



Aggregat-Zellkulturen

Paul Honegger
Institut de Physiologie, Université de Lausanne
CH-1005 Lausanne

Zusammenfassung

Aggregat-Zellkulturen sind Primär-Zellkulturen, die aus 15 Tage alten Ratten-Embryonen stammen. In Rotations-Kultur, unter streng kontrollierten Bedingungen gehalten, können sich diese isolierten Zellen wieder spontan vereinigen und eine grosse Zahl praktisch identischer Aggregate bilden, in denen sie sich dank direkter Zell-Zell-Wechselwirkungen zu hochdifferenzierten organotypischen Strukturen entwickeln. Aggregat-Kulturen können heute sowohl von Hirnzellen als auch von Leberzellen mit relativ einfachen Mitteln hergestellt werden. Da diese Kulturen in chemisch definierten Nährmedien gedeihen und während ihrer Reifung eine Reihe wichtiger Prozesse der Organogenese durchlaufen, eignen sie sich vorzüglich für entwicklungsbiologische Studien. Darüberhinaus könnten Aggregat-Kulturen aber auch für Routine-Tests, beispielsweise in der Toxikologie verwendet werden. Letztere Möglichkeit scheint besonders vielversprechend als Beitrag zur Reduktion von Tierversuchen.

Summary

Aggregate cultures are primary cell cultures prepared from dissociated fetal cells. In rotation-mediated culture under rigorously controlled conditions, the isolated cells are able to reaggregate spontaneously, and to form a large number of practically identical spheres. The three-dimensional cell structure in each aggregate provides a maximum of cell-cell interactions, and thus enables the cells to rearrange and to develop in an organotypic fashion. Relatively simple techniques are now available which permit the preparation of aggregate cultures from fetal brain and liver cells. Since they can be grown in a chemically defined medium, and because they mimic several morphogenetic events occurring *in vivo*, these cultures offer a unique model for developmental studies. Moreover, they may be used as well for routine testing, for example for screening purposes in toxicology, and thus contribute to the reduction of animal experiments.

Einleitung

Zellkulturen gelten allgemein als die vielversprechendste Alternative zu Tierversuchen. Tatsächlich werden sie in der biologischen Grundlagenforschung immer häufiger und immer effizienter als Hilfsmittel und Studienobjekte eingesetzt. Doch gerade wegen dieser zunehmenden Popularität von Zellkultur-Methoden muss vermehrt darauf hingewiesen werden, dass jedes *in vitro*-Modell immer nur eine Facette der komplexen Funktionen eines ganzen Organismus widerspiegeln kann. Sollen Zellkulturen für eine bestimmte Fragestellung erfolgreich eingesetzt werden, muss deshalb immer zuerst das dafür am besten geeignete Zellkultur-Modell eruiert werden.

Von den heute zur Verfügung stehenden Zellkultur-Systemen werden *Zell-Linien* weitaus am häufigsten verwendet. Diese Kulturen bestehen aus praktisch identischen Einzelzellen, die dank ihrer unbegrenzten Teilungsfähigkeit dauernd weitergezüchtet werden können. Sie eignen sich vor allem für Untersuchungen auf zellulärer und molekularer Ebene, weisen aber infolge ihres transformierten Charakters (Ähnlichkeit mit Krebszellen) in vielen Aspekten ein von normalen Zellen abweichendes Verhalten auf.

Zellen, die sich in Kultur weitgehend zellspezifisch verhalten, d.h. sowohl morphologisch als auch metabolisch einen ganz bestimmten Zelltyp repräsentieren, müssen zur Züchtung immer wieder neu aus dem entsprechenden Organgewebe isoliert werden, da sie *in vitro* (wie übrigens auch *in vivo*) nur eine beschränkte Lebensdauer haben. Solche *Primär-Zellkulturen* werden heute noch vorwiegend in Form eines einschichtigen Zell-Rasens ("Monolayer") gehalten, was den Vorteil hat, dass jede einzelne Zelle in Kultur während eines Experimentes zugänglich und identifizierbar bleibt. Andererseits bewirkt diese dissoziierte Züchtungsweise jedoch eine empfindliche Einschränkung der für jedes Gewebe wichtigen interzellulären Kommunikation. Deshalb erwiesen sich auch solche einschichtigen ("zweidimensionalen") Primär-Zellkulturen ungeeignet zum Studium organspezifischer Funktionen.

Weitgehend intakte Zell-Zell-Wechselwirkungen können offenbar nur in

dreidimensionalen Zell-Systemen erreicht werden. Zellkulturen, welche solchen Anforderungen gerecht werden können, wurden in den 60er-Jahren von A. Moscona eingeführt (1). Dieser konnte nämlich beobachten, dass vor allem undifferenzierte Zellen imstande sind, sich nach vollständiger Dissoziation wieder spontan zusammenzuklumpen und innerhalb weniger Wochen in Kultur hochdifferenzierte organotypische Strukturen zu bilden. Solche Aggregat-Zellkulturen wurden vorerst ausschliesslich für morphologische Untersuchungen benutzt. Später wurden sie dann auch für biochemische Studien eingesetzt (2).

Wesentliche technische Verbesserungen (3) sowie die Verwendung eines chemisch definierten Mediums (4) ermöglichten es schliesslich, dieses Zellkultur-System sowohl für die verschiedensten Probleme der Grundlagenforschung als auch für Routineuntersuchungen einzusetzen. Die bisher gesammelten Erfahrungen lassen den Schluss zu, dass dieses *in vitro*-System, gerade wegen seiner organotypischen Eigenschaften, eine echte Alternative für viele der heute noch üblichen Tierversuche bieten kann.

Aggregat-Kulturen aus Hirnzellen

Eingehende Untersuchungen mit Hirnzellen in Aggregat-Kultur (5) haben unter anderem gezeigt, dass sich nur relativ undifferenzierte Zellen zur Herstellung solcher Kulturen eignen. Andererseits steigt aber die Zellzahl, und mit ihr auch die Zell-Ausbeute, parallel zur fortschreitenden Organentwicklung. Um beide Parameter bestmöglichst zu berücksichtigen, wird beispielsweise bei der Ratte das frühe Fetalstadium für die Gewinnung der Hirnzellen bevorzugt. Zur Herstellung einer Suspension lebensfähiger Hirnzellen wird das fetale Hirngewebe einfach durch verschiedene Nylongewebe definierter Maschenweiten gesiebt. Nach vollständiger Dissoziation werden die Zellen dann in ein chemisch definiertes Nährmedium gebracht, wo sie spontan wieder aggregieren. Um einerseits den Prozess der Aggregation genauestens kontrollieren zu können, und andererseits ein späteres Zusammenwachsen, bzw. Anwachsen der Aggregate zu verhindern, werden die



Kulturen bei einer genau definierten Schüttelfrequenz in steter Rotations-Bewegung gehalten. Auf diese Weise kann eine Vielzahl praktisch identischer Kulturen erzeugt werden, wobei jedes Kulturgefäss nahezu die gleiche Anzahl kugelförmiger Zellaggregate von praktisch gleichem Durchmesser enthält.

Die in den Aggregaten sich abspielenden Reifungsprozesse können sowohl morphologisch (durch Untersuchung histologischer Schnitte, unter Zuhilfenahme von Licht- und Elektronenmikroskop) als auch biochemisch (z.B. durch Aktivitätsmessungen von zelltyp-spezifischen Leitenzymen und durch Bestimmung der Zellteilungsrate) verfolgt werden. Solche Studien haben gezeigt, dass die fetalen Hirnzellen sich nach erfolgter Assoziierung auch innerhalb der Zellaggregate weiter organisieren können: In den ersten zwei Wochen in Kultur vermehren sich vorwiegend noch die Gliazellen (z.B. Astrozyten und Oligodendrozyten) durch eine Reihe von Zellteilungen, während die meisten Neuronen dann schon im post-mitotischen Reifungsprozess stehen. Nach weiteren 3-4 Wochen fortschreitender Zellreifung erreichen die Kulturen dann ihren höchsten Differenzierungsgrad, den sie noch über Monate hinaus beibehalten können. In diesem Reifestadium findet man in den Aggregaten eine Gewebestruktur vor, die sehr grosse Ähnlichkeit mit jener eines ausgewachsenen Gehirns *in vivo* hat. Insbesondere können die charakteristischen interzellulären Kontaktstellen in relativ grosser Zahl nachgewiesen werden (z.B. Synapsen zwischen verschiedenen Neuronen, oder die von Oligodendrozyten gebildeten Markscheiden um Neuronen-Axone). Anhand biochemischer und elektrophysiologischer Kriterien kann weiter gezeigt werden, dass diese Kulturen nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell einen sehr hohen Entwicklungsgrad erreichen.

Normalerweise sind in diesen Kulturen alle Zelltypen vertreten, die im entsprechenden Hirngewebe *in vivo* vorkommen. Für besondere Fragestellungen kann es jedoch von Interesse sein, die Zell-Zusammensetzung der Kulturen zu ändern. So ist es beispielsweise möglich, durch eine gezielte Behandlung mit Cholera-Toxin praktisch alle Neuronen zu entfernen, und somit fast reine Glia-Zellaggregate zu erhalten. Umgekehrt können aber auch Aggregate aus



vorwiegend neuronalen Zellen hergestellt werden, wenn die Kulturen im Frühstadium mit gewissen Zytostatika (z.B. Zytosin-Arabinosid) behandelt werden. Ferner können auch mittels gezielter Immunreaktionen (durch Zugabe zelltypspezifischer Antikörper zusammen mit Komplementfaktoren) bestimmte Zelltypen selektiv aus den Kulturen eliminiert werden.

Aggregat-Kulturen aus Leberzellen

Von den verschiedenen in der Leber vorkommenden Zelltypen machen die Hepatozyten den weitaus grössten Anteil aus. Diese Zellen gelten auch heute noch als recht problematisch für die Kultivierung, da sie *in vitro* sehr rasch ihre gewebespezifischen Eigenschaften verlieren. Verschiedene Beobachtungen deuten darauf hin, dass Hepatozyten besonders stark von einer funktionierenden interzellulären Kommunikation abhängig sind. Tatsächlich konnten wir durch eine Verbesserung der Zell-Zell-Wechselwirkungen wesentlich günstigere Kulturbedingungen für Hepatozyten erzielen. So gelang es beispielsweise, die Lebensdauer differenzierter Leberzellen *in vitro* beträchtlich zu verlängern, indem diese Zellen auf einer Schicht von Epithelzellen gehalten wurden.

Da dreidimensionale Zellkulturen nahezu optimale Zellkontakte gewähren, schien es deshalb naheliegend, Leberzellen analog zu Hirnzellen in Aggregat-Kultur zu züchten. Dies gelang dann auch nach einigen Modifikationen der ursprünglichen Methode (6). Das zur Herstellung der Kulturen erforderliche Lebergewebe kann dabei gleichzeitig mit dem Hirngewebe aus denselben fetalen Ratten isoliert werden. Im Gegensatz zum Hirngewebe, das mittels eines einfachen Siebverfahrens dissoziiert wird, muss das Lebergewebe jedoch mit Hilfe von Verdauungsenzymen (z.B. Trypsin) fraktioniert werden. Die dissoziierten Leberzellen werden dann in ein leicht modifiziertes, chemisch definiertes Nährmedium gebracht, wo sie in Rotationskultur spontan eine Vielzahl kleiner, regelmässiger Zellaggregate bilden.

Die morphologische Analyse solcher Kulturen zeigt, dass, anders als bei Aggregaten aus Hirnzellen, Leber-Zellaggregate aussen von einer zusammenhängenden Zellschicht (von einer Art Epithelzellen gebildet) umgeben sind. Im Innern der



Aggregate findet man dann die verschiedenen anderen Leberzellen, vor allem die zahlenmässig stärkste Gruppe der Hepatozyten. Diese Zellen entwickeln in den Aggregaten die ihnen eigene Morphologie und bilden zusammen mit anderen Hepatozyten gewebespezifische Strukturen. Neben morphologischen Kriterien zeigen auch biochemische Untersuchungen, dass sich die Hepatozyten in Aggregat-Kultur organotypisch verhalten. Beispielsweise wird das für Hepatozyten charakteristische Enzym, Tyrosin-Transferase, wie in vivo mit zunehmender Zellreifung vermehrt exprimiert, während ein typisch fetaler Marker der Hepatozyten, das Alpha-Fetoprotein, gerade ein entgegengesetztes Verhalten zeigt.

Im Gegensatz zu Aggregaten aus Hirnzellen können Leber-Zellaggregate nur für eine relativ kurze Zeit in Kultur gehalten werden (maximal 3-4 Wochen). Möglicherweise behindert die umgebende Epithelschicht den Stoff- und Gasaustausch zwischen dem Nährmedium und den Zellen im Innern der Aggregate, und schränkt so die Lebensfähigkeit dieser Zellen ein.

Verwendung von Aggregat-Zellkulturen

Dank dem Umstand, dass Aggregat-Zellkulturen in der Regel aus undifferenzierten Zellen hergestellt werden, und weil diese Zellen in vitro noch die Möglichkeit haben, sich in organspezifischer Weise zu reorganisieren und zu differenzieren, eignen sich diese Kulturen vorzüglich für entwicklungsbiologische Studien. Aggregat-Kulturen aus Hirnzellen beispielsweise durchlaufen eine ganze Reihe wichtiger morphogenetischer Prozesse, die sich auch während der normalen Hirnentwicklung abspielen (etwa die Zellvermehrung, die Synapsenbildung und die Markscheidenbildung). Daher können am gleichen Modell Vorgänge studiert werden, die sich während verschiedener Entwicklungsstadien abspielen. Alle diese Reifungsprozesse werden durch Zell-Zell-Wechselwirkungen gesteuert oder zumindest beeinflusst. Dabei können sowohl direkte Zellkontakte als auch der Austausch von Botenstoffen zwischen verschiedenen Zellen eine wichtige Rolle spielen. Dank der natürlichen Zellkontakte, die sich im dreidimensionalen Zellverband der Aggregat-Kulturen abspielen, können diese Vorgänge anhand dieses Modells bis auf die molekulare Ebene verfolgt werden. Zudem können auch noch die durch äussere Einflüsse (z.B.



durch Hormone) bewirkten Modifikationen der Entwicklungsprozesse studiert werden, da die Kulturen in einem chemisch genau definierten Nährmedium gehalten werden. Der Beitrag, den ein bestimmter Zelltyp während eines einzelnen Entwicklungsschrittes leistet, kann durch Veränderung der Zellzusammensetzung in diesen Kulturen untersucht werden. Beispielsweise kann der Einfluss von Gliazellen auf die Synapsenbildung durch zunehmende Reduktion der Glia-Zellpopulation studiert werden.

Neben den rein entwicklungsbiologischen Gesichtspunkten können mittels Aggregat-Zellkulturen auch pathologische oder toxikologische Fragestellungen angegangen werden. Besonders interessant im Hinblick auf eine Reduktion von Tierversuchen erscheint die Möglichkeit, dieses Kultur-System für toxikologische Routinetests, z.B. für das vorklinische Screening von potentiell toxischen oder teratogenen Substanzen einzusetzen. Dieser Aspekt wurde in den vergangenen drei Jahren im Rahmen eines nationalen Forschungsprogramms (NFP-17) näher untersucht. Dabei wurden die Wirkungen der verschiedensten Agenzien, vor allem aber von bekannten teratogenen Substanzen, auf die Entwicklung der Hirnzellen in Aggregat-Kultur untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie (7) dürfen als ermutigend bezeichnet werden. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass jede der untersuchten teratogenen Stoffklassen in sehr charakteristischer Weise die Zellreifung *in vitro* beeinflussen kann, und dass die Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit dieser Effekte im allgemeinen sehr gut mit publizierten Werten aus Beobachtungen *in vivo* übereinstimmt. Gegenüber anderen Testsystemen bieten Aggregat-Kulturen den weiteren Vorteil, dass die Wirkung toxischer oder teratogener Substanzen über eine relativ lange Entwicklungsperiode untersucht werden kann, und dass sehr selektive Effekte (z.B. eine Hemmung des Neuritenwachstums oder der Markscheidenbildung) erfasst werden können. Zusätzlich können neben Aggregaten aus Hirnzellen auch solche aus Leberzellen eingesetzt werden. Es besteht ferner die Möglichkeit, Co-Kulturen solcher Aggregate zu verwenden (indem separat gewachsene Aggregat-Kulturen aus Hirn- und Leberzellen in der gleichen Kulturflasche vereinigt werden), beispielsweise zur Untersuchung von Substanzen, die erst infolge einer metabolischen Modifikation in Leberzellen eine entwick-

lungsschädigende Aktivität erlangen.

Für Routineuntersuchungen ist es wichtig, dass die Tests unter möglichst standardisierten Bedingungen ausgeführt werden. Die bisherigen Erfahrungen zeigen, dass Aggregat-Zellkulturen in sehr hoher Masse reproduzierbare Resultate liefern. Dies vor allem deshalb, weil eine relativ grosse Zahl praktisch identischer Kulturen zur Verfügung steht. Für die statistische Auswertung der Versuche genügen in der Regel 3-4 Parallel-Kulturen pro Versuchsbedingung. Mit dem in jeder einzelnen Kultur zur Verfügung stehenden Material können eine ganze Reihe verschiedener Kriterien erfasst werden. Daher können beispielsweise mit einem einzigen Ansatz von 120 Kulturen Dosis-Wirkungs-Abhängigkeiten für über ein Duzend verschiedener Substanzen und für ebensoviele verschiedene Parameter ermittelt werden. Die Anzahl der dafür notwendigen trächtigen Ratten (zur Herstellung der Kulturen) würde dabei etwa 10% der Tiere ausmachen, die für eine vergleichbare Studie *in vivo* ihr Leben lassen müssten.

Literatur

- 1) Moscona, A. A. (1960): Patterns and mechanisms of tissue reconstruction from dissociated cells. In: Rudnick (ed.), *Developing Cell Systems and their Control*, pp. 45-70 (Ronald Press, New York).
- 2) Seeds, N.W. (1973): Differentiation of aggregating brain cell cultures. In: Sato (ed.), *Tissue Culture of the Nervous System*, pp. 35-53 (Plenum, New York).
- 3) Honegger, P.; Richelson, E. (1976): Biochemical differentiation of mechanically dissociated mammalian brain in aggregating cell culture. *Brain Research* 109:335-354.
- 4) Honegger, P.; Lenoir, D.; Favre, P. (1979): Growth and differentiation of aggregating fetal brain cells in a serum-free defined medium. *Nature* 282:305-308.
- 5) Honegger, P. (1985): Biochemical differentiation in serum-free aggregating brain cell cultures. In: Bottenstein and Sato (eds.), *Cell Culture in the Neurosciences*, pp. 223-243 (Plenum, New York).
- 6) Guigoz, Y.; Werffeli, P.; Favre, D.; Juillerat, M.; Wellinger, R.; Honegger, P. (1987): Aggregate cultures of foetal rat liver cells: development and maintenance of liver gene expression. *Biology of the Cell* 60:163-172.
- 7) Honegger, P.; Werffeli, P. (1988): Use of aggregating cell cultures for toxicological studies. *Experientia* 44:817-823.

ICH HALTE ES NICHT MEHR AUS! DAUERND
NÖRGEN MEINE HIRNZELLKULTUREN AN
MEINER STATISTIK HERUM!

