

Organ-on-Chip-Plattform mit integrierten Mikrosensoren zur Überwachung von Stoffwechselfparametern in 3D Brustkrebsstammzellkulturen

Johannes Dornhof¹, Jochen Kieninger¹, Harshini Muralidharan²,
Jochen Maurer², Gerald A. Urban¹ und Andreas Weltin¹

¹Professur für Sensoren, IMTEK – Institut für Mikrosystemtechnik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg, Deutschland

²Molekulare Gynäkologie, Universitätsklinikum RWTH Aachen, Aachen, Deutschland
Kontakt: weltin@imtek.de

Einleitung

Dreidimensionale (3D) Zellkulturen, beispielsweise in Form von Sphäroiden oder Organoiden, gewinnen in der biomedizinischen Forschung immer mehr an Bedeutung, da Sie das Originalgewebe besser nachbilden, als klassische, zweidimensionale Zellkulturen [1]. Sie eignen sich daher besonders gut als in vitro Modelle, z.B. für die Wirkstoffentwicklung [2]. Werden Organoidkulturen auf, zumeist mikrofluidischen, Chips eingesetzt, spricht man von Organs-on-Chip [3]. Die Verwendung von patienteneigenen Stammzellen erlaubt die in vitro Replikation des Originaltumors des Patienten und eröffnet damit völlig neue Perspektiven für die Wirkstoffforschung und die personalisierte Medizin, z.B. bei der Entwicklung von patientenspezifischen Chemotherapien. Wir haben dafür ein Modell aus Stammzellen (BCSC1) von triple-negativem Brustkrebs, einer besonders aggressiven und therapieresistenten Form von Mammakarzinom, verwendet. Diese Stammzellen bilden, von einer einzelnen Zelle ausgehend, in vitro den Originaltumor der Patientin nach [4]. Des Weiteren stellen diese Stammzellen die „Motoren“ des Tumors dar und haben die Resistenz gegen Chemotherapeutika inne.

Während es zahlreiche rein mikrofluidische Organ-on-Chip Systeme gibt, sind solche Systeme mit integrierten Sensoren noch verhältnismäßig wenig verbreitet [5–10]. Besondere Herausforderungen stellen dabei die dreidimensionale und oft heterogene Verteilung der Zellen in einer 3D-Matrix sowie die oft geringe Zellzahl dar, was den sensorischen Zugang im Vergleich zu 2D-Zellrasen, die auf einer Chipoberfläche wachsen, besonders anspruchsvoll macht [11–12]. Daher sind in 3D-Zellkultursystemen die genauen Kulturbedingungen wie lokale Sauerstoffkonzentration, aber auch der Massentransport von Nähr- und Wirkstoffen oft nicht hinreichend bekannt. Gerade für Tumorzellkulturen, bei denen der lokale Sauerstoffgehalt von größter Bedeutung ist, sowie für die Entwicklung von Dosierung von Wirkstoffen sind diese Randbedingungen jedoch essentiell. Elektrochemische

Sensoren bieten hier die Möglichkeit Stoffwechselparameter und Kulturbedingungen kontinuierlich und in Echtzeit zu erfassen [12–13]. Elektrochemische Sauerstoffsensoren basierend auf Platinmikroelektroden besitzen im Gegensatz zu optischen Sensoren einen definierten Nullpunkt und ein lineares Verhalten über den gesamten Messbereich. Die gleichen Elektroden können durch Modifikation mit den entsprechenden Enzymen in geeigneten Membranen zu Biosensoren für Glucose und Lactat modifiziert werden, wobei das Produkt der enzymatischen Reaktion an der Mikroelektrode gemessen wird. Herausforderungen stellen dabei die Stabilität der Sensoren unter Zellkulturbedingungen über relevante Zeiträume sowie die Anpassung der Empfindlichkeiten für die jeweiligen Messbereiche und geringen Konzentrationen dar [8, 13–14].

Wir haben daher eine mikrofluidische Organ-on-Chip Plattform entwickelt, in der Kulturbedingungen steuerbar sind und Wirkstoffe in kleinsten Volumina zugeführt werden können [10]. Gleichzeitig erlauben integrierte Bio- und Chemosensoren die Überwachung der Zellstoffwechselfparameter Sauerstoff (Zellatmung), Glucose (Energieträger) und Lactat (Produkt des anaeroben Zellstoffwechsels) sowie die Kontrolle der Kulturbedingungen vor Ort, um den Informationsgehalt und die Qualität von biomedizinischen Experimenten an solchen Zellkulturen zu erhöhen.

Methoden und Materialien

Design und Konzept der Organ-on-Chip-Plattform

Das Kernstück der transparenten, gasdichten Plattform stellen zwei Gelkammern für die 3D-Zellkultur sowie drei angrenzende Mikrokanäle für die Medienversorgung dar [Abb. 1A,B]. Die Zellkammern sind jeweils 5 mm lang, 1 mm breit und etwa 280 µm hoch, was einem Volumen von 1,4 µL entspricht. Die Mikrokanäle sind 500 µm breit. Das gesamte System hat ein Volumen von weniger als 10 µL. Damit sich die Zellkammern blasenfrei befüllen lassen und um die Kammern von den Mikrokanälen abzugrenzen, sind

dazwischen spezielle Barrierestrukturen in Form von Stufen und Pfosten integriert [Abb. 1A,B,C]. Diese begrenzen das Hydrogel mittels Kontaktwinkelpinning [Abb. 1C] und ermöglichen so eine weitgehend offene Grenzfläche zwischen Gel und Medium, um den Austausch von Nähr- und Wirkstoffen zu ermöglichen.

Die Sensorelektroden sind auf dem Glaschip am Boden der Mikrofluidik untergebracht und sowohl in den Mikrokanälen als auch unter den Zellkammern angeordnet (Sauerstoffsensoren) [Abb. 1A,B]. Des Weiteren befinden sich die Biosensorelektroden (Glucose, Lactat) sowie Referenz- und Gegenelektroden in den Auslässen der Mikrokanäle.

Die Befüllung des Systems mit der Gelmatrix (Matrigel) mit suspendierten Zellen (BCSC1) für die Zellkultur erfolgt mit handelsüblichen 10 μ L Laborpipetten. Im mikrofluidischen Betrieb mittels Spritzenpumpe wachsen die eingebrachten Einzelzellen im Matrigel dann über Tage hinweg zu miniaturisierten Tumoren heran. Über die zyklische Versorgung mit Medium werden sowohl die Zellen entsprechend versorgt, als auch die kontinuierliche Bestimmung von Stoffwechselraten ermöglicht, wobei etwa alle 30 min frisches Medium zugeführt und dann während weiterer 30 min verbraucht wird.

Fabrikation der Plattform

Die Glaschips als Basis für die Organ-on-Chip Plattform [Abb. 1B] werden in einem Prozess auf Waferebene in einem Reinraum hergestellt. Platin als Metallisierung wird auf einen Borosilicat-Glaswafer aufgedampft und mittels Lift-off Prozess strukturiert. Die Isolation der Leiterbahnen erfolgt über eine Siliziumoxid/-nitridschicht, die mittels Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition (PECVD) aufgebracht wird. Die Elektroden und Kontaktpads werden mittels Reactive Ion Etching (RIE) geöffnet. Die Barrierestrukturen für die Gelkammer sowie die mikrofluidischen Kanäle werden über einen photostrukturierbaren Epoxidlack (SU-8 3000) erzeugt und durch mehrere Belichtungen lithographisch strukturiert. Die Integration der Silber/Silberchlorid Referenzelektroden erfolgt durch galvanische Abscheidung auf Waferebene. Nach der Vereinzelung der Chips wird über einen Flip-Chip-Prozess eine Leiterplatte mit dem Chip verbunden und mit Epoxidkleber verkapselt [Abb. 1D]. Die Elektrodenmodifikation für die Sensorintegration erfolgt durch Aufbringen entsprechender Hydrogelmembranen auf pHEMA-Basis auf die Mikroelektroden. Der Deckel der Plattform wird aus PMMA mittels einer CNC-Maschine gefräst und mit einem Epoxidkleber auf den Chip aufgeklebt.

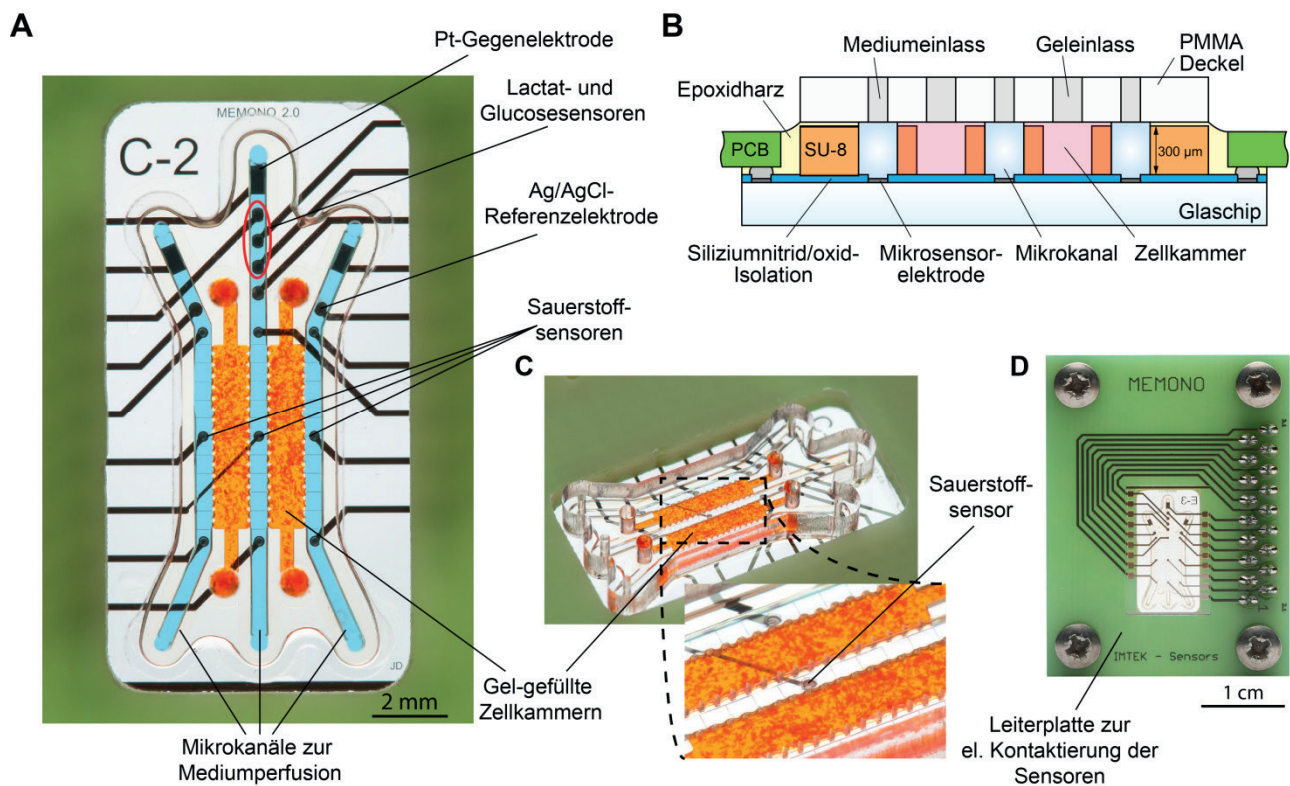


Abb. 1A: Übersicht der Organ-on-Chip-Plattform. **B:** Technologiequerschnitt. **C:** Gel-gefüllte Zellkammern und Barrierestrukturen. **D:** Elektrische Kontaktierung.

Ergebnisse und Diskussion

Systemcharakterisierung

Durch die Verwendung der Materialien Glas, Epoxidlack und PMMA für die Plattform, ist diese, im Gegensatz zu Systemen die typischerweise auf Silikonbasis hergestellt werden, gasdicht. Damit kann in unserem System der Sauerstoffgehalt nicht nur durch die Zellatmung beeinflusst und damit überhaupt gemessen werden, sondern der Sauerstoff im System alleine über die Medienzufuhr gesteuert werden. Die integrierten Sensoren erlauben dabei eine kontinuierliche Überwachung. Abb. 2 zeigt die Demonstration der Gasdichtigkeit des Systems. Zunächst wird das System für 3 h mit luftgesättigtem Medium betrieben und dabei die gelöste Sauerstoffkonzentration entsprechend dem atmosphärischen Sauerstoffgehalt gemessen. Dann wird stickstoffgespültes Medium eingeleitet und der Sauerstoffgehalt im System sinkt in hypoxische Bereiche. Nach weiteren 3 h wird der Fluss angehalten. Aufgrund der gasdichten Materialien kommt nur wenig Sauerstoff aus der Umgebung ins System und hypoxische Werte können ohne zusätzliche Medienzufuhr gehalten werden. Dieser Prozess wird schließlich wieder umgekehrt und die Sauerstoffwerte erreichen die Ausgangswerte, was zusätzlich die Sensorstabilität demonstriert.

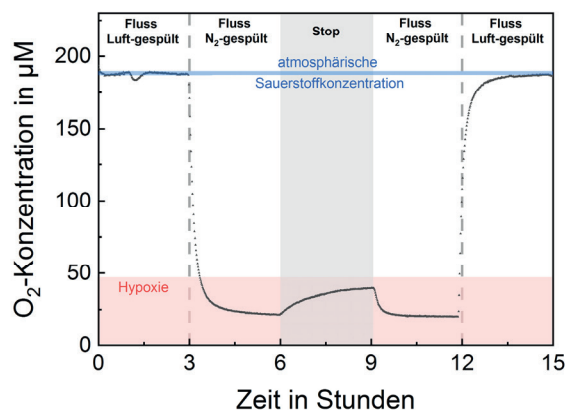


Abb. 2: Demonstration der Gasdichtigkeit des Systems mittels integrierter Sensoren. Über stickstoffgespültes Medium wird die Sauerstoffkonzentration im System auf hypoxische Werte gesenkt. Das Anhalten des Medienflusses für 3 h führt nur zu geringem Sauerstoffanstieg im System.

Wachstum von Brustkrebsosphären im System

Tausende einzelne Brustkrebsstammzellen werden in flüssigem Matrigel in die Zellkammern eingebracht und das Matrigel härtet dort aus. Während des anschließenden fluidischen Betriebs,

wachsen die Einzelzellen über Tage zu Tumorganoiden heran.

Nach dem Befüllen befinden sich etwa 10000 Einzelzellen gleichmäßig verteilt in den Zellkammern [Abb. 3A]. Nach 5 Tagen entstehen daraus etwa 50-60 µm große Sphäroide, die ebenso gleichmäßig im Matrigel verteilt sind. Das Wachstumsverhalten, die Größenverteilung, die Sphere Forming Capacity und die Viabilität der Sphäroide im System entsprechen dabei genau dem etablierten Verhalten in klassischen Mikrotiterplatten in Kontrollexperimenten. Wir konnten damit zeigen, dass im Mikrosystem ein Tumormodell im fluidischen Betrieb entsteht, was dem der zellbiologischen Standardmethode entspricht.

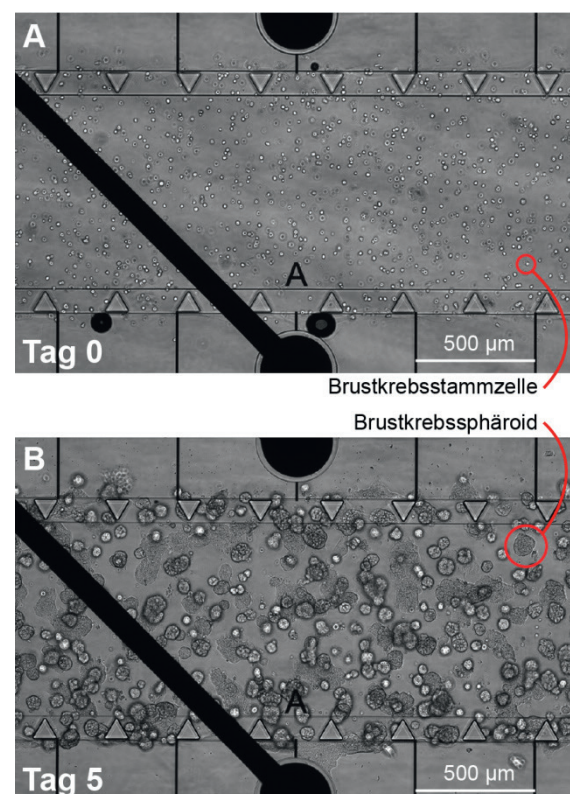


Abb. 3A: Brustkrebsstammzellen (BCSC1) als Einzelzellen in Matrigel nach Befüllung der Zellkammer **B:** Sphäroide mit einem mittleren Durchmesser von ca. 50 µm nach 5 Tagen im mikrofluidischen Betrieb im System.

Sauerstoffmessungen an Brustkrebsosphären

Die Messungen des Zellstoffwechsels werden im fluidischen Stop-/Fluss-Prinzip durchgeführt [Abb. 4A]. In der Flussphase werden die Zellen mit frischem Medium versorgt, in der Stopphase wird Medium verbraucht und dabei die Stoffwechselraten bestimmt. Diese Abfolge wird kontinuierlich wiederholt. Eine typische Langzeitmessung der Sauerstoffkonzentration ist in Abb. 4B dargestellt.

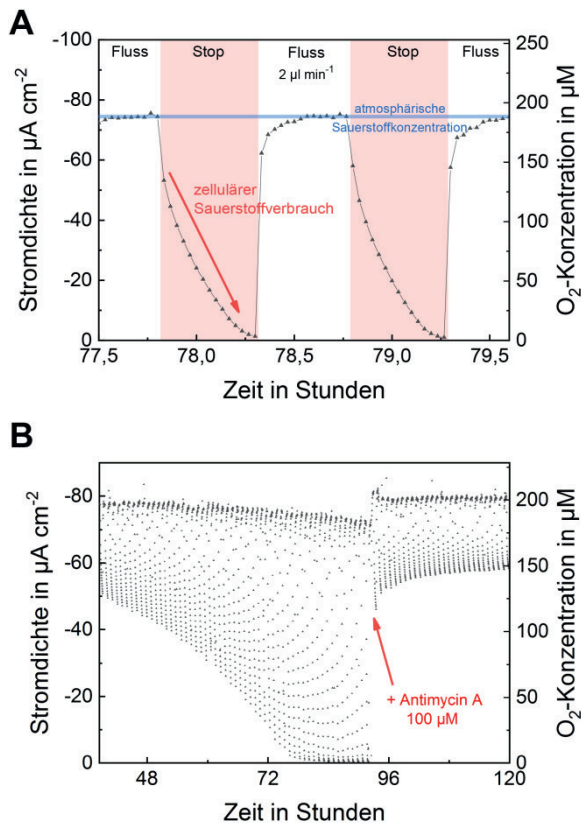


Abb. 4A: Typische Stop/Fluss-Sauerstoffmessung. In der Stopphase wird Sauerstoff durch die Zellen verbraucht, in der Flussphase wird der Wert wieder auf atmosphärische Werte zurückgebracht. **B:** Langzeitmessung mit Anstieg der Zellatmung über der Zeit als Indikator für das Sphäroidwachstum und Zugabe des Wirkstoffs Antimycin A zur Unterdrückung der Zellatmung.

In der Stopphase wird der erreichte Minimalwert über die Zeit immer geringer, da der absolute Sauerstoffverbrauch mit dem Zellwachstum steigt. Somit ist der Sauerstoffverbrauch ein Indikator in Echtzeit für das erfolgreiche Sphäroidwachstum sowie für die Kulturbedingungen vor Ort. Nach ca. 72 h werden in der Stopphase bereits anoxische Werte erzielt [Abb. 4B]. In der Flussphase kehrt der Wert dann immer wieder auf die atmosphärische Konzentration zurück. Nach etwa 90 h wird der Wirkstoff Antimycin A hinzugegeben, der den aeroben Stoffwechsel und damit die Zellatmung unterdrückt. Dies ist am Sensorsignal unmittelbar ersichtlich, da sich die Änderung des Sauerstoffwerts in der Stopphase deutlich verringert. Hierdurch wird die Bedeutung der Echtzeitmessung im Mikrosystem weiter unterstrichen, da Änderungen fortwährend und quantitativ erfasst werden können und so die Pharmakodynamik der Wirkstoffe dargestellt werden kann, im Gegensatz zu klassischen Endpunkttests.

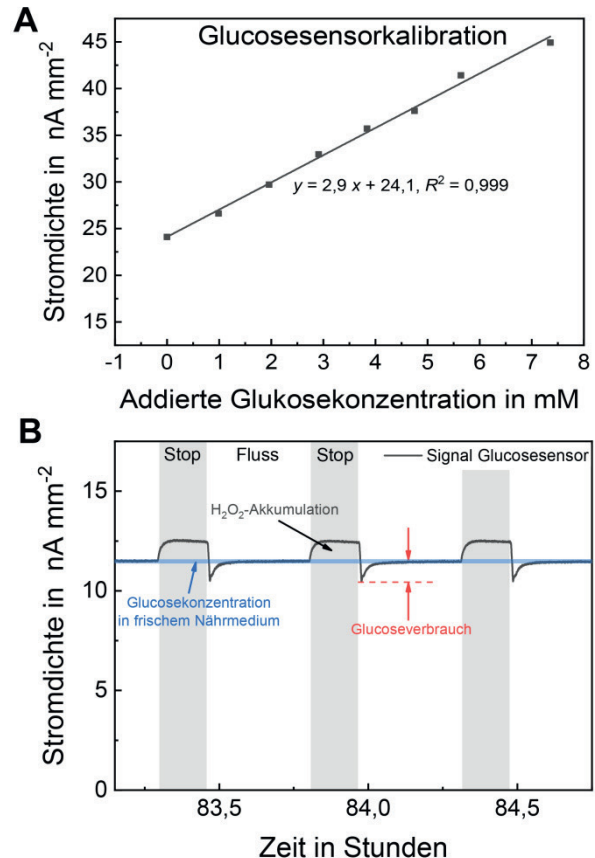


Abb. 5A: Glucosesensorkalibration über die Zugabe von Glucose in glucosehaltiges Zellkulturmedium. **B:** Messung des zellulären Glucoseverbrauchs in der Stop/Fluss-Messung. Der Glucoseverbrauch wird über den Abfall des Glucosesignals im verbrauchten Medium am Beginn der Flussphase bestimmt.

Glucose- und Lactatmessungen an Brustkrebsphäroiden

Glucose- und Lactatbiosensoren befinden sich im Auslasskanal. Eine Kalibration für den Glucose-sensor ist in Abb. 5A dargestellt, wobei die Glukosekonzentrationen zur Hintergrundkonzentration im Medium hinzugegeben wurde. Bei beiden Biosensoren wird zudem ein unspezifisches Hintergrundsignal von einer Blankelektrode abgezogen. Die Kalibration eines Lactatsensors ist Abb. 6A dargestellt. Da serumfreies Medium verwendet wird, gibt es dementsprechend keine Hintergrundkonzentration für Lactat. Es ist für beide Sensoren ein genaues und lineares Verhalten über den gesamten Messbereich zu beobachten.

Da sich die Sensoren im Auslass befinden können sie demnach nur in der Flussphase das verbrauchte Medium aus den Zellkammern vermessen. Dabei sinkt der Glucosegehalt im verbrauchten Medium und der Lactatgehalt steigt. Im Glucosesignal ist daher ein Abfall zu erkennen, der dem Glucoseverbrauch entspricht [Abb. 5B].

Im Lactatsignal ist ein Anstieg zu erkennen, wenn verbrauchtes Medium über den Sensor fließt, da Lactat Produkt des Zellmetabolismus ist [Abb. 6B]. Daher steigt die Lactatproduktion über die Zeit auch an, da auch sie Indikator für das Sphäroidwachstum ist [Abb. 6B].

Wir konnten damit die erfolgreiche Biosensorintegration auf einer mikrofluidischen Organ-on-Chip Plattform zeigen und beide Parameter kontinuierlich und langfristig stabil in der 3D-Zellkultur messen.

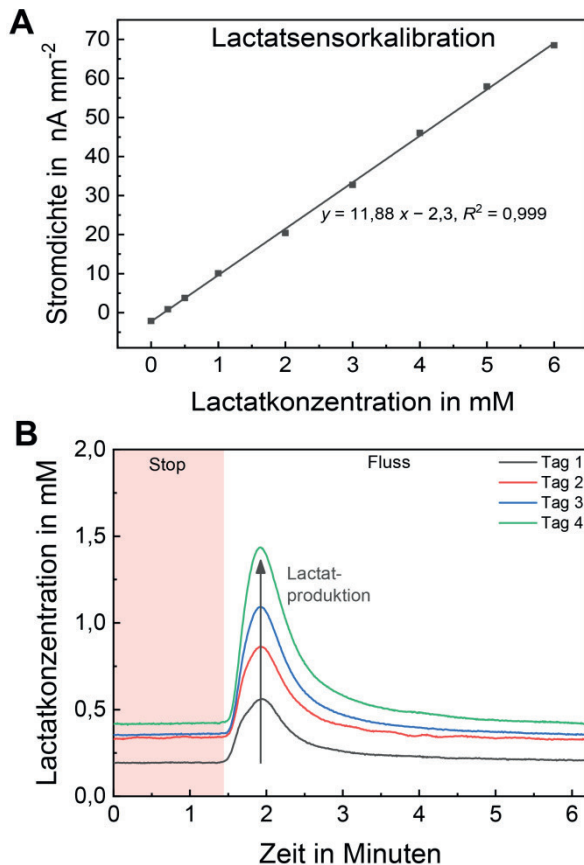


Abb. 6A: Lactatsensorkalibration über die Zugabe von Lactat in lactatfreies Zellkulturmedium. **B:** Messung der zellulären Lactatproduktion in der Stop/Fluss-Messung.

Die Lactatproduktion wird über den Anstieg des Lactatsignals im verbrauchten Medium in der Flussphase bestimmt. Mit dem Wachstum der Sphäroide über Tage steigt der zelluläre Lactatausstoß an.

Schlussfolgerung und Ausblick

Wir haben eine multiparametrische, mikrofluidische Organ-on-Chip-Plattform entwickelt. Die erfolgreiche Integration von patienteneigenen Brustkrebsstammzellen und das Wachstum von Tumorsphäroiden im mikrofluidischen System wurden demonstriert. Integrierte elektrochemische Sauerstoff-, Glucose- und Lactatsensoren, erlauben die

kontinuierliche und genaue Bestimmung der zellulären Stoffwechselfparameter in Echtzeit über mehr als eine Woche. Die einzigartige Steuerbarkeit der Kulturbedingungen in unserem System, sowie deren Kontrolle vor Ort über integrierte Mikrosensoren, wurde demonstriert. Die Bedeutung von Echtzeitmessungen mittels Mikrosensoren zeigt sich vor allem bei Wirkstofftests, bei denen die Pharmakodynamik dargestellt werden kann, was mit klassischen Endpunkttests in der Zellbiologie nicht ohne weiteres möglich ist.

Neben dem Screening von Medikamenten an patienteneigenen Zellen, z.B. für eine personalisierte, und damit wirksamere und schonendere, Chemotherapie, können solche Systeme einen wichtigen Beitrag zur Grundlagenforschung auf zellulärer Ebene, bei der Entwicklung von Tierversuchersatzmethoden und zur Standardisierung von 3D-Zellkulturexperimenten leisten.

Literatur

- [1] M. Simian and M. J. Bissell, "Organoids : A historical perspective of thinking in three dimensions," *J. Cell Biol.*, pp. 1–10, 2016. DOI: 10.1083/jcb.201610056
- [2] L. Ewart and A. Roth, "Opportunities and challenges with microphysiological systems: a pharma end-user perspective," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 20, no. 5, pp. 327–328, 2021. DOI: 10.1038/d41573-020-00030-2
- [3] S. N. Bhatia and D. E. Ingber, "Microfluidic organs-on-chips," *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, no. 8, pp. 760–772, 2014. DOI: 10.1038/nbt.2989
- [4] E. Metzger et al., "KDM4 inhibition targets breast cancer stem-like cells," *Cancer Res.*, vol. 77, no. 21, pp. 5900–5912, 2017. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1754
- [5] O. Frey, P. M. Misun, D. A. Fluri, J. G. Hengstler, and A. Hierlemann, "Reconfigurable microfluidic hanging drop network for multi-tissue interaction and analysis," *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 4250. DOI: 10.1038/ncomms5250
- [6] D. Bavli et al., "Real-time monitoring of metabolic function in liver-on-chip microdevices tracks the dynamics of mitochondrial dysfunction," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 16, pp. E2231–E2240, 2016. DOI: 10.1073/pnas.1522556113
- [7] P. M. Misun, J. Rothe, Y. R. F. Schmid, A. Hierlemann, and O. Frey, "Multi-analyte biosensor interface for real-time monitoring of 3D microtissue spheroids in hanging-drop networks," *Microsystems Nanoeng.*, vol. 2, 2016, DOI: 10.1038/micronano.2016.22

- [8] A. Weltin, S. Hammer, F. Noor, Y. Kaminski, J. Kieninger, and G. A. Urban, "Accessing 3D microtissue metabolism: Lactate and oxygen monitoring in hepatocyte spheroids," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 87, pp. 941–948, 2017.
DOI: 10.1016/j.bios.2016.07.094
- [9] J. Dornhof, J. Kieninger, H. Muralidharan, J. Maurer, G. A. Urban, and A. Weltin, "Microfluidic organ-on-chip system for multi-analyte monitoring of metabolites in 3D cell cultures," *Lab Chip*, vol. 22, no. 2, pp. 225–239, 2022.
DOI: 10.1039/d1lc00689d
- [10] J. Dornhof et al., "Bioprinting-based automated deposition of single cancer cell spheroids into oxygen sensor microelectrode wells," *Lab Chip*, *in press*, 2022.
DOI: 10.1039/d2lc00705c
- [11] A. Weltin et al., "Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: a transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem," *Lab Chip*, vol. 14, no. 1, pp. 138–146, 2014.
DOI: 10.1039/c3lc50759a
- [12] J. Kieninger, A. Weltin, H. Flamm, and G. A. Urban, "Microsensor systems for cell metabolism—from 2D culture to organ-on-chip," *Lab Chip*, vol. 18, no. 9, pp. 1274–1292, 2018.
DOI: 10.1039/c7lc00942a
- [13] A. Weltin, J. Kieninger, and G. A. Urban, "Microfabricated, amperometric, enzyme-based biosensors for in vivo applications," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, no. 17, pp. 4503–4521, 2016.
DOI: 10.1007/s00216-016-9420-4
- [14] A. Weltin, J. Kieninger, B. Enderle, A.-K. Gellner, B. Fritsch, and G. A. Urban, "Polymer-based, flexible glutamate and lactate microsensors for in vivo applications," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 61, pp. 192–199, 2014.
DOI: 10.1016/j.bios.2014.05.014

Danksagung

Wir danken der Baden-Württemberg Stiftung für die Finanzierung im Rahmen des Projekts MEMONO (MIVT-1).

Verwertung

Für das beschriebene System wurde eine Patentanmeldung durchgeführt, bei der die Autoren Erfinder sind.