

Zellkultur-Automatisierung

Automatisierte Kultivierung von induziert pluripotenten Stammzellen

INA MEISER, ISABELLE SÉBASTIEN, JULIA C. NEUBAUER
HAUPTABTEILUNG BIOPHYSIK & KRYOTECHNOLOGIE, FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR BIOMEDIZINISCHE TECHNIK, ST. INGBERT

The groundbreaking discovery that pluripotency can be induced in somatic cells opened new fields in sciences. Generation of patient- and disease-specific cell lines for drug screening and medical research is in reach. However, the numerous possibilities are limited by the amount of cells needed, that cannot be supplied by state-of-the-art cultivation techniques. New approaches for cell culture automation are wanted, mapping the requirements for this interesting, yet sophisticated cell type.

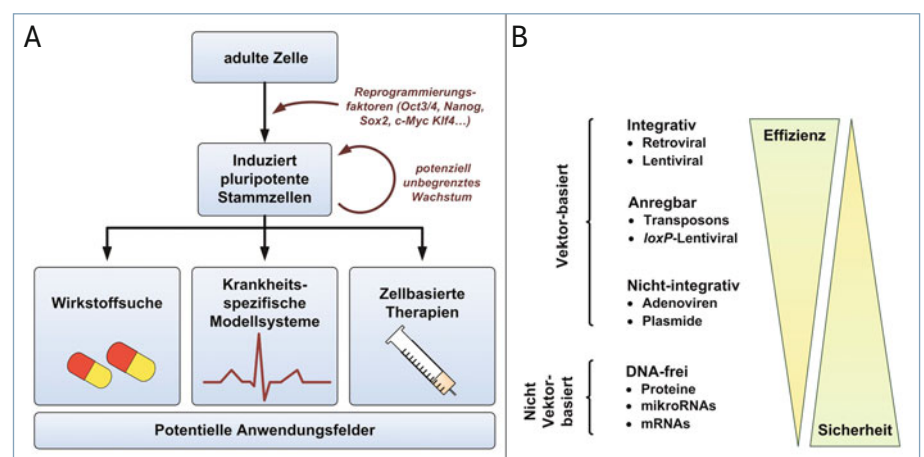
DOI: 10.1007/s12268-013-0351-8
© Springer-Verlag 2013

Stammzellen in der regenerativen Medizin

■ Mit stetig steigender Lebenserwartung und den damit einhergehenden medizinischen Problemen, wie neurodegenerativen Erkrankungen und Stoffwechselstörungen, stoßen aktuelle medikamentenbasierte Therapien an ihre Grenzen. Organtransplantationen können in vielen Fällen bereits helfen, jedoch gibt es einen eklatanten Mangel an passenden Spenderorganen. Daher weckte die Entdeckung von Stammzellen mit außergewöhnlichem Entwicklungspotenzial große Hoffnungen für zellbasierte Therapien. Embryonale Stammzellen, isoliert aus Blastozysten, können Zellen aller drei Keimblätter und somit alle Zellen des Körpers bilden (Pluripotenz) und sind aufgrund ihrer hohen Telomerase-Aktivität prinzipiell unbegrenzt teilbar [1]. Allerdings werden für deren Erzeugung Embryonen zerstört, weshalb die Forschung in Deutschland strikten gesetzlichen Beschränkungen unterliegt (Embryonenschutzgesetz, ESchG). Adulte Stammzellen, z. B. aus Knochenmark oder Fettgewebe, sind multipotent, können also vor allem Zellen ihres Ursprungsgewebes bilden und sorgen dadurch in einem spezifischen Bereich des Körpers für die Zellerneuerung. Anwendung in der Klinik finden bislang nur adulte Stammzellen, da eine direkte Transplantation

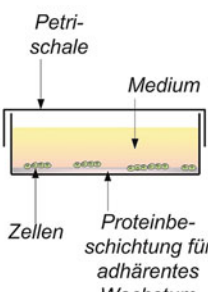
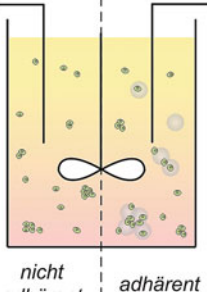
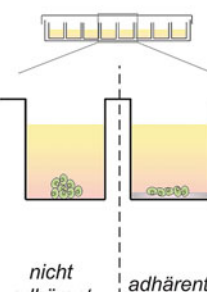
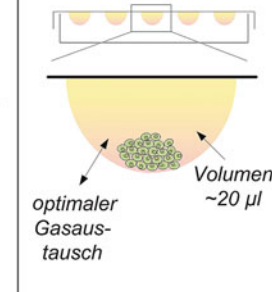
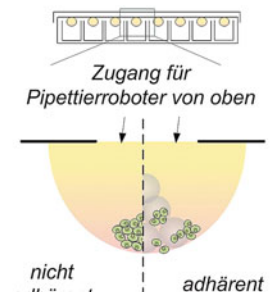
embryonaler Stammzellen aufgrund ihres Tumor-bildenden Potenzials nicht möglich ist. Hämatopoetische Stammzellen und Knochenmark werden routinemäßig transplantiert, um Krankheiten des Blut- und Immunsystems, z. B. Leukämie, zu behandeln. Der Erfolg hängt allerdings von der Spender-Empfänger-Kompatibilität ab: T-Lymphozyten aus inkompatiblem Spendermaterial können das Immunsystem angreifen und die Transplan-

tat-Wirt-Reaktion (*Graft-versus-Host Disease*, GvHD) verursachen, sodass eine permanente Verabreichung belastender Immunsuppressiva notwendig ist. Erstrebenswert für regenerative Therapien wären folglich Transplantate aus autologen, also körpereigenen Zellen mit identischem humanem Leukozyten-Antigen (HLA), die keine Immunantwort hervorrufen. Den Grundstein für solche Therapien legte J. B. Gurdon bereits 1962, als er durch somatischen Zellkerntransfer aus Endothelzellen Kaulquappen klonete [2] und somit bewies, dass adulte Zellen noch immer den genetischen Code eines kompletten Organismus beinhalten. Gut 60 Jahre später nutzten Takahashi und Yamanaka dieses und anderes Wissen, um aus murinen Fibroblasten durch Transduktion eine Zelllinie zu generieren, die Eigenschaften embryonaler Stammzellen aufweist: Aus diesen in den pluripotenten Zustand zurückprogrammierten Zellen konnten sich wieder Zelltypen aller drei Keimblätter entwickeln – jedoch ohne die ethische Problematik der embryonalen Stammzellen. Diese revolutionäre Technologie der induziert pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen), mit der gezielt patientenspezifische,



▲ **Abb. 1:** Anwendungsfelder und Generierung von induziert pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen). **A**, potenzielle Anwendungsfelder von iPS-Zellen in Forschung und Klinik. **B**, Arten der Reprogrammierung. Hierbei bergen die effizienteren Vektor-basierten Methoden aufgrund der DNA-Integration in das Genom der Wirtszelle ein größeres Sicherheitsrisiko als die nicht-Vektor-basierten Methoden.

Tab. 1: Verschiedene Kultivierungsmethoden für pluripotente Stammzellen mit ihren Vor- und Nachteilen: adhärenente Standardkultivierung in Petrischalen; großvolumige, gerührte Bioreaktoren zur Expansion; Mikrowellplatten für kontrollierbare Mikro-Umgebungen; *hanging drop* zur Vermeidung jeglicher Oberflächenkontakte; *hanging drop*-Technologie zur Automatisierung.

Kultivierungsformen	Standardkultivierung	Chemostat-Bioreaktor	Mikrowellplatten	Standard-hanging drop	Automatisierter hanging drop
	 <p>Petri-schale Medium Zellen Proteinbeschichtung für adhärenentes Wachstum</p>	 <p>nicht adhärenent adhärenent</p>	 <p>nicht adhärenent adhärenent</p>	 <p>optimaler Gasaustausch Volumen ~20 µl</p>	 <p>Zugang für Pipettierroboter von oben nicht adhärenent adhärenent</p>
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> einfaches Monitoring 	<ul style="list-style-type: none"> 3D großes Volumen große Wachstumsfläche schaltbare Adhäsion 	<ul style="list-style-type: none"> 3D einfaches Monitoring günstiges WFV-Verhältnis leichte Kontrolle der Mikro-Umgebung 	<ul style="list-style-type: none"> 3D günstiges WFV-Verhältnis / geringer Medienverbrauch optimaler Gasaustausch kein unerwünschter Kontakt mit Oberflächen 	Zusätzlich zum Standard: <ul style="list-style-type: none"> einfache Kontrolle der Mikro-Umgebung schaltbare Adhäsion durch Zugabe von Mikrocarrier
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> 2D schlechtes WFV-Verhältnis keine Kontrolle der Mikro-Umgebung 	<ul style="list-style-type: none"> schlechtes WFV-Verhältnis/hoher Medienverbrauch keine Kontrolle der Mikro-Umgebung mechanische Belastung 	<ul style="list-style-type: none"> schwieriges Handling in kleinen Kavitäten Zellen kommen stets in Kontakt mit artifiziellen Oberflächen 	<ul style="list-style-type: none"> schwieriges Handling, daher schwierige Kontrolle der Mikro-Umgebung Monitoring möglich, aber schwierig 	<ul style="list-style-type: none"> Monitoring möglich, aber schwierig

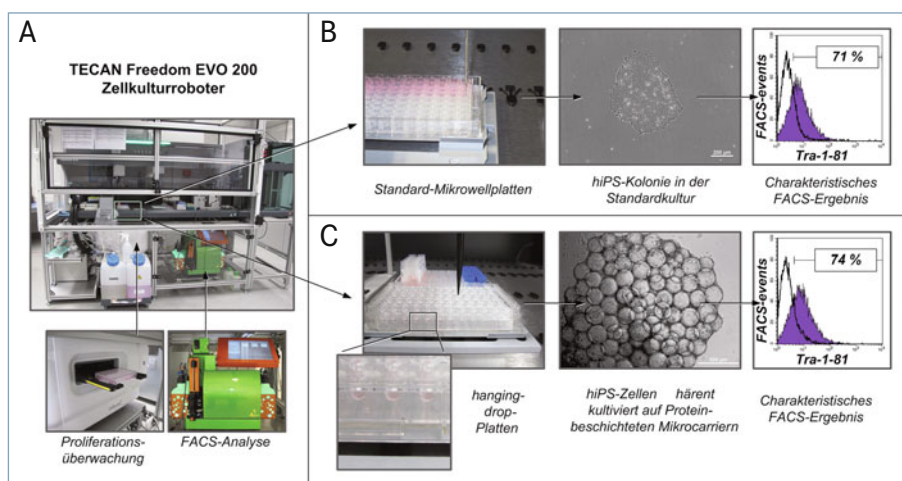
pluripotente Zellen generiert werden können, erhielt nur sechs Jahre nach der Veröffentlichung den Nobelpreis 2012 und ermöglicht zahlreiche Anwendungen (**Abb. 1A**): Neben symptomrelevanten Zelltypen zur verbesserten Wirkstofffindung oder als krankheits-

spezifische Modellsysteme zur Grundlagenforschung [3] können nun auch autologe Transplantate hergestellt werden, wodurch personalisierte Therapien tatsächlich in greifbare Nähe rücken. Erste erfolgreiche Transplantationen im Tiermodell sind bereits pub-

liziert: Neuronale Zellen, gewonnen aus iPS-Zellen und transplantiert in Ratten und Mäuse, konnten deren Parkinson-Symptome verringern [4].

Generierung und Expansion patientenspezifischer iPS-Zellen

In ihrer systematischen Studie konnten Takahashi und Yamanaka vier Faktoren (Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) identifizieren, um lentiviral induziert pluripotente Stammzellen aus Fibroblasten zu generieren [5]. In zahlreichen weiteren Studien wurden andere somatische Zelltypen verwendet, onkogene Faktoren substituiert oder komplett DNA-freie Methoden entwickelt, jedoch geht die zunehmende Sicherheit der Methoden, also die Vermeidung von integrativer Viren-DNA, mit einem Verlust der ohnehin geringen Induktionseffizienz einher (**Abb. 1B**). Mit einer Effizienz von bis zu einem Prozent liegen Transduktionen mit Lentiviren an der Spitze [6]; demgegenüber liegen DNA-freie Methoden im Promille-Bereich oder erfordern einen hohen Laboraufwand mit mehreren Transfektionsrunden. Die sehr ineffiziente, zeit- und arbeitsaufwendige Generierung und Expansion der iPS-Zellen ist limitierend für deren Anwendung im pharmazeutischen und therapeutischen Bereich, da hierfür ein umfang-



▲ Abb. 2: Arbeitsablauf automatisierter iPS-Zellkultur im Standard- und *hanging drop*-Verfahren. **A**, Alle Arbeiten werden in einem TECAN-Zellkulturroboter durchgeführt. **B**, Arbeitsablauf automatisierter Generierung und Kultivierung humaner iPS-Zellen in Mikrowellplatten, angelehnt an die manuelle Standardkultivierung: Ausgesäte iPS-Zellverbände variabler Größe wachsen in Kolonien. **C**, automatisierte Kultivierung adhärenenter humaner iPS-Zellen im *hanging drop*: Eine definierte Zellzahl wird über Pipettierroboter in die einzelnen Tropfen eingebracht. Die Erfolgskontrolle beider Kultivierungstechniken kann sowohl über *live cell imaging* als auch über FACS-Analysen erfolgen.

reicher Vorrat an standardisiert hergestelltem Zellmaterial essenziell ist [7]. Ein Ansatz zur Expansion basiert auf gerührten, großvolumigen Bioreaktoren [8], allerdings mit ungünstigem Wachstumsoberflächen-zu-Volumen-Verhältnis (WF/V-Verhältnis, **Tab. 1**), wodurch relativ viel Material (Medien, Wachstumsfaktoren etc.) verbraucht wird. Des Weiteren ist eine Kontrolle der Umgebungsbedingungen in diesem großen Reaktionsraum nahezu unmöglich. Daher wird aktuell versucht, die manuellen Prozessschritte mithilfe von Robotiktechnologie in Automatisierungssysteme zu übertragen, wie es z. B. zur Pseudovirenproduktion bereits realisiert werden konnte [9]. Die Entwicklung eines modularen Robotiksystems am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik wird die parallele Generierung und Expansion verschiedener iPS-Zelllinien ermöglichen (**Abb. 2A, B**). Das System wird unter vollständig kontrollierbaren Bedingungen arbeiten und damit eine prototypische Produktionslinie für die ständige Generierung von hochwertigem Material für die pharmazeutische und medizinische Forschung darstellen. Insbesondere die Identifikation und Separation erfolgreich reprogrammierter Zellen erfordert eine signifikant andere Automatisierung, als bisherige Ansätze das leisten können. Durch Integration entsprechender Bilderkennungsprogramme können iPS-Zellen von höchster Qualität garantiert werden. Der modulare Aufbau erreicht eine optimale Nutzung der Ressourcen unter reduziertem Platz- und Kostenaufwand, sodass für spätere Studien im Bereich der Medikamentenfindung oder für Therapieansätze ausreichend Zellmaterial zur Verfügung gestellt werden kann.

Wirkstofffindung und Grundlagenforschung im Hochdurchsatz

Während bei der iPS-Generierung eine möglichst große finale Zellzahl im Vordergrund steht, ist für eine spätere Anwendung der Zellen im Bereich der pharmazeutischen Medikamentenentwicklung die Testung möglichst vieler potenzieller Wirkstoffe im Hochdurchsatzverfahren entscheidend. Dazu sind die großvolumigen Ansätze (**Tab. 1**) ungeeignet, denn es müssen homogene Zelleinheiten generiert und separat in kleinen Volumen zur Verfügung gestellt werden. Nur in miniaturisierten Ansätzen, wie den Mikrowellplatten (**Tab.**

1), können die für Funktionalität und Differenzierung entscheidenden Parameter wie dreidimensionales Wachstum und Mikro-Umgebung kontrolliert werden. Es können homogene Zellaggregate aus definierter Zellzahl pro Kavität gezüchtet werden, der Kontakt mit artifiziellen Oberflächen sowie dessen Einfluss auf das Zellverhalten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Ein Zellkulturansatz, der diese Nachteile behebt, ist der hängende Tropfen (*hanging drop*, **Tab. 1**). Hier wird ein geringes Volumen definierter Zellsuspension (ca. 20 Mikroliter) in den Deckel einer Petrischale pipettiert. Nach dem Umdrehen des Deckels sammeln sich die Zellen an der Tropfenunterseite und bilden homogene Zellaggregate in einer definierten Mikro-Umgebung, die sogar zur Kultivierung embryonaler Stammzellen geeignet ist [10]. Allerdings steht das umständliche Hantieren mit den Tropfen an der Deckelinnenseite jeder Automatisierung im Weg. Abhilfe schafft hier eine Lochplatte, die auf handelsübliche 96-Mikrowellplatten aufgelegt wird, sodass einzelne Tropfen mithilfe von Pipettierrobotern von oben durch die Löcher gesetzt werden können (**Tab. 1, Abb. 2C**). Medienwechsel, die Zugabe von Faktoren oder gar Wachstumsfläche durch Mikrocarrier stellen keine Limitierungen mehr dar. Wir konnten mit dieser Prozedur humane iPS-Zellen für zehn Tage unter Pluripotenz erhalten im hängenden Tropfen auf Mikrocarriern automatisiert kultivieren (**Abb. 2**). Durch die innovative Zugabe von Wachstumsflächen wird die Adhäsion schaltbar gemacht, was sogar anspruchsvolle Differenzierungsprotokolle ermöglicht: Die kardiale Differenzierung verlangt z. B. nach dreitägiger Suspensionskultur eine adhärente Weiterkultivierung [11]. Jeder einzelne Tropfen stellt einen abgeschlossenen Mikro-Bioreaktor dar, der über Pipettierroboter einzeln angesteuert werden kann, über einen optimalen Gasaustausch und ein günstiges WF/V-Verhältnis verfügt.

Ausblick

Betrachtet man die jahrzehntelange Entwicklung bis zur klinischen Reife von hämatopoetischen Stammzelltransplantationen wird deutlich, dass, wenn überhaupt, zur klinischen Anwendung von iPS-Zellen noch Jahre vergehen werden. In grundlegenden Experimenten muss erst die Gefahr der Reprogrammierungsme-

thoden durch die Integration viraler DNA untersucht werden [12]. Das riesige Potenzial der Zellen wurde jedoch bereits in zahlreichen Studien belegt, und ihr Nutzen als patienten- und krankheitsspezifische Modellsysteme lässt kaum mehr Zweifel zu. Um für diese Zwecke qualitativ hochwertige, standardisierte und uniforme Zelllinien und -aggregate zu erhalten, sind hochparallele Zellkulturroboter unerlässlich. Solche Robotiksysteme sind zeitgleich in der Lage, Tausende der hier vorgestellten Mikro-Bioreaktoren zu bearbeiten, patientenspezifische iPS-Zellen zu generieren und unter kontrollierten Bedingungen zu expandieren (**Abb. 2**).

Danksagung

Wir danken Michael Fedler von der Firma Tecan Deutschland GmbH für die Unterstützung bei der Systemkonzipierung und Prozessautomatisierung. Diese Arbeit wurde teilweise finanziert durch die Europäische Kommission (HYPERLAB, FP7-223011), durch die Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e. V. und durch das saarländische Ministerium für Wirtschaft und Wissenschaft (Labor der Zukunft). ■

Literatur

- [1] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145–1147
- [2] Gurdon JB (1962) The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 10:622–640
- [3] Itzhaki I, Maizels L, Huber I et al. (2011) Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 471:225–229
- [4] Tabar V, Tomishima M, Panagiotakos G et al. (2008) Therapeutic cloning in individual parkinsonian mice. *Nat Med* 14:379–381
- [5] Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676
- [6] Robinton DA, Daley GQ (2012) The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481:295–305
- [7] Das AK, Pal R (2010) Induced pluripotent stem cells (iPSCs): the emergence of a new champion in stem cell technology-driven biomedical applications. *J Tissue Eng Regen Med* 4:413–421
- [8] Shafa M, Sjonnesen K, Yamashita A et al. (2012) Expansion and long-term maintenance of induced pluripotent stem cells in stirred suspension bioreactors. *J Tissue Eng Regen Med* 6:462–472
- [9] Schutz A, Koch S, Fuss M et al. (2012) An automated HIV-1 Env-pseudotyped virus production for global HIV vaccine trials. *PLoS One* 7:e51715
- [10] Schulz JC, Stumpf PS, Katsen-Globa A et al. (2012) First steps towards the successful surface-based cultivation of human embryonic stem cells in hanging drop systems. *Eng Life Sci* 12:584–587
- [11] Boheler KR, Czyz J, Tweedie D et al. (2002) Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res* 91:189–201
- [12] Pera MF (2011) Stem cells: the dark side of induced pluripotency. *Nature* 471:46–47

Korrespondenzadresse:

Dr. Julia C. Neubauer
Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT)
Ensheimer Straße 48
D-66386 St. Ingbert
Tel.: 06894-980-258
Fax: 06894-980-345
julia.neubauer@ibmt.fraunhofer.de

AUTORINNEN



Ina Meiser

2001–2005 Bachelorstudium der Bioinformatik an der Universität des Saarlandes.
2005–2007 Masterstudium der Biotechnologie an der Universität des Saarlandes.
Seit 2008 Doktorandin am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik, St. Ingbert.



Isabelle Sébastien

2002–2004 *Diplôme Universitaire de Technologie* an der Universität Joseph Fourier, Grenoble, Frankreich. 2004–2006 Ingenieurstudium des Chemieingenieurwesens an der Fachhochschule Münster, Steinfurt. 2006–2008 Masterstudium der Biotechnologie an der Universität des Saarlandes. 2009–2011 Bio-Ingenieurin am Helmholtz-Zentrum Geesthacht. Seit 2012 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik, St. Ingbert.



Julia C. Neubauer

2001–2006 Biologiestudium an der Universität Würzburg. 2007–2012 Promotion (Dr. rer. nat.) am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik, dort seit 2012 Leiterin der Arbeitsgruppe „Zellkultur-Automatisierung“.