

Prof. Minuth über seine revolutionäre Zellkultur-Technik

Erster Schritt auf dem Weg zur künstlichen Leber

Hochdifferenzierte Zellen gedeihen unter fast natürlichen Wachstumsbedingungen – In Perfusionskammern wachsen Ko-Kulturen diverser Zellen miteinander

Nach Ansicht eines Regensburger Anatomen wurde seit Jahrzehnten die „Lebensqualität“ von Zellen in Kultur und damit die Aussagekraft von Zellversuchen sträflich vernachlässigt: Dem hat Professor Dr. rer. nat. Will W. Minuth, Direktor des Anatomischen Instituts der Universität Regensburg, mit einer von ihm erfundenen Kulturmethode abgeholfen. Täglich erlebt der Wissenschaftler, daß unter den weitgehend natürlichen Wachstumsbedingungen auch hochdifferenzierte Zellen prächtig gedeihen. Seine „speziellen Freunde“ zeitigen bisher nicht für möglich gehaltene Ergebnisse. Künftig wird man in der Lage sein, den Zellstoffwechsel automatisch „on line“ zu registrieren und Pharmaka ohne Tierversuche zu prüfen. Für **ÄRZTLICHE PRAXIS** hat Dr. med. Lothar Reinbacher den Erfinder besucht.

ÄP: Herr Professor Minuth, Ihre sensationell anmutende Erfindung, die Sie – quasi als Handelsvertreter in Sachen Wissenschaft – auf der **BIO-TECHNICA '91** in Hannover vorgestellt haben, verleitet zu der Frage: Wann bauen Sie die erste künstliche Leber?

Minuth: Jetzt – wenn Sie wollen. Dazu muß ich Ihnen zuerst erklären, warum die Simulation eines differenzierten Organgewebes mit den seit etwa 50 Jahren gebräuchlichen Methoden nicht gelingen kann. Zellen werden meist in Petrischalen aus Plastik gehalten, in denen sie sich schwimmend vermehren, oder sie werden auf einer undurchlässigen Unterlage zum Anhaften gebracht.

Die klassischen Methoden sind für die Vermehrung der meisten kontinuierlichen Zelllinien, mit denen heute in zellbiologischen Labors gearbeitet wird, gut geeignet. Und da die transformierten Zellen gut wachsen, bestand für viele Wissenschaftler wenig Anreiz, sich über bessere Techniken den Kopf zu zerbrechen.

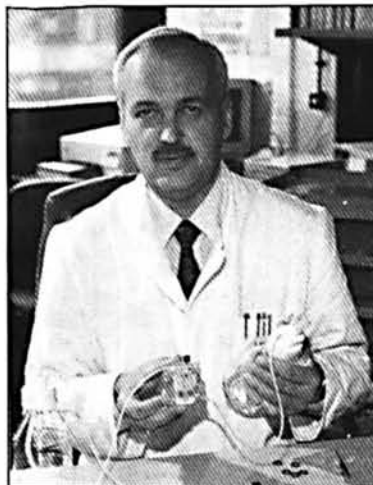
ÄP: Was ist bei Ihrem Verfahren so anders?

Minuth: Unsere spezifischen Organzellen wachsen auf extrem dünnen, fingernagelgroßen Trägerscheibchen, die wir *Minusheets* nennen. Diese können aus organspezifischem, Basalmembran-ähnlichem Material bestehen, also entweder aus beliebigen biotragfähigen Kunststoffen oder aus organischen Häutchen oder Faszien. Die ringförmige Halterung der Minusheets gestattet es, daß sich die Zellunterlagen in speziellen Kulturbehältern wie Münzen in Form von Geldrollen

„Auf extrem dünnen Trägerscheibchen aus Basalmembran-ähnlichem Material wachsen die spezifischen Organzellen. Die Scheibchen werden permanent und kontrollierbar von Nährlüssigkeit umspült.“

len stapeln lassen und dennoch eine kleine Distanz zum Nachbarscheibchen halten.

Die Scheibchen werden in den Kul-



Prof. Will Minuth mit Grundelementen seines Zellzüchtungssystems

Foto: L. Reinbacher

turbehältern permanent und kontrollierbar von Nährlüssigkeit umspült. Dabei werden Stoffwechselprodukte weggeschwemmt. Zunächst aber geben wir unseren Zellen in einer klassischen Kulturschale Gelegenheit, sich auf den Scheibchen anzuheften.

ÄP: Wie viele solcher Scheibchen können Sie über- oder nebeneinanderschichten?

Minuth: Momentan bis zu 24 Minusheets. Der Bau größerer Perfusionskammern ist ohne weiteres möglich. Bedeutsam ist, daß wir in den Perfusionskammern Ko-Kulturen von unterschiedlichen Zelltypen zusammenstellen können – und damit kommen wir auf das *Modell einer „künstlichen Leber“* zu sprechen:

Ich markiere, um dies sichtbar zu machen, einige Scheibchen mit den Buchstaben E für Endothelzellen aus

Blutgefäßen, L für Leberparenchymzellen und K für Kupfer-Zellen und stecke sie mit einer Pinzette binnen Sekunden in die dafür vorgesehenen Vertiefungen der Perfusionskammer. In der Reihenfolge ELK ELK ELK ELK besitze ich nun eine Batterie von drei unterschiedlichen, funktionstüchtigen Zellen aus der Leber.

ÄP: Würden diese drei Zelltypen genügen, um wenigstens für kurze Zeit die Entgiftungsfunktion einer geschädigten Leber übernehmen zu können?

Minuth: Biotechnologisch müßte das ohne weiteres machbar sein, wenn die Perfusionskammern genügend groß dimensioniert sind. Allerdings sollten wir zuerst einmal mit Experimenten beginnen und die Ergebnisse abwarten, da unsere experimentelle Erkenntnis hier endet.

Ich kenne zum Beispiel nur wenige Arbeiten über Endothelzellen, die unter Durchflußbedingungen gezüchtet

„Mit drei unterschiedlichen, funktionstüchtigen Zelltypen aus der Leber könnte man die Entgiftungsfunktion einer geschädigten Leber ohne weiteres übernehmen, wenn die Perfusionskammern genügend groß dimensioniert sind.“

wurden, ich kenne so gut wie keine Arbeiten über Leber- oder Kupfer-Zellen, die unter Perfusionsbedingungen gehalten wurden. Unsere Methode wird ein leichtes experimentelles Arbeiten unter solchen Bedingungen ermöglichen. Die drei erwähnten Zell-

arten würden genügen, um mit einem solchen Lebermodell toxikologische Untersuchungen zu starten.

ÄP: Haben Sie bereits praktische Versuche in dieser Richtung unternommen?

Minuth: Unsere hervorragenden Erfahrungen mit Nierenzellen geben uns die Gewißheit, daß mit Hilfe unserer Technik auch Leberzellen über viele Wochen voll funktionstüchtig bleiben würden. Lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Bilder vom Sammelrohpithel der Niere zeigen, daß die Epithelzellen bereits verschiedene Funktionen übernommen haben. Das läßt sich auch immunhistochemisch nachweisen. Wir arbeiten schon seit langer Zeit mit Nierenzellen und stellen jetzt mit Freude fest, daß wir etwas geschafft haben, was bisher nicht möglich war.

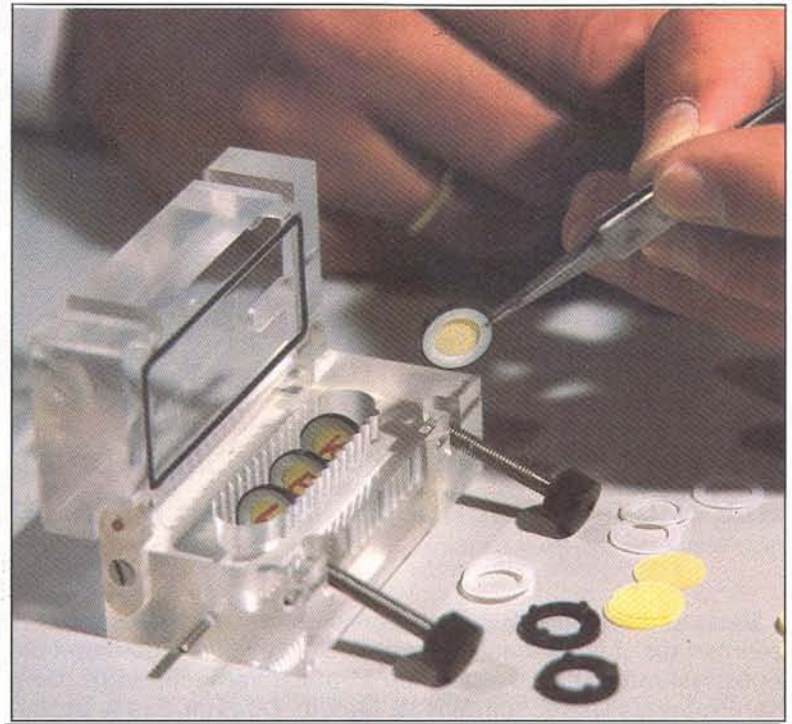
ÄP: Wie lange leben die Nierenzellen in der Perfusionskammer?

Minuth: 30 bis 50 Tage. Schon nach kurzer Zeit vermehren sie sich nicht mehr und unterliegen einer Kontakt-Inhibition. Das heißt, sie nehmen

denselben Zustand an wie im Organ, sie verhalten sich ruhig und gehen sozusagen ihrer Arbeit nach. Sie lösen sich weder von der Unterlage ab noch wuchern sie, wie das bei der konventionellen Zellzüchtung häufig der Fall ist.

ÄP: Sie sagten, der Stoffwechsel der Zellen ließe sich registrieren. Wie hat man sich das vorzustellen?

Minuth: Wir verfügen über spezielle Gradienten-Perfusionsgehäuse, die aus zwei Kammern bestehen, von denen jede einen Zufluß- und einen Abflußschlauch besitzt. Die Minusheets bilden die Kammertrennwand. So können die Kulturzellen von beiden Seiten mit verschiedenen Perfusionslösungen gespült werden – zum Beispiel mit hypo- und hypertotonischer Lösung; denkbar ist auch die Gabe von Hormonen nur von einer Seite. Um etwa die Nierensituation zu simulieren, würde man beispielsweise die eine Seite der kultivierten Zellen mit Serum-haltigem Medium, die andere mit einer Harnstoff-Lösung bespülen. Das Effluat kann man dann sammeln und analysieren.



Perfusionskammer mit den 3 unterschiedlichen Zelltypen E, L und K („Leber“)

ÄP: Welche Perfusionslösung und welche Mengen sind dabei im Spiel?

Minuth: Es handelt sich um eine verbesserte Ringerlösung mit Salzen, Aminosäuren, Zucker und Stoffen, die das Zellwachstum beeinflussen. Die stündlichen Perfusionsraten liegen bei 0,5 ml. Unsere Kammern bieten einen weiteren Vorteil: Man kann die Schläuche mit winzigen Sensoren bestücken und nun quantitative und qualitative Durchflußmessungen vornehmen. Mit den Sensoren kann man Veränderungen des pH-Wertes sowie Na-, K- und Ca-Ionen ermitteln. Die Werte können *on line* abgelesen und kontinuierlich in einen Personal-Computer abgespeichert werden.

ÄP: Wäre das nicht ein höchst interessanter Aspekt für die Prüfung von pharmazeutischen Wirkstoffen?

Minuth: Gewiß. Man kann pharmakologische und toxikologische Wirkungen meines Erachtens an einem klar definierten Zelltyp viel besser untersuchen als am Tier. Am gesamten Nierenorgan wäre es nicht möglich, eine derart exakte Information zu bekommen, weil man es dort mit mindestens 25 verschiedenen Zelltypen zu

„Man kann pharmakologische und toxikologische Wirkungen an einem klar definierten Zelltyp viel besser untersuchen als am Tier.“

tun hat und nicht feststellen kann, was der eine und was der andere reguliert und wie die Zellen interagieren.

ÄP: Wie groß war die Resonanz in Hannover?

Minuth: Relativ gering bei den eingeladenen Gästen, unerwartet groß bei dem vorbeifließenden Publikum. Wir hatten viele Wochen vor der BIOTECHNICA mehr als 1 200 Prospekte an Institutionen und Firmen verschickt. Drei oder vier Pharmafirmen versprochen, einen Abgesandten zu schicken; ob sie am Stand waren, weiß ich nicht.

ÄP: Und die Tierschützer?

Minuth: Die dem Bundesgesundheitsamt angeschlossene „Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ergänzungs- und Ersatzmethoden zum Tierversuch“, kurz: ZEBET, hat unsere Unterlagen „zu den Akten ge-

nommen“ und will bei entsprechenden Anfragen auf unser Zellkultursystem verweisen. Forschungsmittel aus dem Ministerium für Forschung und Technologie stehen – obwohl wir sie schon vor zwei Jahren beantragt haben – nicht zur Verfügung.

ÄP: Eigentlich müßte doch die von den Tierversuchsgegnern unter Beschuß genommene Pharmaindustrie die sich bietende Möglichkeit, präzise Pharmatests an optimierten Zellkulturen vornehmen zu können, einer näheren Prüfung unterziehen. Was würde das denn kosten?

Minuth: Die Weiterentwicklung unseres Zellkultur-Verfahrens bis hin zur Marktreife würde wohl mit ein oder zwei Millionen Mark realisierbar sein. Dazu bedürfte es einer Firma, die Bioreaktoren in entsprechender Größe bauen und Plastikartikel herstellen kann. Während für sämtliche klassischen Zellkultur-Methoden Einwegartikel genügen, benutzen wir wiederverwendbares Material, dessen Herstellung gewisse Schwierigkeiten bereitet.

ÄP: Sind Sie so müllbewußt?

Minuth: Das ist nicht das primäre Problem. Die bei der klassischen Zellkultur-Technik üblichen Gerätschaften sind entweder gas- oder strahlensterilisiert und zum Wegwerfen be-

stimmt. Labors, die mit unserem System arbeiten wollen, müssen in der Lage sein, die Minusheets und Perfusionskammern vor jeder Beschickung mit Zellen zu sterilisieren. Nur Autoklaven sind erschwinglich und anwendungsfreundlich.

Gängige transparente Kunststoffe halten jedoch eine Temperatur von 130°C nicht ohne weiteres aus – weder beim Spritzgußverfahren noch bei der Hitzesterilisation. Es gibt zwar thermobeständige Kunststoffe, aber deren Fließeigenschaften sind anders als die der bisher verwendeten Stoffe. Offenbar hat die herstellende Industrie noch zu wenig Erfahrung mit transparenten und thermostabilen Kunststoffen.

ÄP: Was würde ein Versuch kosten?

Minuth: Eine Spritzgußform kostet etwa 15 000 bis 30 000 Mark. Die Industrie will sich nicht mit solchen konstruktiven Problemen herumschlagen. Die Hersteller von Laborartikeln machen mit den heute verfügbaren Einweg-Labormaterialien einen sicheren Umsatz und scheuen Experimente. Diese sollen wir vornehmen.

ÄP: Und dazu fehlt Ihnen das Kapital und die Zeit.

Minuth: Ich hatte auf diesem Sektor nicht mit derartig vielen Hemmnissen gerechnet. Es reicht heute nicht aus,

ein Patent zu schreiben und nach zwei Jahren mit viel Mühen durchzusetzen. Der Erfinder muß außerdem Prototypen bauen und zeigen, daß die neue Methode funktioniert. Diese Phasen sind finanziell ganz schwer durchzustehen.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) hat uns gefördert, die Universität Regensburg hat uns unterstützt. Ich habe das Bundesministerium für Forschung und Technologie und die Humboldt-Stiftung um Forschungsgelder gebeten – ohne Erfolg. Jetzt haben wir einen Antrag beim „Geldsofort-Programm neue Werkstoffe“ des Freistaates Bayern gestellt: Wir wollen thermostabile Kunststoffe auf ihre Eignung für die Biotechnologie untersuchen.

ÄP: Kann man die kleinen Ringe nicht stanzen?

Minuth: Dann sind sie nicht paßgenau genug.

ÄP: Wer hat den Messestand in Hannover bezahlt?

Minuth: Der Freistaat Bayern und die Landesgewerbeanstalt haben uns zu dieser Messe eingeladen. Das Bayerische Staatsministerium für Wirtschaft und Verkehr fördert den Technologietransfer von den Universitäten zur Wirtschaft und unterstützt Kooperationen, besonders in den industriell wenig erschlossenen Randgebieten des Freistaates.

ÄP: Wenn sich Wissenschaftler bei Ihnen melden und das Kultursystem erproben wollen – müssen Sie die wegschicken?

Minuth: Keineswegs. Wir in unserem Institut bleiben auf alle Fälle bei dem Minusheet-System, weil es für unsere Arbeit einen unverzichtbaren Fortschritt bedeutet. Ernsthaftes Interesse, die mit diesem System ar-

„Am Organ Niere wäre es nicht möglich, eine derart exakte Information zu bekommen, weil man es da mit mindestens 25 verschiedenen Zelltypen zu tun hat.“

beiten wollen, bekommen von uns das erforderliche Wissen und die notwendigen Gerätschaften.

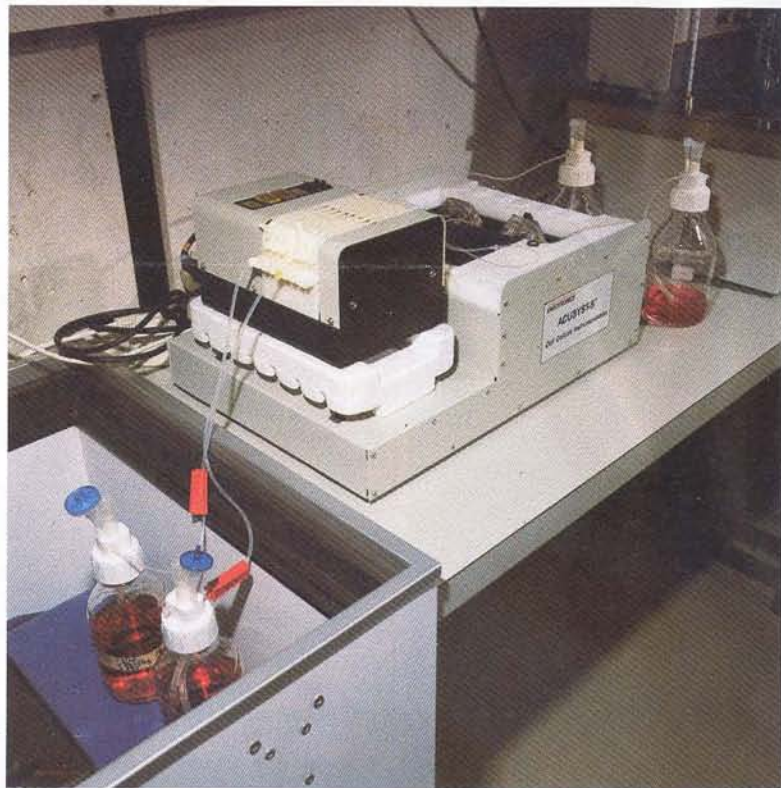
ÄP: In den handgefertigten Präzisionsartikeln steckt viel Geld. Wer hat das bezahlt?

Minuth: Das sind private Gelder. Bisher habe ich mehrere hunderttausend Mark in das Projekt gesteckt.

ÄP: Heißt das – aus der eigenen Schatulle?

Minuth: Ja, wir haben unsere Sparbücher geplündert, und meine Frau hat zusätzlich eine Menge Geld zugeschossen, weil sie von dem System überzeugt ist. – Das war ein großes Opfer. Aber man muß zur richtigen Zeit am richtigen Ort investieren.

Sonderdrucke können angefordert werden bei Prof. Dr. rer. nat. Will W. Minuth, Direktor des Anatomischen Instituts der Universität Regensburg, Universitätsstraße 31, W-8400 Regensburg.



Die von der Regensburger Arbeitsgruppe Minuth entwickelte Laborversion des Zellkultur-Perfusors