

Superhydrophob-superhydrophile Mikrostrukturen: Auf dem Weg zum Ein-Genom-Zellmikroarray**

Florian L. Geyer, Erica Ueda, Urban Liebel, Nicole Grau und Pavel A. Levkin*

Lebende Zellen sind außerordentlich komplexe biologische Systeme, und eine Fülle von zellbasierten Assays wurde zu ihrer In-vitro-Untersuchung entwickelt. Insbesondere die in den letzten Jahren aufkommenden Zellarrays sind eine vielversprechende Technologie im Hinblick auf hochparallelierte und miniaturisierte Zellassays.^[1–5] Die Dichte heutiger Zellmikroarrays ist jedoch aufgrund von Kreuzkontaminations- und Zellmigrationsproblemen begrenzt.^[6,7] Hier beschreiben wir eine einfache Methode zur Herstellung von Arrays aus superhydrophilen Mikrofeldern, die durch dünne superhydrophobe Barrieren voneinander getrennt werden. Wir zeigen, dass derartige Substrate äußerst vielversprechend sind, um sowohl die Kreuzkontaminations- als auch die Zellmigrationsprobleme heutiger Zellarrays zu überwinden und die Herstellung hochdichter Zellmikroarrays zu ermöglichen, die für das genomweite Screening auf einem einzigen Array eingesetzt werden können.

Zur Herstellung eines Arrays erzeugten wir durch UV-initiiertes photochemisches Pfropfen eine superhydrophobe Gitterstruktur in einer auf einer Glasplatte aufgetragenen dünnen Schicht von superhydrophilem nanoporösem Poly(2-hydroxyethylmethacrylat-co-ethylendimethacrylat) (HEMA-EDMA), einem biokompatiblen und transparenten Material. Die Form und Größe der superhydrophoben Felder ist durch die verwendete Fotomaske präzise kontrollierbar. Die extreme Benetzbarkeit der Mikrofelder garantiert eine leichte und homogene Adsorption der Beladungsmischungen, während die dünnen superhydrophoben Barrieren äußerst effektiv Kreuzkontaminationen zwischen benachbarten Feldern verhindern. Experimente mit verschiedenen häufig ge-

nutzten Zelllinien zeigten bevorzugte Adhäsion und Proliferation der Zellen in den superhydrophilen Feldern, während die superhydrophoben Barrieren praktisch nicht besiedelt wurden. Schließlich erwiesen sich die schmalen superhydrophoben Bereiche zwischen den Feldern als hocheffektive Barrieren gegen Zellmigration.

Zellarrays werden hauptsächlich für das Screening von chemischen^[5,8] oder genomischen^[2,4,5,9] Datenbanken oder der extrazellulären Matrix eingesetzt.^[2,5,10,11] Große Aufmerksamkeit wurde der Anwendung von Zellarrays zur funktionalen Charakterisierung des Genoms in genomweiten reversen Transfektions-Screenings gewidmet.^[2–4,6,7,9,12,13] Um ein Mikroarray für die reverse Transfektion adhärenter Zellen herzustellen, druckt und trocknet man Gelatine enthaltende Transfektionsmischungen in einem Array-Format auf eine Glasplatte und „sät“ anschließend Zellen auf dem Array aus. Die Aufnahme der Nukleinsäuren in die auf den Punkten wachsenden Zellen führt zu einem Array aus transfizierten Zellclustern innerhalb eines dichten „Rasens“ nichttransfizierter Zellen (Abbildung 1 A).^[2] Im Vergleich zu Transfektionsuntersuchungen auf Mikrotiterplatten bietet die Verwendung von Zellarrays ein reduziertes Assay-Volumen sowie erhöhte Assay-Dichte und -Durchsatz und ermöglicht eine langfristige Lagerung bereits beladener Arrays.^[6] Zur Benutzung der gedruckten Arrays wird des Weiteren keine Hochdurchsatz-Pipettiereinheit benötigt.^[5] Das Fehlen physikalischer Barrieren zur räumlichen Trennung der verschie-

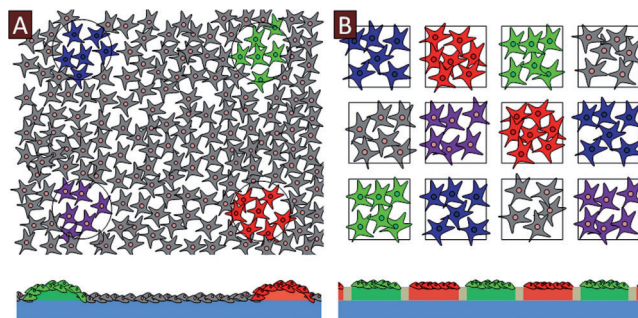


Abbildung 1. A) Ein zurzeit übliches Zellmikroarray. Oben: Transfizierte Zellcluster befinden sich in einem Rasen aus nichttransfizierten Zellen. Die Zellmigration kann nicht kontrolliert werden, und Kreuzkontamination und Punktform verhindern den Aufbau eines dicht gepackten Arrays. Unten: Querschnitt des Arrays: Die Transfektionsreagentien befinden sich in Gel-Klumpen, auf denen die Zellen siedeln. B) Das gewünschte Zellmikroarray: Präzise Kontrolle über Feldform, -größe und -dichte ist möglich, Zellen können ausschließlich auf den die Transfektionsreagentien enthaltenden Mikrofeldern siedeln. So werden räumlich getrennte Zellcluster erhalten und Zellmigration und Kreuzkontamination verhindert.

[*] F. L. Geyer, E. Ueda, Dr. U. Liebel, Dr. P. A. Levkin
Institut für Toxikologie und Genetik
Karlsruher Institut für Technologie (Deutschland)
E-Mail: levkin@kit.edu
Homepage: <http://www.levkingroup.com>

Dr. N. Grau
Medizinische Fakultät Mannheim
Universität Heidelberg (Deutschland)

F. L. Geyer, Dr. P. A. Levkin
Institut für Angewandte Physikalische Chemie
Universität Heidelberg (Deutschland)

[**] Wir danken dem Impuls- und Vernetzungsfonds (Projekt VH-NG-621) der Helmholtz-Gemeinschaft und dem Institut für Angewandte Physikalische Chemie (Prof. M. Grunze) für die finanzielle Unterstützung. Wir danken Dr. Kassels Labor für die HEK-293- und Hepa-Zellen und Dr. Davidsons Labor für die Bereitstellung der Plasmide. Insbesondere möchten wir uns bei Yi Su und Christiane Matthes für die experimentelle Unterstützung bedanken.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201102545> zu finden.

denen Proben erleichtert zudem mikroskopische Untersuchungen.^[6,14]

Dennoch unterliegt die Anwendung heutiger Zellmikroarrays einigen wichtigen Beschränkungen. Erstens befindet sich im Bereich zwischen den Punkten aus Transfektionsreagentien normalerweise ein dichter Rasen nichttransfizierter Zellen. Diese können ungehindert in die Punkte mit den transfizierten Zellen migrieren. Auf die gleiche Weise können auch bereits transfizierte Zellen in benachbarte Punkte wandern. Zweitens führt das Fehlen von physikalischen Barrieren zur Kreuzkontamination^[2,7,14] von Transfektionsreagentien benachbarter Punkte, und die Zusammensetzung und Tropfengröße einer auf das Substrat gedruckten Transfektionsmischung beeinflusst die Größe der resultierenden kreisförmigen Mikropunkte. Somit werden die Homogenität der Punkte und die Dichte des gesamten Arrays eingeschränkt. Zusammengenommen zwangen diese Probleme bei bisherigen Arraydesigns dazu, relativ große Abstände zwischen den Mikropunkten einzuhalten (normalerweise mehr als 1 mm). Dies setzte die Dichte solcher Arrays stark herab und hatte zur Folge, dass die Technologie weit hinter ihrem Potenzial zurückblieb.^[7,14] Die Abbildungen 1 A und 1 B zeigen schematische Darstellungen eines zurzeit üblichen Arrays mit den genannten Problemen sowie eines gewünschten Zellarrays, in dem diese Probleme überwunden sind.

Zur Herstellung eines superhydrophil-superhydrophob mikrostrukturierten Substrats wird zunächst durch Photopolymerisation eines Präpolymers zwischen zwei Glasplatten eine 12,5 µm dünne, superhydrophile und nanoporöse Schicht

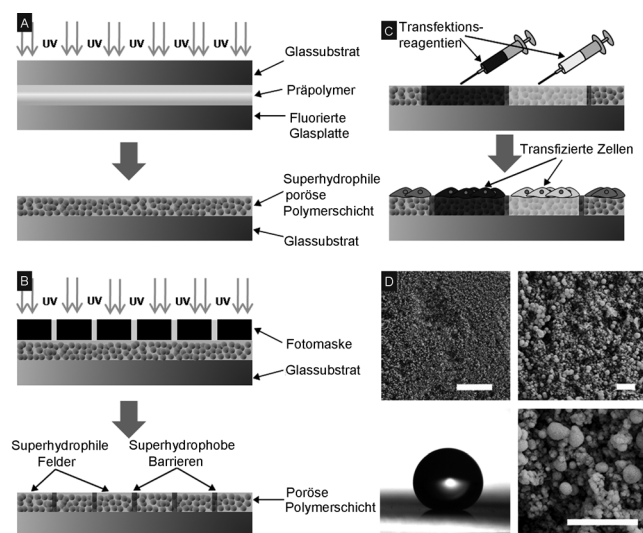


Abbildung 2. A) Herstellung einer superhydrophilen Polymerschicht auf einem Glassubstrat durch UV-initiierte radikalische Polymerisation. B) Herstellung der superhydrophoben Gitterstruktur auf der superhydrophilen Oberfläche durch UV-initiiertes photochemisches Pfropfen. C) Anwendung des Arrays in einem Zell-Screening-Experiment (z.B. reverse Transfektion): Das Array wird mit Transfektionsreagentien beladen und getrocknet. Ausgesäte Zellen werden durch die in den superhydrophilen Feldern adsorbierten Reagentien transfiziert. D) Wassertropfen auf dem superhydrophoben, mit PFPMA modifizierten, nanoporösen HEMA-EDMA und REM-Bilder des Polymers. Maßstab: oben links – 10 µm, oben rechts und unten – 1 µm.

aus HEMA-EDMA hergestellt (Abbildung 2 A).^[15,16] Die Dicke der Polymerschicht wird durch zwei die Glasplatten voneinander trennende Streifen Teflonfolie kontrolliert. Das Präpolymer besteht aus dem Monomer 2-Hydroxyethylmethacrylat (24 Gew.-%), dem Vernetzer Ethylen dimethacrylat (16 Gew.-%), einem Porogen (60 Gew.-%) und 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon (1 Gew.-% bezogen auf Monomere) als Initiator. Eine Mischung aus Cyclohexanol und *n*-Decanol (4:1 w/w) ist ein geeignetes porogenes Lösungsmittel, und die Polymerisation aus diesem Porogen ergibt, wie man aus den entsprechenden REM-Aufnahmen schließen kann, eine nanoporöse Struktur mit einer Porengröße von 100–500 nm (Abbildung 2 D und S1). Beim nassen Polymer führt die geringe Porengröße in Verbindung mit der durch das Wasser reduzierten Lichtstreuung zu Transparenz (Abbildung S4). Die Kombination von hoher Porosität (60 %) und hydrophilen Hydroxyethyl-Funktionen des auf der Glasoberfläche aufgetragenen Polymers resultiert in einer superhydrophilen Oberfläche mit statischen, anwachsenden („advancing“) und schrumpfenden („receding“) Wasserkontaktwinkeln (WKA) nahe 0° im Fall des trockenen Polymers und 15° im Fall des bereits benetzten Polymers (Abbildung S2).

Anschließend wird die superhydrophobe Gitterstruktur in der superhydrophilen HEMA-EDMA-Schicht hergestellt (Abbildung 2 B). Um die superhydrophoben Bereiche zu erzeugen, wird die HEMA-EDMA-Oberfläche durch photochemisches Pfropfen mit Poly(2,2,3,3,3-pentafluorpropylmethacrylat-*co*-ethylen dimethacrylat)-Bürsten (PFPMA-EDMA) modifiziert.^[17] Hierzu wird das mit 2,2,3,3,3-Pentafluorpropylmethacrylat, Ethylen dimethacrylat, dem Initiator Benzophenon und einer Wasser/*tert*-Butylalkohol-Mischung als Lösungsmittel benetzte Polymer mit UV-Licht bestrahlt. Aus den REM-Aufnahmen wird deutlich, dass diese Behandlung die Morphologie der porösen Struktur nicht ändert, während XPS-Messungen eine deutliche Modifizierung der HEMA-EDMA-Oberfläche mit Pentafluorpropyl-Gruppen zeigen (Abbildung S2). Die Modifizierung führt zur Umwandlung der superhydrophilen Oberfläche in ein superhydrophobes Material mit statischen, anwachsenden und schrumpfenden WKAs von jeweils 165°, 167° und 157° (Abbildung 2 D und S2). Die photochemische Methode ermöglicht den Einsatz einer Standard-Fotomaske zur präzisen Erzeugung superhydrophober Strukturen in dem superhydrophilen Substrat. Der Prozess hat eine Genauigkeit im Mikrometerbereich, kann auf große Flächen angewendet werden und führt zu einer Modifizierung im kompletten bestrahlten Querschnitt des Polymers (Abbildung 3).

Den Überlegungen zur Durchführung eines effizienten genomweiten RNAi-Zellscreens auf einem einzigen Chip folgend, wurde eine geeignete Fotomaske hergestellt (siehe die Hintergrundinformationen). Mit dieser wurde ein Array aus 50 400 voneinander durch 60 µm breite superhydrophobe Barrieren getrennten superhydrophilen Feldern hergestellt (siehe Abbildung 3).

Die Oberfläche eines idealen hochdichten Arrays für die reverse Transfektion von Zellen sollte folgenden biologischen Anforderungen genügen: 1) Sie sollte biokompatibel und nicht toxisch sein, 2) Zellen sollten auf den Mikrofeldern

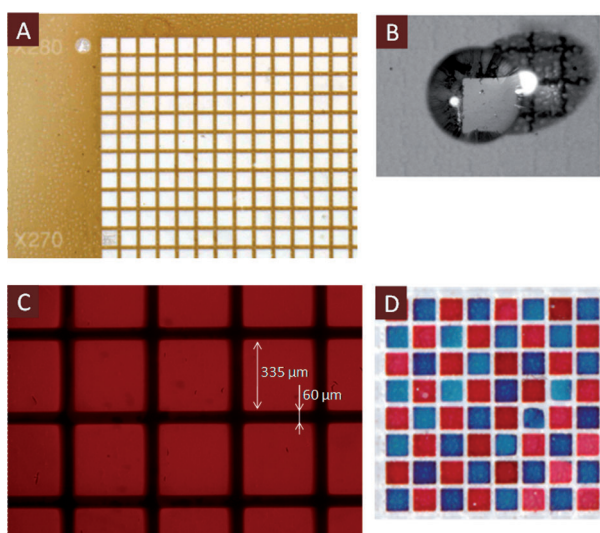


Abbildung 3. Lichtmikroskopische Aufnahmen des Arrays. A) Ecke eines Arrays aus 50400 superhydrophilen Mikrofeldern auf einer Glasplatte ($11 \times 7 \text{ cm}^2$). B) Wassertropfen in einem superhydrophilen Mikrofeld. Der Tropfen kann sich wegen der superhydrophoben Barrieren nicht in die benachbarten Felder ausbreiten. C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines mit Rhodamin 6G gedruckten Arrays. D) Ein Array, dessen Mikrofelder abwechselnd mit wässrigen Lösungen aus Neutralrot und Methylenblau gefüllt wurden.

siedeln können, 3) Zellen sollten das Gebiet zwischen den Mikrofeldern nicht besiedeln, und 4) die Zellmigration zwischen benachbarten Mikrofeldern sollte minimiert sein. Zu diesem Zweck untersuchten wir das Verhalten verschiedener häufig verwendeter Zelllinien auf dem superhydrophob-superhydrophilen Array. Fluoreszierende Mammakarzinomzellen der Ratte (MTly-CMV-eGFP-neo und MTly-CMV-mCherry-neo), Hepa- und HEK-293-Zellen wurden auf dem Array gesät und für 2 Tage inkubiert (ein gewöhnlich für reverse Transfektionsexperimente benötigter Zeitraum).^[7,12] Die Aussaatdichten der Zellen wurden dahingehend optimiert, dass die nicht photochemisch modifizierten Bereiche nach 48 h Inkubation mit einem durchgängigen Zellrasen bedeckt waren. Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente. Die superhydrophilen Mikrofelder wurden von allen getesteten Zelltypen besiedelt, während die superhydrophoben Bereiche deutlich weniger okkupiert wurden. Außerdem konnten Zellen auf den Barrieren als apoptotisch identifiziert werden, was durch runde Formen und die geringe Beweglichkeit deutlich wird. Dieses Verhalten der Zellen führt zur Bildung eines Arrays aus isolierten Zellclustern auf jedem der von superhydrophoben Barrieren abgegrenzten superhydrophilen Mikrofelder.

Für HEK-293-Zellen wurde die unterschiedliche Besiedlung der superhydrophilen Felder und superhydrophoben Barrieren quantifiziert. Nach zwei Tagen in Kultur befanden sich im Durchschnitt 79 Zellen innerhalb eines superhydrophilen Felds, während sich weniger als 2 Zellen auf der superhydrophoben Barriere zwischen zwei Feldern fanden. Analoge Experimente mit MTly-mCherry-Zellen an drei verschiedenen Zeitpunkten zeigten, dass unmittelbar nach

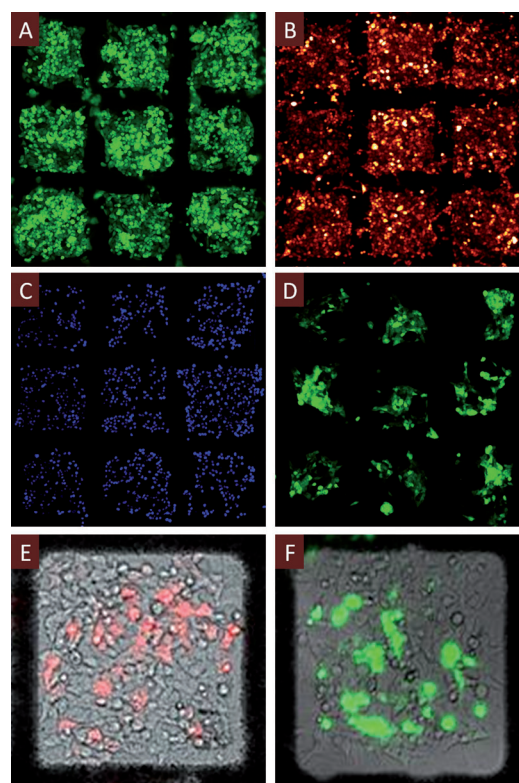


Abbildung 4. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von vier verschiedenen Zelltypen nach 48 h Wachstum auf dem Array: A) MTly-eGFP-Zellen. B) MTly-mCherry-Zellen. C) Mit DAPI gefärbte HEK-Zellen. D) eGFP exprimierende Hepa-Zellen. Mit verschiedenen Plasmiden transfizierte HEK-Zellen innerhalb eines superhydrophoben Felds: E) mCherry-Plasmid. F) eGFP-Plasmid.

der Aussaat der Zellen kaum Unterschiede in der Besiedlung der verschiedenen Oberflächen vorhanden waren und dass sich der beobachtete Unterschied in der Zellokkupation mit steigender Zellzahl stetig vergrößerte (Abbildung S5). Dieser Vorgang kann in den für MTly-eGFP-Zellen und HEK-293-Zellen aufgenommenen Videos deutlich beobachtet werden (siehe die Hintergrundinformationen, Videos S1–3). Diese Videos bestätigen des Weiteren, dass trotz ihres Abstands von nur $60 \mu\text{m}$ praktisch keine Zellmigration zwischen benachbarten Mikrofeldern möglich ist.

Superhydrophobie wird durch eine Kombination aus mikro- und nanoskaliger Rauheit mit der intrinsischen Hydrophobie eines Materials erreicht. Eine raue, superhydrophobe Oberfläche weist normalerweise kleine Unebenheiten auf. Wasser kann entweder in diese eindringen (Wenzel-Regime) oder aufgrund seiner Oberflächenspannung auf ihnen aufliegen (Cassie-Baxter-Regime).^[18,19] Wir nahmen an, dass die überraschende Zellresistenz der superhydrophoben Barrieren durch die im Cassie-Baxter-Regime in der porösen Oberfläche eingeschlossene Luft hervorgerufen wird. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde das Verhalten von Zellen auf einer in das Wenzel-Regime überführten Oberfläche untersucht. Der Unterschied zwischen der Besiedlung der Mikrofelder und den nassen Barrieren wurde daraufhin für MTly-mCherry-Zellen signifikant geringer

(Abbildung S6B). Im Fall von HEK-293-Zellen auf dem Array im Wenzel-Regime konnte sogar keinerlei Präferenz für einen Oberflächentyp mehr beobachtet werden, und die Zellen konnten frei migrieren und proliferieren (Abbildung S6C).

Um die Anwendbarkeit des hergestellten Arrays für reverse Transfektionsexperimente zu demonstrieren, wurden einige Mikrofelder mit zwei verschiedenen plasmidbasierten Transfektionsmischungen beladen.^[13] Nach dem Trocknen wurden HEK-293-Zellen auf dem Array ausgesät und für 48 h inkubiert. Die Abbildungen 4E und F zeigen die resultierende Expressierung von mCherry und GFP in den HEK-293-Zellen.

Es konnte eine einfache und schnelle Methode zur Herstellung von hochdichten Zellmikroarrays entwickelt werden, die auf der photochemischen Erzeugung superhydrophob-superhydrophiler Mikrostrukturen in einer porösen Polymerbeschichtung beruht. Wir erwarten, dass diese Technologie die Herstellung von „Genome-on-a-Chip“-Zellmikroarrays ermöglichen wird, die den Aufwand für genomweite Screenings signifikant reduzieren und somit ihre Anwendbarkeit deutlich verbessern werden. Schließlich ist die hier vorgestellte Methode zur Erzeugung räumlich kontrolliert wachsender, isolierter Zellcluster auch auf die Herstellung von hochdichten Zellarrays zur Untersuchung anderer Klassen biologisch aktiver Verbindungen übertragbar. Arbeiten zur Herstellung von Zellmikroarrays für das Screening von Proteinen und Wirkstoffkandidaten sind derzeit in unserem Labor im Gange.

Eingegangen am 12. April 2011,
veränderte Fassung am 6. Juni 2011
Online veröffentlicht am 12. Juli 2011

Stichwörter: Hochdurchsatz-Screening · Polymere · Superhydrophobie · Zellmikroarrays · Zelltransfektion

- [1] J. D. Hoheisel, *Nat. Rev. Genet.* **2006**, 7, 200–210.
- [2] A. L. Hook, H. Thissen, N. H. Voelcker, *Trends Biotechnol.* **2006**, 24, 471–477.
- [3] N. Perrimon, B. Mathey-Prevot, *Genetics* **2007**, 175, 7–16.
- [4] D. B. Wheeler, A. E. Carpenter, D. M. Sabatini, *Nat. Genet.* **2005**, 37, 25–30.
- [5] M. L. Yarmush, K. R. King, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2009**, 11, 235–257.
- [6] H. Erfle, B. Neumann, U. Liebel, P. Rogers, M. Held, T. Walter, J. Ellenberg, R. Pepperkok, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 392–399.
- [7] H. Erfle, B. Neumann, P. Rogers, J. Bulkescher, J. Ellenberg, R. Pepperkok, *J. Biomol. Screening* **2008**, 13, 575–580.
- [8] S. N. Bailey, D. M. Sabatini, B. R. Stockwell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 16144–16149.
- [9] J. Ziauddin, D. M. Sabatini, *Nature* **2001**, 411, 107–110.
- [10] Y. Soen, A. Mori, T. D. Palmer, P. O. Brown, *Mol. Systems Biol.* **2006**, 2, 1–14.
- [11] C. J. Flaim, S. Chien, S. N. Bhatia, *Nat. Methods* **2005**, 2, 119–125.
- [12] B. Neumann, T. Walter, J. K. Heriche, J. Bulkescher, H. Erfle, C. Conrad, P. Rogers, I. Poser, M. Held, U. Liebel, C. Cetin, F. Sieckmann, G. Pau, R. Kabbe, A. Wunsche, V. Satagopam, M. H. A. Schmitz, C. Chapuis, D. W. Gerlich, R. Schneider, R. Eils, W. Huber, J. M. Peters, A. A. Hyman, R. Durbin, R. Pepperkok, J. Ellenberg, *Nature* **2010**, 464, 721–727.
- [13] M. Sturzl, A. Konrad, G. Sander, E. Wies, F. Neipel, E. Naschberger, S. Reipschlag, N. Gonin-Laurent, R. E. Horch, U. Kneser, W. Hohenberger, H. Erfle, M. Thureau, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2008**, 11, 159–172.
- [14] J. Reymann, N. Beil, J. Beneke, P. P. Kalletta, K. Burkert, H. Erfle, *BioTechniques* **2009**, 47, 877–878.
- [15] Im Folgenden bezeichnen wir ein Polymer als nano- bzw. mikroporös, wenn seine Porengröße im Bereich von einigen zehn Nanometern bzw. wenigen Mikrometern ist.
- [16] P. A. Levkin, F. Svec, J. M. J. Frechet, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, 19, 1993–1998.
- [17] B. Ranby, *Macromol. Chem. Macromol. Symp.* **1992**, 63, 55–67.
- [18] D. Quere, *NeuroReport* **2005**, 68, 2495–2532.
- [19] X. M. Li, D. Reinhoudt, M. Crego-Calama, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1350–1368.