

## PoreGenic<sup>®</sup> - Patch-on-Chip-System für die präklinische Forschung an Ionenkanälen

*Denise Franz<sup>1</sup>, Carsten Tautorat<sup>1</sup>, Uwe Scheffler<sup>1</sup>, Oliver Klink<sup>1</sup>, Thomas Kröger<sup>1</sup>, Jan Gimsa<sup>1</sup>, Werner Baumann<sup>1</sup>, Helmut Beikirch<sup>2</sup>, Philipp Julian Köster<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Universität Rostock, Lehrstuhl für Biophysik, Gertrudenstr. 11a, 18057 Rostock  
info@poregenic.com*

<sup>2</sup> *Universität Rostock, Lehrstuhl Elektronische Bauelemente und Schaltungstechnik,  
Albert-Einstein-Straße 2, 18051 Rostock*

### Kurzfassung

Der vorliegende Beitrag beschreibt den aktuellen Entwicklungsstand eines neuartigen *Patch-on-Chip*-Systems, mit welchem das elektrophysiologische Verhalten von adhärent wachsenden Zellnetzwerken automatisiert untersucht werden soll. Bisher erlaubt nur die klassische (manuelle) *Patch-Clamp*-Technik die Signalableitung an vernetzten Zellen. Der hier beschriebene Systemaufbau des *Patch-on-Chip*-Systems PoreGenic<sup>®</sup> mit 4×4 Messstellen gestattet bereits die Signalableitung von suspendierten Einzelzellen mit Seal-Widerständen oberhalb 1 GΩ. Mit dem Lokalanästhetikum Lidocain wurden an HEK 293 Na<sub>v</sub> 1.7 Vergleichsmessungen zwischen dem PoreGenic<sup>®</sup>-System und dem klassischen *Patch-Clamp* durchgeführt. Es konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass *Patch-Clamp*-Ableitungen sowie pharmakologische Charakterisierungen an suspendierten HEK 293 Nav 1.7 mit dem PoreGenic<sup>®</sup>-System möglich sind.

**Key words:** *Patch-Clamp, Patch-on-Chip, Elektrophysiologie, Lab-on-a-Chip*

### Einleitung

Auf der Suche nach neuen Wirkstoffen bedient sich die Pharmaindustrie in der präklinischen Phase zunehmend zellbasierter Untersuchungsmethoden. Von besonderem Interesse sind dabei Ionenkanäle als Wirkort der Medikamente, da viele Krankheiten wie z. B. Mukoviszidose, generalisierte Epilepsie oder das Long-QT-Syndrom auf fehlerhafte Kanalfunktionen zurückzuführen sind. Im Vergleich zu anderen zellbasierten Verfahren zur Untersuchung von Kanalaktivitäten, wie die Verwendung von spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoffen oder radioaktiven Markern, erlauben *Patch-on-Chip*-Systeme die direkte Messung elektrophysiologischer Parameter von Zellen bzw. Zellnetzwerken.

Kommerzielle *Patch-on-Chip*-Systeme mit planaren *Patch-Sites* führen derzeit ihre Untersuchungen ausschließlich an vereinzelt Zellen in Suspension durch. Ziel des Projektes PoreGenic<sup>®</sup> ist die Entwicklung eines automatisierten *Patch-on-Chip*-Systems für Zellnetzwerke. Für die parallele Ableitung mehrerer Zellen im Netzwerk ist es notwendig auf kleinster Fläche mehrere sog. *Patch-Sites* anzuordnen (im Weiteren als *Multi Patch-Site Array* (MPSA) bezeichnet). Um den für die Messung notwendigen mikrofluidischen Zugang

zum Inneren einzelner Zellen zu realisieren, ist eine auf die Herstellung der *Patch-Sites* spezialisierte Mikrosystemtechnik erforderlich.

Die aktuelle Entwicklungsstufe basiert auf Vorarbeiten mit mikrostrukturierten massiven Nadelelektroden [1] und erlaubt chip-basierte *Patch-Clamp*-Ableitungen.

### Systemaufbau

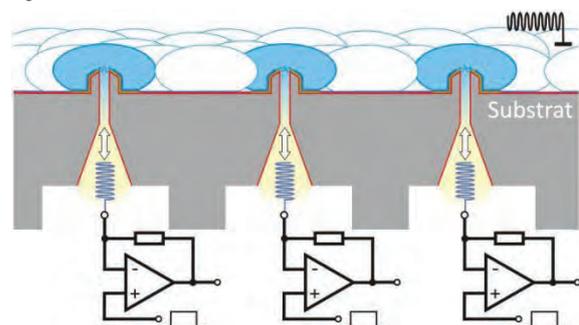


Abbildung 1. Prinzipdarstellung der Signalableitung mit dem PoreGenic<sup>®</sup> Patch-on-Chip-System.

Schematische Querschnittsdarstellung der parallelen *Patch-Clamp*-Ableitung mit chipintegrierten *Patch-Pipetten*. Die Messelektronik ist vereinfacht durch Strom-Spannungswandler im *Voltage-Clamp*-Modus dargestellt. Eine Druckregelung ermöglicht das Anlegen von Über- und Unterdruck (weißer Pfeil) an der *Patch-Site*.

**Abb. 1** zeigt den Prinzipaufbau der parallelen Signalableitung im Zellnetzwerk. Die *Patch-Site* gestattet den mikrofluidischen Zugang zur Zelle. Dabei wird durch leichtes Ansaugen ein kleiner Membranausschnitt in die *Patch-Site* hineingesogen und es entsteht eine hohe elektrische Abdichtung des Pipetteninneren zum extrazellulären Raum. Erreicht diese Abdichtung einen Wert oberhalb 1 G $\Omega$  spricht man vom *Giga-Seal* [2]. In dieser Konfiguration ist es möglich einzelne Ionenkanäle mit Messströmen unterhalb 10 pA zu untersuchen. Sofern der eingesogene Membranausschnitt durch starkes Ansaugen geöffnet wird, ist es möglich intrazelluläre Signalableitungen von der ganzen Zelle vorzunehmen. Je nach Ionenkanalaktivität liegen die Messströme dann zwischen 10 pA und 100 nA.

### Sensorchip

Der Sensorchip mit einem 4×4 MPSA basiert auf einem Glassubstrat (10×10 mm<sup>2</sup>). Die Höhe der pipettenähnlichen MPSA-Elemente aus Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> beträgt ca. 5  $\mu$ m. Ihr Öffnungsdurchmesser an der Spitze liegt bei 1-2  $\mu$ m. Für die Ausbildung eines hohen *Seal*-Widerstandes wird die Oberflächenrauheit der *Patch-Site* durch das Aufbringen einer dünnen SiO<sub>2</sub>-Schicht (PECVD) verringert. Die Optimierungsarbeiten zur Oberflächenrauheit und Schichtdicke werden durch Einsatz der Rasterelektronenmikroskopie (REM) (**Abb. 2A**) in Kombination mit fokussierter Ionenstrahlpräparation (FIB) (**Abb. 7A**) unterstützt.

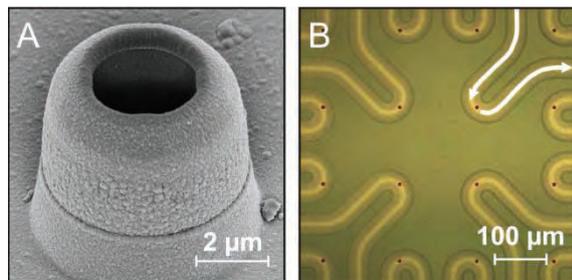


Abbildung 2. PoreGenic®-Sensorchip.

**A:** REM-Aufnahme eines MPSA-Elements mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. 2  $\mu$ m. **B:** Oberfläche des Sensorchips mit 16 *Patch-Sites* (schwarze Punkte) jeweils mit mikrofluidischem Zu- und Ablaufkanal (weiße Pfeile).

Durch Aufkleben des Sensorchips auf einen Fluidik-Chipträger werden die mikrofluidischen Zu- und Ablaufkanäle (**Abb. 2B**) von nur acht *Patch-Sites* nach außen kontaktiert. Aufgrund des vorgefertigten Fluidik-Chipträgers können derzeit nicht alle 16 *Patch-Sites* angeschlossen werden. Der Chipträger im Standard-Objektträgerformat besteht aus transparentem Kunststoff (PMMA). Der Sensorchip wird durch Aufkleben eines PMMA-Troges komplettiert und

bildet zusammen mit der Chipoberfläche die Zellkultur- und Messkammer. Das Design des Troges wurde für die mikroskopische Beobachtung mit Wasserimmersionsobjektiven optimiert.

### Prototyp

Der nicht-automatisierte Prototyp dient der elektrischen und fluidischen Kontaktierung des Sensorchips an die externe Messelektronik sowie an die Druckregelung. Für die Signalableitung taucht jeweils eine Ag/AgCl-Elektrode in eines der 16 Nöpfchen des Fluidik-Chipträgers ein (**Abb. 3A**). Eine große schaltbare Ag/AgCl-Referenzelektrode wird direkt in die Messkammer eingetaucht.

Das Gehäuse (**Abb. 3B**) des Prototyps gestattet Auflichtmikroskopie, dient als Faraday-Käfig und ist für Versuche unter physiologischen Bedingungen temperierbar.

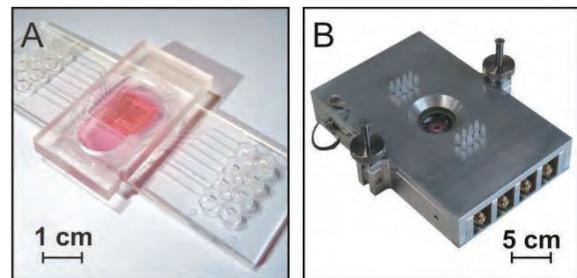


Abbildung 3. PoreGenic®-Prototyp.

**A:** Sensorchip mit 8 fluidisch kontaktierten *Patch-Sites*. **B:** Prototyp für den Anschluss von 8 *Patch-Sites* an einen Mehrkanal-*Patch-Clamp*-Verstärker (nicht dargestellt).

### Messelektronik

Die schaltungstechnischen Anforderungen an *Patch-Clamp*-Verstärker sind seitens der zu messenden Ionenkanalströme im Bereich von 1 pA bis 100 nA hinsichtlich des Rauschens, der Leckströme und der benötigten variablen Verstärkung hoch. Um den Entwicklungsaufwand zu reduzieren, wird ein kommerziell erhältlicher 16 Kanal *Patch-Clamp*-Verstärker der Firma Tecella LCC (Foothill Ranch, Kalifornien, USA) verwendet. Dieser für intrazelluläre Ableitungen optimierte Verstärker gestattet *Voltage*- und *Current-Clamp*-Messungen mit programmierbarer Verstärkung. Die Abtastrate beträgt 20 kHz pro Messkanal. Für die Erfassung, Visualisierung und Speicherung der Messdaten wird die Software TecellaLab genutzt. Für Vergleichsmessungen kann anstatt des Mehrkanal-Verstärkers ein Einkanal-*Patch-Clamp*-Verstärker über einen Multiplexer angeschlossen werden.

### Druckregelung

Die softwaregesteuerte Druckregelung dient dem Befüllen der Fluidkanäle sowie dem individuellen Anlegen von Über- und Unterdruck im Bereich von -300 mbar bis +500 mbar. Sie ermöglicht durch konfigurierbare Druck-Puls-Protokolle die Zellpositionierung und Seal-Ausbildung an der *Patch-Site* sowie den Übergang in die Ganzzelleableitung. Die Genauigkeit der Regelung beträgt  $\pm 3$  mbar. Die Software basiert auf einem LabVIEW<sup>®</sup>-Programm.

### Ergebnisse

#### Wirkstofftest mit HEK 293 Na<sub>v</sub> 1.7

Erste Tests zur Evaluierung des Prototyps wurden an genetisch modifizierten HEK 293 Zellen durchgeführt, welche den spannungsabhängigen Natriumkanal Na<sub>v</sub> 1.7 überexprimieren. Der Vorteil liegt in der Stabilität der Zelllinie sowie dem gut charakterisierten Natriumkanal [3]. Mit dem inhibierenden Lokalanästhetikum Lidocain wurden die Kanaleigenschaften untersucht und mit Ergebnissen aus klassischen *Patch-Clamp*-Messungen verglichen.

Für die Versuche wurden die suspendierten Zellen mit einem Unterdruck von -30 mbar an den *Patch-Sites* angesaugt. Nach Ausbildung des *Giga-Seals* wurde die Zellmembran für die Ganzzelleableitung mit einem kurzem Unterdruckpuls (-180 mbar für 1 s) geöffnet. Die Aktivität der spannungsabhängigen Natriumkanäle wurde mit Hilfe einer Strom-Spannungskennlinie im *Voltage-Clamp*-Modus ermittelt. Dafür wurde an die Zelle eine Spannung angelegt, die angefangen bei -100 mV in 5 mV Schritten auf +40 mV erhöht wurde. Der Spannungspuls hatte eine Länge von 50 ms. Zwischen den Spannungspulsen wurde die Zelle für 200 ms wieder auf ihre Haltespannung von -100 mV geklemmt (**Abb. 4**).

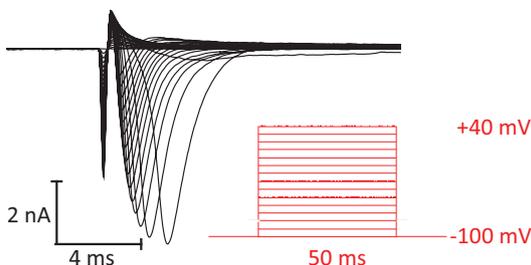


Abbildung 4. Stromantwort einer HEK 293 Na<sub>v</sub> 1.7 auf ein Spannungspuls-Protokoll in der Ganzzelleableitung.

Nach Bestimmung der maximalen Stromantwort wurde der Wirkstoff, beginnend mit der kleinsten Konzentration von 0,1 mM, in den Trog pipettiert. **Abb. 5** zeigt die Strom-

Spannungskurve einer ausgewählten Zelle sowie die hemmende Wirkung von Lidocain auf die Natriumkanäle.

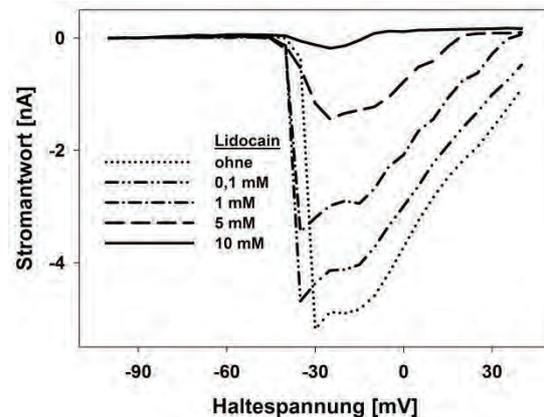


Abbildung 5. Strom-Spannungskurve einer HEK 293 Na<sub>v</sub> 1.7-Zelle unter Zugabe zunehmender Konzentration des Inhibitors Lidocain.

Je nach Anzahl der Natriumkanäle in der Zellmembran der HEK 293 wurden Ströme im Bereich von 1 nA bis 8 nA gemessen. Im Beispiel von **Abb. 5** lag die maximale Stromamplitude bei 5,2 nA. Eine Erhöhung der Lidocain-Konzentration führte signifikant zur Verringerung der Stromantwort und entspricht verschiedenen Literaturquellen [4][5]. Die Zugabe der höchsten Konzentration von 10 mM führte zu einer 98 %-igen Blockade der spannungsabhängigen Natriumkanäle. Um auszuschließen, dass die Abnahme nur ein zeitabhängiger Effekt ist, wurde der Wirkstoff abschließend wieder ausgewaschen. Nach diesem sog. *wash out* konnte wieder bis zu 60 % des Ausgangsstromes der Natriumkanäle detektiert werden. Vergleichsmessungen mit dem klassischen *Patch-Clamp* an HEK 293 Na<sub>v</sub> 1.7 ergaben ähnliche Ergebnisse (vgl. **Abb. 6**).

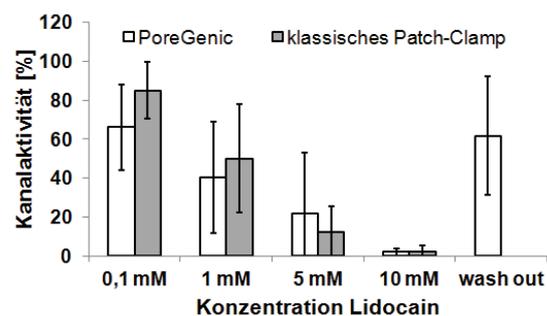


Abbildung 6. Einfluss des Inhibitors Lidocain auf die Natriumkanalaktivität in HEK 293 Na<sub>v</sub> 1.7 ( $n \geq 4$ ) im Vergleich zu Ergebnissen aus dem klassischen *Patch-Clamp* ( $n \geq 6$ ).

**Tab. 1** gibt einen Überblick über die Nebenparameter der Messungen. Die Werte wurden bei der Ganzzelleableitung von HEK 293 Na<sub>v</sub> 1.7

unter Verwendung des EPC 9 *Patch-Clamp*-Verstärkers (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht) ermittelt.

Tabelle 1: Parameter während der Ganzzelleableitung

$R_{\text{pip}}$ : Pipettenwiderstand;  $C_{\text{fast}}$ : Pipettenkapazität;  
 $C_{\text{slow}}$ : Membrankapazität;  $R_s$ : Serienwiderstand

|                   |  |
|-------------------|--|
| $R_{\text{Pip}}$  | $3 \pm 0,5 \text{ M}\Omega$                |
| $C_{\text{fast}}$ | $13 \pm 0,5 \text{ pF}$                    |
| $C_{\text{slow}}$ | 7 pF bis 20 pF<br>(abhängig von Zellgröße) |
| $R_s$             | $6 \pm 2 \text{ M}\Omega$                  |
| Leckstrom         | 20 pA bis 100 pA                           |

### Giga-Seal-Rate

Mit der jetzigen Generation von Sensorchips konnte in diesen Versuchen eine *Giga-Seal*-Rate von 60 % an suspendierten HEK 293  $\text{Na}_v 1.7$  erreicht werden. Ziel ist es, die *Giga-Seal*-Rate auf über 80 % zu erhöhen.

### Diskussion

Mit dem vorläufigen Systemaufbau des *Patch-on-Chip*-Systems PoreGenic® konnte in diesen Versuchen bereits gezeigt werden, dass *Patch-Clamp*-Ableitungen sowie pharmakologische Charakterisierungen an suspendierten HEK 293  $\text{Na}_v 1.7$  möglich sind. Der Vergleich mit dem klassischen *Patch-Clamp* (Abb. 6) zeigte geringe Abweichungen, die evtl. auf Unterschiede im Versuchsaufbau zurückzuführen sind. In den Vergleichsmessungen wurde das Lidocain über eine Perfusion kontinuierlich eingewaschen. Hingegen wurde es bei den Messungen mit dem derzeitigen PoreGenic®-Prototyp direkt in den Zellkulturtrög gegeben. Die Konzentration, die direkt an der Zelle wirkt, könnte dadurch verändert sein. Dies würde auch die Variabilität bei den Messungen erklären.

### Ausblick

Derzeit werden Experimente für die Optimierung der *Seal*-Widerstände an vernetzten adhären Zellkulturen durchgeführt. Dafür werden neue Technologien für eine Verbesserung der *Seal*-Qualität entwickelt, bspw. der Schutz der *Patch-Sites* vor Verunreinigung im Inneren (Abb. 7A).

Ein nächster Entwicklungsschritt sieht vor, die Lage von Zellen durch dielektrophoretische Zellpositionierung (DEP) auf dem MPSA zu steuern (Abb. 7B). Erste Versuche an L929 Tumorzellen mit integrierten DEP-Elektroden waren bereits erfolgreich.

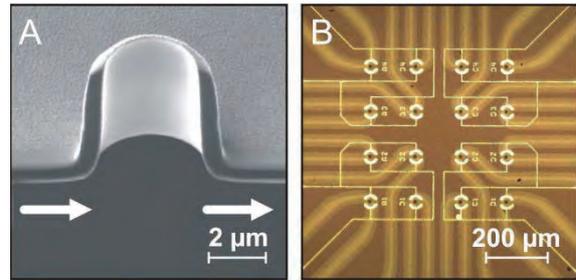


Abbildung 7. Nächstes Entwicklungsschritte.

**A:** FIB-REM-Aufnahme einer *Patch-Site* **B:** Oberfläche des Sensorchips mit 16 *Patch-Sites* und 32 DEP-Elektroden.

Mit der Lösung der technischen Herausforderungen kann das PoreGenic® *Patch-on-Chip*-System stabile Ganzzelleableitungen an Zellnetzwerken erreichen und somit die automatisierte Elektrophysiologie revolutionieren. Aufgrund der Menge an generierten Messdaten wird es notwendig sein, die Daten bereits *online* bezüglich relevanter Parameter aufzubereiten.

### Danksagung

Die Arbeiten am *Patch-on-Chip*-System PoreGenic® werden im BMBF-Projekt „PoreGenic® - Patch-on-Chip-System für Wirkstofftests und Grundlagenforschung an adhären vernetzten Zellen“ (Förderkennzeichen: 0315809) im Rahmen der Förderinitiative „Gründungsoffensive Biotechnologie“ (GO-Bio) am Lehrstuhl für Biophysik der Universität Rostock durchgeführt. Die Autoren danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Förderung und Finanzierung des Projektes.

Des Weiteren gilt unser Dank Frau R. Lange (IEF, IGS, Universität Rostock) für die Anfertigung von REM-Aufnahmen sowie Herrn M. Zwanzig (Fraunhofer IZM, Berlin) für die Erstellung von FIB-Präparationen sowie REM-Aufnahmen.

### Literaturliste

- [1] Tautorat, C., Franz, D., Gimsa, J., Baumann, W., Beikirch, H., and Koester, P.J. (2011). PoreGenic® - Patch-on-Chip-System für Zellnetzwerke. In 10. Dresdner Sensor-Symposium. G. Gerlach and A. Schütze, eds. TUDpress, 41-46.
- [2] Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85-100.
- [3] Catterall, W.A., Goldin, A.L., and Waxman, S.G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and

structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 397-409.

- [4] Fluxion Biosciences, I. Nav 1.7 and 1.8 Recordings on the IonFlux System. [www.novelscience.co.jp/img/products/ionflux/1050-05.pdf](http://www.novelscience.co.jp/img/products/ionflux/1050-05.pdf).
- [5] Chevrier, P., Vijayaragavan, K., and Chahine, M. (2004). Differential modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by the local anesthetic lidocaine. *Br. J. Pharmacol.* 142, 576-584.