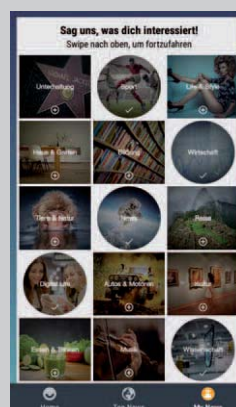


Forschung an den Hochschulen für Angewandte
Wissenschaften in Baden-WürttembergNr. 48
Oktober 2016

horizonte horizonte

anwendungsbezogen - zukunftsorientiert

Mit einem einfachen Low-Cost-Lithographie-Gerät entwickelt die Hochschule Reutlingen Mikro-Chips, die für die Detektion von wandernden Tumorzellen eingesetzt werden können, S. 10

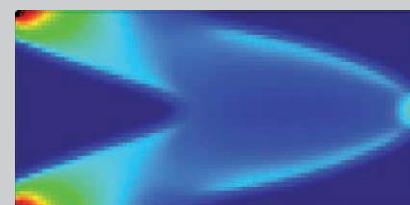


Wie verändern Smartphones die Nachrichtennutzung junger Menschen, eine Frage, der die Hochschule der Medien Stuttgart nachgeht, S. 34



Die Hochschule Ulm befasst sich mit der Optimierung der Einspeisung von Strom aus dezentralen Energiesystemen in Verteilernetze, S. 6

Die Optimierung von umströmten Bauteilen führt zur Energie- und Materialeinsparungen - wie das gehen kann, zeigt eine Dissertation an der Hochschule Karlsruhe, S. 23



Architektur, die Flüchtlingen eine Perspektive bietet - eine Initiative der Hochschule Konstanz, S. 3



Wie lässt sich die Bevölkerung im Katastrophenfall mit Trinkwasser versorgen - eine Lösung stellt die Hochschule Mannheim vor, S. 17

Tumorzellen on the Move

Mikrosystem-basierter Assay zur Untersuchung der Tumorzellen-Migration

Ralf Kemkemer^{1,2}, Andrew Holle², Galina Khachatryan¹, Joachim P. Spatz^{2,3}

¹Hochschule Reutlingen; ²Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Abteilung für Zelluläre Biophysik, Stuttgart; ³Universität Heidelberg, Biophysikalische Chemie

Die Invasion von Tumorzellen in umliegendes Gewebe und die Bildung von Metastasen transformieren einen lokal wachsenden Tumor in eine systemische und lebensbedrohliche Krankheit mit schlechter Prognose. Dabei spielt die aktive Migration der Tumorzellen eine entscheidende Rolle. Tumorzellen gelangen durch die aktive Zellbewegung in das Lymph- oder Blutsystem und breiten sich im Körper aus. Bei der Invasion in ein neues Organ migrieren die Zellen ebenfalls wieder in komplexer Weise durch das Gewebe und können schließlich dort Metastasen bilden. Auf Grund der enormen medizinischen Relevanz der Tumorzell-Invasion, wird die Bewegung von Tumorzellen seit Jahrzehnten unter Laborbedingungen umfassend untersucht und ist ein wichtiger Marker für die Aggressivität der Tumorzellen. Zur Bewegungsanalyse gibt es mehrere experimentelle und auch kommerziell erhältliche in-vitro Untersuchungsmethoden. Ziel des interdisziplinären Projektes „MigChip“ ist die Entwicklung, Herstellung und experimentelle Validierung eines Mikrofluidik-Chips zur verbesserten, detailgenauen in-vitro Untersuchung der Tumorzellen-Migration.

Zellmigration als wichtiger Schritt der Metastasierung

Die Motilität und Migration von Zellen ist ein komplexer Vorgang bei einer Vielzahl von physiologischen aber auch pathophysiologischen Vorgängen in unserem Körper. Drastisch wirkt sich die invasive Migration von Tumorzellen aus (Abb. 1 A). Dabei spielen vielfältige Signalmechanismen zwischen und innerhalb der Zellen sowie die Veränderung der Zell-Matrix-Adhäsion und der Zell-Zelladhäsion eine entscheidende Rolle (1). Die darauf einsetzende Migration der Tumorzellen ist ein Vorgang, bei der Zellen sich sowohl einzeln als auch in Kollektiven ausbreiten können. Abhängig vom Bewegungsmodus der Tumorzellen spricht man auch häufig von einem amöboiden oder mesenchymalen Bewegungsphänotyp. Tumorbedingte Veränderungen von Signalwegen und Strukturen in den Zellen können das invasive Verhalten maßgeblich beeinflussen. Um sich durch das Gewebe aktiv zu bewegen, müssen Tumorzellen sich in der Regel stark verformen und durch sogenannte Confinements, also Verengungen zwischen Zellen und Extrazellulären Matrix, hindurchbewegen (2) (Abb. 1 A). Dazu können Tumorzellen auch Substanzen freisetzen, welche die Extrazelluläre Matrix teilweise auflösen. Die Zellen geraten dann unter Umständen in das Blut- oder Lymphsystem, werden durch den Körper transportiert und kolonisieren andere Organe. Diese zirkulierenden Tumorzellen, sogenannte CTS (Circulating Tumor Cells), lassen sich aus dem Blut isolieren und auch diagnostisch untersuchen, um Prognose und Therapie personalisiert einzustellen.

Etablierte Testsysteme für das invasive Verhalten von Tumorzellen

Auf Grund der enormen medizinischen Relevanz des invasiven Verhaltens von Tumorzellen gibt es zu diesem Themenbereich eine Vielzahl von veröffentlichten Untersuchungen und entsprechend Entwicklungen von experimentellen Untersuchungsmethoden. Das Verhalten der Tumorzellen kann in Tiermodellen sehr realistisch nachgestellt werden und zum Beispiel durch Verfahren der in-vivo Mikroskopie untersucht werden. Nicht zuletzt wegen der Komplexität der Methode und ethischen Aspekten der Tierversuche basiert allerdings ein großer Teil der Untersuchungen zur Migration von Tumorzellen auf in-vitro Experimenten mit Zellkulturen. Neben klassischen einfachen Untersuchungen der Migration in 2D-Zellkulturschalen gibt es auch kommerzielle erhältliche Assays, um das invasive Verhalten von Tumorzellen zu untersuchen. Insbesondere sind Systeme, die auf der sogenannten Boyden-Kammer basieren, weit verbreitet und werden durch verschiedene Hersteller aus dem Bereich der Labor-Diagnostik vertrieben (Abb. 1 B). Dabei handelt es sich prinzipiell um ein vertikales 2-Kammernsystem, bei welcher die beiden Kammern durch eine sehr dünne Membran mit unregelmäßig angebrachten Löchern von wenigen Mikrometern (häufig ca. 8 µm Durchmesser) getrennt sind. Tumorzellen werden nun in der oberen Kammer auf der Membran kultiviert und nach einem bestimmten Zeitraum von mehreren Stunden wird die ungefähre Anzahl der Zellen auf der anderen Seite der Membran bestimmt. Diese Zellen haben sich zuvor über aktive Bewegungsvorgänge



Prof. Dr. R. Kemkemer

durch die kleinen Poren gezwängt. Die relativen Zahlen lassen sich als sogenannter Migrationsindex vergleichen. Von besonderem Interesse ist hier die Fähigkeit der Zellen (typische Größe 5 bis 50 µm), sich durch Verengungen (Poren von ca. 8 µm Durchmesser) zu bewegen, was Rückschlüsse auf das Beweglichkeit und Verformbarkeit der Tumorzellen zulässt. Daraus ergeben sich Rückschlüsse auf das invasive Verhalten der Tumorzellen. Die Boyden-Kammer eignet sich prinzipiell auch zur Anwendung von Gradienten chemotaktischer Substanzen, auf welche die Zellen reagieren. Nachteil dieses klassischen Assays ist, dass die eigentlichen Bewegungsvorgänge der Zellen durch die Poren nicht beobachtet und untersucht werden können. So lassen sich beispielsweise keine Mikroskopbilder der Zellen bei der Bewegung aufnehmen, um ihre Verformung zu studieren oder dabei auftretende Veränderungen von Zellstrukturen und Organellen durch Fluoreszenzmarkierung beobachten. Das ist insbesondere für die Diagnostik in der Forschung der Tumorzellenbewegung von Nachteil. Hier sind lichtmikroskopische Beob-

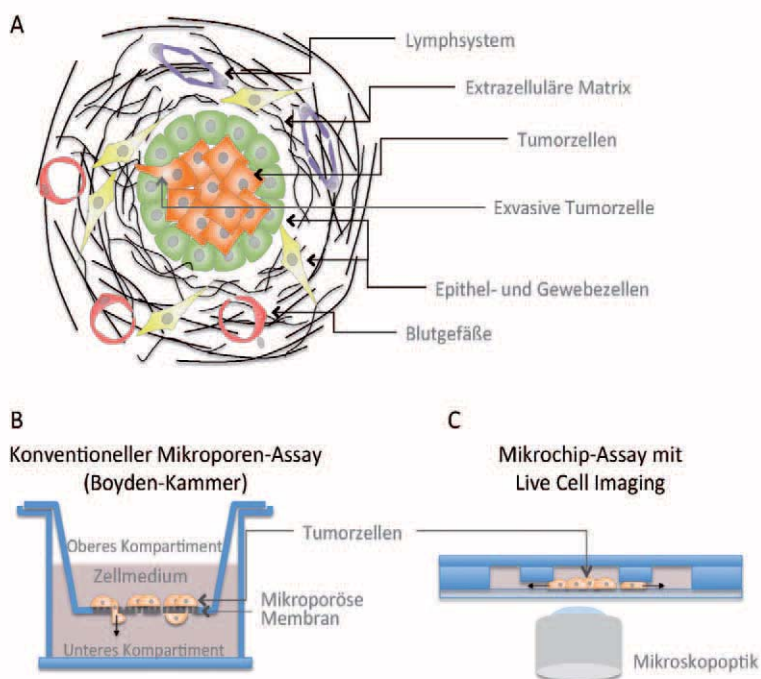


Abb. 1: A) Schematische Darstellung eines Tumors. Mit zunehmendem Wachstum können bestimmte Tumorzellen mit einem Migrationsprozess in das umliegende Gewebe beginnen und werden dann oft über das Lymph- und Blutssystem im Körper verbreitet. (Schema nach (3)) B) Um den wichtigen Teilprozess der Migration durch Verengungen bei der Metastasierung zu untersuchen, wird in-vitro der sogenannte Boyden-Kammer-Assay eingesetzt. Die Zellen können hier durch Verengungen in ein anderes Kompartiment. C) Prinzipieller Aufbau des Mikro-Chips. Die Tumorzellen migrieren durch die Verengungen in die nebengelegenen Kompartimente (Pfeilrichtungen).

achtungen, auch von lebenden Zellen, zu einem mächtigsten Werkzeug in der Zellbiologie geworden. Deshalb gab es in den letzten Jahren verschiedene Anstrengungen, Alternativmethoden zur Boyden-Kammer zu entwickeln.

Neuartiges Testsystem für das Tumorzellverhalten

Wesentliches Ziel des Projektes „MigChip“, gefördert durch das Programm „Innovative Projekte“, war die Entwicklung und Validierung eines einfachen Chip-Systems, welches die lichtmikroskopische Beobachtung der Bewegung von Zellen durch verschiedene Verengungen erlaubt. Der grundsätzliche Aufbau ist in Abbildung 1 C schematisch dargestellt.

Wesentlich Anforderungen an den Chip sind:

- a) Einfache Produktion einer großen Zahl von Prototypen für eigene Vorversuche und zellbiologische Untersuchungen
- b) Eignung für das Live Cell Imaging (Mikroskopie) und Hochdurchsatz-Mikroskopie (Chipformat)
- c) Integration verschiedener Größen von Verengungen von 3 bis 15 μm

d) Prinzipielle Eignung des Systems, die mechanischen Eigenschaften (Steifigkeit) und chemische Funktionalisierung mit Molekülen der Extrazellulären Matrix zu variieren

Insbesondere wurde mit Hilfe des Chips in ersten Studien untersucht, ob es prinzipielle verschiedene Bewegungsmechanismen bei unterschiedlichen Tumorzellen gibt und in wie weit tumorbedingte Veränderungen des sogenannten Zytoskelettes die Migration der Tumorzellen durch Verengungen beeinflussen. Langfristig soll der Chip so weiterentwickelt werden, um auch aus Patientenblut isolierte, zirkulierende Tumorzellen, sogenannte CTS (Circulating Tumor Cells) diagnostisch einfach zu untersuchen. Diese Zellen und deren aggressives Potenzial könnten zur Bestimmung der Prognose und personalisierte Therapie von Krebspatienten herangezogen werden.

Um den oben genannten Anforderungen nach einfacher Produktion in ausreichender Stückzahl gerecht zu werden, kam als wesentliche Methode zur Herstellung der Mikrofluidik-Chips die sogenannte „Soft Lithography“ zum Einsatz (Abb. 2). Diese Methode wurden in den letzten Jahren entwickelt,

um weiche Polymere räumlich in Größen von bis zu wenigen Mikrometern oder auch darunter zu modifizieren und wird häufig zur Herstellung von Chip-Systemen für die Zellanlyse eingesetzt (4). Das Grundprinzip dieser Methode beruht auf der Strukturierung eines Silizium-Wafer mittels konventioneller Fotolithographie, wie sie auch in der Halbleiter-Technologie genutzt wird. Dazu wird ein Silizium-Wafer mit einem lichtsensitiven Polymer (Fotolack) sehr dünn beschichtet, in unserem Fall durch sogenanntes Spin-Coating. Durch UV-Beleuchtung des Polymers durch eine Foto-Maske (Abb. 3 A), bei welcher gewünschte Bereiche transparent, andere reflektierend sind, kann das Polymer räumlich sehr definiert strukturiert werden. Die nach dem Entwicklungsprozess entstandene Struktur, die Masterstruktur, wird dann mittels eines anderen, weichen Polymers, in der Regel einem Elastomer (Poly(-dimethylsiloxan)) oder Polyurethan abgeformt (Abb. 3 B und C). Nach Aufbringung auf einen Glasträger ist der Grundaufbau des Mikrofluidik-Chip fertig. Für den Teilprozess der Fotolithographie wird in den meisten Laboren in einer staubfreien Reinraumumgebung gearbeitet und zur Belichtung ein Mask Aligner verwendet, eine kostspielige Apparatur, die meistens weit über 100.000 Euro kostet. Um den Prozess auch im Reutlinger Hochschul-

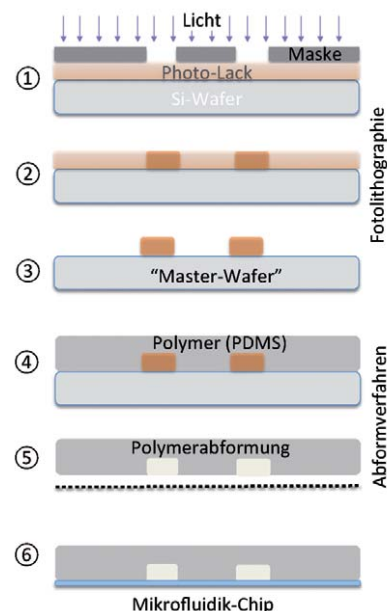


Abb. 2: A) Schematische Darstellung der Herstellungsschritte bei der „Soft Lithography“. Ein „Master-Wafer“ mit entsprechender Oberflächenstruktur wird durch Fotolithographie hergestellt. Dieser „Master-Wafer“ wird durch ein Elastomer, häufig Poly(dimethylsiloxane) abgeformt. Das PDMS-Replikat wird auf einen Träger (Glas) gesetzt, so dass Kanalstrukturen entstehen.

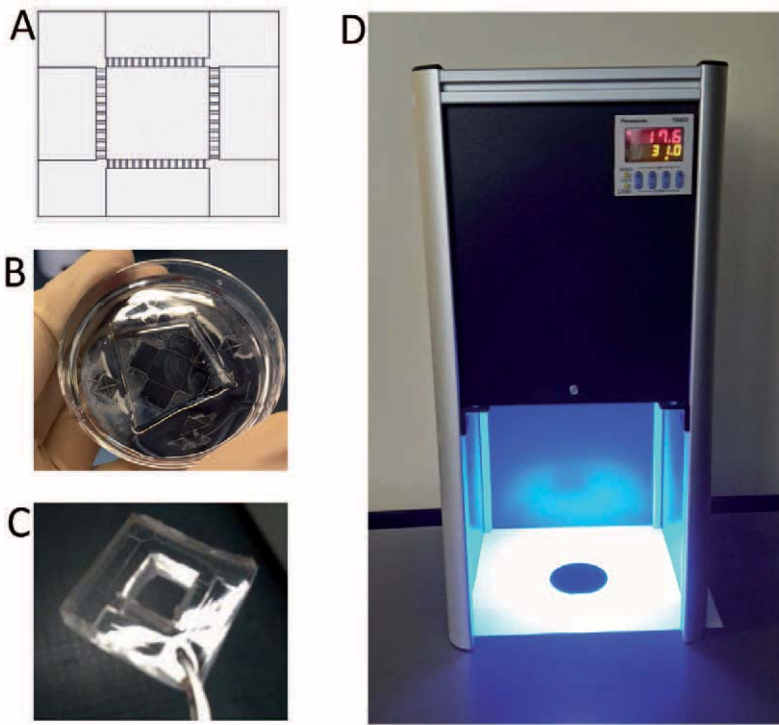


Abb. 3: A) Skizze eines beispielhaften Masken-Layouts für die Lithographie. B) Master-Wafer beim Abformungsprozess. Die Abformung lässt sich sehr oft wiederholen. C) PDMS-Replikate zur weiteren Verwendung für die Herstellung des Chips. D) Eigenbau eines „Low-Cost Mask Aligner“ mit Reinraumfunktion für die Fotolithographie.

Labor zu etablieren, wurde deshalb im Rahmen des Projektes ein „Low Cost Lithographie-System“ entwickelt und aufgebaut. Dabei wurden UV-LEDs, eine simple Elektronik und Optik, sowie eine einfache Reinraumkammer mit handelsüblichen HEPA-Filtern installiert (Abb. 3 D). Die Kosten des Systems liegen unter 1.000 Euro. Einfache Chip-Systeme mit Strukturgrößen von wenigen Mikrometern können damit bereits produziert werden.

Der Mikrofluidik-Chip erfordert eine Reihe von weiteren Modifikationen, um ihn zur Untersuchung der Tumor-

zellbewegung einsetzen zu können. Biologische Zellen adhären grundsätzlich an spezifische Moleküle der Extrazellulären Matrix (EZM), einem komplexen Netzwerk aus oft lagen Biomoleküle wie Collagen, Fibronectin oder Hyaluronsäure. Deshalb muss die Oberfläche des Elastomers, aus welchem der Chip gefertigt wurde, noch entsprechend mit EZM-Molekülen biofunktionalisiert werden. Dies kann durch einfache Physisorption der Moleküle aus Lösungen erfolgen, was für einige der untersuchten Moleküle eine ausreichend homogene Funktionalisierung ergeben hat. Andere Strate-

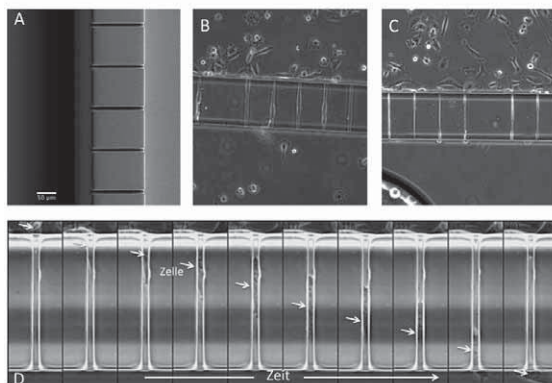


Abb. 4: A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Kanalstrukturen im Migration-Chip. Durch diese Verengungen migrieren die Tumorzellen bei den entsprechenden Untersuchungen, wie beispielhaft in B) (10 µm Kanalbreite) und C) (3 µm Kanalbreite) dargestellt. D) Eine Zeiterie von Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen zeigt die aktive Migration einer Tumorzelle durch einen Mikrokanal mit 7 µm Breite. Die Zeitangaben sind in Minuten gegeben (jeweils oben links). Die weißen Pfeile deuten zur Verdeutlichung auf die Zelle. Entsprechende Bildsequenzen werden analysiert und quantifiziert.

gien wurden im Verlaufe des Projekts entwickelt und getestet, werden hier aber nicht weiter dargestellt.

Untersuchungen der Tumorzellmigration

Insgesamt wurden mehrere verschiedene Chip-Systeme mit verschiedenen Layout und EZM-Funktionalisierungen realisiert und mit etablierten Tumorzelllinien getestet. Kanalgrößen von 3, 5, 7, 10 und 15 µm kamen in der Regel zum Einsatz und erwiesen sich für die meisten Untersuchungen als geeignet. Ein Beispiel für Kanalstrukturen ist in Abbildung 4 A zu sehen. Die Mikrofluidik-Chips erlaubten eine genaue Beobachtung von Bewegungsprozessen der Zellen mit Hilfe von lichtmikroskopischen Methoden bis hin zur Fluoreszenzmikroskopie. Mittels automatisierter Live Cell Mikroskopie wurden die Zellen unter physiologischen Bedingungen bei 37°C und entsprechender Gasatmosphäre (5% CO₂) beobachtet und die Bilder anschließend mit Bildverarbeitungs-routinen analysiert. Beispielhafte Aufnahmen sind in Abbildung 4 B und C zu sehen. Dort sind MDA-MB 231 Zellen, eine Modell-Zelllinie (Brustkrebs, Adenokarzinom), in zwei verschiedenen großen Kanalstrukturen auf dem Mikro-Chip zu sehen. Die Zellen sind in der Lage, selbst durch nur 3 µm weite Kanäle zu migrieren, was eine extreme Verformung verlangt (Abb. 4 C). In Abbildung 4 D ist beispielhaft die Migration einer Tumorzelle durch einen Kanal in einer Bildsequenz über 200 Minuten dargestellt.

In mehreren biologischen Modellstudien wurden die Prototyp des Chips sehr erfolgreich eingesetzt, Details der Ergebnisse können hier nicht dargestellt werden. Beispielhaft konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, wie in Pankreas-Tumorzellen (Panc-1) krankheitsbedingte Veränderungen des Keratin-Zytoskeletts, das invasive Migrationsverhalten der Zellen verändern. Die Zugabe von Sphingosylphosphorilcholin (SPC), eines nativ vorkommenden Phospholipids, induziert eine Kondensation des Keratinnetzwerkes um den Kern, so dass die Zellen insgesamt weicher werden. Dadurch erhöht sich die Effizienz der Zellen, durch enge Kanäle mit 7 µm Durchmesser zu wandern nahezu um den Faktor 3. Wobei die Migrationsgeschwindigkeit unverändert bleibt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit und das invasive Verhalten von

VIELFÄLTIGE CHANCEN IN DER MEDIZINTECHNIK

PRAKTIKA / ABSCHLUSSARBEITEN BEI AESCULAP®

Wir bieten für Studenten (m/w) ingenieur-, natur- und wirtschaftswissenschaftlicher Studiengänge in einer zukunftsorientierten Arbeitswelt

Praktika | Bachelorarbeiten | Masterarbeiten

Interessiert? Dann freuen wir uns auf Ihre Online-Bewerbung.

AESCULAP® – a B. Braun brand



Aesculap AG
www.aesculap.de/praktikum



MDA-MB 231 Zellen von der Art der EZM-Beschichtung anhängen und die Migration durch verschiedene Inhibitoren zentraler intrazellulärer Signalwege modelliert werden kann. Durch den Einsatz von Fluoreszenzmikroskopie und fluoreszierenden Proteinen können relevante intrazelluläre Vorgänge nun in lebenden Zellen beobachtet werden. In einem anderen Teilprojekt konnten interessante Untersuchungen zur Migration von Tumorzellen in Co-Kultur mit Macrophagen-ähnlichen Zellen durchgeführt werden. Entsprechende Daten sollen in Fachzeitschriften publiziert werden.

Zusammenfassung

Die invasive Migration von Tumorzellen ist ein komplexer Vorgang, der auf intrazellulären Veränderungen beruht, aber von Signalen der extrazellulären Umgebungen maßgeblich beeinflusst und moduliert wird. So rückt in den letzten Jahren zunehmend die in vitro Untersuchung von Tumorzellen und deren invasiven Verhalten in 2D und 3D-Kultursystemen in den Fokus (5). Methoden aus der Mikrotechnik bieten umfassende Möglichkeiten, entsprechende Assays herzustellen. Im Rahmen dieses Projektes wurden verschiedene Chips hergestellt und erfolgreich in verschiedenen zellbiologischen Un-

tersuchungen mit Tumorzellen verwendet, auch in Kooperation mit Arbeitsgruppen aus der Biomedizin. Aufgrund der vielen sehr komplexen Fragen um das Thema „Migration von Tumorzellen“, ist eine weitere Verwendung in zellbiologische Studien abzusehen. Interessante Optionen ergeben sich auch für kleine Labore durch Nutzung von Low-Cost Lithographie-Systemen, die sich zu Herstellung einfacher Systeme durch Soft Lithography eignen.

Danksagung

Prof. Dr. Monilola Olayioye, Universität Stuttgart und Mitarbeiterinnen für die Zusammenarbeit, Frau Neethu Govindan, Frau Verena Kast, Benjamin Naggay und Frau Kim Clar für die Unterstützung im Labor.

Dieses Projekt wurde im Rahmen des Programms „Innovative Projekte“ durch das MWK Baden-Württemberg gefördert.

Referenzen

1. Friedl, P.; Wolf, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer* 2003, 3, 362–374.
2. Pathak, A.; Kumar, S. Independent

regulation of tumor cell migration by matrix stiffness and confinement. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, 109, 10334–10339.

3. Shien, A. C. Biomechanical forces shape the tumor microenvironment. *Annals of Biomedical Engineering* 2011, 39, 1379–1389.
4. Underhill, G. H.; Peter, G.; Chen, C. S.; Bhatia, S. N. Bioengineering Methods for Analysis of Cells In Vitro. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2012, 28, 385–410.
5. Friedl, P.; Sahai, E.; Weiss, S.; Yamada, K. M. New dimensions in cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2012, 13, 743–747.

Kontakt

Prof. Dr. Ralf Kemkemer, Hochschule Reutlingen, Fakultät Angewandte Chemie, 72762 Reutlingen, E-Mail: ralf.kemkemer@reutlingen-university.de