

Organotypische Zellkultur

O₂-sensitive Mikrokavitätenarrays: 3D-Zellkultursystem mit Sensorfunktion

ERIC GOTTWALD¹, CHRISTOPH GRÜN¹, GREGOR LIEBSCH²

¹ AG 3D-ZELLKULTURSYSTEME, ABT. BIOPROZESSTECHNIK UND BIOSYSTEME, INSTITUT FÜR FUNKTIONELLE GRENZFLÄCHEN, KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE (KIT)

² PRESENS PRECISION SENSING GMBH, REGENSBURG

Oxygen is a crucial parameter for organotypic *in vitro*-cultures which are still performed under ambient atmosphere supplemented with 5 % CO₂. This can lead to hyperoxia with its associated effects on signaling cascades and their effects on cellular behavior. Here, we describe a platform that enables real-time, label-free, optical oxygen (gradient) measurements in organotypic 3D-/organoid cultures thus allowing for physiologic culture and assay conditions in e. g. mito stress tests and substance testing.

DOI: 10.1007/s12268-023-2045-1

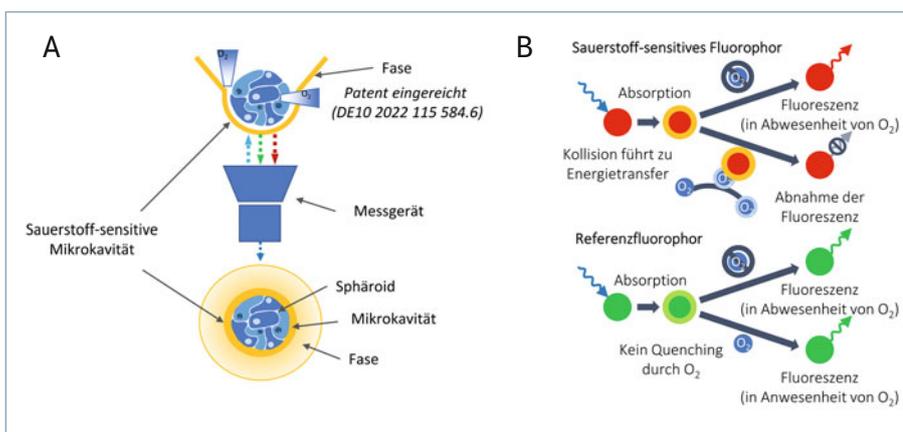
© Die Autoren 2023

■ Insbesondere für die Testung neuer aktiver pharmazeutischer Inhaltsstoffe (API) sind gewebetypische *in vitro*-Systeme von größter Bedeutung. Allerdings stehen *in vivo*-nahe Testsysteme nur selten zur Verfügung,

weshalb in den letzten Jahren immer wieder bereits zugelassene Medikamente wegen unvorhergesehener toxischer Nebenwirkungen vom Markt genommen werden mussten. Dies kann z. T. damit begründet werden, dass Substanzwirkungen auf die mitochondriale Atmungskette unter physiologischen Bedin-

gungen bislang nicht quantitativ erfasst werden können. Zellkulturen werden zum größten Teil immer noch unter Umgebungsatmosphäre, also bei einer Sauerstoffkonzentration von 20,95 Prozent unter Zusatz von fünf Prozent CO₂, kultiviert. Dies führt in der mit Feuchtigkeit gesättigten Brutschrankatmosphäre zu einer Sauerstoffkonzentration von etwa 18,5 Prozent [1]. Derartig hohe Sauerstoffkonzentrationen treten aber im menschlichen und tierischen Körper nicht auf, weshalb *in vitro*-Kulturen in der Regel tatsächlich einer Hyperoxie ausgesetzt sind, wenn von „Normoxie“ die Rede ist. Hyperoxische Bedingungen können einen deutlichen Einfluss auf zelluläre Signalkaskaden haben und führen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Diese rufen eine akute Toxizität durch makromolekulare Beschädigungen hervor und werden *in vivo* langfristig mit der Entstehung verschiedener Krankheiten wie Krebs, männliche Unfruchtbarkeit, Diabetes mellitus Typ 2, Herzinsuffizienz und Alterung in Verbindung gebracht. Ebenso gewebetypisch sind natürlich auch echte hypoxische Kulturbedingungen, unter denen die Zellen einen Sauerstoffmangel erleiden.

Während in Lebewesen Sauerstoff im Blut durch die Blutgefäße in die Gewebe und nur postkapillär in die Zellen diffundiert, erfolgt in der Zellkultur die Sauerstoffversorgung meist ausschließlich durch Diffusion in das Medium. In 3D-Zellkulturmodellen ist die Sauerstoffversorgung komplexer, da O₂ auch noch durch die Gewebeschichten diffundieren muss. Dies kann zu unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen innerhalb eines Systems und auch zu Sauerstoffgradienten innerhalb der Gewebe führen, die sich damit aber der *in vivo*-Situation annähern. Als gewebetypische Normoxie bezeichnet man einen Sauerstoffgehalt von 10–21 Prozent, während die Hypoxie Sauerstoffkonzentrationen deutlich darunter (unter 5 %) und die Hyperoxie Sauerstoffkonzentrationen über 21 Prozent bezeichnet [2]. Ein weitaus entscheidenderer Faktor ist jedoch, dass diese in der Atmosphäre vorliegende Normoxie nicht identisch mit gewebetypischen Sauer-



▲ **Abb. 1:** Setup und Messprinzip der Sauerstoffmessung. **A,** Einzelkavität mit Messbereichen für O₂. Sphäroide/Organoide werden in den Mikrokavitäten erzeugt und kultiviert. Durch das Messsystem wird die Sauerstoff-empfindliche Folie mit geeignetem kurzwelligem Licht (blauer Pfeil) angeregt, woraufhin die emittierte Fluoreszenz (roter und grüner Pfeil) sowohl im Bereich des Sphäroids/Organoids der Mikrokavität, in dessen direkter Mikroumgebung als auch im Bereich der Fase zur Gradientenbestimmung gemessen werden kann. **B,** Messprinzip des dynamischen Quenchings. Das Sauerstoff-sensitive Fluorophor emittiert in Abwesenheit von O₂ eine höhere Fluoreszenz als in Anwesenheit von O₂, das durch strahlungslosen Energietransfer die Fluoreszenz löscht (dynamisches Quenching). Das Referenzfluorophor reagiert in beiden Situationen gleich, sodass durch ratiometrische Auswertung die Sauerstoffkonzentration bestimmt werden kann.

stoffkonzentrationen ist, sodass hierfür der Begriff einer gewebetypischen Normoxie definiert werden muss, die auch als Physioxie bezeichnet wird [3].

Physiologische Sauerstoffkonzentrationen sind schwer zu ermitteln und deshalb nur unzureichend bekannt. Auf dem Weg des Sauerstoffs durch einen Organismus, durch die Gewebe hin zu den Mitochondrien, sinkt der Partialdruck aufgrund verschiedener Barrieren von rund 21 Prozent O_2 bis unter 1,3 Prozent in den Mitochondrien [2, 3]. Die gewebetypische Sauerstoffkonzentration, also der Bereich der Physioxie, wird daher zwischen dem Sauerstoffpartialdruck der Atmosphäre und dem in den Mitochondrien erwartet und unterscheidet sich je nach Gewebe erheblich. So wird mit den bis dato zur Verfügung stehenden Methoden die Sauerstoffkonzentration z. B. in der Leber mit 4–7,2 Prozent und im Myokard mit 2–4,9 Prozent angegeben [1, 4, 5]. Diese liegen weit unterhalb der 18,5 Prozent der Inkubatoratmosphäre, allerdings erreichen diese auch nicht die Zellen, da der Sauerstoff zunächst die Mediumschicht durchdringen muss. Demnach wäre eine versuchsbeglei-

tende Kontrolle der Sauerstoffsättigung in der direkten Umgebung der Zellen nicht nur wünschenswert, sondern sehr sinnvoll. So auch für die Untersuchung organotypischer Reaktionen in einer Kultur, da hier u. U. die Sauerstoffhistorie der Vor- und Nachkultur von Interesse sein kann.

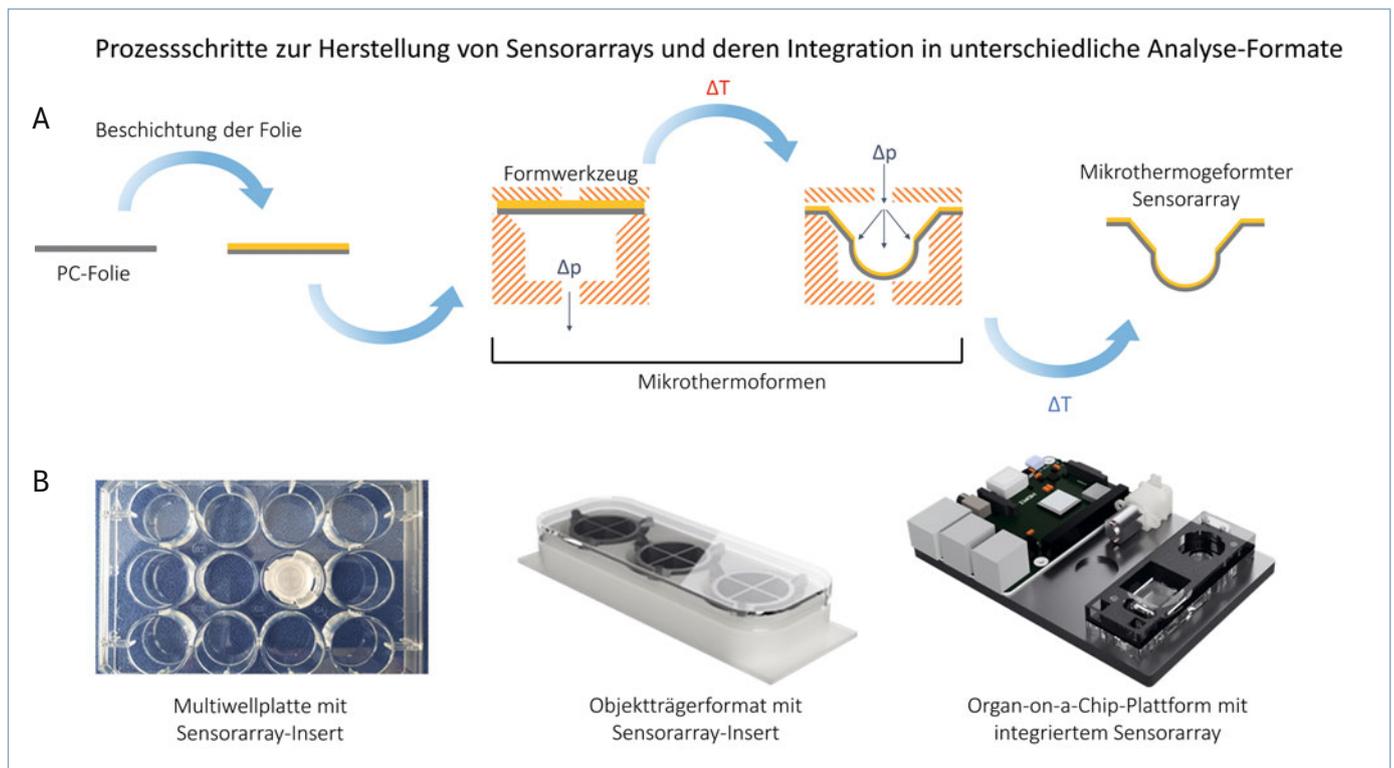
Sauerstoffmessverfahren *in vitro*

Für die Sauerstoffmessung stehen zwar im Prinzip mehrere Verfahren zur Verfügung, allerdings sind die wenigsten für *in vitro*-Anwendungen geeignet. Häufig verwendet werden polarografisch, punktuell messende Methoden, die allerdings Sauerstoff-verbrauchend sind und insbesondere für die Messung in sehr kleinen Volumina kritisch zu sehen sind. Alternativ kann über O_2 -assoziierte Parameter, z. B. die Expression des Hypoxie-induzierten Faktors 1α , indirekt die Sauerstoffsituation eingeschätzt werden. Insbesondere Fluoreszenzverfahren haben sich daher in den letzten Jahren für Sauerstoffmessungen in der Zellkultur etabliert, da sie marker- und berührungsfrei, in Echtzeit und ohne O_2 -Verbrauch messen können (Abb. 1). Allerdings gibt es bislang nur wenige Studi-

en, die Sauerstoffmessungen in 3D-Kultursystemen zeigen. Es wäre daher von größter Wichtigkeit, den Sauerstoff in einem 3D-Kultursystem in Echtzeit, markierungsfrei und ohne Sauerstoffverbrauch in der direkten Mikroumgebung des Gewebes unter physiologischen Bedingungen messen zu können.

Sauerstoff-sensitive Folien zur Messung der Sauerstoffkonzentration und von Sauerstoffgradienten

Mit der Erforschung von lumineszierenden Farbstoffen, die bei Kontakt mit O_2 mit dem dynamischen Quenching-Effekt reagieren, wurde eine neue Methode zum Nachweis von Gewebesauerstoffkonzentrationen möglich. Zu diesen gehören unter anderem Pt(II)- und Pd(II)-Porphyrinkomplexe, die sich aufgrund ihrer Quencheffekte für Sauerstoffmessungen im Bereich von 0–200 μM eignen [6]. Darüber hinaus können die Reporterfarbstoffe in verschiedenen Formaten formuliert werden, indem sie in speziellen Polymeren immobilisiert werden, die die Sauerstoffdiffusion erlauben, aber ein Ausbluten der Farbstoffe in das Messmedium verhindern, sodass intrazelluläre (Format: Nano-/Mikro-

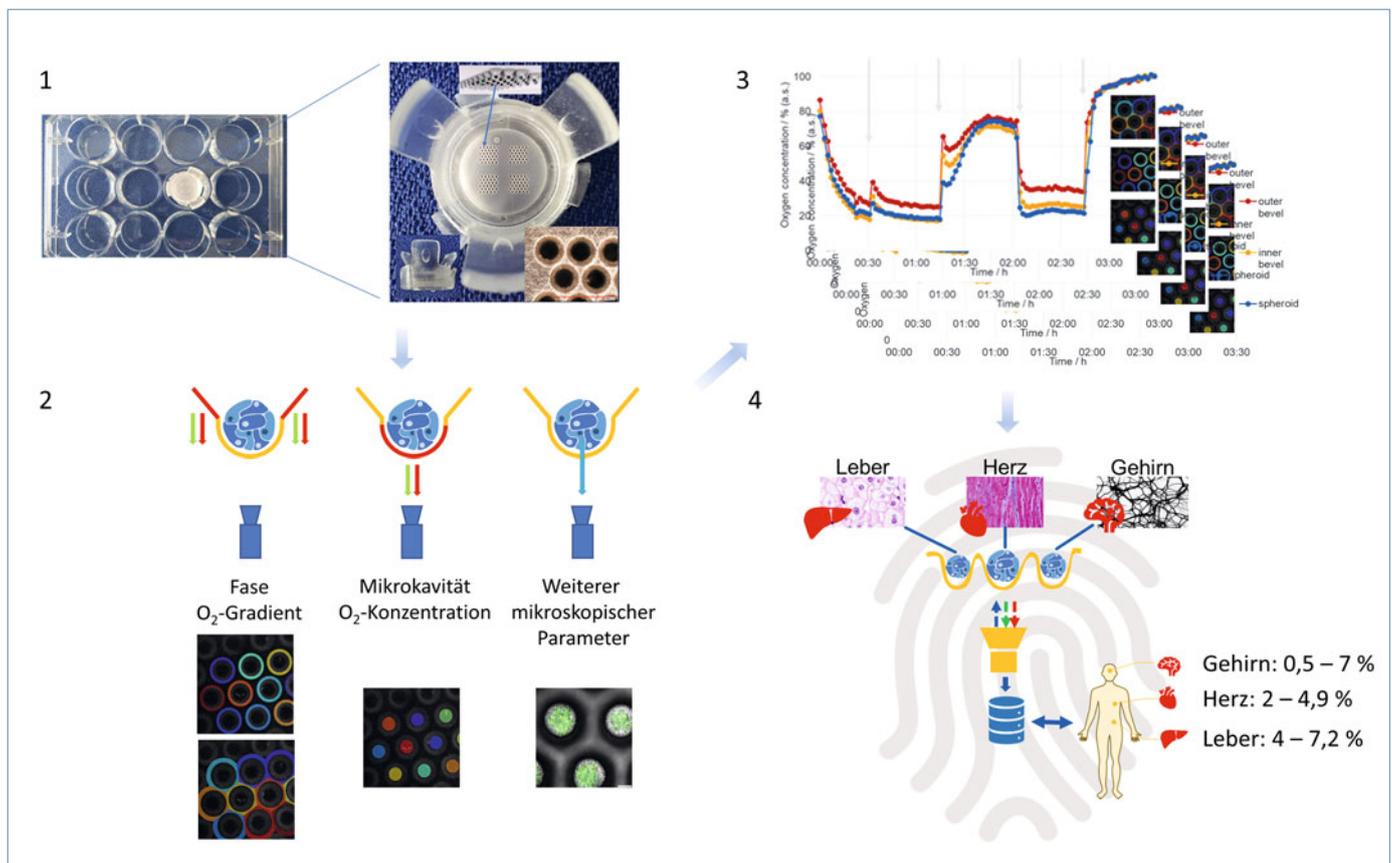


▲ **Abb. 2:** Herstellung und Verwendungsbeispiele der Sensorarrays. **A**, Herstellung der Sensorarrays durch Mikrothermoformen. Eine planare Polycarbonat(PC)-Folie wird zunächst mit Sensor- und Referenzfluorophor beschichtet. Die Folie wird anschließend in das Formwerkzeug gelegt und mithilfe von Vakuum auf der Unterseite (Δp = Druckänderung), Druck auf der Oberseite (Δp) und Erhitzen (ΔT = Temperaturänderung) geformt. Nach dem Erkalten (ΔT) kann der Sensorarray aus der Form entnommen werden. **B**, Die Sensorarrays können als Inserts in Multiwellplatten (links), Objektträgerformaten (Mitte) und in Organ-on-a-Chip-Plattformen (rechts) mit aktivem Fluss verwendet werden.

partikel) und extrazelluläre (Format: planare Folien) Messungen durchgeführt werden können. Da jedoch Mikropartikel den Energiemetabolismus der Zellen ändern können und 3D-Aggregate/Organoide auf flächigen Sensorfolien unkontrollierte O_2 -Nachdiffusion erfahren, sind diese Sensorformate nicht für Messungen in der direkten Mikroumgebung von 3D-/Organoidkulturen einsetzbar. Unser Ansatz erweitert nun die Sauerstoffmessung auf 3D-/Organoidkulturen aller Art, indem eine mit Sensorfarbstoff beschichtete, planare Polycarbonatfolie einem Mikrothermoformverfahren unterzogen wird [7, 8]. Die so entstehenden Mikrokavitätenarrays mit Sensorfunktion, die Sensorarrays, sind durch ihr Design in der Lage, nicht nur permanent die Sauerstoffkonzentration in der Mikroumgebung der 3D-Kultur/Organoide zu messen, sondern durch die integrierte Fase an der Oberseite der Mikrokavitäten auch Sauerstoffgradienten bzw. die Nachdiffusion aus dem Medium (**Abb. 1**).

Die Kavitäten bleiben auch bei der Messung gegen das Medium offen, sodass Sauerstoff nachdiffundieren kann. Die Mikrokavitäten weisen dabei am oberen Ende eine Fase auf, die es ermöglicht, auch O_2 -Gradienten oberhalb einer statischen oder dynamischen Kultur zu messen. Auch dies ist bislang nicht möglich gewesen und ermöglicht neue Einblicke in laufende 3D-Kulturen. Die Sensorarrays können nicht nur als System zur Erzeugung und Kultivierung der Sphäroide/Organoide selbst verwendet werden (Selbstorganisation von 3D-Aggregaten, die durch einfaches Pipettieren der Zellen in formgenaue Mikrokavitäten sehr ähnliche Größen und Formen aufweisen), sondern liefern darüber hinaus Sauerstoffdaten aus der direkten Mikroumgebung der Aggregate. Dies unterscheidet unseren Ansatz zwar fundamental von solchen, in denen intrazellulär Sauerstoff über von den Zellen aufgenommene Mikropartikel gemessen werden, das System kann aber durch die unterschiedliche Herange-

hensweise (intrazellulär vs. extrazellulär) sinnvoll das Bild der Gesamt-Sauerstoffsituation in einer Kultur erfassen bzw. ergänzen. Mithilfe der Sensorarray-Plattform können nun auch z. B. Mito-Stresstests in 3D durchgeführt werden. In diesen werden die Zellen auf ihre mitochondriale Atmung hin untersucht, indem zunächst durch Zugabe von Oligomycin die ATP-gekoppelte Respiration bestimmt werden kann. Durch anschließende Zugabe des auf die Atmungskette entkoppelnd wirkenden Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) kann die maximale Respiration und schließlich durch Zugabe von Rotenon und Antimycin A der Anteil des nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs gemessen werden (**Abb. 3**, [9]). Bereits verfügbare Messsysteme, die zwar das gleiche Messprinzip nutzen, aber planare Folien einsetzen, können nur den O_2 -Gehalt der gesamten, bei Messdurchführung gegenüber der Außenatmosphäre verschlossenen, Mess-/Kulturkammer



▲ **Abb. 3:** Workflow für das O_2 -Fingerprinting: 1: Multiwellplatten-Insert mit vier Mikrokavitätenfeldern für parallele Messungen. 2: simultane O_2 -Datenaufnahme der Fase (links, rot) zur O_2 -Gradientenbestimmung und der Mikroumgebung des Sphäroids/Organoids aus der Kavität (rot, Mitte) und möglicher weiterer (Fluoreszenz-)mikroskopischer Parameter (rechts). 3: Durch die Multiplexingmöglichkeit bei der Datenaufnahme können in einer 12-Well-Platte z. B. bis zu 1.440 Mito-Stresstests parallel aufgenommen werden. 4: Durch Sauerstoffverbrauchsmessungen unter physiologischen Bedingungen kann eine O_2 -Fingerprinting-Datenbank aufgebaut werden, die optimale Sauerstoffkulturbedingungen für jeden Zell-/Gewebetyp zur Verfügung stellt.

bestimmen. Dadurch erzeugt die Messung selbst eine zweitweise Hypoxie. Im Unterschied zu bisherigen Systemen können die Assays mit Sensorarrays nun aber unter physiologischen Sauerstoffkonzentrationen stattfinden, zusätzlich über beliebig lange Zeiträume gemessen werden und das sowohl in statischen als auch aktiv durchströmten Systemen. Die sehr *in vivo*-nahe Kultivierung erlaubt somit technologisch einfache, aber hinsichtlich Wirkstoffanalyse auch komplexe Assays, die wiederum den Weg hin zu zell-, gewebe- oder gar organotypischem O₂-Fingerprinting ebnet.

Ausblick

Mithilfe der von uns entwickelten Technologie ist es nun möglich, neben 3D-Mito-Stresstests und anderen Assays zur Charakterisierung der mitochondrialen Atmung, auch Substanztestungen (prinzipiell im High-Throughput) unter physiologischen Bedingungen durchzuführen. 3D-Mito-Stresstests wurden von uns jüngst demonstriert [9]. Mit solchen Techniken wird es nun möglich sein, die Sauerstoffkonzentration für einzelne Zelltypen unter physiologisch relevanten Konzentrationen und/oder bester physiomimetischer Funktion zu bestimmen. Dies könnte z. B. durch die Bestimmung der Expression typischer Gewebemarker auf genetischer wie auch auf Proteinebene und/oder enzymatischer Funktionen erreicht werden. Auf diese Weise wird eine Datenbank entstehen, in der optimale *in vitro*-Sauerstoffkonzentrationen gesammelt werden, was zu einem Sauerstoff-Fingerprint für jeden einzelnen Zell- bzw. Gewebetyp führt (**Abb. 3**). ■

Literatur

- [1] Keeley TP, Mann GE (2019) Defining Physiological Normoxia for Improved Translation of Cell Physiology to Animal Models and Humans. *Physiol Rev* 99: 161–234
 [2] Timpano S, Guild BD, Specker EJ et al. (2019) Physioxic human cell culture improves viability, metabolism, and mito-

chondrial morphology while reducing DNA damage. *FASEB J* 33: 5716–5728

- [3] Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A et al. (2011) Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* 15: 1239–1253
 [4] Leary TS, Klinck JR, Hayman G et al. (2002) Measurement of liver tissue oxygenation after orthotopic liver transplantation using a multiparameter sensor. A pilot study. *Anaesthesia* 57: 1128–1133
 [5] Rivera BK, Naidu SK, Subramanian K et al. (2014) Real-time, *in vivo* determination of dynamic changes in lung and heart tissue oxygenation using EPR oximetry. *Adv Exp Med Biol* 812: 81–86
 [6] Dmitriev RI, Papkovsky DB (2012) Optical probes and techniques for O₂ measurement in live cells and tissue. *Cell Mol Life Sci* 69: 2025–2039
 [7] Giselbrecht S, Gietzelt T, Gottwald E et al. (2006) 3D tissue culture substrates produced by microthermoforming of pre-processed polymer films. *Biomed Microdevices* 8: 191–199
 [8] Gottwald E, Giselbrecht S, Augspurger C et al. (2007) A chip-based platform for the *in vitro* generation of tissues in three-dimensional organization. *Lab Chip* 7: 777–785
 [9] Grün C, Pfeifer J, Liebsch G et al. (2023) O₂-sensitive microcavity arrays: A new platform for oxygen measurements in 3D cell cultures. *Front Bioeng Biotechnol* 11: 1111316

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Eric Gottwald
 AG 3D-Zellkultursysteme
 Abt. Bioprozesstechnik und Biosysteme
 Institut für Funktionelle Grenzflächen
 Karlsruher Institut für Technologie
 Hermann-von-Helmholtz-Platz 1
 D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen
eric.gottwald@kit.edu

AUTOREN



Eric Gottwald

1985–1995 Biologiestudium mit Promotion im Bereich Biochemische Pharmakologie, Universität Köln. 1996–1999 PostDoc am Institut für Pharmakologie des Karlsruher Instituts für Technologie. 2000 AG-Leiter 3D-Zellkulturen. 2012 Habilitation im Bereich Technische Biologie. Seit 2014 außerplanmäßiger Professor für Technische Biologie am Institut für Funktionelle Grenzflächen des KIT.



Christoph Grün

2012–2017 Studium Chemische Biologie. 2017–2019 Wiss. Mitarbeiter in einem Ausgründungsprojekt des KIT. 2019–2020 Patent- und Innovationsschutz-Manager, Fernstudium Universität des Saarlandes, Saarbrücken und Universität Koblenz-Landau. 2020–2023 Promotion zum Thema Sauerstoff-sensitive Mikrokavitätenarrays und seit 7/2023 PostDoc in der AG von Prof. Dr. Gottwald.



Gregor Liebsch

1991–1997 Chemiestudium, Regensburg. 2000 Promotion in Analytischer Chemie anschließend PostDoc. 2002–2010 Entwicklungsleitung Biocam GmbH. Seit 2010 Head of R&D Imaging Solutions, PreSens GmbH: Fluoreszenz-optische Sensorik und Bildgebung für die LifeSciences/Biotech für Monitoring des Energiemetabolismus an der Schnittstelle Forschung, Entwicklung und Vertrieb von Innovationen.