

Universelle Geräteplattform für das automatisierte Handling zellbasierter Assays

Frank Sonntag¹, Mathias Busek^{1,3}, Jens Steidl¹, Mario Bürger², Steffen Howitz², Uwe Marx^{3,4}, Silke Hofmann³, Reinhold A. Klapsing⁵ und Udo Klotzbach¹

¹ Fraunhofer-Institut für Werkstoff- und Strahltechnik IWS, 01277 Dresden, Winterbergstraße 28

² GeSiM mbH, 01454 Großberkmannsdorf, Bautzner Landstrasse 45

³ TU Berlin Institut für Biotechnologie, 13355 Berlin, Gustav-Meyer-Allee 25

⁴ TissUse GmbH, 15528 Spreenhagen, Markgrafenstraße 18

⁵ capitalis technology GmbH, 10117 Berlin, Krausenstraße 8

Abstract

Für die automatisierte Charakterisierung von Zell- bzw. Gewebereaktionen auf definierte Substanzen über miniaturisierte dynamische Bioreaktor-Chipsysteme ergeben sich vor allem zwei technische Herausforderungen: 1. Wie kann die Vitalität und Funktionalität der organtypischen Gewebe in den Bioreaktor-Chipsystemen möglichst ohne Intervention in das sterile Gewebe kontinuierlich überwacht werden. 2. Wie kann eine Vielzahl derartiger Chips zeitgleich versorgt, über Wochen hinweg mit Substanzen beaufschlagt und kontinuierlich steril betrieben werden? Für die Lösung dieser komplexen Aufgabenstellung müssen zwei Grundfunktionalitäten in einer Geräteplattform vereint werden: Das Handling flüssiger Medien (Testsubstanzen, Zellkulturmedien) und die nicht-invasive Online-Überwachung (Vitalitätsbestimmung). Dazu wurde auf Basis der etablierten Nanoplotter™-Plattform ein Portalsystem mit zwei Brücken konzipiert. Die Zellkultursysteme (Mikrotiterplatten, Lab-on-a-Chip-Systeme) befinden sich in einer temperierbaren Aufnahmeplatte, die zwischen den beiden Brücken angeordnet ist. Auf der oberen Brücke sitzt ein frei positionierbarer Dosierkopf, der mit unterschiedlichen Flüssigkeitshandlingsystemen ausgestattet werden kann. Der frei positionierbare Sensorkopf an der unteren Brücke kann mit unterschiedlichen Messsystemen bestückt werden. So kann jeder Chip einzeln mit unterschiedlichen Medien versorgt und charakterisiert werden. Die entsprechenden Abläufe können je nach Experiment individuell programmiert und über die Software gesteuert werden, sodass das System nach einmal erfolgter Programmierung ohne weitere menschliche Eingriffe autark arbeiten kann. Die nicht-invasive Online-Überwachung soll durch eine kombinierte Erfassung von Fluoreszenzfärbungen sowie der Autofluoreszenz von NADH erfolgen. Dabei soll die komplette notwendige Technik in einer einzigen Sonde verbaut werden.

1 Einleitung

Testsysteme zur Charakterisierung von Zell- bzw. Gewebereaktionen auf definierte Substanzen sind von internationalem Interesse. Der Einsatz zellbasierter Systeme bringt eine Reihe wesentlicher Vorteile mit sich. Zellen besitzen eine natürlich entwickelte Selektivität gegenüber biologisch aktiven Substanzen. Des Weiteren handelt es sich bei der Zellantwort in den meisten Fällen um physiologisch relevantes Verhalten. Das heißt, bei Wahl eines geeigneten Zellmodells können Rückschlüsse auf den entsprechenden Organismus gezogen werden. Dies wird vor allem in der Pharmako- und Toxikokinetik bei der Entwicklung neuer Medikamente und Wirkstoffe ausgenutzt. Auch aus Tierschutz- und Kostengründen sowie aufgrund gesetzlicher Vorgaben werden immer mehr Tests an Zellkulturen durchgeführt. Dreidimensionale organtypische Gewebekulturen sind aktuell noch sehr selten. Sie bedürfen einer kontinuierlichen Versorgung und sind deshalb häufig nur in dynamischen, also kontinuierlich perfundierenden Bioreaktor-Chipsystemen realisierbar [1]. Gleichzeitig geht die bisher in der Zellkultur etablierte lichtmikroskopische Einschätzung der Vitalität der Zellkulturen in dreidimensionalen Geweben verloren. Für miniaturisierte dynamische Bioreaktor-Chipsysteme ergeben sich vor allem zwei technische Herausforderungen: 1. Wie kann die Vitalität und Funktionalität der organtypischen Gewebe in den Bioreaktor-Chipsystemen möglichst ohne

Intervention in das sterile Gewebe kontinuierlich überwacht werden? 2. Wie kann eine Vielzahl derartiger Chipsysteme zeitgleich versorgt, über Wochen hinweg mit Substanzen beaufschlagt und kontinuierlich steril betrieben werden? Für die Lösung dieser komplexen Aufgabenstellung müssen zwei Grundfunktionalitäten in einer Geräteplattform vereint werden: Das Handling flüssiger Medien (Testsubstanzen, Zellkulturmedien) und die nicht-invasive Online-Überwachung (Vitalitätsbestimmung).

2 Konzeption

Es wurde auf Basis der etablierten Nanoplotter™-Plattform [2] ein Portalsystem mit zwei Brücken konzipiert. Die Zellkultursysteme (Mikrotiterplatten, Lab-on-a-Chip-Systeme) befinden sich in einer temperierbaren Aufnahmeplatte, die zwischen den beiden Brücken angeordnet ist. Auf der oberen Brücke sitzt ein frei positionierbarer Dosierkopf, der mit unterschiedlichen Flüssigkeitshandlingssystemen (Piezopipetten, pneumatisch und elektrisch betriebene Dispenser) ausgestattet werden kann. Der frei positionierbare Sensorkopf an der unteren Brücke kann mit unterschiedlichen Messsystemen (Mikroskop, Fluoreszenzmesssystem, SPR-Spektrometer) bestückt werden. So kann jeder Chip einzeln mit unterschiedlichen Medien versorgt und charakterisiert werden. Die entsprechenden Abläufe können je nach Experiment individuell programmiert und über die Software gesteuert werden, sodass das System nach einmal erfolgter Programmierung ohne weitere menschliche Eingriffe autark arbeiten kann.

Eine Toxizitäts- oder Substanztestung soll schematisch folgendermaßen ablaufen: Die Chips werden routinemäßig Rund-um-die-Uhr vom System versorgt, d. h. die Gewebe werden automatisiert in die Chips eingebracht und in regelmäßigen Abständen wird von der oberen Brücke aus frisches Zellkulturmedium in die Chips dosiert, während parallel verbrauchtes Medium entfernt wird. Zusätzlich werden über das obere Robotiksystem die Testsubstanzen in das System injiziert. Die Analytik wird komplett von der unteren Brücke des Systems übernommen und erfolgt durch die transparente Bodenplatte der einzelnen Chips. Fluoreszenz- und Lebendzellmarker werden dabei erfasst, ohne dass die empfindlichen Gewebekulturen innerhalb der Chips berührt, beeinträchtigt oder manipuliert werden müssen. So kann die Sterilität des Systems über den kompletten Versuchsverlauf garantiert werden. Analog kann das System mit der am Fraunhofer IWS etablierten SPR-Plattform [3] kombiniert werden. Über eine spezielle Adapteroptik wird so der labelfreie Nachweis spezifischer Marker durch die transparente, goldbeschichtete Bodenplatte der einzelnen Chips möglich. Der schematische Aufbau des Robotiksystems ist in Bild 1 dargestellt.

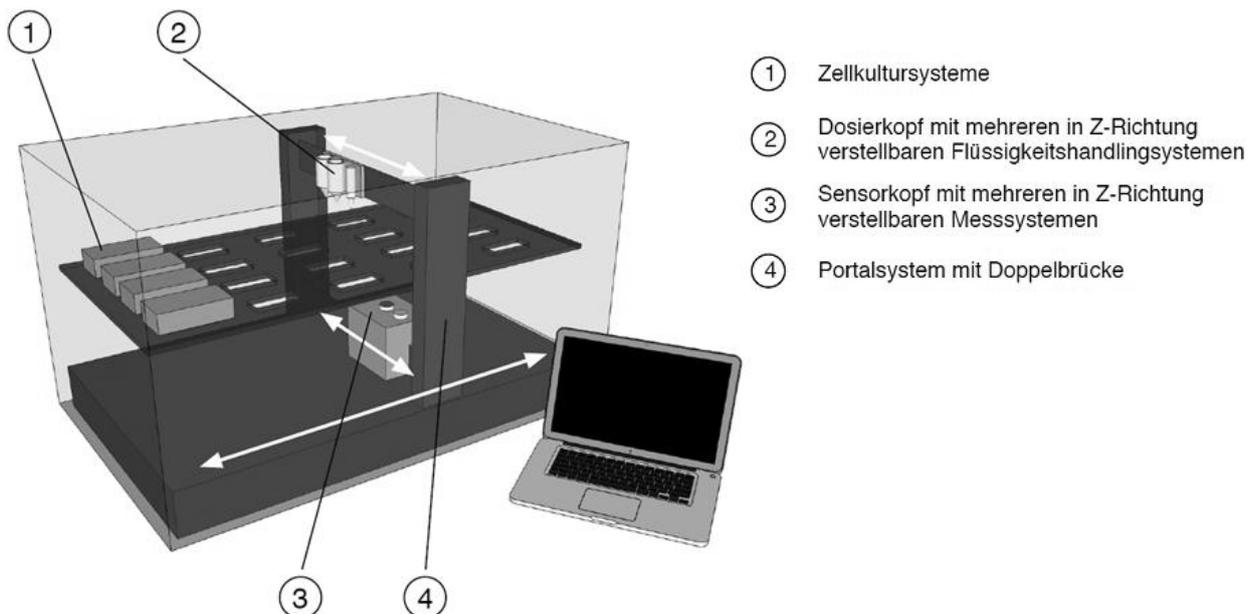


Bild 1 Schematischer Aufbau der Geräteplattform

Mit dem Ansatz soll ermöglicht werden, für jeden Chip innerhalb der Plattform ein eigenes Protokoll, bestehend aus einer chronologischen Abfolge von Dosier- und Messschritten, vorzugeben, das vollautomatisch abgearbeitet wird. So können die Arbeitsabläufe in einer Chip-Farm mittels Robotik-

Plattform gehandhabt werden. Auf diese Weise kann in einem kurzen Zeitraum eine hohe Anzahl von Zellträgern mit geringem Personalaufwand untersucht werden. Diese Funktion lässt eine high-throughput Durchführung von Versuchen zu. Darüber hinaus ist eine kontinuierliche Rund-um-die-Uhr-Überwachung über Wochen und Monate möglich. Weiterhin besteht auch die Möglichkeit, jederzeit kurzfristig auf einen Mehrbedarf an Tests reagieren zu können. In einem normalen Toxizitätstest setzen Personalbedarf, Versuchspersonen und Tiere dem Experiment enge Grenzen. Sollte es beispielsweise aufgrund eines Krisenfalls, wie aktuell bei der EHEC-Epidemie, zu einem schlagartigen Mehrbedarf an Tests kommen, kann aufgrund der Automatisierung schnell reagiert werden. Durch die robotergestützte Arbeitsweise können so jederzeit kurzfristig die Arbeitskapazitäten erhöht werden. Tafel 1 fasst die angestrebten technischen Funktionalitäten und die damit verbundenen relevanten Parameter der einzelnen Module zusammen.

Tafel 1 Technische Funktionalitäten und relevante Parameter der einzelnen Module

Modul	Funktionalität und relevante Parameter
2-Ebenen-Portal-Robotik-Basissystem	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Exakte räumliche Positionierung von Dosier- und Sensorkopf mit einer Positioniergenauigkeit kleiner 5 µm ◆ Bereitstellung von Stromversorgung und Steuerleitungen für die Subsysteme Dosier- und Sensorkopf ◆ genormte Hardwareschnittstelle und Protokoll zur Ansteuerung über einen PC
Mehrkanal-Dosierkopf	<ul style="list-style-type: none"> ◆ parallele Aufnahme mehrerer Flüssigkeitshandlingssysteme ◆ leichtes und flexibles Design ◆ separate Höhenverstellung mit einer Positioniergenauigkeit kleiner 5 µm ◆ exakte Dosierung von Testsubstanzen im Nanoliter-Maßstab mittels Piezopipetten ◆ exakte Dosierung von Kulturmedien, Gelen und Geweben im Mikrolitermaßstab mittels Spritzenpumpe ◆ genormte Hardwareschnittstelle und Protokoll zur Ansteuerung über PC oder 2-Ebenen-Portal-Robotik-Basissystem
Mehrkanal-Sensorkopf	<ul style="list-style-type: none"> ◆ parallele Aufnahme mehrerer Sensorsysteme ◆ leichtes und flexibles Design ◆ Möglichkeit des Anschlusses mehrerer Lichtquellen und Detektionseinheiten ◆ separate Höhenverstellung mit einer Positioniergenauigkeit kleiner 5 µm und Abstandmessung ◆ Integration eines Beobachtungsmikroskops ◆ Integration von Referenzmesspunkten ◆ genormte Hardwareschnittstelle und Protokoll zur Ansteuerung über einen PC oder 2-Ebenen-Portal-Robotik-Basissystem
Steuersoftware	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Für jeden Chip: <ul style="list-style-type: none"> ◆ automatische Abarbeitung eines Protokoll, bestehend aus einer chronologischen Abfolge von Dosier- und Messschritten ◆ Protokoll kann jederzeit geändert, gestartet, beendet oder vorübergehend angehalten werden. ◆ Service- und Testfunktionen ◆ Definierte Softwareschnittstelle zur Integration in LIMS

Die nicht-invasive Online-Überwachung soll durch eine kombinierte Erfassung von Fluoreszenzfärbungen sowie der Autofluoreszenz von NADH erfolgen. Ziel ist die Auswertung von Lebendzellfärbungen, um weitere essentielle Informationen über Vitalität, Zell-Zell-Interaktionen etc. zu gewinnen. Dabei soll die komplette notwendige Technik in einer einzigen Sonde verbaut werden. Der schematische Aufbau der nicht-invasiven Online-Überwachung ist in Bild 2 dargestellt. Mit ihr können die Chips nicht nur überwacht, sondern mit Hilfe von Lebendzell-Markern oder geeigneten fluoreszenten Antikörpern auch gezielt auf individuelle Fragestellungen untersucht werden. Damit besteht sowohl die Möglichkeit einer passiven Überwachung, als auch die Chance zur gerichteten Analyse.

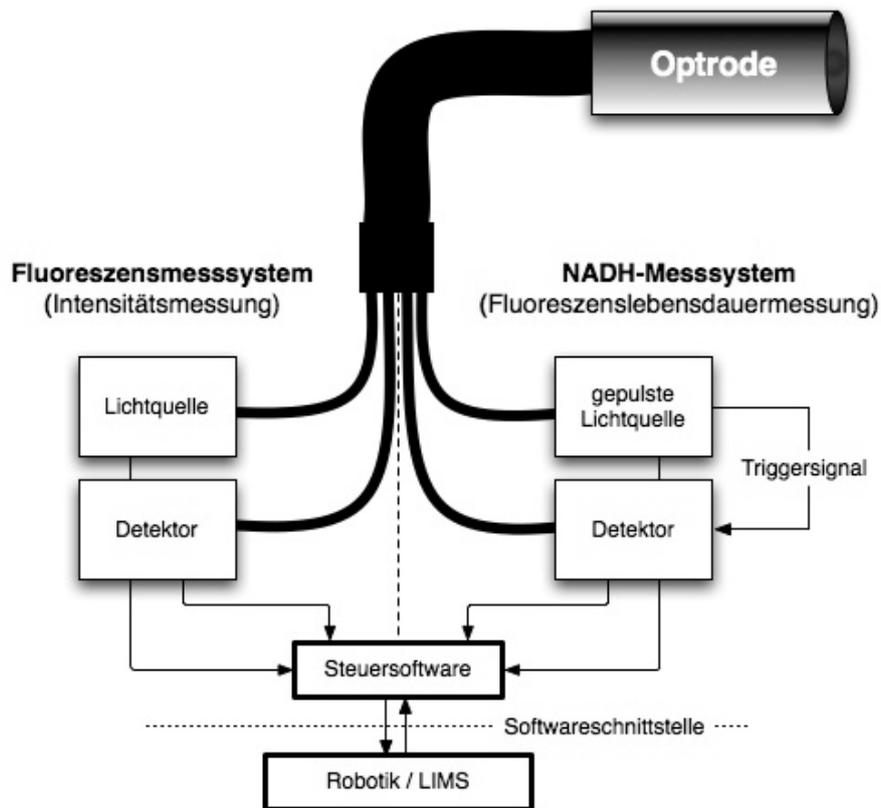


Bild 2 Schematischer Aufbau der nicht-invasiven Online-Überwachung

5 Zusammenfassung und Ausblick

Basierend auf der vorgestellten Konzeption, wird eine universelle Geräteplattform zur kontinuierlichen Überwachung, Analyse, Versorgung und Dokumentation zellbasierter Assays entwickelt und realisiert. Die Plattform kombiniert eine Zwei-Ebenen-Portal-Robotik-Lösung mit aseptischem Kulturführungshintergrund mit einer Multi-Parameter-Messsonde auf Optroden-Basis. Die Konzeption ermöglicht die vollautomatisierte Abarbeitung komplexer, benutzerdefinierter Abläufe wie die Prozessierung von Multi-Organ-Chips oder zellbasierten Assays im Mikrotiterplattenformat. Mit dieser Ausstattung bietet das System erstmals die Gelegenheit, Substanz- und Toxizitätsscreenings unter Verzicht auf Tierexperimente im Hochdurchsatzverfahren zu bewältigen.

Literatur

- [1] F. Sonntag, M. Gruchow, I. Wagner, G. Lindner, U. Marx: BIOSpektrum 04.11, 17. Jahrgang: Miniaturisierte humane organotypische Zell- und Gewebekulturen. 2011
- [2] F. U. Gast, M. Bürger, T. Gehring, S. Howitz, K. Meißner, J. Steidl, U. Klotzbach, F. Sonntag: Regenerative Medizin, Zuckschwerdt Verlag München: Der Nano-Plotter, eine flexible Robotikplattform zur Herstellung von 2D- und 3D-Strukturen für die Zellbiologie und die regenerative Medizin. 2010
- [3] N. Danz, A. Kick, F. Sonntag, S. Schmieder, B. Höfer, U. Klotzbach, M. Mertig: Engineering in Life Sciences: Surface plasmon resonance platform technology for multi parameter analyses on polymer chips. 2011.