

Gezielte chemische Stimulation einzelner Tabak Protoplasten mittels hochaufgelöster Wirkstoffabgabe

N. Wangler^{1*}, O. Brett¹, M. Laufer¹, M. Straßer¹, A. Dovzhenko², K. Voigt², K. Palme^{2,3}, M. Daub¹, R. Zengerle^{1,3}, und J. Steigert^{1,3}

¹ Universität Freiburg, Institut für Mikrosystemtechnik - IMTEK, Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, Georges-Köhler-Allee 103, 79110 Freiburg, Deutschland

² Universität Freiburg, Institut für Biologie II, Botanik

³ Centre for Biological Signalling Studies (bioss), Universität Freiburg

* nicolai.wangler@imtek.uni-freiburg.de, Tel.: +49 761 203 7321, Fax: +49 761 203 7322

Kurzfassung

Diese Arbeit präsentiert die diskrete und gezielte Abgabe von zwei individuell adressierbaren Substanzen im unteren pL-Bereich (10 pL) mit einer hohen räumlichen ($< 50 \mu\text{m}$) und zeitlichen ($< 100 \mu\text{s}$) Auflösung zur chemischen Stimulation einzelner Zellen. Die Zellen werden in einer dünnen Alginatschicht kultiviert und durch kleine Tropfen ($d_{\text{Tropfen}} = 25 \mu\text{m}$) beschossen, die einen zu Tabak-Protoplasten vergleichbaren Durchmesser ($d_{\text{Protoplast}} = 30 \mu\text{m}$) aufweisen. Das kleine Volumen erzeugt im unmittelbaren Umfeld der Zielzelle eine wohl definierte Wirkstoffkonzentration, während der Konzentrationsgradient aufgrund der dreidimensionalen Diffusion mit wachsender Distanz drastisch abfällt und somit zeitnah zu einem extrem niedrigen Hintergrundsignal führt. Demonstriert wird dies durch die hoch aufgelöste Färbung eines einzelnen Protoplasten der Tabakpflanze mit Carboxyfluoresceindiacetat.

Abstract

We present the discrete release of two individually addressable substances in the sub pL-range (10 pL) with a high spatial ($< 50 \mu\text{m}$) and temporal ($< 100 \mu\text{s}$) resolution for the stimulation of single cells, embedded in a thin alginate layer. This is ensured by dispensing a small droplet ($d_{\text{droplet}} = 25 \mu\text{m}$) with a diameter smaller or comparable to a single tobacco protoplast ($d_{\text{protoplast}} = 30 \mu\text{m}$). Furthermore, the pL-volume generates defined drug concentration at the target cell while the concentration gradient in the vicinity decreases drastically in time due to the three dimensional diffusion and leads to extremely low background signals. This was proven by highly resolved labelling of a single tobacco protoplast with carboxyfluorescein diacetate.

1 Einleitung

Seit der ersten Regeneration von *Nicotiana tabacum* aus Mesophyll-Protoplasten [1] können mittlerweile weit mehr als 100 verschiedene Pflanzenarten aus Protoplasten regeneriert werden. Hierfür werden die Protoplasten gewöhnlich in flüssigen Medien oder Gel-Matrizen eingebettet [2] und in der gesamten Zellkultur mit verschiedenen Medien (z.B. Auxine) behandelt. Eine gezielte Behandlung einzelner Zellen eröffnet hier neue Wege für die Forschung in der Pflanzen-Biologie. Durch die Möglichkeit einzelne Zellen innerhalb einer Zellkultur auf verschiedene Weise zu manipulieren, können Verhalten und Wachstum der Zellen direkt miteinander verglichen werden.

2 Experimenteller Aufbau

In einer dünnen Alginatschicht kultivierte Protoplasten der Tabakpflanze [1] werden in diesem Experiment unter einem inversen Mikroskop betrachtet. Währenddessen wird der Dispenser in einem Abstand von 0,3 - 0,5 mm über einem einzelnen Protoplasten an der Oberfläche der Alginatschicht positioniert (siehe Abbildung 1). Für eine eindeutige Visualisierung der Einzelzellstimulation wird in diesem Experiment eine einzelne Zelle mit Carboxyfluorescein Diazetat (CFDA) [2] markiert. Bei CFDA handelt es sich um ein zellmembranpermeables Molekül, das frei in den Protoplasten diffundiert und in der Zelle zu Carboxyfluorescein und Essigsäure dissoziiert, wobei Carboxyfluorescein nicht weiter durch die Zellmembran diffundieren kann und somit das Innere der Zelle dauerhaft markiert.

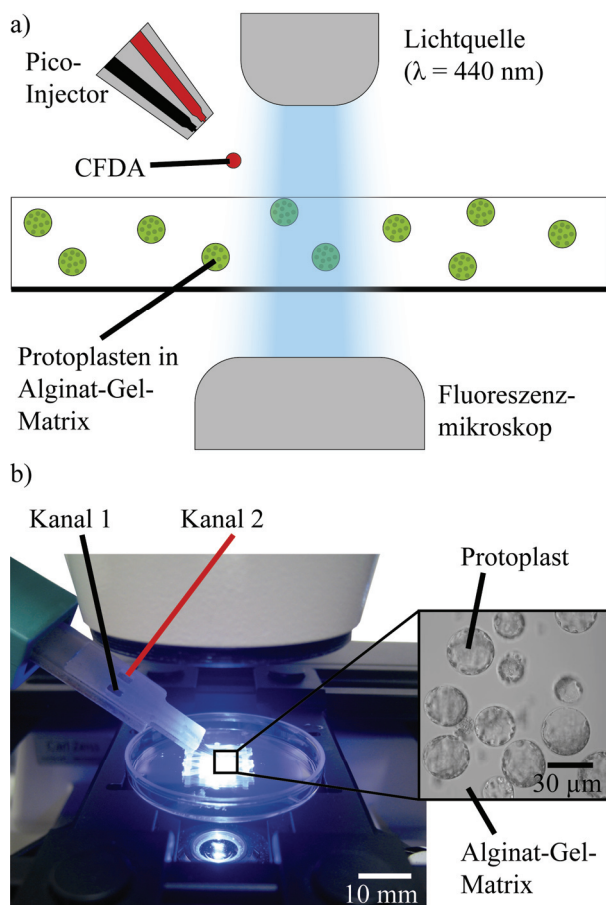


Abbildung 1 Stimulation einzelner in Alginat-Gel-Matrix kultivierter Protoplasten a) Mittels diskreter spezifischer Abgabe kleinster Mengen Wirksubstanz (10 pL) können einzelne Protoplasten stimuliert oder modifiziert werden. Der präsentierte Zweikanaldispenser erlaubt die individuelle Abgabe zweier unterschiedlicher Fluide mit einer hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung. Ein Fluoreszenzmikroskop ermöglicht eine gleichzeitige Versuchskontrolle. b) Foto des Versuchsaufbaus: Der Zweikanaldispenser ist zur gezielten Stimulation einzelner Protoplasten ausgerichtet.

3 Der 2-Kanaldispenser Pico-Injector

Die sowohl räumlich als auch zeitlich hoch präzise Abgabe kleinster Wirkstoffmengen mit einem Tropfendurchmesser in der Größenordnung des Zelldurchmessers ($d_{\text{Protoplast}} = 30 \mu\text{m}$) beziehungsweise kleiner ist die ausschlaggebende Schlüsselspezifikation für eine gezielte chemische Stimulation von Einzelzellen [4]. Die Stimulation einzelner Zellen impliziert, dass Reproduzierbarkeit und hohe räumliche Auflösung der Tropfenposition als essentielle Kriterien unabdingbar sind. Der für diese Applikation entwickelte Bubble-Jet Dispenser zeichnet sich durch eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung aus.

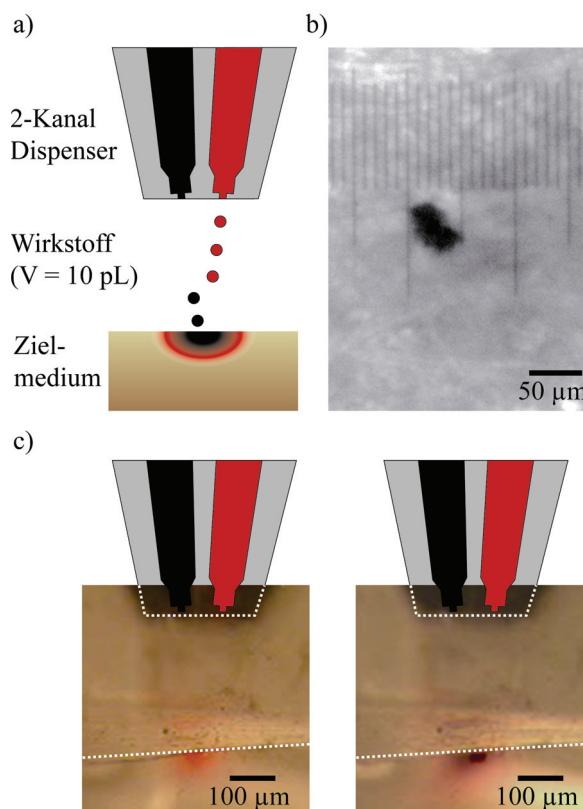


Abbildung 2 Aktuation des Zweikanaldispensers a) Durch die individuelle Ansteuerung der beiden Aktoreinheiten können verschiedene Stimulationsprotokolle gefahren werden. Der Dispenser erlaubt eine gezielte Abgabe von pL-Tropfen ($V = 10 \text{ pL}$, $d_{\text{Tropfen}} = 25 \mu\text{m}$) b) Die abgegebenen Tropfen treffen in einem Bereich von $\text{Ø} < 50 \mu\text{m}$ (5 Tropfen) auf. c) Fotografie der räumlich hoch aufgelösten Tropfenabgabe zweier Fluide (zur Visualisierung wurden pro Bild mehr als 100 Dosierungen abgegeben).

Der Dispenser erlaubt die getriggerte Abgabe (0 – 11 kHz) kleinster Tropfen ($V = 10 \text{ pL}$; $d_{\text{Tropfen}} = 25 \mu\text{m}$), welche auf einem definierten Punkt ($< 50 \mu\text{m}$) auftreffen (siehe Abbildung 2c). Dies führt zu einer für die gezielte Einzelzellstimulation idealen Kombination aus zeitlich und räumlich präziser Wirkstoffabgabe. Die zwei getrennt von einander ansteuerbaren und auf einen Punkt fokussierten Kanäle des Pico-Injectors erlauben weiter die individuelle Abgabe von zwei verschiedener Medien und so eine Vielzahl anwendungsspezifischer Stimulationsprotokolle. Nach der gezielten Manipulation einer einzelnen Zelle mit Wirkstoff aus dem einen Kanal, kann beispielsweise mittels des zweiten Kanals diese Zelle zur späteren Beobachtung markiert werden (siehe Abbildung 2a).

4 Stimulation einzelner Protoplasten

Nach der Auswahl eines geeigneten Protoplasten an der Oberfläche der dünnen Alginat-Gel-Matrix im Hellfeld (siehe Abbildung 3a) wird der Pico-Injector relativ zu dieser Zelle positioniert. Während der Tropfenabgabe ($t = t_0$) kann das Auftreffen des einzelnen CFDA-Tropfen (10 pL) deutlich sichtbar unter Fluoreszenz beobachtet werden (siehe Abbildung 3b). Das Zusammenspiel aus kleinstem Volumen (10 pL) und 3-dimensionaler Diffusion führt zu einem vernachlässigbar kleinen Hintergrundsignal innerhalb weniger Sekunden, trotz der verlangsamten Diffusionskonstante des CFDA im Alginat-Gel. So emittiert nach der Diffusion des Fluoreszenzfarbstoffes ($t = t_0 + 5$ s) nur noch die markierte Zelle (siehe Abbildung 3c).

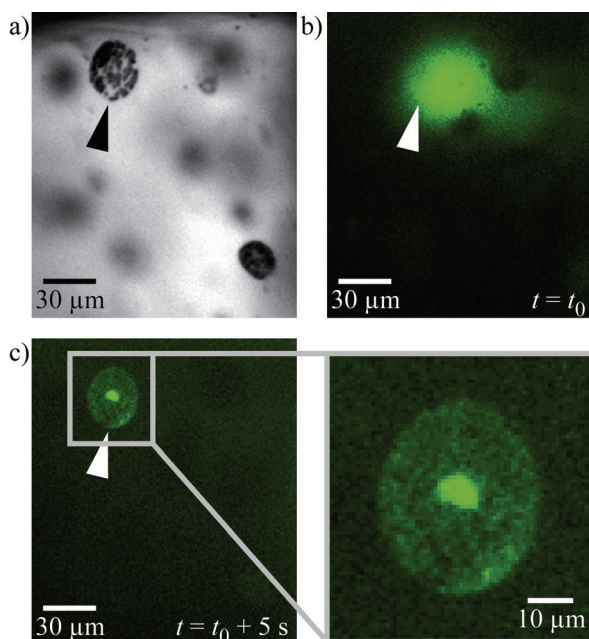


Abbildung 3 Markierung eines einzelnen Protoplasten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluoresceindiacetat (CFDA) a) In einer dünnen Alginatschicht kultivierte Protoplasten der Tabakpflanze an der Oberfläche der Gelschicht. b) Fluoreszenzsignal unmittelbar nach der Tropfenabgabe: Das CFDA beginnt ins Gel zu diffundieren. c) Fluoreszenzsignal eines markierten Protoplasten nach fünf Sekunden. Innerhalb weniger Sekunden diffundiert der Fluoreszenzfarbstoff in die Zelle und zerfällt dort zu Essigsäure und Carboxyfluorescein. Das Carboxyfluorescein kann nicht weiter durch die Zellmembran diffundieren. Aufgrund des kleinen Tropfenvolumens und der dreidimensionalen Diffusion des CFDA wird nur der getroffene Protoplast markiert, während das Hintergrundsignal vernachlässigbar bleibt.

5 Ausblick

Die Möglichkeit einer gezielten diskreten Wirkstoffabgabe im unteren pL-Bereich mit einer hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung ebnet den Weg zu einer großen Anzahl neuer Experimente und Entwicklungen in der Biologie. Mit Hilfe des beschriebenen Setups können individuelle Stimulationsprotokolle mit zwei einzeln adressierbaren Wirksubstanzen auf einzelne Zellen angewandt werden. Zukünftige Anwendungen für dieses Setup können unter anderem z.B. die Untersuchung spezifischer Ionenkanäle, biologische Signaltransduktionsanalysen oder Wirkstoff-Screenings sein.

6 Danksagung

Wir danken der Hans L. Merkle Stiftung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes. Weiter danken wir dem Reinraum Cervice Center des IMTEK und das HSG-IMIT für die gute Kooperation.

7 Literatur

- [1] I. Takebe, et al., *Naturwissenschaften*, 58, p. 318-320, 1971
- [2] A. Dovzhenko, et al., *Protoplasma*, 204, p. 114-118, 1998
- [3] 5-Carboxyfluorescein diacetate (CFDA), Sigma Aldrich Chemie GmbH, www.sigmaaldrich.com
- [4] A. van den Berg, et al., *Lab on a Chip*, 7, p. 544-546, 2007