

Der Mikrokavitäten-Array: Folien-basierte 3D-Zellkultursysteme

Citation for published version (APA):

Gottwald, E., Giselbrecht, S., Truckenmüller, R., & Haug, P. (2014). Der Mikrokavitäten-Array: Folien-basierte 3D-Zellkultursysteme. *BIOforum*, 26-27.
<https://analyticalscience.wiley.com/do/10.1002/gitfach.12950/full/>

Document status and date:

Published: 01/01/2014

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Document license:

Taverne

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Der Mikrokavitäten-Array

Folien-basierte 3D-Zellkultursysteme

Die Geschichte der Zellkultur stützt sich seit jeher auf Systeme, die eine Kultivierung auf planaren Oberflächen, und damit in nur zwei Dimensionen (2D) zulässt. Zu diesen Systemen gehören Petrischalen, Kulturflaschen und deren Derivate, wie Multiwellplatten. Die über hundertjährige Erfolgsgeschichte der 2D-Systeme ist auf die einfache Handhabbarkeit, die niedrigen Kosten und die Möglichkeit, die Zellen enorm expandieren zu können, zurückzuführen. Sobald jedoch organotypische Leistungen der kultivierten Zellen im Vordergrund stehen, können Versuche in 2D-Systemen nicht oder nur eingeschränkt durchgeführt werden, da häufig insbesondere primäre Zellen ihre organotypischen Leistungen aufgrund dieser sehr gewebsuntypischen Kulturform innerhalb weniger Tage verlieren.

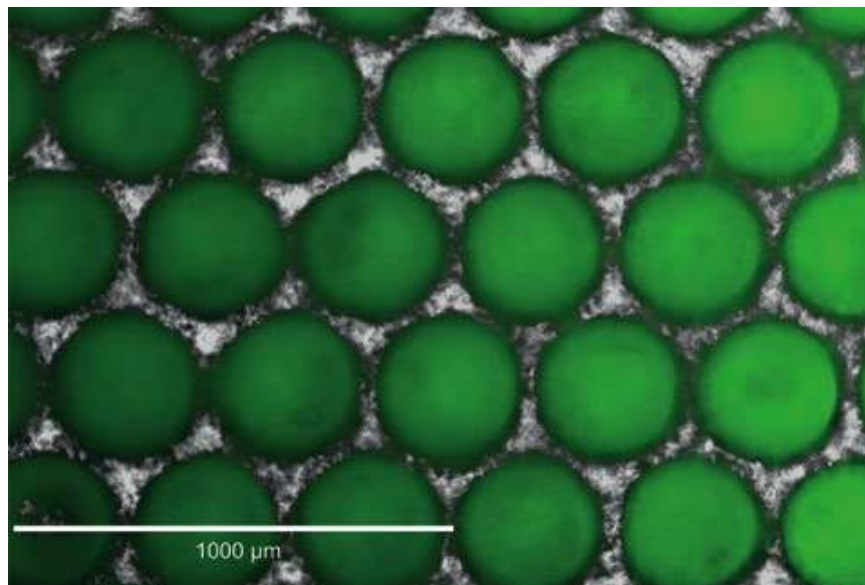


Abb. 1: CellTracker Green gefärbte Zellen nach dem Animpfen in Mikrokavitäten-Arrays

Obwohl die Vorteile von 3D-Kulturen schon seit mehr als 30 Jahren bekannt sind, setzt sich erst jetzt ein Trend zur verstärkten Nutzung von 3D-Kulturen durch, und zwar sowohl in der Grundlagenforschung als auch der industriellen Nutzung. Häufig kommt dabei die einfachste Form der 3D-Kultur, die sogenannten Sphäroide, zum Einsatz. Sphäroide werden in der Regel durch Aggregation von Einzelzellen im sogenannten Hanging Drop-Verfahren hergestellt. Dazu wird ein geringes Volumen Nährmedium mit einer Einzelzellsuspension z. B. an den Deckel einer Petrischale gehängt und 2 bis 3 Tage inkubiert. Durch die Gravitation sinken die Zellen in den Scheitelpunkt des Tropfens und aggregieren dort. Die so erzeugten kugelförmigen Aggregate werden anschließend in neue Kulturgefäße überführt, um sie weiteren Untersuchungen zugänglich zu machen.

Neben der Aggregation in Tropfen können dreidimensionale Aggregate auch mit Hilfe von Gerüststrukturen hergestellt werden, die von Zellen besiedelt werden können. Zu diesen Gerüststrukturen können Schwamm-ähnliche Strukturen, Faserstrukturen, Beads oder Hydrogele gehören.

Neues Verfahren zur Herstellung von 3D-Kulturen

In diesem Artikel wird ein neuer Weg zur Herstellung von 3D-Kulturen vorgestellt. 300Microns hat ein Verfahren entwickelt, mit dem sich dünne Polymerfolien mit Hilfe des sogenannten Mikrothermoformverfahrens strukturieren lassen. Das Thermoformen ist zwar schon lange aus dem makroskopischen Bereich z. B. zur Herstellung von Verpackungen bekannt, bislang konnten aber keine Strukturen im µm-Massstab hergestellt werden. Das von uns entwickelte und patentierte sogenannte SMART-Verfahren (Surface Modification And Replication by Thermoforming) ist eine Prozessfolge, die aus einem Vorprozess, dem eigentlichen Thermoformen der Folie als Hauptprozess und einem nachgelagerten Prozess besteht. Im Vorprozess können Folien z. B. so modifiziert werden, dass die Polymeroberfläche für Zellen besonders attraktiv oder auch besonders unattraktiv wirkt. Der eigentliche Mikrothermoformprozess führt dann zu einer Einbringung der Mikrokavitäten, die typischerweise in den Größenordnungen liegen, in denen biologische Strukturen von Natur aus angelegt werden. So beträgt z. B. die maximale Distanz zwi-

schen zwei Blutkapillaren in einem typischen tierischen Gewebe bis zu 300 µm, d. h. die Zellen zwischen diesen Kapillaren werden durch Diffusion versorgt. Deshalb ist der Mikrokavitätendurchmesser und die Tiefe diesen natürlichen Gegebenheiten nachempfunden (Abb. 2). Das Verfahren ist sehr flexibel, so dass Mikrokavitäten in Geometrien und Größenordnungen von wenigen Mikrometern bis hin zu einigen Millimetern geformt werden können. Die Mikrokavitäten können zu Arrays angeordnet werden und als solche in alle Standardformate zur Zellkultur integriert werden. Der Nachprozess von SMART kann z. B. ein Prozess zum Einbringen von Poren in die Folien sein. Poröse Mikrokavitäten-Arrays eignen sich damit für die Realisierung von z. B. Boyden-Chamber-Assays, da die Folien als Boden von klassischen Filter-Inserts für Multiwell- und Mikrotiterplatten hergestellt werden können. Poröse Kavitäten bieten darüber hinaus auch die Möglichkeit, die in den Kavitäten kultivierten 3D-Aggregate aktiv mit Medium zu versorgen. Dies kann dadurch erreicht werden, dass die Mikrokavitäten-Arrays in eigens dafür entwickelte Bioreaktoren von der Größe einer 6 cm-Petrischale eingebaut werden (Abb. 2). In dem geschlossenen, re-

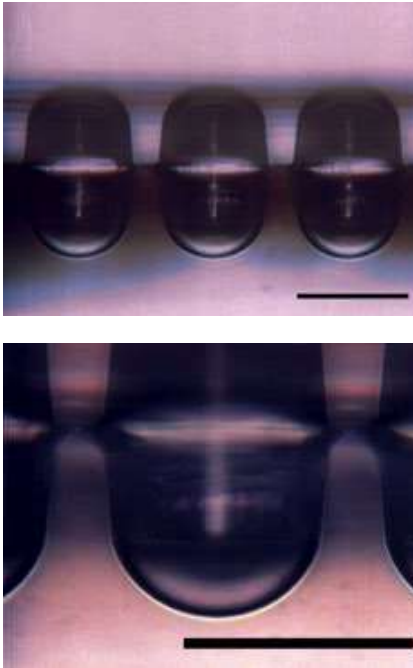


Abb. 2: Folien-basierte Mikrokavitäten zur 3D-Kultur von Zellen. Massstabsbalken 300 µm.

perfundierten System kann der Mediumfluß so gewählt werden, dass er entweder senkrecht oder parallel zur Mikrokavitätenfläche fließt, weshalb die beiden Versorgungsmodi von uns als Perfusion bzw. Superfusion bezeichnet werden (Abb. 3).

Anwendungen

Mikrokavitäten-Arrays lassen sich zu Screening-Zwecken im Bereich von Toxizitätstests, High-Throughput-/High-Content-Screenings im industriellen aber auch akademischen Umfeld in Form von Mikrotiterplatten einsetzen. Die Anzahl der Mikrokavitäten in den Wells einer

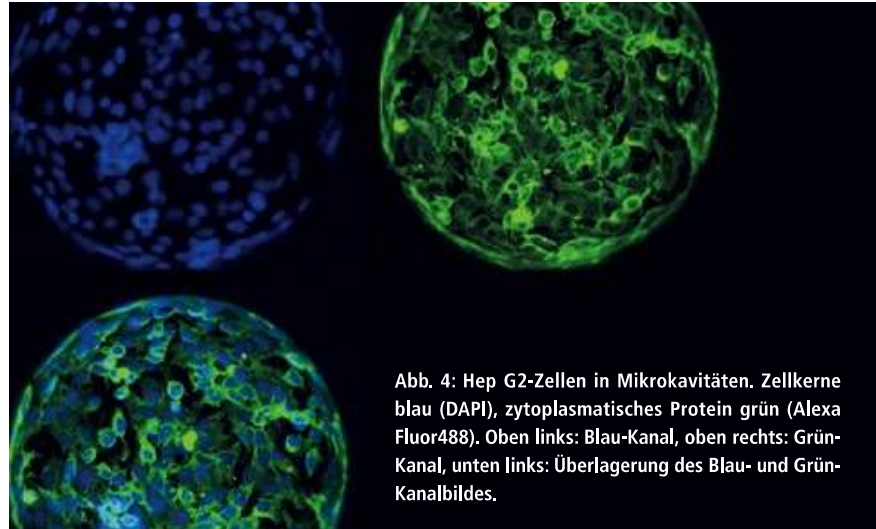


Abb. 4: Hep G2-Zellen in Mikrokavitäten. Zellkerne blau (DAPI), zytoplasmatisches Protein grün (Alexa Fluor488). Oben links: Blau-Kanal, oben rechts: Grün-Kanal, unten links: Überlagerung des Blau- und Grün-Kanalbildes.

Mikrotiterplatte ist variabel, so dass Zellen die nur in geringen Mengen verfügbar sind, ausreichen, um die Mikrokavitäten zu füllen und damit 3D-Aggregate der erforderlichen Größe bilden zu können (Abb. 3). Ferner läßt sich auch die Größe der Kavitäten selbst variieren, so dass individuelle Assays aufgebaut werden können. So sind mit Hilfe dieser Arrays auch Einzelzell-Arrays denkbar, die in Kavitäten von nur wenigen µm Durchmesser durchgeführt werden und die dadurch zu hohen Integrationsdichten auf den Mikrotiterplatten führen. Im Prinzip ist damit bereits der Grundstein zu einem neuen Screening-Format gelegt, da jede einzelne Mikrokavität als „Screening-well“ genutzt werden kann. Im 300 µm-Format könnten so 22.500 „wells“ auf der Fläche einer Mikrotiterplatte untergebracht werden. Im Vergleich zu heutigen Hochdurchsatz-Systemen erhöht man die Kapazität einer Mikrotiterplatte damit

um einen Faktor 14,6 bezogen auf eine 1536-well Platte bzw. 58,5 bezogen auf eine 384-well Platte.

Die Folien-Arrays lassen sich auch als Stammzell-Plattform verwenden, mit deren Hilfe die Mikrokavitäten als artifizielle Stammzellnischen für den Erhalt der Stammzeleigenschaften bzw. der gerichteten Differenzierung eingesetzt werden können. Darüber hinaus eignen sich Inserts mit Kavitätenböden für solche Versuche, in denen klassische Boyden-Chamber-Versuche an ihre Grenzen stoßen, da Monolayer kein organotypisches Verhalten zeigen. Auch die Kombination aus Mikrotiterplatten und Inserts mit Mikrokavitäten-Böden, läßt sich so darstellen.

Die Zellen werden mit Standardpipettierhilfen oder Robotern in die Mikrokavitäten gebracht. Dort aggregieren sie in kurzer Zeit und bilden dreidimensionale Aggregate aus, ohne jedoch dabei zusätzliche Gerüststrukturen zu benötigen (Abb. 1). Differenzierte, nicht proliferierende Zellen, können so über mehrere Wochen in den Arrays kultiviert werden. Für eine Downstream-Analytik lassen sich die Zellen aus den Mikrokavitäten mit gängigen Techniken zurückgewinnen, so dass sowohl intakte Zellen als auch Zellinhaltsstoffe wie DNA, RNA oder Protein isoliert werden können.

Autoren

Eric Gottwald, Stefan Giselbrecht, Roman Truckenmüller, Peter Haug
300 Microns, Karlsruher Institut für Technologie

Kontakt

Eric Gottwald
KIT-Spin-Off-Projekt 300Microns
Karlsruher Institut für Technologie
Eggenstein-Leopoldshafen
eric.gottwald@300microns.com
www.300microns.com

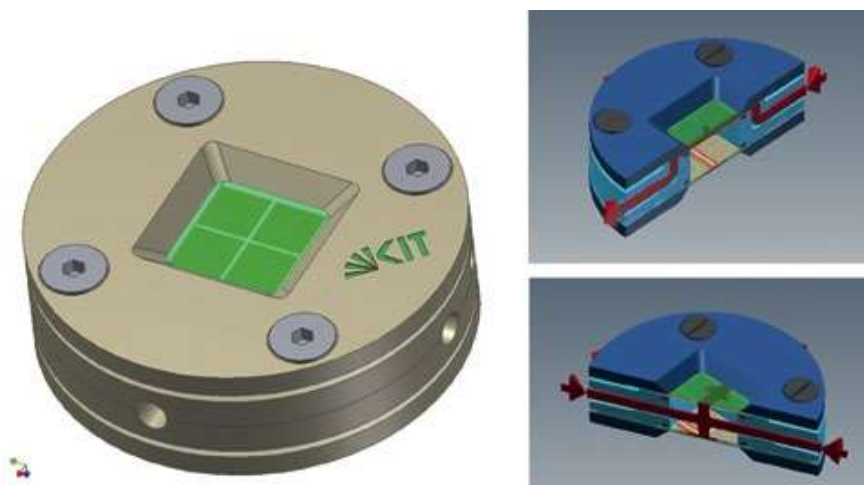


Abb. 3: Bioreaktor für die Aufnahme von Mikrokavitäten-Arrays zur Durchführung von Versuchen mit aktivem Mediumfluß. Superfusion (rechts oben) und Perfusion (rechts unten) im Mikrokavitäten-Array-Bioreaktor. Rot: Mediumfluß.