

## ► Automatische Zellanalyse

# Automatisiertes Patch-Clamping – Lösungen und Herausforderungen

Dr. Thomas Knott<sup>1</sup>, Dr. Sandra Single<sup>1</sup>, Dr. Alfred Stettl<sup>1,2</sup>, <sup>1</sup>CytoCentrics CCS GmbH, <sup>2</sup>Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut (NMI), Universität Tübingen, Reutlingen

*Apparaturen für das automatisierte Patch-Clamping von suspendierten Zellen in der ‚whole-cell‘-Konfiguration müssen diverse Anforderungen erfüllen, um mit einer hohen Erfolgsrate dieselbe Ableitqualität wie beim klassischen Patch-Clamping zu erreichen. Dieser Beitrag beschreibt den „Cytocentering“-Ansatz, der sowohl im High Throughput Screening (HTS) als auch im sekundären HTS (HTSS) beziehungsweise Sicherheitsscreening oder auch der Grundlagenforschung zum Einsatz kommen kann. Der dazu entwickelte CytoPatch-Automat nutzt zur Automation beliebig erweiterbare Module anstelle der normalerweise eingesetzten Mikrotiterplatten.*

Mit Hilfe der elektrophysiologischen Patch-Clamp-Technik kann der Einfluß von chemischen Substanzen auf die wichtige Targetklasse der Ionenkanäle derzeit am besten getestet werden<sup>1</sup>. Das klassische Patch-Clamping in der ‚whole-cell‘-Konfiguration (siehe Abb. 1) erfordert drei Schritte:

- mikroskopisch kontrollierte Positionierung der Patch-Clamp-Elektrode (Abb. 1Aa/b),
- Anlegen eines Unterdruckes, der zum Einsaugen eines Teils der Zellmembran in die Pipettenspitze führt (Abb. 1Ac),
- Zerreißen der Zellmembran durch Unterdruck oder Spannungspuls (Abb. 1Ad, ‚whole cell‘-Konfiguration, charakterisiert durch einen kleinen Zugangswiderstand zwischen Patch-Elektrode und Zellinnerem).

Um bei Messungen der Wirkung chemischer Substanzen auf Ionenkanäle eine große Anzahl von Datenpunkten pro Tag erreichen zu können, ist eine Automation des Patch-Clamping erforderlich. Das zentrale Ziel dabei ist, die hohe Qualität der Messungen, die beim klassischen Patch-Clamping erreicht wird, auch beim automatisierten zu erreichen.

## Automatisiertes Patch-Clamping mit hoher Qualität

Bei allen Automatisierungsansätzen wird die Zelle auf einer mikrometerfeinen Öffnung in einem planaren Träger plaziert. Der planare Automatisierungsansatz kontrolliert dies durch Anlegen eines Unterdruckes in der Öffnung (Abb. 1Ba/b). Untersuchungen am NMI haben dabei gezeigt, daß der Durchmesser der Öffnung dazu mindestens 4 µm betragen muß (optimal sind 8-12 µm). Die Bildung eines mechanischen Kontaktes mit hohem elektrischen Abdichtwiderstand er-

folgt durch Erhöhung des Unterdruckes (Abb. 1Bc). Ein Teil der Zellmembran wird in die Öffnung gezogen. Weitere Untersuchungen am NMI haben gezeigt, daß durch Öffnungsdurchmesser, die für das Ansaugen ideal sind, die Bildung sogenannter Gigaseals – eines hohen Abdichtwiderstandes zwischen Patch-Elektroden und Badlösung (siehe LABORWELT 3/2002) – jedoch stark gehemmt wird: Bestenfalls 30 bis 60 % können mit dem planaren Automatisierungsansatz erreicht werden (selbst mit Öffnungsdurchmessern von nur 2 µm<sup>1-4</sup>). Eine Erklärung dafür ist, daß durch den permanenten Unterdruck während der Positionierung die Öffnung verdeckt oder die Zellen mangels Ansaugkapazität und hoher Zelldichte nicht richtig positioniert werden. Wird ein Gigaseal nicht erreicht, reißt auch die Zellmembran nicht – das Klemmen der Membranspannung in der ‚whole cell‘-Konfiguration ist nicht möglich (Abb. 1Bd).

Einen scheinbaren Ausweg bietet hier die sogenannte ‚perforated patch‘-Konfiguration. Dazu werden der Elektrolyt-Lösung in der Patch-Öffnung sogenannte Kanalbildner zugegeben, die in der Zellmembran Poren entstehen lassen, über die ein Zugang zum Zellinneren und damit ein Klemmen des Membranpotentials möglich wird. Ein Gigaseal-Kontakt zwischen Zellmembran und Patch-Öffnung ist dazu nicht unbedingt nötig. Aber durch das schlechte Verhältnis von hohem Zugangswiderstand und niedrigem Abdichtwiderstand sind die Signale nur schlecht zu messen.

Eine Lösung, die ohne Kanalbildner auskommt und zugleich eine hohe Ausbeute hochqualitativer Ableitungen bietet (Abb. 1C) ist im Cytocentering-Verfahren realisiert: die für die Positionierung und das Ableiten nötigen Öffnungen werden getrennt. Eine kleine zentrale Öffnung stellt die Patch-Öffnung dar, eine große umgebende Öffnung dient der Positionierung (Abb. 1Ca/b). Neben einer

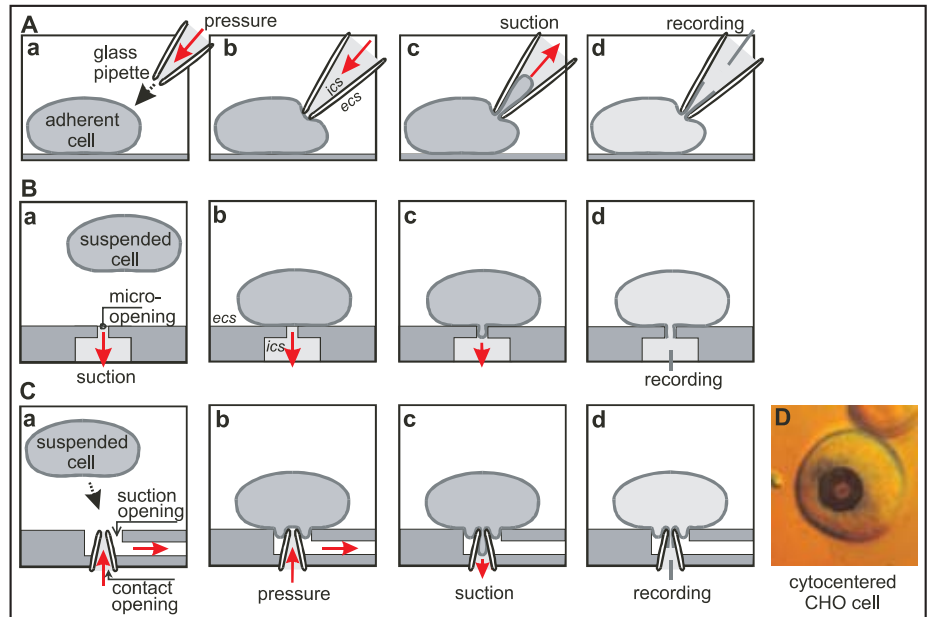
ausreichenden Ansaugkapazität bleibt die Kontaktöffnung durch einen niedrigen Überdruck sauber. Das Verfahren wurde am NMI entwickelt und von der Firma Cytocentrics in ihrer automatisierten Patch-Clamp-Apparatur realisiert. Im Vergleich zu allen anderen Verfahren wird der zentrale Prozeß des manuellen Patch-Clamping beibehalten und in inverser Konfiguration durchgeführt. Daher wirken dieselben hydrodynamischen und mechanischen Kräfte auf die Zelle und ihre Membran, und es wird mit einer hohen Erfolgsrate dieselbe Ableitqualität erreicht<sup>5</sup>.

### Automatisiertes Patch-Clamping mit hohem Durchsatz

Mikrotiterplatten-basierte Ansätze sind für elektrophysiologische Untersuchungen, wie das Patch-Clamping, mit einigen Problemen behaftet:

- ▶ die vielfachen, nah benachbarten Ableitungen führen zu gegenseitigen elektrischen Störsignalen,
- ▶ die Anwendung von komplexen Testprotokollen mit diversen Ein- und Auswaschzyklen ist schwierig zu realisieren und
- ▶ eine individuelle Steuerung der einzelnen Meßkammern ist nicht Stand der Technik.

Bedingt durch die synchrone Steuerung erzwingt der Mikrotiterplatten-Ansatz die Vorgabe einer einheitlichen Versuchsdauer. Da aber die Sealformation und auch die Lebensdauer der Zellen sehr unterschiedlich ist, folgt daraus, daß für manch schlechte Ableitung chemische Testsubstanz vergeudet wird, beziehungsweise daß manch gute Ableitung vorzeitig verworfen wird. Auch ist die Qualität aller Meßdaten nicht unbedingt einsichtig.

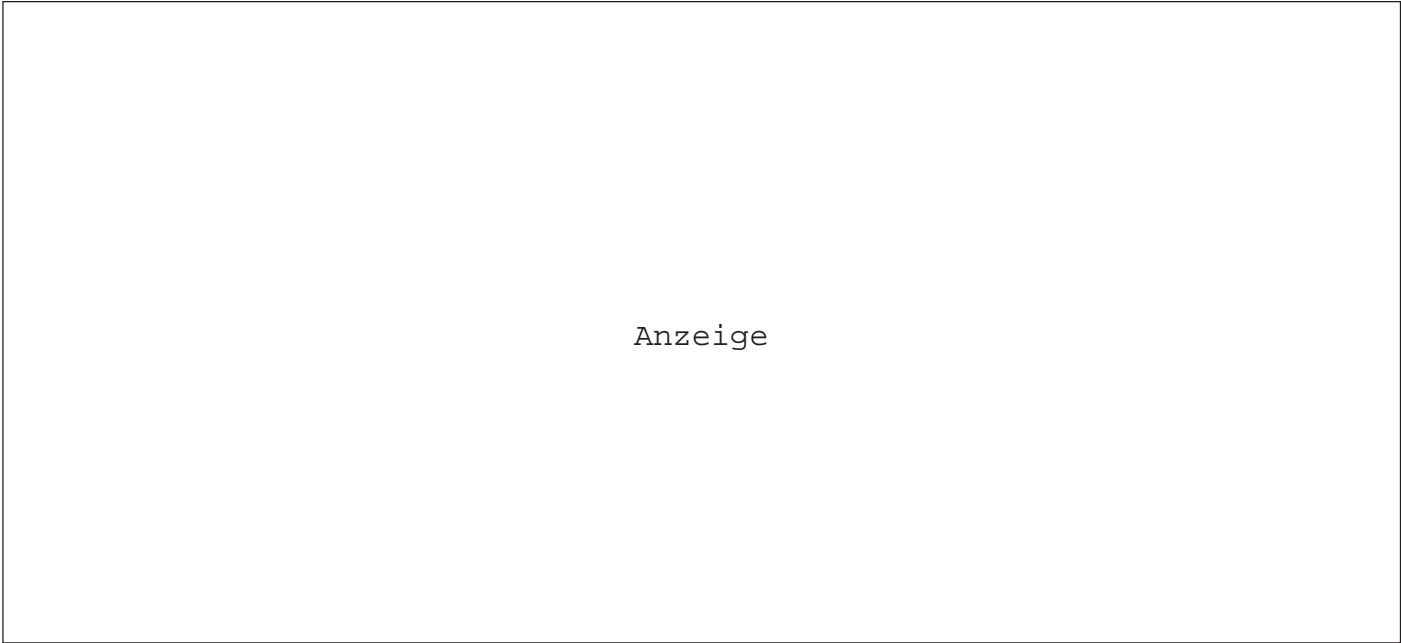


**Abb. 1:** A) Das konventionelle, manuelle Patch-Clamping: Die Spitze einer Glaspipette wird leicht auf die Zelle aufgesetzt (dabei permanenter Überdruck zum Sauberhalten der Pipette, a/b). Durch Umschalten auf Unterdruck wird die Zellmembran in die Öffnung der Glaspipette eingezogen und reißt auf (c/d, vereinfachte Darstellung). Das Klemmen des Membranpotentials und Messen von Ionenströmen ist möglich. B) Das automatisierte, planare Patch-Clamping: die Mikroöffnung muß für die Positionierung (Ansaugen durch Unterdruck, a/b) und das Klemmen (Gigaseal und Reißen der Membran durch Unterdruck, c/d) der Zelle verwendet werden. C) Das automatisierte Patch-Clamping mit dem „Cytocentering“-Ansatz: Durch die Applikation eines Unterdruckes wird eine Zelle über der Patch-Öffnung positioniert (gleichzeitiger Überdruck in der Patch-Öffnung, a/b). Durch Anwendung eines Unterdruckes in der Patch-Öffnung wird der Gigaseal (c) und die ‚whole-cell‘-Konfiguration hergestellt (d). D) Beispiel einer mit dem Cytocentering-Ansatz kontaktierten CHO-Zelle. Der äußere Umriß gibt die Zellbegrenzung wieder, der mittlere die Begrenzung der Positionierungsöffnung (Durchmesser 12 µm), die innere die Begrenzung der Patch-Öffnung.

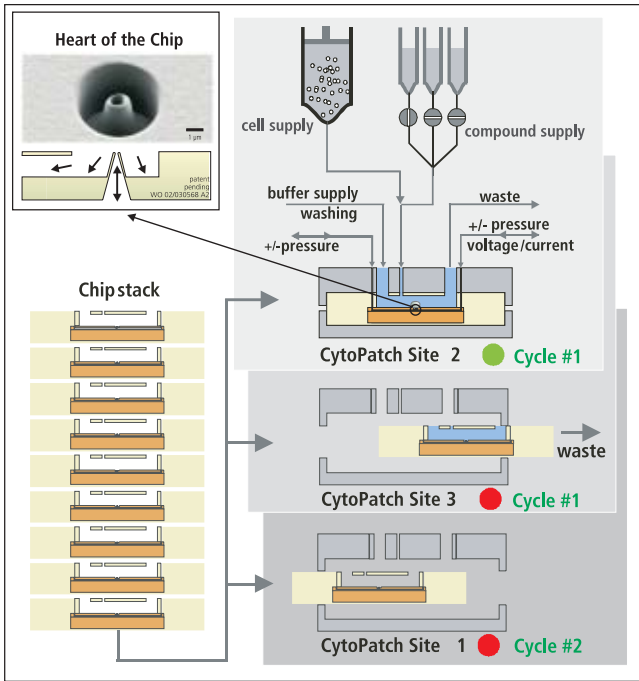
Ein alternativer Ansatz ist der des parallel asynchronen Betriebs (Abb. 2): mehrere Chips werden einzeln, also räumlich voneinander getrennt, kontaktiert und arbeiten individu-

ell. Das bedeutet, die Qualität der Ableitung, der Spannungsklemme oder der Zelle etc. wird individuell auf jedem Chip kontrolliert, unabhängig vom Status der anderen Chips.

▼ Information ordern? ▼ Kennziffer 21 LW 04 / [www.biocom.de](http://www.biocom.de)



Anzeige



**Abb. 2:** Schematische Zeichnung autarker CytoPatch™-Meßstationen. Chips, Zellen und Testsubstanzen werden vollautomatisch zugeführt. Das Chip-Reservoir kann mehrere, modular in den Automaten integrierte Meßstationen bedienen. Inset: Das Herzstück des CytoPatch™-Chips. In dieser Design-Studie wurden in einer 10 µm dicken Quarzschicht (SEM-Bild) mittels eines fokussierten Ionenstrahles die Patch-Öffnung und die umgebende Positionieröffnung abgetragen.

Ist die Qualität ausreichend, werden weitere Tests mit der kontaktierten Zelle gestartet; ist sie mangelhaft, wird der Versuch beendet und ein neuer gestartet. Damit wird nur dort chemische Substanz verbraucht, wo Daten guter Qualität zu erwarten sind.

### Skalierbarer Patch-Clamp-Automat

Der CytoPatch™-Chip (Abb. 2, inset links oben) besteht aus Quarzglas (max. Zugangswiderstand 5 MOhm) und kann in bereits bestehenden Produktionsanlagen in großen Stückzahlen hergestellt werden (BionChip, NL). Der Chip ist von einem Plastikgehäuse umgeben, das die mikrofluidische Zu- und Abfuhr von Nährstofflösung oder Testsubstanzen ermöglicht (Abb. 2 oben). Durch dieses geschlossene Strömungssystem kann die Lösung sehr schnell ausgetauscht werden. Dies ermöglicht das Auswaschen von Substanzen und die An-

wendung mehrerer Konzentrationen oder Testsubstanzen auf einer Zelle.

Der Verbrauch von Testsubstanzen im µl-Bereich ist dem in Mikrotiterplatten vergleichbar. Nach Beendigung des Versuchs klappt ein Chiphalter auf, der Chip wird entsorgt, ein neuer Chip aus dem Chipvorrat geholt (Abb. 2 links) und in den Chiphalter eingelegt. Die Zelllösung wird ausgetauscht, Testsubstanzen werden von neuem appliziert. Dies alles geschieht vollautomatisiert in hohem Durchsatz. Der Vorrat an Chips kann so ausgerichtet werden, daß eine Testreihe über Nacht gemessen wird. Bis zu 200 Zellen können so pro Tag mit einem Modul gemessen werden. Um den Durchsatz zu erhöhen, werden dem CytoPatch-Automaten weitere Module hinzugefügt (bis zu 50, Abb. 2 unten). Aufgrund der Architektur des CytoPatch™-Automaten können spannungsabhängige, ligandengesteuerte sowie metabotrope Kanäle untersucht werden. Seine Anwendung findet das Verfahren im High

### Kennziffer 23 LW 04 ▶ Information? ▶

Throughput Screening (HTS), im sekundären HTS (HTSS) beziehungsweise Sicherheits-screening oder auch der Grundlagenforschung. Darüber hinaus ist der breite Einsatz im Bereich Functional Genomics zu erwarten.

### Danksagung

Wir danken Claus Burkhardt (NMI) für die Herstellung von Chip-Prototypen mit der FIB-Technik und dem Max-Planck-Institut für Metallforschung, Stuttgart, für die Möglichkeit, die FIB-Anlage zu benutzen sowie Uli Weber (NMI) für die Durchführung vieler Testmessungen. Des weiteren danken wir BionChip, NL, für die gute Zusammenarbeit bei der Chip-Entwicklung und Multi Channel System, Reutlingen, und npi electronic, Tamm, für die gute Zusammenarbeit bei der Elektronik Hardware-Entwicklung.

### Literatur

- [1] Fertig, N., Klau, M., George, M., Blick, R., Behrends, J.C. Biochip für die Analyse zellulärer Ionenkanäle. *Laborwelt III* (2002a), 16-19
- [2] Fertig, N., Blick, R.H. and Behrends, J.C. Whole Cell Patch Clamp Recording Performed on a Planar Glass Chip. *Biophys. J.* 82 (2002b), 3056-3062
- [3] Owen, D. and Silverthorne, A. Channelling drug discovery. Current trends in ion channel drug discovery research. *Drug Discovery World* 3 (2002), 48-61
- [4] Sigworth, F.J. and Klemic, K.G. Patch Clamp on a Chip. *Biophys. J.* 82 (2002), 2831-2832
- [5] Stett, A., Burkhardt, C., Weber, U., van Stiphout, P., Knott, T. Cytocentering: a novel technique enabling automated cell-by-cell patch clamping with the CytoPatch Chip. *Receptors and Channels* (2002), in press

### Korrespondenzadresse

Dr. Thomas Knott  
Cytocentrics CCS GmbH  
Täleswiesenstr.3. D-72770 Reutlingen  
Tel.: 07121-5147951, Fax: 07121-5147957  
eMail: knott@cytocentrics.com  
www.cytocentrics.com

▼ Information ordern? ▼ Kennziffer 22 LW 04 / www.biocom.de

Anzeige