

3D-Zellkultur

3D-Migrationsassays im Hochdurchsatz

BRAD LARSON¹, LEONIE RIEGER¹, HUBERT TSENG², GLAUCO R. SOUZA²,
ALEKSANDRA VELKOVA-KREI³

¹ BIOTEK INSTRUMENTS, WINOOSKI, VT, USA

² NANO3D BIOSCIENCES, HOUSTON, TX, USA

³ GREINER BIO-ONE GMBH, FRICKENHAUSEN

Migration assays are a common tool to screen toxic effects of compounds. However, assays using monolayer cell cultures may not entirely represent a native *in vivo* environment and may result in misinterpretation of compound toxicity. Magnetic 3D bioprinting in combination with automated kinetic imaging provides an easy and robust high-throughput screening approach of compound effects on cell migration in a 3D environment.

DOI: 10.1007/s12268-016-0704-1

© Springer-Verlag 2016

■ Zellmigrationsassays wie der Scratch-Test zählen zu den am häufigsten verwendeten Toxizitätstests. In einem Scratch-Test werden Zellen aus einem zweidimensionalen Zellrasen entfernt und der Einfluss von Wirkstoffen auf die Regeneration der Zellen beobachtet [1].

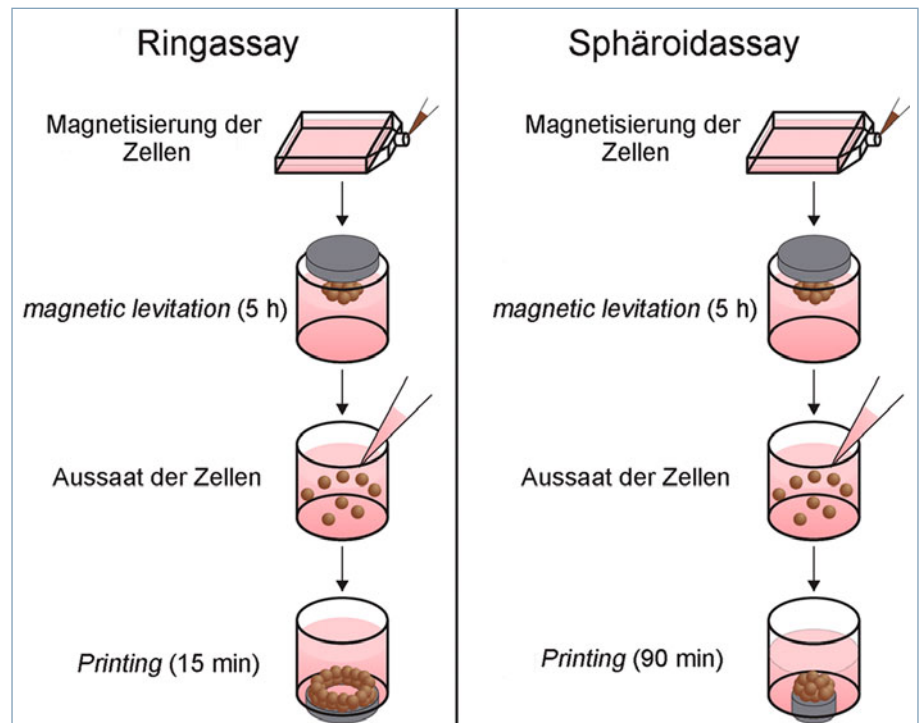
Scratch-Tests, die auf zweidimensionalen Monolayerkulturen beruhen, können *in vivo*-Bedingungen allerdings nur begrenzt nachbilden: Faktoren, die Einfluss auf das Toxizitätsprofil von Wirkstoffen haben, wie z. B. die Ausbildung von Gewebestrukturen und die Interaktion der Zellen mit der extrazellulären Matrix, können nicht nachgestellt werden. Dies kann zu einer falschen Beurteilung der Wirkstofftoxizität führen. Dreidimensionale Zellkulturmodelle, die Gewebestrukturen präziser abbilden und aussagekräftigere Testergebnisse versprechen, rücken deshalb vermehrt in den Fokus.

Neben der beschränkten Aussagekraft von Assays mit Monolayerkulturen stellt die Auswertung von Scratch-Tests im Hochdurchsatzscreening eine große Herausforderung dar. Eine manuelle mikroskopische Analyse ist sehr zeitaufwendig und deshalb nicht für den Hochdurchsatz geeignet. Durch die Verwendung eines *multi-mode imaging reader* (Cytation™ 5, BioTek Instruments) können

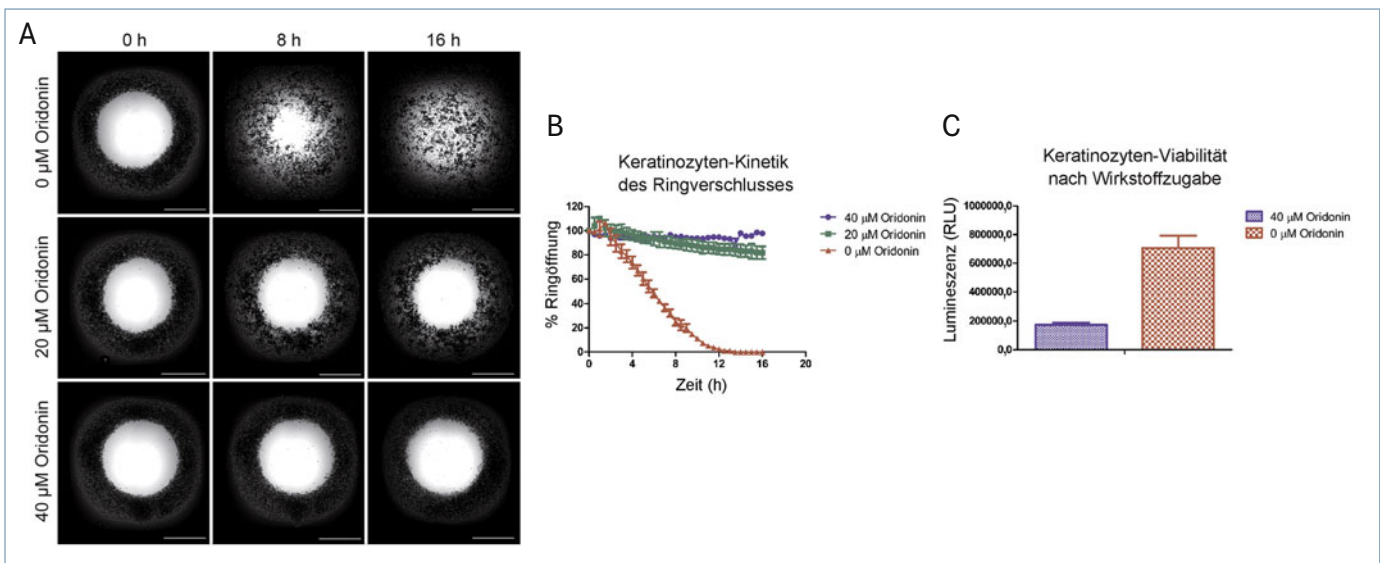
selbst 384-Well-Mikroplatten automatisiert und schnell ausgewertet werden.

3D-Migrationsassays mit magnetisierten Zellkulturen

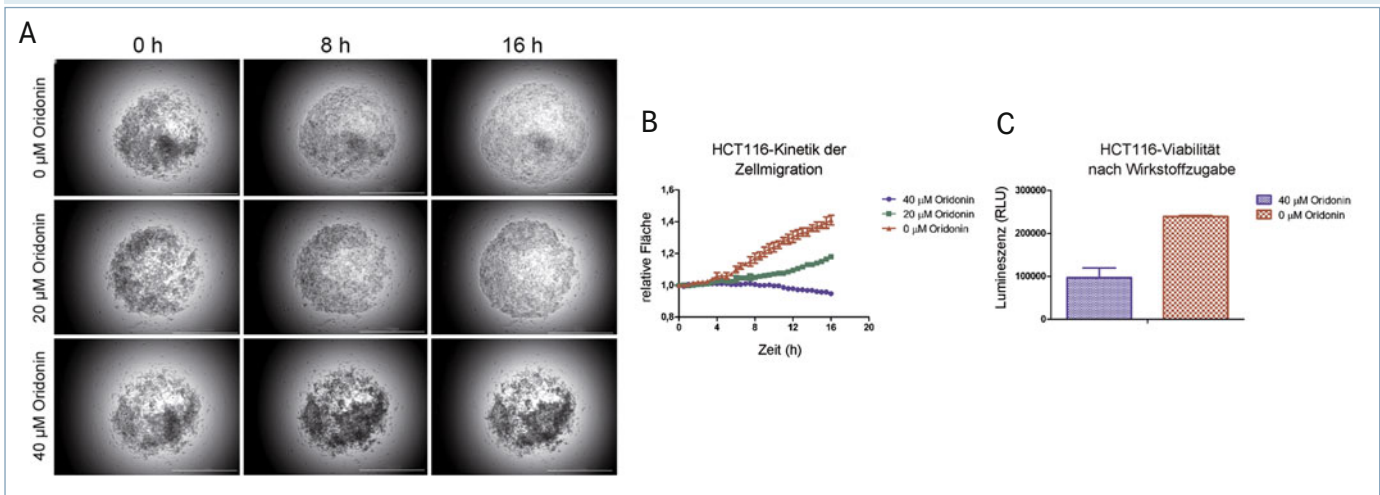
Eine einfache Methode zur Ausbildung dreidimensionaler Strukturen ist das magnetische 3D-Bioprinting. Hierbei werden Zellen mit biokompatiblen Nanopartikeln aus Gold, Eisenoxid und Poly-L-Lysin (NanoShuttle™, Nano3D Biosciences) [2] inkubiert. Die Nanopartikel lagern sich unspezifisch an die Zellmembran an und magnetisieren so die Zellen. Diese können dann mithilfe schwacher magnetischer Kräfte, in Abhängigkeit der Form des verwendeten Magneten, zu definierten dreidimensionalen Strukturen zusammengeführt werden.



▲ **Abb. 1:** Ausbildung von dreidimensionalen Ring- und Sphäroidstrukturen mittels 3D-Bioprinting. Die Zellen werden durch die Zugabe von NanoShuttles™ über Nacht magnetisiert, abgelöst, in die Wells einer 6-Well-Platte überführt und dort fünf Stunden mithilfe eines Magnetaufsatzes in der Schwebelage inkubiert (*magnetic levitation*). Die Zellen, die in dieser Zeit aggregieren und beginnen, eine extrazelluläre Matrix auszubilden, werden resuspendiert und in die Wells einer 384-Well-Platte überführt (Aussaat der Zellen). Die Ausbildung einer Ringstruktur bzw. eines Sphäroids erfolgt, indem die Platte für 15 bzw. 90 Minuten auf Magnete mit entsprechender Geometrie aufgesetzt wird (*Printing*).



▲ **Abb. 2:** Ringassay mit Keratinozyten. **A**, Ausbildung von dreidimensionalen Ringstrukturen mittels 3D-Bioprinting. Die Zugabe von Oridonin, einem Apoptose-Induktor, stoppt die Migration der Zellen in den Innenraum. Maßstabsbalken: 1.000 µm. **B**, Real-Time-Analyse des Innendurchmessers mittels Cytation™ 5 und Gen5™-Software. **C**, Die Daten des Viabilitätsassays (ApoSENSOR™ Cell Viability Kit, Enzo Life Sciences) spiegeln die Zellmigrationsdaten wider.



▲ **Abb. 3:** Sphäroidassay mit humanen Kolonkarzinomzellen (HCT-116-Zellen). Maßstabsbalken: 1.000 µm. **A**, Migration nach außen und Wachstum der mittels 3D-Bioprinting erstellten Sphäroide. **B**, Die Flächenanalyse zeigt, dass der Apoptose-Induktor Oridonin die Migration verlangsamt bzw. bei Zugabe von 40 µmol Oridonin umkehrt. **C**, Die Daten des Viabilitätsassays (ApoSENSOR™ Cell Viability Kit, Enzo Life Sciences) untermauern die Zellmigrationsdaten.

Das 3D-Bioprinting eröffnet zwei Ansätze für einen 3D-Migrationsassay: (1) Beim Ringassay bilden die Zellen in Anlehnung an den Scratch-Test eine Ringstruktur aus, in die die Zellen im Verlauf des Assays einwandern. Dieser Versuch eignet sich besonders für Zelllinien wie Keratinozyten, die bei der Wundheilung nach innen migrieren. (2) Beim Sphäroidassay werden die Zellen beim *Printing* zu einem Sphäroid zusammengeführt. Während und unmittelbar nach dem *Printing* ziehen sich die Zellen zusammen und migrieren dann im Verlauf des Versuchs aus dem resultierenden Sphäroiden nach außen. Die Migrationsbewegung spiegelt hierbei die Zellvi-

lilität wider. Dieser Ansatz ist besonders für Assays geeignet, mit denen Metastasen-bildende Zellen, die nach außen migrieren, untersucht werden sollen.

Für beide Assays werden die Zellen in einem ersten Schritt magnetisiert, indem NanoShuttles™ der Zellkultur beigefügt werden (Abb. 1). Während der Kultivierung über Nacht unter Standardbedingungen lagern sich die magnetischen Nanopartikel elektrostatisch an die Zellmembran an. In einem weiteren Schritt werden die Zellen in eine Sechswell-Multiwellplatte (CELLSTAR®, mit zellabweisender Oberfläche, Greiner Bio-One) überführt und mithilfe eines Magneten, der

auf der Platte platziert wird, frei schwebend kultiviert (*magnetic levitation*). Während dieser Phase aggregieren die Zellen ohne Kontakt zum Zellkulturgefäß und bilden eine extrazelluläre Matrix aus. Die resuspendierten Zellen werden in eine 384-Well-CELLSTAR®-Screeningplatte überführt. In dieser Platte, deren spezielle Oberfläche ein adhären-tes Zellwachstum effektiv unterbindet, bilden die Zellen durch kurzzeitige Exposition mit einem Magneten die gewünschte dreidimensionale Struktur aus (*Printing*). Das Design des verwendeten Magneten bestimmt hierbei die Form der resultierenden 3D-Struktur.

In dieser Studie wurden Keratinozyten (1×10^5 Zellen pro Well) in ringförmigen Strukturen bis zu 16 Stunden mit und ohne Zugabe von Oridonin (Sigma-Aldrich), einem Apoptose-Induktor kultiviert (**Abb. 2A**). Die toxische Wirkung des Oridonins wurde mit einem Zellviabilitätsassay (ApoSENSOR™ Cell Viability Kit, Enzo Life Sciences) nachgewiesen (**Abb. 2C**), was zu einem Migrationsstopp der Zellen in den Innenraum führt (**Abb. 2A**) und somit den Ringschluss unterbindet (**Abb. 2B**). Für den Zellmigrationsassay nach außen wurde die humane Kolonkarzinom-Zelllinie HCT-116 (1×10^4 Zellen pro Well) verwendet. Ohne Zugabe bzw. bei einer niedrigen Konzentration des Oridonins migrieren die Zellen nach außen, was zu einer Vergrößerung der Sphäroidfläche führt (**Abb. 3A, B**). Aufgrund der zytotoxischen Wirkung des Oridonins bei einer Konzentration von $40 \mu\text{mol}$ (**Abb. 3C**) wird die Zellmigration nach außen unterbunden, die Fläche des Sphäroids nimmt sogar ab (**Abb. 3A, B**).

Imaging und Analyse

Die Verwendung des multifunktionalen Imaging-Lesegeräts Cytation™ 5 mit integriertem automatisiertem, digitalem Mikroskop in Kombination mit der Analysesoftware Gen5™ (beide BioTek Instruments) ermöglicht eine Auswertung der 3D-Migrationsassays im Hochdurchsatz. Neben der automatisierten Aufnahme von Durchlichtbildern erfolgt die Ermittlung des inneren Durchmessers der Ringstrukturen (**Abb. 2**) bzw. der Sphäroidfläche (**Abb. 3**).

Fazit

3D-Bioprinting mit magnetisierten Zellen ist eine unkomplizierte und schnelle Methode zur Entwicklung von Migrationsassays unter 3D-*in vitro*-Bedingungen. Das automatisierte Imaging im Cytation™ 5 hilft, 3D-Migrationsassays im Hochdurchsatz zu analysieren und mit *high-content*-Daten zu ergänzen.

Das 3D-Bioprinting mit magnetisierten Zellen und das automatisierte Imaging im Cytation™ 5

ergeben in Kombination eine zielführende Methode für das Toxizitätsscreening von Wirkstoffen im Hochdurchsatz. ■

Literatur

- [1] Werner S, Krieg T, Smola H (2007) Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 127:998–1008
- [2] Souza GR, Molina JR, Raphael RM et al. (2010) Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol* 5:291–296

Korrespondenzadresse:

Dr. Aleksandra Velkova-Krei
Greiner Bio-One GmbH
Maybachstraße 2
D-72636 Frickenhausen
Tel.: 07022-948-0
Fax: 07022-948-569
Aleksandra.Velkova-Krei@gbo.com
www.gbo.com