

Zellzählung mittels Einzelobjektelektrochemie

J. Justin Gooding*

Einzelne Zellen · Einzelobjektelektrochemie · Elektrochemie · Nanoaufprall · Säugerzellen

Messmethoden bilden das Fundament der Naturwissenschaften, und es sind Experimente, mit denen wir unsere Hypothesen auf den Prüfstand stellen. Der Fortschritt in der Komplexität der Fragen, die wir zu beantworten vermögen, geht einher mit immer kleiner werdenden Mengen Materials, das wir für eine einzelne Messung benötigen. Wir sind an einem Punkt angekommen, wo die Messung einzelner Objekte, das können Moleküle, Zellen oder Partikel sein, zum Standard geworden ist. Durch unsere Fähigkeit, einzelne Objekte zu messen, sind wir in der Lage, Fragen zur Heterogenität und Stochastik im Verhalten und zur Bedeutung dieser Heterogenität zu stellen. Wir können auch die Frage stellen, ob unser Verständnis eines Mechanismus auf der Ebene einzelner Objekte gültig bleibt. Oder wie das Verhalten einer Bulksubstanz von den konstituierenden Einzelobjekten beeinflusst wird. Eine Folge dieser Familie von Fragen ist, dass viele Einzelobjektmessungen an einer Probe durchgeführt werden müssen. Diese Anforderung der Messung vieler Einzelobjekte stellt einen Wendepunkt dar. Der Wendepunkt ist, dass die Größe der gemessenen Probe anfängt wieder anzusteigen, nun aber durch das Zählen vieler Einzelobjekte in der Probe zur selben Zeit.^[1]

Eine ganze Schar von Messungen wurde eingesetzt, um Experimente an einzelnen Molekülen oder einzelnen Zellen durchzuführen. Die Elektrochemie spielt eine zentrale Rolle bei der Durchführung von Experimenten an einzelnen Objekten. Das Interesse an der Elektrochemie einzelner Objekte ist in den letzten Jahren explodiert, die Wurzeln reichen aber um über 30 Jahre zurück. Zum Beispiel wurden chronoamperometrische Messungen an exocytosierten Spezies aus einzelnen Zellen erstmals in den frühen 1980er Jahren durchgeführt.^[2] Über Messungen mit Nanoporen wurde erstmals Mitte der 1990er Jahre berichtet,^[3] und diese Verfahren sind heute soweit fortgeschritten, dass sie zu kommerziellen Techniken ausgearbeitet werden können. Seit diesen ersten Arbeiten wurde eine ganze Reihe von elektrochemischen Techniken für Einzelobjektmessungen entwickelt, darunter Bruchkontaktexperimente mittels Rastertun-

nelmikroskopie,^[4] elektrochemische Rastermikroskopie^[5] und Nanoaufprallexperimente.^[6] Wir bezeichnen dieses Feld als Einzelobjektelektrochemie („single entity electrochemistry“) (siehe Abbildung 1).

Das Feld der Einzelobjektelektrochemie hält praktische, grundsätzliche und anwendungsbezogene Herausforderungen bereit. Die praktischen Herausforderungen ergeben sich aus den geringen Signalstärken und den potenziell großen Datensätzen, die bei der Durchführung vieler Einzelobjektmessungen anfallen. Aus grundsätzlicher Sicht ist zu konstatieren, dass die zu messenden Objekte oftmals kleiner sind als die Dicke elektrischer Doppelschichten und in einem Größenbereich liegen, wo Defekte und kleine Abweichungen in der lokalen Zusammensetzung signifikant werden. Dies stellt unser kontinuumgeprägtes Denken bezüglich Stofftransport und Kinetiken vor Schwierigkeiten. Aus mehr anwendungsbezogener Sicht erlaubt das Feld die Entwicklung immer kleinerer Instrumente und gibt Einblick in die Funktionsweise makroskopischer Materialien auf der Nanoskala.

Unter den elektrochemischen Einzelobjekttechniken gilt derzeit wohl die höchste Aufmerksamkeit den Nanopartikelkollisionsexperimenten (auch Nanopartikelaufprall genannt). Dies ist zum Teil deshalb so, weil diese Experimente von jedem Elektrochemiker durchgeführt werden können. Alles was man braucht, ist ein Potentiostat, der niedrige Ströme messen kann, ein Faradayscher Käfig, Nanopartikel, Mikroelektroden und die Vorstellungskraft des Experimentators. Die Methode ging aus einer bahnbrechenden Arbeit von Bard und Mitarbeitern aus dem Jahr 2007 hervor.^[7] In dieser Veröffentlichung wurde eine Kohlenstoffmikrofaser-elektrode in wässrigem Elektrolyt auf ein Potential eingestellt, bei dem nur eine geringe Wasserstoffreduktion stattfindet. Die Injektion von Platin-Nanopartikeln, die elektrokatalytisch aktiv in der Wasserstoffreduktion sind, resultierte in einer Serie kurzlebiger Stromspitzen. Diese Stromspitzen entstehen, wenn Platin-Nanopartikel mit der Elektrode in Kontakt kommen und dabei die Wasserstoffreduktion katalysieren. Viele Varianten dieses durch den Aufprall eines Nanomaterials auf eine Elektrode vermittelten Elektronentransfers wurden seither realisiert.^[6] Ihre gemeinsame Grundlage ist, dass die Mikroelektrode gegenüber einer Redoxspezies in Lösung elektrochemisch relativ inert ist und ein elektrochemischer Vorgang nur dann beobachtet wird, wenn das Nanopartikel auf die Elektrode prallt.

Der alternative Weg zur Durchführung dieses Experiments, eingeführt von Compton und Mitarbeitern,^[8] besteht darin, das Nanopartikel selbst zu oxidieren oder zu reduzie-

[*] Prof. J. J. Gooding

School of Chemistry, The Australian Centre for NanoMedicine and ARC Centre of Excellence in Convergent Bio-Nano Science and Technology, The University of New South Wales Sydney, 2052 (Australien)
E-Mail: Justin.gooding@unsw.edu.au

Die Identifikationsnummer (ORCID) des Autors ist unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201605152> zu finden.

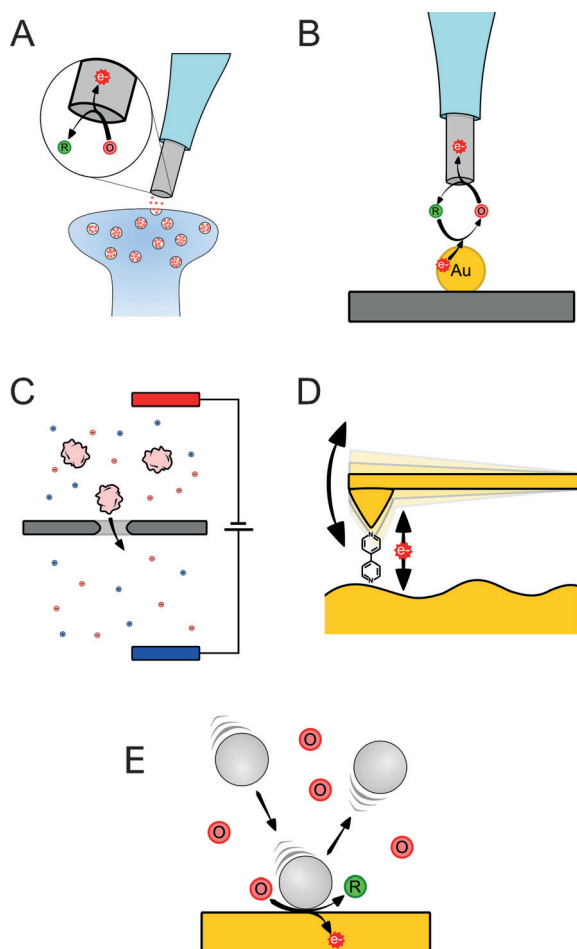


Abbildung 1. Die Arten von Experimenten, die zusammen das Gebiet der Einzelobjektelektrochemie bilden: A) Eine Mikroelektrode zur Amperometrie redoxaktiver Verbindungen, die durch Exocytose aus einzelnen Zellen freigesetzt werden. B) Elektrochemische Rastertunnelmikroskop (SECM)-Messung an einem einzelnen Nanopartikel zur Veranschaulichung der Leistungsfähigkeit der SECM bei der Messung elektrochemischer Vorgänge auf der Nanoskala. C) Nanoporen für den Nachweis einzelner Moleküle; beim Durchgang des Moleküls durch die Pore wird der Ionenstrom blockiert und die Leitfähigkeit reduziert. D) Bruchkontaktexperiment mit einem Rastertunnelmikroskop; der Tunnelstrom beim Hin- und Wegfahren der Mikroskopspitze zur bzw. von der Oberfläche wird gemessen. E) Nanopartikelauflageexperimente, bei denen ein elektrochemisches Signal nur beobachtet wird, wenn das Nanopartikel auf eine Elektrode aufprallt.

ren. Viele verschiedene Metallpartikel,^[6] Micellen,^[9] Liposomen^[10] und unilamellare Vesikel^[11] wurden auf diese Weise verwendet. Eine jüngste Veröffentlichung von Compton und Mitarbeitern in der *Angewandten Chemie*^[12] beschreibt nun einen großen Fortschritt auf diesem Gebiet in Form von Aufprallexperimenten mit roten Blutkörperchen unter physiologischen Bedingungen. Was hier so einzigartig ist, ist nicht, dass biologische Objekte durch Aufprallvoltammetrie nachgewiesen werden; Viren, die mit Silber-Nanopartikeln^[13] oder Glukoseoxidase-Antikörper-Konjugaten^[14] markiert wurden, wurden bereits früher in Aufprallexperimenten eingesetzt. Das vielmehr Besondere ist die Verwendung von Säugerzellen, die vollständig unmarkiert sind und in Blut er-

fasst werden (verdünnt auf 25 %, um die Viskosität zu reduzieren und Verklumpung zu vermeiden).

Der elektrochemische Vorgang, der erfasst wird, wenn rote Blutzellen auf eine pyrolytische Graphitelektrode aufprallen, wird auf einen Sauerstoffreduktionsstrom zurückgeführt; man kann sich das rote Blutkörperchen hier als einen Sack voll Sauerstoff vorstellen. Compton und Mitarbeiter zeigen weiter, dass das elektrochemische Signal für jede Zelle durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid zur Lösung verstärkt werden kann. Es wird angenommen, dass die Verstärkung dadurch verursacht wird, dass Katalase-Enzyme das Wasserstoffperoxid in Sauerstoff umwandeln. Was in der voltammetrischen Messung beobachtet wird, ist das Auftreten einer Stromspitze jedes Mal wenn eine Zelle auf die Oberfläche prallt. Beim Aufprall werden die Zellen hämolytisiert, sodass die Elektrode nicht verschmutzt wird. Die Autoren wiesen nach, dass Lyse der Zellen durch hohe Konzentrationen von Wasserstoffperoxid in der Nähe der Elektrode verursacht wird.

Warum nun ist diese Arbeit wichtig? Die Fähigkeit, beim Aufprall einzelner Zellen auf die Elektrode Stromspitzen auszuzählen, könnte im Prinzip automatisiert werden, vorausgesetzt es lässt sich verifizieren, dass jede Stromspitze von einer einzelnen Zelle stammt. Das Zählen roter Blutkörperchen könnte für die Diagnose von Blutkrankheiten nützlich sein. Rote Blutkörperchen werden häufig mit einem Hämozytometer gezählt. Ein Hämozytometer ist ein dicker Mikroskopträger mit einer Kammer bekannten Volumens, wodurch die Zahl der Zellen pro Volumen mit einem Mikroskop ermittelt werden kann. Eine stärker automatisierte Technik zum Zählen von Zellen – sowie ferner zum Sortieren von Zellen auf Einzelzellniveau – bietet die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) als eine Routinemethode der modernen Zellbiologie. Der Vorteil beim Zählen roter Blutkörperchen durch elektrochemische Aufprallexperimente ist die Einfachheit der Messausrüstung und der Umstand, dass keine Markierung angebracht werden muss. Moderne FACS-Instrumente sind oftmals technisch komplexer und teurer als dies für das Zählen roter Blutkörperchen nötig wäre.

Die Methode bietet aber noch weitaus mehr Möglichkeiten als bloß das Zählen von Zellen. Signalthöhe und Fläche unter dem Signal könnten eine Möglichkeit zur Bestimmung der Heterogenität roter Blutkörperchen bieten. Es ließe sich auch noch mehr vorstellen, zum Beispiel andere Arten von Zellen oder wie Zellen auf Antioxidantien oder andere Redoxspezies reagieren.

Was Compton und Mitarbeiter demonstriert haben, ist eine dramatische Ausweitung elektrochemischer Aufprallexperimente auf komplexe biologische Objekte in komplexen biologischen Medien. Es scheint, dass diese Entwicklung erhebliche Auswirkungen haben könnte, die weit über die Einführung eines neuen elektrochemischen Aufprallexperimentes hinausgehen. Es ist sicher anzunehmen, dass die Ergebnisse andere Forscher dazu inspirieren werden, Aufprallexperimente von Zellen vorzunehmen. Dieser Fortschritt hat das Potenzial, uns zu einem besseren Verständnis biologischer Heterogenität zu geleiten und neue Diagnoseinstrumente auf der Grundlage der Einzelzellelektrochemie zu entwickeln.

Danksagung

Der Autor dankt dem Australian Research Council für ein ARC Laureate Fellowship (FL150100060; „Single Entity Measurements“) sowie Jesse Goyette für das Anfertigen der Abbildungen.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12956–12958
Angew. Chem. **2016**, *128*, 13148–13150

-
- [1] J. J. Gooding, K. Gaus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, DOI: 10.1002/anie.201600495; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 10.1002/ange.201600495.
- [2] C. Amatore, S. Arbault, M. Guille, F. Lemaitre, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2585–2621.
- [3] H. Bayley, P. S. Cremer, *Nature* **2001**, *413*, 226–230.
- [4] B. Q. Xu, N. J. J. Tao, *Science* **2003**, *301*, 1221–1223.
- [5] A. J. Bard, F. R. F. Fan, J. Kwak, O. Lev, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 132–138.
- [6] W. Cheng, R. G. Compton, *Trac-Trends Anal. Chem.* **2014**, *58*, 79–89.
- [7] X. Xiao, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9610.
- [8] Y.-G. Zhou, N. V. Rees, R. G. Compton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4219–4221; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4305–4307.
- [9] H. S. Toh, R. G. Compton, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 5053–5058.
- [10] W. Cheng, R. G. Compton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13928–13930; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 14148–14150.
- [11] E. Lebègue, C. M. Anderson, J. E. Dick, L. J. Webb, A. J. Bard, *Langmuir* **2015**, *31*, 11734–11739.
- [12] L. Sepunaru, S. V. Sokolov, J. Holter, N. P. Young, R. G. Compton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9768–9771; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 9920–9923.
- [13] L. Sepunaru, K. Tschulik, C. Batchelor-McAuley, R. Gavish, R. G. Compton, *Biomater. Sci.* **2015**, *3*, 816–820.
- [14] J. E. Dick, A. T. Hilterbrand, L. M. Strawsine, J. W. Upton, A. J. Bard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 6403–6408.

Eingegangen am 4. Juli 2016

Online veröffentlicht am 17. August 2016