

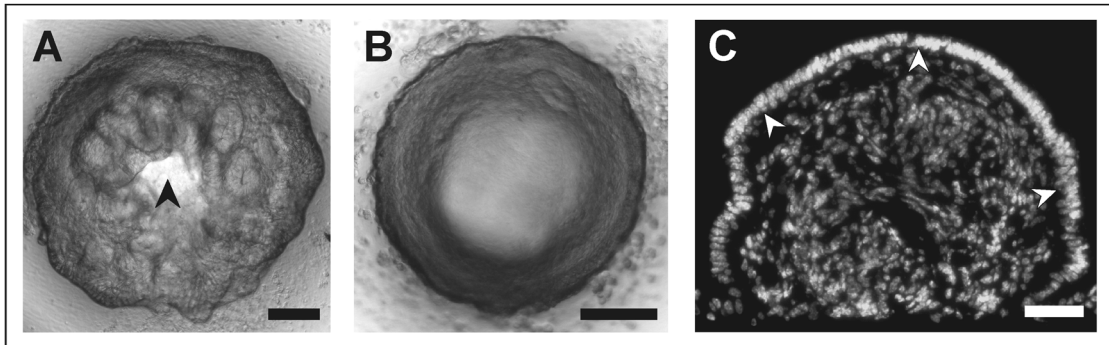
## **FKZ 2552: Die intestinale, organotypische Gewebekultur**

Prof. Dr. Ulrich Drews,  
Dr. Lothar Just  
Anatomisches Institut  
Universität Tübingen  
Österbergstr. 3  
72074 Tübingen

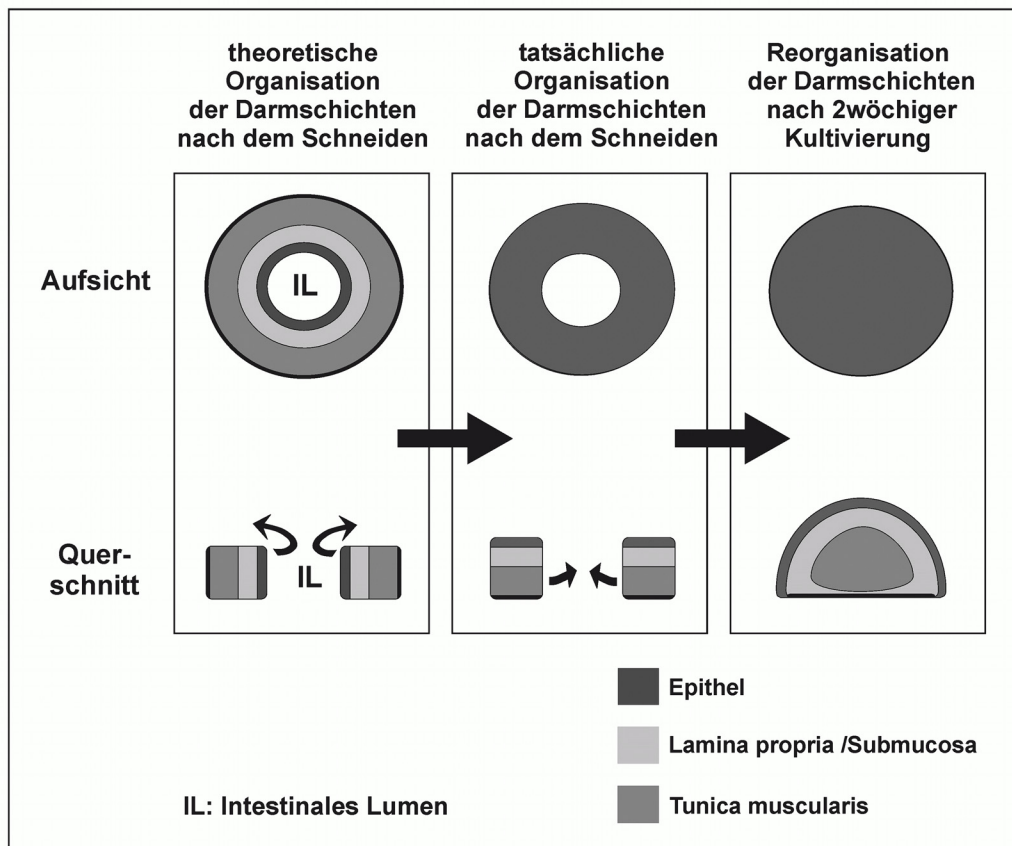
Das Darmschleimhautepithel gehört zu den regenerativsten Geweben des Organismus. Die Proliferation der Stammzellen, die Differenzierung der Tochterzellen zu Enterozyten, Becherzellen und enteroendokrinen Zellen sowie die apoptotischen Vorgänge unterliegen hochkomplexen Mechanismen, die auch von den Zellen des umgebenden Bindegewebes beeinflusst werden (Mills und Gordon, 2001; van den Brink *et al.*, 2001; Marshman *et al.*, 2002).

Für die detaillierte Analyse entwicklungsabhängiger Mechanismen zur Zellproliferation und Zelldifferenzierung von intestinalen Stamm- und Vorläuferzellen sind neben den *in vivo*-Experimenten entsprechende Zellkultur-Modelle notwendig. Die Verwendung von zweidimensionalen Monolayerkulturen stößt dabei oft an ihre Grenzen, da die Zusammensetzung der Zelltypen der Darmmukosa und die Ausbildung eines epithelähnlichen Zellverbandes der *in vivo*-Situation nicht gerecht werden. Funktionale dreidimensionale Zellkulturmodelle bieten dagegen die Möglichkeit, die Zell-Zellinteraktionen zwischen intestinalen Epithelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen oder neuronalen Zellen und deren entwicklungsabhängige Differenzierung im dreidimensionalen Raum zu verfolgen (Abud *et al.*, 2005; Goodwin *et al.*, 1993).

Zur Herstellung der Darmkulturen wurde das Colon fötaler Mäuse (E18) unter sterilen Bedingungen in 200 µm dicke Darmringe geschnitten und das Gewebe auf Membransätze für bis zu drei Wochen kultiviert (Abb. 1), (Metzger *et al.*, 2007). Bei dieser Methode werden die Gewebeschnitte an der Luft/Medium-Grenze kultiviert (Stoppini *et al.*, 1991). Dies gewährleistet gleichzeitig eine ausreichende Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des Gewebeverbandes. Die „offene“ Kulturmethode erlaubt weiterhin eine gute Zugänglichkeit des Gewebes sowohl für biochemische und elektrophysiologische Methoden als auch für zellbiologische Manipulationen.



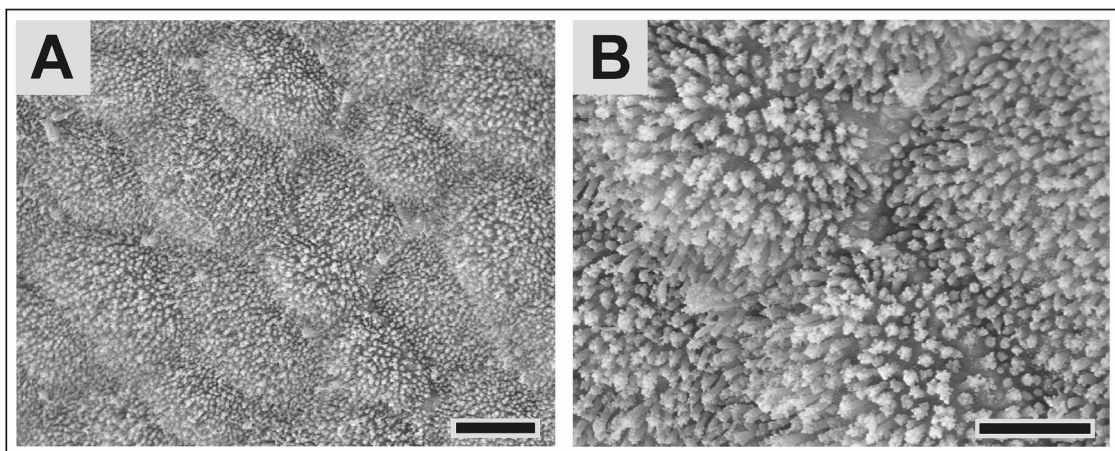
**Abb. 1:** Dreidimensionale Darmgewebekulturen hergestellt aus dem Darm einer fötalen Maus. **A:** Hellfeldaufnahme eines frisch kultivierten Darmschnitts, der auf eine Mikromembran positioniert wurde. Der Pfeilkopf zeigt auf den zellfreien Bereich im Zentrum des Schnitts. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ . **B:** Darmgewebekultur, die für 14 Tage kultiviert wurde. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ . **C:** Fluoreszenzaufnahme eines DAPI-gefärbten Paraffinquerschnittes durch eine für 7 Tage kultivierte Gewebekultur. Die Pfeilköpfe weisen auf die Zellkerne der epithelialen Zellen der Kulturoberfläche. Größenbalken: 50  $\mu\text{m}$



**Abb. 2:** Schematische Darstellung zur Reorganisation der dreidimensionalen Darmschnittkultur im Laufe der Kultivierung. Der linke Teil zeigt die theoretische Orientierung der Darmschichten nach dem Schneiden mit dem *Tissue chopper* in Aufsicht- und Querschnittsdarstellung; IL: Intestinales Lumen. Im mittleren Teil wird die tatsächliche Orientierung in vereinfachter Form dargestellt. Direkt nach dem Schneidevorgang kommt es durch die gewebsinterne Spannung des Darmrings zu einer Lageveränderung der intestinalen Schichten. Die Darmschleimhaut wird dabei zur oberen und seitlichen Position hin gedreht, während die Muskelschichten um etwa 90 Grad umgeklappt werden. Der zellfreie Raum im Zentrum bleibt dabei erhalten und kann für Zellimplantationen genutzt werden. Im rechten Abbildungsteil wird die Reorganisation der Gewebszellen nach einer 7tägigen Kulturdauer verdeutlicht. Der zentrale zellfreie Raum ist verschwunden. Die epithelialen Zellen bedecken die gesamte Oberfläche der Kultur, während die Muskelzellen im mittleren unteren Bereich der Kultur lokalisiert sind.

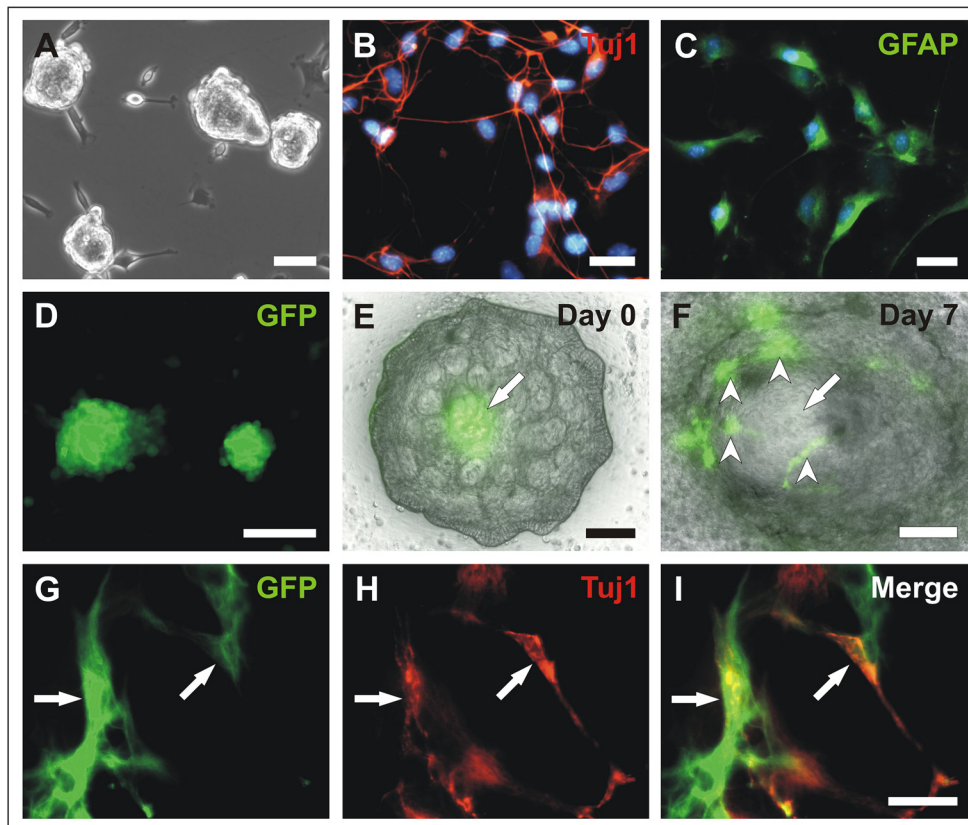
Während der Präparation kommt es direkt nach dem Schneidevorgang durch die gewebeinterne Spannung des Darmrings zu einer Lageveränderung der intestinalen Schichten (Abb. 2). Innerhalb von 7 Tagen reorganisierten sich die Zellen im Gewebe neu. Danach bedeckte ein iso- bis hochprismatisches Mikrovilli-aufweisendes Epithel die Gesamtkulturoberfläche (Abb. 3), während sich die Muskelzellen im mittleren unteren Bereich der Gewebekultur positionierten.

Histologische Analysen zeigten, dass sich die Gewebekultur aus über 35 übereinanderliegenden Zellschichten zusammensetzte. Dabei konnten in den Kulturen typische intestinalen Zellen, wie Enterozyten, Becherzellen, glatte Muskelzellen, Gliazellen und enterische Neurone immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch detektiert werden. Etwa 24 h nach Anlegen der Kulturen begannen sich die Gewebe autonom zu kontrahieren. Durch Inkubation des Neurotransmitters Serotonin und des Natriumkanalblockers Tetrodotoxin ließ sich die autonome Kontraktionsfrequenz der glatten Muskelzellen in der Darmgewebekultur modulieren.



**Abb. 3:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche einer fötalen Darmgewebekultur, die für 14 Tage kultiviert wurde. **A:** Übersichtsaufnahme des epithelialen Zellverbands. Größenbalken: 2  $\mu\text{m}$ . **B:** Vergrößerte Darstellung der Mikrovilli-tragenden Oberflächenepithelzellen. Die Aufnahme erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Manfred Rohde. Größenbalken: 1  $\mu\text{m}$ .

Das Darmgewebemodell eignet sich aber auch, um die Integrationsleistung von Stamm- und Vorläuferzellen aus den epithelialen oder neuralen Stammzellkompartimenten des Darms *in vitro* in einem dreidimensionalen Gewebverband zu untersuchen (Abb. 4).



**Abb. 4:** Implantation von enterischen Neurosphären in fötale Gewebekulturen des Kolons. **A:** Phasenkontrastaufnahme von proliferierenden enterischen Neurosphären. Größenbalken: 50  $\mu\text{m}$ . **B, C:** Immunfluoreszenz von  $\beta$ -Tubulin III (Tuj1)-positiven Neuronen (B, rot) und GFAP-exprimierenden Gliazellen (C, grün), die aus Neurosphären für 5 Tage differenziert wurden. Größenbalken: 25  $\mu\text{m}$ . **D:** Fluoreszenzaufnahme von eGFP-exprimierenden Neurosphären (grün) nach 2 Wochen *in vitro*. Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ . **E, F:** Transfer von eGFP-positiven Neurosphären in eine Darmgewebekultur. Fluoreszenzaufnahme der eGFP-positiven Zellen (grün) 1 h (E) und 7 Tage nach Implantation (F). Größenbalken für E und F: 100  $\mu\text{m}$ . **G, H, I:** *Whole mount*-Immunfluoreszenz einer Gewebekultur 7 Tage nach der Implantation von eGFP-exprimierenden Neurosphären. In G, H und I ist das gleiche Areal dargestellt. Größenbalken: 25  $\mu\text{m}$ . Fluoreszenzaufnahme von  $\beta$ -Tubulin III (Tuj1)-positiven Neuronen (G) und eGFP-exprimierenden Zellen (H). Kombinierte Fluoreszenzdarstellung (I). Die Pfeile zeigen auf eGFP-positive Neurone.

Für diese Experimente wurden Neurosphären aus dem Darm eGFP-exprimierender fötaler Mäuse (E18) hergestellt und entsprechend expandiert. Nach Implantation dieser Sphären in die zellfreien Zentren frisch angelegter Darmschnitte konnte in der weiteren Kultivierung die Integration des Implantats in den Zellverband der Gewebekultur analysiert werden.

Die intestinale Gewebekultur bietet neben der Möglichkeit, Implantationsexperimente mit Stammzellen durchzuführen, noch zwei weitere interessante Eigenschaften:

1. Die Ausbildung eines geschlossenen und intakten Epithelverbands erlaubt die Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen, bei denen die Epithelbarriere von Bedeutung ist. So sind beispielsweise Analysen Darm-rele-

vanter Pharmaka bezüglich deren Resorptions- und Penetrationsleistung denkbar.

2. Weiterhin spielt das Oberflächenepithel der Darmmukosa bei Interaktionen mit intestinalen Mikroorganismen und immunologischen Prozessen eine Rolle. Gerade für Untersuchungen von Initialisierungsvorgängen bei mikrobiologischen Infektionen durch pathogene Mikroorganismen, wie Stämmen von Shigellen, Salmonellen, Yersinien oder E.coli, ist ein intakter differenzierter Epithelverband des *in vitro*-Modells notwendig. Epithel-Monolayer-Kulturen können diese Bedingung nur unbefriedigend gewährleisten.

Die *in vivo*-ähnlichen Eigenschaften der Kulturen hängen von der dreidimensionalen Anordnung der verschiedenen Zellpopulationen im Gewebeverband ab. Die räumliche Struktur der Gewebekultur gewährleistet dabei den Aufbau unterschiedlicher funktionaler Mikrokompimente, entwicklungssteuernder Stoffgradienten innerhalb des Zellverbands sowie komplexer Zell-Zellinteraktionen im Verbund mit der extrazellulären Matrix. Auf Grund dieser Eigenschaften eröffnet das vorgestellte Gewebekultursystem neue Möglichkeiten, wissenschaftliche Fragestellungen bezüglich der Darmentwicklung, Regeneration und immunologischen bzw. pathologischen Prozessen zu untersuchen.

### **Literatur:**

- Abud, H.E., Watson, N., Heath, J.K., 2005. Growth of intestinal epithelium in organ culture is dependent on EGF signalling. *Exp. Cell Res.* 303, 252-262.
- Goodwin, T.J., Schroeder, W.F., Wolf, D.A., Moyer, M.P., 1993. Rotating-wall vessel coculture of small intestine as a prelude to tissue modeling: aspects of simulated microgravity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202, 181-192.
- Marshman, E., Booth, C., Potten, C.S., 2002. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24, 91-98.
- Metzger, M., Bareiss, P.M., Nikolov, I., Skutella, T., Just, L., 2007. Three-dimensional slice cultures from murine fetal gut for investigations of the enteric nervous system. *Dev. Dyn.* 236, 128-133.
- Mills, J.C., Gordon, J.I., 2001. The intestinal stem cell niche: there grows the neighborhood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 12334-12336.
- Stoppini, L., Buchs, P.A., Muller, D., 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37, 173-182.
- van Den Brink, G.R., de Santa, B.P., Roberts, D.J., 2001. Development. Epithelial cell differentiation--a Mather of choice. *Science* 294, 2115-2116.