

Chip statt Maus: Zellbasierter in-vitro-Sensor für Kometabolisierungs- und Toxizitätstests

Walter Wirths¹, Joachim Wiest² und Bernhard Wolf¹

¹ Technische Universität München, 80333 München, Arcisstraße 21, ² cellasys GmbH F&E, 80335 München, Karlstraße 96

Zusammenfassung

Zellkulturen sind ein wichtiges Instrument sowohl in der Grundlagenforschung als auch bei in-vitro-Toxizitäts- und Wirkstofftests. Bei letzterem Anwendungsfall ist es entscheidend, die Wirkung einer Substanz auf den menschlichen Körper vorherzusagen. Wie ein Stoff auf den Organismus wirkt, wird durch das Zusammenspiel verschiedener Organe bestimmt. Die Nachbildung dieser Interaktion mit verschiedenartigen Zelltypen ist also in vielen Fällen für das Ergebnis relevant.

Zu diesem Zweck wurde das Zellchip-System „IMOLA-IVD“ so erweitert, dass verschiedene Zellkulturen innerhalb einer Messkette in Interaktion treten können. Die Untersuchung der Vitalitätsparameter der Zellen blieb hierbei ungestört.

1 Einleitung

Seit Inkrafttreten der EU-Verordnung REACH (**R**egistration, **E**valuation, **A**uthorisation and **R**estriction of **C**hemicals) ist die chemische Industrie verpflichtet, die Risiken ihrer produzierten Chemikalien sorgfältig zu evaluieren. Experten rechnen deswegen mit einer enormen Zunahme an hierfür benötigter Tierversuche [1]. Diese sind nicht nur ethisch bedenklich sondern verursachen auch hohe Kosten. Zudem ist bekannt, dass sich Ergebnisse aus Tierversuchen nur bedingt auf den Menschen übertragen lassen [2].

Es gibt bereits anerkannte in-vitro-Verfahren, um toxische und mutagene Substanzen zu identifizieren. So sind Zellkulturen in gut dokumentierten Fällen ein geeignetes Modell für die Überprüfung eines Stoffes auf toxische Wirkungen [3]. **Bild 1** zeigt hier beispielhaft, wie die Ansäuerungsrate von 3T3 Fibroblasten¹ durch die Zugabe des toxischen Quecksilberchlorids stark abfällt. Nach Entfernung der Substanz nehmen die Fibroblasten ihre Stoffwechselaktivität wieder auf. Am Ende des Experiments wurde die Zellmembran durch Triton X-100 Gabe aufgelöst. Dies ist im rapiden Abfall der Ansäuerungsrate deutlich zu erkennen [4].

Bei komplizierten Wirkmechanismen ist oftmals eine Vormetabolisierung der zu untersuchenden Substanz notwendig. In solchen Fällen reichen einfache Zellkulturen als Modell nicht aus, da verschiedene Zelltypen beteiligt sind. Aus diesem Grund wurde ein neuartige Messkette entwickelt: Durch die serielle Verknüpfung von Lab-on-Chip-Systemen wurde es möglich, verschiedenartige Zelltypen miteinander interagieren zu lassen. Durch diese Anordnung wird erreicht, dass Stoffe einen ähnlichen Wirkungspfad wie im lebenden Organismus durchlaufen. So kann eine mögliche toxische Wirkung zuverlässiger detektiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Zelllinien

Im Körper ist die Leber ein wichtiges Organ für metabolische Umwandlungsprozesse von extern zugeführten Stoffen. Primäre Hepatozyten (Leberzellen) haben jedoch anspruchsvolle Kulturbedingungen und neigen

1 Immortalisierte Zelllinie, Ursprung: Bindegewebe eines Mausembryos

dazu ihre Funktionalität bereits nach kurzer Zeit einzustellen, wenn sie außerhalb des Körpers kultiviert werden. Darüber hinaus ist ihre Verfügbarkeit limitiert.

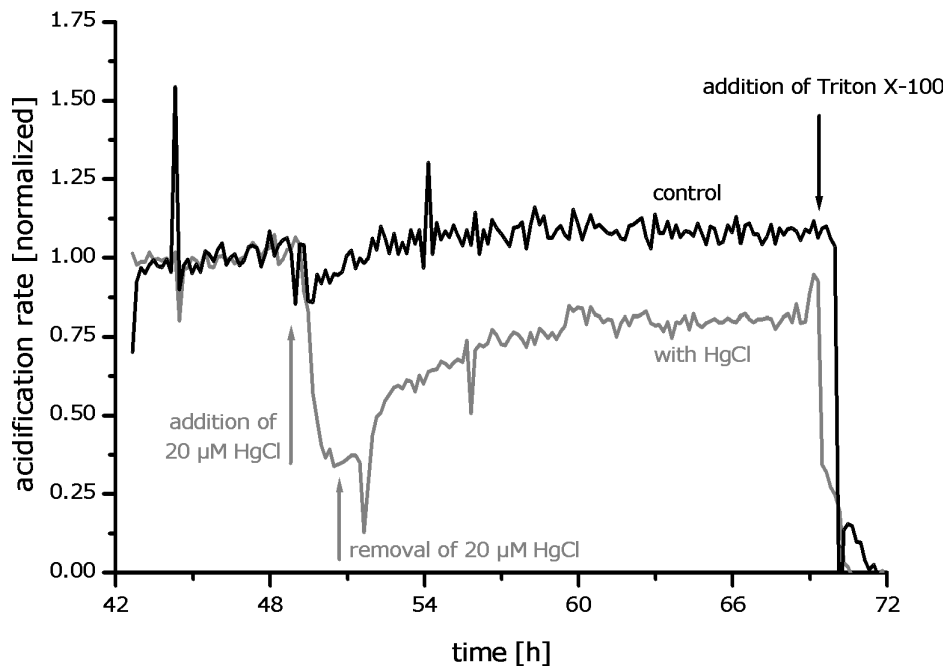


Bild 1 Der toxische Effekt von Quecksilber auf 3T3 Fibroblasten [4]

Aus diesen Gründen wurde evaluiert, ob HepG2-Zellen in der entwickelten Messkette eingesetzt werden können. Die Zelllinie HepG2 ist eine immortalisierte Zelllinie, isoliert aus einem menschlichen hepatozellulären Karzinom (Lebertumor). HepG2 können im Vergleich zu primären Hepatozyten besser in Kultur gehalten werden. Sie zeigen eine bessere Proliferation und besitzen auch in Kultur noch viele der Funktionen, die für normale Hepatozyten typisch sind [5].

Eine weitere Zelllinie die zur Evaluierung des Systems verwendet wurden ist MCF-7². Diese Zellen wurden von uns schon oft im „IMOLA-IVD“ eingesetzt und eigneten sich somit gut als Referenz.

Beide Zelltypen wurden jeweils im Sterillabor angezüchtet. Hierzu wurden die Zellen vorab in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert. Die Vorinkubation der Biochips erfolgte mit 50.000 Zellen in 350 µl DMEM über 24 Stunden. Anschließend wurden die Biochips versiegelt und in den Versuchsinkubator gebracht.

2.2 Zellchip-Systeme

Zellchip-Systeme bieten die Möglichkeit, die Wirkung biologisch aktiver Substanzen auf eine Zellkultur zu detektieren. Die Veränderung von Zellatmung, extra-zellulärer Ansäuerung sowie der Zellmorphologie eignen sich als Überwachungsparameter.

Als Zellchip-System für die folgenden Untersuchungen wurde das „IMOLA-IVD“ der Firma cellasys GmbH (www.cellasys.com) verwendet. Das System verfügt über elektrochemische pH-, O₂- und Bioimpedanzsensoren, die auf einem austauschbaren Chip untergebracht sind [6]. Die Zellen wachsen direkt auf dem Biochip an und werden über eine geschlossene Fluidik mit Nährstoffen versorgt. Stoffwechselaktivität und Zellatmung können über den pH- und O₂-Sensor überwacht werden. Der Bioimpedanzsensor liefert Informationen über Zelldichte und Morphologie der Zellen und ist somit ein wichtiges Werkzeug im Bereich der Toxizitätsbestimmung. Die Messung der Vitalitätsparameter erfolgt bei diesem System elektrochemisch. Da hierfür keine chemischen Marker benötigt werden, wird die Zellkultur

durch die Messung praktisch nicht beeinträchtigt. Dies erlaubt eine kontinuierliche Überwachung der Zellvitalität in Echtzeit.

2.3 Kopplung von Zellchip-Systemen

Für die Kometabolisierungsexperimente wurden zwei Biochips über die Fluidik seriell verknüpft. **Bild 2** zeigt links den Versuchsaufbau für drei Messketten bestehend aus je zwei IMOLAs. Rechts ist die Verknüpfung zweier IMOLAs schematisch gezeigt. Nähr- und Wirkstoffe passieren zunächst die Zellkultur des ersten Biochips. Nun können während einer Pumppause kometabolische Umwandlungsprozesse stattfinden. Im nächsten Pumpzyklus werden die Stoffe zum zweiten Chip transportiert, um dort eine mögliche cytotoxische Wirkung zu detektieren.

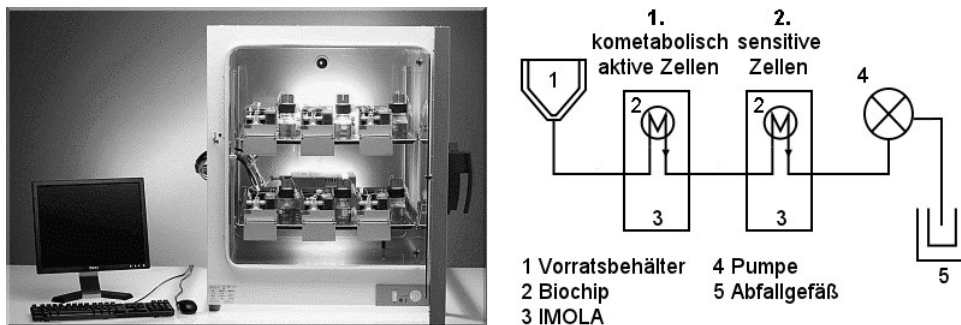


Bild 2 links: 6-fach IMOLA Aufbau im Inkubator
rechts: Verknüpfung zweier IMOLAs

Bei der Evaluierung der Messkette wurde untersucht, ob die Vitalitätssignale der Zellen unabhängig voneinander gemessen werden können. Dazu wurden auf beiden Biochips MCF-7-Zellen inkubiert und die Zellvitalität über mehrere Tage gemessen. Abschließend wurde die Zellmembran durch Zugabe von Natriumlaurylsulfat (analog zu der Triton X-100 Gabe in Bild 1) auf beiden Biochips aufgelöst. Mit dieser Methode kann zuverlässig festgestellt werden, ob die gemessenen Daten plausibel sind oder die Biochips sich gegenseitig beeinflussen.

3 Ergebnisse

3.1 Vitalität der untersuchten Zelllinien

Sowohl HepG2-Zellen als auch MCF-7-Zellen zeigten eine normale Vitalität innerhalb der Messkette. Der Stoffwechsel der MCF-7-Zellen unterschied sich bei verketteten Zellkulturen nicht von den bisherigen Ergebnissen, die mit einzelnen Biochips durchgeführt wurden.

Die HepG2-Zellen zeigten eine geringere Stoffwechselrate als die MCF-7-Zellen und eine stark abweichende Bioimpedanz. Letzteres ist gut durch morphologische Unterschiede zwischen den runden MCF-7-Zellen und den polygonalen, deutlich kleineren HepG2-Zellen erklärbar.

3.2 Unabhängigkeit der gemessenen Vitalitätsparameter

Die Zugabe von Natriumlaurylsulfat macht sich 20 Minuten zeitverzögert zuerst auf Biochip 1, dann auf Biochip 2 bemerkbar. Dies stimmt exakt mit der erforderlichen Zeit überein, die der Wirkstoff benötigt, um vom ersten in den zweiten Biochip zu gelangen. **Bild 3** zeigt den Sauerstoffverbrauch zweier verketteter MCF-7-Zellkulturen. Interferenzen zwischen den Sauerstoffsensoren der beiden Biochips sind nicht zu erkennen. Die gleiche Zeitverzögerung zeigt sich sowohl bei der Ansäuerungsrate als auch bei der Bioimpedanz.

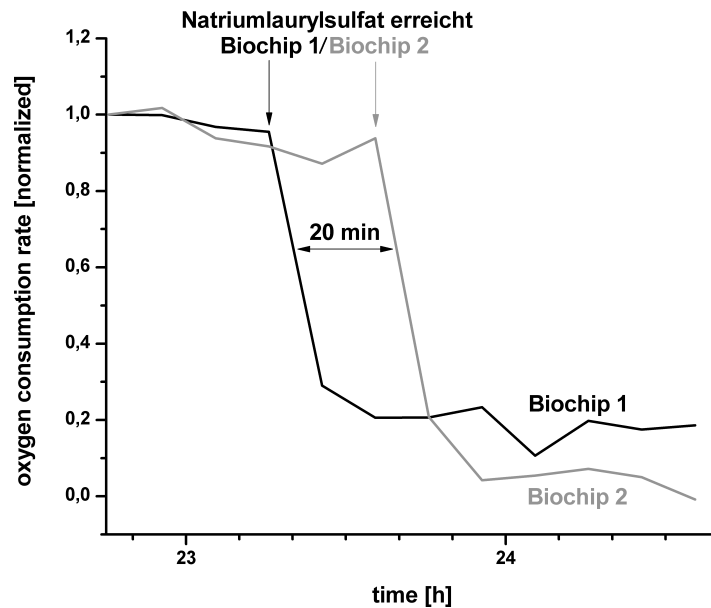


Bild 3 Zeitverzögert erreicht der Wirkstoffe erst Biochip 1 dann Biochip 2

4 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass eine interferenzfreie Messkette bestehend aus IMOLAs aufgebaut werden kann. Nun können auf den unterschiedlichen Kettengliedern toxikologische Experimente mit verschiedenen Zellkulturen durchgeführt werden. Damit sich aus solchen Versuchen zuverlässige Toxizitätstests etablieren können, muss verstärktes Augenmerk auf die ADME³-Prozesse (im Körper) gelegt werden. Mithilfe dieses Wissens können wichtige Parameter der Messkette, wie Wirkstoffkonzentration oder Auswahl geeigneter Zellkulturen zur Vormetabolisierung, bewertet und erprobt werden. Die hieraus gewonnenen Daten sollen in Zukunft dabei helfen, neuartige in-vitro-Systeme für toxikokinetische Analysen bereitzustellen.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei der Heinz-Nixdorf-Stiftung für die finanzielle Unterstützung mit der dieses Projekt ermöglicht wurde.

Literatur

- [1] T. Hartung, C. Rovida, Re-evaluation of animal numbers and costs for in vivo tests to accomplish reach legislation requirements for chemicals transatlantic. Think Tank for Toxicology, 2009.
- [2] C. Exner, H. Bode, K. Blumer, C. Giese, Deutsche Forschungs Gemeinschaft (2004): Tierversuche in der Forschung. Lemmens Verlags- und Mediengesellschaft, 2004: 18.
- [3] B. Wolf, M. Brischwein, H. Grothe, C. Stepper, J. Ressler, T. Weyh: Lab-on-a-chip Systems for Cellular Assays. Urban, G. (Herausgeber) BioMEMS, Springer-Verlag, Dordrecht (NL) 2006, S. 269-308
- [4] J. Wiest, M. Brischwein, A.M. Otto, B. Wolf: Cell based assay for label-free, multiparametric, long-term monitoring of cellular vitality, ALTEX, 2009, 26, 96, ISSN 1868-596X.
- [5] K. I. Mühlenfeld. Untersuchungen zur Biotransformation und Toxizität mit der Hepatomzelllinie Hep G2 im Vergleich zu Primärkulturen der Wistarratte. Doktorarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, 1999.
- [6] J. Wiest, T. Stadthagen, M. Schmidhuber, M. Brischwein, J. Ressler, U. Raeder, H. Grothe, A. Melzer, B. Wolf, Intelligent Mobile Lab for Metabolics in Environmental Monitoring, Analytical Letters, Band 39, Ausgabe 8, Jul 2006, S. 1759-1771.