

Schlussbericht

zum Teilvorhaben **Integration laserbasierter Technologien zur Aufreinigung
und berührungsfreien Manipulation von adhärennten
Stammzellkulturen**

FKZ: 13N11830
LIFE&BRAIN GmbH
Sigmund-Freud-Str. 25
53127 Bonn, Deutschland

Autoren: Brüstle, Oliver
 Haupt, Simone

Laufzeit: 01.07.2012 – 30.06.2015

des Verbundprojektes **Laser induzierte, Nanopartikel vermittelte selektive Zell
Elimination und Modulation
LAND-CEM**

Der vorliegende Bericht ist zur Veröffentlichung bestimmt. Ggf. vertrauliche
Ergebnisse/Informationen werden im Erfolgskontrollbericht dargestellt.

1. Zusammenfassung

Fördermaßnahme:

Optische Technologien in den Lebenswissenschaften – Grundlage zellulärer Funktionen

Projektpartner:

Institut für biomedizinische Optik der Universität zu Lübeck (BMO)

Peter-Monnik-Weg 4

23562 Lübeck, Deutschland

Abteilung und Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde (FMZ)

Pleicherwall 2

Universitätsklinikum Würzburg

97070 Würzburg, Deutschland

Institute für molekulare Medizin und experimentelle Immunologie (IMMEI)

Universität Bonn

Sigmund-Freud Str. 25

53105 Bonn, Deutschland

Miltenyi Biotec GmbH

Friedrich-Ebert-Straße 68

51429 Bergisch Gladbach, Deutschland

Aufgabenstellung und Ziele des Verbundprojektes:

Ziel des Verbundes waren die Erforschung und Entwicklung eines neuartigen optischen Verfahrens, das auf der Wechselwirkung von Licht mit Gold-Nanopartikeln basiert und eine berührungsfreie Aufreinigung und Manipulation von biomedizinisch relevanten Zellmodellen erlaubt. Die im Projekt gewonnenen Erkenntnisse über physikalische, chemische und biologische Grundlagen dieser Wechselwirkungen flossen in die Entwicklung neuer Applikationsprotokolle sowie Mikroskop-basierter und durchflusszytometrischer Gerätekomponenten ein, die der Aufreinigung und Manipulation von adhärent wachsenden Zellen bzw. von Zellen in Suspensionskulturen dienen. Im Rahmen des Teilvorhabens konnten Methoden zur Laser-basierten Elimination unerwünschter Zielzellen aus adhärent wachsenden Stammzellkulturen evaluiert und validiert werden. Die weitere Erforschung der in diesem Projekt entwickelten Verfahren wird es ermöglichen, entscheidende Schritte der Kultivierung, Differenzierung und Modifikation biomedizinisch relevanter, substratgebundener Zellkulturen zu standardisieren.

2. Zielsetzung

Die zu Projektstart verfügbaren gängigen Verfahren zur Zellaufreinigung und Manipulation wiesen erhebliche Einschränkungen auf, die durch den hohen technischen Aufwand für die Selektion der gewünschten Zellen oder die notwendige zellschädigende Präparation und Manipulation des Zellmaterials entstehen. Im Bereich der Zellaufreinigung suspendierter Zellen galten z.B. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) und Magnetpartikel-basierte Systeme (MACS) als technisch ausgereift. Eine Neuentwicklung in diesem Bereich erfordert neben der Verfeinerung bereits vorhandener elektronischer und mechanischer Komponenten auch neue biologische Markierungsstrategien zur Effizienzsteigerung.

Mikroskop-basierte Systeme zur berührungsfreien Aufreinigung und Manipulation adhärenter Zellen sind das von PALM entwickelte LMPC (laser microdissection and pressure catapulting) Verfahren^(1, 2) oder die LEAP-Technologie der Firma Cytellec^(3, 4). Beide Systeme müssen zur Detektion der Zielzellen auf komplexe Zellmarkierungs- und Bildanalyseverfahren zurückgreifen, was je nach Art der durchgeführten Bildanalyse (z.B. Mehrkanal-Fluoreszenzaufnahmen) einen äußerst zeitaufwändigen und unter Umständen zellschädigenden Prozess darstellt. Zudem wurde das System der Firma Cytellec seit 2011 nicht mehr kommerziell vertrieben, da die Firma Intrexon die Technologie exklusiv erworben hat und ausschließlich für den internen Gebrauch einsetzt. Das im Verbund zu entwickelnde Verfahren sowie die gerätetechnische Lösung zielen damit auf die Schließung der entstandenen Technologielücke ab.

Für die biomedizinische Forschung an humanen pluripotenten Stammzellen war insbesondere die Anwendung der Mikroskopplattform zur Generierung hochreiner, adhärenter Stammzell-basierter Zellkulturmodelle von Interesse. Die Verfügbarkeit humaner embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) und induziert pluripotenter Stammzellen (iPS-Zellen) bietet noch nie dagewesene Möglichkeiten, definierte somatische Zelltypen in praktisch unbegrenzter Zahl in vitro zu erzeugen^(5, 6). Eine breite Palette von etablierten adhärenenten Differenzierungsverfahren erlaubt die Gewinnung einer Vielzahl neuraler Zelltypen⁽⁷⁻¹²⁾. So gewonnene Zellkulturen eröffnen neue Perspektiven bei der Erforschung von Krankheitsursachen und der Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, die häufig durch den progressiven Verlust bestimmter neuronaler oder glialer Zellpopulationen gekennzeichnet sind. Beispiele für krankheitsrelevante neurale Subpopulationen sind dopaminerge Neurone (Morbus Parkinson), Motorneurone (amyotrophe Lateralsklerose), GABAerge Neurone (Morbus Huntington, Epilepsie) oder auch gliale Zellen wie Oligodendrozyten (Multiple Sklerose, Pelizaeus-Merzbacher Krankheit). Aus neurobiologischer Sicht besteht die Schwierigkeit darin, mit Hilfe der verfügbaren in vitro Differenzierungsprotokolle hochreine Kulturen spezifischer Zelltypen für die Krankheitsforschung und Wirkstoffentwicklung aus pluripotenten Stammzellen zu generieren. Bisher war es nicht möglich, ohne genetische oder mechanische Selektionsmethoden reine Populationen

eines neuronalen oder glialen Subtypen in vitro zu erzeugen. Die nach Differenzierung gewonnenen adhärennten Mischkulturen sind meist äußerst empfindlich gegenüber mechanischer oder enzymatischer Manipulation und Vereinzlung. Die etablierten Methoden zur Zellaufreinigung (FACS und MACS, Immunopanning) lassen nur mit suspendierten Zellen durchführen und sind daher für solche Kulturen weitgehend ungeeignet.

Ziel des Verbundes war die Erforschung grundlegender Parameter für optische Verfahren zur Aufreinigung und Manipulation von Zellen mittels Gold-Nanopartikeln als Grundlage für eine technische Umsetzung der Methodik in Form von Geräteplattformen, die für wissenschaftlich und wirtschaftlich interessante Zellprodukte verwendet werden können. In den verschiedenen Arbeitsbereichen wurden die physikalischen, chemischen und biologischen Voraussetzungen für die Anwendung an adhärennten und suspendierten Zellpopulationen erforscht. Die erzielten Ergebnisse flossen in die Entwicklung entsprechender Mikroskop-Aufbauten für adhärennte Zellsysteme oder durchflusszytometrische Geräten für Zellen in Suspension ein. Ziel war es, das für beide Zellkultursysteme zu Projektende jeweils ein Demonstrator zur Verfügung steht. Die geplanten Anwendungen basierten auf zwei optisch induzierbaren Wechselwirkungen mit biologischem Material, die durch die Verwendung von Gold-Nanopartikeln verstärkt werden:

- i) Mechanische Effekte durch ns-gepulste Laserbestrahlung werden zur Depletion von Zellen verwendet. Grundlage dafür sind laserinduzierte Kavitationsblasen, die bei entsprechender Wahl der Laserparameter und entsprechender Komposition der Gold-Nanopartikel zu einer präzise steuerbaren, letalen Schädigung markierter Zellen führen.
- ii) Thermische Effekte durch cw Laserbestrahlung von Gold-Nanopartikeln wiederum können zur gezielten Wirkstofffreisetzung verwendet werden. Der Aufbau von Mehrkomponentensystemen, die durch den Einbau von Gold-Nanopartikeln sensitiv gegenüber Licht sind, kann damit zur Manipulation individueller Zellen genutzt werden. Grundlegend für eine effiziente Verwendung partikelbasierter Zelldepletion ist das Verständnis der Prozesse an der Partikeloberfläche, die durch die Interaktion mit Licht induziert werden, sowie deren biologische Auswirkung. Das **BMO** führte die Untersuchungen zu physikalischen Vorgängen um laserbestrahlte Nanopartikel und deren Wirkung auf Zellmembranen zur Permeabilisierung bzw. Zerstörung von Zellen durch. Da die zu beobachtenden Effekte im Nanometer-Maßstab ablaufen, spielte auch die Oberflächenbeschaffenheit der Partikel und damit deren Anbindung an Zielzellen eine entscheidende Rolle. Der Verbundpartner **FMZ** führte die Arbeiten zur Entwicklung und Evaluation biokompatibler, modifizierbarer Materialoberflächen durch. Die von den Verbundpartnern **BMO** und **FMZ** erarbeiteten Ergebnisse zur notwendigen physikalischen und chemischen Beschaffenheit der Gold-Nanopartikel wurden im Experiment an Zellkultursystemen aus der Immunologie und Stammzellbiologie von den Verbundpartnern **IMMEI** und **LIFE&BRAIN** überprüft. Entscheidend für die Anwendung der Technologie im Zellkulturmodell ist eine selektive Anbindung der Gold-Nanopartikel

an die Zielstrukturen auf den Zellen. Ein Screening für monoklonaler Antikörper zur Aufreinigung Stammzell-abgeleiteter neuronaler Subpopulationen wurde innerhalb des Verbundes in der Zusammenarbeit von **LIFE&BRAIN** und **Miltenyi Biotec** durchgeführt. Parallel zu den Arbeiten erfolgte der Aufbau von Funktionsmustern für die Mikroskopplattform und Durchflusszytometrie bei **Miltenyi Biotec**. Entsprechend dem Fortschreiten des Aufbaus der Funktionsmuster sollten die im Labor durch **BMO**, **IMMEI** und **LIFE&BRAIN** erhobenen experimentellen Ergebnisse zeitnah an den Funktionsmustern auf Übertragbarkeit geprüft werden.

3. Ergebnisse und Arbeiten zu den einzelnen Arbeitspaketen

3.1 Arbeitspaket 1: Wissenschaftliche und technische Grundlagen der Zellaufreinigung: Bestimmung der relevanten Laserparameter und Partikelgrößen sowie der notwendigen Funktionalisierung von Gold-Nanopartikeln für eine laserinduzierte Aufreinigung von industriell relevanten Zellkultursystemen

Ziel des Arbeitspaketes war es, die von den Partnern IMMEI, BMO und FMZ erarbeiteten Grundlagen der photothermischen Wirkung von sphärischen Gold-Nanopartikeln auf Zellen in Abhängigkeit von Partikelgröße, Beschichtung, Dosis, Pulsfolge und Laserleistung in einem Stammzell-basierten adhärennten Ko-Kultur Modell zu validieren. Die entwickelte Methode wurde darüber hinaus auf ein Mikrocarrier-basiertes System übertragen, um die Anwendung der Methodik in einem skalierbaren Zellkultursystem zu erproben. Um neue monoklonaler Antikörper zu identifizieren, die sich für die Nano-Gold-vermittelte Aufreinigung biomedizinisch verwertbarer neuronaler Subpopulationen eignen, wurde in Zusammenarbeit mit Miltenyi Biotec ein Multiplex Flow Cytometry Colour-Coded Antikörperscreen an neuronal differenzierten pluripotenten Stammzellen durchgeführt.

Die Parameter zur photothermischen Aufreinigung von Zellen konnten erfolgreich von den Partnern IMMEI, BMO und FMZ etabliert und in verschiedensten, nicht Stammzell-basierten Zellkultursystemen angewendet werden. Unabhängig vom Zellsystem wurden dabei Reinheiten von mehr als 99 % erreicht. In Zusammenarbeit mit dem Partner IMMEI wurden diese Parameter auf ein bei LIFE&BRAIN etabliertes Ko-Kultursystem aus mesenchymalen und neuralen Stammzellen angewendet. Dazu wurden mesenchymale Stammzellen (MSZ) in einer Ko-Kultur mit neuralen Stammzellen (It-NES⁽⁸⁾) in einem Mischungsverhältnis 80%/20% auf Lumox Platten kultiviert. Ziel war es es, unter Verwendung Gold-Nano-Partikel gekoppelter α CD73-Biotin Antikörper die markierten MSZ aus dem adhärennten Ko-Kultursystem zu eliminieren. Um die Effizienz der Methode zu bestimmen, wurde eine It-NES Reporterlinie verwendet, die das grün fluoreszierende Protein GFP unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Promoters EF1 α exprimiert⁽¹³⁾. Zur lebend/tot Unterscheidung nach Laser-vermittelter Elimination wurden die Zellkulturen mit Propidiumjodid (PI) behandelt, was eine Unterscheidung mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops erlaubt (Abbildung 1).

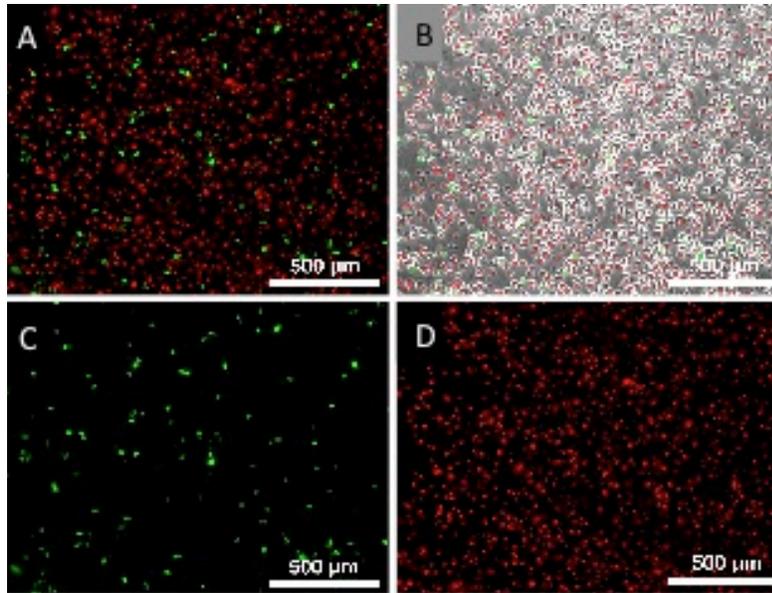


Abbildung 1: Ablation von mesenchymalen Stammzellen aus einer Ko-Kultur mit neuronalen Stammzellen (Mischung 80%/20%).(A) Overlay , PI- und GFP-Kanal. (B) Overlay Durchlicht, PI- und GFP-Kanal. (C) GFP-Kanal. (D) PI Kanal. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit dem IMMEI an dem dort verfügbaren Funktionsmuster generiert.

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem am IMMEI vorhanden Versuchsaufbau eine photothermische Elimination der MSZ von mehr als 99% und eine Rückgewinnung der It-NES von nahezu 100% erreicht werden konnte. Die Erprobung der Methodik in einem Mikrocarrier-basierten Zellsystem wurde vom Partner IMMEI anhand von B-Lymphozyten (LB27.4) und dendritische Zellen (DC2.4) auf Cytodex3 und Cytodex1 Mikrocarriern durchgeführt und erfolgreich validiert.

Im Rahmen des Projektes wurde zunächst ein neuartiges Protokoll zur Gewinnung von Motorneuronen entwickelt. Motorneurone stellen eine potentielle Zielstruktur für die Entwicklung neuer Therapien zur Behandlung z.B. der erblichen spastischen Paraplegie (HSP), der spinalen Muskelatrophie (SMA) oder der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) dar. Das entwickelte Protokoll basierte auf der Verwendung von Suspensionskulturen pluripotenter Stammzellen und der anschließenden neuronalen Konversion der Zellaggregate in Suspension durch Gabe von *small molecules*, die den BMP und TGF- β Signalweg inhibieren. Mittels Retinsäure und Purmorphamin Supplementierung konnte im weiteren Verlauf der Differenzierung eine effiziente Anreicherung von Motorneuronen erreicht werden (Abbildung 2)^(14, 15). Um die Detektion der Zielpopulation im Antikörperscreening zu gewährleisten wurde eine humane pluripotente Reporterstammzelllinie verwendet (HB9::GFP)⁽¹⁶⁾. Diese Reporterlinie exprimiert GFP unter der Kontrolle des Motorneuron-spezifischen Promotors HB9 und ermöglicht so die Ko-Detektion neuer CD Marker aus der von Miltenyi bereitgestellten CD Markerbibliothek. Zur Quantifizierung der gewonnenen Motorneurone wurde zunächst der zeitliche Verlauf der GFP-Expression während der Differenzierung mittels durchflusszytometrischer Analysen untersucht. Die GFP-Expression und somit die Zahl HB9-positiver Motorneurone nimmt ab Tag 12 kontinuierlich zu und erreicht ihr Maximum an Tag 24 (Abbildung 2A). Mit Hilfe des entwickelten Protokolls konnte eine maximale Anreicherung von 55 % GFP-positiven Zellen erzielt werden. Immunzytochemische Analysen zeigten, dass GFP und der Motorneuron-spezifische

Marker HB9 in den Zellen ko-exprimiert werden, wodurch die Detektion falsch positiver CD Marker auf Basis der GFP-Fluoreszenz während des FACS-basierten Antikörperscreenings ausgeschlossen werden kann (Abb. 2B, links). Da nur etwa 60% der HB9-positiven Zellen den Reporter exprimierten, konnten falsch negative Ergebnisse jedoch nicht ausgeschlossen werden. Wie in Abbildung 2B gezeigt können die GFP-positiven Zellen nach Dissoziation in Zellkulturschalen weiter kultiviert werden und stehen so für weitergehende Analysen und die geplanten Arbeiten zur Depletion im adhären System zur Verfügung.

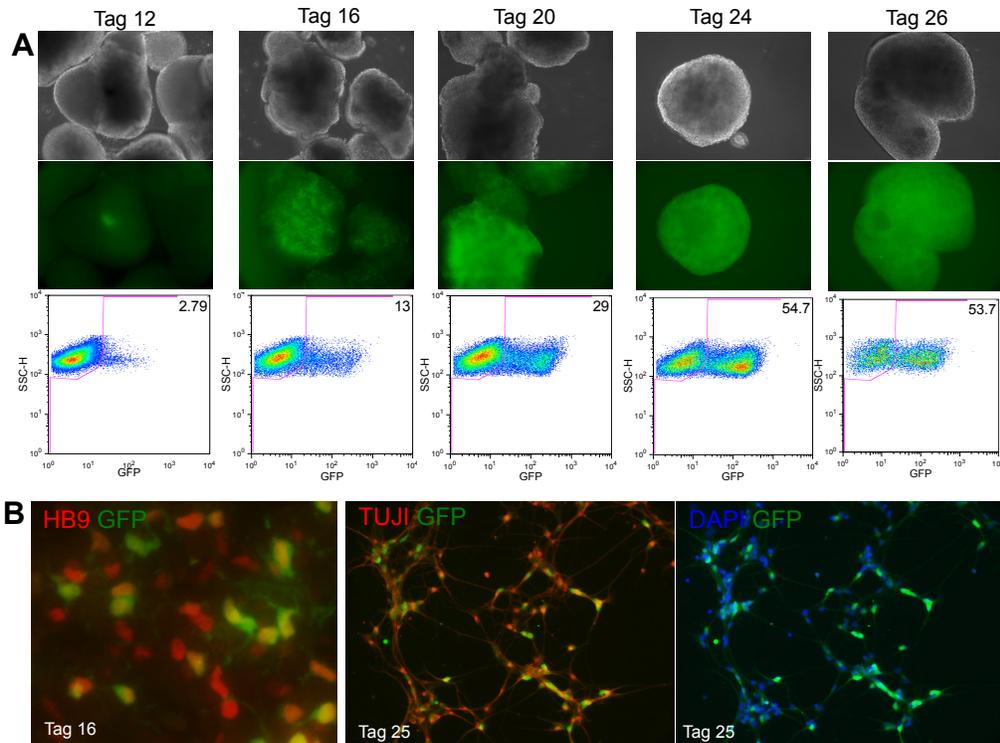


Abbildung 2: Analyse der GFP-Fluoreszenz in HB9::GFP hESZ während der Differenzierung. (A) Phasenkontrastaufnahmen und korrespondierende Aufnahmen der GFP Lebendfluoreszenz repräsentativer Aggregate zu den entsprechenden Zeitpunkten während der Motoneuronen-Differenzierung. Gezeigt sind die zugehörigen durchflusszytometrischen Analysen mit Angabe der GFP-positiven Zellen in %. (B) Immunzytochemische Ko-Detektion des Motoneuron-spezifischen Markers HB9 und der GFP-Fluoreszenz an Tag 16 der Differenzierung (links), sowie immunzytochemische Analysen der Zellen 3 Tage nach EDTA-basierter Vereinzelung und Replattierung an Tag 22. Gezeigt sind die Ko-Detektion des Neuronen-spezifischen Markers β -III Tubulin (TUJI) mit GFP sowie des DNA Farbstoffes DAPI mit der GFP Fluoreszenz.

Zur Identifikation monoklonaler Antikörper, die GFP-negative Zellen markieren wurde gemeinsam mit Miltenyi Biotec ein Durchflusszytometrie-basiertes Antikörperscreening durchgeführt. Dazu wurde ein bei Miltenyi verfügbares CD-Marker Panel mit 300 Antikörpern eingesetzt. In der anschließenden Auswertung konnten so Antikörper identifiziert werden, die spezifisch an GFP-negative oder positive Zellen binden.

Zunächst wurden in Zusammenarbeit mit Miltenyi Biotec Bedingungen für eine effiziente und schonende Vereinzelung der differenzierten Kulturen erprobt. Insbesondere wurden zwei kommerziell erhältliche Kits der Firma Miltenyi Biotec (EB dissociation Kit (EBD Kit); Tumor dissociation Kit (TD Kit)). Eine Quantifizierung der vitalen Zellen nach Vereinzelung zeigte, dass sich das EB Kit im Hinblick auf die erzielte Zellausbeute nach Vereinzelung der Zellen besser eignete. Die Untersuchung des Oberflächenmarkerprofils mittels durchflusszytometrischer Analysen nach enzymatischer Vereinzelung der Zellen mit Hilfe von Antikörpern gegen PSA-NCAM, CD133, GLAST und CD271 zeigte hingegen keine deutlichen qualitativen Unterschiede. Daher wurde für alle folgenden Versuchsreihen das EBD Kit verwendet. In einer weiteren Versuchsreihe wurden unterschiedliche Differenzierungsstadien der Stammzell-abgeleiteten Motoneuronenkulturen hergestellt. Zur Identifikation unterschiedlicher Differenzierungsstadien während des Screenings wurden Versuchsreihen zur Markierung aller drei Differenzierungsstadien mit einem Lebend-Farbstoff (Cell Trace Violet) durchgeführt. Wie in Abbildung 3 zu sehen können diese nach Inkubation mit 0, 0.5 und 3 μM Cell Trace Violet klar aufgetrennt und als distinkte Populationen erkannt werden. Im anschließend durchgeführten Screening können so unterschiedliche Differenzierungsstadien mit Cell Trace Violet markiert, gepoolt und anschließend parallel im durchflusszytometrisch vermessen werden. Dadurch können Differenzierungseffekte auf die Markerexpression visualisiert werden.

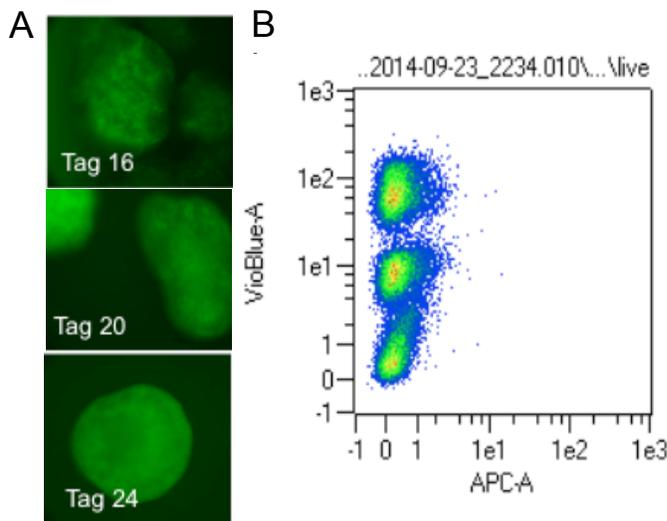


Abbildung 3: Etablierung der Cell Trace Violet Färbung unterschiedlicher Differenzierungsstadien von Motoneuronenkulturen in der durchflusszytometrischen Analyse. (A) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der lebend GFP-Fluoreszenz in Aggregaten von HB9::GFP-abgeleiteten Motoneuronenkulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung. (B) Auftrennung der unterschiedlichen Differenzierungsstadien nach enzymatischer Vereinzelung mit dem EB Kit und Inkubation mit 0 μM (unter Population, 16 Tage), 0.5 μM (mittlere Population, 20 Tage) und 3 μM (obere Population, 24 Tage) Cell Trace Violet.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden für den Versuchstag über 16 und 20 Tage differenzierte Motoneuronenkulturen generiert, einzeln, mit Cell Trace Violet markiert und mit den Antikörpern inkubiert. Insgesamt wurden 13 CD Marker (CD90, CD58, CD49a, CD49b, CD49e, CD49f, CD133 1 und 2, CD9, MSCA1, A2B5, CD326, CD51) identifiziert, die GFP-negative Zellen markieren. Die meisten Antikörper markieren 0-25 % der GFP-negativen Zellen. Eine Ausnahme stellt der Marker CD49f dar, mit dem eine klar abgrenzbare, GFP-negative Population detektiert werden konnte (Abbildung 4). CD49f markiert mehr als 38 % der Zellen, was bezogen auf die GFP-

negative Zellen ca. der Hälfte der Population entspricht. Die CD49f Expression ist zudem abhängig vom Zeitpunkt während der Differenzierung. Auf Grund des in der Kultur weiterhin vorhandenen hohen Anteils GFP negativer Zellen könnte CD49F zwar für eine Anreicherung, jedoch nicht für die Präparation reiner Motoneuronenkulturen eingesetzt werden.

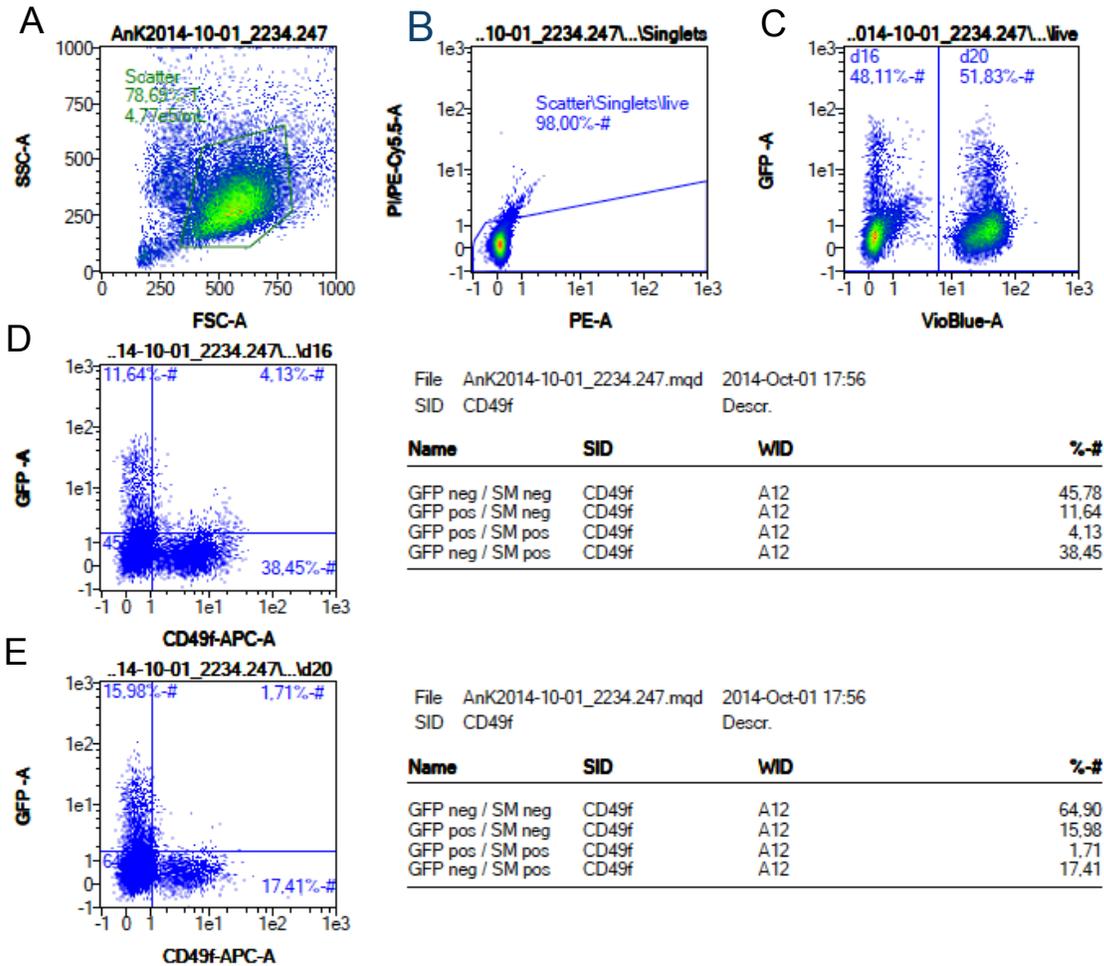


Abbildung 4: Analyse der CD49f Expression. (A) Gating der Zielpopulation im Forward-Scatter vs. Sideward-Scatter Streudiagramm. (B) Streudiagramm der lebend/tot Diskriminierung. (C) Auftrennung der unterschiedlichen Kulturen anhand der Cell Trace Violett Färbung auf der x-Achse (d16 = Tag 16; d20= Tag 20) und der GFP-positiven Motoneuronen auf der y-Achse. Analyse der CD49f Expression in (D) 16 Tage und (E) 20 Tage differenzierten Motoneuronenkulturen und die dazugehörigen Quantifizierungen.

Die Grundlagen der photothermischen Wirkung von sphärischen Gold- Nanopartikeln auf Zellen in Abhängigkeit von Partikelgröße, Beschichtung, Dosis, Pulsfolge und Laserleistung zur Zelldepletion konnten erfolgreich in einen adhärennten Stammzell-basierten System validiert werden. Die entwickelte Methode konnte vom Partner IMMEI auf ein Mikrocarrier-basiertes System übertragen werden. Um neue monoklonaler Antikörper zu identifizieren, die sich für die Gold-Nanopartikel-vermittelte Aufreinigung von Motoneuronen eignen eignen, wurde in Zusammenarbeit mit Miltenyi Biotec ein

Multiplex Flow Cytometry Colour-Coded Antikörperscreen durchgeführt. Es konnten jedoch keine spezifischen CD-Marker für die effiziente Elimination aller kontaminierenden Zellen aus Stammzell-abgeleiteten Motoneuronenkulturen identifiziert werden.

3.2 Arbeitspaket 2: Zellmanipulation: Evaluierung optisch adressierbarer Trägersysteme auf der Basis von Gold-Nanopartikeln zur steuerbaren, zellspezifischen Einbringung von Makromolekülen in Zellen

Im Rahmen von AP2 sollte bei LIFE&BRAIN eine Machbarkeitsstudie zur laserinduzierten intrazellulären Freisetzung von mRNA in adhärent wachsenden Stammzellen durchgeführt werden. Die von den Verbundpartnern IMMEI und BMO etablierten Protokolle für die intrazelluläre Freisetzung von Makromolekülen in Immunzellen sollten dazu von LIFE&BRAIN auf Anwendbarkeit in adhärennten humanen Stammzellsystemen angepasst werden. Nach Testung der Methode beim Partner IMMEI sollte die Methode zur örtlich und zeitlich steuerbaren Einbringung und Aktivierung von Makromolekülen in neurale Stammzellen evaluiert werden, um diese perspektivisch für das *screening* einzusetzen. Geplant war eine *proof-of-principle* Studie zur biologischen Funktionalität des Systems durch das Einbringen von Neurogenese-initiiierenden Faktoren in neurale Reporterzelllinien^(17, 18). Die Funktionalität der Methode sollte durch Messung der Fluoreszenz-Intensität analysiert werden, welche aus der Aktivierung der neuronalen Reporterexpression resultiert. Erste Versuchsreihen, die beim Partner IMMEI durchgeführt wurden konnten eine erfolgreiche Einbringung von siRNA mittels Gold-Nanopartikeln zeigen. Die Arbeiten verzögerten sich allerdings erheblich, da Probleme bei der Synthese der Goldpartikel und der Einbettung der funktionalisierten Goldpartikel in Nanohydrogele auftraten. Daher konnte im Rahmen der Projektlaufzeit keine Machbarkeitsstudie anhand von Stammzell-basierten Systemen bei LIFE&BRAIN durchgeführt werden.

3.3 Arbeitspaket 4: Mikroskopaufbau: Adaption von LAND-CEM an ein modulares mikroskopisches System zur Anwendung an adhärennten Zellkulturen

Die mit Hilfe des am IMMEI verfügbaren Versuchsaufbaus der Mikroskopplattform erzielten Ergebnisse dienten der Konzeption der Prozessintegration der Laser-, Optik-, Mikroskop- und Trägermodule sowie der Steuerelektronik für das bei Miltenyi Biotec entwickelte Gesamtsystem. Im Rahmen des Arbeitspaketes sollte das Gesamtsystem im Monat 30 zur biologischen Validierung für Anwendungen im industriellen Maßstab an adhärennten Zellkulturen zu LIFE&BRAIN transferiert werden. Dazu sollten die von dem Verbundpartner Miltenyi Biotec neu entwickelten Materialien für die Gold-Nanopartikel-basierte laservermittelte Elimination adhärennter Zellen getestet werden. Dabei sollen die evaluierten Parameter und Resultate aus AP1 genutzt werden. Aufgrund von Verzögerungen im Versuchsaufbau stand das Gesamtsystem LIFE&BRAIN jedoch nicht im Rahmen der Projektlaufzeit für die geplanten Arbeiten zur Verfügung.

4. Ausblick

Zellbasierte Assays finden vielfältigen Einsatz in der Medikamentenentwicklung. So werden in der pharmazeutischen Industrie Lead-Validierung, ADME (Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion)- und Toxikologie-Studien an adhären Stammzell-basierten Zellkulturen durchgeführt. Die Reinheit der verwendeten Zellkulturen ist ausschlaggebend für die Aussagekraft der Screening-Ergebnisse. Die Weiterentwicklung der hier etablierten laserbasierter Technologien und Methoden besitzt somit ein hohes Marktpotenzial und stellt einen Anknüpfungspunkt für weitere Forschungsarbeiten dar. Von Dritter Stelle sind im Rahmen der Verbundlaufzeit keine kommerziellen Gesamtsysteme oder Applikationsprotokolle für die Laser-basierte Nano-Gold-vermittelte Präparation und Manipulation adhären Stammzellkulturen entwickelt und publik gemacht worden.

5. Anhang

5.1 Veröffentlichungen

Karus, M., Blaess, S., Brüstle, O. (2014)

Self-organisation of neural tissue architectures from pluripotent stem cells

J Comp Neurol 522(12):2831-2844.

doi: 10.1002/cne.23608.

Heffele, L., Ormond, D.R., Haupt, S., Brüstle, O., Knolle, P., Rudnitski, F., Groll, J., Hüttmann, G. and Endl, E.

Benchmarking light induced nanoparticle activated cell selection as a purification strategy for adherent cells and cells in suspension.

Publikation in Vorbereitung

5.2 Schutzrechte

keine

Referenzen

1. Schutze, K., Niyaz, Y., Stich, M., and Buchstaller, A. (2007) Noncontact laser microdissection and catapulting for pure sample capture. *Methods in cell biology* **82**, 649-673
2. Terstegge, S., Rath, B. H., Laufenberg, I., Limbach, N., Buchstaller, A., Schutze, K., and Brustle, O. (2009) Laser-assisted selection and passaging of human pluripotent stem cell colonies. *Journal of biotechnology* **143**, 224-230
3. Koller, M. R., Hanania, E. G., Stevens, J., Eisfeld, T. M., Sasaki, G. C., Fieck, A., and Palsson, B. O. (2004) High-throughput laser-mediated in situ cell purification with high purity and yield. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **61**, 153-161
4. Szaniszló, P., Rose, W. A., Wang, N., Reece, L. M., Tsulaia, T. V., Hanania, E. G., Elferink, C. J., and Leary, J. F. (2006) Scanning cytometry with a LEAP: laser-enabled analysis and processing of live cells in situ. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **69**, 641-651
5. Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature protocols* **2**, 3081-3089
6. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147
7. Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature biotechnology* **27**, 275-280
8. Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J. A., Ladewig, J., and Brustle, O. (2009) A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 3225-3230
9. Kriks, S., Shim, J. W., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., Yang, L., Beal, M. F., Surmeier, D. J., Kordower, J. H., Tabar, V., and Studer, L. (2011) Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* **480**, 547-551
10. Li, W., Sun, W., Zhang, Y., Wei, W., Ambasudhan, R., Xia, P., Talantova, M., Lin, T., Kim, J., Wang, X., Kim, W. R., Lipton, S. A., Zhang, K., and Ding, S. (2011) Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 8299-8304
11. Reinhardt, P., Glatza, M., Hemmer, K., Tsytsyura, Y., Thiel, C. S., Hoing, S., Moritz, S., Parga, J. A., Wagner, L., Bruder, J. M., Wu, G., Schmid, B., Ropke, A., Klingauf, J., Schwamborn, J. C., Gasser, T., Scholer, H. R., and Sternecker, J. (2013) Derivation and expansion using only small molecules of human neural progenitors for neurodegenerative disease modeling. *PloS one* **8**, e59252
12. Shi, Y., Kirwan, P., and Livesey, F. J. (2012) Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nature protocols* **7**, 1836-1846
13. Terstegge, S., Winter, F., Rath, B. H., Laufenberg, I., Schwarz, C., Leinhaas, A., Levold, F., Dolf, A., Haupt, S., Koch, P., Endl, E., and Brustle, O. (2010) Laser-

- assisted photoablation of human pluripotent stem cells from differentiating cultures. *Stem cell reviews* **6**, 260-269
14. Elanzew, A., Sommer, A., Pusch-Klein, A., Brustle, O., and Haupt, S. (2015) A reproducible and versatile system for the dynamic expansion of human pluripotent stem cells in suspension. *Biotechnology journal* **10**, 1589-1599
 15. Karus, M., Blaess, S., and Brustle, O. (2014) Self-organization of neural tissue architectures from pluripotent stem cells. *The Journal of comparative neurology* **522**, 2831-2844
 16. Placantonakis, D. G., Tomishima, M. J., Lafaille, F., Desbordes, S. C., Jia, F., Socci, N. D., Viale, A., Lee, H., Harrison, N., Tabar, V., and Studer, L. (2009) BAC transgenesis in human embryonic stem cells as a novel tool to define the human neural lineage. *Stem cells* **27**, 521-532
 17. Ladewig, J., Koch, P., Endl, E., Meiners, B., Opitz, T., Couillard-Despres, S., Aigner, L., and Brustle, O. (2008) Lineage selection of functional and cryopreservable human embryonic stem cell-derived neurons. *Stem cells* **26**, 1705-1712
 18. Tucker, K. L., Meyer, M., and Barde, Y. A. (2001) Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nature neuroscience* **4**, 29-37

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN geplant	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Verbundprojekt: Laser induzierte, Nanopartikel vermittelte selektive Zell Elimination und Modulation (LAND-CEM) Teilvorhaben: Integration laserbasierter Technologien zur Aufreinigung und berührungsfreien Manipulation von adhärenen Stammzellkulturen	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Brüstle, Oliver Haupt, Simone	5. Abschlussdatum des Vorhabens 12.2015 6. Veröffentlichungsdatum geplant
	7. Form der Publikation Fachzeitschrift
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) LIFE&BRAIN GmbH Sigmund-Freud-Str. 25 53127 Bonn	9. Ber. Nr. Durchführende Institution - 10. Förderkennzeichen *) 13N11830
	11. Seitenzahl 11
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 18 14. Tabellen 0
	15. Abbildungen 4
16. Zusätzliche Angaben -	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) -	

18. Kurzfassung

Derzeitiger Stand von Wissenschaft und Technik

Die Verfügbarkeit humaner pluripotenter Stammzellen (PS-Zellen) bietet noch nie dagewesene Möglichkeiten, definierte somatische Zelltypen in praktisch unbegrenzter Zahl in vitro zu erzeugen. Eine breite Palette von etablierten adhärenen Differenzierungsverfahren erlaubt die Gewinnung einer Vielzahl neuraler Zelltypen. So gewonnene Zellkulturen eröffnen neue Perspektiven bei der Erforschung von Krankheitsursachen und der Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, die häufig durch den progressiven Verlust bestimmter neuronaler oder glialer Zellpopulationen gekennzeichnet sind. Aus neurobiologischer Sicht besteht die Schwierigkeit darin, mit Hilfe der verfügbaren in vitro Differenzierungsprotokolle hochreine Kulturen spezifischer Zelltypen für die Krankheitsforschung und Wirkstoffentwicklung aus pluripotenten Stammzellen zu generieren. Bisher war es nicht möglich, ohne genetische oder mechanische Selektionsmethoden reine Populationen eines neuronalen oder glialen Subtypen in vitro zu erzeugen. Die nach Differenzierung gewonnenen adhärenen Mischkulturen sind meist äußerst empfindlich gegenüber mechanischer oder enzymatischer Manipulation und Vereinzelung. Die etablierten Methoden zur Zellaufreinigung (FACS und MACS, Immunopanning) lassen sich nur mit suspendierten Zellen durchführen und sind daher für solche Kulturen weitgehend ungeeignet.

Begründung/Zielsetzung der Untersuchung

Ziel des hier vorgeschlagenen Teilvorhabens war es, automatisierbare, laserbasierte Verfahren zur Aufreinigung und Manipulation biomedizinisch und pharmakologisch relevanter humaner Stammzell-abgeleiteter Nervenzellen (neuraler Zellen) in einem adhärenen Zellkultursystem zu entwickeln. Bisher war es nicht möglich, ohne genetische oder mechanische Selektionsmethoden reine Populationen eines neuronalen oder glialen Subtypen in vitro zu erzeugen. Die nach Differenzierung gewonnenen adhärenen Mischkulturen sind meist äußerst empfindlich gegenüber mechanischer oder enzymatischer Manipulation und Vereinzelung. Eine Mikroskop-basierte Manipulations- und Aufreinigungsstation für die automatisierte, Gold-Nanopartikel-vermittelte Präparation adhärenen Zellen würde dies erstmals erlauben. Voraussetzung für die Methodenentwicklung ist die Verfügbarkeit spezifischer monoklonaler Antikörper.

Methode

- Evaluierung von Verbrauchsmaterialien zur Laser-basierten Nanogold-vermittelten Zellelimination im adhärenen Stammzell-basierten Zellkultursystem
- Entwicklung von Zellkulturprotokollen für die Anreicherung von Motoneuronen aus pluripotenten Stammzellen
- Multiplex Flow Cytometry Colour-Coded Antikörperscreen
- Untersuchung der Nanogold-vermittelten Zelleliminationseffizienz

Ergebnis

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem im Projekt entwickelten Versuchsaufbau 99% der Nanogold-markierten Zellen mittels photothermischer Elimination aus einem adhärenen Stammzell-basierten Ko-Kultursystem entfernt werden konnten. Die nicht markierten, verbleibenden neuralen Stammzellen wurden dabei nicht geschädigt und konnten zu 100% zurückgewonnen werden.

Schlussfolgerung/Anwendungsmöglichkeiten

Zellbasierte Assays finden vielfältigen Einsatz in der Medikamentenentwicklung. So werden in der pharmazeutischen Industrie Lead-Validierung, ADME (Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion)- und Toxikologie-Studien an adhärenen Stammzell-basierten Zellkulturen durchgeführt. Die Reinheit der verwendeten Zellkulturen ist ausschlaggebend für die Aussagekraft der Screening-Ergebnisse. Die Weiterentwicklung der hier evaluierten Plattformtechnologie kann einen entscheidenden Beitrag zur Generierung hochqualitativer Stammzell-basierter in vitro Modelle für die Wirkstoffsuche und Krankheitsforschung liefern.

19. Schlagwörter

Nanogold-vermittelte Zelldepletion
Adhärenen Stammzellkulturen

20. Verlag

-

21. Preis

-

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication) Final report	
3. title Project: Laser induced nanoparticle-based selective cell elimination and modulation (LAND-CEM) Subproject: Integration of laser-based technologies for the purification and contact-free manipulation of adherent stem cell cultures		
4. author(s) (family name, first name(s)) Brüstle, Oliver Haupt, Simone	5. end of project 31.12.2015	6. publication date planned
	7. form of publication Journal	
8. performing organization(s) (name, address) LIFE&BRAIN GmbH Sigmund-Freud-Str. 25 53127 Bonn	9. originator's report no. 13N11830	10. reference no.
	11. no. of pages 11	
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 18	14. no. of tables 0
	15. no. of figures 4	
16. supplementary notes -		
17. presented at (title, place, date) -		
18. abstract Specific immunotargeting gold nanoparticles and appropriate subsequent short pulsed laser irradiation result in selective cell depletion based on localized light absorption of nanoparticles. Precise aiming and prior identification of the target cells is not necessary for this form of photodamage because inherent optical and thermal effects provide target selectivity. In this study, we show that pulsed laser activated nanoparticle cell elimination is able to purify adherently growing cells with high throughput. By using 25nm spherical gold nanoparticles directly conjugated to IgG monoclonal antibodies selective cell depletion by laser-irradiated nanoparticle assisted cell selection was achieved in mixed stem cell cultures adherently grown on lumnox cell culture dishes. We could achieve depletion efficiencies in adherent cultures of over 99%, whereas viability of non-targeted neural cells was not affected. Plasmonic photothermolysis is not limited to cells in suspension, like other cell-selection methods such as FACS and MACS, which are commonly used for cell purification in biomedical research and is a new cell purging technology well applicable for adherent stem cell cultures.		
19. keywords Gold nanoparticle-based cell depletion Adherent stem cell culture		
20. publisher -	21. price -	