

Konstante Startbedingungen für 3D-Zellkulturmethoden: Einzigartige Plattform erlaubt die Züchtung von bis zu 9.000 einheitlichen und größenkontrollierten Sphäroiden

Keine Notwendigkeit von Vorbehandlung der Platte und Zentrifugieren nach der Aussaat

3D-Zellkulturexperimente erlauben eine Wachstumssimulation, die näher an den Vorgängen im menschlichen Körper ist. Aus diesem Grund gewinnen sie insbesondere in der Life Science immer mehr an Bedeutung. Jedoch sind viele Plattendesigns in Bezug auf die Reproduzierbarkeit oder maximale Anzahl an gezüchteten Zellclustern in einem Versuch limitiert. In der Folge ist die 3D-Zellkultivierung für viele Labore zeit- und kostenintensiv. Deshalb hat das mit der Heidolph Instruments GmbH & Co. KG verpartnerte Start-Up, Kugelmeiers Ltd., die SP5D-Zellkulturplatte entwickelt, die ohne diese Begrenzungen auskommt. Ihr 5D-Prinzip kombiniert dabei die drei räumlichen Dimensionen mit den Faktoren Zeit und Zell-zu-Zell-Kommunikation: Das spezielle Design erlaubt die kontrollierte, zügige Züchtung von bis zu 9.000 gleichmäßigen Clustern auf einer Platte, was einen größeren Ertrag pro Durchgang ermöglicht. Die SP5D ist direkt einsatzbereit; eine Vorbehandlung der Platte und Zentrifugieren nach der Aussaat entfallen. Die speziell entwickelte, patentierte Geometrie und die einzigartige non-fouling Beschichtung klinischen Grades gewährleisten ein gleichmäßiges Wachstum, sodass die Ergebnisse besonders präzise und zu einem höheren Grad reproduzierbar sind. Es konnten bereits erfolgreich zahlreiche Zellgattungen in der Platte gezüchtet werden, darunter menschliche Insel- und embryonale Stammzellen sowie Maus-Stammzellen.

Die Kultivierung von Zellen im dreidimensionalen Raum entwickelt sich in vielen Laboren immer mehr zum Standard – insbesondere in Bereichen wie der Stammzellenforschung oder der regenerativen Medizin. „Im menschlichen Körper organisieren sich Zellen in Zellverbänden und Organen, das heißt sie wachsen

dreidimensional und sind nicht einfach flach“, erklärt Cordula Böttger, Applikationsspezialistin im Bereich Life Science bei Heidolph Instruments GmbH & Co. KG. „Mit einer 3D-Zellkultur lässt sich eine künstliche Umgebung schaffen, in der Zellen in allen drei Dimensionen wachsen und mit ihrer Umgebung interagieren können. Dadurch wird deren Verhalten viel näher an den realen Bedingungen im Körper nachstellbar, was klinisch relevantere Ergebnisse ermöglicht.“ Im Idealfall lässt sich die Forschung translational gestalten, sodass sich die Erkenntnisse viel schneller als bisher in therapeutische Maßnahmen übersetzen lassen.

Jedoch sind viele 3D-Zellkulturplatten entweder in der Anzahl oder der Einheitlichkeit der zu züchtenden Sphäroide limitiert, was das Verfahren für Labore trotz seiner Vorteile zu einer weniger wirtschaftlichen Alternative macht. Außerdem gilt es bei der Anwendung einiges zu beachten: So muss das Trägermaterial so beschaffen sein, dass die Sphäroide nicht zu groß werden, da sie ansonsten aufgrund mangelnder Sauerstoffversorgung durch die fehlenden Blutgefäße absterben würden. Eine Interaktion der Zellen während der Wachstumsphase sollte darüber hinaus lediglich untereinander erfolgen, um eine unkontrollierte Zelldifferenzierung durch falsche Signale zu verhindern. Deshalb war das Ziel, ein sicheres Plattendesign zu entwickeln, das diese Risiken eliminiert und gleichzeitig eine flexible Skalierbarkeit bei einfacher Handhabung erlaubt. Mit der SP5D und ihrer patentierten Geometrie ist es nun möglich, eine große Anzahl einheitlicher Sphäroide – bis zu 9.000 auf einer einzigen Platte – zu kultivieren. Damit ist das Design 400-mal platzsparender als die aktuell gebräuchliche 3D-Hängetropfen-Technologie. Die Plattform ist so aufgebaut, dass die Reproduzierbarkeit von Folgeversuchen erhöht wird, da die Experimente aufgrund der geringen Größenvarianz der gewachsenen Zellcluster immer unter identischen Ausgangsbedingungen starten.

Dreidimensionale Geometrie mit abgerundeten Böden

„Die Bezeichnung SP5D steht für ‚Sphericalplate 5D‘, wobei sich das 5D auf die insgesamt fünf beteiligten Dimensionen bezieht“, erklärt Böttger. „Sie setzen sich zusammen aus der 3D-Struktur der in der Platte wachsenden Zellcluster, aus der benötigten Zeit als vierter Dimension, die durch eine größere Ausbeute und leichtere Anwendung reduziert wird, sowie aus der sogenannten Zell-Zell-Kommunikation als fünfter Dimension, die für eine physiologisch richtige Umgebung der Zellen notwendig

ist und unerwünschte Signale unterbindet.“ Ein homogenes Zusammenspiel dieser Parameter wird unter anderem durch die patentierte Geometrie der Microwells auf der Platte erreicht. Das Prinzip lässt sich vereinfacht folgendermaßen veranschaulichen: Die Zellen gleiten in quadratische, abgerundete „Pyramiden-Löcher“ und bilden so stets gleich große Kügelchen. Dieser Aufbau führt zu einer gerüstfreien, regelmäßigen Clusterbildung, sodass das Aggregat bzw. die Zellkugel immer im Zentrum der einzelnen Mikrovertiefung gehalten wird. Dies ist bei anderen Designs oftmals nicht möglich und erschwert dementsprechend eine identische Clusterbildung.

„Auf einer SP5D stehen zwölf Wells mit je 750 Mikrowells zur Verfügung, wodurch eine sehr große Ausbeute sichergestellt wird. Der spezielle Winkel der einzelnen Vertiefungen lässt die Zellen in gleichbleibender Anzahl absinken, sodass ein zusätzliches Zentrifugieren entfällt“, so Böttger. Währenddessen verhindert die Spezialbeschichtung ein Anhaften von Proteinresten sowie eine Zell-Oberflächen-Signalisierung und unterbindet damit eine Aktivierung der Rezeptoren an der Zellwand mit zellfremden Materialien. Die besonderen geometrischen Abmessungen erlauben den Zellen dabei gerade so viel Raum zum Wachsen, dass sie eine definierte Größe nicht überschreiten, die hypoxische Schäden aufgrund der geringen Sauerstoffversorgung nach sich ziehen würde.

SP5D – für den Laboralltag und translationale Medizin optimiert

Die Arbeit mit der gebrauchsfertigen SP5D ist besonders anwenderfreundlich, sodass der Umgang mit der Plattform schnell erlernt ist: Die Anzucht erfordert keine Vorbehandlung, aufwändige Coating-Prozesse entfallen. Auch der Medienwechsel gestaltet sich durch einfaches Pipettieren sehr komfortabel, denn die Höhe der Mikrowells wurde so gewählt, dass die Zellcluster zurückgehalten werden. So werden mit einer einzigen Pipettenbewegung 750 Zellcluster geliefert, was hundertmal schneller ist als bei einzelnen Sphäroid-Plattformen. Auch das Abernten erfolgt zügig: Da die Zellen nicht an der Oberfläche haften, sind die Sphäroide „freischwebend“ und können leicht durch Abpipettieren aus der SP5D entnommen werden. Zudem ist die Plattform kompatibel mit Standard-Automatisierungseinheiten, sodass sich die 3D-Zellkultivierung leichter in bestehende Laborabläufe integrieren lässt. Die Wahl von COC (Cycloolefin-Copolymeren) als Plattenmaterial gewährleistet dabei eine Echtzeit-Bildgebung mit möglichst wenig Hintergrundrauschen.

Der hohe Grad an Standardisierung und Zuverlässigkeit prädestiniert die SP5D für den Einsatz in hochfrequenten Forschungseinrichtungen, die mit einer Vielzahl von Zelllinien sowie Co-Kultursystemen arbeiten. Einige der vielversprechendsten Anwendungen, bei denen die SP5D bereits erfolgreich zum Einsatz kommt, sind *in-vivo*-Anwendungen und die translationale Forschung. Die SP5D bietet Wissenschaftlern dabei viel Raum für Entdeckungen ebenso wie für die Kultivierung von hochwertigem Forschungsmaterial für nachgelagerte Prozesse. Gut lässt sich dies beispielsweise anhand der Krebs- und Stammzellenforschung zeigen: „Viele Krebsarten gehen von Stammzellen aus, wobei unsere Plattform genutzt werden könnte, um die Umgebung von Krebszellen nachzubilden – einschließlich der Zellsignalübertragung und der Physiologie. Auf diese Weise ließen sich z.B. Chemotherapeutika vergleichen und die jeweils wirksamste Behandlung für den Patienten feststellen“, fasst Böttger den translationalen Nutzen der SP5D zusammen.

Weitere Informationen im Internet unter www.heidolph-instruments.com