

# Die Kultur von Epithelzellen unter organtypischen Bedingungen

*W.W. Minuth*

## Zusammenfassung

Mit der konventionellen Kulturtechnik ist es häufig schwierig, organtypische Bedingungen zu erzeugen. Dadurch verlieren die kultivierten Zellen die für sie typischen Eigenschaften, sie dedifferenzieren. Aus diesem Grund entwickelten wir ein neues Zellkultursystem für eine optimale Zelldifferenzierung, das die Simulierung eines natürlichen Organmilieus ermöglicht: Adhärenz Zellen können auf individuell auswählbaren Zellunterlagen und in kompatiblen Zellhalterungen - den MINUSHEETS - kultiviert werden. Die Zellhalterungen lassen sich stapeln und in spezielle Behälter überführen, wo sie permanent mit Kulturmedium durchströmt werden. In einer Gradientenperfusionskammer können die Kulturen von oben und unten mit ganz unterschiedlichen Medien versorgt werden. Zellen aus der Säugermiere z.B. entwickeln unter diesen neuen Kulturbedingungen eine bisher nicht gekannte Qualität an Differenzierungsleistung und werden somit viel vergleichbarer zu der in vivo-Situation.

## 1. Die komplexen Organe

Die menschlichen und tierischen Organe sind sehr komplexe Strukturen, die in den meisten Fällen aus vielen verschiedenen Zellen bestehen. Um die biochemische Wirkung eines Pharmakons an einem einzelnen Zelltyp eines solchen komplexen Organs untersuchen zu können, ist es deshalb für viele Versuchsvorhaben gerade zuzwingend, die gewünschten Zellen aus dem Organverband herauszulösen und wenn möglich in Kultur zu bringen (JAKOBY W.B. und PASTAN I.H., 1979). In vitro kann zuerst die Anzahl der Zellen vermehrt werden und über einen relativ langen Zeitraum stehen dann klar definierte Zellen für die verschiedensten Versuche zur Verfügung.

### *1.1. Wie gut ist das in vitro-System ?*

Leider haben sich die Erwartungen an solche organspezifischen Zellkulturen nur in den wenigsten Fällen erfüllt. Der wesentlichste Grund für die mangelhafte Leistung von kultivierten Zellen ist wohl in der Dedifferenzierung zu suchen (MINUTH W.W., 1987; MINUTH W.W. und GILBERT P., 1988; GSTRANTHALER G.J.A., 1988). Da Organzellen sehr empfindliche "soziale Wesen" sind, wundert es nicht, daß sie nach der Isolierung aus dem Organverband leicht verkümmern und schon oft wenige Stunden ganz wesentliche morphologische, physiologische und biochemische Eigenschaften verlieren. Da solche dedifferenzierten Zellen nicht mehr dem gleichen, was sie einmal innerhalb des Organverbandes darstellten, wundert es auch nicht, daß

die Wirkungen eines Pharmakons oft nicht mehr optimal untersucht werden können. Es bedarf keiner besonderen Phantasie, daraus zu folgern, daß die dedifferenzierten Zellen nicht mehr vergleichbar sind mit den ursprünglichen Organzellen. Somit werden Übertragungen von in vitro-Ansätzen zu in vivo-Bedingungen eigentlich unmöglich. Die unzähligen bisher durchgeführten Zellkulturexperimente einerseits und die äußerst wenigen wirklich zur Verfügung stehenden organspezifischen in vitro-Modelle andererseits belegen das Dilemma (GSTRATHALER G.J. A., 1988; HORSTER M., 1980; KREISBERG J.I. und WILSON P.D., 1988).

*1.2. Die gute alte Zellkulturtechnik fährt nicht weiter*

Eine der wesentlichen Ursachen für eine zelluläre Dedifferenzierung ist meist bei der bisher durchgeführten Zellkulturmethode zu suchen. Seit nahezu 50 Jahren werden Zellen in petrischalenähnlichen Kulturbehältnissen gezogen. Zwar haben die diversen Einmalartikel aus Plastik die Behälter aus Glas abgelöst, doch an der derzeit vielgenutzten Technik hat sich prinzipiell nicht viel geändert. Mangelpunkte sind eine unnatürliche Verankerung von Zellen auf den undurchlässigen Kulturschalenböden, der fehlende kontinuierliche Medienaustausch und der "biologische Kurzschluß" von Zellen, weil sie von oben und unten das gleiche Kulturmedium erhalten. Weder eine Haut-, noch eine Nieren- oder eine Leberzelle kann sich unter diesen Kulturbedingungen wohlfühlen und die von ihr erwartete hohe Differenzierungsleistung erbringen.

Besonderes Interesse haben wir an den salztransportierenden Epithelien der Säugermiere, speziell am Sammelrohrsystem, welches unter der hormonellen Kontrolle von Aldosteron und Vasopressin die ionale und osmotische Zusammensetzung des Harns feinreguliert (KRIZ W. und KAISLING B., 1985). Viele Jahre haben wir uns bemüht, sowohl die hellen Principal Cells wie auch die dunklen Intercalated Cells des Sammelrohrs in einer hochdifferenzierten Form zu erhalten. Die hellen Zellen konnten wir mit der klassischen Kulturmethode in einem adäquaten Differenzierungszustand erhalten (MINUTH W.W., 1987; MINUTH W.W. et al., 1988), während wir bei den dunklen Zellen keinen Erfolg hatten.

Ziel der weiteren Forschungsarbeit war es deshalb, in den kultivierten Sammelrorepithelien auch die dunklen Zellen zu erzeugen. Für diese Versuche wurde deshalb eine Perfusionszellkulturmethode entwickelt, die die Simulierung von organtypischen Milieubedingungen erlaubt (MINUTH W.W. und RUDOLPH U., 1990; MINUTH W.W. et al., 1992 a, b, 1993).

**2. Eine neue Strategie - Perfusionskultur**

Für unsere eigenen wissenschaftlichen Arbeiten wollten wir Zellen aus dem Sammelrohr der Säugermiere kultivieren, die in möglichst vielen Punkten der Organsituation entsprachen. Dazu sollten die Zellen erstens auf einer individuell auswählbaren Unterlage, zweitens unter permanentem Austausch des Kulturmediums und drittens unter einem luminal-basalen Flüssigkeitsgradienten gehalten werden können. In einem ersten Entwicklungsschritt wurden die sogenannten "MINUSHEETS" konstruiert (Abb. 1) (MINUTH W.W., 1992 a, b).

Es handelt sich hierbei um dünne Scheibchen mit einer konzentrischen Halterung. Der Vorteil dieser Scheibchen besteht darin, daß für jede Zellart eine Vielzahl von unterschiedlichen Trägermaterialien für die optimale Differenzierung der Zellen eingesetzt werden kann. Jedes bioverträgliche, membranartige Material eignet sich für diese Versuche. Ein weiterer besonderer Vorteil der MINUSHEETS besteht darin, daß auch beliebig dünne biologische Häutchen als Zellunterlage verwendet werden können.

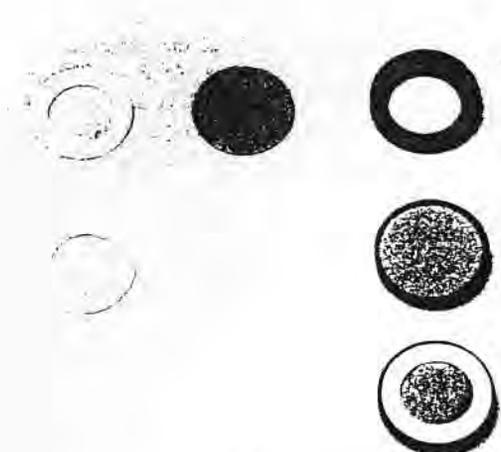


Abb. 1. MINUSHEET-Zusammenbau

Sehr gute Erfahrungen wurde z.B. mit der Capsula fibrosa von Säugermieren gemacht (MINUTH W.W. und RUDOLPH U., 1990). In einem zweiten Entwicklungsschritt wurden für die MINUSHEETs verschiedene Zellkulturbehälter konstruiert, die eine permanente Perfusion mit Kulturmedium erlauben. Um das gesamte neue Kultursystem automatisch betreiben zu können, wurde schließlich in einem dritten Entwicklungsschritt ein Perfusionsbioreaktor mit integriertem Pumpenstand, Kultur- und Mediumkompartiment sowie einer integrierten elektronischen Überwachung gebaut (MINUTH W.W. et al., 1992 b).

### 2.1. Die Verbindung zwischen neuer und alter Zellkulturtechnik

Die kompatiblen MINUSHEET-Zellhalterungen sind sowohl in klassischen Zellkulturgefäßen wie auch in den neuen Perfusionsbehältern verwendbar. Sie bilden somit eine Brücke zwischen konventioneller und neuer Methode (MINUTH W.W., 1991).

### 2.2. Verwendung der MINUSHEETs in klassischen Kulturgefäßen

Für ein Experiment wird eine Zellunterlage ausgewählt und in die MINUSHEET-Halterung eingelegt (Abb. 1). Danach wird das Sheet am besten in Ethanol oder Dampf sterilisiert. Es kann anschließend in jedes beliebige Zellkulturgefäß, z.B. in eine 24-well Gewebekulturplatte eingelegt werden (Abb. 2). Danach werden das Kulturmedium und die Zellen aufpipettiert. Die Zellen lassen sich nach kurzer Zeit auf dem MINUSHEET nieder. Bis zum völligen Anhaften können die Zellen auf ihrer spezifischen Unterlage in einem ganz gewöhnlichen  $\text{CO}_2$ -Inkubationsschrank beliebig lange gehalten werden.

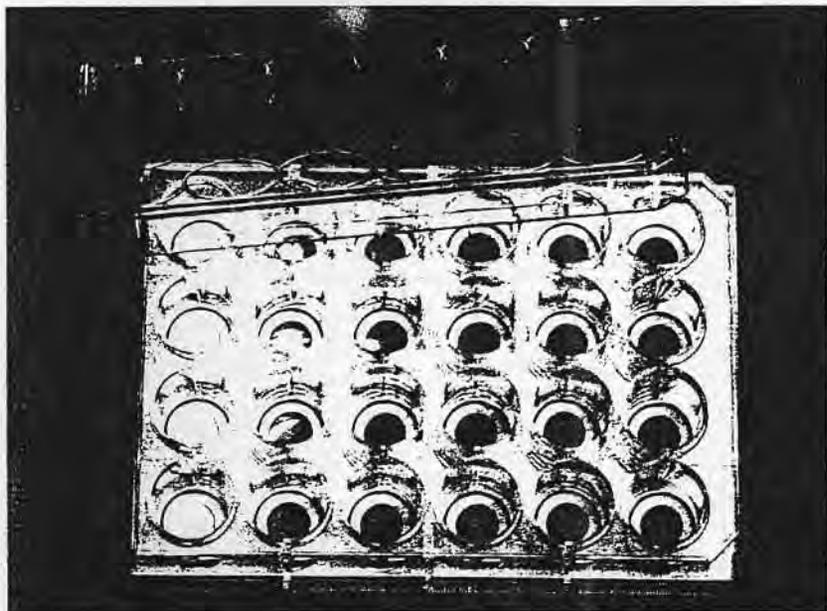


Abb. 2. MINUSHEETS in 24-well Kulturplatte

### 2.3. Die MINUSHEETS eignen sich besonders gut für Perfusionskulturexperimente (Abb. 3)

Da die Sheets keine hohe laterale Wandung besitzen, sondern flache Scheibchen darstellen, sind sie leicht stapelbar. Mit einer Pinzette können die Sheets aus der Kulturschale entnommen und in einen Perfusionskulturbehälter eingesetzt werden (Abb. 3). Nach Schließen des Deckels wird das Kulturmedium auf der Bodenseite des Gefäßes eingepumpt und an der Oberseite wieder abgeführt. Damit können die Zellen einem permanenten Flüssigkeitsstrom mit neuem Kulturmedium ausgesetzt werden.

#### 2.3.1. Die Gradientenperfusionskammer

Die Kultivierung von Epithelzellen unter nahezu natürlichen Bedingungen ermöglicht die Gradientenperfusionskammer (Abb. 4).

Zur benutzerfreundlichen Bedienung müssen während dem Öffnen und Schließen der Kammer keine Schläuche gekoppelt werden. Nach dem Öffnen der Kammer werden die mit Zellen bewachsenen MINUSHEETS mit einer Pinzette in die Kammervertiefung eingesetzt. Durch Schließen des Deckels wird das Sheet automatisch zentriert und die Kammer dicht verschlossen. Da das mit Zellen bewachsene MINUSHEET die Kammer in ein oberes und unteres Kompartiment teilt, können die Zellen von oben und unten separat mit ganz unterschiedlichen Kulturmedien durchströmt werden. Damit können hypotone und hypertone Kulturmediumgradienten angelegt werden, wie sie z.B. in der Niere und in vielen anderen Organen vorkommen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß jetzt von basal oder luminal ganz gezielt Hormone, Wach-

tumsfaktoren oder Pharmaka kontinuierlich und unter realitätsnahen Bedingungen appliziert werden können.

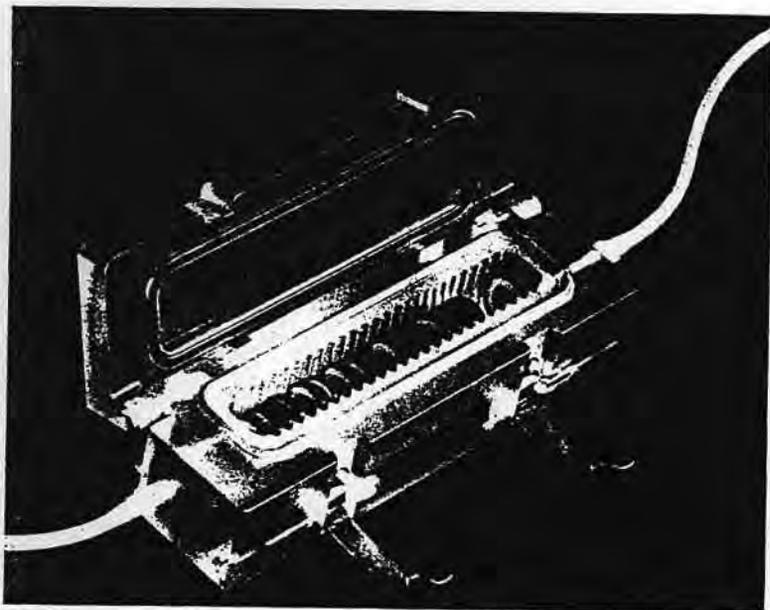


Abb. 3. Perfusionskulturbehälter

#### 2.4. Die neue Qualität an renaler Zellkultur

Die Perfusionskultur von embryonalen Sammelrohrzellen der Säugerniere ergab eine bisher nicht gekannte Qualität an Differenzierungsleistung (MINUTH W.W. et al., 1993).

##### 2.4.1. Vorkultur der renalen Zellen

Dünne Capsula fibrosa Häutchen der Niere von neugeborenen New Zealand Kaninchen (MINUTH W.W., 1987) wurden in die MINUSHEET-Halterung (MINUTH W.W. et al., 1992a, b) eingespannt. Die häutchenartigen renalen Präparate bestanden aus der Capsula fibrosa, nephrogenem Blastem, S-shaped bodies und den Sammelrohrampullen. Werden solche Zellpräparate in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM/25 mM HEPES) mit 10% fetalem Kälberserum kultiviert, dann wachsen die Zellen der Sammelrohranlagen aus. Die Sammelrohrzellen überwachsen das gesamte Explant und bilden innerhalb von 24 Stunden ein polar differenziertes Epithel von vielen mm<sup>2</sup>. Die Vorkultur der Zellen wurde in einem Heraeus Gewebekulturschrank (Hanau, FRG) bei 37°C und in feuchtigkeitsgesättigter Luftatmosphäre (5% CO<sub>2</sub>/95% Luft) durchgeführt.

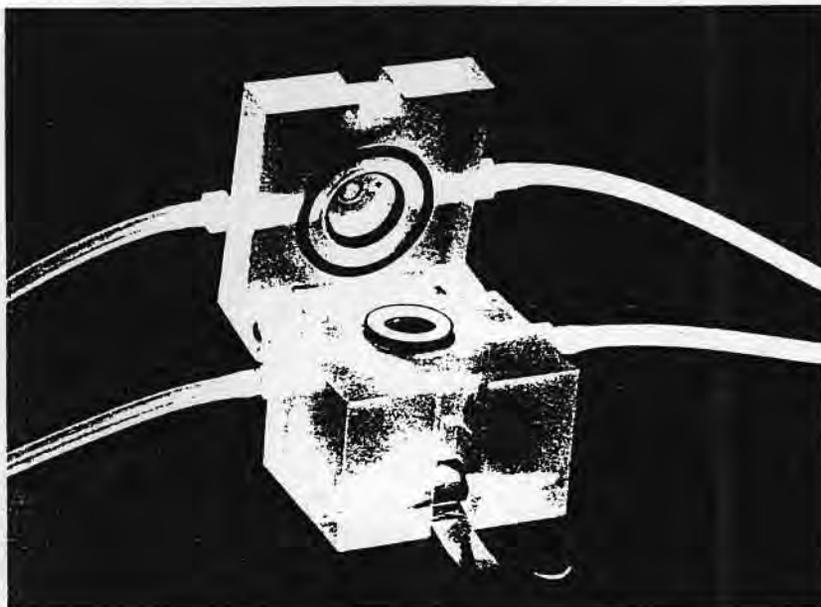


Abb. 4. Gradientenperfusionskulturkammer

#### 2.4.2. Perfusionskultur

24 Stunden nach Beginn der Vorkultur wurden sechs etablierte Sammelrohrethelien auf der Zellhalterung mit einer feinen Pinzette in den Perfusionskulturbehälter überführt (Abb. 3) und wie Münzen in einer Geldrolle gestapelt. Durch einen basalen Einstromkanal und einen oberen Auslaß kann für beliebig lange Zeit jetzt Kulturmedium durch den Kulturbehälter durchströmt werden. In unserem Fall wurden die Sammelrohrethelien mit IMDM/25 mM HEPES und 1% antibiotisch-antimykotischer Lösung (Gibco Life Technology, Eggenstein, FRG) für 13 Tage perfundiert. Das Medium wurde in Schott Glasflaschen (500 ml), die mit speziellen Schraubkappen (Nr. 47622, TECHNOMARA, Fernwald, FRG) versehen waren, aufbewahrt. Medienflaschen, Kulturbehälter und Auffangflasche werden über Silikonschläuche mit einem Innendurchmesser von 1 mm über Standard-Luerverschlüsse verbunden. Die Durchströmungsrate des Kulturmediums betrug 1 ml/h.

#### 2.4.3. Perfusionskulturmedien

IMDM/25 mM HEPES mit 1% antibiotisch-antimykotischer Lösung diente als Kontrollmedium. Aldosterone ( $1 \times 10^{-7}$  M), Vasopressin ( $1 \times 10^{-6}$  M) und Insulin ( $1 \times 10^{-6}$  M) wurden den Medien in den einzelnen Versuchen beigelegt.

Kulturmedien wurden von Gibco-BRL Life Technologies (Eggenstein, FRG), Aldosteron (Aldocorten) von Ciba Geigy Wehr (Baden, FRG), Vasopressin (AVP) und Insulin von Sigma (Deisenhofen, FRG) bezogen.

#### 2.4.4. Ergebnisse

Mit unseren bisherigen Experimenten konnten wir zeigen, daß in der Perfusionskultur neben hellen Zellen auch dunkle Zellen zu erzeugen sind (MINUTH W.W. et al., 1992 a, b; 1993). Histochemische Analysen mit fluoreszierenden Peanut-Agglutinin ergaben, daß die dunklen Zellen dem  $\beta$ -Typ zugeordnet werden können (SCHWARTZ G.J. et al., 1988).

Die Bildung der dunklen Zellen vom  $\beta$ -Typ konnte außerdem hormonell beeinflusst werden: Während in Kontrollen ohne Hormonzusatz nur etwa 8% dunkle Zellen gefunden wurden, konnte in Aldosteron behandelten Epithelien 72% und in Aldosteron/Insulin behandelten sogar 90% dunkle Zellen festgestellt werden. Dagegen wurden in Aldosteron/Vasopressin behandelten Epithelien nur 44% dunkle Zellen gefunden. Vasopressin oder Insulin allein vermochte nur 15% dunkle Zellen zu bilden. Die Versuche belegen, daß überraschenderweise das Steroidhormon Aldosteron die Bildung von dunklen Zellen zu steuern vermag (MINUTH W.W. et al., 1993).

### 3. Allgemeine Perspektiven mit der neuen Technik

#### 3.1. Niere

Epithelien der Säugermiere können jetzt von luminal und basal in ganz unterschiedlichen Flüssigkeiten kultiviert werden. Damit lassen sich z.B. mit der neuen Technik erstmals die hohen (1200 mOsm) und niedrige (150 mOsm) Flüssigkeitsgradienten simulieren, wie sie im corticopapillären Verlauf der Niere an den Epithelien vorgefunden werden.

#### 3.2. Leber

Ein weiteres Forschungsfeld sind Leberzellen, die mit der Perfusionsmethode über einen Zeitraum von mehreren Monaten kultiviert werden können. Die Methode ermöglicht außerdem, daß sich in Kultur ein Blut- und Gallenkompartiment aufbauen läßt. Dadurch lassen sich z.B. von einer Seite Pharmaka zuleiten. Auf eine sehr einfache Art kann so die Pharmakokinetik von solchen Substanzen nach Passieren der Zellen untersucht werden.

#### 3.3. Innenauskleidung von Blutgefäßen

Endothelzellen können jetzt unter nahezu natürlichen Bedingungen kultiviert werden, da sämtliche rheologische Bedingungen auf eine sehr einfache Art simuliert werden können.

#### 3.4. Blut-Hirnschranke

Mit der neuen Technik ließe sich ganz ideal ein Blut-Hirnschrankenmodell aufbauen. Dazu könnten Endothelzellen auf der einen Seite, Astrozyten auf der anderen Seite der MINUSHEETS kultiviert werden. Unter optimalen Bedingungen ließen sich in der Gradientenkammer dann Permeationsversuche mit den verschiedensten Substanzen durchführen.

### 4. Schlußbemerkung

Die MINUSHEET-Technik könnte dazu beitragen, organspezifische Zellkulturen entscheidend zu verbessern und damit die kultivierten Zellen vergleichbar mit den dazugehörigen Organstrukturen werden zu lassen.

Anmerkung: Alle Teile der MINUSHEET-Technik sind jetzt in Serie aufgelegt und zu beziehen über Minucells und Minutissue, KATHARINA LORENZ-MINUTH, Starenstr. 2, D-8403 Bad Abbach, FRG.

*Die Untersuchung wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Mi 331/2-5). Besonderer Dank gilt meiner technischen Mitarbeiterin Frau MARION KUBITZA.*

## Literatur

- GSTRAUNTHALER G.J.A., Epithelia cells in tissue culture, *Renal Physiol Biochem* II, 1-42, 1988
- HORSTER M., Tissue culture in nephrology: potential and limits for the study of renal disease, *Klin Wochenschr* 58, 965-973, 1980
- JAKOBY W.B. and PASTAN I.H., Cell culture, *Methods Enzymology* 58, Academic press, 1979
- KREISBERG J.I. and WILSON P.D., Renal cells in culture, *J Electron Mic Tech* 9, 235-263, 1988
- KRIZ W. and KAISLING B., Structural organization of the mammalian kidney, in: SELDIN D.W., GIEBISCH G. (Hrsg), *The kidney: physiology and pathophysiology*, New York: Raven Press, 265-306, 1985
- MINUTH W.W., Neonatal rabbit kidney cortex in culture as tool for the study of collecting duct formation and nephron differentiation, *Differentiation* 36, 12-22, 1987
- MINUTH W.W. and GILBERT P., The expression of specific proteins in cultured renal collecting duct cells, *Histochem* 88, 435-441, 1988
- MINUTH W.W., GILBERT P., GROSS P., Appearance of specific proteins in the apical plasma membrane of cultured renal collecting duct epithelium after chronic administration of aldosterone and vasopressin, *Differentiation* 38, 194-202, 1988
- MINUTH W.W. and RUDOLPH U., A compatible support system for cell culture in biomedical research, *Cytotechnology* 4, 181-189, 1990
- MINUTH W.W., Eine Möglichkeit adherente Zellen unter natürlichen Bedingungen zu kultivieren, *ALTEX (Alternat. Tierexp.)* 15, 18-30, 1991
- MINUTH W.W., DERMETZEL R., KLOTH S., HENNERKES B., A new method culturing renal cells under permanent superfusion and producing a luminal-basal medium gradient, *Kidney Int* 41, 215-219, 1992a
- MINUTH W.W., STÖCKL G., KLOTH S., DERMETZEL R., Construction of an apparatus for perfusion cell cultures which enables in vitro experiments under organotypic conditions, *Eur J Cell Biol* 57, 132-137, 1992b
- MINUTH W.W., FIETZEK W., KLOTH S., AIGNER J., HERTER P., RÖCKL W., KUBITZA M., STÖCKL G., DERMETZEL R., Aldosterone modulates the development of PNA binding cell isoforms within renal collecting duct epithelium kept in perfusion culture, *Kidney Int.*, 1993, in press
- SCHWARTZ G.J., SATLIN L.M., BERGMAN J.E., Fluorescent characterization of collecting duct cells: a second H<sup>+</sup>-secreting type, *Am J Physiol* 255, 1003-1014, 1988