

Zellbasierte Sensoren

Fallstudie im Rahmen der Vorlesung
Mikrosysteme

Von: Karen Strub, Thomas Schollbach, Sabrina Giannone

02.06.2010

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abstract | 3 |
| Einleitung | 3 |
| Messverfahren Biosensoren..... | 4 |
| Arten von zellbasierten Biosensoren | 4 |
| Aufbau von Biosensoren | 5 |
| Auswahl des richtigen Biosensors | 5 |
| Vergleich chemische Sensoren und Biosensoren..... | 6 |
| Funktionsweisen der Biosensoren | 7 |
| Mikroorganismen-basierte Biosensoren | 7 |
| Fluoreszenzuntersuchung von zellulären Funktionen..... | 8 |
| Zelluläre Biosensoren basierend auf Zellmetabolismus..... | 8 |
| Impedanz-Analyse für Zellfunktionen | 9 |
| Zelluläre Biosensoren basierend auf intrazelluläre Potentiale..... | 9 |
| Extrazelluläres Potential als Basis für zellbasierte Biosensoren..... | 10 |
| Haltbarkeit des Biosensors..... | 12 |
| Zusammenfassung | 12 |
| Warum zellbasierte Biosensoren?..... | 12 |
| Anwendungsbereiche..... | 13 |
| Fazit..... | 13 |
| Literaturverzeichnis..... | 14 |
| Abbildungsverzeichnis..... | 14 |

Abstract

Die Forderung nach immer tieferen Nachweisgrenzen in der Analytik und gleichzeitig hoher Spezifität des Messsystems zum einen und die Untersuchung von Umweltwirkungen und Toxizität von Chemikalien generell zum anderen verlangt nach neuartigen Sensortechniken. Biosensoren scheinen den extremen Anforderungen gewachsen, haben sich in der Natur bewährt und die junge Technik der zellbasierten Sensoren eröffnet zudem noch viele weitere Felder an Untersuchungsmethoden und sind Hoffnungsträger in der Medizin. Diese Fallstudie erläutert die Funktionsweise dieser Sensoren, unterscheidet sie von anderen Messtechniken (chemischen und enzymatischen) und nennt (auch zukünftige, visionäre) Anwendungen.

Einleitung

(vgl. (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung UFZ))

Ein Biosensor ist ein sich geschlossenes integriertes System, bestehend aus einer selektiv erkennenden biologischen Komponente (biologischer Rezeptor) und einem Signalwandler (Transduktor).

Früher hatte man nur enzymatische Biosensoren, heute werden enzymatische und zellbasierte Biosensoren unterschieden.

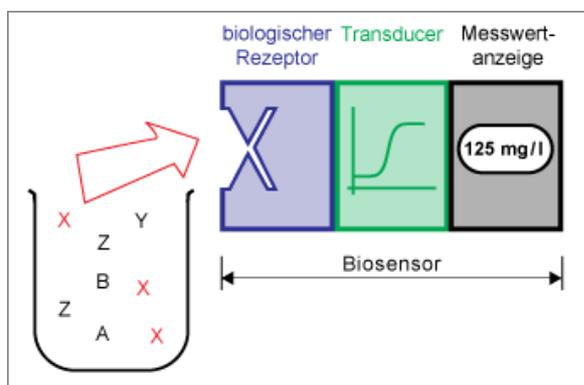


Abbildung 1 (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung UFZ): Funktionsweise Biosensor

Biosensoren werden zur selektiven Bestimmung eines Analyten in einem komplexen Gemisch eingesetzt. Die grundsätzliche Funktionsweise kann anhand der Abbildung 1 grob und einfach erklärt werden:

Die biologische Erkennungsreaktion des Rezeptors wird am Transduktor in ein elektronisch verwertbares Signal umgesetzt.

Messverfahren Biosensoren

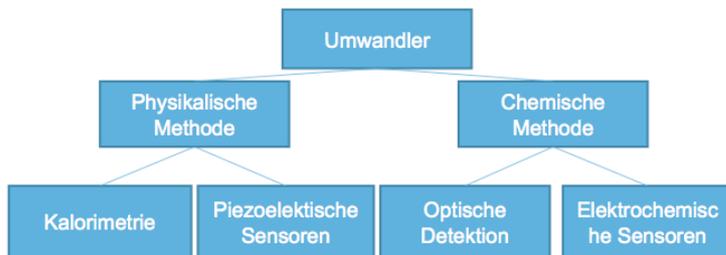


Abbildung 2 (Tomaschitz): Grundarten der Detektion

Es wird zwischen physikalischen und chemischen Messmethoden unterschieden.

Arten von zellbasierten Biosensoren

Es gibt Sensoren mit Einzellern (Bakterien bzw. Hefen), welche auch als *microbial biosensors* bezeichnet werden.

Bei multizellulären Sensoren wird nochmals zwischen Sensoren mit Pilzen als biologischer Rezeptor oder Sensoren mit Zellen oder auch Zellgeweben (*tissue biosensors*) von höheren Tieren und Pflanzen unterschieden. Erwähnt werden sollten auch die auf Erythrozyten basierenden Sensoren, welche den Einzeller-Sensoren ähnlich sind.

Werden mehrere unterschiedliche Zellen in einem Biosensor vereint, können mehrstufige Enzymreaktionen stattfinden oder Signale der ersten Zelle in der weiteren Zelle verstärkt werden.

Aufbau von Biosensoren

Benutzt werden Reaktor- und Membranbiosensoren.

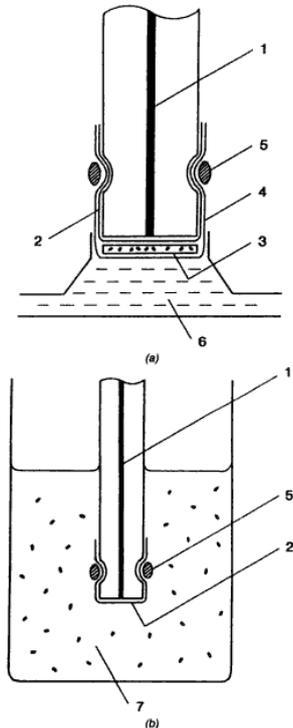


FIGURE 2.2. (a) Membrane biosensor and (b) Reactor biosensor, both with an oxygen electrode as a transducer; 1—platinum cathode, 2—teflon membrane, 3—membrane with immobilized cells, 4—dialysis membrane, 5—rubber O-ring, 6—chamber with a sample, 7—cell suspension with a sample in a reaction vessel.

Abbildung 3 (Racek, 1995): Aufbau Biosensor; a) Membranbiosensor, b) Reaktorbiosensor

Je nach Bauform muss die Membran nicht ständig nach einer Messung regeneriert werden, sondern kann mehrere Male gebraucht werden.

Auswahl des richtigen Biosensors

Sensoren mit ganzen Zellen werden oft in der Toxikologie und der Pharmazie verwendet. Dies geschieht mit genetisch modifizierten Zellen, welche nach Kontakt mit einem Analyten spezielle Proteine bilden. Diese Proteine werden danach erfasst.

Den grössten Markt bilden die Glukosesensoren (stellvertretend für Enzymsensoren). Diese müssen nach der Messung des Analyten gereinigt werden, um wieder eingesetzt werden zu können.

Bei enzymatischen Sensoren müssen die Enzyme isoliert, gereinigt und immobilisiert werden. Bei zellbasierten Biosensoren entfällt dieser Schritt.

Die Haltbarkeit der Enzyme in einer lebenden Zelle ist höher und ermöglicht multi-step Enzymreaktionen. Einfacher ausgedrückt: man vermeidet viele Probleme, wenn man die Enzyme in ihrer natürlichen Umgebung belässt.

Nachteil dieser Biosensoren ist die Reaktionsgeschwindigkeit, da die Moleküle zunächst in die Zelle eindringen müssen.

• **Enzymatische Sensoren:**

- Häufig mit Oxidasen oder Reduktasen
- Transduktion meist optisch oder amperometrisch
- Auch Sensoren mit bi-Enzymatischen Systemen und Co-Enzymen

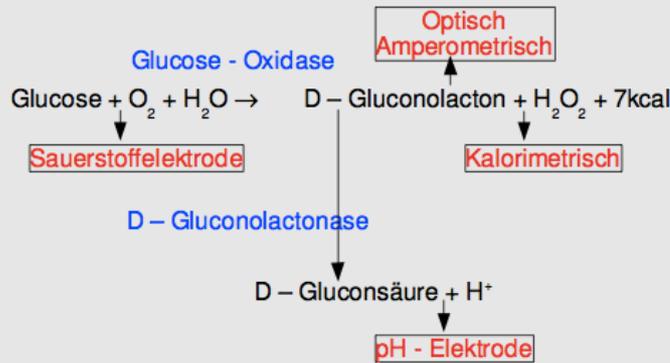


Abbildung 4 (C-Cit): Enzymatische Sensoren

Vergleich chemische Sensoren und Biosensoren

(vgl. (C-Cit))

| Chemische Sensoren | Biosensoren |
|--------------------------------|---|
| schlechtere Nachweisgrenze | sehr tiefe Nachweisgrenze |
| Reversibel | Reversibel oder regenerierbar |
| Häufig ohne Reagenzien | Häufig mit Reagenzien |
| Lebensdauer eher lang (Monate) | Lebensdauer eher kurz (Tage bis Monate) |
| Kostengünstig | Eher teuer |
| Rasche Ansprechzeit | Ansprechzeit unterschiedlich |

Tabelle 1: Vergleich chemische Sensoren und Biosensoren

Funktionsweisen der Biosensoren

Biosensoren funktionieren nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip mit anschliessender Zellreaktion am Zielmolekül.

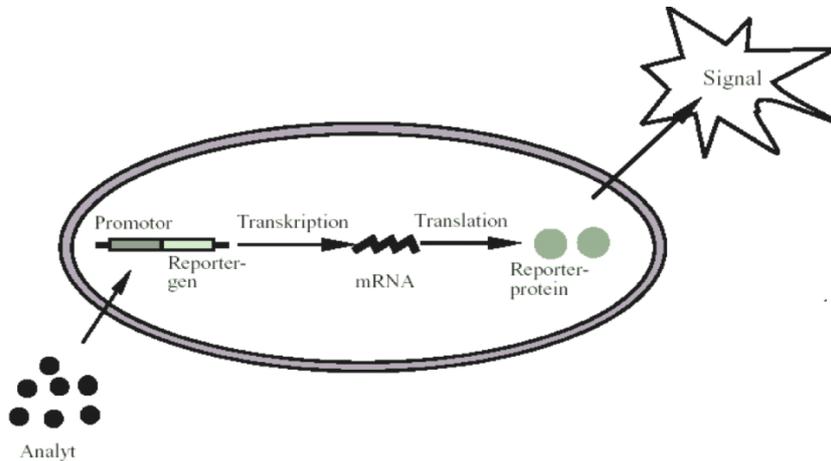


Abbildung 5 (C-Cit): Funktionsweise

Die Enzyme tauschen Elektronen mit den Elektroden der Messeinrichtung aus. Alternativ können bei zellbasierten Systemen auch andere Grössen gemessen werden, beispielsweise Umgebungsbedingungen (Änderungen des pHs, der Temperatur, etc.).

Aus diesem Grunde sind auch die Messeinrichtungen (Transduktoren), welche die Umwandlung eines Signals vom Gewebe zu einem elektrischen Signal zur Weiterverarbeitung, also zur Datenanalyse, umsetzen, verschieden:

- Mit Ionen sensitive Elektroden, die spezifisch auf einen Ionentypen reagieren
- Genereller und damit auch anfälliger für Interferenzen sind nach der Methode der Konduktometrie / Voltmetrie arbeitende Transduktoren (Änderungen des intrazellulären oder des extrazellulären Potentials der Zelle)
- Optische Messungen (Zellfluoreszenz)
- Temperaturmessung
- Bestimmung des Metabolismus der Zelle

Mikroorganismen-basierte Biosensoren

(vgl. (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999))

Gewisse Analyten wie Verunreinigungen können Mikroorganismen aktivieren, welche einen Metabolismus oder nicht-spezifischen Zellstress auslösen, dass zur Expression einer oder mehrerer Gene führt. Zum Beispiel zog bei immobilisierten Hefen, welche Formaldehyd exponiert wurden, die Änderung im Metabolismus eine Änderung des extrazellulären Säuregehaltes nach sich.

Eine weitere Sensor-Methode beinhaltet gentechnisch veränderte Bakterien, welche ein biolumineszenter Reporter-Gen mit der Promotor-Sequenz eines Genes an der relevanten Stelle verschmelzen lassen.

Modifizierte Bakterien haben als Zellsensorelemente zur Detektion von Naphthalin und seiner metabolischen Produkte Salicylat, Benzen, Toluol, Quecksilber und Oktan geführt. Allerdings sind Verunreinigungen oftmals Mischungen, und die Gegenwart anderer stimulierender oder hemmender Substanzen in einer Probe kann die Integrität des Nachgewiesenen beeinträchtigen.

Fluoreszenzuntersuchung von zellulären Funktionen

(vgl. (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999))

Fluoreszenzverfahren haben sich als wichtiges Werkzeug bei der Überwachung von Änderungen der Konzentration von Ionen und Proteinexpression bei Zellsignalen erwiesen.

Das kommerziell verfügbare FLIPR™ (Fluorometric imaging plate reader) ermöglicht hohe Durchsatzraten bei der fluorometrischen Untersuchung von Membranpotential und interzellulärem Kalziumaktivierung.

Bei der Fluoreszenztechnik sind zwei wichtige Punkte zu beachten:

1. Die Zelle mit Fluoreszenzmittel zu bestücken ist eine invasive Methode, welche die Zelle beschädigen kann.
2. Autofluoreszenz muss bei der Wahl des Analyten beachtet werden, denn es kann zu Hintergrundinterferenzen kommen und das Signal könnte somit negativ beeinflusst werden.

Zelluläre Biosensoren basierend auf Zellmetabolismus

(vgl. (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999))

Diese Kategorie von zellulären Biosensoren verlässt sich auf die Messung des energetischen Metabolismus, der allgemein in allen lebenden Zellen vorkommt.

A

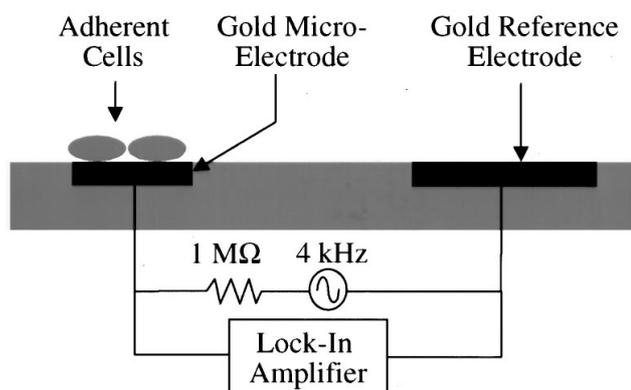


Abbildung 6 (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999): Cytosensor®

Erklärung zu Abbildung 6: Das Silikonmaterial ist isoliert mit Oxynitrid, das pH-sensitiv und photoreaktiv ist und mit dem Licht, das von den LEDs emittiert wird, reagiert. Der resultierende Photostrom I ist von der Gittervorspannung abhängig.

Cytosensor® (siehe Abbildung 6): Licht-adressierbarer, potentiometrischer Sensor welches misst extrazelluläres pH misst, das mit der zellulären metabolischen Aktivität korreliert. Man benutzt diesen Biosensor bei verschiedenen Zellentypen, wie z.B. ZNS-Neuronen, Hepatozyten, Neutrophile, Endothelzellen und bei unterschiedlichen Rezeptoren in den Zellen, wie z.B. GABA, welches die Erhöhung des Zellmetabolismus und eine nachfolgende Erhöhung der extrazelluläre Acidose verursacht.

Impedanz-Analyse für Zellfunktionen

(vgl. (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999))

Es ist schon lange bekannt, dass biologisches Material, inklusive Zellen, dielektrische Eigenschaften hat. Mit diesem Wissen kann man Zellen über eine oder mehrere Elektroden kultivieren und somit nichtinvasive Analysen über zelluläre Haftung, Verteilung, Sterberate etc. durchführen (siehe Abbildung 7).

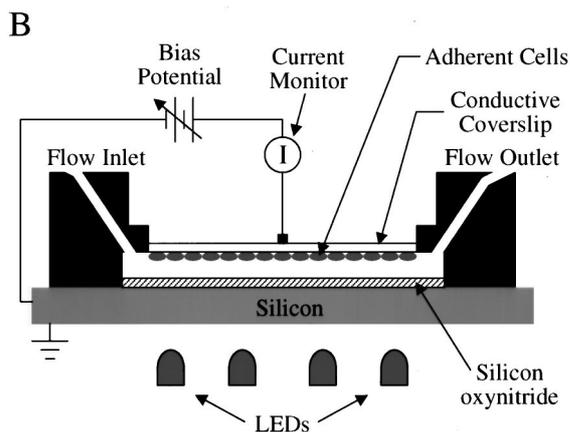


Abbildung 7 (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999): Zelluläres Impedanz-System

Erklärung zu Abbildung 7: Schematische Darstellung eines zellulären Impedanz-System, um morphologische Veränderungen wie Haftung und Sterblichkeit von Zellen zu analysieren

Intakte lebende Zellen sind bei tiefen Signalfrequenzen sehr gute elektrische Isolatoren. Während sich die Zelle langsam über die Oberfläche der Elektroden verbreitet, erhöht sich die Impedanz der Elektroden. Diese Methode wird gebraucht, um das Verhalten von Zellen bei Problemen von nicht-erregbaren Zellen (nonexcitable cell types) z.B. Makrophagen, 77 Endothelzellen, 148 und Fibroblasten zu analysieren.

Zelluläre Biosensoren basierend auf intrazelluläre Potentiale

(vgl. (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999))

Ein wichtiger Aspekt der Information, welche man durch zellbasierte Biosensoren erhält, ist die physiologische Signifikanz der Analyten zum Organismus. Hierzu betrachtet man das bioelektrische Phänomen, das charakteristisch ist für erregbarere Zellen um Funktionalitätsinformationen bezüglich Zellstatus zu erhalten. Es ist bekannt, dass Membranerregbarkeit ein Schlüssel zur physiologischen

Rolle von Neuronen und Myokardiozyten bei der Kontrolle von Ausscheidungen und Kontraktion ist. Deshalb haben Analyten, welche die Membranerregbarkeit beeinflussen, eine massive Wirkung auf das Organismus.

Mit dem Gebrauch von Glas-Mikroelektroden kann man Zellmembranpotentiale direkt beobachten.

Ein weiteres interessantes Gebiet ist, ob man mit zellbasierten Sensoren chemische Waffen, wie z.B. VX und Soman (GD) detektieren kann. In einem Versuch mit Ganglienneuronen des Frosches, zeigen die Gifte VX und Soman (GD), dass sie die Membranerregbarkeit gleich beeinflussen wie eine spannungsgesteuerte Ca-21 Kanalblockade.

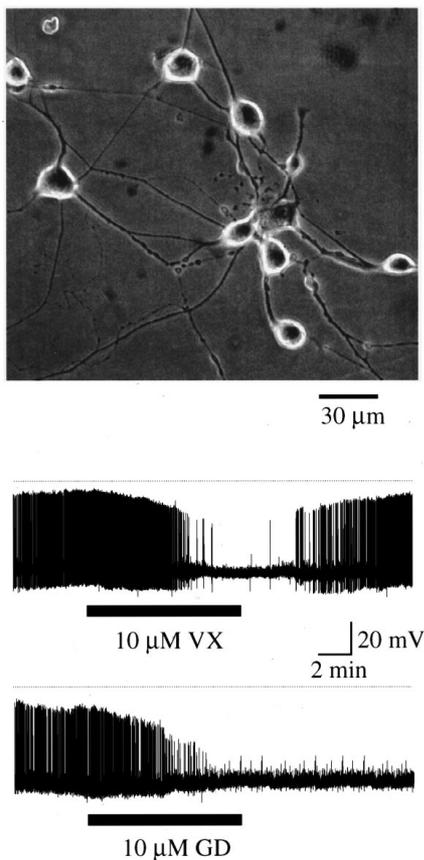


Abbildung 8 (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999): spontanes Feuern in NG108-15-Zellen

Abbildung 8 zeigt das spontane Feuern in NG108-15-Zellen, welche markant von der Exponierung mit den chemischen Stoffen VX und GD beeinflusst worden sind. Bei GD bleibt die Zelle permanent depolarisiert, bei VX hingegen ist die Hyperpolarisation wieder reversibel. Dieses Beispiel zeigt das man erregbare Zellen als Sensoren verwenden kann um chemische Waffen zu erkennen.

Extrazelluläres Potential als Basis für zellbasierte Biosensoren

(vgl. (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999))

Im Gegensatz zu intrazelluläre Potentialmessung ist der Vorteil der extrazellulären Potentialmessung, dass sie nicht invasiv ist. Somit kam sie in den letzten Jahren vermehrt zum Einsatz. Die extrazelluläre

Potentialmessung bietet folglich eine langfristige Möglichkeit an Biopotentiale zu beobachten.

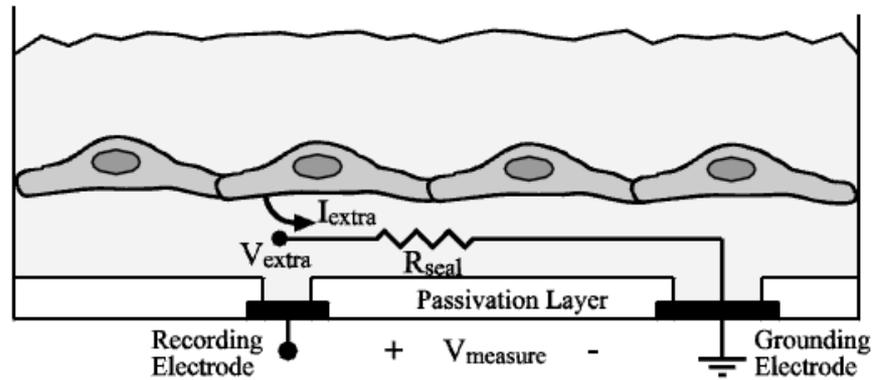


Figure 2.6: Illustration showing the source of the extracellular signal detected with the microelectrode. The ionic current (I_{extra}) generated by the cells flows through the resistive cell media (R_{seal}). Local potentials (V_{extra}) are created that can be measured relative to a distant reference potential (here ground).

Abbildung 9: extrazelluläre Potentialmessung

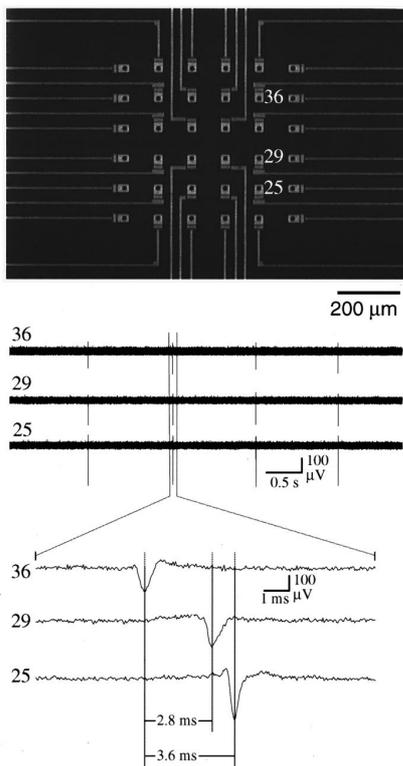


Abbildung 10 (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999)

Abbildung 10 illustriert, wie man mit Multielektroden-Arrays die Potentiale von einem Monolayer aus Myokardiozyten von Küken aufzeichnen kann. Dieses planare Multielektroden-Array erlaubt simultane nicht-invasive Aufnahmen von erregbarem Gewebe, um Aktionspotentialweiterleitungen zu messen. Das Mikroelektroden-Array wurde im IC Labor der Stanford Universität fabriziert. Es besteht aus 36 Mikroelektrodenstellen, welche im Durchmesser 10 μ m sind. Das Array wurde mit

photolithographischer Technik hergestellt, indem man die Mikroelektroden auf Gold aufgetragen hat.

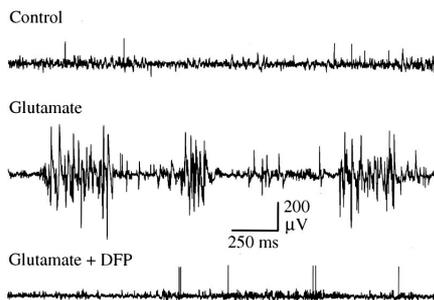
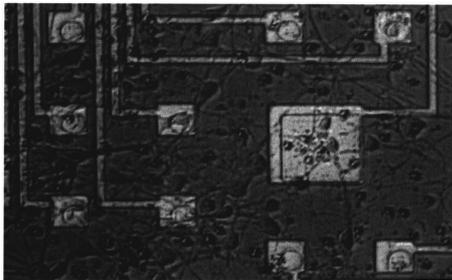


Abbildung 11 (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999): Rückenmarkneuronen

In Abbildung 11 werden Kulturen von Rückenmarkneuronen von Ratten für toxikologische Evaluationen angeschaut.

Upper panel: Phasenkontrastbild von Embryo-Rückenmarkneuronen von Ratten wurden 18 Tage lang auf einem Mikroelektroden-Array kultiviert. Die Zellen wurden auf einem selbstorganisierenden Monolayer-Substrat von Aminosalinen unter serumfrei definierten Mediumkonditionen kultiviert. Hinzugabe von 50 mM Glutamat verstärkte die Spannungsspitzen um ein Vielfaches. Die Administration von 25mM DFP (Organophosphat, Diisopropylfluorophosphat) hat eine bemerkbare Entfernung der spontanen Feuerung aufgezeigt. Diese Tatsache verdeutlicht den Nutzen von auf Mikroelektroden-Arrays kultivierte Neuronen für die Detektion von toxischen Verbindungen.

Haltbarkeit des Biosensors

Die Haltbarkeit ist von Sensor zu Sensor verschieden.

Die zellbasierten Biosensoren stellen gegenüber den enzymatischen Sensoren eine Verbesserung dar, da hier die Enzyme und Proteine in ihrer natürlichen Umgebung operieren.

Zusammenfassung

Warum zellbasierte Biosensoren?

Die Empfindlichkeit von Biosensoren ist in der Regel hoch, das heißt, es reichen wenige Moleküle, um einen Reiz auszulösen. Beispiele dafür sind Na^+ - Kanäle, die sich durch angedockte Proteine öffnen, oder Steroide, die in der Zelle Reaktionen beeinflussen oder auslösen.

Auch hat es einen generelleren Aspekt: Biosensoren helfen zu verstehen, wie Zellen oder Zellorganellen funktionieren, wie Signalmoleküle mit Zielmolekülen interagieren und wie das

Immunsystem sowie das Hormonsystem arbeiten. All dies hilft, entsprechende Medikamente ganz spezifisch entwickeln zu können.

Anwendungsbereiche

Anwendung finden Biosensoren in der Medizin, der Umweltanalytik, der Nahrungsmittelkontrolle sowie auch bei der Detektion von Giften und Drogen (speziell zur Blutzuckerbestimmung und Sauerstoffsättigung).

Anwendungsbereiche sind sowohl ausserhalb als auch innerhalb des Körpers zu finden und sehen. Visionäre Anwendungen, wie Moleküle, die Krebszellen ausfindig machen und somit kleinste Tumore lokalisieren, bevor diese eine tastbare Grösse erreichen, lassen Recherchen auf dem Biosensorenfeld weiter zu. Auch künstliche Organe und Anbindung des Menschen an den Computer gehören zu den Visionen der Forscher im Biosensorenbereich.

Fazit

Zellbasierte Biosensoren stellen ein vielversprechendes Forschungsfeld dar mit unzähligen Anwendungen, welche vom pharmazeutischen Screening bis zum Umweltmonitoring reichen. Zellen bieten ein Spektrum an natürlich sich weiterentwickelten Rezeptoren und Wege, welche auf einen Analyt in physiologisch relevanter Weise reagieren können. Enzyme, Rezeptoren, Kanäle und andere Signalproteine, welche Ziele eines Analytes sein können, reagieren hochspezifisch, liefern aber keine funktionellen Informationen. Daraus resultiert eine kritische technologische Lücke in der Fähigkeit unbekannte oder gentechnisch veränderte biologische Agenten zu detektieren und somit den Schweregrad einer allfälligen Bedrohung zu bemessen. Aufgrund dieser wachsenden Bedenken ist der Bedarf, eine generelle Biodetektion für ein breites Spektrum an vorausgeahnten und unbekanntem Drogen zu finden, äusserst wichtig. Es wird vorausgesagt, dass Studien, welche zum Finden von Signalwegen Immunzellen gebrauchen und so eine Klassifizierung von biologischen Agenten bringen könnten, in Zukunft stark an Bedeutung gewinnen werden.

Der Gebrauch von lebenden Zellen als Sensorelement nutzt die natürlich evolvierte Empfindlichkeit von lebenden Zellen. Weil zellbasierte Biosensoren direkt physiologische Funktionen messen können, liefern sie Fähigkeit, bis dahin unbekanntem Agenten zu detektieren. Bevor aber zellbasierte Biosensoren in kritischen Applikationen eingesetzt werden, muss ihre Leistung / Erfolg validiert werden. Besondere Belange, welche angesprochen werden müssen, sind die Reproduzierbarkeit der Sensorantworten bei verschiedenen Zellpopulationen, die Anfälligkeit / Empfindlichkeit von zellbasierten Biosensoren auf Lärmquellen, die Fähigkeit, verschiedene Typen und Konzentrationen von chemischen Mitteln zu unterscheiden, und die Anwendbarkeit der zellbasierten Biosensoren in realistischen Applikationen.

Literaturverzeichnis

Canh, T. M. (1993). *Biosensors*. London: Champan & Hall and Masson.

C-Cit. (kein Datum). Abgerufen am 20. Mai 2010 von http://www.c-cit.ch/public/hsw/061114_Biosensoren.pdf

Cooper, J. M., Cooper, J., & Cass, A. E. (2004). *Biosensors*. Oxford: Oxford University Press.

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung UFZ. (kein Datum). Abgerufen am 31. Mai 2010 von http://www.ufz.de/index.php?de=12245&gloss_zeichen=b#18

Lambrechts, M., & Sansen, W. M. (1992). *Biosensors*. CRC Press .

Pancrazio, J. J., Whelan, J. P., Borkholder, D. A., Ma, W., & Stenger, D. A. (1999). Development and Application of Cell-Based Biosensors. *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 27 , S. 697-711.

Racek, J. (1995). *Cell-Based Biosensors*. Lancaster: CRC Press.

Tomaschitz, C. J. (kein Datum). *TU Wien*. Abgerufen am 20. Mai 2010 von http://www.ims.tuwien.ac.at/teaching/vr/advanced_topics/Talkso8/Biosensoren.pdf

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung UFZ): Funktionsweise Biosensor.....3
 Abbildung 2 (Tomaschitz): Grundarten der Detektion4
 Abbildung 3 (Racek, 1995): Aufbau Biosensor; a) Membranbiosensor, b) Reaktorbiosensor5
 Abbildung 4 (C-Cit): Enzymatische Sensoren.....6
 Abbildung 5 (C-Cit): Funktionsweise7
 Abbildung 6 (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999): Cytosensor®8
 Abbildung 7 (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999): Zelluläres Impedanz-System9
 Abbildung 8 (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999): spontanes Feuern in NG108-15-Zellen10
 Abbildung 9: extrazelluläre Potentialmessung.....11
 Abbildung 10 (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999)11
 Abbildung 11 (Pancrazio, Whelan, Borkholder, Ma, & Stenger, 1999): Rückenmarkneuronen.....12