

Kultivierungsstrategien für Stammzellen

Entwicklungen zur Bereitstellung von Zell- und Gewebestrukturen für die regenerative Medizin

In den letzten Jahren hat das Interesse an Stammzellen aus den unterschiedlichsten „Quellen“ stark zugenommen. Die möglichen Einsatzgebiete und Verwendungsmöglichkeiten dieser Zellen sind weit gestreut. Zum einen hoffen Forscher, Erbkrankheiten wie Alzheimer und Parkinson mit Hilfe dieser Zellen heilen bzw. lindern zu können. Zum anderen werden Stammzellen im Bereich des Tissue Engineering eingesetzt, wo sie auf 3 D Gerüststrukturen künstliche Gewebe bilden, die als Organtransplantate dienen sollen.



Dipl. Chem. Stefanie Böhm, Sc. Magda Tomala, wissenschaftliche Mitarbeiterinnen am Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover



Privat Dozentin Dr. Cornelia Kasper, Arbeitsgruppenleiterin, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover,

Adulte Stammzellen- Definition und Kultivierungsbedingungen

Adulte Stammzellen können aus verschiedenen Gewebetypen isoliert werden. Häufig verwendete Quellen sind das Knochenmark und das Fettgewebe. Hierbei spielen vor allem die mesenchymalen Stammzellen (MSC) eine große Rolle. Seit einiger Zeit werden MSC auch aus dem Nabelschnurgewebe gewonnen.[1] Der Vorteil von Stammzellen aus dem Fett- und Nabelschnurgewebe liegt in ihrer Verfügbarkeit. Zum Einen sind die für die Isolation der Stammzellen nötigen Mengen dieser Gewebe „verzichtbar“ und auch die Häufigkeit der Stammzellen in diesen Geweben ist im Vergleich zur Verfügbarkeit und Zahl der Stammzellen im Knochenmark hoch. Um einen internationalen Standard zu bekommen, hat die Internationale Society für zelluläre Therapie 2006 folgende Eigenschaften für mesenchymale Stammzelle definiert: i) Adhärenz auf Plastikoberflächen ii) Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein bestimmter Oberflächenmarker iii) adipogene, chondrogene, osteogene Differenzierbarkeit.[2]

Bei der Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen *in vitro* sind drei Punkte von Bedeutung: die Aufrechterhaltung ihres Proliferationsvermögens, die Fähigkeit der Differenzierung in unterschiedliche Gewebearten und die Möglichkeit die Zellen zu kryokonservieren. Die Kryokonservierung von Zellen ist unumgänglich, wenn jederzeit Zellmaterial zur Verfügung stehen soll. Das

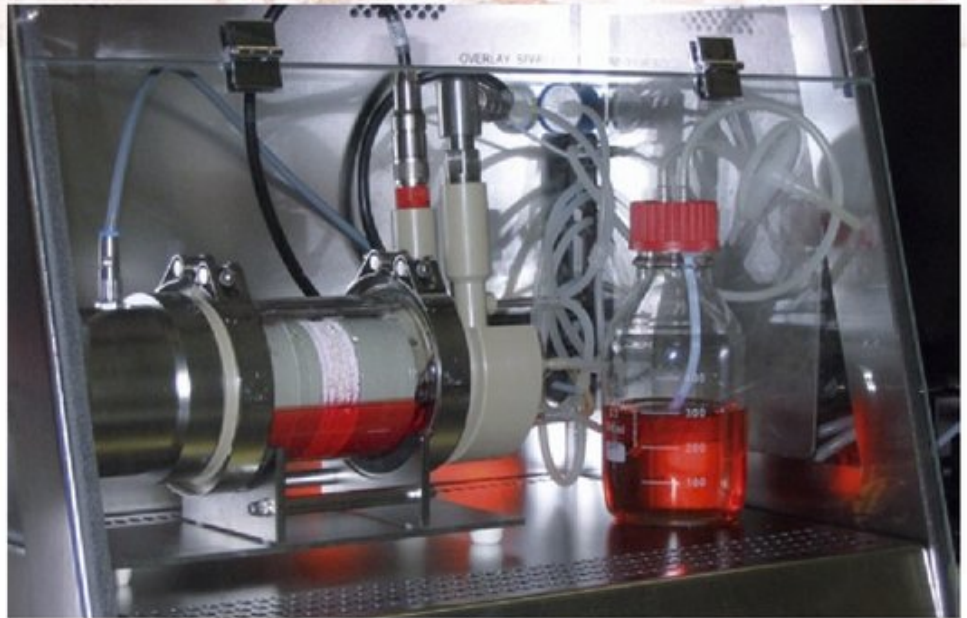


Abb.: 1: Drehbettreaktor (Zellwerk, Oberkrämer)

Proliferationsvermögen von Stammzellen ist enorm wichtig, da bei einer Entnahme von Stammzellen nur eine geringe Menge erhalten wird und diese vor einer Einpflanzung in einen Körper *in vitro* vermehrt werden müssen, um eine ausreichende Menge zu erhalten. Durch Zugabe von Wachstumsfaktoren (z.B. *fibroblast growth factor 2*) zeigen Stammzellen bei der *in vitro* Kultivierung eine erhöhte Proliferationsrate. Allerdings hat auch die Dichte der Zellen während der Kultivierung einen Einfluss auf die Proliferation. Zellen, die mit geringer Dichte ausplattiert wurden, haben eine deutlich

Keywords: Stammzellen, Differenzierung, dynamische Kultivierung, Bioreaktoren

höhere Proliferationsrate als dicht ausplattierte Zellen.[3] Aufgrund der geringen Menge von Stammzellen im Körper sind diese schwer von den anderen Zellen zu isolieren. Um die Proliferation der mesenchymalen Stammzellen *in vitro* aufrecht zu erhalten, ist es allerdings wichtig die Zellen nach der Isolierung aufzureinigen und eine möglichst homogene Population von Zellen zu erreichen. Dazu wurden verschiedene Verfahren

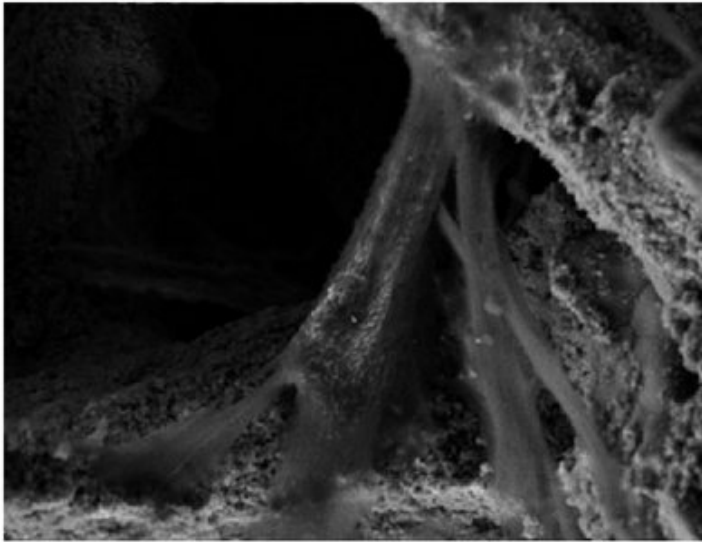


Abb.: 2: REM Aufnahme (2500x Vergrößerung) von Fettstammzellen auf Sponceram. Im Vordergrund sind Zellen, die in Poren des Sponcerams wachsen, zu erkennen

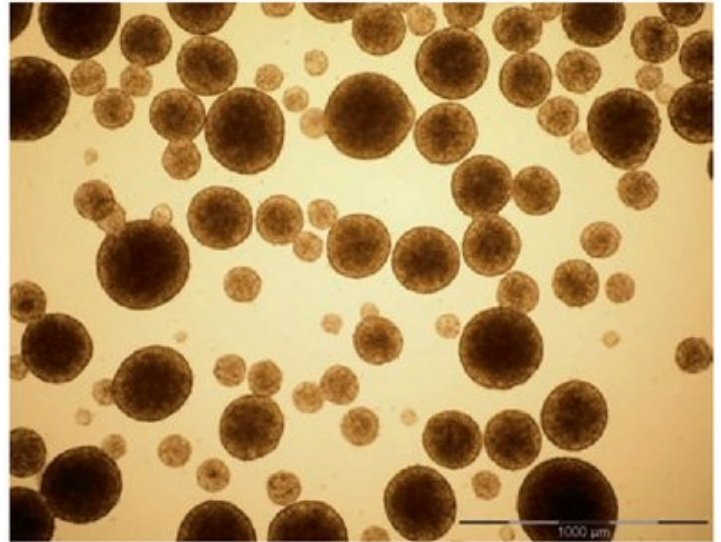



Abb.: 3: Suspendierte Aggregate von ES- Zellen. Messbalken 1000 µm

entwickelt, die eine Proliferation der Zellen über einen langen Kultivierungszeitraum ermöglichen.[4] In Kultur besitzen mesenchymale Stammzellen eine *fibroblastoide Morphologie* und wachsen im Gegensatz zu hämatopoetischen Zellen adhären. Sie können somit durch mehrmaliges komplettes Entfernen des Kulturmediums von den nichtadhärenten Zellen getrennt werden.[5] Dennoch ist

eine unbegrenzte Kultivierung von MSC bis heute nicht möglich.

Eine wichtige Strategie zur Expansion der Zellen beruht auf der Kultivierung der Zellen in Bioreaktoren. Zurzeit wird in unserer Arbeitsgruppe ein spezieller Drehbettreaktor (ZRP, Zellwerk, Oberkrämer) eingesetzt, um die mesenchymalen Stammzellen kontrolliert zu expandieren und gezielt osteogen zu

differenzieren.[6] Hierzu werden die Zellen auf einem porösem Gerüstmaterial aus Zirkoniumdioxid (Sponceram) über einen längeren Zeitraum in dem Drehbettreaktor kultiviert. Ziel dieser Kultivierungsstrategie ist es, ein funktionelles Gewebekonstrukt aus Zellen und Gerüstmaterial herzustellen, das im Idealfall als Implantat in den Körper eingesetzt werden kann. Abbildung 2 zeigt eine raster-




PEPROTECH®

Visit us at
Biotechnica:
Hall 8 - Booth F24

Not Just Cytokines!

ANIMAL-FREE REAGENTS

 Since 1988, PeproTech has been focused on the development of high quality cytokine products for life-science research. Today, PeproTech is a world leader in supplying a wide-range of recombinant cytokines and related proteins, their monoclonal, polyclonal and biotinylated antibodies as well as ELISA development kits.

To keep up with current research and growing demands, we have launched the development of a new line of animal-free recombinant proteins. These proteins are produced in a dedicated animal-free

facility under strict animal-free conditions, thereby minimizing potential problems that might arise from the presence of trace amounts of animal-derived contaminants. Our growing line of animal-free recombinant proteins currently includes 26 new products.

Also available from PeproTech is a new line of animal-free Media Supplement Kits designed to improve the performance of serum-free formulations in sustaining the viable cell growth of various mammalian cell lines.

Animal-Free Proteins:				Animal-Free Media Supplement Kits:
Human Heregulin-β1	Human KGF	Human IL-16	Murine GM-CSF	PeproGrow 1 - Hek-293 (adherent), HeLa, A549 cells
Human PIGF-1	Human VEGF	Murine SCF	Human TNF-Alpha	PeproGrow 2 - NSO cells
Human IGF-1	Human IL-2	Human GM-CSF	Rat TPO	PeproGrow 3 - CHO ₂
Human PDGF-BB	Human IL-3	Human SCF	Human BDNF	
Human EGF	Human IL-4	Human TPO	Aminopeptidase	
Human FGF-acidic	Murine IL-4	Human Flt3-Ligand		
Human FGF-basic	Human IL-6	Human M-CSF		

For more information about our Animal-Free Products, visit our website: www.peprotech.com

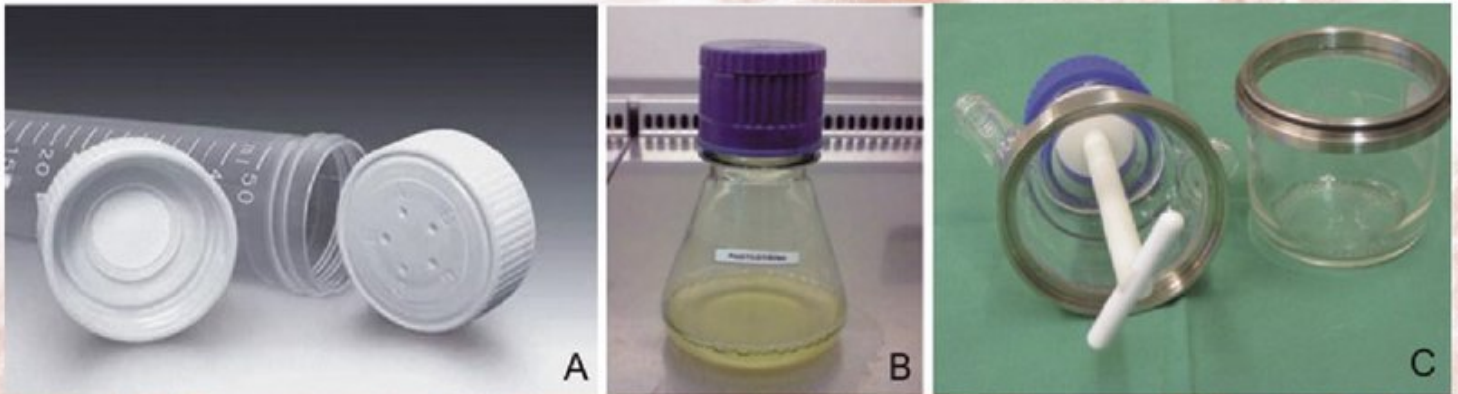


Abb.: 4: Kultivierungsgefäße für Suspensionskulturen von ES- Zellen. A: CultiFlask 50 (Sartorius Stedim Biotech). B: Erlenmeyerkolben (VWR), C: Spinnerflasche (TCI)

elektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von einem Sponceram-Zell Konstrukt nach einer Kultivierung im Reaktor.

Embryonale Stammzellen- Definition und Kultivierungsbedingungen

Embryonale Stammzellen (ES- Zellen) werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen und sind theoretisch unbegrenzt teilungsfähig weshalb sie als permanente Zelllinien betrachtet werden. Die erste Maus ES- Zelllinie wurde im Jahr 1981 [7] isoliert, humane ES- Zellen erst 1998 [8]. Die Kultivierung von ES- Zellen ist technisch anspruchsvoll, da sie eine natürliche Eigenschaft besitzen, auszudifferenzieren. Unter geeigneten Kulturbedingungen können sie jedoch in einem undifferenzierten Zustand gehalten werden. Diese Bedingungen variieren zwischen verschiedenen Spezies von ES- Zellen. Humane ES- Zellen müssen in der Regel mit sogenannten Feederzellen ko-kultiviert werden. Feederzellen sind primäre Fibroblasten und sezernieren eine Reihe von Zytokinen und anderen teilweise noch nicht vollständig identifizierten biologisch aktiven Substanzen, die u.a. zum Erhalt der Pluripotenz von humanen ES- Zellen dienen. Für murine ES- Zellen hingegen ist bekannt, dass das Zytokin LIF (Leukemia Inhibitory Factor) eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz spielt und ES- Zellen unter feederzellenfreien Bedingungen in Anwesenheit von LIF und Serum im undifferenzierten Zustand kultiviert werden können [9] [10].

Aktuelle Forschungsarbeiten mit ES- Zellen zielen darauf ab, Differenzierungsprotokolle zu entwickeln, mit denen eine effiziente Differenzierung zu

nur einem bestimmten Zelltyp erreicht werden kann. Hier ist von entscheidender Bedeutung, dass neben „falsch“ differenzierten keinerlei undifferenzierte Zellen zurückbleiben, da letztere im Spenderorganismus Tumore (Teratoma) bilden können. Ein weiterer Schwerpunkt auf dem Forschungsgebiet mit ES- Zellen liegt in der kontrollierten Vermehrung von undifferenzierten ES- Zellen. Hier werden standardisierte Kultivierungsverfahren entwickelt, mit denen große Mengen an undifferenzierten ES- Zellen generiert werden können, welche dann in gleicher Qualität für Differenzierungsexperimente zur Verfügung stehen.

Suspensionskulturen von ES- Zellen

Üblicherweise werden ES- Zellen als adhärenente Kulturen geführt, wobei die Zellen entweder in Ko-Kultur mit Feederzellen oder feederzellenfrei auf Gelatine beschichteten Oberflächen im pluripotenten Zustand gehalten werden. Adhärenente Kulturen erreichen jedoch schnell ihre Grenzen im Hinblick auf das *scale-up*. Perfundierte und suspendierte Kultivierungssysteme schaffen einerseits kontrollierte Bedingungen (z.B. Sauerstoff- und pH- Gehalt) und erlauben eine einfachere Durchführung von *large scale* Kultivierungen, wie sie benötigt werden, um gezielt große Mengen undifferenzierter ES- Zellen zu generieren. ES- Zellen haben die Eigenschaft, nicht einzellig sondern in Clustern oder Sphären zu wachsen (Abb. 3). Gewöhnlich werden Maus ES- Zellen einzellig ins Medium ausgesät, woraufhin sie im Verlauf der folgenden Teilungen die charakteristischen Zellaggregate ausbilden. Form und Größe dieser Zellsphären hängen stark vom Suspensionsbioreaktor bzw. von der Geschwindigkeit und Art der mechanischen

Kräfte, die sie in Bewegung halten, ab. Verschiedene Sorten von Suspensionssystemen können betrachtet werden; ausgehend von der statischen Petrischale über die Spinnerflasche (wie sie üblicherweise zur Kultivierung von suspendierten Produktionszelllinien eingesetzt wird), kann der Einsatz von Erlenmeyerkolben und *Cultiflasks* erwähnt werden. Letztere unterscheiden sich in der Hinsicht von Spinnerflaschen, dass kein internes Rührwerk die Zellsuspension in Bewegung hält, sondern eine von außen herbeigeführte Orbitalbewegung das gesamte Kultivierungsgefäß in Dynamik versetzt. In unserem Labor wurden all diese Systeme daraufhin getestet, wie gut sie sich dazu eignen, ES- Zellen effizient in ihrem pluripotenten Zustand zu expandieren. Darüber hinaus wurden Differenzierungsprotokolle weiter entwickelt, mit deren Hilfe die Bildung von sogenannten Embryoid Bodies (EB's) ermöglicht werden. EB's gelten als wichtige Übergangsstufe im Verlauf der Differenzierung von ES- Zellen.

Referenzen bei den Autoren

Autoren

M.Sc. Magda Tomala, Dipl. Chem. Stefanie Böhm, Privat Dozentin Dr. Cornelia Kasper

Kontakt

Privat Dozentin Dr. Cornelia Kasper

Leibniz Universität Hannover

Hannover

Tel.: 0511/762-2967

Fax: 0511/762-3004

kasper@iftc.uni-hannover.de