ganz typische Eigenschaften verlieren können, begannen wir die Suche nach Markerproteinen, mit denen die Qualität von kultivierten Zellen bestimmt werden kann (Tab. 2). Wir entwickelten Antikörper als Erkennungssonden für Sammelrohrzellen in der Kaninchenniere und für kultivierte Zellen. Überraschenderweise fanden sich bei Zellen, die auf dem Boden einer Kulturschale gehalten wurden, im Vergleich zu Zellen aus der Niere viel mehr Ungleichheiten als Ähnlichkeiten. Bei Sammelrohrzellen, die auf einem Kulturschalenboden wuchsen, konnten nämlich nur in Einzelfällen typische Proteine festgestellt werden. Damit zeigen diese Zellen keine Ähnlichkeit mehr zu den Zellen aus der Niere. Eine viel bessere Qualität besteht

Tab. 2: Die Ausbildung von spezifischen Sammelrohrproteinen kann immunhistochemisch mit Antikörpern nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, daß kultivierte Zellen auf dem Boden einer Kulturschale spezifische Proteine nicht bilden. Werden die Zellen jedoch auf der organspezifischen Capsula fibrosa kultiviert, wird die Mehrzahl der SR-Proteine gebildet. Diese Befunde unterstreichen die Wichtigkeit einer geeigneten Zellunterlage für die Ausbildung spezifischer Funktionen.

Protein	kDa	AK	Sammelrohrzellen in der Niere	SR-Primärkultur auf Capsula fibrosa	SR-Primärkultur auf Plastik
GPCD 1	150	pk	+	+	+
GPCD 2	85	pk	+	+	-
PCD 1	190	mk	+	-	-
PCD 2	210	mk	+	+	-
PCD 3	45	mk	+	+	-
PCD 4	40	mk	+	+	-
PCD 7	57	mk	+	+	(o)
PCD 9	39	mk	+	+	(o)

(+) vorhanden; (-) nicht vorhanden; (o) nicht überprüft

SR: Sammelrohr; Molekulargewicht (kDa); Polyklonaler (pk), Monoklonaler (mk) Antikörper (AK)

dagegen bei Sammelrohrzellen, die auf der nierenspezifischen Unterlage kultiviert wurden. In der Mehrzahl aller Fälle konnte hier eine mit der Niere vergleichbare Proteinausbildung gezeigt werden.

*Organotypische Umgebung verbessert die Qualität von Kulturen:* Bei den bisherigen Versuchen befanden sich die kultivierten Zellen über Tage in dem gleichen Medium. Unter diesen statischen Bedingungen konnten wir nur Principal Cells, jedoch keine funktionsfähigen Intercalated Cells für die Regulation des Säure/Base Gleichgewichts kultivieren. Da wir wieder einmal an die Grenzen des Möglichen der Zellkulturtechnik gestoßen waren, suchten wir nach einem völlig neuen Konzept, mit dem Zellen unter möglichst organähnlichen Bedingungen gehalten werden konnten und mit dem auch eine verbesserte Differenzierung, also eine verbesserte Qualität zu erreichen war. Um den natürlichen Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurde ein Zellkultursystem entwickelt, das folgende Anforderung erfüllt (Abb. 2; Minuth et al., 1992; Minuth et al., 1993):

1. Die Zellen werden auf einer spezifischen Unterlage kultiviert.
2. Das Kulturmedium wird permanent ausgetauscht (Abb. 2a).
3. Die Applikation unterschiedlicher Medien von oben und unten ist möglich (Abb. 2b).

Anhand immunhistochemischer und elektronenmikroskopischer Befunde zeigte sich, daß mit dem neuen Kultursystem bei einer kontinuierlichen Nährstoffversorgung gleiche Differenzierungseigenschaften der Zellen gefunden wurden, wie sie von der Niere her bekannt sind (Aigner et al., 1994).

Bei unseren derzeitigen und zukünftigen Forschungsarbeiten mit kultivierten Zellen bemühen wir uns, das funktionelle Konzept der Niere zu übernehmen. Da Epithelzellen immer an einer Grenzfläche vorkommen, sind sie von der oberen Seite ganz anderen Milieubedingungen ausgesetzt als auf der unteren Seite. Epithelien der Niere z. B. bilden in diesem Gradienten eine Barriere zwischen dem Urinraum und dem Blutraum aus. Genau diese Bedingungen möchten wir nun in unseren weiteren Experimenten mit den kultivierten Sammelrohrrephelien simulieren. Dazu werden in einer speziellen Gradientenperfusionskammer (Abb. 2b) an den Epithelien während der gesamten Kulturzeit von oben und unten ganz unterschiedliche Medien vorbeigeströmt. Verschiedene Umgebungseinflüsse, z.B. das Ionenmilieu oder ein variierender pH, haben eine sehr große Wirkung auf die Ausbildung von spezifischen Zelleigenschaften (Pfaller et al., 1992). Gerade weil es so viele beeinflussende Faktoren für die Zelldifferenzierung gibt, ist es ein sehr wichtiges Ziel, möglichst organotypische Versuchsbedingungen zu erzeugen, die der natürlichen Lebenssituation einer Zelle besonders nahe kommen. Wichtig ist dabei zu lernen, den gegenwärtig noch labilen Zustand von Zellkulturen in funktionell stabilisierte Systeme zu über-

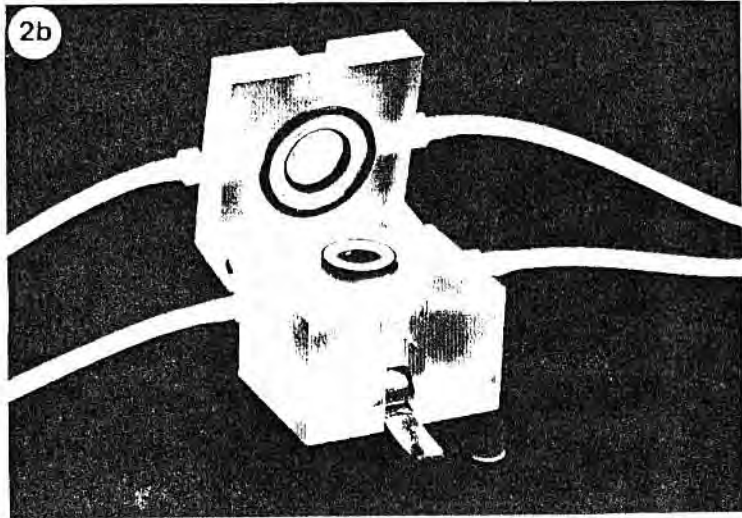
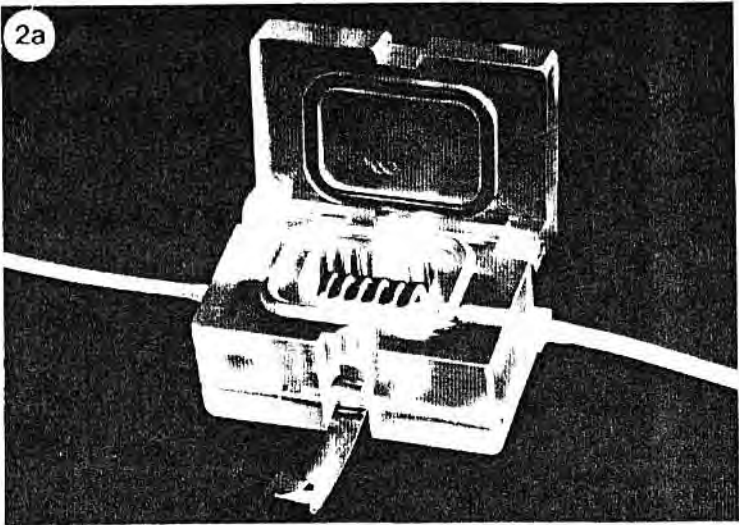


Abb. 2: Neu entwickelte Zellkulturkammern, mit denen die Zellkulturen permanent wie unter natürlichen Bedingungen mit frischem Medium versorgt werden können. a) In der Perfusionskammer werden die Zellträger ober- und unterhalb mit dem gleichen Kultivationsmedium versorgt. b) In der Gradientenperfusionskammer werden die Zellen wie in der Niere von oben und unten mit ganz unterschiedlichen Medien durchströmt.

führen. Erst mit solchen Kultursystemen, die dann aus menschlichen Zellen gewonnen werden, wird es möglich sein, pharmakologische sowie toxikologische Versuche durchzuführen, die sich unmittelbar auch auf uns Menschen übertragen lassen.

## Anmerkungen

Die Forschungsarbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Mi 331/2-5) unterstützt. Die Entwicklung des neuen Zellkultursystems erhielt 1992 den Philip Morris Forschungspreis Herausforderung Zukunft. Das System ist zu beziehen über MINUCCELLS and MINUTISSUE Vertriebs GmbH, Starenstr. 2, D-93077 Bad Abbach. Die detaillierte Literaturliste zum Thema erhalten Sie nach Anfrage vom Erstautor.