

Bioproduktion in dreidimensional wachsenden Zellkulturen

Professor Dr. D. F. Hülser, Dipl.-Biol. Irene Klünder
und Dipl.-Biol. Joachim Brenner
Universität Stuttgart
Biologisches Institut, Abt. Biophysik

Die biotechnologische Produktion von Substanzen wie t-PA, monoklonalen Antikörpern, Interleukinen, Wachstumsfaktoren, Interferonen und Hormonen sollte vorzugsweise mit Säugerzellen erfolgen, weil Bakterien diese Substanzen nicht in ihrer nativen Form herstellen können. Die dazu benötigten großen Mengen von Säugerzellen werden — je nach Zelltyp — in Monolayer- oder Suspensionskultur gezüchtet. Für Monolayerkulturen müssen große Oberflächen (Roller Bottles, Microcarrier) zur Verfügung gestellt werden, was viel Raum und Material beansprucht und somit kostenintensiv ist. In Suspension wachsen die Zellen voneinander isoliert, wodurch Zellkooperation unterbunden wird und interzellulärer Informationsaustausch nicht mehr möglich ist. Es gibt jedoch eine weitere Möglichkeit, Eukaryonten zu kultivieren, welche die Nachteile der beiden anderen Methoden aufhebt. Diese bisher vorwiegend in der Krebsforschung oder bei der Untersuchung von Regulationsmechanismen von Zellen verwendete Technik läßt die Zellen zu dreidimensional angeordneten kugelförmigen Zellaggregaten — den Multizell-Sphäroiden — heranwachsen (Abb. 1 und 2).

Die räumliche Anordnung der Zellen in Multizell-Sphäroiden führt zu einer funktionellen und strukturellen Heterogenität der Zellen. Dies wird dadurch deutlich, daß der Anteil nicht profilierender (G_0/G_1 -Phase) Zellen zum Innern des

Sphäroids bis auf 90 Prozent zu- und der Anteil der Zellen in der S- und G_2 -Phase entsprechend abnimmt. Verantwortlich für den unterschiedlichen Proliferationsstatus sind neben Gradienten von Nährstoffen, Wachstumsfaktoren, Hor-

monen, Sauerstoff und anderen metabolisch wirksamen Stoffen (Review Sutherland, 1988) auch interzelluläre Wechselwirkungen, die durch die dichtere Assoziation der Zellen im Sphäroid ähnlich wie *in vivo* wirksam werden. Es bildet sich dabei auch die extrazelluläre Matrix aus, die ein Mikromilieu definiert, welches die Proteinsynthese und -sekretion beeinflusst (Shinji et al., 1988; Review Vournakis et al., 1989). Die extrazelluläre Matrix ist also ein Wachstums- und Differenzierungsfaktor, der für die Bioproduktion nicht außer acht gelassen werden sollte. Erste Versuche zeigten, daß in Multizell-Sphäroiden von Rattenhepatozyten deutlich mehr Albumin produziert wird als in Monolayerkulturen der gleichen Zellen (T. Shinji et al., 1988).

In vergleichenden Messungen untersuchen wir zwei permanent wachsende Zelllinien auf ihre Produktionsraten unter den drei genannten Kulturbedingungen. Die beiden Zelllinien unterscheiden sich durch ihren Ursprung und ihren Differenzierungszustand. L-Zellen (W. R. Earle et al., 1943) sind ausdifferenzierte Mäusefibroblasten, die mit einem lacZ-Gen transfiziert wurden, das für die Produktion des gut nachweisbaren Stoffes β -Galactosidase verantwortlich ist. F9-Zellen (S. Strickland et al., 1980) sind embryonalen Ursprungs, die zu t-PA produzierenden Zellen differenziert werden können. L-Zellen können in Suspensions-, Mono-

layer- und Sphäroidkultur gehalten werden. Die β -Galactosidase dient uns als Modellprodukt, welches die Zelle nicht verläßt und auch nicht über interzelluläre Kanäle in Nachbarzellen gelangen kann. Sie ist für die Spaltung von Lactose in Glucose und Galactose verantwortlich. Zum Nachweis von β -Galactosidase werden die Zellen mit Fluorescein-di-galactosid beladen. In der Zelle wird durch die β -Galactosidase Fluorescein abgespalten, dessen Intensität der Aktivität der β -Galactosidase entspricht (Abb. 3). Somit kann die Aktivität jeder einzelnen Zelle durchflußzytometrisch ermittelt werden.

Bei den F9-Zellen handelt es sich um eine embryonale Karzinom-Zelllinie der Maus. Die Zelllinie wurde von einem testikulären Teratokarzinom abgeleitet und entspricht der „Inneren Zellmasse“ im Blastozystenstadium des Embryos. Die hochmalignen F9-Stammzellen werden mit sehr geringer spontaner Differenzierungsrate als permanent wachsende Monolayerkultur gezüchtet und können vorübergehend auch in Suspension gehalten werden, wo sie zu Multizell-Sphäroiden aggregieren. Undifferenzierte F9-Zellen bilden kein bzw. nur sehr wenig t-PA. Nach gezielter Differenzierung durch ein Derivat des Vitamins A (Retinsäure) und zyklisches Adenosinmonophosphat entstehen benigne Zellen, die ihr Äquivalent in den parietalen Endodermzellen des Mäuseembryos haben. Zu den physiologischen Aufgaben dieser ausdifferenzierten Zellen gehört die Bereitstellung des t-PAs. t-PA ist an der Fibrinolyse und an der Neugestaltung von Zellverbänden und Zellwanderungen beteiligt, in dem es die bestehende extrazelluläre Matrix zwischen den Zellen abbaut und so das Wachstum und die Ausdehnung des Embryos ermöglicht. t-PA wird aus den Zellen ausgeschleust und kann im Kulturüberstand photometrisch durch einen zweistufigen Enzymtest mit einem chromogenen Substrat nachgewiesen werden.

Jede der beiden Zelllinien repräsentiert eine der unterschiedlichen Ausgangsbedingungen, die man für die industrielle Bioproduktion mit Massenkulturen vorfindet. Transfizierte Zellen haben dabei den Vorteil, daß eine Zelllinie ausgewählt werden kann, die für die vorgesehenen Kultivierungsbedingungen am besten geeignet ist. Das erforderliche Gen kann zusammen mit einem zweckmäßigen Promotor und einem Markergen transfiziert werden, was den Nachweis des gewünschten Produkts über die Bestimmung des Markers als Biosensor erlaubt. Nicht transfizierte Zellen haben den Vorteil, daß die strengen Sicherheitsmaßnahmen im Laborbetrieb und komplizierte Genehmigungsverfahren entfallen, die für Produkte aus genetisch manipulierten Zellen gelten. Um die Kulturbedingungen den nichttransformierten Zellen

Abb. 1: Multizell-Sphäroid — nicht nur ein Modell für die Tumorforschung, sondern auch für die Bioproduktion. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, Sphäroiddurchmesser ca. 200 μ m

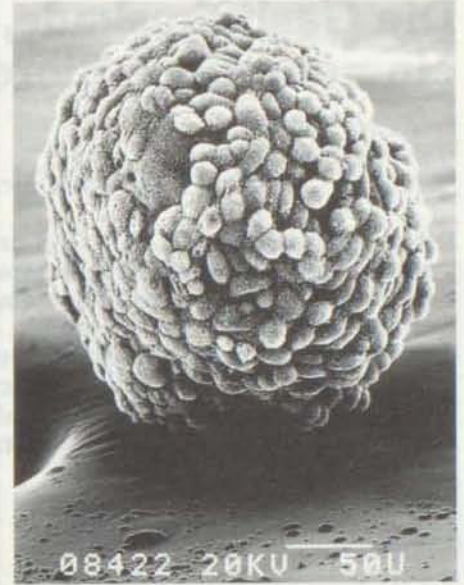


Abb. 2: Schnitt durch einen Multizell-Sphäroid von L-Zellen; HE-Färbung; Lichtmikroskopische Aufnahme, Sphäroiddurchmesser ca. 330 μ m

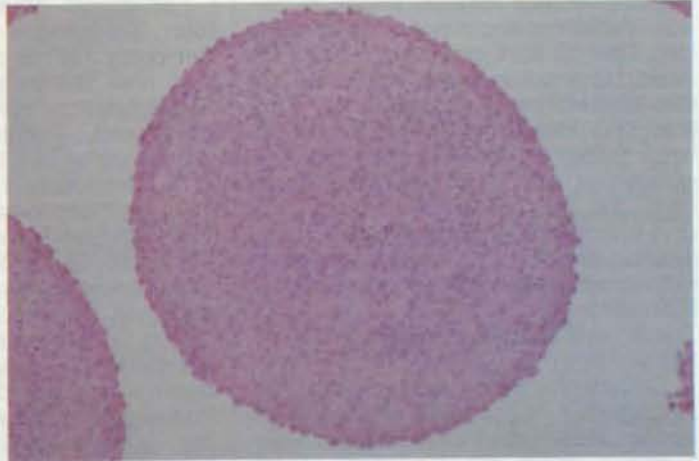
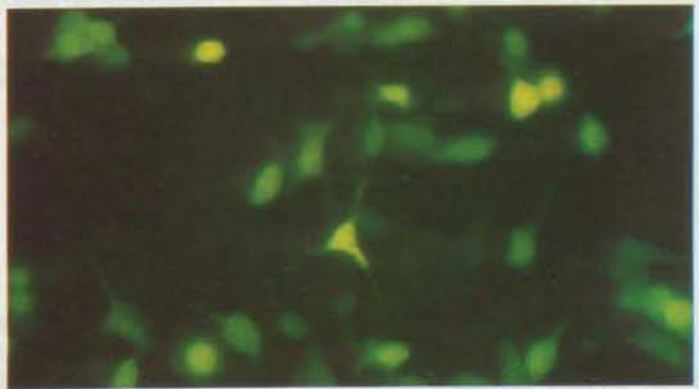


Abb. 3: Nachweis der β -Galactosidase Produktion in L-Zellen. Die Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die β -Galactosidase Aktivität. Auflichtfluoreszenz Aufnahme, Zelldurchmesser ca. 15 μ m



anzupassen, ist zwar ein größerer Aufwand erforderlich, er führt jedoch zu einer optimalen Produktion entsprechend der natürlichen Aufgabe der ausgewählten Zellen.

Wir danken Herrn Dr. Hansjörg Hauser (GBF Braunschweig) für die Überlassung der transfizierten L-Zellen.

Literatur

— Earle, W. R., Schilling, E. L., Stark, T. H., Straus, N. P., Brown, M. F. und Shelton, E.: Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 4, 165–212 (1943)

— Shinji, T., Koide, N. und Tsuji, T.: Glycosaminoglycans Partially Substitute for Proteoglycans in Spheroid Formation of Adult Rat Hepatocytes in Primary Culture. *Cell Structure and Function* 13, 179–188 (1988)

— Strickland, S., Smith, K. R. und Marotti, K. R.: Hormonal Induction of Differentiation in Teratocarcinoma Stem Cells: Generation of Parietal Endoderm by Retinoic Acid and Dibutyryl cAMP. *Cell* 21, 347–358 (1980)

— Sutherland, R. M.: Cell and Environment Interactions in Tumor Microregions: The Multicell Spheroid Model. *Science* 240, 117–256 (1988)

— Vournakis, J. N. und Runstadler, P. W.: Microenvironment: The Key to Improved Cell Culture Products. *Bio/Technology* 7, 143–145 (1989)