

Stammzellen

Hochdurchsatzanalyse zur Identifizierung von Virusinfektionen in ps-iPSCs

DANIELA HÜBSCHER^{1,2}, KATRIN STRECKFUSS-BÖMEKE^{1,2}

¹KLINIK FÜR KARDIOLOGIE UND PNEUMOLOGIE, UNIVERSITÄT GÖTTINGEN

²DZHK (DEUTSCHES ZENTRUM FÜR HERZ-KREISLAUF-FORSCHUNG), GÖTTINGEN

The generation of patient-specific induced pluripotent stem cells (ps-iPSCs) offers a broad range of applications including human disease modelling, drug screening, bioengineering, or cell therapy. Virus contamination-free cell lines generated under Good Manufacturing Practise (GMP) conditions are of outstanding importance. Here, we demonstrate the feasibility to use an automated high-throughput PCR-based method for detection of human pathogenic viruses, for instance HIV, in ps-iPSCs.

DOI: 10.1007/s12268-020-1432-0

© Die Autorinnen 2020

Die Fähigkeit, Patienten-spezifische induzierte pluripotente Stammzellen (ps-iPSCs) zu generieren, ermöglicht eine Vielzahl an translationalen Anwendungen. Durch die Reprogrammierung von somatischen Patientenzellen in pluripotente Stammzellen können humane Krankheitsmodelle etabliert, Medikamentenscreenings durchgeführt und Transplantationsansätze für die regenerative Medizin etabliert werden. Für Standardverfahren der guten Herstellungspraxis, wie sie in Transplantationsexperimenten verwendet werden, und in iPSC-Screening-Einheiten ist es von essenzieller Bedeutung, Virus-kontaminationsfreie Zelllinien zu verwenden. Wir zeigen hier, dass es mittels eines automatisierten High-Throughput-PCR-basierten Verfahrens möglich ist, humanpathogene Viren, wie das humane Immundefizienzvirus (HIV-1), das Hepatitis-B-Virus (HBV) und das Hepatitis-C-Virus (HCV), in ps-iPSC-Linien zu detektieren.

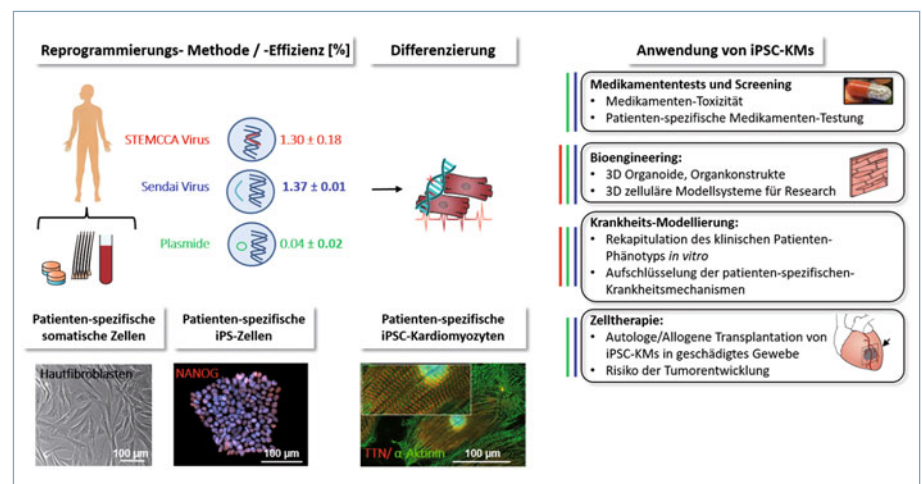
Induzierte pluripotente Stammzellen

Bei iPSCs handelt es sich um somatische Zellen, die zur Pluripotenz induziert worden sind. Dafür werden humane Spenderzellen, z. B. Hautfibroblasten, periphere mononukleäre Blutzellen oder mesenchymale Stammzellen durch Zugabe von spezifischen Pluripotenz-assoziierten Faktoren in den pluripotenten Status einer Stammzelle zurückver-

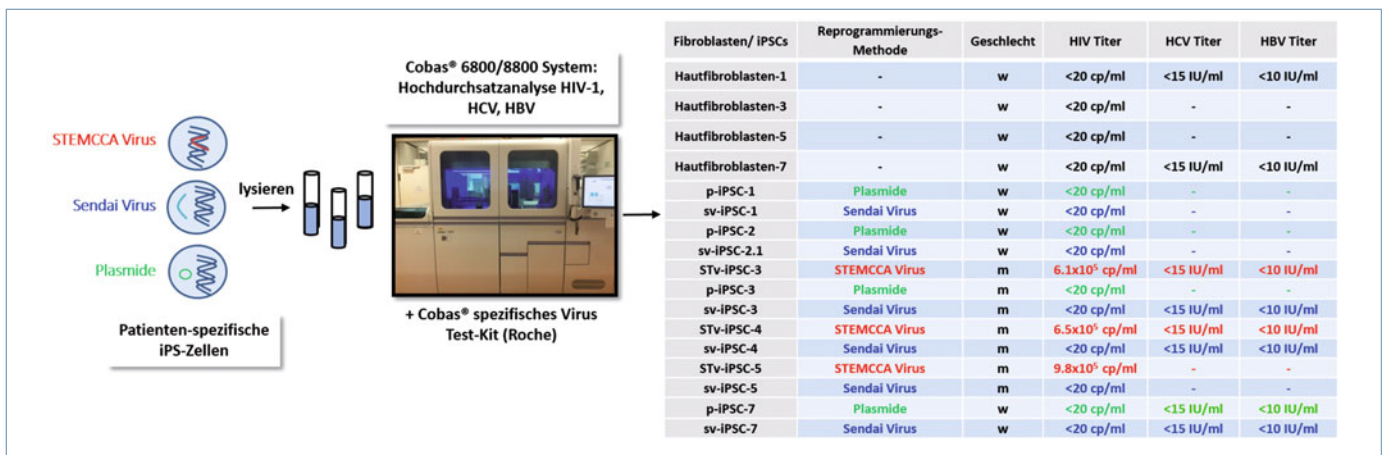
setzt. Diese können sich zum einen unbegrenzt teilen und zum anderen haben sie die Fähigkeit, sich in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Seit der ersten Herstellung von iPSCs durch Takahashi und Yamanka [1, 2] wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Reprogrammierungs-Methoden publiziert, die im Vergleich zur initialen

Takahashi-Methode durch erhöhte Reprogrammierungs-Effizienzen und nicht-integrative virale Sequenzen in den iPSC-Linien charakterisiert sind.

Die ersten retroviralen Reprogrammierungen von humanen Fibroblasten zeigten eine Reprogrammierungs-Effizienz von 0,02 Prozent [2]. Es folgte eine Reihe an Bestrebungen, sowohl die Reprogrammierungs-Effizienz zu erhöhen als auch die virale Integrität ins Wirtgenom zu reduzieren. Virusfreie humane Zelllinien sind im Hinblick auf Transplantationsversuche unerlässlich, um Immunreaktionen und pathogene Krebserkrankungen zu vermeiden [3]. Gängige Reprogrammierungs-Methoden basieren auf Genom-integrierenden Viren, z. B. dem lentiviralen STEMCCA-Vektor (*single cassette reprogramming vector*) [4], nicht Genom-integrierenden Viren, z. B. dem Sendai-Virus [5], sowie episomalen Plasmiden [6] oder RNA [7] (Abb. 1).



▲ **Abb. 1:** Herstellung und Anwendung von patientenspezifischen induzierten pluripotenten Stammzell-Kardiomyozyten (ps-iPSC-KMs). Hautfibroblasten, Keratinozyten oder periphere Blutzellen werden aus somatischem Patientenmaterial isoliert und mittels Pluripotenz-assoziiierter Transkriptionsfaktoren zu pluripotenten Stammzellen reprogrammiert. Diese werden über verschiedene Reprogrammierungs-Methoden wie STEMCCA-Viren (Genom-integrierend), Sendai-Viren und episomale Plasmide (nicht-genom-integrierend) in die Wirtszelle transportiert. Die Reprogrammierungs-Effizienz (hier dargestellt für Hautfibroblasten) ist abhängig von der Reprogrammierungs-Methode. iPSCs werden mittels direkter kardialer Differenzierung zu ps-iPSC-KMs differenziert. Diese finden ihre Anwendung bei Medikamententests, Bioengineering, der Krankheitsmodellierung und der Zelltherapie.



▲ **Abb. 2:** Analyse von iPSC-Linien auf humanpathogene Viren mittels der Hochdurchsatztechnologie am Cobas® 6800/8800 am Beispiel des HIV-1, HCV und HBV. Die mittels unterschiedlicher Reprogrammierungsmethoden hergestellten iPSC-Linien werden lysiert und im Hochdurchsatzverfahren im Cobas® 6800/8800-System mit Cobas®-spezifischen Virus-Kits automatisch bezüglich der vorhandenen Viruslast untersucht. Hautfibroblasten und iPSC-Linien, die mittels nicht-genomintegrierender Methoden wie Sendai-Viren oder episomalen Plasmiden generiert worden sind, zeigten negative HIV-1-Resultate mittels des Cobas® 6800/8800-Cobas-HIV-1-Test-Systems. Die mittels Genom-integrierender STEMCCA-Viren generierten iPSC-Linien liefern falsch-positive Ergebnisse aufgrund vorhandener gag- und LTR-Regionen im Wirtsgenom. Alle getesteten Hautfibroblasten und iPSC-Linien zeigen unabhängig von der Reprogrammierungsmethode Virustiter von HCV und HBV unterhalb der Nachweisgrenze von 15 IU/ml bzw. 10 IU/ml.

Die Generierung von Patienten-spezifischen iPSC-Zellen mit monogenetischen Erkrankungen war ein Durchbruch für die humanen *in vitro*-Krankheitsmodellierung und die Transplantationsmedizin. Somit ist es möglich, Patienten-spezifische Medikamentenanalysen in der *in vitro*-Zellkultur durchzuführen und Patienten-spezifische autologe Transplantate herzustellen, um unerwünschte Immunreaktionen bei Transplantationen potenziell eindämmen zu können.

Unsere Arbeitsgruppe fokussiert sich auf die Herstellung von iPSC-Linien von Patienten, die unter mono- bzw. polygenetischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen leiden. Hierfür werden je nach Anwendungsgebiet und Patienten-Ausgangsmaterial verschiedene Reprogrammierungs-Methoden verwendet. Wir konnten zeigen und damit die Literatur bestätigen, dass sowohl die ursprüngliche somatische Zellquelle, die für die Reprogrammierung eingesetzt wird, als auch die verwendete Reprogrammierungs-Methode einen Einfluss auf die Reprogrammierungs-Effizienz hat, aber nicht auf die Pluripotenzcharakteristika der generierten iPSC-Linien. So erhielten wir mit der Kombination von mesenchymalen Stammzellen und episomalen Plasmiden eine Reprogrammierungs-Effizienz von über drei Prozent [8, 9]. Die Reprogrammierungs-Effizienz von Hautfibroblasten zeigte signifikant höhere Werte für das Sendai-Virus-System ($1,37 \pm 0,01$ %) und das STEMCCA-System ($1,30 \pm 0,18$ %) im Vergleich zu episomalen Plasmiden ($0,04 \pm 0,02$ %) (**Abb. 1**). Die generierten ps-iPSC-Linien wurden für zelluläre,

molekulare und phänotypische Untersuchungen direkt in iPSC-Kardiomyozyten (ps-iPSC-KMs) differenziert [10], um den klinischen Patienten-Phänotyp *in vitro* zu rekapitulieren und die patientenspezifischen Krankheitsmechanismen aufzuschlüsseln (**Abb. 1**). Mittels ps-iPSC-KMs konnten in vorangegangenen Projekten unserer Arbeitsgruppe die Pathomechanismen verschiedener kardialer Erkrankungen, z. B. die RBM20-spezifische dilatative Kardiomyopathie oder das Takotsubo-Syndrom, analysiert werden [11, 12]. Neben der Krankheitsmodellierung können iPSC-KMs für patientenspezifische Medikamententests und Toxizitätsanalysen eingesetzt werden. Die Herstellung von 3D-Organoiden bzw. zellulären 3D-Modellsystemen sowie die Zelltherapie sind weitere Anwendungsgebiete von ps-iPSC-KMs (**Abb. 1**). Die generierten iPSC-Linien können über viele Jahre in Biobanken gelagert werden.

Verunreinigungen von iPSC-Linien

Die in der Forschung verwendeten Zelllinien unterliegen aufgrund des Standardverfahrens der guten Herstellungspraxis einer genauen Zertifizierung. Regelmäßig werden diese auf genetische Mutationen, aber auch auf mikrobiologische Kontaminationen wie Mykoplasmen, überprüft [13]. Da die Zelllinien teilweise über Jahrzehnte gelagert werden, ist das Risiko einer Kontamination relativ hoch. Eine Pathogenität der generierten Zelllinien basiert jedoch oft auf einer bereits existierenden Erkrankung des Spenders [14]. Doch auch eine sekundäre Infek-

tion der Zellkultur durch erkranktes Laborpersonal oder andere zeitgleich bearbeitete kontaminierte Zelllinien ist möglich. Gerade im Hinblick auf Transplantationsversuche ist ein Screening dieser Zellen von großer Bedeutung [3]. Darüber hinaus ist es ebenso von essenziellem Interesse, das Laborpersonal zu schützen, das täglichen Kontakt zu den Zellkulturen hat. Aus den genannten Gründen ist eine genaue und regelmäßige Untersuchung bezüglich humanpathogener Kontaminationen unumgänglich. Der Fokus liegt hierbei auf HIV-1, HBV und HCV [3].

Automatisierte Hochdurchsatzmethode zur Identifizierung von humanpathogenen Viren

Unserer Arbeitsgruppe ist es gelungen, die *in-house* generierten iPSC-Linien mittels einer Hochdurchsatzmethode am Cobas® 6800/8800 (Roche) auf humanpathogene Viren zu untersuchen [8]. Diese Technologie wurde initial für die Untersuchung von humanen Blutplasmaproben verschiedener Patienten auf potenzielle humanpathogene Kontaminationen etabliert. Die Identifizierung von HIV, HBV oder HCV erfolgt über eine quantitative PCR-Analyse. Dafür werden Virus-Kits von der Firma Roche verwendet, die auf einer *dual-target*-Technologie basieren. Zwei Detektionsreagenzien sind mit Fluorophoren gekoppelt und binden spezifisch an hoch konservierte Regionen des Virusgenoms. Zur Durchführung der HIV-, HBV- und HCV-Tests werden 1×10^6 Fibroblasten oder iPSC-Zellen den Angaben des SV-Total-

RNA-Isolierungskits von Promega entsprechend lysiert und in einem größeren Volumen Lysispuffer mit dem Cobas®-spezifischen Virus-Test-Kit (Roche) am Cobas® 6800/8800 analysiert. Die Sensitivität für die Virusdetektion von HIV-1 liegt bei 20 Viruskopien pro Reaktion (cp/mL), von HCV bei 15 IU/ml und von HBV bei 10 IU/ml (**Abb. 2**). Die Analyse basiert auf einer vollautomatisierten Probenaufarbeitung. Zunächst werden Nukleinsäuren aus der Probe extrahiert, aufgereinigt und mittels quantitativer PCR-Analyse die virusspezifischen Nukleinsäuren im Wirtsgenom nachgewiesen. Da einige iPSC-Linien mittels viraler Genom-integrierender Techniken hergestellt worden sind (STEMCCA), kommt es bei der Hochdurchsatzmethode am Cobas® 6800/8800 jedoch zu Limitationen. Das STEMCCA-Virus basiert auf dem HIV-Virus und enthält noch Fragmente des gag-Gens, welches die viralen Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine codiert. Darüber hinaus sind im STEMCCA-Virus LTR (*long terminal repeats*)-Regionen vorhanden, die die virale Genexpression und Transposition steuern. Somit können diese Bereiche mittels des beschriebenen HIV-1-Testverfahrens erkannt werden und falsch-positive Resultate liefern. Wir haben interne Kontrollen verwendet, um diese falsch-positiven Ergebnisse besser zu verstehen. Mittels des simultanen Vergleichs der HIV-Last von somatischen Hautfibroblasten, die für die Reprogrammierung eingesetzt wurden, sowie verschiedenen hergestellten iPSC-Linien (mittels Genom-integrierender STEMCCA Viren und nicht-integrierender Sendai-Viren bzw. episomaler Plasmide) konnten wir zeigen, dass die Fibroblasten und die Sendai-Virus/Plasmid-generierten iPSC-Linien derselben Patienten eine negative HIV-1-Last mittels des beschriebenen Hochdurchsatzverfahrens am Cobas® 6800/8800 aufwiesen. Ausschließlich die mittels STEMCCA-Virus generierten iPSC-Linien zeigten positive HIV-1-Resultate. Derartige falsch-positive Ergebnisse konnten bei der Bestimmung der HCV- und HBV-Viruslast nicht detektiert werden (**Abb. 2**). Unsere Ergebnisse zeigten auch, dass das Geschlecht oder das Alter der Patienten sowie die Art der Ausgangszellen keine Auswirkungen auf das Testverfahren haben (**Abb. 2**, [8]).

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass mehr als 50 bereits in unserer Biobank aufbewahrten iPSC-Linien mit der Cobas 6800/8800 Hochdurchsatz-PCR-Technologie auf HIV-1 getestet werden konnten. Aus-

nahmslos alle iPSC-Linien, die mittels nicht Genom-integrierender Methoden wie Sendai-Viren oder episomalen Plasmiden generiert worden sind, zeigten negative HIV-1-Resultate mittels des Cobas® 6800/8800-Cobas-HIV-1-Test-Systems. Bezogen auf die quantitative Analyse der HCV- und HBV-Viruslast zeigten alle untersuchten iPSC-Linien und Hautfibroblasten Werte unterhalb der Detektionsgrenze. Die aufgezeigte Hochdurchsatz-PCR-Analyse ist somit eine schnelle, robuste, sensitive, verlässliche und kostengünstige *in vitro*-Methode zum Screenen von iPSC-Linien auf humanpathogene Viren. Bezogen auf die Wahl der Reprogrammierungs-Methode von somatischen humanen Zellen zu iPSC-Linien sollte also zu Beginn bedacht werden, ob regenerative Transplantationsstudien oder Medikamententests/Screenings die endgültige Anwendung der iPSC-KMs darstellen. Dafür sind nicht-Genom-integrierende Reprogrammierungs-Methoden notwendig, und nachfolgende Viruskontaminationen können mittels der Cobas-Technologie analysiert werden.

In Anbetracht der Richtlinien der guten Herstellungspraxis, der Anwendung in Transplantationsstudien und dem Schutz der Mitarbeiter im Labor sollte ein Screening auf humanpathogene Viren am Beginn jeder neuen Studie stehen. ■

Literatur

- [1] Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676
- [2] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872
- [3] Zur Hausen H (1991) Viruses in human cancers. *Science* 254:1167–1173
- [4] Somers A, Jean JC, Sommer CA et al. (2010) Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripo-

tent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 28:1728–1740

- [5] Ban H, Nishishita N, Fusaki N et al. (2011) Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:14234–14239
- [6] Okita K, Matsumura Y, Sato Y et al. (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPSC cells. *Nat Methods* 8:409–412
- [7] Yoshioka N, Gros E, Li HR et al. (2013) Efficient generation of human iPSCs by a synthetic self-replicative RNA. *Cell Stem Cell* 13:246–254
- [8] Hübscher D, Rebs S, Haupt L et al. (2019) A high-throughput method as a diagnostic tool for HIV detection in patient-specific induced pluripotent stem cells generated by different reprogramming methods. *Stem Cells Int* 2019:2181437
- [9] Streckfuss-Bömeke K, Wolf F, Azizian A et al. (2013) Comparative study of human-induced pluripotent stem cells derived from bone marrow cells, hair keratinocytes, and skin fibroblasts. *Eur Heart J* 34:2618–2629
- [10] Lian X, Zhang J, Azarin SM et al. (2013) Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc* 8:162–175
- [11] Streckfuss-Bömeke K, Tiburcy M, Fomin A et al. (2017) Severe DCM phenotype of patient harboring RBM20 mutation S635A can be modeled by patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 113:9–21
- [12] Borchert T, Hübscher D, Guessoum CI et al. (2017) Catecholamine-dependent β -adrenergic signaling in a pluripotent stem cell model of Takotsubo cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 70:975–991
- [13] Drexler HG, Uphoff CC, Dirks WG et al. (2002) Mix-ups and mycoplasma: the enemies within. *Leuk Res* 26:329–333
- [14] Moor AC, Dubbelman TM, VanSteveninck J et al. (1999) Transfusion-transmitted diseases: risks, prevention and perspectives. *Eur J Haematol* 62:1–18

Funding Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

PD Dr. rer. nat. Katrin Streckfuß-Bömeke
Kardiologie und Pneumologie
Universitätsmedizin Göttingen
Robert-Koch-Straße 40
D-37075 Göttingen
katrin.streckfuss@med.uni-goettingen.de

AUTORINNEN



Katrin Streckfuß-Bömeke

1996–2002 Biologiestudium, Universität Göttingen; dort 2006 Promotion in genetischer Mikrobiologie. 2006–2013 Postdoc, Stammzell-Labor, Universitätsklinikum Göttingen. Seit 2013 Gruppenleiterin der „Translationalen Stammzellforschung“, Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen. 2018 Habilitation: „Modellierung und Untersuchung der Krankheitsmechanismen verschiedener Herzerkrankungen mittels patientenspezifischer iPSC-Zellen“.



Daniela Hübscher

2003–2008 Biochemiestudium, Universität Hannover. 2009–2012 Promotion im Bereich der kardialen Stammzellforschung, Stammzell-Labor Universitätsmedizin Göttingen. 2013–2015 Postdoc in der Arbeitsgruppe „Molekulare Bildgebung des Herzens“, Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen. Seit 2015 Postdoc in der Arbeitsgruppe „Translationale Stammzellforschung“, Universitätsmedizin Göttingen.