

# Minusheets – ein neuer Weg zur organspezifischen Zellkultur

Sollen Tierversuche weiter eingeschränkt werden, muß man die Funktion ganzer Organe in Zellkulturen nachahmen. Dazu brauchen die Zellen ein Milieu, das dem im Körperinneren möglichst nahekommt. Ein System, das diese Forderung erfüllt, konnte nun erstmals entwickelt werden.

Von Will W. Minuth

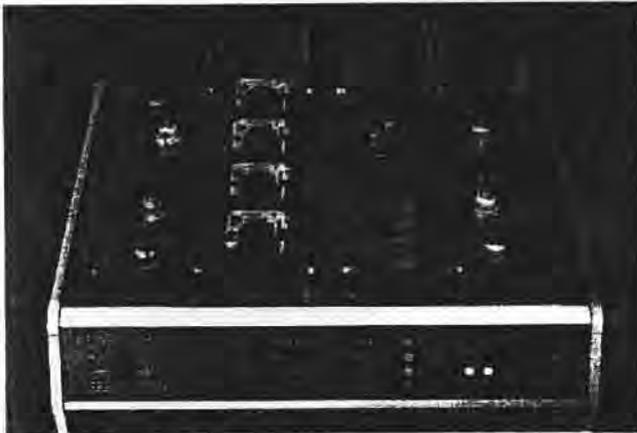
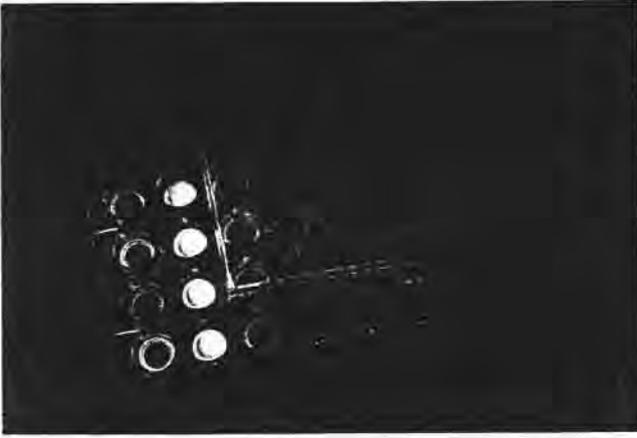
Zellkulturen werden für drei ganz unterschiedliche Aufgaben benötigt. Zum einen braucht man sie für die Produktion großer Mengen an Biomaterie wie monoklonalen Antikörpern oder biotechnologisch hergestellten Medikamenten und Nahrungsmitteln. Zum anderen wurden vor einigen Jahren kultivierte Zellen in der Toxizitätsprüfung als wertvolle Alternative zum Tierversuch routinemäßig eingeführt: damit können alle möglichen Giftstoffe statt an Tieren mit weit weniger Aufwand an lebenden Zellen – zumeist an kontinuierlichen Zell-Linien – ausgetestet werden. Neuerdings schließlich möchte man mit Zellkulturen sogar ein ganzes Organ simulieren, um Arzneimittel unter körperähnlichen Bedingungen wirklichkeitsnah erproben zu können – auch dies eine Alternative zum Tierversuch. Leider gelingen diese Experimente bisher in den wenigsten Fällen.

Daß einerseits unzählige Untersuchungen an Zellkulturen ohne jegliche Qualitätsaussage publiziert werden und andererseits nur wenige organspezifische Zellkulturmodelle zur Verfügung stehen, war Anlaß und Motivation für meine Mitarbeiter und mich, den gegenwärtigen Stand der Technik zu überdenken. Bei unseren Recherchen stellten wir überrascht fest, daß sich an den Methoden zur Kultivierung von Organzellen seit fast 50 Jahren so gut wie nichts geändert hat – abgesehen von dem unerheblichen Faktum, daß Einwegkulturgefäße die Petri-Schalen aus Glas abgelöst haben. Da

sich kontinuierliche Zell-Linien mit der altbewährten Technik recht einfach kultivieren lassen, sah man offenbar keinen Grund für Neuerungen. Man legte Wert darauf, daß die Zellen gut wachsen, und fragte nicht danach, ob sie auch eine organspezifische Leistung erbringen. Genau das aber muß man von Organzellen verlangen, wenn man an ihnen möglichst wirklichkeitsnah die Wirkung eines Hormons oder Pharmakons prüfen will.

Warum versagen in diesem Punkt die meisten Zellkulturen gänzlich oder teilweise? Zuerst müssen die Zellen gewonnen werden – für organspezifische Kulturen werden sie mit speziellen Enzymen aus dem jeweiligen Organverband wie zum Beispiel aus einer Leber oder einem Herz herausgelöst und in ein Nährmedium übersetzt. Dies bleibt nicht ohne Folgen. Isoliert von ihrer natürlichen Umgebung, verlieren die Zellen oft schon binnen Stunden viele ihrer physiologischen, biochemischen und morphologischen Eigenschaften – ein Vorgang, den man als Dedifferenzierung bezeichnet. Obwohl solche Zellen sich noch gut vermehren können, sind sie kaum noch vergleichbar mit denen innerhalb des Organverbandes, von denen sie abstammen.

Ziel einer zeitgemäßen organspezifischen Zellkulturtechnik muß es daher sein, die zelluläre Dedifferenzierung zu unterbinden, indem man ein Milieu wie in dem betreffenden Organ erzeugt. Dazu sollten die Zellen auf individuell auswählbaren, durchlässigen Unterlagen,



Minusheets bestehen aus zwei flachen Ringen mit einer konzentrischen Halterung, in die je nach Zellart dasjenige Unterlagenmaterial eingelegt werden kann, auf dem die betreffenden Zellen am besten haften und ihre Eigenschaften bewahren. Zum Anheften der Zellen werden die Minusheets in herkömmliche Einmal-Sterilgefäße eingesetzt (links oben). Da sie wie Münzen in einer Geldrolle gestapelt werden können, lassen sie sich leicht in Perfusionskultur-

kammern unterbringen, wo sie permanent mit frischem Kulturmedium versorgt werden (rechts oben). Neue Perspektiven eröffnet die Gradienten-Perfusionskammer. Darin kann das mit Zellen bewachsene Minusheet von oben und unten mit unterschiedlichen Medien durchströmt werden (rechts unten). Ein auf das Kultursystem abgestimmtes Gerät erlaubt, die Zellen mit Mikrosensoren vollautomatisch rund um die Uhr zu überwachen (links unten).

die der extrazellulären Matrix nachempfunden sind, kultiviert und mit einem kontinuierlich ausgetauschten Kulturmedium versorgt werden. Für Epithelien wäre es außerdem sehr wichtig, daß sie – entsprechend der Situation an Zellgrenzschichten im Körper, denen sie angehören – von oben und unten mit unterschiedlichen Kulturmedien umspült werden können. Hautzellen zum Beispiel stehen oben mit Luft und unten mit einem blutähnlichen Milieu in Kontakt, während Nierenzellen auf der einen Seite von Urin und auf der anderen von Blut benetzt werden.

Da Apparaturen für eine derartige, der Natur nachempfundene Zellkulturtechnik kommerziell nicht erhältlich waren, machten wir uns daran, sie selbst zu entwickeln. Sie sollten es erlauben, in technisch einfacher Form und mit möglichst vielen unkomplizierten Bedienungshilfen ein körperrnahes Milieu für Organzellen zu schaffen.

Die Basis des von uns entwickelten Verfahrens sind die sogenannten Minusheets: dünne Scheibchen mit konzentrischer Halterung, in die jedes beliebige, für die jeweiligen Zellen optimale Material zur Differenzierung als Unterlage eingelegt werden kann (Bild). Nach der Sterilisation werden die Minusheets mit einer Pinzette in klassische Kulturgefäße eingelegt und die Zellen sowie das Kulturmedium aufpipettiert. Für wenige Stunden oder über Nacht läßt man die Zellen sich auf den Minusheets anheften.

Wirkt die passende Unterlage schon der Dedifferenzierung entgegen, so ist der Effekt noch wesentlich besser, wenn die Zellen permanent mit frischem Kulturmedium durchströmt werden. Da sich die Minusheets mit den fest angewachsenen Zellen leicht stapeln lassen, kann man sie mit einer Pinzette in kleine Perfusionskulturkammern überführen (oben rechts im Bild). Dort wird auf einer Seite mit einer Peristaltikpumpe kontinuierlich

neues Kulturmedium zugeführt und auf der anderen Seite verbrauchtes weggeleitet. Da das Medium sehr langsam perfundiert (um etwa einen Milliliter pro Stunde), benötigt man mit der neuen Technik nur etwa halb soviel davon wie in bisherigen Versuchen. Ein Metallheizblock unter den Perfusionskammern hält die Zellen auf Körpertemperatur.

Da man auch Minusheets mit unterschiedlichen Zelltypen übereinander in die Perfusionskammer einsetzen kann, lassen sich auf einfache, modulare Weise organähnliche Bedingungen mit diversen Zelltypen und beliebigen Interaktionen aufbauen. Für die Simulation einer künstlichen Leber zum Beispiel könnten Leberparenchymzellen, Endothelzellen und Kuffersche Sternzellen miteinander kombiniert werden.

Noch weitere Möglichkeiten eröffnet schließlich die Gradienten-Perfusionskammer, in der die Zellen wie unter natürlichen Bedingungen von oben und un-

---

ten mit ganz unterschiedlichen Kulturmedien durchströmt werden können (rechts unten im Bild). So lassen sich auf sehr einfache Weise zum Beispiel osmotische Gefälle oder Salzgradienten an Epithelien erzeugen, wie sie in vielen Organen natürlicherweise vorliegen. Damit kann man die Verhältnisse im Körper noch besser annähern.

Zudem bietet unser System die Chance einer Standardisierung und Automatisierung. Da die Kulturen langsam, aber permanent von frischem Kulturmedium durchströmt werden, kann man ionenselektive Durchflusssensoren oder andere elektronische Molekülsonden anschließen, welche die Stoffwechselaktivität der kultivierten Zellen fortlaufend registrieren und speichern (links unten im Bild).

Dabei ist es möglich, das gesamte Zellkultursystem automatisch zu betreiben und zum Beispiel an immer den gleichen Kulturen neue Arzneimittel zu erproben. Im übrigen sind alle Teile des neuen Zellkultursystems nach Reinigung beliebig oft wiederverwendbar.

---

Dr. Minuth ist Professor am Anatomischen Institut der Universität Regensburg und erhielt für die Entwicklung seines Zellkultursystems in diesem Jahr den Philip-Morris-Forschungspreis. Das Projekt wurde von der Universität Regensburg, der Fakultätswerkstatt und der Deutschen Forschungsgemeinschaft großzügig unterstützt.

---