

Konzeption und Implementierung einer automatisierten Prozessführung und -überwachung in Bioreaktoren am Beispiel der Kultivierung von humanen Stammzellen

Michael M. Gepp¹, Roman Ruff¹, Paul Woll^{1,2}, Gizem Aydogan^{1,2}, Dmitry Amelin¹, Thorsten Knoll¹, Heiko Zimmermann^{1,2}, Sylvia Wagner¹, Thomas Velten¹

¹ *Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik – IBMT, Joseph-von-Fraunhofer-Weg 1, 66280 Sulzbach/Saar*

² *Universität des Saarlandes, Molekulare und Zelluläre Biotechnologie/Nanotechnologie, Campus, 66123 Saarbrücken*

Zusammenfassung

Die Kultivierung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (hiPSCs) für In-vitro-Testsysteme erfordert eine präzise Prozessführung, da Schwankungen bei Nährstoffen, Temperatur und mechanischen Einflüssen die Zellqualität stark beeinflussen. Im miniaturisierten Maßstab führen manuelle Eingriffe, diskontinuierliche Analytik und fehlende Online-Überwachung zu hoher Chargenvariabilität. In dieser Arbeit soll die biologischen Hintergründe und Anforderungen für ein integriertes Konzept zur Sensorisierung, Prozessüberwachung und teilweisen Automatisierung von Mini-Bioreaktoren für die hiPSC-Kultivierung dargestellt und Ansätze zur Umsetzung vorgestellt werden.

Im Fokus stehen die perfusionsbasierte Kultivierung von hiPSC-Sphäroiden, die Erfassung metabolischer und physikalischer Prozessparameter sowie eine automatisierte morphologische Qualitätsbewertung durch bildbasierte Analytik und Machine-Learning-Methoden. Erste Ergebnisse zeigen, dass ein manuell durchgeführte Medienwechsel zur Simulation einer Perfusion stabilere Kulturbedingungen ermöglichen und die metabolische Prozessführung verbessern. Gleichzeitig beeinflussen geringfügige Änderungen am System das Zellverhalten, weshalb zellbiologische Experimente frühzeitig in den Implementierungsprozess integriert werden sollten.

Keywords: Bioreaktoren, Zellkultivierung, Zellkulturautomatisierung, Biosensorik

Biologischer Hintergrund

Humane induzierte pluripotente Stammzellen haben sich seit ihrer Entdeckung [1] in den letzten Jahren als zentrale Modellplattform für Disease Modeling, Wirkstoffscreenings und regenerative Medizin etabliert [2]. Ihr großes Potenzial, z.B. In-vitro-Zellmodelle für Herzmuskelgewebe künstlich im Labor zu züchten [3], geht jedoch mit hohen Anforderungen an die Prozessführung einher: Geringfügige Abweichungen bei Nährstoffverfügbarkeit, pH-Wert, Temperatur oder mechanischer Belastung können Wachstum, Viabilität und Pluripotenz maßgeblich beeinflussen. In der klassischen 2D-Kultur werden diese Schwankungen meist durch einmal täglich durchgeführte manuelle Mediumwechsel kompensiert, was jedoch zu abrupten Konzentrationsänderungen und einer eingeschränkten Prozesskontrolle führt. Miniaturisierte Bioreaktorsysteme hingegen bieten die Möglichkeit, 3D-Sphäroidkulturen unter definierten und

skalierbaren Bedingungen zu etablieren sowie Zellen zu expandieren und zu differenzieren [4]. Der Medienwechsel erfolgt hier in vielen Forschungslaboren noch immer analog zur 2D-Kultur über manuelle Wechsel. Insbesondere die Perfusionskultur erlaubt perspektivisch einen kontinuierlichen Mediumswechsel und damit stabilere Kulturbedingungen, die einen direkten Effekt auf z.B. Proliferation oder Differenzierung der Zellen haben [5]. Eine Übersicht der externen Einflüsse auf hiPSCs ist in Abbildung 1 dargestellt. Der volle Nutzen dieser Systeme wird jedoch erst durch geeignete Sensorik und automatisierte Datenauswertung erschlossen [6]. Neben der klassischen Sensorik (z.B. biochemische Sensoren für Glukose) werden für Zellsysteme wie hiPSCs zunehmend Methoden der künstlichen Intelligenz übertragen bzw. angewendet [7]. Hierfür werden insbesondere qualitativ hochwertige und annotierte Datensätze benötigt, um Modelle zu trainieren, die dann z.B. für die Klassifizierung von Zellzuständen

eingesetzt werden können. Die Modifikation bestehender Bioreaktorsysteme durch zusätzliche Funktionalitäten stellt dabei stets eine Herausforderung dar.

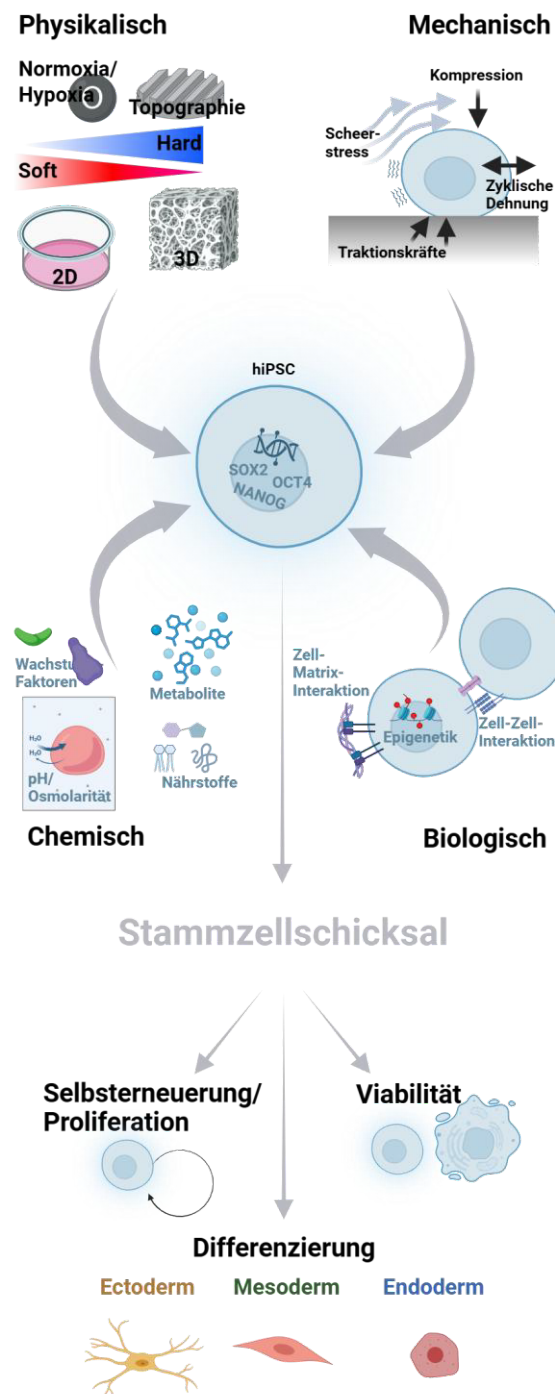


Abb. 1: Biologischer Hintergrund: Beeinflussung des Schicksals der Stammzellen durch externe Stimuli, Kultivierungsbedingungen und Umgebungseigenschaften. Graphik erstellt mit Biorender.com

Vor diesem Hintergrund adressiert die vorliegende Arbeit die Frage, wie Sensorisierung und

datenbasierte Prozessüberwachung in Mini-Bioreaktoren konkret umgesetzt und für die Kultivierung von hiPSCs nutzbar gemacht werden können.

Anforderungsprofil

Das Anforderungsprofil (vereinfachte Darstellung) eines (miniaturisierten) Bioreaktors adressiert zentrale biologische und prozesstechnische Randbedingungen kultivierter Zellsysteme. Zur Minimierung schädlicher Scherkräfte werden rotierende Reaktionsgefäße mit integrierten Strombrechern eingesetzt. Eine konstante Kultivierungstemperatur von 37°C wird durch einen temperaturkontrollierten Inkubationsraum in Kombination mit einer variablen Perfusionsrate sichergestellt. Die Stabilisierung des pH-Werts im Zellkulturmedium erfolgt über Puffersubstanzen und eine einstellbare CO₂-Konzentration im Inkubationsraum sowie eine kontinuierliche Perfusion zum Abtransport metabolischer Säuren wie Laktat. Für die Sterilisierbarkeit des Systems kommen biokompatible, autoklavierbare Materialien zum Einsatz, die bevorzugt additiv gefertigt werden.

Implementierung

Miniaturisierter Bioreaktor und Perfusion

Als Kultivierungssystem wurde ein miniaturisierter Suspensionsbioreaktor (Basis: OMNI-Life Science GmbH & Co.KG, Bremen; CERO-Bioreaktorsystem) eingesetzt, der Reaktorgefäße mit einem Arbeitsvolumen von bis zu 50 ml aufnimmt. Diese Bioreaktoren ermöglichen sowohl die Skalierung von Prozessen als auch das Screening verschiedener Bedingungen durch parallele Nutzung.

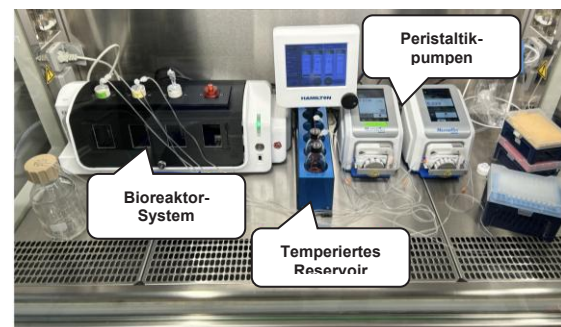


Abb. 2: Aufbau des modifizierten Bioreaktorsystems mitsamt Fluidik unter einer Sterilbank.

Zur Realisierung einer kontinuierlichen Perfusion wurde das Bioreaktorsystem durch einen 3D-gedruckten Deckel sowie modulare Fluidik-Einsätze erweitert. Die Einsätze erlauben es, Zu- und Abflüsse des Kulturmediums

voneinander zu trennen und sind zudem so gestaltet, dass sie mit zusätzlichen Sensoren ausgestattet werden können (siehe Abbildung 2).

Zellkultur, Prozessführung und Sterilität

Die Stammzellen (hiPSCs-Linie UKKi011-A, ebisc.org/UKKi011-A) wurden für die Experimente entweder als 2D-Monolayer oder als Sphäroide in mTeSR1-Medium (STEMCELL Technologies, Vancouver) kultiviert (siehe hierzu auch [4]). Für die Sphäroidkultur wurden Einzelzellen mit definierten Inokulationsdichten in den Bioreaktor eingebracht. Die Kultivierung erfolgte unter kontinuierlicher Rotation, initialer Zugabe von Apoptose-Inhibitoren (ROCK-Inhibitor) und anschließend entweder mit diskontinuierlichem mehrfachem Mediumwechsel oder perfusionsbasierter Prozessführung. Die Sterilität der Komponenten wurde durch sterile Verbrauchsmaterialien, eine nachträgliche Sterilisation durch Autoklavieren oder Ethanolbehandlung sichergestellt. Darüber hinaus wurde der modifizierte Bioreaktor in einer Sicherheitswerkbank aufgebaut, um das Risiko einer Kontamination während der Kultivierung zu minimieren. Die Implementierung eines Perfusionsystems erfolgte über Peristaltikpumpen (Masterflex Ismatec, Gelsenkirchen) mit definierten Flussraten im Bereich von $\leq 0,2$ ml pro min. Das Kulturmedium wurde aufgrund der Wachstumsfaktoren in einem Metallblock gekühlt (KK4TBE Kühlgerät, Labortechnik Medingen, Arnsdorf). Schlauchmaterialien und Innendurchmesser wurden hinsichtlich Autoklavierbarkeit, Totvolumen und Langzeitstabilität systematisch evaluiert.

Prozessüberwachung und Analytik

Die Prozesscharakterisierung umfasste Temperaturmessungen zur Bestimmung der Wärmeübertragung im modifizierten Bioreaktor sowie zur Abschätzung maximal zulässiger Perfusionsraten. Die metabolische Analytik (Glukose, Laktat) erfolgte mittels Offline-Referenzmessungen sowie einer explorativen morphologischen Analyse von Sphäroiden (Größe, Rundheit, Kompaktheit) durch automatisierte Bildauswertung. Die Pluripotenzbewertung erfolgte durch qPCR, Durchflusszytometrie sowie ergänzend durch Lebendzellfärbungen. Ebenso wurden bildbasierte Datensätze für das Training von Machine-Learning-Modellen (CNNs) erzeugt, um morphologische Merkmale automatisiert mit dem Pluripotenzstatus zu korrelieren.

Ergebnisse und Diskussion

Charakterisierung des perfusionsfähigen Mini-Bioreaktors

Das modifizierte Bioreaktorsystem besitzt einen 3D-gedruckten Deckel, der die fluidischen Komponenten mit den vier Bioreaktorgefäßen verbindet. Um eine sterile Prozessführung zu gewährleisten und das Kontaminationsrisiko zu minimieren, befindet sich der gesamte Perfusionsaufbau in einer Sterilbank unter laminarer Luftströmung. Durch die Modifikation des Systems zeigte sich anhand der Zellzahlen, dass die Reproduzierbarkeit zwar mit dem Referenzsystem vergleichbar ist, jedoch insgesamt eine reduzierte Zellzahl erzielt wird (siehe Abbildung 3). Temperaturmessungen zeigten, dass bei geeigneten Flussraten eine konstante Kulturtemperatur (> 36 °C) aufrechterhalten werden kann, obwohl das zugeführte Medium gekühlt gelagert wird. Die Durchmischung im Reaktorgefäß entsprach bei Rotation weitgehend dem theoretisch erwarteten Verhalten, während ohne Rotation Hinweise auf einen fluidischen Kurzschluss beobachtet wurden.

Die Anpassung des Mini-Bioreaktors ermöglichte in einigen Durchläufen eine stabile Perfusionskultur über mehrere Tage. In anderen Fällen traten jedoch Schwierigkeiten bei der gleichmäßigen Zufuhr und Abfuhr des Mediums auf, die in der Konsequenz ein Redesign von manchen Komponenten erfordert.

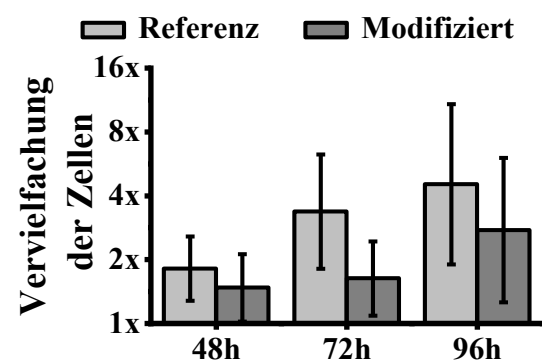


Abb. 3: Veränderung der Zellzahl dargestellt als Vervielfachung gegenüber 24 h mit ($n=3$) und ohne ($n=4$) fluidischem Einsatz. Es sind Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

Analyse von Metaboliten und Morphologie

Sowohl in 2D- als auch in 3D-Kulturen zeigte sich, dass ein kontinuierlicher bzw. häufigerer Mediumwechsel (manuell) zu einem erhöhten kumulierten Glukoseverbrauch und einer stabileren Laktatentwicklung führt. In 3D-Sphäroidkulturen kam es ohne regelmäßigen Mediumwechsel zu einem frühzeitigen Abfall der Wachstumsrate und teilweise zu negativen Wachstumsraten, insbesondere bei hohen Inokulationsdichten. Diese Effekte konnten durch

einen mehrfach durchgeführten manuellen Medienwechsel deutlich abgeschwächt werden. Abbildung 4 zeigt exemplarisch die Korrelation von Zellzahlentwicklung, Glukosekonzentration mit und ohne Medienwechsel.

Die Offline-Analyse der Glukose- und Laktatverläufe zeigte dabei eine Korrelation mit der Zellzahl, insbesondere bei höheren Inokulationsdichten. Allerdings war die Vorhersagekraft einzelner Metaboliten für z.B. einen Softsensor limitiert, was auf die Notwendigkeit multivariater Modelle hinweist. Erfolgt kein Medienwechsel, stagniert die Zellzahl bereits nach 48 h.

Die morphologische Analyse ergab, dass pluripotente Sphäroide eine hohe Rundheit, homogene Textur und begrenzte Größenverteilung aufweisen. Differenzierte oder gestresste Kulturen zeigten hingegen unregelmäßige Formen und erhöhte Variabilität. Machine-Learning-Modelle konnten diese Unterschiede in ersten Ansätzen zuverlässig klassifizieren und zeigten eine gute Übereinstimmung mit etablierten biologischen Endpunktanalysen.

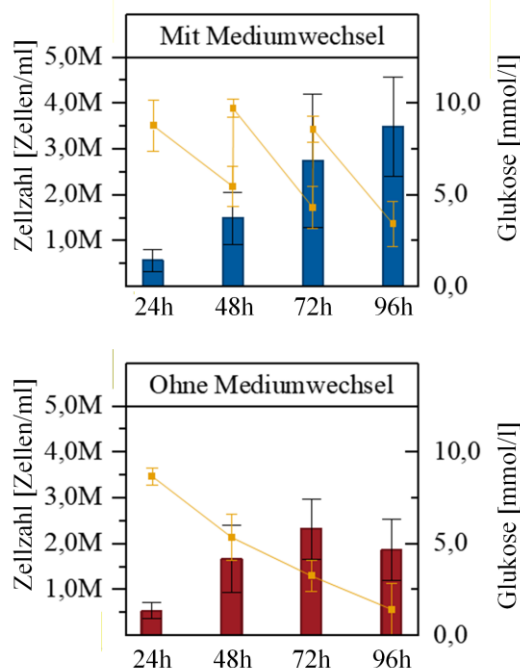


Abb. 4: Expansion in Suspensionsbioreaktoren von hiPSC bei Inokulation von 750.000 Zellen/ml und Verlauf der Glukosekonzentrationen mit und ohne Medienwechsel.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass miniaturisierte Bioreaktoren ein hohes Potenzial für die standardisierte hiPSC-Kultivierung besitzen, dieses jedoch maßgeblich von der verfügbaren Prozessüberwachung abhängt. Die Perfusionsskultur reduziert diskontinuierliche Schwankungen, ersetzt jedoch keine aktive Prozesskontrolle. Metabolische Parameter wie Glukose und

Laktat eignen sich als globale Indikatoren des Kulturzustands, sind aber allein nicht ausreichend, um komplexe Qualitätsmerkmale wie Pluripotenz zuverlässig abzubilden. Die Kombination aus metabolischer Analytik, physikalischer Sensorik und automatisierter Bildauswertung stellt daher einen vielversprechenden Ansatz dar. Insbesondere KI-gestützte Methoden bieten die Möglichkeit, subtile morphologische Veränderungen frühzeitig zu erkennen und mit biologischen Qualitätskriterien zu verknüpfen. Es zeigt sich, dass eine solche multimodale Sensorisierung den Übergang von reaktiver zu prädiktiver Prozessführung ermöglichen kann.

Ausblick

Zukünftige Forschungs- und Entwicklungsarbeiten werden die hier vorgestellten Ansätze und Erfahrungen in einem vollständig integrierten System zusammenführen. Dazu zählen robuste In-line- oder At-line-Messungen metabolischer Parameter, die Echtzeit-Auswertung morphologischer Daten sowie deren Kopplung an automatisierte Regelungsstrategien, etwa zur dynamischen Anpassung der Perfusionsrate. Langfristig kann so eine teil- bis vollautomatisierte Plattform entstehen, die eine reproduzierbare, skalierbare und regulatorisch anschlussfähige Kultivierung humaner Stammzellen im Miniaturmaßstab ermöglicht.

Danksagung

Diese Arbeit wurde vom Ministerium für Wirtschaft, Innovation, Digitales und Energie des Saarlandes (MWIDE) und der Fraunhofer-Gesellschaft (Leistungszentrum „Sensor-Intelligenz“) unterstützt.

Literaturnachweis

- [1] K. Takahashi et al., *Cell* 131, 861–872 (2007); doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
- [2] S. Yamanaka, *Cell Stem Cell* 33, 372–381 (2026); doi: 10.1016/j.stem.2026.02.003
- [3] B. Fischer et al., *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 111, 1600–1615 (2023); doi:10.1002/jbm.a.37558
- [4] C. K. Kwok et al., *Reproductive Toxicology* 112, 23–35 (2022); doi:10.1016/j.reprotox.2022.05.007
- [5] C. Kropp et al., *Stem Cells Translational Medicine* 5, 1289–1301 (2016); doi:10.5966/sctm.2015-0385
- [6] S. J. Reyes et al., *Processes* 10, 189 (2022); doi:10.3390/pr10020189
- [7] Q. D. Vo et al., *PLoS ONE* 19, e0302537 (2024); doi: 10.1371/journal.pone.0302537