

27.01.2015

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.

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 kugeligen 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 zwischen zwei Blutkapillaren in einem typischen tierischen Gewebe bis zu $300\ \mu\text{m}$, 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, reperfundierten 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 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, KIT-Spin-Off-Projekt 300Microns, Karlsruher Institut für Technologie

Kontaktieren

Karlsruhe Insitute of Technology

Hermann-von-Helmholzplatz 1

76344 Eggenstein-Leopoldshafen

Germany