

Biomed. Technik
46 (2001), 133-136

W. Feicht¹
A. Buchner²
R. Riesenberg²

Entwicklung eines Inkubationssystems für ein inverses Mikroskop zur Langzeitbeobachtung von Zellkulturen in gekammerten Objektträgern

Incubation System for an Inverted Microscope for Long-Term Observation of Cell Cultures Using Chamber Slides

¹Labortechnik, Institut für Klinische Chemie
²Labor für Tumorummunologie, Urologische Klinik
Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, München

Schlüsselwörter: Tumorummunologie, Zellkultur, Inkubationssystem, Videoaufzeichnungen

Trifunktionelle bispezifische Antikörper eröffnen neue immuntherapeutische Perspektiven bei der Krebsbekämpfung. Vor einem möglichen klinischen Einsatz sind umfangreiche Tierexperimente und vor allem In-vitro-Untersuchungen notwendig. Zur genauen Langzeitbeobachtung der zellulären Interaktionen zwischen den verschiedenen immunologisch aktiven Blutzellen und einzelnen Tumorzellen in Anwesenheit von Antikörpern wurde ein Inkubationssystem für experimentelle Zellkulturen in einem inversen Mikroskop konstruiert. Das System besteht aus einer Plexiglasbox mit externer Umluftheizung und CO₂-Versorgung und einer zentral positionierten feuchten Kammer mit integriertem Wasserbad. Die Zellkulturen befinden sich unter sterilen Bedingungen in einem gekammerten Objektträger in einer zentralen Aussparung des Wasserbads. Das neuentwickelte Inkubationssystem stellt eine Möglichkeit dar, Experimente unter optimalen Zellkulturbedingungen kontinuierlich visuell verfolgen und mit modernen Videotechniken kombinieren zu können.

Key words: Tumour immunology – cell culture – incubation system – video recording

Trifunctional bispecific antibodies open up new immunological possibilities in tumour treatment. Prior to clinical application, comprehensive investigations using animal models and in vitro examinations need to be done. To investigate long-term interactions between various immunologically active blood cells and individual tumour cells in the presence of antibodies, we developed an incubation system for experimental cell cultures on an inverted microscope. The system consists of a perspex box with a central moisture chamber with integrated water reservoir, external air circulation heating, and a CO₂ supply. The sterile cell cultures are located in the wells of a slide positioned within a depression in the water reservoir. The newly developed incubation system enables continuous observation over the long term of experiments under optimal cell culture conditions in combination with modern video techniques.

1 Einleitung

Die Tumorummunologie hat in dem Bestreben, das Immunsystem und die Tumorzellen gezielt therapeutisch zu beeinflussen, in den letzten zwei Jahrzehnten eine rasante Entwicklung durchlaufen. Die immer besseren technischen Möglichkeiten, Tumorzellen und Mechanismen der Immunabwehr bis hin zur Mutation einzelner Gene zu analysieren, und der damit verbundene immense Zuwachs an Wissen haben zur Etablierung neuer Therapieformen geführt, die unter dem Begriff Immun- oder Immunmodulations-Therapien zusammengefaßt werden. Ein Problem der heutigen Therapieformen ist nicht der Primärtumor, sondern es sind einzelne, im Körper verteilte Tumorzellen. Diese können jahrelang ruhen und dann zu oft nicht mehr kurativ behandelbaren Metastasen führen. Trifunktionelle bispezifische Antikörper im Rahmen einer Immuntherapie sind ein neuer und erfolgversprechender Ansatz

zur Zerstörung dieser restlichen Tumorzellen [2, 3, 5, 6]. Dabei werden nicht nur T-Zellen, sondern gleichzeitig auch Freßzellen (Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen) an die Tumorzellen herangeführt und aktiviert. Das führt zu einer gezielten Zerstörung der Tumorzellen, ein Verfahren, das bei der extrakorporalen Reinigung von Stammzellpräparaten bereits erfolgreich eingesetzt wird.

Um die dynamischen Vorgänge bei der Zerstörung einzelner Tumorzellen, die Dosis-Wirkungs-Beziehungen und die Einflüsse von T-Zellen und Freßzellen unter Einwirkung von bispezifischen Antikörpern im Zellkulturexperiment genau beobachten und untersuchen zu können, wurde eine Inkubationskammer zur Aufrüstung eines inversen Mikroskops mit CO₂-Anschluß und geregelter Heizung entwickelt und eingesetzt. Die experimentellen Möglichkeiten dieses Systems werden bereits für computergesteuerte Videoaufzeichnungen genutzt.

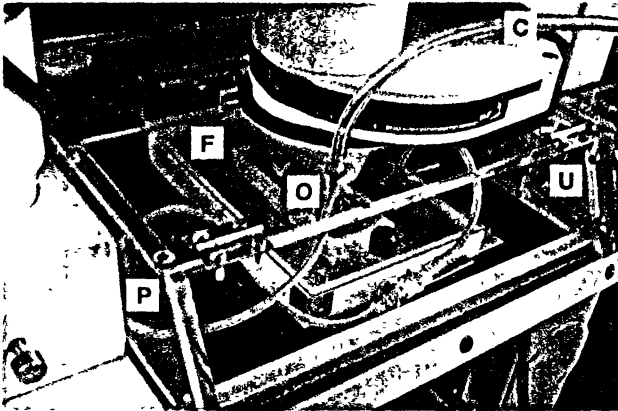


Bild 1. Im Axiovert 35 eingebaute Inkubationsbox mit Plexiglasgehäuse (P), feuchter Kammer (F), gekammertem Objektträger (O), Umluftheizung (U) und Zuleitung für die CO₂-Versorgung (C).

2 Aufbau des Inkubationssystems

Das Kernstück des Systems besteht aus einer Plexiglasbox, die in den Bereich zwischen Stativ, Kondensor und heizbarem Mikroskoptisch eines inversen Mikroskops (Axiovert 35, Zeiss, D-Göttingen) eingebaut ist. In der Box befindet sich eine feuchte Kammer mit integriertem Wasserbad, einer Aussparung für einen gekammerten Objektträger (16 Kammern, 0,4 cm² Kulturfläche/Kammer, NUNC, D-Wiesbaden) sowie der Glasabdeckung mit Bohrungen für die CO₂-Zuleitung bzw. die Entlüftung (Bild 1). Als Ergänzung zum heizbaren Mikroskoptisch gibt es eine externe Umluftheizung mit vorgeschaltetem Ventilator zur gleichmäßigen Temperaturverteilung. Die Box dient somit der Konstanz der drei wichtigen Grundbedingungen für die Kultivierung humaner Zellen: 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 100 % Luftfeuchtigkeit.

2.1 Plexiglasbox

Die aus 8 mm starkem Plexiglas gebaute Box (230 × 230 × 65) (mm) hat eine rechtsseitige Klappe zum Einführen der feuchten Kammer. Der Kreisausschnitt (Ø = 80 mm) auf der Oberseite dient der paßgenauen Einsenkung des konischen LD-Mikroskopkondensors (Bild 2a). Durch diese Öffnung wird auch der gekammerte Objektträger in die feuchte Kammer eingeführt. Auf der Oberseite der Plexiglasbox befindet sich zudem der Steckanschluß für die abgezweigte CO₂-Zuleitung (Bild 2b) aus dem Brutschrank (Heraeus BB6220, D-Hanau). In die Zuleitung ist eine Wasserdampffalle eingebaut, um die Luftfeuchtigkeit aus der Brutschrank-Atmosphäre abzuscheiden. In der Box ist ein Temperatursensor zur Überwachung und Regelung der Umlufttemperatur angebracht. Die erwärmte Luft wird mit einem Ventilator durch einen 300 mm langen Verbindungsschlauch (Ø = 40 mm) aus gewebeverstärktem, teflonbeschichtetem Polyethylen umgewälzt, der rechts und links vom Mikroskopstativ in die Ple-

Bereitgestellt von | Universitätsbibliothek der LMU Muenchen

Angemeldet | 129.187.254.47

Heruntergeladen am | 18.11.13 14:14

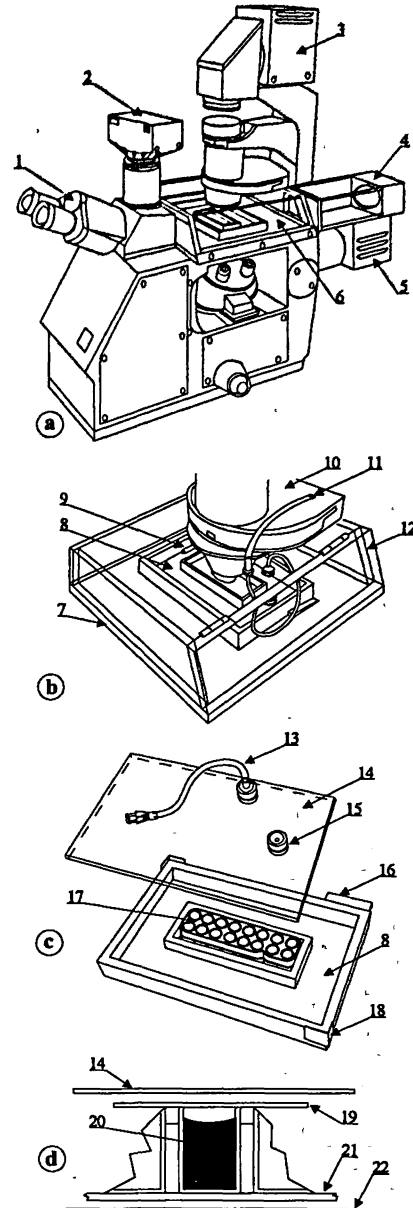


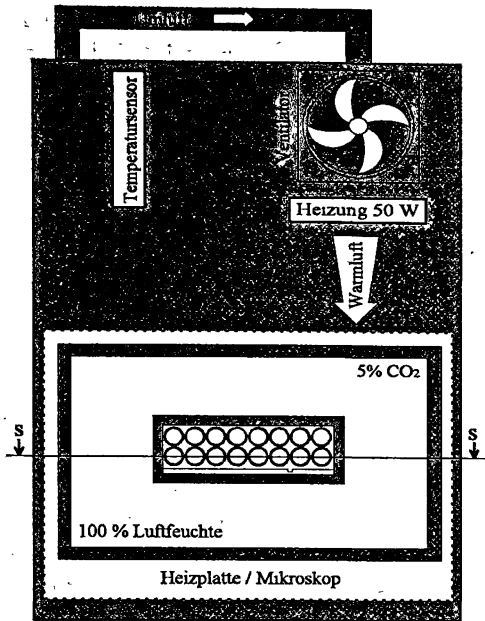
Bild 2a-d. Inverses Mikroskop Axiovert 35 (Zeiss) mit Plexiglasbox und Umluftheizung (Bild 2a), Plexiglasbox (Bild 2b) und feuchter Kammer (Bild 2c). Querschnitt durch eine Kammer des Objektträgers (Bild 2d).

a) (1) Okular, (2) Videokamera, (3) Lampengehäuse Durchlicht, (4) Umluftheizung, (5) Lampengehäuse Fluoreszenzlicht, (6) Plexiglasbox; b) (7) heizbarer Mikroskoptisch, (8) Wasserbad, (9) Temperatursensor, (10) Kondensor, (11) CO₂-Zuleitung, (12) Klappe der Box; c) (13) Verbindungsschlauch zur CO₂-Zuleitung, (14) Glasabdeckung, (15) Entlüftungsbohrung, (16) Arretierung für Halterahmen, (17) gekammertem Objektträger, (18) Arretierung für Glasabdeckung; d) (19) Deckel, (20) Kammer, (21) Objektträger, (22) Deckglas.

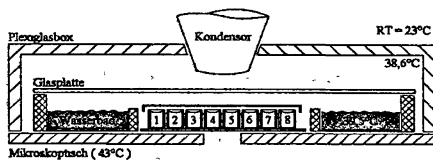
xiglasbox einmündet. Die Box sorgt für eine homogene und geregelte Wärmeverteilung und schließt das System gegen äußere Einflüsse ab.

2.2 Feuchte Kammer

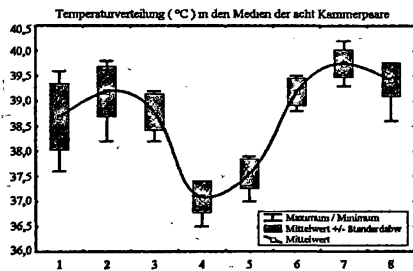
Zentrale Einheit der Plexiglasbox ist das Wasserbad aus Delrin[®] (144 mm × 98 mm, außen 18 mm, innen 14 mm hoch) mit arretierbarer Glasplatte (143 mm × 97 mm), die auch die Aussparung für den gekammert-



a



b



c

Bild 3a-c. Umluftheizung: a) Blockschema, S = Schnittebene; b) Querschnitt in der Ebene S (s. Bild 3a); c) Temperaturverteilung in den Medien der acht Kammerpaare (vgl. Bild 3b) bei zehn Messungen.

ten Objektträger abdeckt, aber nicht zum Wasserbad hin abschließt (Bild 2c). Die Glasplatte enthält eine Bohrung für die Zuleitung der CO₂-Begasung und eine weitere für die Entlüftung. Der Zuleitungsschlauch aus Polyethylen (Ø = 35 mm) zum Glasdeckel läßt sich über einen Luer-04-Anschluß mit dem Schlauch zur Oberseite der Plexiglasbox verbinden. In die Aussparung in der Mitte des Wasserbads wird der gekammerte Objektträger (Bild 2c) mit den experimentellen Zellkulturen eingesetzt. Der Inhalt der 16 Kammern bleibt durch den aufgelegten Deckel steril. Die zentrale Durchlichtöffnung im Mikroskoptisch (Ø = 30 mm) wird mit einem Deckglas (50 mm × 50 mm) geschlossen, um einen Verlust von Wärme, CO₂ und Wasserdampf zu vermeiden. Alle konstruktionsbedingten Möglichkeiten der Lichtabsorption im Strahlengang sind in Bild 2d zusammengefaßt. Die gesamte feuchte

Kammer kann über eine Arretierung am Halterahmen mit Koaxialtrieb und Objektführer des Mikroskops horizontal in X- und Y-Richtung positioniert werden, wobei die Dichtigkeit der Plexiglasbox jederzeit gewährleistet ist.

2.3 Umluftheizung

Die besondere Situation der Zellkultur in kleinflächigen Gefäßen über der zentralen Bohrung des Mikroskoptisches erfordert eine externe Umluftheizung als Ergänzung zur Tischheizung (Temperaturregler TRZ 3700, Zeiss), um eine gleichmäßigere Temperaturverteilung zu erhalten (Bild 3a). Die PTC-Element-Heizung (50 W) mit vorgeschaltetem Ventilator (Matsushita SF60) befindet sich, wie unter 2.1 beschrieben, in einem (180 × 75 × 65) (mm) großen Anbau der Plexiglasbox (Bild 2a). Zur Optimierung der Temperatur in den entscheidenden vier Kammern des Objektträgers im Durchlichtstrahlengang wurden in wiederholten Meßreihen die Temperaturwerte der Kulturmedien, des Wasserbads und der Umluft bestimmt (Bild 3b + 3c). Bei Durchschnittswerten von 39,5 °C für das Wasserbad, 38,6 °C Umlufttemperatur und 43 °C für den Mikroskoptisch wurden die gewünschten Werte um 37 °C in den Kammern 4 und 5 jeder Reihe erreicht. Interessant ist dabei die Temperaturverteilung in der Abfolge der Kammern von 1 bis 8 (Bild 3c). Die Flüssigmedien in den Kammern 1 bis 3 sowie 6 bis 8 jeder Reihe sind durch den direkten Kontakt mit dem beheizten Mikroskoptisch deutlich wärmer als die Kammern 4 und 5. Die Kammern 1 und 8 geben offensichtlich durch ihre Randlage vermehrt Wärme an die Umgebung ab. Die Kammern 6 bis 8 haben vermutlich deshalb eine höhere Durchschnittstemperatur als die Kammern 1 bis 3, weil sie dem austretenden Warmluftstrom der Umluftheizung etwas näher sind.

2.4 Steuereinheit

Sämtliche Anschlüsse und elektrisch/elektronischen Elemente sind in einem nach VDE-Richtlinien abgesi-

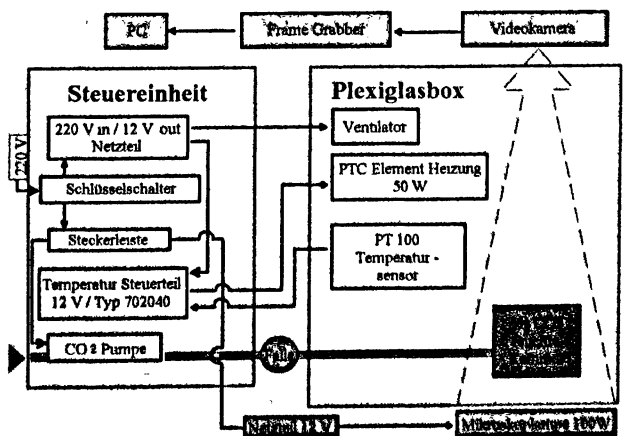


Bild 4. Inkubationssystem, Blockschema.

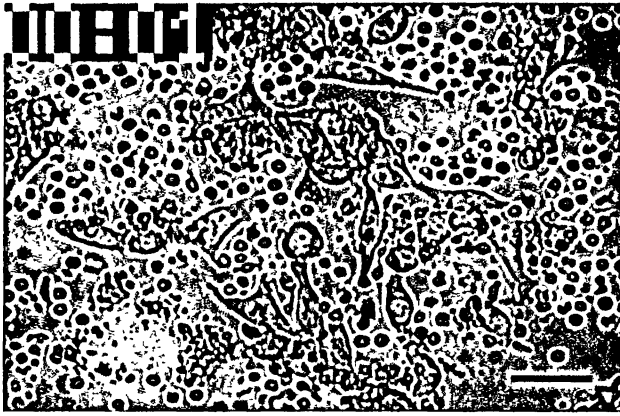


Bild 5. Kokultur aus Prostata-Karzinomzellen (LNCaP, groß) und mononukleären Blutzellen (klein) im gekammerten Objektträger. Videobild mit automatischer Zeiteinblendung. Maßstab: 50 µm.

cherten Minitower-PC-Gehäuse untergebracht. Mit einem zentralen Schlüsselschalter werden das Netzteil und die angeschlossene Steckerleiste ein- und ausgeschaltet. Das Netzteil versorgt über einen 12-V-Ausgang den Ventilator und den Temperaturregler (Jumo Itron, Typ 702040). An die Steckerleiste sind eine Membranpumpe aus einer Pipettierhilfe (Hirschmann, D-Eberstadt) als CO₂-Pumpe und das Netzteil der Mikroskopbeleuchtung angeschlossen. Alle elektrischen Elemente in der Plexiglasbox werden aus Sicherheitsgründen mit nur 12 V betrieben. Die Schaltung ist in einem Blockschema dargestellt (Bild 4).

2.5 Dokumentation der Experimente

Die durch die Inkubationsbox ermöglichten Langzeitexperimente werden mit einer hochempfindlichen Videokamera (Optronics VI-470, Goleta, USA) dokumentiert, die über ein C-Mount-Gewinde im Strahlengang des Mikroskops angebracht ist. Sowohl Durchlicht- als auch Fluoreszenz-Aufnahmen sind möglich. Das Videosignal wird mit einer Framegrabber-Karte (Imagination PXC-200, Beaverton, USA) digitalisiert. Neben einer Echtzeit-Beobachtung ist insbesondere eine computergesteuerte Aufnahme von Einzelbild-Sequenzen möglich (selbstentwickelte Software auf Basis von MS Visual Basic, Microsoft, Redmond, USA, und Common Vision: Blox System, Stemmer Imaging GmbH, D-Puchheim), aus denen sich Zeitraffer-Filme herstellen lassen. Diese erlauben die funktionelle Beurteilung von biologischen Vorgängen, die über Stunden oder Tage ablaufen.

3 Ausblick

Zusammenfassend stellt die neuentwickelte Inkubationsbox eine Möglichkeit dar, Zellkultur-Experimente unter optimalen Bedingungen tagelang visuell zu verfolgen und mit modernen Videoaufzeichnungsmethoden zu kombinieren. Ähnlich konzipierte Kurzzeitun-

tersuchungen über 3 bis 10 h [1, 4] benötigen lediglich eine Luftstrom-Temperaturregelung (z. B., Nevtek, Burnsville, USA, bzw. World Precision Instruments, Sarasota, USA) oder verwenden zusätzlich eine geschlossene Perfusionskammer [4]. Langzeitkulturen können auf die nötige Pufferung des Mediums durch die CO₂-Zufuhr bzw. auf 100 % Luftfeuchtigkeit nicht verzichten, und Perfusionskammern sind für Suspensionskulturen wie Blutzellen nicht geeignet. Mit der hier vorgestellten Konstruktion, die zudem relativ einfach nachzubauen ist, lassen sich u. a. Zell-Zell-Interaktionen experimentell beobachten, wie die derzeit intensiv untersuchte Antikörper-vermittelte Lyse von Tumorzellen durch Zellen des Immunsystems (Bild 5). Dabei sind nicht nur Durchlichtaufnahmen möglich. Die simultane Verwendung verschiedener Lebendfluoreszenzfarbstoffe (z. B. CellTracker Fluorochrome von Molecular Probes, Eugene, USA) erlaubt noch differenziertere Analysen zellphysiologischer Vorgänge.

Danksagung

Die Autoren danken Roswitha Fischer und Peter Simon für ihre Hilfe bei der Zellkultivierung bzw. den feinmechanischen Arbeiten.

Literatur:

- [1] Hirschberg, K., C. M. Miller, J. Ellenberg, J. F. Presley, E. D. Siggia, R. D. Phair, J. Lippincott-Schwartz: Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J. Cell Biol.* 143 (1998) 1485–1503.
- [2] Lindhofer, H., H. Menzel, W. Günther, L. Hültner, S. Thierfelder: Bispecific antibodies target operationally tumor-specific antigens in two leukemia relapse models. *Blood* 88 (1996) 4651–4658.
- [3] Riesenberger, R., A. Buchner, H. Pohla, H. Lindhofer: Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies ((EpCAM x (CD3)). *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001), im Druck.
- [4] Toomre, D., J. A. Steyer, P. Keller, W. Almers, K. Simons: Fusion of constitutive membrane traffic with the cell surface observed by evanescent wave microscopy. *J. Cell Biol.* 149 (2000) 33–40.
- [5] Zeidler, R., G. Reisbach, B. Wollenberg, S. Lang, S. Chaubal, B. Schmitt, H. Lindhofer: Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. *J. Immunol.* 163 (1999) 1246–1252.
- [6] Zeidler, R., J. Mysliwicz, M. Csanady, A. Walz, I. Ziegler, B. Schmitt, B. Wollenberg, H. Lindhofer: The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells. *Br. J. Cancer* 83 (2000) 261–266.

1008

Korrespondenzanschrift:

Dr. rer. nat. Rainer Riesenberger
Labor für Tumorummunologie
Urologische Klinik, Klinikum Großhadern
Marchioninistr. 23
D-81377 München
Telefon 089/7095 4877
Telefax 089/7095 4864
E-Mail: riesenberger@life.med.uni-muenchen.de