

Stammzellprozesstechnik

Biomaterialien – Nachbildung der Stammzellnische in Bioreaktoren

JULIA C. NEUBAUER, MICHAEL M. GEPP
 FRAUNHOFER-PROJEKTZENTRUM FÜR STAMMZELLPROZESSTECHNIK,
 FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR BIOMEDIZINISCHE TECHNIK IBMT, WÜRZBURG

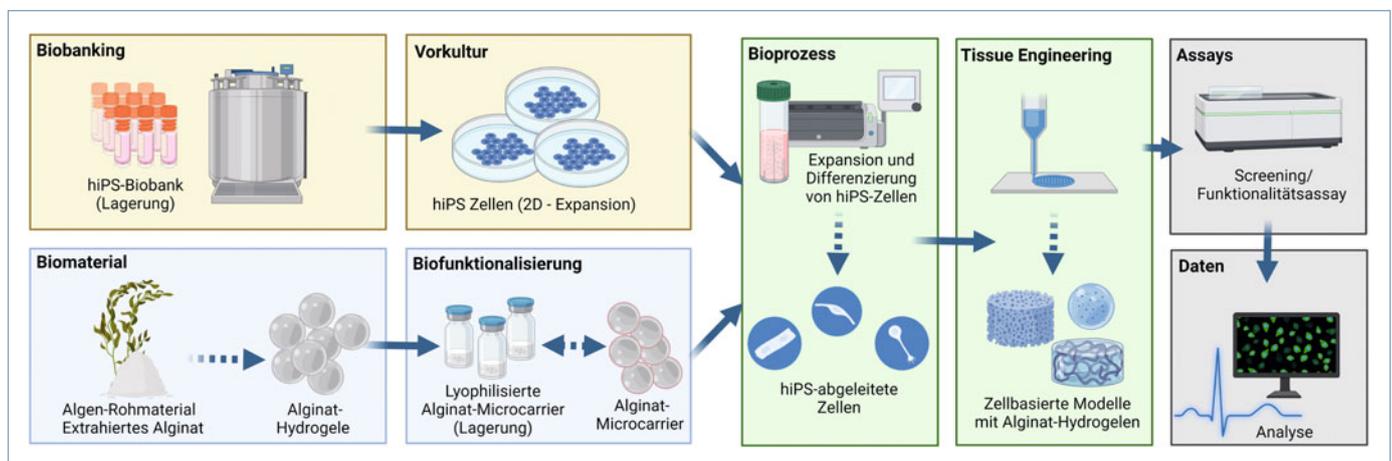
The generation of high-quality human pluripotent stem cells and their derivatives requires growth surfaces imitating the natural micro-environment. Stiff plastic surfaces with protein coatings are not an optimal stem cell niche and adjustable growth surfaces are needed to meet the cell-specific requirements. Alginate hydrogels are versatile biomaterials in stem cell processes since they can be integrated in all fundament cell workflows not only as planar surface but also as microcarrier cultures in suspension bioreactors.

DOI: 10.1007/s12268-022-1822-6
 © Die Autorinnen und Autoren 2022

■ Für die Herstellung hochwertiger Stammzellen und deren Derivate zeigt sich immer mehr, dass eine Nachbildung der physiologischen Stammzellnische von großer Bedeutung ist. Diese strukturelle und zelluläre Umgebung innerhalb eines Organismus, in denen die Stammzellen natürlicherweise vorliegen, kann zum einen durch die Zugabe von *small molecules* imitiert werden, um die Stammzeleigenschaften zu erhalten oder

eine gezielte Differenzierung in den gewünschten Zelltyp zu erreichen. Zum anderen sollten die bereitgestellten Oberflächen den *in vivo*-Bedingungen nachempfunden sein. Die klassische Zellkultur auf zweidimensionalen (2D-)Polystrol-Oberflächen entspricht allerdings nicht der natürlichen Umgebung der Zellen [1]. Die Zellen können auf den harten, nicht elastischen Oberflächen nur limitiert Zell-Zell- und Zell-

Matrix-Kontakte ausbilden, wodurch die Zellfunktionalität negativ beeinflusst wird. Dies führt z. B. bei Tumorzellen im Labor zu einer langsameren Tumorprogression und einer geringeren Resistenz gegenüber Medikamenten als bei Tumorzellen *in vivo* [1]. Unser Ziel ist es daher, den vorteilhaften Einfluss von Biomaterialien auf die Zellexpansion, -differenzierung und Kryokonservierung am Beispiel von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) im Bioreaktor aufzuzeigen (Abb. 1). Das von uns verwendete Alginate-Hydrogel kann dabei ohne weitere Prozessschritte direkt in den normalen Arbeitsablauf integriert werden. Dazu werden zunächst die Braunalgen geerntet, daraus Alginate extrahiert und funktionalisierte Alginate-Microcarrier als physiologische Wachstumsoberfläche hergestellt, wobei eine Langzeitlagerung der Microcarrier, z. B. durch Lyophilisierung, erreicht werden kann. Die hiPS-Zellen werden in Biobanken bis zur Anwendung gelagert und dann im Suspensionsbioreaktor expandiert bzw. in spezialisierte Zelltypen differenziert. Die generierten Zellen (z. B. Kardiomyozyten oder Neurone) können zusammen mit Alginate-Hydrogelen kombiniert werden, um als komplexe Modellsysteme aussagekräftige



▲ **Abb. 1:** Herstellung und Verwendung von Alginate-Microcarriern in Bioreaktoren für hiPS-Zellkulturprozesse. Lagerung der hiPS-Zellen in Biobanken, Expansion und Differenzierung im Suspensionsbioreaktor (SBR) auf Microcarriern. Spätere Anwendung im Tissue-Engineering-Bereich oder in Medikamentenscreenings. Erstellt mit BioRender.com.

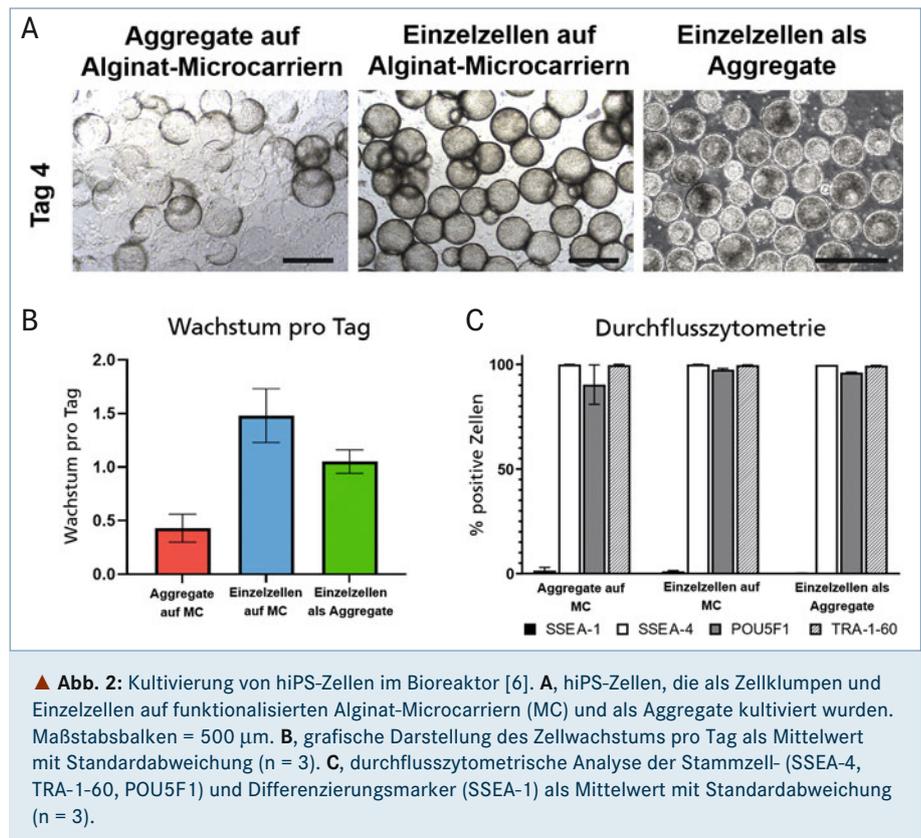
Daten zu generieren, z. B. in Medikamentenscreenings.

Biomaterialien für das Upscaling von hiPS-Zellen in Bioreaktoren

Die Entdeckung der hiPS-Zellen [2] war für die biomedizinische Wissenschaft revolutionär, da sie aus somatischen Zellen von Spendern mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund gewonnen und in Zellen aller drei Keimblätter differenziert werden können. Dadurch ist es möglich, genetische Krankheiten in Form von Zellmodellen im Labor nachzubilden und zu erforschen. Sie können als Ausgangsmaterial für Toxizitätsstudien, Wirkstoffscreenings, Krankheitsmodellierung und der regenerativen Medizin dienen. Ähnlich wie embryonale Stammzellen können hiPS-Zellen problemlos im Labor kultiviert werden, da sie sich selbst erneuern und eine unbegrenzte Vermehrungsfähigkeit besitzen. Insbesondere für humane pluripotente Stammzellen ist die Nachbildung der Stammzellnische eine wichtige – bisher noch nicht erreichte – Grundvoraussetzung.

3D-Suspensionsbioreaktoren (SBR) werden zunehmend für die Expansion von hiPS-Zellen verwendet, insbesondere, wenn große Zellmengen benötigt werden. Dabei werden die Zellen auf beschichteten Microcarriern (MC) kultiviert, wodurch die Wachstumsoberfläche der Zellen um ein Vielfaches vergrößert werden kann [3]. Diese MC können aus synthetischen oder natürlichen Materialien wie Polystyrol, Dextran, Glas, Cellulose oder Polysacchariden [4] hergestellt werden. Biopolymere natürlichen Ursprungs besitzen dabei den Vorteil der Bioabbaubarkeit und der Biokompatibilität [5]. Das Polysaccharid Alginate wird aus marinen Braunalgen gewonnen und bildet durch die Interaktion mit bivalenten Kationen (z. B. Ba^{2+}) xenofreie Hydrogele, deren mechanische Eigenschaften, Oberflächenchemie und Porosität kontrolliert eingestellt werden können. Somit eignen sich Alginate-MC hervorragend, um hiPS-Zellen in SBR zu expandieren und zu differenzieren. Wir verwenden dabei ein spezielles, kontrolliert gerichtetes Alginate (www.alginatec.com), das ein hohes Molekulargewicht besitzt und dadurch sehr hochviskos ist.

Für eine Expansion im SBR ist es möglich, die hiPS-Zellen in Form von Zellklumpen oder als Einzelzellen auf die MC zu inokulieren oder sie als Aggregate zu kultivieren (Abb. 1). Durch die Verwendung von Einzel-



zellen ist die Adhäsion an die MC homogener und die Zellausbeute kann im Vergleich zu Zellklumpen erheblich gesteigert werden (>3-fach) [6].

Kryokonservierung

Der Goldstandard in der Kryokonservierung ist das langsame Einfrieren von Einzelzellen oder kleinen Zellklumpen in Suspension. Bei hiPS-Zellen oder deren Derivaten sind allerdings innovativere Kryokonservierungstechniken erforderlich, die in den Automatisierungsablauf integrierbar sind und keine weiteren Prozessschritte notwendig machen. Daher haben wir ein neuartiges, auf ultraschnellem Einfrieren (Vitrifikation) basierendes Verfahren für adhärenz hiPS-Zellen entwickelt, die auf Alginate-MC in SBR expandiert wurden [7]. Entscheidend dabei ist, die Adhäsionszeit der hiPS-Zellen und die Elastizität der Alginate-MC zu optimieren, um keine Kryoschädigungen während des Einfrier- und Auftauprozesses zu erzeugen. Abweichungen von den optimalen Parametern führen beim Einfrieren zu Membranrisen und zu einem erheblichen Zellverlust nach der adhärenz Vitrifikation. Bei Anwendung der optimalen Bedingungen war die tropfenbasierte Vitrifikation dem konventionellen, langsamen Einfrieren überlegen [7]. Diese Methode ermöglicht es, die

hiPS-Zellen nach der Expansion im SBR direkt auf den Alginate-MC einzufrieren und zu lagern.

Differenzierung von hiPS-Zellen in NGN2-induzierte Neurone auf Alginate-Microcarrier

Im Vergleich zu herkömmlichen wachstumsfaktorbasierten Differenzierungsansätzen (z. B. *dual SMAD inhibition*) ermöglicht die Überexpression des Transkriptionsfaktors NGN2 eine beschleunigte neuronale Differenzierung. Diese Art der Differenzierung führt zu einer homogeneren und reproduzierbaren Population [8] von neuronalen Zellen nach nur zwei Tagen Differenzierung, wofür normalerweise eine Dauer von mehreren Wochen notwendig ist. Unter 3D-Bedingungen im SBR wurde eine Zunahme der Zellkonfluenz auf den MC während einer fünf-tägigen Kultur beobachtet, die vergleichbar zur Entwicklung der Zellzahl in der 2D-Kultur war [6]. Allerdings wurde nach fünf Tagen eine deutlich geringere Zellausbeute als in 2D erzielt, da sich die Zell-Zell-Kontakte in den 3D-Ansätzen wahrscheinlich stärker ausgebildet haben als es in planaren 2D-Kulturen möglich ist. Insgesamt war die Differenzierungseffizienz in 3D-Ansätzen nicht von 2D-Kulturen zu unterscheiden, was das Potenzial unserer 3D-Protokolle für eine

hochskalierbare Produktion von Neuronen bestätigt [6].

Lyophilisierung der Alginat-Microcarrier zur langfristigen Lagerung

Alginat-MC können nach ihrer Herstellung und Modifikation [3] in isotoner Kochsalzlösung bei 4 °C für mehrere Wochen gelagert werden. Für eine Langzeitlagerung ist diese Art der Lagerung nicht geeignet. Angekoppelte biologische Makromoleküle können durch degradierende Prozesse in Lösung ihre Funktionalität verlieren. Des Weiteren sedimentieren die MC, wodurch sie aggregieren und verkleben. Wir entwickeln daher Protokolle, um Alginat-MC mittels Lyophilisierung (Gefriertrocknung) über die Prozessschritte Einfrieren, Sublimation im Vakuum und Nach Trocknung für eine Langzeitlagerung zu entwässern. Bei den Alginat-MC besteht dabei die Herausforderung (1) die Form und mechanischen Eigenschaften des Alginat-Hydrogels und (2) die biochemischen Eigenschaften der kovalent gekoppelten Proteinschicht zu erhalten. Mit einem entwickelten Lyophilisationsprotokoll ist es gelungen, morphologisch intakte und funktionale Alginat-MC zu trocknen, die nach erfolgter Rekonstituierung weiterhin eine vergleichbare Form und Oberflächenbeschaffenheit sowie Adhäsion und Proliferation von hiPS-Zellen zeigen.

Ausblick

Wir konnten in unseren Arbeiten bisher zeigen, dass die Kultivierung und Differenzierung von humanen Stammzellen unter 3D-Bedingungen auf Biomaterialien vorteilhaft für deren Zellverhalten und -funktionalität sein kann. Dabei konnte das Alginat-Hydrogel vollständig in den Arbeitsablauf zur Expansion, Differenzierung und Kryokonservierung von hiPS-Zellen integriert werden. Durch eine Modifikation der Beschichtung können die Alginat-MC an die

individuellen Zellbedürfnisse angepasst werden. Zukünftig könnten durch die Alginat-MC auch noch weitere Funktionalitäten zur Optimierung des Arbeitsablaufs, wie z. B. die kontrollierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren oder das enzymfreie Ablösen von Zellen durch schaltbare Oberflächen, hinzugefügt werden.

Danksagung

Diese Studie wurde im Rahmen des Siebten Rahmenprogramms (FP7) von der Europäischen Kommission (FP7-HEALTH), Vereinbarung-Nr. 601865 (DropTech) und von der Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking (JU), Vereinbarung-Nr. 821362(EBiSC2) finanziert.

Literatur

- [1] Huang L, Abdalla AME, Xiao L et al. (2020) Biopolymer-based microcarriers for three-dimensional cell culture and engineered tissue formation. *Int J Mol Sci* 21: 1895
- [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] Zweigerdt R, Olmer R, Singh H et al. (2011) Scalable expansion of human pluripotent stem cells in suspension culture. *Nat Protoc* 6: 689–700
- [4] Gepp MM, Fischer B, Schulz A et al. (2017) Bioactive surfaces from seaweed-derived alginates for the cultivation of human stem cells. *J Appl Phycol* 5: 2451–2461
- [5] Rodrigues AL, Rodrigues CAV, Gomes AR et al. (2018) Dissolvable microcarriers allow scalable expansion and

- harvesting of human induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions. *Biotechnol J* 14: e1800461
- [6] Kwok CK, Sébastien I, Hariharan K et al. (2022) Scalable expansion of iPSC and their derivatives across multiple lineages. *Reprod Toxicol* 112: 23–35
 - [7] Meiser J, Majer J, Katsen-Globa A et al. (2021) Droplet-based vitrification of adherent human induced pluripotent stem cells on alginate microcarrier influenced by adhesion time and matrix elasticity. *Cryobiology* 103: 57–69
 - [8] Shih PY, Kreir M, Kumar D et al. (2021) Development of a fully human assay combining NGN2-inducible neurons co-cultured with iPSC-derived astrocytes amenable for electrophysiological studies. *Stem Cell Res* 54: 102386

Funding note: Open Access funding enabled and organized 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:

Dr. Julia Neubauer
 Fraunhofer-Projektzentrum für
 Stammzellprozesstechnik
 Fraunhofer-Institut für Biomedizinische
 Technik IBMT
 Neunerplatz 2
 D-97082 Würzburg
julia.neubauer@ibmt.fraunhofer.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Julia C. Neubauer

2001–2006 Diplomstudium Biologie, Universität Würzburg. 2012 Promotion, Universität des Saarlandes. 2012–2013 Leiterin Arbeitsgruppe Kryokonservierung & Zellkultur-Automatisierung, Fraunhofer IBMT, Sulzbach. 2013–2017 Leiterin Abteilung Kryo- & Stammzelltechnologie, Fraunhofer IBMT, Sulzbach. Seit 2017 Geschäftsführerin Fraunhofer-Projektzentrum SPT, Würzburg.



Michael M. Gepp

2001–2005 Bachelorstudium Bioinformatik, Universität des Saarlandes. 2005–2007 Masterstudium Biotechnologie, Universität des Saarlandes. 2017 Promotion, Universität des Saarlandes. 2018–2020 Leiter Arbeitsgruppe Stammzellmaterialien, Fraunhofer-Projektzentrum SPT, Würzburg. Seit 2020 stellv. Leiter Arbeitsgruppe Stammzelltechnologie und stellv. Standortleiter, Fraunhofer-Projektzentrum SPT, Würzburg.