



# MINUSHEET - eine neue Kulturmethode für anhaftende Zellen unter "natürlichen" Bedingungen

Will W. Minuth

Institut für Anatomie, Universität Regensburg,  
Universitätsstr. 31, D-8400 Regensburg

## *Zusammenfassung*

Der Wert von kultivierten Zellen in der pharmazeutischen, biomedizinischen und zellbiologischen Forschung ist abhängig vom Grad ihrer terminalen Differenzierung. In konventionellen Kulturschalen ist es häufig schwierig, Kulturbedingungen zu erreichen, die die Situation von intakten Geweben oder Organen widerspiegeln. Mangelpunkte *in vitro* sind eine ungenügende Zellverankerung auf dem impermeablen Boden von Plastik-Kulturgefäßen sowie ein fehlender permanenter Medienaustausch. Hinzu kommt eine fehlende Gradientenexposition mit Kulturmedien für Epithelzellen. Diese technischen Einschränkungen veranlassten uns, ein neues Zellkultursystem mit verschiedenen Kulturbehältern und kompatiblen Zellhalterungen zu entwickeln. Mit diesem neuen System wird die Simulierung von quasi natürlichen Bedingungen möglich.

Der Vorteil der Neuentwicklung ist: 1) Adherente Zellen können auf individuellen und austauschbaren Unterlagen zur optimalen Anheftung gezüchtet werden. 2) Mit einer kontinuierlichen Perfusion des Zellkulturmediums können während der gesamten Kulturzeit kontrollierbare Bedingungen aufrechterhalten werden. 3) Mit einer neu entwickelten Gradientenperfusionskammer können den Kulturen von luminal und basal ganz unterschiedliche Medien kontinuierlich appliziert werden. Alle Artikel des neuen Kultursystems sind beliebig oft wieder verwendbar.

## *Summary: MINUSHEET - A new method for "natural" culture conditions of epithelia in vitro*

The value of cultured cells in biotechnical, pharmaceutical or cell biological research depends on the degree of terminal cell differentiation. In conventional Petridishes or tissue culture plates it is difficult to achieve culture conditions which resemble the *in situ* situation of intact tissue, as regards optimal cell adhesion, exchange of nutrients and metabolic products. The limitations of conventional culture technique prompted us to develop procedures and equipment which optimize the *in vitro* environment of cultured cells. The advantages are:

(1) Anchorage-dependent cells can be kept on individual and interchangeable support materials for optimal cell attachment, (2) a defined nutrient concentration can be maintained by continuous culture medium perfusion, (3) MINUSHEET allows perfusion with different media at the apical and basal side of the cultures, thus mimicking the natural environment of epithelial cells, (4) all parts of the system are re-usable.

## *Einleitung*

Die im zellbiologischen Labor häufig angewandte Zellkultur ist eine nun seit nahezu 50 Jahren fast unveränderte Technik. Zwar haben die vielen Einmalartikel aus Plastik die Petrischalen und Pipetten aus Glas abgelöst, doch wurde das Prinzip der Technik weitgehend beibehalten. Mit dieser Technik konnten so über Jahrzehnte die vielen verschiedenen kontinuierlichen Zelllinien beliebig oft



Altex 15:18  
1991

propagiert werden. Da die transformierten Zellen alle gut wuchsen, bestand keine Veranlassung, eine bewährte Methode zu verlassen.

Die Ansprüche an eine Zellkultur haben sich jedoch in den letzten Jahren stark erweitert und damit verändert. Während früher ausschließlich die Vermehrung von Zellen im Vordergrund stand, so wird heute von den Zellen als Alternative zum Tierversuch vielfach eine organspezifische Leistung und Reaktion erwartet. Für organspezifische Fragestellungen gelten nach wie vor die Primärkulturen als das Mittel der Wahl. Dazu werden Zellen aus den jeweiligen Organstrukturen enzymatisch herausgelöst und in Kultur gebracht. Danach werden die isolierten Zellen meist in Plastikkulturgefäße überführt, die in großer Auswahl angeboten werden. Die Zellen haften auf der Plastikoberfläche der Kulturgefäße mehr oder weniger gut an und beginnen sich zu vermehren. Die Quantität und Qualität der auf diese Art kultivierten Zellen läßt jedoch häufig zu wünschen übrig. Dies ist auf mehrere Gründe zurückzuführen. Die Zellen haften auf einem impermeablen Unterlagematerial, das in dieser Form in einem Organismus nicht vorgefunden wird. Ein weiterer Mangel ist darin zu sehen, daß das Kulturmedium häufig über mehrere Tage nicht ausgetauscht wird. Dadurch können auf unkontrollierbare Weise Stoffwechselprodukte angehäuft werden, die in einem Organismus zu katastrophalen Folgen führen würden. In vielen Fällen müssen dem Kulturmedium Hormone appliziert werden, um Zellen zum Wachstum anzuregen oder eine spezifische Reaktion zu erzielen. Wenn jedoch hormonhaltiges Kulturmedium schon für wenige Stunden bei den Zellen verbleibt, so kann wegen der schnellen Degradationsgefahr eigentlich keine Gewähr mehr für die Bioverfügbarkeit der Hormone übernommen werden. Zudem erhalten bei der bisher gebräuchlichen Methode die kultivierten Zellen von allen Seiten das gleiche Kulturmedium. Für Epithelzellen bedeutet dieses Milieu einen permanenten "biologischen Kurzschluß". Epithelzellen wachsen immer an Grenzflächen, wo apikal und basal ganz unterschiedliche Medien im Organismus vorkommen. Nierentubuluszellen sind z.B. von der apikalen Seite mit Urin, von der basalen Seite mit bluthaltigem Medium umgeben. Neben all diesen technischen Unzulänglichkeiten reagieren die kultivierten Zellen mit einem zellbiologisch wohl bekannten, aber bisher nicht geklärten Phänomen: Die Zellen in vitro lassen sich häufig nicht in genügendem Ausmaß vermehren. Hinzu kommt, daß sie ihre organspezifischen Eigenschaften verlieren, indem sie sich entdifferenzieren.

Diese Entdifferenzierung von kultivierten Zellen bedeutet, daß sie oft binnen Stunden ganz typische morphologische, physiologische und biochemische Eigen-

schaften verlieren können. Leider wurde dem Phänomen der Entdifferenzierung von kultivierten Zellen in den letzten 20 Jahren sowohl von wissenschaftlicher wie auch von tierschützerischer Seite viel zu wenig Bedeutung beigemessen. Die kaum mehr überschaubare Anzahl von Kulturexperimenten mit Organzellen auf der einen Seite und die äußerst geringe Anzahl der wirklich zur Verfügung stehenden organspezifischen Zellkulturmodelle andererseits, sind meines Erachtens ausschließlich auf das Problem der Entdifferenzierung zurückzuführen. In diesem Wissenschaftsfeld wird deshalb in den nächsten Jahren noch in sehr hohem Maße Pionierarbeit zu leisten sein.

### *Die Notwendigkeit einer Neuentwicklung*

In unseren Augen erschien die bisher angewandte Zellkulturtechnik in vielen Punkten als nicht mehr zeitgemäß. Für unsere eigenen wissenschaftlichen Arbeiten wollten wir Zellen aus dem Sammelrohr der Säugerniere kultivieren, die in möglichst vielen Punkten der Organsituation entsprachen. Dazu mußten die Zellen auf einer individuell auswählbaren Unterlage, unter Perfusionsbedingungen und unter einem luminal-basalen Flüssigkeitsgradient gehalten werden.



Fig. 1:  
Jeder kennt das Flohspiel. Die MINUSHEETS im Vordergrund sind den Sprungplättchen nachempfunden. Es handelt sich dabei um flache Scheibchen mit einer konzentrischen Halterung, in die ganz individuell folienartige und permeable Trägermaterialien mit einem Durchmesser von 13 mm für ein optimales Anheften der Zellen eingelegt werden können.



Die Suche nach kommerziellen Produkten für eine solche komplexe Zellkulturtechnik ergab, daß eigentlich nur sehr wenig verwertbares und kompatibles Material zur Verfügung steht. Aus diesem Grunde entwickelten wir eine neue Technik.

Für unsere Kultivationsarbeiten können die Zellen jetzt

- 1) auf organspezifischen Supporten,
- 2) auf permeablen Oberflächen,
- 3) unter luminal/basalen Flüssigkeitsgradienten,
- 4) unter Perfusionsbedingungen wachsen und
- 5) können schnell und leicht von der einen in eine andere Versuchsanordnung überführt werden.

Diese Art einer zeitgemäßen Zellkultivation erschien uns nur dann sinnvoll, wenn sie in einer möglichst einfachen technischen Form realisiert werden konnte:

In einem ersten Entwicklungsschritt wurden die sogenannten "MINUSHEETS" konstruiert (Fig. 1). Es handelt sich hierbei um folienartige, extrem dünne Scheibchen mit einer konzentrischen Halterung. Der Vorteil dieser Scheibchen besteht darin, daß man nicht vorgefertigte Teile, sondern selbst eine Vielzahl von unterschiedlichen Trägermaterialien in Form eines besonders geeigneten Supportes für die Zellen einsetzen kann. Jedes bioverträgliche, membranartige Material kann für diese Versuche als Zellunterlage verwendet werden. Ein weiterer besonderer Vorteil der MINUSHEETS besteht darin, daß auch beliebige dünne biologische Häutchen als Support verwendet werden können. Sehr gute Erfahrungen wurden z.B. mit der Capsula fibrosa (Organkapsel) von Säugern gemacht. Solche organspezifischen Supporte haben sich als besonders günstig für die Differenzierung von hoch spezialisierten Zellen erwiesen (4). Der Vorteil der neu entwickelten Methode besteht also darin, daß für jede Zellart eine individuelle Unterlage für die Zellen ausgesucht und angewendet werden kann.

*Die Neuentwicklung verbindet konventionelle Technik mit neuen Experimentiermöglichkeiten*

1) *Verwendung der MINUSHEETS in klassischen Kulturgefäßen:* Die Sheets können mit eingelegter Zellunterlage zum besseren Anhaften der Zellen bei Bedarf noch mit Proteinen der extrazellulären Matrix beschichtet werden. Danach wird

das Sheet in Aethanol oder Dampf sterilisiert. Es kann anschliessend in jedes beliebige Zellkulturgefäß, z.B. eine 24-well Gewebekulturplatte eingelegt werden (Fig. 2). Das MINUSHEET dient hier als Verbesserung des Kulturschalenbodens. Danach können das gewünschte Kulturmedium und die Zellen einpipettiert werden. Die Zellen lassen sich auf dem MINUSHEET nieder. Für einen beliebigen Zeitraum können jetzt die Zellen auf ihrer spezifischen Unterlage in einem Inkubationsschrank auf klassische Art gezüchtet werden.

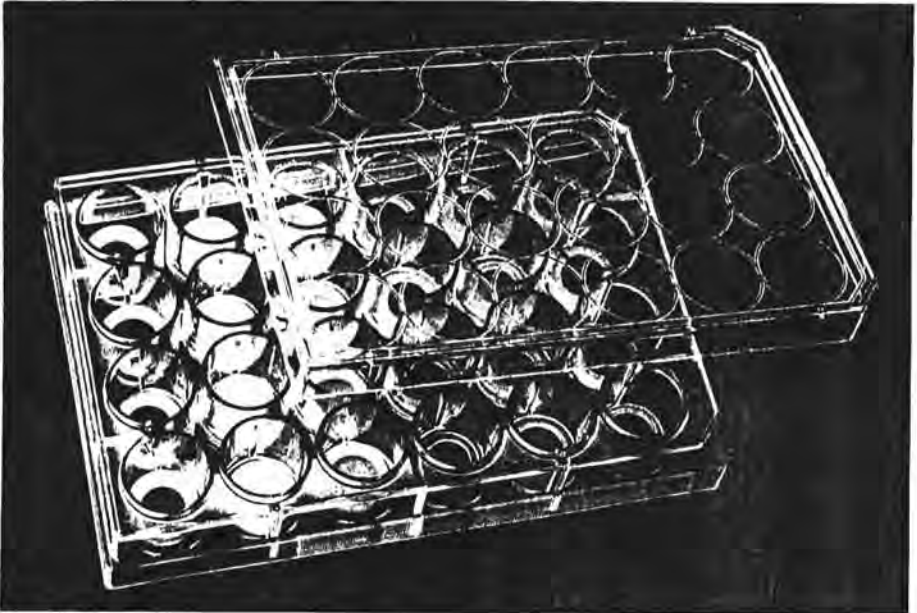
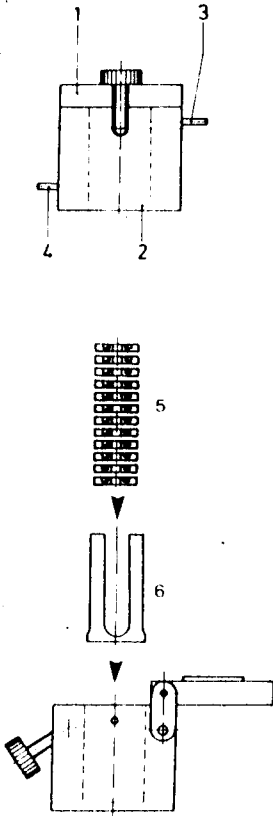


Fig. 2:  
Die MINUSHEETs können in allen kommerziellen Kulturgefäßen zur Verbesserung des Schalenbodens eingelegt werden. Für jeden individuellen Zelltyp kann eine speziell ausgesuchte Anhaftungsunterlage in die Ringhalterung eingelegt werden. Die unterschiedliche Konturierung der MINUSHEETs läßt die große Vielfalt der Experimentiermöglichkeiten erkennen. Die MINUSHEETs sind zudem beliebig oft wiederzuverwerten.

2) Die MINUSHEETs eignen sich besonders gut für *Perfusionsexperimente*. Dazu wurden spezielle Kammern entwickelt (Fig. 3). Da die Sheets keine hohe laterale Wandung besitzen, sondern flache Scheibchen darstellen, sind sie leicht stapelbar. Ähnlich einem Münzstapel können die Sheets mit einer Pinzette aus der Kulturschale entnommen und in einem Halter aufeinander gestapelt werden. Der Halter wird dann in die Perfusionskammer versenkt. Durch einfaches Schließen des Deckels kann Kulturmedium auf der Bodenseite des Gefäßes ein-



- 1 = Deckel
- 2 = Boden
- 3 = Auslaßkanüle
- 4 = Einlaßkanüle
- 5 = MINUSHEETs
- 6 = Halter

Fig. 3:

Mit einer Pinzette können die mit Zellen bewachsenen MINUSHEETs (5) binnen Sekunden von Kulturschalen in einen Halter (6) überführt und gestapelt werden. Der Halter wird dann in ein Perfusionskulturgefäß eingesetzt. Nach Schließen des Deckels kann die Perfusion durch eine basale Einlaßkanüle und einen apikalen Anschluß beginnen.

gepumpt (1ml/h) und an der Oberseite abgeführt werden. Damit sind die Zellen einem permanenten Flüssigkeitsstrom ausgesetzt. Für Endothelzellen als Auskleidung von Gefäßen oder für Zellen der Augencornea oder Conjunktiva sind solche Kulturbedingungen als ideal anzusehen.

3) *Die Gradientenperfusionskammer:* Die Kultivierung von Epithelzellen unter nahezu natürlichen Bedingungen ermöglicht die Gradientenperfusionskammer (Fig. 4). Dazu werden mit Zellen bewachsene MINUSHEETs mit einer Pinzette in die Kammer überführt. Durch Schließen des Deckels wird das Sheet automatisch zentriert und die Kammer dicht verschlossen. Zur benutzerfreundlichen



Bedienung müssen während des Öffnens und Schliessens der Kammer keine Schläuche entfernt oder gekoppelt werden. Da das eingelegte MINUSHEET die Kammer in ein apikales und basales Kompartiment teilt, können die Zellen von oben und unten ganz separat mit unterschiedlichen Kulturmedien versorgt werden.

Die Technik erlaubt somit eine getrennte apikale und basale Perfusion des Kulturmediums über viele Tage, ja sogar über Wochen. Da apikal und basal mit ganz unterschiedlichen Kulturmedien gearbeitet werden kann, können jetzt auch hypotone und hypertone Kulturmediumgradienten angelegt werden, wie sie auch in vielen Organstrukturen vorgefunden werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß von basal oder luminal ganz gezielt Hormone oder Pharmaka kontinuierlich appliziert werden können. Alle diese genannten Versuchsparameter sind mit der herkömmlichen Technik nicht oder nur sehr unvollkommen machbar.

Die beschriebenen Perfusionsversuche lassen sich in Serie mit beliebig vielen Kammern durchführen. Wir entwickeln gerade eine Methode, die es erlaubt, jede einzelne Kammer elektronisch zu vermessen. Dadurch können von jeder Kammer über Tage hinweg die transepitheliale Potentialdifferenz und der Widerstand der Zellen gemessen werden. Somit können Wachstum und Transportleistung von epithelialen Zellen on-line erfasst werden. Besonders interessant werden die Versuche, wenn z.B. von basal allen Zellen in mehreren Gradientenperfusionskammern ein Pharmakon appliziert wird. Elektronisch kann jetzt in allen Kammern gleichzeitig die Änderung der elektrophysiologischen Parameter bestimmt werden. Nach erfolgtem Versuch kann das Pharmakon ausgespült und eine neue Testsubstanz appliziert werden. Es ist ein völlig neuer Ansatz in der organspezifischen Zellkulturtechnik, daß unter nahezu natürlichen Bedingungen parallel beliebig viele Kulturen im on-line Verfahren elektronisch auf ihre Vitaläußerung hin untersucht werden können.

4) Die MINUSHEETs können von den Perfusionskammern oder einfachen Kulturgefäßen in eine *neu konstruierte mikroskopische Halterung* eingesetzt werden. Da bei den Sheets keine hohe laterale Wand vorhanden ist, wird von oben ein ungehindertes Arbeiten mit Mikropipetten in diese Kammer möglich. Gleichzeitig werden die Zellen von apikal und basal mit Kulturmedium durchströmt.

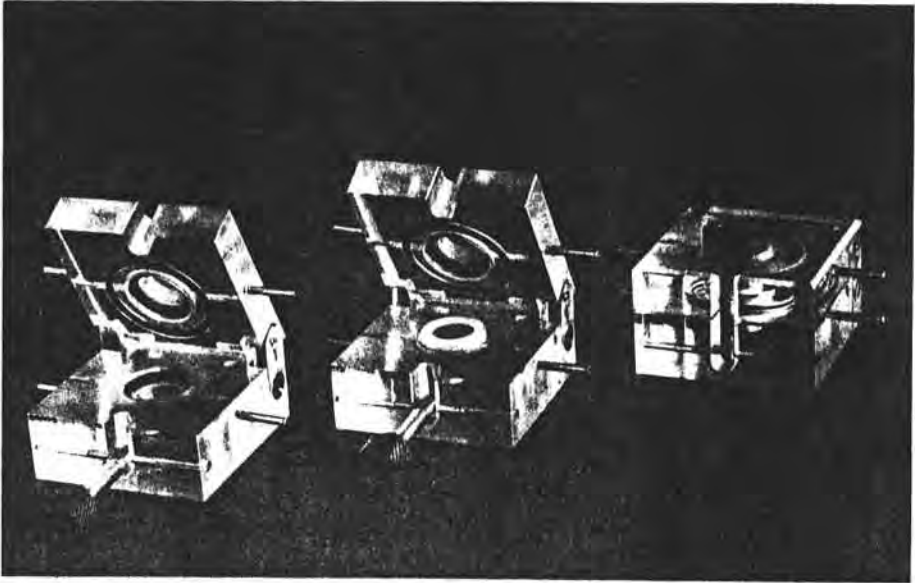
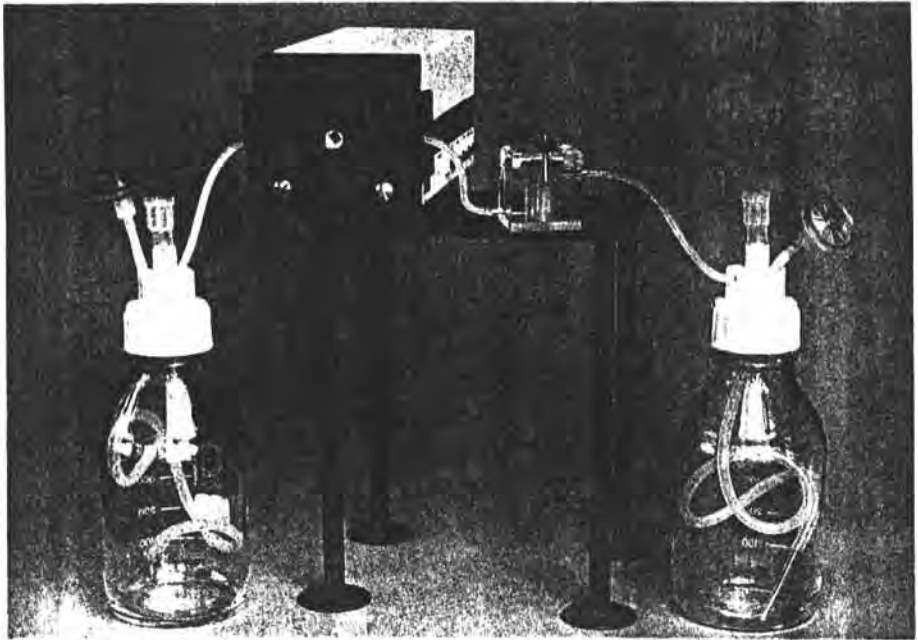


Fig. 4:  
Die MINUSHEETS können in eine Gradientenperfusionskammer eingelegt werden. Damit können die auf den MINUSHEETS wachsenden Zellen von oben und unten mit ganz unterschiedlichen Medien durchströmt werden.

### *Zellkulturexperimente mit renalen Sammelrohrzellen*

*Sterilisierung der MINUSHEETS:* Die mit einer spezifischen Zellunterlage versehenen Sheets werden am besten in 70% Ethanol im Kühlschrank aufbewahrt und bei Bedarf entnommen. Es erfolgt dann eine zweimalige Spülung mit steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Danach werden die Sheets in 24-well Gewebekulturplatten überführt, wo sie als Verbesserung des Kulturschalenbodens aus Plastik dienen.





**Fig. 5:** Semischematische Darstellung einer einfachen Perfusionskultur mit Mediumvorratsflasche (links), Chromatographiepumpe (1ml/h), Perfusionsreaktor (Fig. 3) und einer Mediumsammel­flasche (rechts). Die Teile sind über Silikonschläuche (Innendurchmesser 2mm) und Standard­luft­verschlüsse miteinander verbunden. Zur Temperierung des Perfusionskultur­gefäßes wird ein Enzymwasserbad oder ein Metallheizblock verwendet.

*Vorkultur der renalen Zellen:* Dünne Capsula fibrosa-Häutchen der Niere von neugeborenen New Zealand-Kaninchen (2, 3) werden in die MINUSHEET-Halterung eingespannt. Die häutchenartigen renalen Präparate bestehen aus der Capsula fibrosa, nephrogenem Blastem, S-shaped bodies und den Sammelrohrampullen. Werden solche Zellpräparate in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM/HEPES) mit 10% fetalem Kälberserum kultiviert, dann wachsen die Zellen der Sammelrohranlagen aus (2-4). Die Sammelrohrzellen überwachsen das gesamte Explantat und bilden binnen 24 Stunden ein polar differenziertes Epithel von vielen mm<sup>2</sup>. Die Vorkultur der Zellen wird in einem Heraeus Gewebekulturschrank (Hanau, BRD) bei 37°C und in feuchtigkeits­gesättigter Luft-Atmosphäre (5% CO<sub>2</sub>/95% Luft) durchgeführt.

**Perfusionskultur:** 24 Stunden nach Beginn der Vorkultur werden die MINUSHEETS mit den gerade etablierten Sammelrohrepiithelien mittels einer feinen Pinzette in den Perfusionskulturbehälter überführt (Fig. 3). Dazu werden 6 Sheets in den Halter gelegt und wie Münzen in einer Geldrolle gestapelt. Der Halter wird in den Perfusionskulturbehälter eingesetzt und der Deckel geschlossen. Durch einen basalen Einströmkanal und einen oberen Auslaß kann jetzt über Tage oder Wochen Kulturmedium durch den Kulturbehälter durchströmt werden. Die Sammelrohrepiithelien werden mit IMDM plus 25 mM HEPES und 1% antibiotischer Lösung für 13 Tage perfundiert. Das Medium wird in Schott Glasflaschen (500 ml), die mit Schraubkappen (Nr. 47622, TECNOMARA, Fernwald, BRD) versehen sind, aufbewahrt. Medienflaschen, Kulturbehälter und Auffangflasche wird über Silikonschläuche mit einem Innendurchmesser von 1mm über Standard-Luerverschlüsse verbunden. Die Durchströmungsrate des Kulturmediums beträgt 1 ml/h.

**Perfusionskulturmedien:** IMDM/HEPES mit 1% antibiotischer Lösung dient als Kontrollmedium. Aldosterone ( $10^{-7}M$ ), Vasopressin ( $10^{-6}M$ ) und Insulin ( $10^{-6}M$ ) werden den Medien in den experimentellen Serien beigefügt. Die Durchströmung der Kulturen mit Medium beginnt 24 Stunden nach Ansetzen der Zellen und wird für 13 Tage aufrechterhalten.

Medien, Serum und Antibiotika werden von Gibco-BRL Life Technologies (Eggenstein, BRD), Aldosteron (Aldocorten) von Ciba-Geigy Wehr (Baden, BRD), Vasopressin (AVP) und Insulin von Sigma (Deisenhofen, BRD) bezogen.

**Histologie:** 14 Tage nach Ansetzen der Kultur werden die Sammelrohrepiithelien für 20 Minuten in IMDM und 3% Glutaraldehyd fixiert. Nach Fixierung werden mittels feiner Pinzetten die Spannringe der MINUSHEETS geöffnet und die losgelösten Epithelien für 15 Minuten in PBS mit 1% Osmiumtetroxid (pH 7.4) nachfixiert. Das Zellmaterial wird in PBS gewaschen, über eine Alkoholreihe entwässert und in Epon eingebettet. Semidünne Schnitte werden mit Richardson-Lösung gefärbt und anschließend mikroskopiert. Mehr als 200 Epithelien wurden für diese Studie morphologisch untersucht.

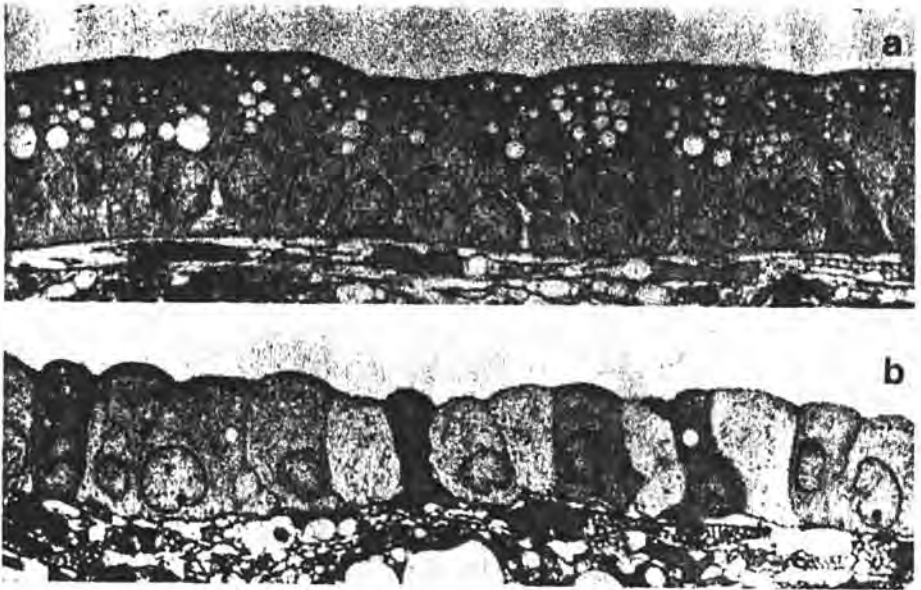


Fig. 6a, b: Mikroskopische Aufnahme eines histologischen Semidünnschnittes von 14 Tage alten Perfusionskulturen renaler Sammelrohrepiethelien.

- a) Unter Kontrollbedingungen ist im kultivierten Epithel nur ein einziger Zelltyp zu erkennen.
- b) Nach Perfusion mit Aldosteron/AVP und Insulin-haltigem Medium sind helle und dunkle Zellen (*principal*, resp. *intercalated cells*) erkennbar. x 400

*Ergebnis:* Eine dünne corticale Gewebsschicht der Niere von neugeborenen Kaninchen liefert ein polar differenziertes Epithel bestehend aus Sammelrohrzellen. Unter konventionellen Kulturbedingungen (4, 5) sowie unter Superfusionsbedingungen ohne Hormonzusatz (Fig. 6a) ist innerhalb des Epithels nur ein einziger Zelltyp zu erkennen. Werden die Epithelien jedoch unter Superfusionsbedingungen mit Hormonzusatz (Fig. 6b) gehalten, dann können mindestens zwei verschiedene Zelltypen identifiziert werden, die den hellen *principal cells* und den dunklen *intercalated cells* gleichen (1). Beide Zelltypen werden auch in der Niere gefunden. Die Ergebnisse belegen, daß aus embryonalen Epithelien der renalen Sammelrohrampulle mithilfe der Perfusionszellkultur differenzierte *principal* und *intercalated cells* in der Niere hergestellt werden können (5, 6).



### *Weitere Möglichkeiten der Perfusionszellkultur*

*Niere:* Zellen der Säugerniere können jetzt unter luminalen und basalen Flüssigkeitsgradienten kultiviert werden. Damit lassen sich mit der neuen Technik erstmals die hohen (1200 mOsm) und niedrige (150 mOsm) Flüssigkeitsgradienten simulieren, wie sie im corticopapillären Verlauf der Niere vorgefunden werden.

*Leber:* Ein weiteres Forschungsfeld sind Leberzellen, die jetzt unter Perfusionsbedingungen kultiviert werden können. Die Methode ermöglicht, daß sich in Kultur ein Blut- und Gallenkompartiment bilden läßt. Dadurch lassen sich Pharmaka oder Toxine von basal zuleiten und so auf einfache Art die Pharmakokinetik dieser Substanzen untersuchen.

*Innenauskleidung von Blutgefäßen:* Endothelzellen als Innenauskleidung von Gefäßen können jetzt unter nahezu natürlichen Bedingungen kultiviert werden. Bisherige Versuche haben gezeigt, daß die Kultivierung dieser Zellen in üblichen Kulturschalen, und damit ohne eine Fließbewegung des Mediums, nur eine sehr unvollkommene Methode der Zellkultur darstellt.

*Blut-Hirnschranke:* Mit der neuen Technik läßt sich ein Blut/Hirnschranken-Modell aufbauen. Dazu können Endothelzellen auf der einen Seite, Astrozyten auf der anderen Seite der MINUSHEETS kultiviert werden. Bei einem Gelingen dieser Versuche lassen sich unter optimalen Bedingungen der Gradientenkammer pharmakologische Versuche durchführen, wie sie bisher nicht möglich gewesen sind.

Für alle die genannten Modelle muß experimentelles Neuland beschritten werden. Durch eine sachgerechte Ausführung der neuen Technik kann unseres Erachtens ein besonders großes, interessantes und vielversprechendes Anwendungsgebiet eröffnet werden. Ziel unserer gesamten Versuche ist es, *in vitro* so nahe wie möglich an eine Organstruktur heranzukommen und das darin befindliche Milieu auf eine technisch sehr einfache Art zu simulieren. "For the happiness of cells" gehört einfach, dass sich die kultivierten Zellen auf einer optimalen und permeablen Auflagefläche verankern können, dass sie permanent mit frischem Medium versorgt und dass die Stoffwechselprodukte kontinuierlich entfernt werden. In jedem Organ sind diese Voraussetzungen von essentieller Bedeutung - warum nicht auch in der organspezifischen Zellkulturtechnik?