

Physikalische Chemie 2009: Zellen im Mikrochip

Phillip Kuhn, Petra S. Dittrich

Mit mikrofluidischen Plattformen lassen sich Veränderungen an einzelnen Zellen durch externe Einflüsse oder Zell-Zell-Kommunikation untersuchen. Das gewonnene Wissen wird nicht nur unser Verständnis für biologische Abläufe in lebenden Organismen erweitern, sondern kann auch helfen, Krankheiten besser zu verstehen und Medikamente zu entwickeln.

◆ Unser Wissen über Zellen ist zu meist das Ergebnis von Messungen an großen Zellpopulationen. In diesen ist es schwierig, die Eigenschaften der direkten Umgebung der Zellen genau zu kontrollieren, ebenso wie räumlich und zeitlich variierende Stimuli einzustellen. Zeitliche Heterogenitäten und Unterschiede innerhalb der Zellpopulation bleiben versteckt. Cytometrische Verfahren ermöglichen zwar die Analyse einzelner Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt, eine längere Beobachtung ist allerdings nicht möglich. Die Individualität von Zellen spielt aber eine wichtige Rolle in der Natur, beispielsweise bei der An-

passung von Zellen an unterschiedliche Umgebungen oder bei evolutionen Prozessen.

Durch die Analyse einzelner Zellen lassen sich wichtige Mechanismen biochemischer Prozesse in einer Zelle aufklären. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von Proteinen in einer Zelle nicht kontinuierlich ist, sondern überraschenderweise zeitlich gehäuft auftritt.¹⁾ Einzelzellmethoden sind hilfreich in biotechnischen und pharmazeutischen Anwendungen, etwa bei der Medikamentenentwicklung und bei der Bestimmung von Toxizitäten.^{2,3)}

Werkzeuge für Einzelzelluntersuchungen

◆ Warum ist es schwierig, die Funktionsweise lebender Zellen zu untersuchen und zu verstehen? Eine Ursache dafür ist die Komplexität zellulärer Prozesse. In Zellen laufen viele Reaktionen parallel ab, die sich gegenseitig beeinflussen.

Weiterhin reagieren Zellen sehr sensibel auf Änderungen in ihrer näheren Umgebung, beispielsweise auf Temperaturschwankungen, Veränderungen des Mediums (etwa des pH-Werts), Beschaffenheit der Oberfläche, chemische und mechanische Einflüsse (Abbildung 1). In

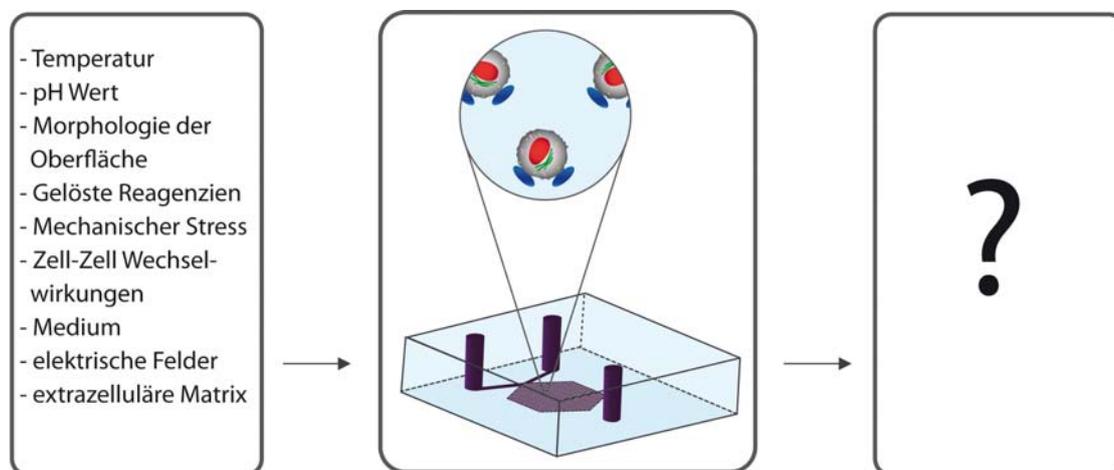


Abb. 1. Mikrofluidische Chips als Plattformen, um einzelne, lebende Zellen zu untersuchen: Veränderungen externer Parameter (links) beeinflussen die zellulären Abläufe, die auf dem Mikrochips detektiert werden.

ihrer natürlichen Umgebung interagieren sie mit der extrazellulären Matrix, mit benachbarten Zellen und mit Botenstoffen aus anderen Zellen. Wenn wir solche Einflüsse untersuchen möchten, müssen wir die Voraussetzungen schaffen, sie gezielt zu variieren, während die anderen Parameter konstant bleiben. Mikrostrukturierte Plattformen haben sich dabei als ausgesprochen geeignet erwiesen, da mit ihnen sowohl die Zellen als auch die Flüssigkeiten (Medium, Stimuli etc.) kontrolliert zu handhaben sind.²⁻⁴⁾ Es sind nur extrem geringe Probemengen erforderlich, die Transportwege der Flüssigkeiten sind kurz, Flüssigkeiten lassen sich gezielt zu einem Ort hinführen,⁵⁾ und Arbeitsabläufe lassen sich automatisieren. So entfallen das Pipettieren von Flüssigkeiten und damit verbundene Pipettierfehler.

Die Entwicklung der Chip-Technik

◆ Die Möglichkeiten der Mikrochip-Technik für die Zellanalytik wurden bereits Mitte der 1990er Jahre erkannt. Damals wurden mikrofluidische Systeme entwickelt, um in Puffer suspendierte oder adhärenente Zellen zu untersuchen. Nach einer euphorischen und explorativen Anfangsphase zeigten sich aber auch die Schwierigkeiten: In kleinen Mikrokanälen und Mikrokanälern ist die Beschaffenheit der Oberfläche entscheidend, der Austausch des Mediums ist sicherzustellen, wobei die Flussraten bei der Zufuhr von Flüssigkeiten sehr gering sein müssen, um die Zellen keinen großen Scherkräften aussetzen.

Ein Meilenstein war die Etablierung einfacher Herstellungsverfahren von Mikrochips: Die Abformung elastischer Polymere von kommerziell erhältlichen, photolithographisch hergestellten Abgussformen (Soft Lithographie)⁶⁾ ist in vielen Forschungslaboren mittlerweile Routine. Damit sind mikrofluidische Chips nicht mehr spezielle Anfertigungen von Exper-

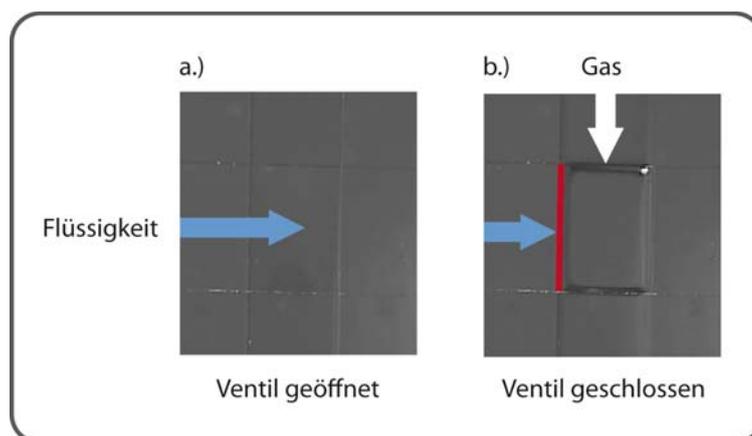


Abb. 2. Pneumatisches Ventil in einem Mikrofluidik-Kanal aus einer flexiblen Membran, die durch einen Gasstrom den Kanal verschließt: a) offen, b) geschlossen. So lassen sich Flüssigkeitsmengen von pL bis nL lenken. (Skalierung: 100 μm)

ten der Mikrosystemtechnik, sondern vielen Anwendern zugänglich. Als Polymer ist besonders Polydimethylsiloxan (PDMS) zu nennen, das kostengünstig, transparent und gasdurchlässig ist und sich somit gut für die mikroskopische Untersuchung von Zellen eignet.

Um Flüssigkeiten in Mikrokanälen zu lenken, wurden einfache Lösungen entwickelt, die mit dem üblichen planaren Aufbau von Mikrofluidik-Chips kompatibel sind. Ein Beispiel sind pneumatische Ventile (Abbildung 2).⁷⁾ Hier wird eine dünne Membran, etwa aus PDMS, über den mit Flüssigkeit gefüllten Kanal integriert. Eindrücken der Membran mit Druckluft oder durch einen Stickstoffstrom stoppt den Fluss im Kanal. Die Ventile haben kein Totvolumen, kurze Ansteuerungszeiten im 100-ms-Bereich und ermöglichen damit die zeitliche definierte Zufuhr von Stimuli, beispielsweise in Form eines kurzen Pulses. Außerdem lassen sich durch zwei Ventile hintereinander kleine Reaktionskammern erzeugen, die Zellen einschließen oder mit denen sich Flüssigkeiten abmessen lassen.

Immobilisieren

◆ Zentrale Bedeutung hat der Mikrochip für die Immobilisierung und den Einschluss separierter Zellen. Neben den nicht-invasiven

Methoden wie optische Fallen im fokussierten Laserlicht oder dielektrophoretische Zellfallen sind Techniken zum strukturierten Beschichten der Oberflächen (z. B. Stempel, micro contact printing) verfügbar, so dass Zellen direkt und räumlich definiert an der Oberfläche anbinden und immobilisiert werden können. Cytophile Substanzen, die die Zelladhäsion fördern, wie Fibronectin oder Polylysin, werden dabei ebenso eingesetzt wie cytophobe Substanzen, wie Polyethylenglycol (PEG) oder das Protein Rinderserumalbumin (BSA). Eine elegante Methode, so-



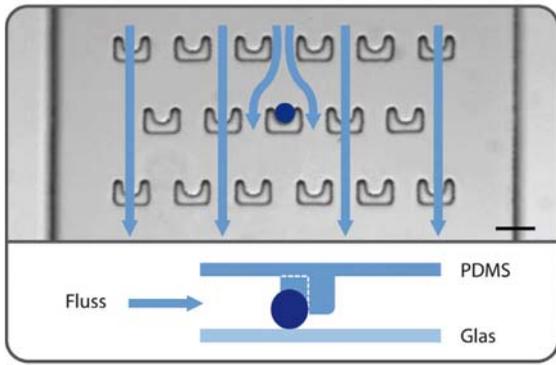


Abb. 3. Zellfallen im Mikrokanal. Unten: Um die Fallen durch Einleiten einer Zellsuspension automatisch zu beladen, dürfen die Zellfallen nicht die gesamte Höhe des Kanals einnehmen. In dieser Geometrie kann die Flüssigkeit (Puffer oder Zellmedium) unterhalb einer unbesetzten Zellfalle fließen. Sobald eine Zelle festgehalten wird, umströmt die nachfolgende Flüssigkeit die besetzte Falle.⁸⁾ (Skalierung: 25 μm)

wohl adhären, aber auch nicht-adhären, sind kleine, im Mikrokanal integrierte Hürden (Abbildung 3), deren Größe und Geometrie die Zahl der festgehaltenen Zellen bestimmt.⁸⁾ Nach dem Einleiten der Zellsuspension werden die Zellfallen automatisch innerhalb weniger Sekunden einheitlich besetzt. Das Design legt den Abstand der Zellfallen genau fest, so ist der Zell-Zell-Abstand genau kontrolliert.

Vielversprechend ist auch der neue Ansatz, einzelne Zellen in der wässrigen Phase einer Emulsion einzuschließen. Die Isolierung der Zellen in die wässrigen Tropfen (in Mikrokultivierungskammern) erfolgt auf dem mikrofluidischen Chip mit hoher Homogenität der Tropfengröße und des Tröpfcheninhalts. Das Volumen der Tropfen ist von circa 100 pL bis einigen 100 nL wählbar, die Analyse der Tropfen kann ähnlich wie in der Cytometrie, nacheinander erfolgen und mit einem Modul zur Zell- und Tröpfchensortierung verbunden werden.⁹⁾

Analysieren

◆ Eine weitere Herausforderung ist es, analytische Instrumente und aussagekräftige Ausleseparameter zu entwickeln. Die Ansprüche an die Messinstrumente sind extrem hoch, da einzelne Zellen ein geringes Volumen aufweisen (1 bis 2 fL für eine Bakterienzelle, > 50 fL für eukaryontische Zellen) und die Analyten in geringen Konzentrationen oder in geringer absoluter Menge enthalten sind.

Während für Methoden zur chemischen Analyse (z. B. Elektro-

rese, Massenspektrometrie) die Zellen lysiert werden,¹⁰⁾ sind optische Methoden zumeist zerstörungsfrei, so dass Zellen über einen langen Zeitraum zu beobachten sind. Insbesondere die Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht spezifische Aussagen, da sich die Fluorophore an bestimmte Zielmoleküle auch im Cytosol anbinden lassen. Durch molekulargenetische Methoden kann erreicht werden, dass fluoreszierende Proteine wie das grün fluoreszierende Protein (GFP) an andere Zielproteine angebunden werden. Fluoreszenzspektroskopische Methoden eignen sich deshalb vor allem zur Analyse der Proteinexpression.

Häufig werden auch Reaktionsfolgen verwendet, in denen durch enzymatische Reaktion ein Fluorophor entsteht, der innerhalb der Zelle nachgewiesen wird oder aus der Zelle transportiert wird und damit Fluoreszenz in der direkten Zellumgebung sichtbar macht.^{1,9,11)} Beim aktuellen Beispiel in Abbildung 4 wird ein Mikrochip mit einer dielektrophoretischen Falle eingesetzt, um einzelne oder wenige Hefezellen festzuhalten, die das GFP exprimieren und aus der Zelle transportieren. Direkt hinter der Hefezelle wird das Fluoreszenzsignal mit konfokaler Laserspektroskopie aufgenommen. Dieser experimentelle Aufbau ist extrem empfindlich – ein sehr hohes Signal deutet an, dass ein einzelnes Fluorophor (hier GFP) den Laserstrahl passiert hat.

Diese Kombination von Einzelzellmethoden mit Fluoreszenz-Einzelmolekülspektroskopie liefert Informationen, die es zukünftig sogar ermöglichen könnten, den zeitlichen Verlauf der Entstehung und des Transports einzelner Proteine in Echtzeit zu verfolgen.

Neue Ansätze, in denen die Mikrochip-Technik mit verschiedenen analytischen Methoden integriert wird,¹²⁾ werden sicherlich bald dazu beitragen, ein vollständiges Bild zu erhalten über Reaktionsschritte, die miteinander verbunden sind und sich gegenseitig beeinflussen.

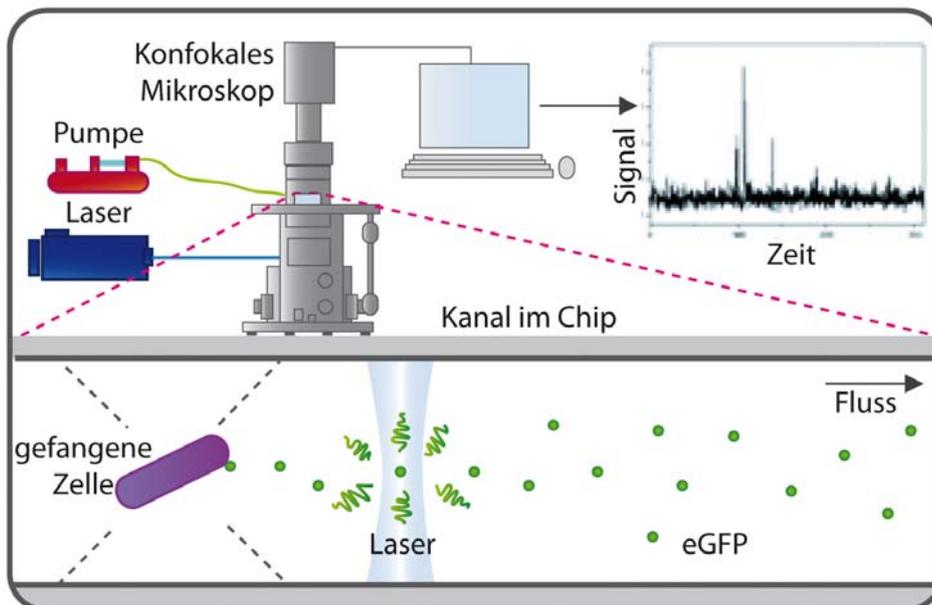


Abb. 4. Vollständiger Aufbau für eine Zellanalyse, hier Mikrochip-Technik, kombiniert mit konfokaler Fluoreszenzspektroskopie als Detektionssystem: Im Mikrokanal wird eine Zelle festgehalten (angedeutet ist eine elektrophoretische Falle), und die Zelle sondert ein fluoreszierendes Protein (eGFP) ab. Beim Durchtritt durch den fokussierten Laserstrahl wird das eGFP detektiert.¹¹⁾

Fazit

◆ Um einzelne Zellen über einen längeren Zeitraum zu beobachten und gleichzeitig kontrollierbaren, zeitlich und räumlich definierten Veränderungen auszusetzen, müssen sowohl die technischen Voraussetzungen geschaffen sein als auch die analytischen Methoden zur Verfügung stehen. Die Manipulation, also die Trennung, Immobilisierung und Kultivierung, wird erst durch mikrostrukturierte Plattformen möglich. Mikrochips dienen dabei nicht nur zur Miniaturisierung bekannter Methoden, sondern eröffnen die Möglichkeit, neuartige Methoden zu entwickeln.

Die bisherigen Fortschritte gibt es vor allem in der akademischen Forschung – für jede Anwendung und für jeden Zelltyp sind Mikrochips neu zu entwickeln und zu

optimieren. Dies erfordert die Zusammenarbeit von Biologen, Physikern, Chemikern und Ingenieuren.

Petra S. Dittrich, Jahrgang 1974, ist seit dem Jahr 2008 Assistenzprofessorin für Bioanalytik im Department für Chemie und Angewandte Biowissenschaften der ETH



Zürich. Der Fokus ihrer Forschung ist die Entwicklung von Mikrochips für chemische, biologische und pharmazeutische Fragen. Sie erhielt einen Starting Grant des Europäischen Forschungsrats (µ-LIPIDS) zur Untersuchung und Manipulation von Lipidmembran-Strukturen auf mikro- und nanofluidischen Chips.

Phillip Kuhn, Jahrgang 1982, studierte Mikrosystemtechnik an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg und promoviert seit 2009 in der Gruppe von Petra Dittrich an der ETH Zürich. In seiner Forschung beschäftigt er sich unter anderem mit der Fabrikation von mikrofluidischen Chips zur Einzelzellanalyse.

**Literatur**

- 1) L. Cai, N. Friedman, X. S. Xie, *Nature* 2006, 440, 358.
- 2) A. Schmid, H. Kortmann, P. S. Dittrich, M. B. Lars, *Curr. Op. Biotechnology* 2010, im Druck.
- 3) P. S. Dittrich, A. Manz, *Nature Rev. Drug Disc.* 2006, 5, 210.
- 4) M. R. Bennett, J. Hasty, *Nat. Rev. Gen.* 2009, 10, 628.
- 5) F. Kurth, C. A. Schumann, L. M. Blank, A. Schmid, A. Manz, P. S. Dittrich, *J. Chromatogr. A*, 2008, 1206, 77.
- 6) Y. Xia, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* 1998, 110, 568.
- 7) M. A. Unger, H. P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, S. R. Quake, *Science* 2000, 288, 113.
- 8) D. D. Carlo, L. Y. Wu, L. P. Lee, *Lab Chip* 2006, 6, 11.
- 9) J.-U. Shim, L. F. Olguin, G. Whyte, D. Scott, A. Babbie, C. Abell, W. T. S. Huck, F. Hoffelder, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 15251.
- 10) L. M. Borland, S. Kottegoda, K. S. Phillips, N. L. Allbritton, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2008, 1, 191.
- 11) H. Kortmann, F. Kurth, L. M. Blank, P. S. Dittrich, A. Schmid, *Lab Chip* 2009, 9, 3047.
- 12) L. M. Fidalgo, G. Whyte, B. T. Ruotolo, J. L. Benesch, F. Stengel, C. Abell, C. V. Robinson, W. T. Huck, *Angew. Chem.* 2009, 121, 3719.



Die Welt ist voll von Halbwissen.

Die modernste Technik nützt nichts, wenn man sie nicht richtig bedienen kann. Besonders im sensiblen beruflichen Umfeld der Chemie ist Halbwissen fehl am Platz. Deshalb arbeiten wir seit 1947 mit Leidenschaft und Akribie daran, dass evaluierte Daten und Fakten rund um das Themenfeld Chemie zur Verfügung stehen. Immer. Und ohne Ausnahme. So wurde „Der RÖMPP“ Synonym für inzwischen über 60.000 Stichwörter und über 200.000 Querverweise, auf die man sich verlassen kann. Das sollten Sie sich am besten selbst anschauen.

Nur 100% sind 100%.
www.roempp.com

Sonderpreis
für GDCh-Mitglieder 139,-€
für stud. Mitglieder 69,-€

www.gdch.de

