

# WHITEPAPER

## Magnetische 3D-Zellkulturtechnik – eine einfache und effektive Technologie mit breitem Anwendungsbereich

Zellkulturmodelle spielen in der Wirkstoffforschung, dem Tissue Engineering, sowie in der Stammzellen- und Grundlagenforschung eine wichtige Rolle. Zurzeit kommen dort hauptsächlich zweidimensionale (2D) Zellkulturen, sogenannte „Monolayer“ zum Einsatz. Monolayer-Kulturen liefern allerdings oft Ergebnisse mit beschränkter Aussagekraft. Dies schlägt sich zum Beispiel in einer ca. 95%igen Ausfallrate bei klinischen Studien mit potentiellen Krebsmedikamenten nieder. In konventionellen 2D-Zellkulturen werden die Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) nicht ausreichend exprimiert. Zell-Zell- und Zell-Matrix- Interaktionen finden nur beschränkt statt. Diese Faktoren beeinflussen aber *in vivo* erheblich Differenzierung, Proliferation und Zellfunktionen<sup>2</sup>. Die Etablierung von 3D-Zellkulturtechniken verspricht die Entwicklung von Testsystemen mit höherer physiologischer Relevanz, die dazu beitragen die Aussagekraft präklinischer Ergebnisse in der Wirkstoffentwicklung zu verbessern<sup>3-5</sup>.

In diesem Whitepaper werden zwei effektive Techniken für die 3D-Zellkultur vorgestellt: die magnetische Levitation und das magnetische Bioprinting (Abb. 1). Beide Techniken beruhen auf der Magnetisierung von Zellen mit NanoShuttle™-PL. Nach der Magnetisierung werden die Zellen in einem zweiten Schritt mithilfe von schwachen magnetischen Kräften entweder in der Schwebe (Levitation) oder am Wellboden (Bioprinting) zusammengeführt und bilden dort biologisch repräsentative 3D *in vitro* Modelle aus.

Da die magnetisierten Sphäroide beim Hinzufügen oder Entfernen von Flüssigkeiten durch Magnete am Wellboden fixiert werden können, gehen keine Sphäroide beim Medienwechsel oder bei Waschschritten verloren. Die Sphäroide können mithilfe eines magnetischen Stiftes, dem sogenannten MagPen™, aufgenommen und umgesetzt werden<sup>6</sup>.

NanoShuttle™-PL sind Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm, die aus Gold, Eisenoxid und Poly-L-Lysin bestehen<sup>7</sup>. Diese Nanopartikel heften sich während einer statischen Inkubationsphase über Nacht durch elektrostatische Anziehung an die Zellmembran an und führen so zu einer Magnetisierung der Zellen. Nach der Anlagerung von NanoShuttle™ PL erscheinen die Zellen braun gesprenkelt. NanoShuttle™-PL haftet bis zu 8 Tage an der Zellmembran und wird danach in die 3D-Kultur freigesetzt<sup>8</sup>. NanoShuttle™-PL ist biokompatibel und hat keine negativen Auswirkungen auf den Stoffwechsel, die Proliferation und den inflammatorischen Stress in der Zelle<sup>6</sup>. In 3D-Kulturen werden sogar positive Effekte auf

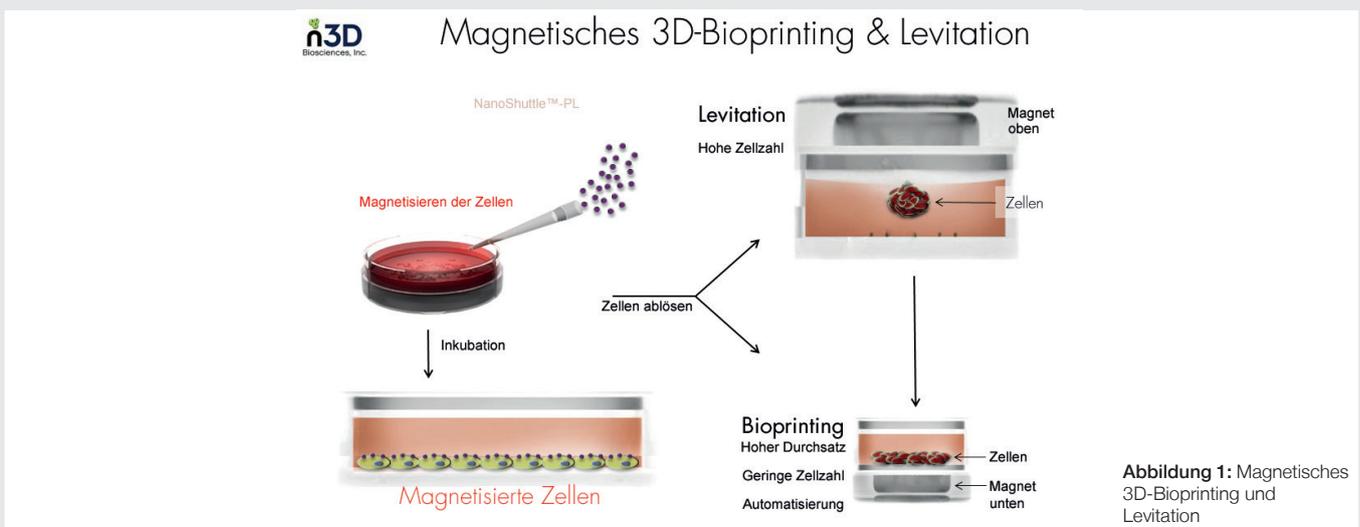
die Zellproliferation beobachtet<sup>8,9</sup>. Experimentelle Techniken wie Fluoreszenzmessungen<sup>9</sup> oder Western Blots<sup>11</sup> werden durch NanoShuttle™-PL nicht beeinträchtigt.

### Levitation – 3D-Zellkultur im Schwebezustand

Die magnetische Levitation ist eine einfache Methode, um Bedingungen, wie sie in nativem Gewebe herrschen, *in vitro* nachzubilden. Die Zellen werden über Nacht mit NanoShuttle™-PL inkubiert. Die auf diese Weise magnetisierten Zellen werden dann in Schalen oder Multiwellplatten mit zellabweisender Oberfläche überführt. Dort werden sie von einem Magneten, der über dem Zellkulturgefäß platziert wird, in einen Schwebezustand angehoben<sup>9</sup>. Die Magnetkräfte wirken hierbei wie ein unsichtbares „Gerüst“, durch dessen Hilfe die Zellen schnell zusammenfinden. Die aggregierten Zellen beginnen unmittelbar mit der Expression von EZM-Komponenten. Die Verwendung eines speziellen Mediums ist nicht notwendig. Die schwebenden 3D-Zellkulturen sind für Langzeitversuche geeignet<sup>10</sup>.

### Anwendungsbeispiele für die magnetische Levitation

Die magnetische Levitation wurde bereits erfolgreich zur Kultivierung von unterschiedlichen Zelllinien, Stammzellen und Primärzellen in 3D<sup>6,9,10-14</sup> eingesetzt. Im Wesentlichen dient diese Technologie dazu, 3D-Zellkulturen unter verschiedenen Bedingungen zu kultivieren, um sie mit gängigen biologischen



Techniken, wie immunohistochemischen Analysemethoden<sup>6,10</sup> und Western Blots<sup>11</sup> zu untersuchen. Eine typische Anwendung für die Levitation ist ein Invasionsassay mit humanen Glioblastoma-Zellen und Astrozyten (Abb. 2). Für den Versuch wurden zunächst beide Zelllinien separat als Levitationskultur angezogen und anschließend zusammengeführt. In der so entstandenen Ko-Kultur wurde die Interaktion der Glioblastomazellen mit den Astrozyten untersucht<sup>9,11</sup>. Ein weiterer Anwendungsbereich der magnetischen Levitation ist die Differenzierung von Stammzellen in 3D-Kulturen. 3T3-L1 Prä-Adipozyten wurden in Adipozyten differenziert. In einer Ko-Kultur mit Endothelzellen haben sich vaskularisierte Adiposphären ausgebildet (Abb. 3)<sup>10,13</sup>. Für solche 3D-Kulturen können Petrischalen oder 6- und 24-Well-Platten mit zellabweisender Oberfläche verwendet werden.

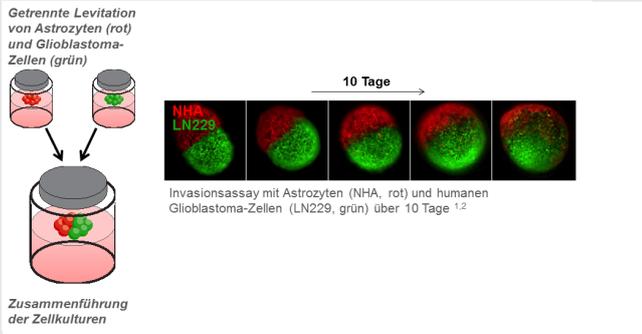


Abbildung 2: Invasionsassay mit Astrozyten und Glioblastoma-Zellen<sup>9,11</sup>

### Magnetisches Bioprinting

Im Gegensatz zur magnetischen Levitation werden beim magnetischen 3D-Bioprinting magnetisierte Zellen mit Hilfe von schwachen magnetischen Kräften am Wellboden zu Sphäroiden zusammengeführt. Hierzu werden die Zellen in einer 96 oder 384 Well Microplatte mit zellabweisender Oberfläche ausgesät. Die befüllte Microplatte wird kurzzeitig auf eine Plattform mit Magnetstiften gesetzt. Die Magnetstifte, die jeweils zentral unter den Wells der Microplatte lokalisiert sind, führen die Zellen innerhalb von 15 min bis zu wenigen Stunden zu Sphäroiden zusammen. Nach der Inkubationszeit können die Magnetstifte entfernt werden. Das magnetische Bioprinting bringt viele Vorteile mit sich. Die Zellen finden sehr schnell zu Sphäroiden zusammen, die dann ohne Bindung an ein festes Substrat wachsen. Die Größe der Sphäroide ist in Abhängigkeit von der Zellzahl reproduzierbar. Die Technologie ist für Hochdurchsatz-Anwendungen im 96 und 384 Well Format geeignet und nicht auf spezifische Zelltypen beschränkt.

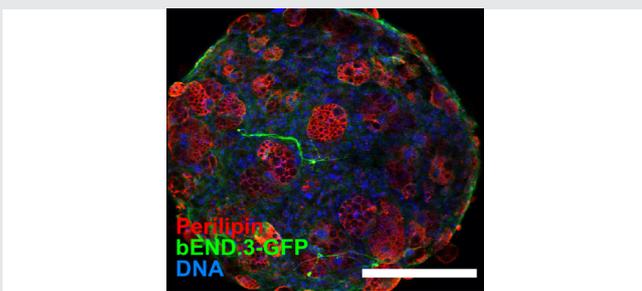


Abbildung 3: Aus 3T3-L1 Prä-Adipozyten und GFP-exprimierenden bEND.3 Maus-Endothelzellen gebildeter Sphäroid. Die Sphäroide wurden nach der Adipogenese mit Perilipin-Antikörpern (rot) und GFP-Antikörpern (grün) markiert<sup>10</sup>.

### Anwendungsbeispiele für das magnetische Bioprinting

Mithilfe des magnetischen 3D-Bioprinting können wachstumsfähige Sphäroide generiert und die Viabilität der Zellen in den Sphäroiden

kontinuierlich mithilfe handelsüblicher Assays wie dem RealTime-Glo™ (Promega) analysiert werden. Die Kombination von Zellviabilitätsassays mit dem 3D-Bioprinting stellt eine ideale Methode für das Compound Screening im Hochdurchsatz dar<sup>15</sup>.

Das magnetische 3D-Bioprinting eignet sich bestens zur Entwicklung von innovativen Assays, die den Effekt von Wirkstoffen auf die Zellmigration untersuchen. Werden automatisierte kinetische Imaging-Verfahren miteinbezogen resultiert dieser Ansatz in einer robusten Methode für das High Throughput und das High Content Screening (Abb. 4)<sup>16</sup>.

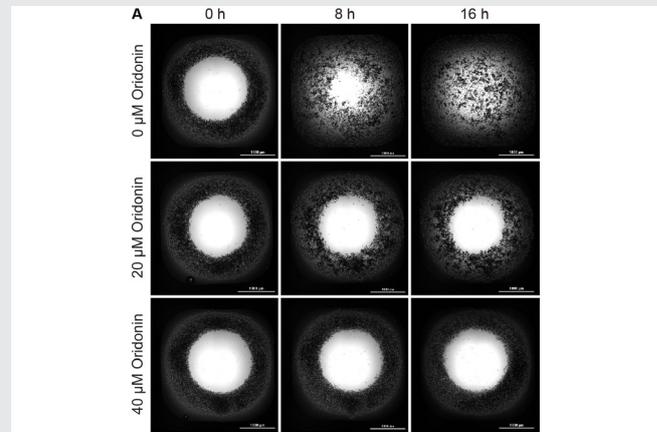


Abbildung 4: Ring Assay mit Keratinozyten. (A) Ausbildung von dreidimensionalen Ring-Strukturen mittels 3D Bioprinting. Die Zugabe von Oridonin stoppt die Migration der Zellen in den Innenraum<sup>16</sup>.

### Zellkulturgefäße mit zellabweisender Oberfläche - Die optimale Plattform für magnetische Zellkulturen

Die magnetische Zellkultur zeichnet sich durch schnelle Ausbildung von Sphäroiden und eine sehr einfache Handhabung aus. Die Sphäroide werden ohne Bindung an ein festes Substrat kultiviert. Eine Anheftung der Zellen an die Oberfläche der Zellkulturgefäße darf nicht erfolgen. Deshalb sind Standard-Zellkulturprodukte, die das adhären Zellwachstum unterstützen, nicht für die magnetische Zellkultur geeignet. CELLSTAR® Zellkultur-Gefäße von Greiner Bio-One mit zellabweisender Oberfläche verhindern wirkungsvoll das Anheften von Zellen und bieten somit eine perfekte Plattform für die magnetische Zellkultur.

- <sup>1</sup> Kola, I.; Landis, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004, 3 (8), 711-715.
- <sup>2</sup> Mazzoleni, G.; Di Lorenzo, D.; Steimberg, N. Modeling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr.* 2009, 4 (1), 13-22.
- <sup>3</sup> Pampaloni, F.; Reynaud, E.G. & Stelzer, E.H.K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 839-845 (2007).
- <sup>4</sup> Abbott, A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 424, 870-872 (2003).
- <sup>5</sup> Griffith, L.G. & Swartz, M.A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 211-224 (2006).
- <sup>6</sup> Tseng, H. et al. Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole coculture model using magnetic levitation. *Tissue Eng. Part C. Methods* 19, 665-75 (2013).
- <sup>7</sup> Tseng, H. et al. A three-dimensional co-culture model of the aortic valve using magnetic levitation. *Acta Biomater.* 10, 173-82 (2014).
- <sup>8</sup> Castro-Chavez, F., Vickers, K. C., Lee, J. S., Tung, C.-H. & Morrisett, J. D. Effect of lysophosphatidylcholine and Schnurri-3 on osteogenic transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to calcifying vascular cells in 3D culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3828-34 (2013).
- <sup>9</sup> Souza, G. R. et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat. Nanotechnol.* 5, 291-6 (2010).
- <sup>10</sup> Daquinag, A. C., Souza, G. R. & Kolonin, M. G. Adipose tissue engineering in three-dimensional levitation tissue culture system based on magnetic nanoparticles. *Tissue Eng. Part C. Methods* 19, 336-44 (2013).
- <sup>11</sup> Molina, J. R., Hayashi, Y., Stephens, C. & Georgescu, M.-M. Invasive glioblastoma cells acquire stemness and increased Akt activation. *Neoplasia* 12, 453-63 (2010).
- <sup>12</sup> Becker, J.L. & Souza, G.R. Using space-based investigations to inform cancer research on Earth. *Nat. Rev. Cancer* 13, 315-327 (2013).
- <sup>13</sup> Marx, V. Cell culture: a better brew. *Nature* 496, 253-258 (2013).
- <sup>14</sup> Lee, J.S., Morrisett, J.D. & Tung, C.-H. Detection of hydroxyapatite in calcified cardiovascular tissues. *Atherosclerosis* 224, 340-347 (2012).
- <sup>15</sup> Hubert T. et al. Luminescent Viability assays in Magnetically Bioprinted 3D Cultures. White Paper. 2015
- <sup>16</sup> Larson B. et al. 3D-Migrationsassays im Hochdurchsatz. *BIOspektrum* 04-2016

Revision: Juli 2016 - F073 775