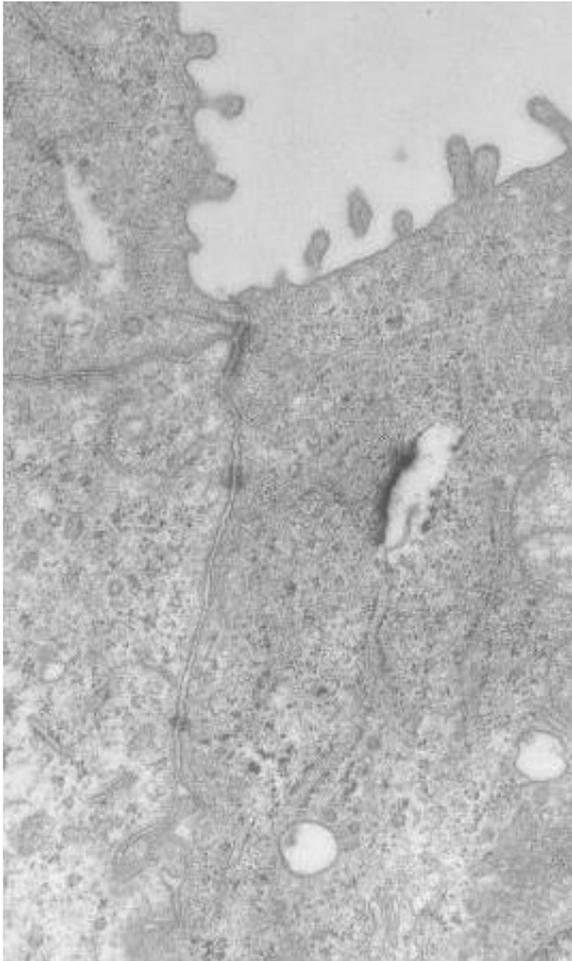


# Biotechnologie und Gesundheit

## Organoide Zellkulturen als Ersatz für Tierversuche

Ausgewählte Projekte angewandter Forschung in Baden-Württemberg



Materialien zur Unterrichtsgestaltung

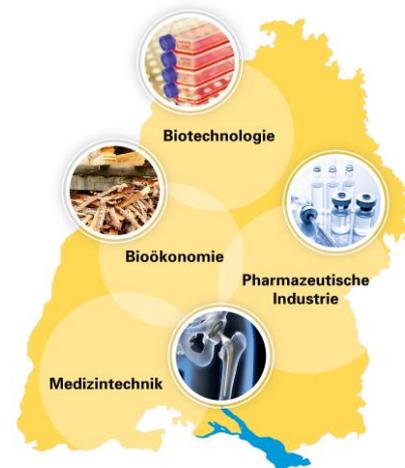


## Vorwort

Prof. Dr. Ralf Kindervater

Geschäftsführer der BIOPRO Baden-Württemberg GmbH

Mit der BIOPRO Baden-Württemberg GmbH steht seit 2002 eine vom Ministerium für Wirtschaft, Arbeit und Wohnungsbau und dem Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst gemeinsam getragene Landesgesellschaft zur Verfügung, die den Standort Baden-Württemberg national und international vertritt. Wir sind gestartet mit der Begleitung und Betreuung der Biotechnologie als Schlüsseltechnologie. Im Jahr 2013 erfolgte eine Erweiterung unserer Zuständigkeit: Die „neue“ BIOPRO ist der zentrale Ansprechpartner für die Gesundheitsindustrie mit den Branchen Medizintechnik, Pharmazeutische Industrie und Biotechnologie und unterstützt den Aufbau einer Bioökonomie im Land. Wir stellen die kürzesten Verbindungen her zwischen Forschungseinrichtungen, Unternehmen und Netzwerken und begleiten Gründer auf dem Weg in ihr eigenes Unternehmen. Unser Ziel ist es, mit unserem Fachwissen Baden-Württemberg als herausragenden Standort weiterzuentwickeln und ein optimales Klima für Innovationen zu schaffen. Wir bewirken mit unserer Arbeit aber auch sehr konkret, dass wissenschaftliche Erkenntnisse schneller den Weg in die Wirtschaft finden.



### Kräfte bündeln - Innovationen lenken

Baden-Württemberg ist ein starker Standort der Gesundheitsindustrie. Die zahlreichen Unternehmen der Medizintechnik, der Pharmazeutischen Industrie und der Biotechnologie bilden einen Kernbereich der baden-württembergischen Wirtschaft. Wir untermauern dies mit Daten und Fakten und tragen dazu bei, die führende Position des Landes national und international deutlich zu machen.

In einer Bioökonomie dienen nachwachsende Rohstoffe als Basis zum Beispiel für Chemikalien, Kunststoffe und Energie. Wichtige Verfahren zur Umsetzung von Biomasse in Zwischenprodukte kommen aus der Biotechnologie/Biologie. Wir sensibilisieren Unternehmen für die wirtschaftlichen Chancen in diesem Bereich und engagieren uns für die Etablierung einer Bioökonomie in Baden-Württemberg.

„Wenn Sie nicht über die Zukunft nachdenken, werden Sie keine haben“ lautet ein Sprichwort. Die Zukunft der Biotechnologie gründet sich auf motivierte und qualifizierte Nachwuchswissenschaftler. Daher engagiert sich die BIOPRO Baden-Württemberg aktiv auf dem Gebiet der Nachwuchsförderung. Damit eine solche Förderung und Wissensvermittlung erfolgreich ist, muss sie früh ansetzen. In Baden-Württemberg wird dies durch 31 Biotechnologische Gymnasien und eine Reihe von Initiativen im Umfeld der allgemeinbildenden Schulen gesichert. Seit 2008 werden die besten Absolventen im Profulfach Biotechnologie an den beruflichen Gymnasien biotechnologischer Richtung in Baden-Württemberg mit dem MTZ®-BIOPRO Schülerpreis ausgezeichnet.



**Gruppenfoto mit den MTZ® -Schülerpreisträgern 2016 und dem Vorstand der MTZ®stiftung (Foto: BIOPRO)**

Der Wissenszuwachs in Gesundheitsindustrie und Bioökonomie ist enorm und für Laien nicht immer verständlich. Daher übernehmen wir die Rolle eines Dolmetschers und bieten Übersichtsvorträge zu Innovationen aus Medizintechnik, Biotechnologie, pharmazeutischer Forschung und Bioökonomie für Schulklassen ab Klasse 9 an. Wir geben in unseren Vorträgen einen Einblick in ausgewählte Projekte aus der Forschung in Baden-Württemberg und zeigen anhand von Beispielen, welche Entwicklungen sich in den letzten Jahren ergeben haben. Mithilfe von Materialproben und Projektbeispielen wird den Schülern ein Eindruck vom Themengebiet vermittelt.

### **Materialien zur Unterrichtsgestaltung**

In den Unterrichtsmaterialien werden aktuelle Forschungsprojekte aus Baden-Württemberg für die Integration in den Unterricht aufbereitet. Der aktuelle Forschungsbezug im Bereich Biotechnologie und Gesundheit sowie Biotechnologie und Bioökonomie in Verknüpfung mit klassischen Unterrichtsthemen kann daher das Interesse der Schüler im Bereich NWT verstärken und vertiefen. Die Materialien zur Unterrichtsgestaltung werden zum Thema „Biokunststoffe“ sowie zu den Themen „Peripheres Nervensystem“ und „Ersatz für Tierversuche“ angeboten.



# Organoide Zellkulturen als Ersatz für Tierversuche

Margit Jost-Kant, neu bearbeitet durch Dr. Ariane Pott

## Inhaltsverzeichnis

<b>Tierversuche vermeiden.....</b>	<b>6</b>
<b>Aufbau und Funktion der menschlichen Haut .....</b>	<b>6</b>
<b>3D-Gewebemodell - Beispiel: Haut .....</b>	<b>7</b>
<b>Aufbau und Funktion des menschlichen Dünndarms.....</b>	<b>9</b>
<b>3D-Gewebemodell - Beispiel: Darm .....</b>	<b>10</b>
<b>Glossar .....</b>	<b>13</b>
<b>Literatur .....</b>	<b>15</b>
<b>Integration des Themas in den Unterricht.....</b>	<b>17</b>

# Organoide Zellkulturen als Ersatz für Tierversuche

Margit Jost-Kant, neu bearbeitet durch Dr. Ariane Pott

## Wie aus Zellen Zellsysteme werden und wie sie Tierversuche ersetzen können

### Tierversuche vermeiden

Im Juli 2013 ist die EU-Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere in Kraft getreten. Damit wurden die Anforderungen an den Tierschutz für Versuche mit oder an lebenden Tieren für wissenschaftliche Zwecke verschärft. Denn sie enthält den Grundsatz der Vermeidung, Verminderung und Verbesserung. In diesem verpflichten sich die EU-Mitgliedsstaaten, Tierversuche wenn möglich zu vermeiden, deren Anzahl zu verringern und die Methoden und Bedingungen, unter denen sie stattfinden, zu verbessern. Tierversuche werden für die Grundlagenforschung, aber auch für die angewandte Forschung, zum Beispiel für die Vorbeugung, Diagnose oder Behandlung von Krankheiten bei Mensch, Tier und Pflanze, eingesetzt.

Die Anzahl der Tierversuche lässt sich reduzieren, indem man zum Beispiel für Medikamententests neue Verfahren zur Wirksamkeitsüberprüfung des Medikaments entwickelt. Für die Anerkennung aber auch für die Entwicklung solcher alternativer Verfahren ist das **European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL ECVAM)** zuständig. Hier werden [In-vitro-Tests](#) als Alternative für Tierversuche geprüft und zugelassen.

Lange Zeit wurden auch Kosmetika in Tierversuchen getestet. Die im Juli 2013 in Kraft getretene EU-Verordnung für kosmetische Mittel (Nr. 1223/2009) verbietet die Durchführung von Tierversuchen in der Europäischen Union für Endprodukte sowie Bestandteile oder Kombinationen von Bestandteilen von kosmetischen Produkten. Weiterhin dürfen keine kosmetischen Erzeugnisse in der Europäischen Union

in Verkehr gebracht werden, deren endgültige Zusammensetzung durch Tierversuche festgelegt wurde.

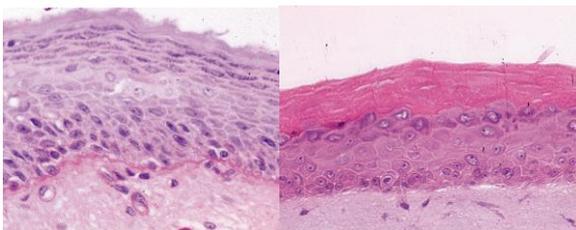
Es besteht daher ein zunehmender Bedarf für neue Testmöglichkeiten ohne den Einsatz von Tierversuchen. Anhand der Beispiele eines Haut- und eines Darmmodells wird erklärt, wie man mit Hilfe von Gewebemodellen die Anzahl von Tierversuchen reduzieren kann.

### Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die Haut gilt als unser größtes Organ, dessen Aufgaben zahlreich und vielfältig sind. So ist die Haut Sinnesorgan, bildet aber auch Schranke und Pforte für Stoffaufnahme und Stoffabgabe des Körpers. Sie ist der Ort verschiedenster Stoffwechselreaktionen und vermittelt Immunreaktionen.

Ihr äußerer Teil besteht aus einem mehrschichtigen Epithel, der Epidermis, die aus dem darunter liegenden Bindegewebe, der Dermis, durch Diffusion versorgt wird.

Zu den Zellen der **Epidermis** (Oberhaut) gehören vorwiegend [Keratinocyten](#) sowie die sogenannten dendritischen Zellen, wie Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen. Die Epidermis besteht aus vier „Schichten“ (siehe Tab. 1): Die Keratinocyten der Epidermis besitzen ein Zytoskelett aus Keratin, wobei man unterschiedliche Typen von Keratin von innen nach außen findet. Die über zahlreiche Desmosomen miteinander verbundenen Keratinocyten durchwandern während ihrer Lebensdauer die Schichten der Epidermis von innen nach außen. In der äußersten Schicht kapseln sie sich schließlich ab, produzieren Lipide, die durch die Zellmembran nach außen abgegeben werden, und bilden Serinproteasen, sodass die auf diese Weise entstandenen Hornschuppen sich laufend ablösen können. Zur Dermisseite gelegene Keratinocyten bleiben teilungsfähig und sind als adulte Stammzellen zu betrachten.



**Abbildung 1: Histologischer Schnitt einer humanen Haut (links) und eines dreidimensionalen Hautäquivalents mit Stratum corneum (rechts). (Foto: Fraunhofer IGB)**

**Tabelle 1:** Zellschichten der Epidermis. Stratum spinosum und Stratum basale werden gemeinsam als Stratum germinativum (Regenerationsschicht) bezeichnet.

Außen	<b>Hautschicht (Wissenschaftliche Bezeichnung)</b>	<b>Funktion</b>
	Hornschicht (Stratum corneum)	Verhornung, Hornzellen entstehen
	Hornbildungsschicht (auch Körnerschicht, Stratum granulosum)	Einlagerung von <a href="#">Keratohyalin</a>
	Stachelzellschicht (Stratum spinosum)	Verhornungsprozess der Zelle beginnt
	Basalzellschicht (Stratum basale)	Zellteilung, eine Tochterzelle wandert in die höheren Hautschichten
Innen		

Die **Dermis** besteht aus lockerem Bindegewebe. Die [Fibroblasten](#) sind in die faserverstärkte Grundsubstanz eingebettet. Sie regeln die Zusammensetzung der Grundsubstanz und produzieren die Bindegewebsfasern. In der Dermis befinden sich die Hautanhangsgebilde wie Haare, Nägel und Hautdrüsen. Zudem ist sie von Blutgefäßen und Lymphgefäßen durchzogen. Von hier aus werden die Epithelzellen mit Nährstoffen versorgt sowie die aus dem Epithel abgeschiedenen Abfallprodukte entsorgt. Dazu dienen die abführenden Blutkapillaren und Lymphgefäße. Weitere Zellen der Dermis vermitteln die Abwehr von Krankheitserregern oder Fremdstoffen wie beispielsweise Tätowierungstusche und sind am Prozess der Wundheilung beteiligt. Dermis und Epidermis sind durch die sogenannte Basalmembran getrennt beziehungsweise verbunden. Die Basalmembran besteht aus Mukopolysacchariden, in die sogenannte Gitterfasern, eine Art präkollagener Fasern, als netzartige Strukturen eingelagert sind.

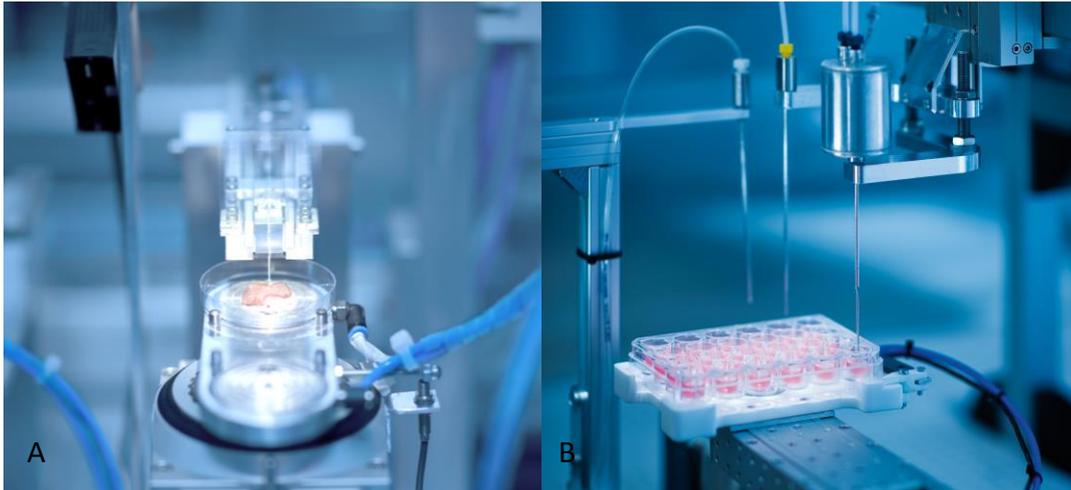
Epidermis und Dermis bilden zusammen die Haut. Wenn im Folgenden verschiedene Varianten des Hautersatzes erläutert und diskutiert werden, sollte man sich immer im Klaren darüber sein, dass eine komplette Haut eben aus diesen beiden Komponenten - Epidermis und Dermis - besteht und ein komplexes Wirkungsgefüge dieser beiden Anteile darstellt. Das Ganze wird außerdem dadurch verkompliziert, dass die Haut beständig erneuert wird.

### 3D-Gewebemodell - Beispiel: Haut

Das Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB aus Stuttgart verfügt über ein patentiertes dreidimensionales humanes Hautäquivalent (Patent-Nr. EP 1 290 145B1). Dieses 3D-Hautmodell ist für die Prüfung der Biokompatibilität von Medizinprodukten zertifiziert (DIN ISO 10993-5). Das Hautmodell ist zweischichtig aufgebaut und besteht aus Epidermis und Dermis, enthält jedoch keine Blutgefäße. Die Dermis des Modells besteht aus dermalen Fibroblasten, die in eine Biomatrix aus gewebetypischen Matrixproteinen, hauptsächlich Kollagen, eingebettet sind. Nach einer Kulturzeit werden Keratinozyten auf die Fibroblasten enthaltende Biomatrix gesät. Die Keratinozyten differenzieren während einer mehrtägigen Kultur und eine mehrschichtige Epidermisschicht bildet sich aus. Fibroblasten sowie Keratinozyten werden durch eine Biopsie der menschlichen Haut gewonnen, sodass ein individuelles Hautäquivalent hergestellt werden kann (siehe Tab. 2). Das Hautmodell ermöglicht es, verschiedene Wechselwirkungen zwischen epidermalen und dermalen Zellen zu analysieren.

**Tabelle 2:** Prozessschritte beim Tissue Engineering

Prozessschritt	Beschreibung
Entnahme/Gewinnung der Primärzellen	Zum Beispiel Hautbiopsie und anschließende Vereinzelung der Zellen aus dem Gewebeverband
Vermehrung der Primärzellen im geeigneten Medium	Durchführung einer Zellkultur
Aussäen der Zellen auf einem geeigneten Träger	Die Art der verwendeten Matrix bestimmt, ob sich die Zellen flächig oder dreidimensional ausbreiten und hat auch Einfluss auf deren Differenzierung. Verwendet werden Kunststoffe, biologisch makromolekulare Stoffe wie <a href="#">Kollagen</a> , und Fibrin, <a href="#">Fütterzellen</a> (feeder layer)
Vermehrung der Zellen durch mitotische Teilung / Differenzierung der Zellen	Die Zusammensetzung der Kulturflüssigkeit orientiert sich an empirischen Untersuchungsergebnissen bzgl. der Elektrolyte, Hormone etc.



**Abbildung 2: Hautfabrik des Fraunhofer IGB. A: Zerkleinerung der Gewebeprobe, B: Kultivierung der 3D-Hautäquivalente (Foto: Fraunhofer IGB)**

Die Herstellung der künstlichen Haut ist zeitaufwendig und erfordert geschultes Personal. Ein Konsortium von vier Fraunhofer-Instituten (Fraunhofer IGB, Fraunhofer-Institut für Produktionstechnik und Automatisierung IPA, Fraunhofer-Institut für Produktionstechnologie IPT und Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI) hat daher die automatisierte Hautfabrik entwickelt. In einem ersten Prototyp wurde der Herstellungsprozess des oben aufgeführten patentierten Hautmodells auf eine automatisierte Anlage übertragen. Das Vollhautmodell kann dort in drei Wochen mit einem Gesamtdurchsatz von 15 Biopsien pro Tag hergestellt werden. Daraus ergeben sich 5.000 Hautäquivalente pro Monat. Die hohe Anzahl der hergestellten Hautäquivalente und die mit der Automatisierung einhergehende gleichbleibende Qualität ermöglichen es nun, das Hautmodell an vielen Stellen in der pharmazeutischen Forschung sowie der Kosmetikindustrie einzusetzen. So können Tierversuche reduziert und Kosmetika auf hoher Qualität getestet werden. Im Folgenden wird der Ablauf der Herstellung in der „Hautfabrik“ beschrieben.

In der in Module unterteilten Hautfabrik (siehe Abb. 2) werden die Zellen nach einer Biopsie aus dem Gewebe isoliert, so dass Fibroblasten und Keratinozyten gewonnen werden. Die Zellextraktion verläuft voll automatisiert. Im Anschluss werden Fibroblasten und Keratinozyten in der sterilen Anlage vermehrt. Dabei sind auch der Wechsel des Mediums sowie die Überprüfung der Bedingungen vollautomatisiert. Um ein voll funktionsfähiges 3D-Hautmodell zu gewinnen, müssen die Zellen im Anschluss auf einem Trägermaterial kultiviert werden. Hierzu werden die Fibroblasten für die Gewinnung der Dermis mit Kollagen kultiviert und im Anschluss die Keratinozyten auf die Dermissschicht aufgebracht, sodass in eigens für diese Vorrichtung entwickelten Zellkulturplatten die Haut-

äquivalente wachsen können (siehe Abb. 2B). Alle aufgeführten Schritte werden durch zahlreiche Sensoren kontrolliert. So können zum Beispiel Kontaminationen oder Schäden an den Hautschichten schnell festgestellt werden.

Damit ein In-vitro-Testsystem als Ersatz zu Tierversuchen von der zuständigen Behörde, dem ECVAM, akzeptiert wird, muss nachgewiesen werden, dass die toxikologischen Eigenschaften der Substanz mit dem Testverfahren ausreichend sensitiv, spezifisch und reproduzierbar untersucht werden können. Für diese Validierung wurde zunächst ein humanes Epidermismodell ausgewählt, für das das Fraunhofer-Projektconsortium innerhalb nur weniger Monate den automatisierten Herstellungsprozess etablieren konnte. Hierbei werden epidermale Zellen (Keratinozyten) isoliert, vermehrt und dann in die Kulturgefäße zum Aufbau einer korrekt strukturierten Epidermis überführt.

Das Hautmodell kann nun als Vorstufe für Tierversuche eingesetzt werden. Dabei kann zum Beispiel untersucht werden, wie sich die Testsubstanzen in den verschiedenen Hautschichten verteilen oder ob die Zellen durch die Substanz geschädigt werden. Das Hautäquivalent kann daher ebenfalls dafür eingesetzt werden, um die Unterstützung der Wundheilung durch eine Substanz zu prüfen. Das Modell kann auch um Tumorzellen erweitert werden und ermöglicht es so, gleichfalls die Wirkung von Substanzen auf Hautkrebs zu untersuchen. So können einzelne Schritte von Medikamententests am Hautmodell durchgeführt werden. Ganz ohne Tierversuche kommt man jedoch leider immer noch nicht aus. Allerdings wird mit diesen Vorversuchen die Anzahl der Tierversuche deutlich reduziert.

## Aufbau und Funktion des menschlichen Dünndarms

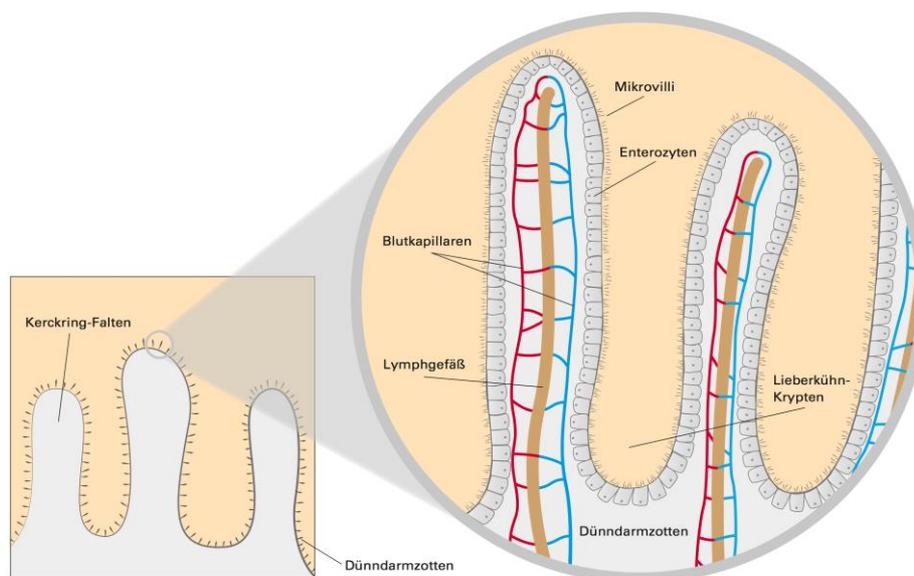
Der Darm ist Teil des Verdauungssystems. Nachdem die Nahrung beziehungsweise Flüssigkeit durch den Mund aufgenommen wurde, gelangt sie, teilweise schon zerkleinert, durch die Speiseröhre in den Magen. Tabelle 3 zeigt eine Auflistung der Organe des Verdauungssystems und deren Funktionen.

Der Hauptort des enzymatischen Abbaus ist der Dünndarm. Dank der Enzyme der Bauchspeicheldrüse werden Kohlenhydrate in Monosaccharide, Proteine zu Aminosäuren und Fette zur Fettsäuren und Glycerin gespalten. Für die Fettverdauung sind zudem die Gallensäuren unerlässlich. Und im Dünndarm werden die Nahrungsbestandteile resorbiert.

Der Dünndarm ist von außen mit dem Bauchfell umgeben. Das Bauchfell ist eine seröse Haut (Serosa), die als dünne epithelartige Schicht die Organe unterhalb des Zwerchfells umgibt. Das Bauchfell gibt die sogenannte [Peritonealflüssigkeit](#) ab, die dafür sorgt, dass die Organe aneinander vorbeigleiten können. Auch der Dünndarm ist von einer solchen Schicht umgeben. Von außen nach innen folgen Schichten glatter Muskulatur (Längs- und Ringmuskelschicht), die durch ihre Erschlaffung und Kontraktion den Darminhalt durchmischen, sowie der Submukosa, die durch mehrere 100 Falten (Kerkring-Falten) eine sehr große Oberfläche hat (siehe Abb. 3). Die Falten sind Ausfaltungen der Submukosa in das Darmlumen hinein und sind mit Dünndarmzotten besetzt. Bei den

Zotten handelt es sich um Ausstülpungen aus der Schleimhaut (Mukosa), die sich auf der Submukosa befindet. Das einschichtige Zottenepithel besteht aus Enterozyten (Saumzellen) und den schleimbildenden Becherzellen. Die Enterozyten bilden einen dem Darmlumen zugewandten Bürstensaum (Mikrovilli) aus. Sie resorbieren die im Darm befindlichen bioaktiven Stoffe, die im Anschluss in das Kapillarnetz der Dünndarmzotten und damit ins Blut gelangen. Die Enterozyten Epithelzellen des Dünndarms sind durch sogenannte [Tight Junctions](#) dicht verbunden. Tight Junctions sind Membranproteine, die eine Diffusionsbarriere bilden, so dass ein kontrollierter Transport der Nahrungsbestandteile möglich ist. Durch Falten, Zotten und Mikrovilli ist die Oberfläche des Dünndarms extrem vergrößert. Er kann eine Gesamtschleimhautoberfläche von über 120 m<sup>2</sup> besitzen, also etwa die Fläche von einem kleinen Einfamilienhaus.

Kohlenhydrate, Fette und Proteine werden an unterschiedlichen Orten des Verdauungssystems (siehe Tab. 3) aufgespalten und zerkleinert. Resorbiert werden sie jedoch gemeinsam im Dünndarm. Die nach der Spaltung der Fette entstandenen Mizellen gelangen durch passive Diffusion in die Dünndarmepithelzellen. Die Endprodukte der Kohlenhydratverdauung, die Monosaccharide, werden über aktive sowie passive Transportmechanismen in die Enterozyten aufgenommen. Für die Aminosäuren beziehungsweise die Di- und Tripeptide gibt es je nach Typ (neutrale, basische, saure Aminosäuren) spezifische aktive Transportsysteme.



**Abbildung 3: Ausschnitt aus dem Dünndarm. A: Auffaltung der Submukosa, B: Vergrößerung der etwa 1 mm hohen und 0,1 mm dicken Dünndarmzotten. Das Zottenepithel besteht aus Enterozyten und Becherzellen. Die Becherzellen sind in der Abbildung nicht dargestellt. (Foto: BIOPRO)**

**Tabelle 3:** Übersicht über das Verdauungssystem

Organ	Unterteilung	Funktion
Mundhöhle	Zähne, Lippen, Zunge, Speicheldrüsen	Mechanische Zerkleinerung, enzymatischer Verdau (Amylase) von Kohlenhydraten
Speiseröhre		Transport der Nahrung
Magen		Dient als Zwischenspeicher, HCl sterilisiert die Nahrung, Protein- und Fettverdauung
Dünndarm	Duodenum (Zwölffingerdarm), Jejunum, Ileum	Sekrete der Bauchspeicheldrüse und Gallenblase neutralisieren den Nahrungsbrei und ermöglichen enzymatische Fett-, Kohlenhydrat- und Proteinverdauung
Dickdarm	Mastdarm (Kolon), Enddarm (Rektum)	Wasserrückgewinnung, Größte Anzahl an Symbionten

Doch das Dünndarmepithel nimmt nicht nur Nährstoffe auf, sondern bildet gleichzeitig eine selektive Barriere. Dabei ist die Mukosa die erste zelluläre Barriere für die aus dem Darmlumen eindringenden Stoffe. Weiterhin sezernieren die sogenannten [Paneth-Zellen](#) antimikrobielle Proteine, sodass sich Mikroorganismen nicht in der unmittelbaren Nähe des Darmepithels ansiedeln können. Die für die Resorption der Nährstoffe zuständigen Enterozyten übernehmen im Dünndarmepithel die Rolle eines Wächters, denn nur Stoffe mit bestimmten Eigenschaften werden transportiert. Zwischen diesen Epithelzellen sind auch zahlreiche Lymphozyten zu finden. Ist die Darmbarriere nicht vollständig intakt, wie zum Beispiel bei entzündlichen Darmerkrankungen wie [Morbus Crohn](#) oder bei Infektionen mit beispielsweise [Salmonellen](#), so dringen Mikroorganismen in das tieferliegende Gewebe und den Blutkreislauf ein. Dadurch können schwere [Entzündungen](#) entstehen.

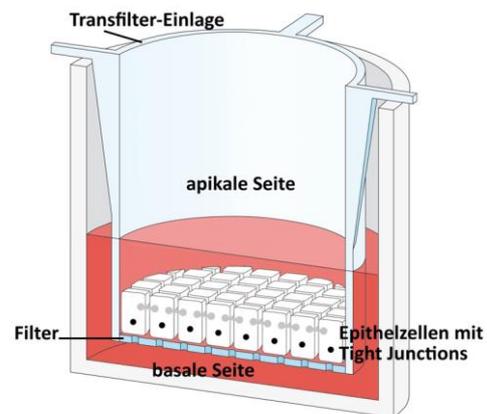
**3D-Gewebemodell - Beispiel: Darm**

Neben der Haut ist der Magen-Darm-Trakt der wichtigste Ort, an dem Medikamente in die Blutbahn aufgenommen werden. Für die Aufnahme von pharmazeutischen Wirkstoffen über den Dünndarm wird ergänzend zu Tierversuchen ein Modell mit sogenannten Caco-2-Zellen verwendet. Diese Zellen stammen ursprünglich aus einem menschlichen Kolon-

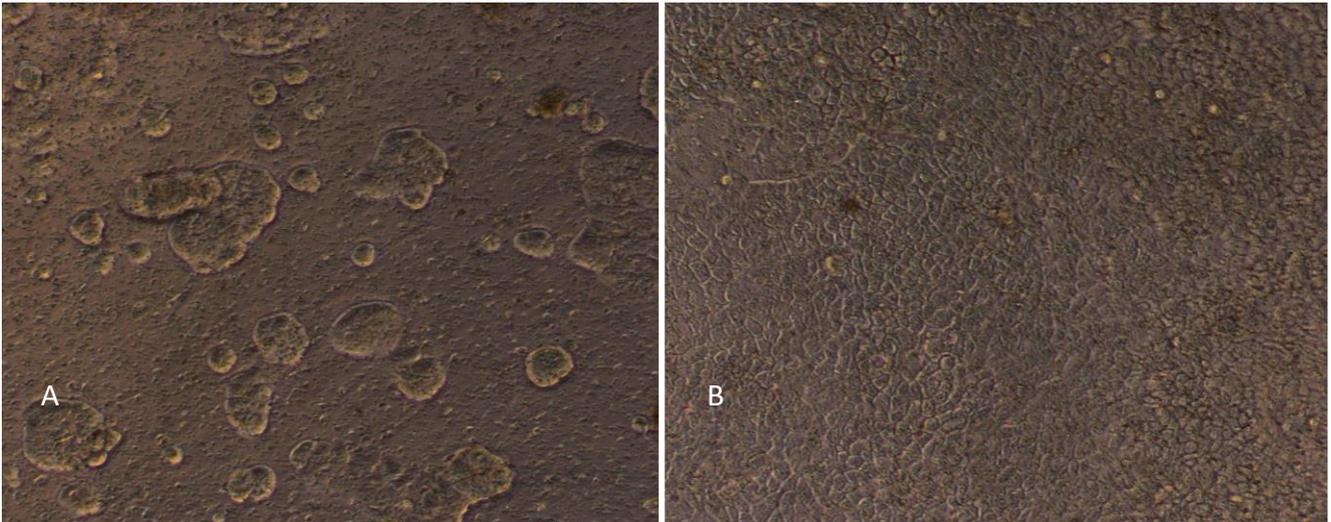
Adenokarzinom, also einer bestimmten Form von Dickdarmkrebs. Sie wurden Mitte der 1970-Jahre von US-amerikanischen Wissenschaftlern isoliert. Mit Caco-2-Modellen kann zum Beispiel die [Bioverfügbarkeit](#) von pharmazeutischen Wirkstoffen bestimmt werden. So ist die Caco-2-Zelllinie als In-vitro-Test für biopharmazeutische Untersuchungen der Bioverfügbarkeit und des Transports von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassen. Die Caco-2-Zellen gelten für Untersuchungen der Pharmakokinetik im Rahmen von sogenannten ADME-Untersuchungen (Adsorption, Distribution, Metabolism und Excretion) als validiertes und automatisiertes Testsystem. Caco-2-Zellen haben ähnliche morphologische und funktionelle Eigenschaften wie Enterozyten. Sie bilden Mikrovilli, Tight Junctions sowie zahlreiche Enzyme der Enterozyten aus. In der Regel werden sie als sogenannte Monolayer, also einer Ein-

Zell-Schicht, auf einer Oberfläche kultiviert (siehe Abb. 4).

Die Zellen werden auf [semipermeable](#) Filter ausgebracht, die sich in einer Mikrotiterplatte mit 24 kleinen Vertiefungen (ca. 2 ml Volumen, englisch: microwell plate) befinden. Dort vermehren sich die Zellen, bis sie 100 Prozent [Konfluenz](#) erreicht haben, also lückenlos die Kulturfläche bedecken (siehe Abb. 5). Sobald sie sich nicht mehr teilen können, beginnen sie sich zu differenzieren und bilden Tight Junctions mit den Nachbarzellen aus. Weiterhin werden die Mikrovilli auf der apikalen Seite und eine [extrazelluläre Matrix](#) auf der basalen Seite ausgebildet. Es dauert etwa



**Abbildung 4:** Zeichnung der Wanne aus der Mikrotiterplatte mit Zellen (Foto: Weiß)



**Abbildung 5: A: Caco-2-Zellen auf der Membran während des Bewachsens B: Caco-2-Zellen konfluent auf der Membran (Fotos: Weiß)**

sieben bis zehn Tage, bis die Zellen eine Barriere gebildet haben, die der des Dünndarms sehr ähnlich ist.

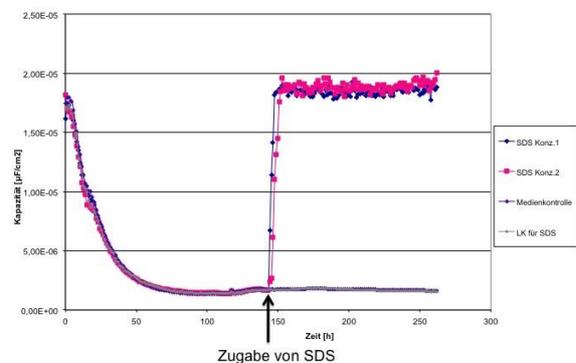
Um die Qualität der Zellen, wie zum Beispiel den Stand der Differenzierung und die Dichte des Zellwachstums zu bestimmen, wird auf eine elektrophysiologische Methode zurückgegriffen. Mit Hilfe bestimmter Elektroden wird entweder der transzelluläre elektrische Widerstand (TEER, Transepithelial Electrical Resistance) direkt gemessen, oder es wird die Impedanz, also der Wechselstromwiderstand der Zellen bestimmt. Mit Hilfe der Impedanzmessung werden der TEER sowie die Kapazität der Zellen mit dem Computer berechnet. Während der TEER Informationen über die Durchlässigkeit von Ionen liefert, können durch die Kapazität der Zellschicht Erkenntnisse über die Dichtigkeit der Zellschicht gewonnen werden.

Der Widerstand nimmt zunächst stetig zu. Wenn die Zellen zu 100 Prozent konfluent sind, also die Oberfläche zum größten Teil lückenlos bedecken, dauert es noch zwei bis drei Tage, bis sich die Tight Junctions vollständig ausgebildet haben. Der Widerstand erreicht zu diesem Zeitpunkt ein Plateau. Die Kapazität ist bei Zellen mit geringer Konfluenz zunächst hoch (siehe Abb. 6) und sinkt mit zunehmendem Zellwachstum.

Gibt man verschiedene Substanzen auf die Zellschicht, ändern sich der Widerstand und die Kapazität der Zellen. Die Wissenschaftler können so Informationen über den Transport der Stoffe durch die Zellen bekommen. Als Funktionskontrolle wird ein Detergens wie SDS (Natriumdodecylsulfat) verwendet. Wird SDS auf die Zellen gegeben, nimmt der Widerstand ab, da das Detergens die Tight Junctions und

die epitheliale Barriere zerstört. Die Kapazität nimmt nach Zugabe von SDS zu (siehe Abb. 6). Wie dieses Beispiel zeigt, kann mit Hilfe des Modells die Toxizität eines Stoffes geprüft werden. Je nach Art der Toxizität einer auf der apikalen Seite des Zellsystems aufgetragenen Substanz ändern sich die Kapazität und der Widerstand des Systems.

Wird das Modell verwendet, um den Transport einer Substanz, wie zum Beispiel eines Medikaments durch die Darmwand, zu prüfen, muss zunächst wie oben beschrieben untersucht werden, ob die Enterozytenschicht intakt ist. Die Messung des TEER und der Kapazität dient dabei der Qualitätskontrolle des Modellsystems. Hat der Widerstand einen bestimmten Wert erreicht, ist also entsprechend hoch, so gehen die prüfenden Behörden, wie zum Beispiel die FDA, davon aus, dass das differenzierte Epithel mit dem Dünndarmepithel vergleichbar ist. Um den Transport eines pharmazeutischen Stoffes zu untersuchen, wird dieser auf die apikale Seite des Systems aufgebracht. Ob ein Transport durch die Zellen stattgefunden hat,



**Abbildung 6: Kapazität in  $\mu\text{F}$  pro  $\text{cm}^2$  in Abhängigkeit von der Zeit in h. Es sind 2 SDS-Konzentrationen (blau und pink) sowie die Medienkontrolle (Zellen ohne SDS) und der Leerwert (nur SDS) aufgetragen. (Foto: Weiß)**

lässt sich über eine Konzentrationsmessung einer Probe der basalen Seite bestimmen. Die Berechnung des sogenannten Permeabilitätskoeffizienten ermöglicht es den Wissenschaftlern zu prüfen, wie hoch die Bioverfügbarkeit eines Medikaments ist. Ist die Konzentration des aufgetragenen Stoffes auf der basalen Seite hoch, so findet ein Transport durch die Enterozyten statt.

## Glossar

**Bioverfügbarkeit:** Die Bioverfügbarkeit gibt den prozentualen Anteil eines Wirkstoffes an, der nach Aufnahme in den Blutkreislauf in wirksamer Form zur Verfügung steht.

**Detergens:** Detergenzien sind amphiphile Moleküle, das heißt, sie weisen einen hydrophilen und einen hydrophoben Molekülteil auf. Sie sind grenzflächenaktiv und können Membranproteine lösen, indem sie Mizellen bilden.

**Entzündungsmediatoren:** Entzündungsmediatoren sind biochemische Substanzen, wie zum Beispiel Histamin, die die Entzündungsreaktion eines Gewebes einleiten oder aufrechterhalten.

**Extrazelluläre Matrix:** Die extrazelluläre Matrix ist aus Glykoproteinen, Proteinen (zum Beispiel Kollagen) und Polysacchariden aufgebaut und füllt bei tierischen Geweben die Räume zwischen den Zellen aus. Sie dient als Strukturelement und trägt unter anderem zur Elastizität von Haut, Lunge und Blutgefäßen bei.

**Fibroblasten:** Fibroblasten (Fibrozyten) sind sogenannte fixierte Bindegewebszellen. Als Teil des Bindegewebes produzieren sie die zwischenzelligen Substanzen. Dazu gehören die Grundsubstanz (interstitielle Flüssigkeit sowie unter anderem Glykoproteine) sowie die Bindegewebsfasern, wie zum Beispiel die Kollagenfasern.

**Fütterzellen:** Fütterzellen werden eingesetzt, um andere, besonders empfindliche oder anspruchsvolle Zellen zu kultivieren. Fütterzellen setzen Wachstumsfaktoren frei und bieten den eigentlich zu kultivierenden Zellen eine Wachstumsunterlage in Form einer intakten extrazellulären Matrix.

**Impedanz:** Unter Impedanz versteht man den elektrischen Widerstand eines Wechselstromkreises als komplexe Größe, zusammengesetzt aus dem Ohm-Widerstand und dem Blindwiderstand.

**In-vitro-Test:** In-vitro bedeutet „im Glas“ und bezeichnet einen organischen Prozess der außerhalb des Organismus stattfindet. Die Experimente finden also in einer künstlichen Umgebung wie zum Beispiel in einem Reagenzglas oder auf der Mikrotiterplatte, statt.

**Kapazität:** Die Kapazität eines Objekts ist das Verhältnis der zugeführten Ladungsmenge zur entstandenen Spannung. Die Kapazität bezeichnet die Fähigkeit eines Körpers Ladungen zu speichern.  $C$  (*Kapazität eines Körpers*) =  $\frac{Q \text{ (zugeführte Ladungsmenge)}}{U \text{ (entstandene Spannung)}}$ .  $U$  ist proportional zu  $Q$ . Die Kapazität ist damit ein Proportionalitätsfaktor.

**Keratinozyten:** Keratinozyten (Hornzellen) sind hornbildende Zellen in der Epidermis. Sie produzieren Keratin.

**Keratohyalin:** Keratohyalin ist ein Strukturprotein, das im Stratum granulosum der Epidermis vorkommt. Keratohyalin wird über Zwischenstufen in Keratine umgewandelt. Keratine, ebenfalls Strukturproteine, sind Teil des Verhornungsprozesses (Keratinisierung) der Haut. Keratine sind daher auch in großen Teilen in Haaren, Nägeln sowie Hufen und Hörnern enthalten.

**Kollagen:** Kollagen ist ein tierisches Faserprotein und wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix. Heute sind mehrere Kollagentypen bekannt. Alle Kollagene sind aus drei Polypep-

tidketten, welche häufig Glycin und Prolin als Bestandteil enthalten, aufgebaut. Kollagen kommt unter anderem in Haut, Sehnen, Knochen und Knorpel vor.

**Konfluenz:** Konfluenz bezeichnet die in der Zellkultur dichteste mögliche Anordnung von adherenten, also anheftenden Zellen als Monolayer (Ein-Zell-Schicht).

**Morbus Crohn:** Morbus Crohn ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung. Ursache und Entstehung der Krankheit sind bisher nicht geklärt, sie wird jedoch zu den Autoimmunkrankheiten gezählt. Neben genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen spielt die individuelle Zusammensetzung der Mikroorganismen im Darm eine Rolle.

**Ohmscher Widerstand:** Unter dem Ohmschen oder elektrischen Widerstand  $R$  versteht man das Verhältnis der Spannung  $U$  zur Stärke des Stroms  $I$ .  $R = \frac{U}{I}$ . In einem elektrischen Leiter verhält sich daher die Stromstärke direkt proportional zur Spannung.

**Paneth-Zellen:** Paneth-Zellen sind im Epithel der Dünndarmschleimhaut zu finden. Sie produzieren unter anderem Lysozym und Peptidasen.

**Peritonealflüssigkeit:** Die Peritonealflüssigkeit, auch seröse Flüssigkeit, ist die Flüssigkeit in der Bauchfellhöhle, die die Reibung der Organe verringert.

**Salmonellen:** Salmonellen sind stäbchenförmige Bakterien der Gattung Salmonella, die eine Magen-Darm-Entzündung hervorrufen.

**Semipermeabilität:** Semipermeabel bedeutet „halb durchlässig“. Eine semipermeable Membran ist nur für bestimmte Substanzen, Ionen oder Teilchen durchlässig. Das ist eine wichtige Eigenschaft von biologischen Membranen, zum Beispiel bezüglich des Stofftransportes.

**Tight Junctions:** Als Tight Junctions werden aus Membranproteinen bestehende Zellverbindungen bezeichnet. Sie kommen stets im apikalen Bereich zwischen zwei benachbarten Epithel- bzw. Endothelzellen vor. Tight Junctions haben eine Barrierefunktion und kontrollieren den Transport über das Epithel.

## Literatur

1. Steigleder GK. Dermatologie und Venerologie. Stuttgart: Thieme 1992.
2. Rennekampff HO, Hansbrough JF. Current Status of Cultured Epidermal Skin Substitutes. In: Horch RE, Munster AM, Achauer BM. Cultured Human Keratinocytes and Tissue Engineered Skin Substitutes. Stuttgart: Thieme 2001.
3. Haut aus der Fabrik. Presseinformation Fraunhofer-Gesellschaft 22.03.2011.
4. Schenke-Layland K, Walles H. Editorial: [Strategies in tissue engineering and regenerative medicine \(pages 278–279\)](#) Biotechnology Journal 2013; 8: 278-9.
5. Automated Tissue Engineering on Demand – The Tissue Factory. [http://www.tissue-factory.com/content/dam/tissue-factory/en/documents/Tissue\\_Engineering\\_2012.pdf](http://www.tissue-factory.com/content/dam/tissue-factory/en/documents/Tissue_Engineering_2012.pdf)
6. Braun J S. Arzneistoffabsorption in Caco-2/TC7 Zellen: Ibuprofen und der Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1). Dissertation der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen 2007.
7. Faller A, Schünke M. Der Körper des Menschen. 15. Auflage. Stuttgart: Thieme 2008.
8. Haller D, Grune T, Rimbach G, Hrsg. Biofunktionalität der Lebensmittelinhaltsstoffe. Heidelberg: Springer Spektrum 2013.
9. Hochschule Esslingen - Lebensmittel als Herausforderung für zelluläre Testsysteme, Netzwerk Bioaktive Pflanzliche Lebensmittel. 13.11.2012. <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/de/fachbeitrag/pm/hochschule-esslingen-lebensmittel-als-herausforderung-fuer-zellulaere-testsysteme/>
10. Kamel RA, Ong JF, Eriksson E, Junker JPE, Caterson EJ. Tissue Engineering of Skin. JACS 2013; Vol. 217, Issue 3: 533-55.
11. Forschungsbericht der Hochschule Esslingen 2010, ISSN 1866 – 6221.
12. Online-Kompaktlexikon Biologie. [www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt](http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt), Heidelberg: Springer Spektrum 2001 (Zugriffsdatum: 20.08.2014).
13. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molekularbiologie der Zelle. Weinheim: Wiley-VCH 2004.
14. Jastrow H, Elektronenmikroskopischer Atlas von Zellen, Geweben und Organen im Internet <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMAlles.html> (Zugriffsdatum: 15.08.2014).
15. Wink M. Molekulare Biotechnologie - Konzepte, Methoden und Anwendungen., Weinheim: Wiley-VCH 2011.
16. Kuchling H. Physik, Formeln und Gesetze. 9. Aufl. Köln: Buch- und Zeitverlagsgesellschaft 1972.

**Weiterführende Links zum Thema (Stand Oktober 2016)**

- [EuroStemCell](#) (Portal von 90 europäischen Forschungslabors im Bereich Stammzellen und regenerative Medizin)
- [Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB](#)
- Universitätsklinikum Tübingen – [Zentrum für Regenerationsbiologie und Regenerative Medizin](#) ZRM
- Europäische Kommission: Institute for Health and Consumer Protection: [Alternatives to animal testing & Safety Assessment of Chemicals](#)

## Integration des Themas in den Unterricht

Das Thema Organoide Zellkulturen eignet sich für eine Integration in den Unterricht der Kursstufe. Hier gibt es verschiedene Möglichkeiten der Anknüpfung an die vorgegebenen Unterrichtsinhalte.

### LPE 1 A: Von der Zelle zum Organ – Haut

Anknüpfung an die Inhalte	Methodische Hinweise	Zielsetzung
Zelldifferenzierung, Gewebe- und Organbildung	Mikroskopie der Haut (Fertigpräparate) als Beispiel für ein tierisches Organ	➤ Kenntnis der gesunden Hautstruktur
Krebs	Referate/GFS zum Thema „Gutartige und bösartige Tumoren der Haut“	➤ geschärfte Sensibilität für die zunehmende Problematik des Hautkrebses schaffen
	Gruppenpuzzle zum Thema Haut <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bau der Haut</li> <li>• Hautbräunung</li> <li>• Sonnenschutz</li> <li>• Hautkrebs</li> <li>• Tätowierungen: Herstellung/Entfernung</li> </ul>	➤ Kenntnisse gewinnen und praktisch umsetzen (eigenes Verhalten)

### LPE 1 B: Von der Zelle zum Organ – Darm

Verdauung	Übersicht über das Verdauungssystem	➤ Aufnahme und Verdau von aufgenommener Nahrung und Nährstoffen
Zelldifferenzierung, Gewebe- und Organbildung	Mikroskopie des Dünndarms (Fertigpräparate)	➤ Kenntnis des gesunden Darms

### LPE 2 Aufnahme, Weitergabe und Verarbeitung von Information

Tierversuche und deren Vermeidung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Internet-Recherche gruppenteilig über aktuelle Regelungen</li> <li>• Referate/GFS zum Thema Transplantation und Hautersatz</li> <li>• Referate/GFS zu: Einsatz von Tierversuchen, Alternative zu Tierversuchen</li> <li>• Referate/GFS zu: Einsatz Methoden der Biopharmazie, Erforschung neuer Medikamente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ethische und biologisch-medizinische Probleme kennen</li> <li>➤ Herstellungsverfahren für Hautersatz kennen</li> <li>➤ Möglichkeiten des Einsatzes von gezüchteter Haut sehen</li> <li>➤ Ansätze der pharmazeutischen Forschung verstehen</li> </ul>
-----------------------------------	---	---

<b>LPE 4 Angewandte Biologie</b>		
Grundlagen der Biotechnologie	<ul style="list-style-type: none"><li>• Referate / GFS zum Thema Zellkulturen, Hautersatz aus gentechnisch veränderten Zellen</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Wissen zum Thema sammeln</li><li>➤ Chancen, Risiken biotechnologischer Möglichkeiten diskutieren können, Stellung beziehen</li></ul>

## Impressum

Herausgeber: BIOPRO Baden-Württemberg GmbH  
Breitscheidstr. 10, 70174 Stuttgart  
Tel: +49 (0) 711 21 81 85 00  
Fax: +49 (0) 711 21 81 85 02  
E-Mail: [info@bio-pro.de](mailto:info@bio-pro.de)  
Internet: [www.bio-pro.de](http://www.bio-pro.de)

Vertretungsberechtigter Geschäftsführer : Prof. Dr. Ralf Kindervater

Registergericht: Amtsgericht Stuttgart  
Registernummer: HRB 23470  
Umsatzsteuer-Identifikationsnummer gemäß § 27a Umsatzsteuergesetz: DE 227283342

Verantwortlich im Sinne des Presserechts: Prof. Dr. Ralf Kindervater

Chefredaktion: Dr. Barbara Jonischkeit

Redaktion: Dr. Ariane Pott

Autoren: Margit Jost-Kant, Dr. Ariane Pott

Fotos Titel: Prof. Dr. Bettina Weiß / Hochschule Esslingen (links) und Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB (rechts)

Copyright : BIOPRO Baden-Württemberg GmbH November 2016