

Mikrostrukturierung

Selektive und ortsaufgelöste Zellanbindung mit μ -Pattern^{ibiTreat}

DANIEL RÜDIGER¹, STEFANIE KIDERLEN², KIM WHYE LEONG³, ELFRIEDE NÖSSNER⁴, MARISA GÖTZFRIED¹

¹IBIDI GMBH, GRÄFELFING

²PROSPECTIVE INSTRUMENTS, DORNBIRN

³MECHANOBIOLOGISCHES INSTITUT VON SINGAPUR

⁴IMMUNANALYTIK, HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN

The μ -Pattern^{ibiTreat} provides a method for spatially defined long-term stable cell cultivation using microstructured adhesion spots. Customization of size, shape, and coating allow diverse applications from the single cell level to cell differentiation and cell interaction studies. The multi-array arrangement simplifies the analysis of time-lapse microscopy images and increases statistical robustness of a single experiment, leading to a more detailed cell description.

DOI: 10.1007/s12268-023-1959-y

© Springer-Verlag GmbH 2023

■ Time-Lapse-Mikroskopie-Analysen sind ein zentraler Bestandteil moderner biologischer und medizinischer Forschungsarbeiten, denn sie bieten die Möglichkeit, Zell- und Zellpopulationsverhalten detailliert über eine breite Zeitspanne zu beobachten. Durch

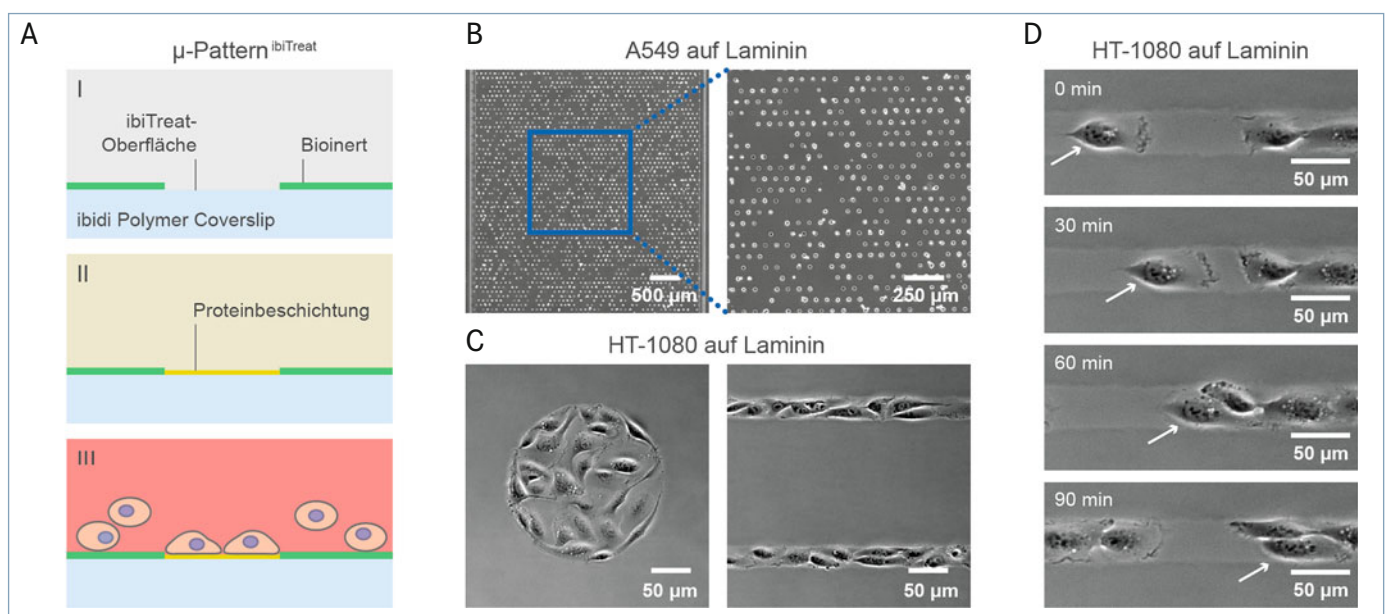
stetige Verbesserungen von Bildanalysen und modernes Datenmanagement gewinnen diese zellulären Assays immer mehr an Bedeutung.

Die experimentellen Rahmenbedingungen können hierbei die Effizienz und Qualität der

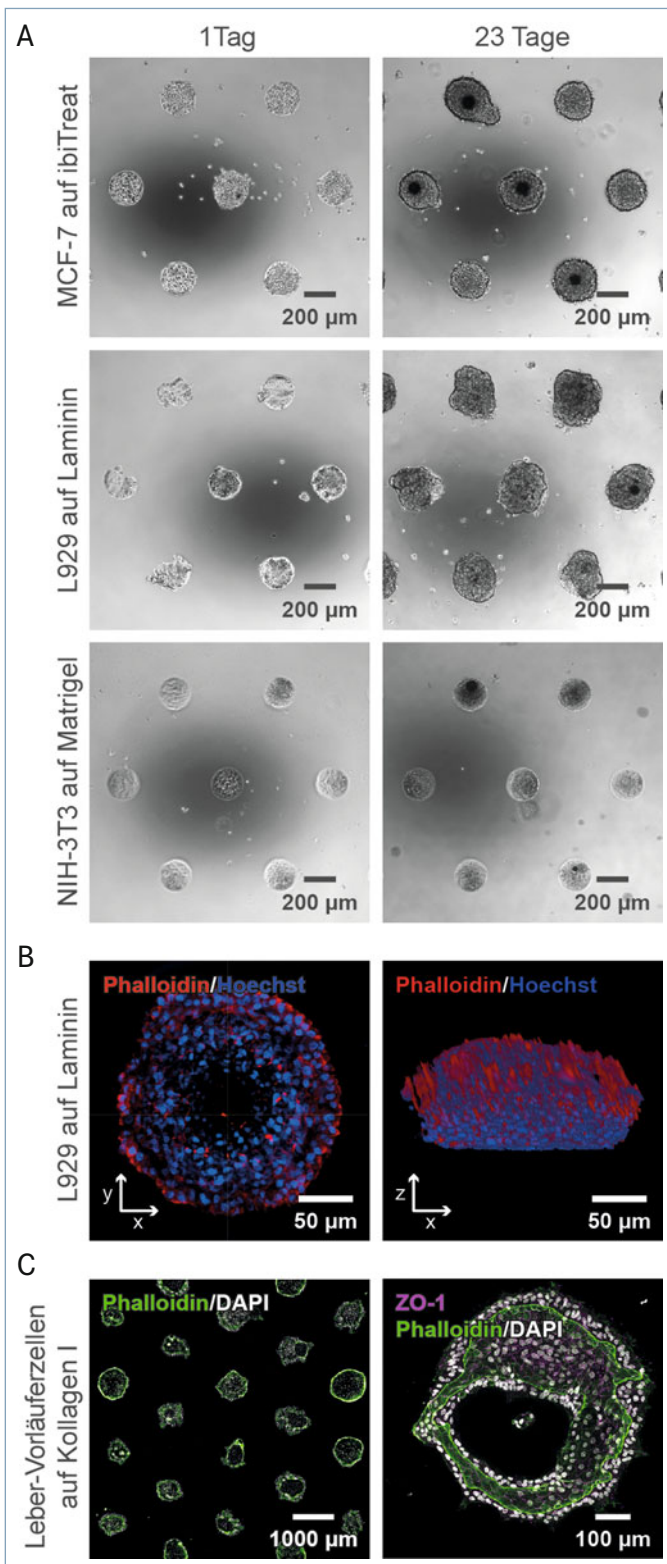
Analysen stark beeinflussen. Mikrostrukturierungsverfahren, welche die Zelllokalisierung, die Einzelzell- oder Zellpopulationsform sowie die Freiheitsgrade der Zellbewegung auf Zellkultursubstraten vorgeben, ermöglichen eine sehr effiziente Analyse von Morphologie, Lebensstatus und Genexpression [1, 2].

Die meisten Mikrostrukturierungsverfahren basieren auf einer zellabweisenden Monolagenbeschichtung. Diese wird additiv oder subtraktiv manipuliert, um Zelladhäsionsliganden ortsaufgelöst zu präsentieren [3]. Durch die meist nur physisorbierte Passivierung ist die Strukturierung jedoch nicht für die Kultivierung über mehrere Wochen geeignet und Zellen neigen teilweise dazu, die vorgegebenen Adhäsionsflächen mit der Zeit zu verlassen.

Das von ibidi entwickelte μ -Pattern^{ibiTreat} verwendet die Bioinert-Technologie als zell- und proteinabweisenden Untergrund. Dabei ist eine dünne Schicht Hydrogel kovalent an das Substrat gebunden, was die Langzeitstabilität des Systems garantiert. Die Adhäsion



▲ **Abb. 1:** Aufbau und Geometrien des μ -Pattern^{ibiTreat}. **A**, schematischer Aufbau: I: Mikrostrukturierte Oberfläche; II: Beschichtung; III: Zelladhäsion. **B**, A549-Zellen auf Laminin Einzelzellspots; 2 h nach Aussaat. **C**, HT-1080 auf Laminin; verschiedene Geometrien; 25 h nach Aussaat. **D**, HT-1080 auf Linien mit Laminin-Beschichtung, markierte Zelle (Pfeil) migriert entlang der Linie, ohne das Pattern zu verlassen.



◀ **Abb. 2:** Langzeitkultivierung auf Adhäsionsspots mit unterschiedlicher Beschichtung. **A**, MCF-7 auf ibiTreat; L929 auf Laminin; NIH-3T3 auf Matrigel; Kultivierung über 3 Wochen. **B**, 2-Photonen-Aufnahmen der Langzeitkultivierung von L929 auf Laminin. **C**, Leber-Vorläuferzellen auf Kollagen I; mit Kollagen I Gel überschichtet; Leber-Organoid Bildung mit Lumen 24 h nach Überschichtung.

mischen beschichtet werden. Dies ermöglicht eine spezifische Zellanbindung ohne unspezifische Hintergrundadhäsion über mehrere Wochen. Zellen sind zudem auch in der Lage, ohne Proteinbeschichtung an der ibiTreat-Oberfläche zu binden (**Abb. 2A**). Die mikrostrukturierten Oberflächen haben keine signifikant höhere Autofluoreszenz als das Substrat, wodurch auch hochauflösende Fluoreszenzaufnahmen möglich sind. 2-Photonen-Aufnahmen zeigen deutlich, dass Zellen unter Langzeitkultivierung 3D-Strukturen ausbilden, dabei die Adhäsionspunkte der mikrostrukturierten Oberflächen jedoch nicht verlassen (**Abb. 2B**). Werden Leber-Vorläuferzellen auf den Strukturen ausgesät und mit Kollagen überschichtet, bildet sich nach 24 Stunden ein Leber-Organoid, inklusive Lumen (**Abb. 2C**). Mit dieser Eigenschaft zur 3D-Zellkultivierung sowie Sphäroid- und Organoid-Bildung ist das μ -Pattern^{ibiTreat} eine zukunftsreiche Methode für die biologische Forschung.

Selektive Zellbindung und Zytotoxizitätsanalyse

Die mikrostrukturierten Oberflächen können auch mit Antikörpern beschichtet werden. Die Verwendung eines CD19-Antikörpers erlaubt die selektive Bindung von CD19-positiven Nalm-6-Zellen aus einer Mischung mit CD19-negativen Jurkat-Zellen (**Abb. 3A**). Nach der Selektion der Suspensionszellen, kann in einem nächsten Schritt auch die Analyse dieser Zellen auf den Strukturen erfolgen, z. B. für die Immunanalytik.

Bei Immunzell-vermittelten Zytotoxizitätsanalysen erleichtert die Verwendung von mikrostrukturierten Oberflächen die Auswertung. Die T-Zell-Zytotoxizität gegenüber verschiedenen Nierenkarzinom-Zelllinien kann z. B. mithilfe der Konfluenz der Strukturen bewertet werden. Die Abnahme der Konfluenz auf dem Pattern ist ein Maß für die Zytotoxizität der T-Zellen. Im durchgeführten Experiment werden RCC26-Zellen sehr viel schneller als die RCC53-Zellen durch die gleichen T-Zellen getötet (**Abb. 3B**). Durch die Mikrostrukturen und das Auswerten der Konfluenz der Spots ist eine einfache Analyse des Zellverhaltens möglich.

Fazit

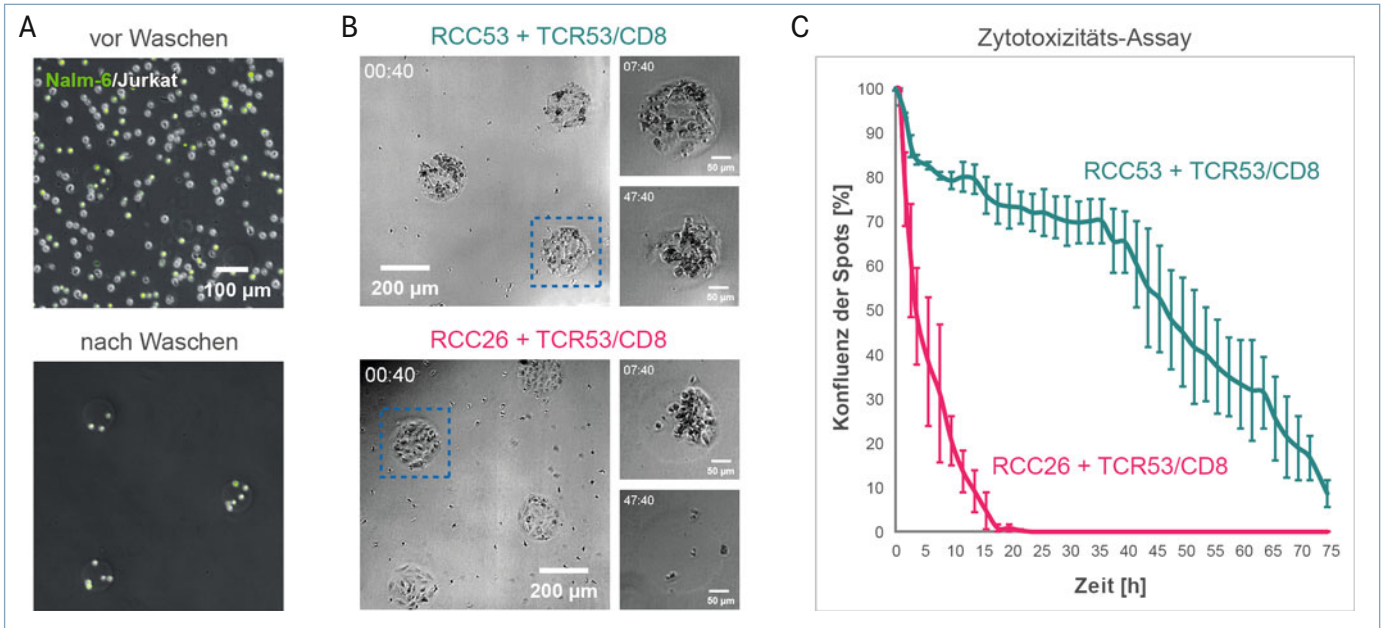
Das μ -Pattern^{ibiTreat} bietet eine langzeitstabile, mikrostrukturierte Oberfläche, welche durch variable Formen und Beschichtungsmöglichkeiten der Adhäsionsspots vielfältige Anwendungsgebiete bietet. Die Wiederho-

sionssspots haben eine ibiTreat-Oberfläche, welche die Adhäsion von Zellen fördert und das Beschichten mit Proteinen erlaubt (**Abb. 1A**). Die Form und Größe der freiliegenden ibiTreat-Oberfläche sind vielfältig. Dabei können Einzelzellen (**Abb. 1B**) und Zellgruppen (**Abb. 1C**) gebunden werden. Die Zellen sind klar von der passivierten Umgebung

abgegrenzt und verlassen auch während eines Migrationsprozesses die strukturierten Bereiche nicht (**Abb. 1D**).

Langzeitkultivierung und 3D Anwendung

Die Strukturen können mit einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen oder Proteinge-



▲ **Abb. 3:** Assays auf μ -Pattern^{ibidiTreat}. **A**, selektive Anbindung von CD19+-Suspensionszellen (Nalm-6, grün) aus einer Mischung mit Jurkat-Zellen (unmarkiert, CD19-) auf CD19-beschichteten Strukturen, Waschen nach 2 h. **B**, Beispielbilder des Zytotoxizitäts-Assays zu verschiedenen Zeitpunkten. Bei T-Zell-Zugabe (TCR53/CD8; t=0) ist das Kollagen-I-Pattern konfluent mit Nierenkarzinom-Zellen bewachsen, Konfuz nimmt über Zeit ab. **C**, quantitative Auswertung des Zytotoxizitäts-Assays; Konfuz des Patterns als Maß für die Zytotoxizität über die Zeit aufgetragen (n=9); RCC26 (magenta) werden schneller abgetötet.

lung der Strukturen in einer Array-Anordnung erlaubt die Erhebung großer Datenmengen aus einem einzigen Experiment zur Beschreibung des Zellverhaltens.

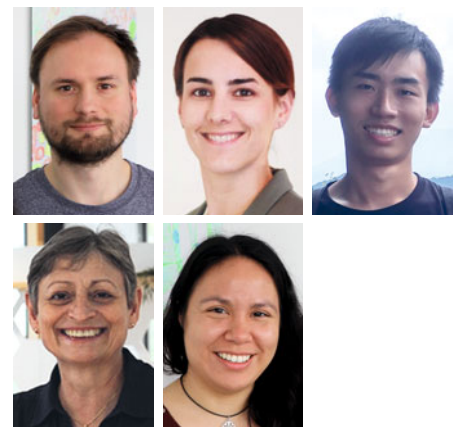
Danksagung

Gefördert durch: EMULSION Programm H18/017A0/017, ZIM AppMic 16KN097520.

Danke an Gerlinde Schwake für die Bilder der Einzelzellspots und Wenqing Xu für die Durchführung der T-Zell-vermittelten Zytotoxizitätsanalyse. ■

Literatur

- [1] Fink J, Thery M, Azoune A et al. (2007) Comparative study and improvement of current cell micro-patterning techniques. *Lab Chip* 7: 672–680
- [2] Reiser A, Woschke D, Kempe SM et al. (2021) Live-cell Imaging of Single-Cell Arrays (LISCA) – a Versatile Technique to Quantify Cellular Kinetics. *J Vis Exp* 169: e62025
- [3] You C, Piehler J (2015) Functional protein micropatterning for drug design and discovery. *Expert Opin Drug Discov* 11: 105–119



Daniel Rüdiger, Stefanie Kiderlen, Kim Whye Leong, Elfriede Nöbner und Marisa Götzfried (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Dr. Daniel Rüdiger
ibidi GmbH
Lochhamer Schlag 11
D-82166 Gräfelfing
druediger@ibidi.de
<https://ibidi.com>