

Basic paper

WAS IST

3D-ZELLKULTUR UND WIE FUNKTIONIERT DIE 3D-METHODE?

Inhalt

1. Einführung
2. Was genau ist 3D-Zellkultur?
 - a. Die extrazelluläre Matrix
 - b. Organoide und Sphäroide
3. Welche Formate gibt es bei 3D-Zellkulturen?
Methoden zur Bildung von Sphäroiden
 - a. Pellet-Kultur
 - b. Hanging Drop
 - c. Sphäroid-Bildung in Mikrotiterplatten
4. Gerüstbasierte Methodentechnik
 - a. Vorgefertigte Matrizen
 - b. Hydrogele
 - c. Zelltücher



1. Einführung

Zellkultur ist ein wichtiger Forschungsbereich, welcher mehr und mehr Beachtung findet. Tierische Zellen bieten hier die Grundlage für die verschiedenen Forschungen sowie die Untersuchung und Wirkung von neuen Medikamenten auf die Zelle. Zusätzlich ist es möglich, dass Tierversuche erheblich reduziert werden können. Aber auch in der Zellkultur können unterschiedliche Ansätze verfolgt werden. In der 2D-Zellkultur werden die tierischen Zellen entweder in einer Suspensionskultur (freischwebend im Medium) oder als adhärenente Zellen (einlagige Schicht auf einer

Oberfläche) kultiviert. Bei der 2D Zellkultur kann man allerdings an gewisse Grenzen stoßen, da viele Wechselwirkungen, vor allem zwischen den Zellen, vernachlässigt werden. Um diese Einschränkungen zu umgehen, kann die 3D-Zellkultur in Betracht gezogen werden. Der Hintergrund für die 3D-Zellkultur ist eigentlich relativ simpel. Dadurch, dass die Welt und sämtliche Organismen dreidimensional strukturiert sind, macht es natürlich Sinn, dies auch auf die Zellkultur zu übertragen.

Mit der 3D-Zellkultur kann die natürliche Umgebung eines Organs oder Organismus besser nachempfunden werden. Dies zeichnet sich auch positiv auf die Forschungsergebnisse aus, da zum Beispiel die Wechselwirkungen von Wirkstoffen in einer 3D Zellkultur besser beobachtet und nachempfunden werden können. In diesem Basic Paper wird der Fokus auf das Thema „3D-Zellkultur“ gelegt.

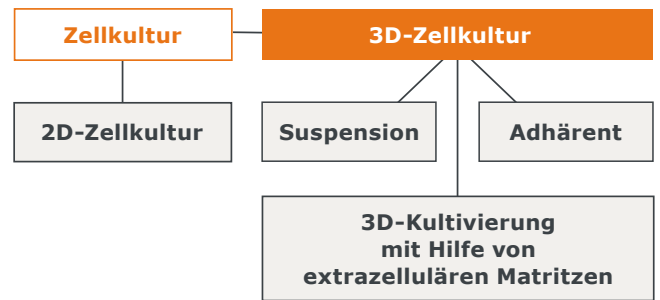


Abb. 1: Methoden der 3D-Zellkultur

2. Was genau ist 3D Zellkultur?

Wie schon kurz erwähnt, ist die natürlichste Form von Zellverbänden und Organen die Dreidimensionale. Dementsprechend ist es von Vorteil, wenn noch bessere *in vivo* Bedingungen geschaffen werden sollen, diese nachzustellen. Aber was genau wird für die Kultur in 3D benötigt und was ist der generelle Unterschied zu der herkömmlichen zweidimensionalen Zellkultur? Die 2D-Zellkultur ist begrenzt, da diese Form der Zellkultur nur einen Teil der *in vivo* Situation von Zellverbänden simulieren kann. Dies liegt daran, dass in der üblichen 2D-Zellkultur Zellen auf einer Oberfläche als Monolayer

einschichtig wachsen. Das Wachstum stoppt, sobald sich die Zellen innerhalb des Zellverbandes „zu nahe“ kommen und die gesamte Oberfläche des Gefäßes bedeckt ist. Für einen dreidimensionalen Ansatz benötigt man, je nach Anforderung, ein extrazelluläres Gerüst, bzw. eine Matrix, welche dem Zellverband die Möglichkeit gibt, in sämtliche Richtungen auszuwachsen. Andere Möglichkeiten sind die Züchtungen von Sphäroiden oder Organoiden, um zum Beispiel Tumorbildungen und Medikamenteneinwirkungen noch besser verstehen zu können.

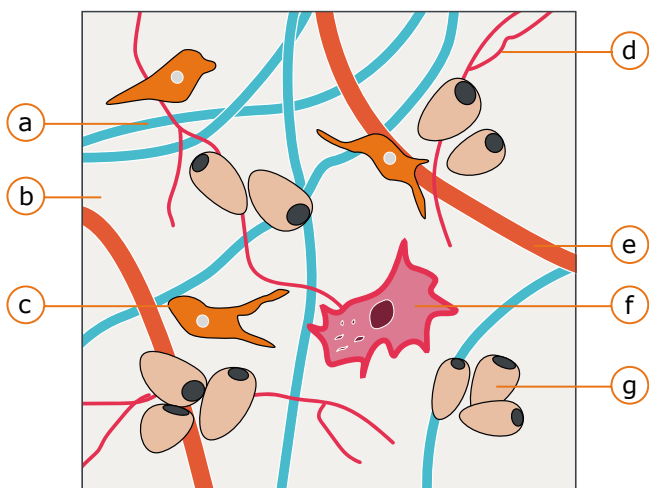


Abb. 2: Beispielhafter Aufbau einer extrazellulären Matrix mit a: Kollagenfaser; b: Grundsubstanz; c: mesenchymale Zelle; d: elastische Faser; e: Blutgefäße; f: Makrophage; g: Fettzelle

a. Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist bei tierischen Geweben vorhanden und sie ist der Gewebeanteil, der zwischen Zellen im Interzellularraum liegt. Die Hauptfunktionen sind zum Beispiel, den Wassergehalt der Gewebe zu gewährleisten, Signaltransduktion in Geweben vorzunehmen und Wundheilungsprozesse zu beeinflussen.

Dabei handelt es sich grundlegend um die Gesamtheit aller Makromoleküle, die außerhalb der Plasmamembran von Zellen in Geweben und Organen sind. Die grundlegende Funktion ist die Fixierung der Zellen. Zu beachten ist hier, dass es sich nicht um eine starre Umgebungsstruktur handelt. Die EZM und Zellen stehen im Gleichgewicht miteinander. Ein Großteil der EZM Komponenten werden in Zellen hergestellt, abgesehen über weitere Bindungen fixiert und im Anschluss außerhalb oder im Inneren der jeweiligen Zelle abgebaut.

Der Aufbau der EZM kann in zwei Gruppen eingeteilt werden: Grundsubstanz und Fasern.

Je nachdem, für welche Kulturtechnik man sich als Forscher schlussendlich entscheidet, ist es wichtig, die Wechselwirkungen der Zellen mit der extrazellulären Matrix zu verstehen.

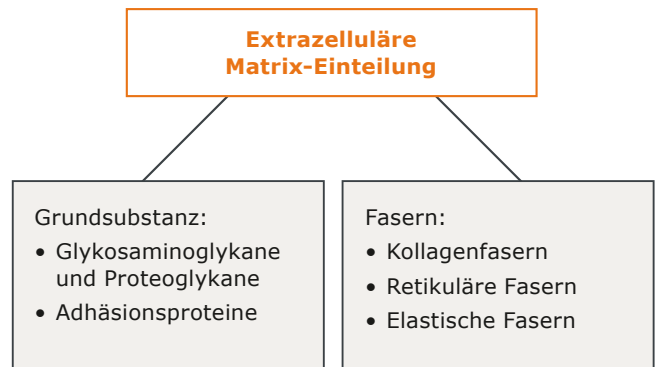


Abb. 3: Einteilung der extrazellulären Matrix

b. Organoide, Sphäroide

Organoide oder Sphäroide können auch ohne extrazelluläre Matrix kultiviert werden, weshalb sie einfacher und schneller im Labor verarbeitet werden können. Um den Unterschied beider Formen zu verstehen, werden diese in diesem Kapitel näher beleuchtet.

Sphäroide

Sphäroide sind Zellaggregate, die durch Aggregation und Organisation tausender Zellen zu einer Kugel in 3D erzeugt werden können. Sphäroide werden bevorzugt in der Tumorforschung eingesetzt. Sphäroide können aus verschiedenen Zelltypen generiert werden, zum Beispiel aus Embryoid Bodies, Hepatozyten, Tumorgewebe und Mammazellen (Brustkrebs). Innerhalb der Sphäroide erzeugen die Zellen eine heterogene Zellverteilung durch Wechselwirkungen mit dem EZM oder mit den Zellen untereinander.

Zusätzlich entsteht in der „Zellkugel“ ein metabolischer Gradient, das bedeutet, dass die Zellen außerhalb der Zelle den Großteil der Nährstoffe aufnehmen und innerhalb der Zelle eine Art „Ruhezzone“ bilden. Dieses Verhalten konnte auch oft bei Tumoren in vivo beobachtet werden, weshalb sich die Kultivierung von Sphäroiden besonders gut für Tumorforschung eignet. Zusätzlich werden Sphäroide für das Screening in der Medikamentenwirksamkeit und -toxizität verwendet.

Organoide

Organoide sind weiterentwickelte Sphäroide, welche Funktionen von spezifischen Organen haben. Im Gegensatz zu Sphäroiden sind Organoide komplexe Gewebe, welche aus mehreren Zellen bestehen. Als Ausgang für die Kultivierung von Organoiden werden pluripotente Zellen verwendet. Als pluripotent werden Stammzellen bezeichnet, welche sich komplett undifferenziert weiterentwickeln können. Durch die Kultivierung von Organoiden kann die Aussagekraft von Pharmakologie- und Toxikologie-Assays verbessert werden, da Organoide die in vivo Situation besser widerspiegeln.

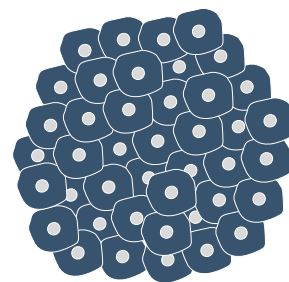


Abb. 4: Sphäroid

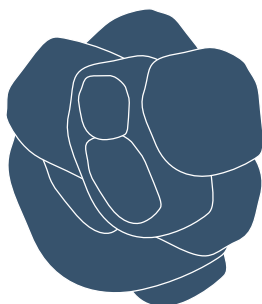


Abb. 5: Organoid

3. Welche Formate gibt es bei 3D-Zellkulturen?

Welches Format für die Kultur zum Einsatz kommt, ist von dem gewünschten Ergebnis und der verwendeten Zelllinie abhängig. Sollen die Wechselwirkungen von neuen Wirkstoffen mit Tumoren beobachtet werden, würde sich hier die Kultur von Sphäroiden anbieten. Wenn auf der anderen Seite komplexe Interaktionen

mehrerer Zellen erforscht werden, fällt hier die Wahl auf gerüstunterstützende Zellkulturen. Im Folgenden werden unterschiedliche Methoden dargestellt, mit denen man einfach Sphäroide herstellen kann. Zusätzlich werden verschiedene Möglichkeiten der Gerüstunterstützenden 3D-Zellkultur beleuchtet.

Methoden zur Bildung von Sphäroiden

a. Pellet-Kultur

Eine ganz einfache Methode um Sphäroide zu bilden, bzw. Sphäroid-Kultur zu betreiben, ist die Pellet-Kultur. Hier wird Zentrifugalkraft benutzt, um die Zellen in Suspension als Pellet im konischen Boden des verwendeten Gefäßes gesammelt. Durch die Zell-Zell-Interaktionen wird die Sphäroidbildung gefördert. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass durch die einwirkenden Zentrifugalkräfte einzelne Zellen Schaden nehmen können.

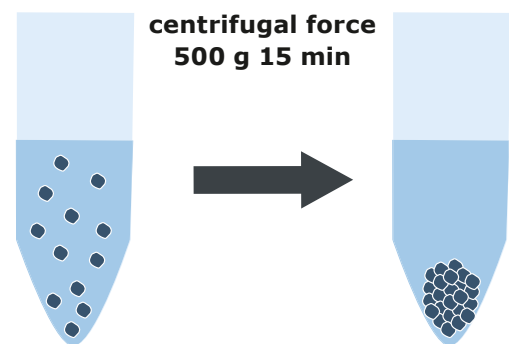


Abb. 6: Sphäroidbildung durch Verwendung der Schwerkraft bei der Zentrifugation

b. Hanging Drop

Die Hanging-Drop-Kulturform macht sich die Oberflächenspannung des Mediums zu Nutze. Die Suspensionskultur wird in Form eines Tropfens auf eine Oberfläche, vorzugsweise den Petrischalendeckel, aufgetragen, das Konstrukt wird anschließend über eine Petrischale gestülpt. In die Petrischale wird oft ein wenig Flüssigkeit gegeben, z.B. phosphatgepufferte Lösung, um ein Austrocknen der Tropfen während des Kulturzeitraums zu verhindern.

Durch die Oberflächenspannung bleibt der Tropfen „kopfüber“ an dem Deckel hängen. Die Gravitation zwingt die Zellen an das untere Ende des Tropfens. So können diese sich wieder durch Zell-Zell-Interaktionen zu einem Sphäroid zusammenschließen. Dadurch, dass man die Konzentration der verwendeten Suspensionskultur und der Proben, welche aufgetragen werden, steuern kann, können mit dieser Methode Sphäroide mit einheitlicher Zellzahl gebildet werden. Somit ist eine gewisse Reproduzierbarkeit innerhalb der einzelnen Experimente gegeben.



Abb. 7: Hanging-Drop-Methode; Zellen in Suspension werden als Tropfen auf Petrischalendeckel gegeben. Durch Umdrehen des Deckels können Zellen sich am unteren Ende des Tropfens zu Sphäroiden bilden.

c. Sphäroid Bildung in Mikrotiterplatten

Ebenso einfach ist die Bildung von Sphäroiden in speziell dafür konzipierten Mikrotiterplatten. Hier sind die Kavitäten so beschaffen, dass diese am Boden konische Einbuchtungen haben, sodass sich die Sphäroide durch die vorgegebene Geometrie bilden können. Auch hier hilft Gravitation, sodass die Zellen einfacher ihren Weg

zueinander finden und sich als Aggregat zusammenschließen können. Das Gute an dieser Methode ist, dass man als Forscher nicht von seinem vorhandenen, schon fertigen Protokoll abweichen muss, da man lediglich die Zellsuspension in die Mikrotiterplatte geben muss.

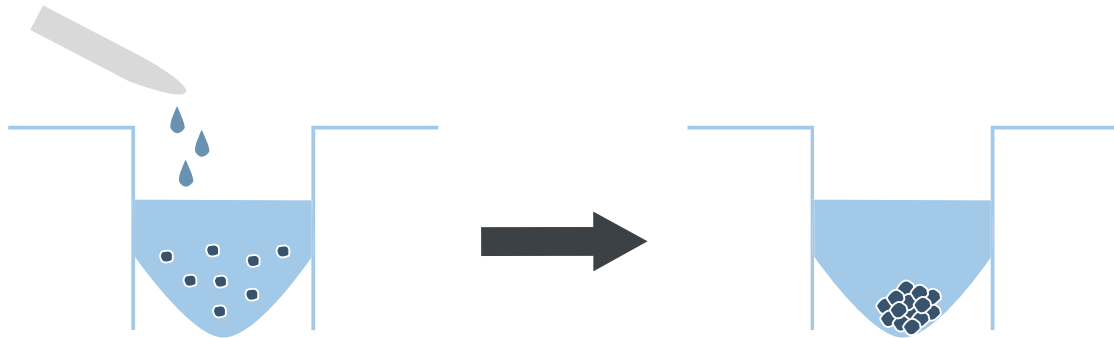


Abb. 8: Mikrotiterplatten mit konisch geformten Kavitäten

4. Gerüstbasierte Methodentechnik

Neben der Bildung von Sphäroiden oder Organoiden gibt es auch die Möglichkeit, Zellen dreidimensional mit Hilfe von Gerüsten wachsen zu lassen. Diese Gerüste sind der extrazellulären Matrix nachempfunden. Je nachdem, welches Material für das Gerüst verwendet wird, muss zusätzlich noch darauf geachtet werden, welche Wachstumsfaktoren und Proteine für das Wachstum gebraucht werden. Des Weiteren ist es wichtig, die Porengröße des jeweiligen Materials zu kennen. Dies liegt vor allem daran, dass es grundlegend interessant ist, zu wissen, wie sich die Zellen in der jeweiligen Matrix

einbetten und welches Wachstumsverhalten die Zellen in dem jeweiligen Gerüst zeigen. Es gibt verschiedene Ansätze zur Realisierung einer extrazellulären Matrix. Ein paar Beispiele sind wie folgt aufgeführt:

- Vorgefertigte Matrizen
- Hydrogele
- Zelltücher

a. Vorgefertigte Matrizen

Die Matrixkomposition kann hier komplett an die jeweilige Zelle angepasst werden. Die Herstellung kann über mehrere Verfahren erfolgen: Polymerphasen-Separation, Lyophilisation oder zum Beispiel mittels 3D-Druck. Viele dieser Herstellungsweisen üben einen hohen Druck auf Zellen aus oder die Spurenelemente im Material sind fehlerhaft. Allerdings gibt es hier bereits relativ neue Ansätze dies zu umgehen, indem Fibrine

eingesetzt werden, die extrem biokompatibel sind. Durch den Einsatz der Fibrine konnte das Wachstum der eingesetzten Zellen in den vorgefertigten Matrizen wesentlich verbessert werden. Somit sollte der Einsatz zusätzlicher, stabilisierender und für die Zellen förderlicher Proteine bei Auswahl dieser Matrizenform beachtet werden.

b. Hydrogele

Hydrogele sind sehr vorteilhaft, da sie eine sehr ähnliche Struktur zu Geweben haben. Der Hauptbestandteil dieser Hydrogele sind Biopolymere. Ein großer Vorteil von Hydrogelen ist, dass diese sich mit der Struktur der Zellen verändern können, sodass mehr Raum für interne Wechselwirkungen und Bioaktivität entsteht. Besonders zu beachten ist die Art und Weise, wie die gewachsenen Zellstrukturen nach Abschluss der Experimente aus dem Hydrogel zu entfernen sind. Hier ist die Forschung mittlerweile so weit, dass enzymatisch abbaubare Biopolymere zum Einsatz kommen können.

c. Zelltücher

Dieser Ansatz wird gerne für das Wachstum von Organen oder komplexen Geweben verwendet. Anstelle von sehr komplexen Gerüsten, welche vorher im 3D-Druck gedruckt werden müssen, werden hier mehrere Zellschichten übereinander gestapelt. Dieser Ansatz hat gezeigt, dass es nicht immer unbedingt nötig ist, sehr komplexe Gerüste für die 3D-Zellkultur oder das Herstellen von Geweben einzusetzen.

Resumé

Für welche Art der 3D-Zellkultur man sich letztendlich entscheidet, hängt stark von dem jeweiligen Forschungsvorhaben ab. Generell kann gesagt werden, dass sich die Kultivierung von Sphäroiden eher für die Tumorforschung eignet, da Sphäroide eine ähnliche Physiologie zeigen. Der Nachteil hier ist, dass keine Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix beobachtet werden können.

Wenn also das gewünschte Endergebnis die Beobachtung komplexer Zellmechanismen und Zellphysiologie als Gesamtes ist, bieten sich hier die Kulturmöglichkeiten mittels der künstlichen extrazellulären Matrizen an. Dieser Ansatz verfolgt das Nachbilden der natürlichen Umgebung und lässt die Zellen in Verbänden so

wachsen, wie es in tierischen oder menschlichen Organismen der Fall ist. So können interne Zellprozesse besser dargestellt werden.

Alles in allem bietet die 3D-Zellkultur viele Möglichkeiten, noch mehr über zelluläre Prozesse zu erfahren. Dadurch werden Mechanismen verständlich, die bisher verborgen waren. Diese Erkenntnisse sind überaus wichtig, da sie in verschiedenen Bereichen wie in der Medizin oder Wirkstoffentwicklung zum Einsatz kommen, und so in Zukunft viele Menschen vor Krankheit bewahrt werden können.

Quellen:

- <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/extrazellulaere-matrix/4008> (28.09.2022)
- Habanjar, Ola; Diab-Assaf, Mona; Caldefie-Chezet, Florence; Delort, Laetitia; 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22
- Duval, Kayla; Grover, Hannah; Han, Li-Hsin; Mou, Yongchao; Pegoraro, Adrian F.; Fredberg, Jeffery; Chen-Zi; Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture, *Physiology*, July 2017, 32(4), p. 266-277
- <https://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v133.php> (28.09.2022)



NOCH FRAGEN

Kontaktieren Sie uns:

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG

+49 9122 9920-0
redaktion@heidolph.de
www.heidolph.com