

Stammzellendifferenzierung unter kombinierter physiologischer Stimulation

1. Motivation und Ziele

Die Züchtung von Gewebeersatz (Tissue-Engineering) unter Nutzung adulter Stammzellen, ist ein vielversprechender Zweig der modernen biomedizinischen Forschung¹. Entsprechend beschäftigt sich eine große Zahl aktueller Studien mit Aspekten der Stammzellendifferenzierung um optimierte Protokolle zu entwickeln. Die Differenzierung wird von einer Vielzahl an Parametern, die oft schwer definierbar und kontrollierbar sind, beeinflusst, was häufig zu unvergleichbaren oder inkonsistenten Studienergebnissen führt. Wichtige Einflußgrößen sind beispielsweise die Medienzusammensetzung und lösliche Signalmoleküle, mechanische Belastung und Sauerstoffangebot. In Standardkultursystemen können diese Parameter nicht oder nur unzureichend gesteuert werden. Um eine bessere Kontrolle über die Kultivierungsparameter zu erzielen wurde im vorliegenden Projekt ein mikrofluidisches System etabliert. Des weiteren basiert die Auswertung vieler existierender Studien vorwiegend auf mikroskopischen Bildern und Endpunktanalysen, welche zwar qualitative Informationen bieten jedoch keinen Rückschluß auf quantitative Veränderungen im Zeitverlauf zulassen. Um diese Limitation zu überwinden war es ein weiteres Ziel dieses Projekts nicht-invasive Biosensoren in die mikrofluidischen Zellkulturkammern zu integrieren und so kontinuierliche quantitative Messungen zu ermöglichen.

2. Durchführung und Ergebnisse

Das Forschungsvorhaben beschäftigte sich mit physiologischen Parametern zur Beeinflussung der Stammzellendifferenzierung. Im Speziellen waren dies Zytokinzugabe (Interleukin-1 β), Sauerstoffangebot und mechanische Stimulation. Um diese gezielt einstellen und variieren zu können, wurde Mikrofluidik als Technologieplattform gewählt. Hierbei kam einerseits eine mit Mikropumpen ausgestattete Teststation (Lab-on-a-Chip Technologie des AIT Austrian Institute of Technology) zum Einsatz, andererseits wurde ein separates mikrofluidisches System mit peristaltischer Pumpe etabliert und optimiert (Abb. 1). Kritische Entwicklungsaspekte waren insbesondere i) Handhabung und Sterilität, ii) Vermeidung und Eliminierung von Luftblasen, sowie iii) Abstimmung der Systemkomponenten um eine physiologisch relevante Scherbelastung in den Zellkulturkammern zu erreichen (Abb. 2A). Ebenso wurde die Pumpleistung der Mikropumpen kalibriert (Abb. 2B). Undifferenzierte Stammzellen weisen eine hohe Sensibilität gegenüber mechanischer Belastung auf². Entsprechend zeigte sich in unseren Versuchen, dass kontinuierliche Perfusion zu erhöhtem Zellverlust führt. Daher wurde ein optimiertes Protokoll mit einstündigen Intervallen zwischen 10-minütigen Pumpphasen etabliert.

Für die Differenzierungsversuche wurden die mikrofluidischen Kammern mit humanen mesenchymale Stammzellen (MSC) aus Fettgewebe besiedelt. Sobald sich eine konfluente Zellschicht gebildet hatte, wurde das Wachstumsmedium gegen Differenzierungsmedium getauscht und die Zellveränderungen beobachtet. Mittels Zellimpedanzmessung (Abb. 2C) konnte zwischen ostogener (Anstieg) und adipogener (Abfall) Differenzierung unterschieden werden. Bereits innerhalb von 2 Tagen waren deutliche Impedanzänderungen messbar was eine

¹ D. Eberli and A. Atala, *Methods in enzymology*, 2006, **420**, 287-302.

² L. Adamo and G. García-Cardena, *Antioxidants & redox signaling*, 2011, **15**, 1463-1473.

sehr frühe Einschätzung der Differenzierungsrichtung und –effizienz ermöglicht. Endpunktfärbungen bestätigten die Interpretation der Impedanzdaten.

Durch Platzierung der Plattform in einem entsprechenden Brutschrank wurde zugleich der Sauerstoffgehalt kontrolliert. Für die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen (5% O₂) wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zu Differenzierung unter Normoxie festgestellt. Die Zugabe geringer Konzentrationen von IL1 β (1 ng/ml) verbesserte die osteogene Differenzierung in statischer Kultur, während höhere Konzentrationen die Ablösung der Zellen vom Gefäßboden begünstigten (Abb. 2D). Im mikrofluidischen System zeigte sich eine erhöhte Sensibilität gegenüber der Zytokingabe. Bereits bei 1 ng/ml IL1 β war ein deutliches Ablösen zu beobachten (Abb. 2E). Diese Beobachtung bestätigt die Notwendigkeit kombinierte Effekte verschiedene Einflussfaktoren zu untersuchen.

3. Zusammenfassung Ausblick

Im Zuge des Projekts konnten 2 mikrofluidische Systeme erfolgreich für die Kultivierung und Differenzierung von MSC etabliert und charakterisiert werden. Wichtige Parameter wie Scherstress, Sauerstoffkonzentration und lösliche Signalmoleküle können definiert und kontrolliert werden. Weitere Versuche sind notwendig um die zahlreichen Möglichkeiten systematisch zu kombinieren und so ein kompletteres Bild über die Stammzellbiologie zu erhalten. Die nicht invasive Zellimpedanzmessung ist hierbei von entscheidender Bedeutung, da sie es erlaubt zelluläre Prozesse mit hoher zeitlicher Auflösung zu detektieren. Die systematische Untersuchung von dynamischen Zellreaktionen auf wohldefinierte Stimuli ist eine wichtige Voraussetzung um optimierte Kultivierungsprotokolle für akademische wie auch klinische Fragestellungen zu etablieren.

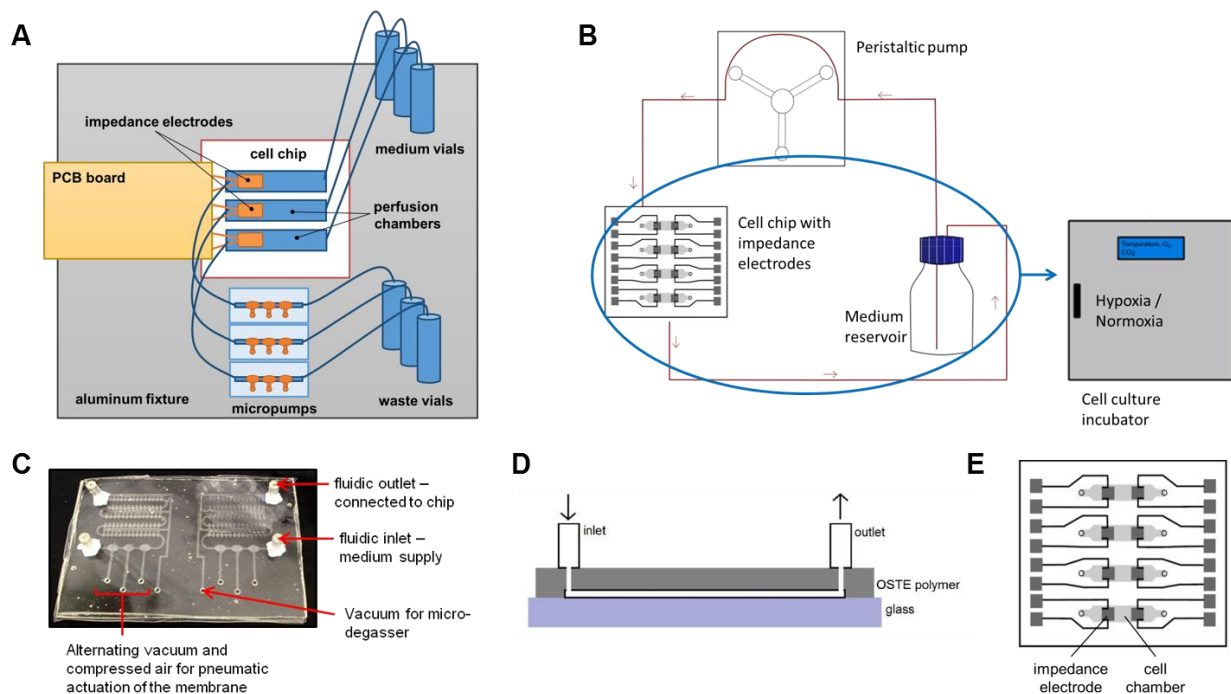


Abb. 1: Mikrofluidische Systeme und –komponenten: Schematische Darstellung der Lab-on-a-Chip Station des AIT (A) und mikrofluidisches Perfusionssystem mit Peristaltikpumpe (B); Mikropumpen (C); Aufbau der Zellkammern in Aufriss (D) und Grundriss (E).

4. Verwertung und Nutzen

Die finanzielle Unterstützung des Kooperationsprojekts zwischen der Universität für Bodenkultur (BOKU) und Peter Ertls *Cell Chip Gruppe* am AIT Austrian Institute of Technology ermöglichte eine unkomplizierte und enge Zusammenarbeit, so dass die Ressourcen beider Partner optimal genutzt werden konnten. Gleichzeitig wurde die Grundlage für eine weitere Zusammenarbeit gelegt.

Während der einjährigen Projektlaufzeit waren drei Bakkalaureats-Studierende sowie eine Masterstudentin an der Forschungsarbeit beteiligt, wodurch ihnen ein Einblick in das interdisziplinäre Gebiet der mikrofluidischen Zellkultur ermöglicht wurde. Durch die intensive Beschäftigung sowohl mit biologischen als auch technischen Fragestellungen, konnten die Studierenden ihre Stärken und Interessen besser kennenlernen, was eine wichtige Grundlage für weitere Ausbildungs- und Karriereentscheidungen darstellt.

Die Ergebnisse aus dem geförderten Projekt wurden auf mehreren internationalen Tagungen präsentiert: Short talk beim 12. Wildbad Kreuth Symposium zur Hämotherapie (Jän 2015) und bei der 4. internationalen WITE Konferenz (Juni 2015); Posterpräsentation beim 4. TERMIS World Congress in Boston (Sept 2015). Des Weiteren sind eine Präsentation bei einer DECHEMA Veranstaltung sowie eine Publikation basierend auf den im Laufe des Projekts gewonnenen Daten für das Jahr 2016 geplant.

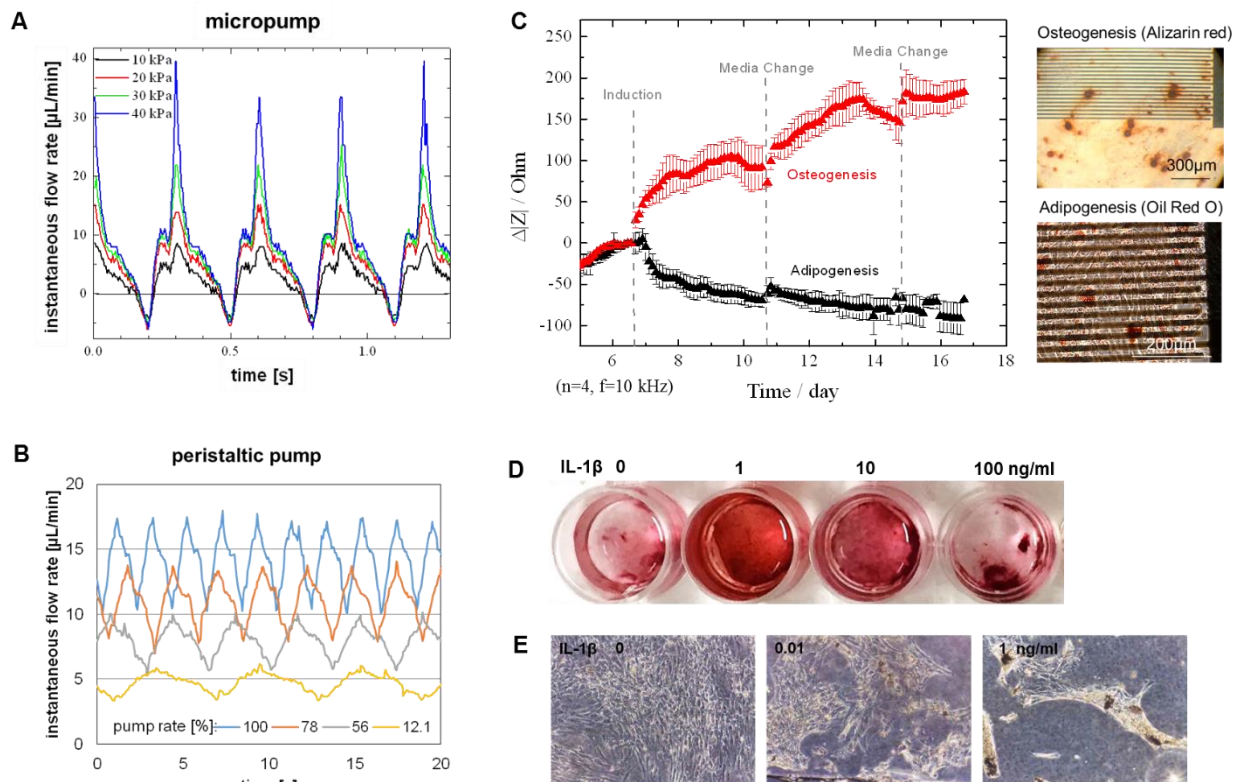


Abb. 2: Mikrofluidische MSC Kultivierung: Charakterisierung der Perfusionsprofile der Mikropumpen (A) und der peristaltischen Pumpe (B); Impedanzsignal und Endpunktfärbung osteogener und adipogener Differenzierung (C); Alizarin Rot Färbung nach 11 Tagen osteogener Differenzierung unter Stimulation mit IL1 β in statischer Kultur (D) und mikroskopische Zellbilder nach 10 Tagen im mikrofluidischen System (E).