

Einzelzelldrucker in Freiburg

Große Hoffnung in kleinen Tröpfchen

Foto: weilsus.com

■ Einzelzellanalyse ist der Goldstandard für die klonale Charakterisierung von Krebszellen. Auch in anderen Feldern wird sie inzwischen populärer, wobei der erste Schritt immer die effiziente und schonende Vereinzelung von Zellen ist. Ein Forscherteam aus Freiburg hat sich dieses Problems angenommen.

„Das Prinzip aller Dinge ist Wasser, denn Wasser ist alles und ins Wasser kehrt alles zurück.“ (Thales von Milet)

So etwas Ähnliches muss sich auch der holländische Naturforscher Antoni van Leeuwenhoek gedacht haben, als er im 17. Jahrhundert Teiche und Regenpfützen erkundete. Was er in den kleinen Wassertropfen fand, taufte er „animalcules“. Heute wissen wir, dass es sich bei seinen Funden um Einzeller, nämlich Protozoen und Bakterien, handelte. Doch die Faszination für diesen Mikrokosmos lebt in denen weiter, die schon einmal ein Teichwassertropfen unter dem Lichtmikroskop bestaunen durften.

Auch die Arbeitsgruppe von Peter Koltay vom Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung am Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK) in Freiburg interessiert sich für winzige Flüssigkeitstropfen. Diese sollen untersucht und berührungslos (also ohne menschlichen Kontakt) in beliebige Substrate appliziert werden – und manchmal mit so wenig Leben darin wie möglich.

Zu diesem Zweck entwickelten die Forscher unter anderem einen sogenannten Einzelzelldrucker. Mit ihm können winzige Flüssigkeitströpfchen generiert und appliziert werden; vergleichbar mit dem Prinzip eines Tintenstrahldruckers.

Der Clou der Methode ist jedoch, dass jeder erzeugte Tropfen nur eine einzige Zelle enthält.

Eine faszinierende Technik

Der Gedanke hinter der Einzelzellanalyse ist es, Signale zu erkennen, die in der Masse vieler Zellen möglicherweise übersehen oder nicht richtig gedeutet werden würden. Die Applikationsmöglichkeiten eines solchen Einzelzelldruckers sind daher vielfältig.

Großes Potential verspricht die Technik in der Krebsforschung wie Doktorand Julian Riba aus der Arbeitsgruppe von Koltay sowie Heiko Becker von der Universitätsklinik in Freiburg zeigen konnten.

In ihrer jüngsten Veröffentlichung war es den beiden mitsamt ihrem Team gelungen, mithilfe des Einzelzelldruckers Krebszellen aus verschiedenen Krebszelllinien wie auch aus der Blutprobe eines Leukämie-Patienten zu vereinzeln und zu sequenzieren (PLoS ONE 11: e0163455).

„Das System und dessen Arbeitsweise ist faszinierend“, erläutert Becker. Zu Beginn wird eine Zellsuspension in eine Kartusche gefüllt, die aus einem Silikonchip und einer Düse besteht. Ein Piezoelement auf der Rückseite verbiegt im nächsten Schritt die Silikonmembran und ein 160 Pikoliter kleiner Tropfen wird generiert. Über dessen Schicksal entscheidet eine Kamera, welche parallel Bilder des Prozesses aufnimmt. Dank eines Algorithmus werden Tropfen, die keine oder mehrere Zellen enthalten, erkannt und abgesaugt. Alle restlichen landen in Reaktionsgefäßen.

Zwei Kopien eines Gens ist nicht viel

„Dieser Prozess kann theoretisch unendlich oft wiederholt werden“, erklärt Becker und fährt weiter fort: „Für mich als Nicht-Ingenieur sind vor allem die technischen Fähigkeiten des Geräts beeindruckend“. Und nicht nur das: „Mit den parallel aufgenommenen Bildern sind wir in der Lage, jede einzelne Zelle auch morphologisch grob zu überprüfen.“ Damit ist es Riba und Becker möglich, einzelne Zellen anhand ihres Aussehens und ihrer Größe in großem Maßstab miteinander zu vergleichen und diese Daten molekulargenetischen Analysen gegenüberzustellen.

Doch die Arbeit mit einzelnen Zellen kann auch problematisch sein. „Es sind kleine DNA-Mengen, mit denen wir arbeiten müssen“, so Becker. „Pro Well gibt es nur zwei Kopien eines Gens. Das ist nicht viel.“ Doch durch eine Amplifizierung des Genoms könne das kompensiert werden. Die anschließende Sequenzierung kann dann Hinweise geben, ob und wie Mutationen in der DNA von Krebszellen auftreten und in welchem Zusammenhang sie mit gewissen Krankheitsbildern stehen. Langfristig ist das Ziel, die Therapie eines Krebspatienten mithilfe



Heiko Becker (l.) und Julian Riba (r.) tüfteln am Einzelzelldrucker.

Foto: Juliet Mezer

der Informationen aus der Einzelzellanalyse entsprechend anzupassen.

Praktisch und flexibel

Des Weiteren sticht hervor, dass der Einzelzelldrucker besonders flexibel in seiner Anwendung ist. Er passt problemlos unter eine Sicherheitswerkbank und funktioniert mit Einmal-Kartuschen, sodass man bei Bedarf auch steril arbeiten kann.

Zudem kann das von Riba und Becker vorgestellte Gerät leicht transportiert werden und beschränkt sich auf das Wesentliche – die Zellvereinzelung. „Bei beispielsweise mikrofluidischen Vereinzelungs-Chips ist das Problem, dass in diesen Technologien schon alles verbaut ist“, stellt Riba klar. Das vereinfacht zwar den Gebrauch für eine spezifische Anwendung, jedoch ist man hinsichtlich möglicher Änderungen stark eingeschränkt. Die durch den Einzelzelldrucker isolierten Zellen können dagegen einfach in eine Mikrotiterplatte abgegeben und dann beliebig bearbeitet werden.

Die Konkurrenz schläft nicht

Als Alternative zur Zellvereinzelung steht dem Einzelzelldrucker die aktuell noch deutlich häufiger verwendete Zell-sortierende Durchflusszytometrie gegenüber – den meisten besser bekannt als FACS (*fluorescence-activated cell sorting*). Im Vergleich schneidet der Einzelzelldrucker nach Meinung der Autoren je nach Anwendung aber besser ab. Denn beim Cell Sorter muss die Zelle in den meisten Fällen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Die den Farbstoff anregenden Laserstrahlen und die im Inneren entstehenden Scherkräfte können die Zelle möglicherweise negativ beeinflussen oder beschädigen. Ein weiterer Kritikpunkt ist der fehlende Nachweis bei Cell Sortern, dass tatsächlich nur eine einzelne Zelle isoliert wurde.

Darüber hinaus hatten Riba und Becker in ihrer Studie versucht, die Kosten so gering wie möglich zu halten. Dafür führten sie die Genom-Amplifikation mit einem Viertel des Volumens durch. Das Problem bei der Einsparung: Meist braucht man größere Mengen der Reagenzien um die Zellen vollkommen zu bedecken, da sich diese sonst wegen der elektrostatischen Aufladung an den Seitenwänden der Wells absetzen. Durch den Einsatz ionisierter Luft konnten Riba und Becker die Mikrotiterplatten jedoch neutralisieren, wodurch die Zellen treffsicher in den Reaktionsgefäßen landeten.

Für die Zukunft wollen die beiden die Mengen an Reagenzien noch stärker reduzieren, um weitere Kosten einzusparen.

Doch nicht nur in der Krebsforschung ist die Einzelzellanalyse sinnvoll. „Momentan beschäftige ich mich auch mit der Vereinzelung von Bakterienzellen“, erzählt Riba stolz. Denn viele Prokaryoten können unter Laborbedingungen gar nicht oder nur schwer angezchtet werden. Könnte man die Bakterien direkt einzeln analysieren, bräuchte man sie vorher gar nicht erst kultivieren. Damit könnte man etwa sehr genau und vor allem in kurzer Zeit Blut-, Stuhl- oder andere Proben von Patienten auf Pathogene untersuchen. Auch direkt in der Natur könnte man speziell in Extremhabitaten gezielt nach Organismen suchen, beispielsweise nach Schadstoff-abbauenden Mikroben.

Mit lauter Zukunftsmusik

Was in den Laborräumen am IMTEK in Freiburg als Prototyp steht, könnte es schon bald zu kaufen geben. Im Jahre 2014 gründete Koltay mit zwei Doktoranden und einem Wirtschaftswissenschaftler auf der Basis des Einzelzelldruckers das Freiburger Start-Up Unternehmen „cytena GmbH“. Die Firma produziert Einzelzelldrucker, die vom Prinzip her funktionieren wie das Gerät von Riba und Becker. Allerdings ist die momentan häufigste Anwendung eine andere: Die von cytena hergestellten Drucker werden überwiegend in der Pharmaindustrie zur Herstellung klonaler Zelllinien verwendet – wieder ein Beispiel dafür, wie flexibel die Technologie ist.

Riba selbst sieht im Markt für Einzelzellgenomik großes Potential, auch für den eigenen Einzelzelldrucker. „Wir wollen das Gerät noch weiter verfeinern und verbessern“, meint er. Ziel ist es, routinemäßig bis zu 1.000 Zellen aus Patientenproben zu vereinzelnd, damit die Daten in einem breiteren Kontext dargestellt und bei Bedarf einzeln ausgewertet werden können. Neben der Reduzierung der Reagenzolumina sollen etwa auch die Pipettiervorgänge weitgehend automatisiert werden.

Bis dahin haben die Wissenschaftler allerdings noch einen weiten Weg vor sich. Immerhin ist das IMTEK mit cytena schon seit Juni 2016 Teil des europäischen Projekts „SiBaGem“ – mit dem Ziel, ein Laborgerät speziell für Einzelzellgenom- und Transkriptomanalysen zu entwickeln.

Das freut Julian Riba ganz besonders: „Es ist schön zu sehen, wenn so was in der ganzen Welt gebraucht wird!“

JULIET MERZ

LABVOLUTION

world of labs.

- Die neue Fachmesse für innovative Laborausstattung und die Optimierung von Labor-Workflows
- Die ideale Geschäftsplattform für Nord-/Ost-/Westdeutschland und Nordeuropa

16. – 18. Mai 2017
Hannover • Germany

labvolution.de



Neuer Termin
im Frühjahr!



Deutsche
Messe

