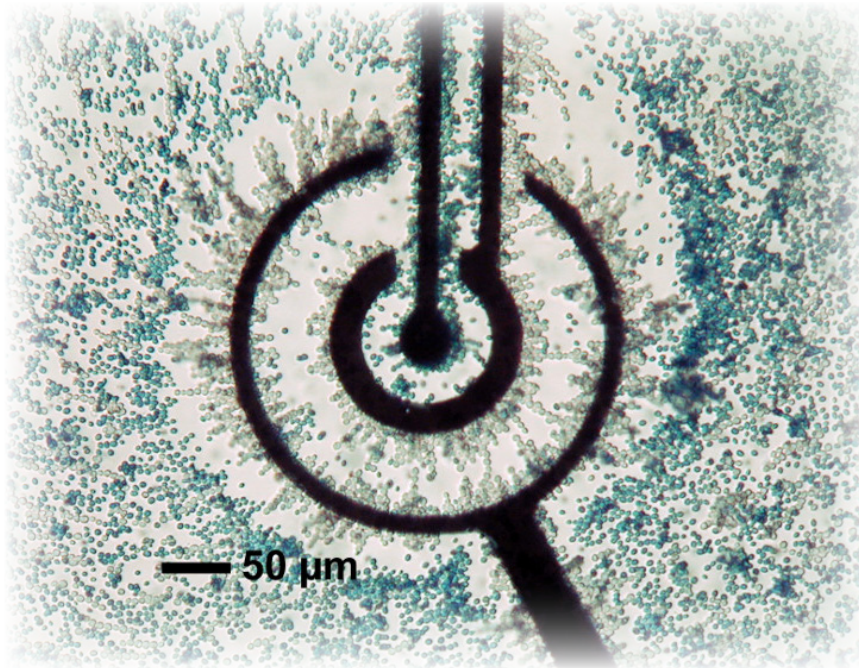


# Zellbasierte Sensoren



## **Von**

Michael Rutschmann, Reto Galli, Tobias Müller, Heinrich Reiser  
LST-VZ 2008  
07. Juni 2010

## **Modul**

Mikrosystemtechnik MIS

## **Dozent**

Dr. Marc Dusseiller

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Grundlagen</b>	<b>3</b>
1.1 Definition	3
1.2 Vor- und Nachteile	3
1.3 Anwendungsgebiete	3
<b>2 Messmethoden zellbasierter Sensoren</b>	<b>4</b>
2.1 Überblick	4
2.2 Impedanzmessung	5
2.3 Messung Stoffwechselprodukte	5
2.4 Extrazelluläre Signale elektrogener Zellen und Zellnetzwerken	6
2.5 Optische Methoden	6
2.5.1 Raman Spektroskopie	6
2.5.2 Aggregation von Pigmentorganellen in Chromatophoren	7
<b>3 Anwendungsbeispiel: Sensor auf der Basis von Geschmackszellen</b>	<b>8</b>
3.1 Geschmackserkennung allgemein	8
3.2 Versuchserklärung	8
3.3 Zell-Chip Schnittstelle	9
3.4 Signalauswertung	10
<b>4 Ausblick</b>	<b>11</b>

## Abstract

Zellbasierte Sensoren sind Sensoren, die lebende Zellen und Gewebe mit konventionellen Materialien und Mikrofabrikationsprozessen verbinden, um hybride Geräte zu bilden. Ziel dieser Fallstudie war es, einen grundsätzlichen Einblick in die Welt der zellbasierten Biosensoren zu geben. Anhand von verschiedenen Messmethoden wird deren Wirkungsweise erläutert. Desweiteren wird in dieser Studie auf eine interessante Forschungsarbeit eingegangen, in welcher versucht wurde, einen zellbasierten Geschmackssensor auf einer Silizium-Plattform zu realisieren.

# 1 Grundlagen

## 1.1 Definition

Zellbasierte Sensoren sind Sensoren, die lebende Zellen und Gewebe mit konventionellen Materialien und Mikrofabrikationsprozessen verbinden, um hybride Geräte zu bilden. Lebende Zellen haben etliche gemeinsame Eigenschaften, die sie für den Einsatz als Komponente in einem Biosensor nützlich machen. Rezeptoren mit variierender Genauigkeit für extrazelluläre Reize sind in der Zellmembran und im Nukleus eingebettet. Signalübertragungskaskaden verstärken Signalwege aufgrund von Rezeptor/Liganden – Bindungen. Dies führt zu einer Zellantwort (z.B. Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ , Transkription von Genen, Änderung des Membranpotentials usw.). [1]

## 1.2 Vor- und Nachteile

Zell- und Gewebebasierte Sensoren bieten eine Vielzahl an Vorteilen gegenüber Nicht-Biosensoren:

- Sie sind in der Lage unerwartete Bedrohungen (neue Krankheitserreger) festzustellen und/oder zu klassifizieren
- Sie können Sensorangaben mit der menschlichen Physiologie/Pathologie verknüpfen.
- Sie gewährleisten eine verbesserte Stabilität von Enzymen, Rezeptoren oder Antikörpern in biologischen Systemen.
- Sie können sich genomische Vorgänge zu Nutze machen, um DNA-Chips, Polymerase Kettenreaktion (PCR) usw. zu untersuchen.

Zell- und Gewebebasierte Sensoren haben aber auch Nachteile gegenüber Nicht-Biosensoren:

- Sie sind stark abhängig von ihrer Umwelt
- Ihre Veränderlichkeit schreitet nach diversen rechnerbetonten Strategien
- Input/Output Interaktionen sind schwierig zu definieren.

[1]

## 1.3 Anwendungsgebiete

Anwendungsgebiete für Zellbasierte Sensoren sind umfangreich

- Pharmazeutische Arzneimittelherstellung
- Neuronale Netzwerke
- Medizinische Diagnostik
- Zellbasierte Therapien
- Erfassung von chemisch und biologisch aktiven Stoffen

[1]

# 2 Messmethoden zellbasierter Sensoren

## 2.1 Überblick

Es gibt verschiedene Technologien welche eingesetzt werden können, um Zellsignale von Zellen in zellbasierten Sensoren zu messen. In diesem Kapitel soll vor allem ein Überblick über verschiedene Methoden gegeben werden. Folgende Techniken werden vorgestellt:

1. Mit einer Wechselstrom Leitfähigkeitsmessung wird die Impedanz zwischen den einzelnen Zellen und zwischen den Zellen und dem Substrat bestimmt. Die Zellen funktionieren bei dieser Methode als Widerstand.
2. Mit (Bio-)chemische Sensoren werden die metabolischen Produkte, welche von kultivierten Zellen in das Medium abgegeben wurden, gemessen.
3. Direkte elektrische Antwort von elektrogenen Zellen (Neuronale Zellen, Herzmuskelzellen, Beta-Zellen im Pankreas) oder eines neuronalen Zellnetzwerks werden gemessen. [2]
4. Raman Spektroskopie zur Klassifizierung und Quantifizierung von Stoffen anhand der Zellveränderungen über die Zeit. [7]
5. Veränderung der Pigmentorganellen in Chromatophoren [3]

Abbildung 6 zeigt die Kombination verschiedener Messsysteme in einem Device, es wurden die Methoden 1-3 integriert, diese ergänzen sich optimal.

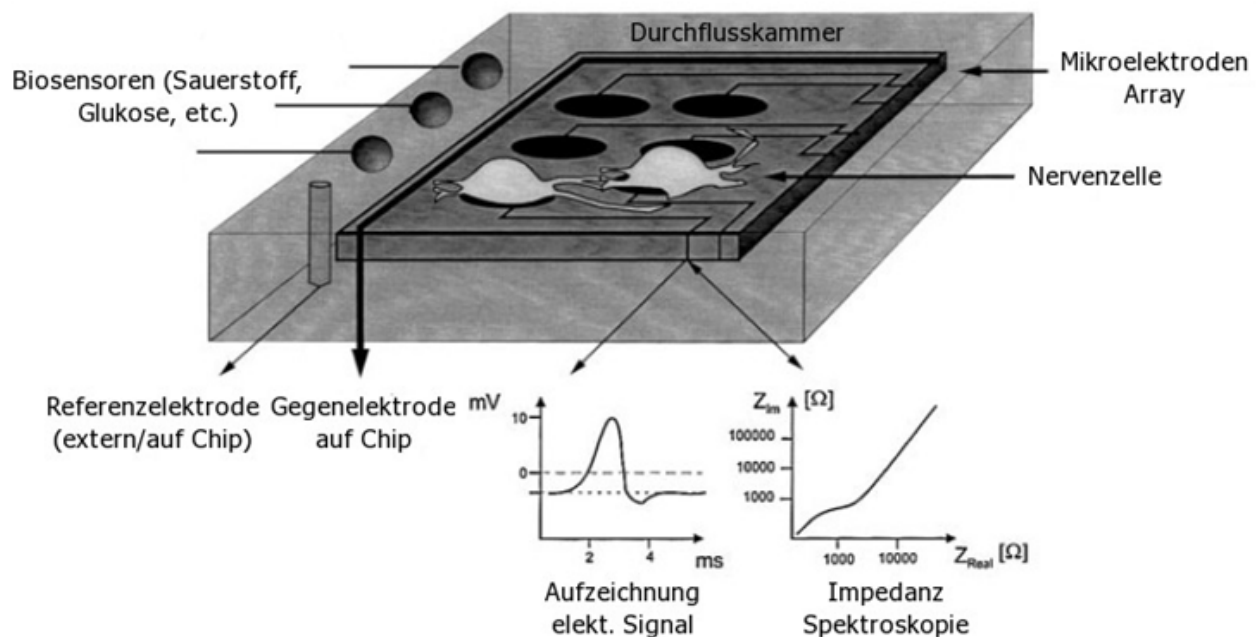


Abbildung 1: Anwendung verschiedener Messmethoden in einer Durchflusskammer [3]

## 2.2 Impedanzmessung

Nachfolgend sollen zwei verschiedene Methoden beschrieben werden, die für die Bestimmung des Zell-Zell Kontaktes verwendet werden.

Die Zellen werden auf einem Array aus planaren Elektroden, welche auf einem Substrat aufgebracht sind, kultiviert. Die Impedanz wird entweder zwischen zwei der Elektroden gemessen oder aber zwischen einer Elektrode und einer Gegenelektrode (auf einem Chip oder direkt im Medium). [2] Abbildung 3 zeigt ein mögliches Layout eines Chips mit planaren Elektroden. Das Substrat ist aus  $\text{Al}_2\text{O}_3$  Keramik und wurde durch das Siebdruckverfahren mit zwei ineinandergreifenden Elektrodenstrukturen (Interdigitated electrode structure, IDEs) bedruckt. [4]

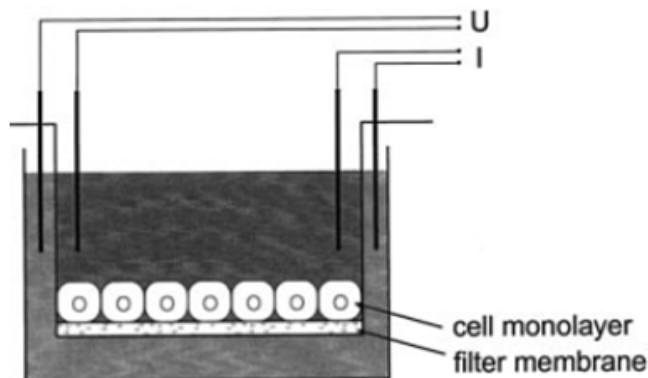


Abbildung 2: Üblicher Aufbau zur Bestimmung des Widerstandes einer Zellschicht [5]

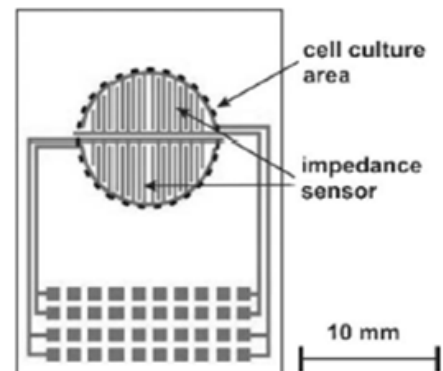


Abbildung 3: Sensorchip mit 2 IDEs [4]

Beim zweiten Aufbau können die Zellen auch auf einem wasserporösen Filter kultiviert werden, welcher zwei Kompartimente trennt. In jedem Kompartiment befindet sich eine grosse Elektrode, durch welche der Gesamtwiderstand der Zellschicht auf dem Filter bestimmt werden kann.

Die erste Messanordnung hat den Vorteil, dass die Zellen in normalen Schalen kultiviert werden können, d.h. auf einem festen, nicht porösen Träger. Die planaren Elektroden müssen jedoch durch z.B. durch Dünnschicht-Verdampfungsprozesse separat präpariert werden.

Bei beiden Messaufbauten wird die Impedanz in Funktion der Zeit und der sich ändernden Umgebung gemessen. Im ersten Aufbau beeinflusst auch der Kontakt der Zelle zur Elektrode den Widerstand.

Zahlreiche Anwendungen für diese Messmethode sind möglich. Beispielsweise können Arzneimittel getestet werden. Denkbar wäre auch das Testen eines Anti-Tumor Medikamentes mit kultivierten Tumorzellen. Ein weiteres Anwendungsbeispiel sind Medikamente, welche die Blut-Hirn-Schranke überwinden müssen; als Zellschicht werden Endothalzellen verwendet. Ein weiterer Anwendungsbereich könnte auch der toxikologische Einfluss von Schwermetallionen sein. [2]

## 2.3 Messung Stoffwechselprodukte

Die Messung von extrazellulären Stoffwechselprodukten ist bestens bekannt. Stoffwechselraten in Zellen sind auf rezeptorgesteuerte Vorgänge zurückzuführen, Beispiele solcher sind die Geschwindigkeit der Versauerung von der extrazellulären Umgebung oder Änderungen des Sauerstoffgehaltes ausserhalb der Zelle. Es gibt viele chemische und biochemische Sensoren, welche, abhängig vom Stoffwechselprodukt, zur Detektion verwendet werden können.

Dazu gehören:

- Glas-Elektroden
- pH-sensitive ISFETs (Ionen-sensitive Feldeffekt Transistoren)
- LAPS (Licht-adressierbare potentiometrische Sensoren) um pH-Veränderungen aufzuzeichnen
- Clark Elektroden für Sauerstoff
- Enzymbasierende amperometrische Geräte zur Messung von Glukose und Laktose.
- Ionen-sensitive Elektroden oder ISFETs mit Ionen-selektiven Membranen über dem Gate zur Detektion anderer Ionen als  $H^+$ , beispielsweise  $Na^+$  oder  $Ca^+$

Alle verschiedenen Sensoren können entweder alleine oder aber in Kombination mit den anderen vorgestellten Messmethoden verwendet werden. Die kombinierte Messung von verschiedenen Signalen ist sehr nützlich, weil Zellen, die von aussen stimuliert werden, mit paralleler Aktivierung verschiedener Signalpfade antworten.

Es würde den Umfang dieser Fallstudie sprengen jeden dieser verschiedenen Sensoren beschreiben zu wollen und deshalb haben wir uns auf die Auflistung der verschiedenen Methoden zur Messung von Stoffwechselprodukten beschränkt. [2]

## 2.4 Extrazelluläre Signale elektrogener Zellen und Zellnetzwerken

Nervenzellen und Nervenzellen-Netzwerke sind sehr sensitiv gegenüber einer grossen Anzahl von neuroaktiven Verbindungen, welche dem Kulturmedium hinzugefügt werden. Neuroaktive Verbindungen sind wasserlöslich und beeinflussen den empfindlichen elektro-physiologischen Mechanismus von Nervenzellen.

Solche Neurochemikalien wirken auf Nervenzellen oder Nervenzellen-Netzwerke kultiviert auf Feldeffekttransistoren (FET) oder Mikroelektroden Arrays. Diese Wirkung führt während eines Aktionspotentials zu einer Änderung des Membranpotentials. Das Potential hat einen Einfluss auf das Gate des FETs und hat somit eine Auswirkung auf die Kapazität zwischen dem Axon der Nervenzelle und der Mikroelektrode. Mit einem Wechselstrom-gekoppelten Verstärker mit hoher Eingangsimpedanz kann diese Kapazität gemessen werden. Einzelne Nervenzellen geben weniger zuverlässige Signale zurück, weil sie nicht einfach so aktiv werden und müssen deshalb von aussen angeregt werden, was zu einer kurzen Lebensdauer führt. Zudem resultiert die fehlende natürliche Umgebung in unnatürlichen Reaktionen. Im Gegensatz dazu sind die Nervenzellen-Netzwerke relativ fehlertolerant. [2]

## 2.5 Optische Methoden

### 2.5.1 Raman Spektroskopie

Ein neuer Ansatz um Signale eines zellbasierte Sensors zu detektieren ist die Raman Spektroskopie. Die Klassifizierung und Quantifizierung eines Giftstoffes anhand der Zelleinwirkung ist mit Ausnahme der Nervenzellen-Netzwerk-Methode nicht möglich. Der Grund ist, dass die Untersuchung der Zellen nur limitierte biologische Informationen zurückliefert und so in ähnlichen Änderungen für viele Stoffe resultiert. Die nicht-resonante konventionelle Raman Spektroskopie basiert auf der Tatsache, dass verschiedene Stoffe unterschiedliche Effekte auf lebende Zellen haben und spezifisch zeitabhängige biochemische Veränderungen hervorrufen. Die gesamte biochemische Zusammensetzung der Zelle wird durch das Raman Spektrum repräsentiert, so dass verschiedene Stoffe, welche verschiedene Zellantworten initiieren, charakteristische Änderungen im Raman Spektrum hervorbringen. Auf eine Probe einfallende Photonen können entweder elastisch (keine Änderung der

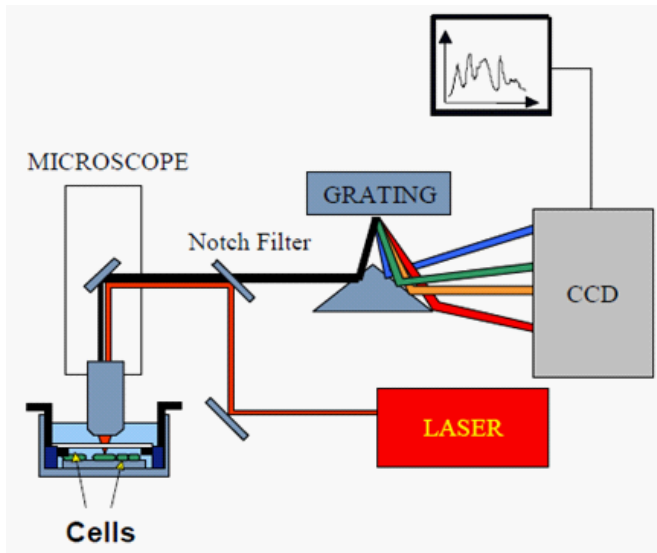


Abbildung 4: Experimenteller Aufbau zur Untersuchung von Zellen mit Raman Spektroskopie [7]

Energie) oder unelastisch gestreut (Änderung der Energie) werden. Die Raman Spektroskopie basiert auf der unelastischen Streuung. Während der Interaktion von Photonen mit den vibrierenden Molekülen der Probe können Photonen Energie zu Molekülen transferieren oder von ihnen erhalten. Die Energieänderung der gestreuten Photonen korrespondiert mit dem Level der Schwingungsenergie der Moleküle der Probe. Auf der Abbildung 4 ist ein experimenteller Aufbau zur Untersuchung von Zellen dargestellt. Der Laser emittiert die Photonen, der Kerbfilter (Notch Filter) filtert die elastische Streuung heraus. Beim Beugungsgitter (Grating) wird das Licht in das Spektrum aufgeteilt und danach auf einen CCD-Foto-Sensor gelenkt, welcher das Spektrum erfasst. [7]

## 2.5.2 Aggregation von Pigmentorganellen in Chromatophoren

Ein anderes Prinzip ist ein zellbasierter Sensor der Chromatophoren verwenden, pigmenthaltige Zellen welche bei Fischen, Amphibien und Reptilien verantwortlich für die funkelnden Farben sind. Verschiedene Krankheitserreger können das Erscheinungsbild der Chromatophore verändern und ändern oft auch die innere Anordnung der Pigmententhaltenden Organellen. Auch chemische Stoffe wie Ionenkanal-Wirkstoffe, Schwermetalle und bakterielle Toxine können Chromatophoren von aussen stimulieren. Dies führt zu einer Aggregation der Pigmente innerhalb der Zelle, d.h. die Pigmentorganellen bewegen sich zur Mitte und die Farbe der Zellen wird heller. Über die Messung der optischen Dichte können die morphologischen Änderungen einfach überwacht werden. Diese Technik wurde bereits erfolgreich bei der Identifikation von chemischen Kampfstoffen angewendet. [6]

# 3 Anwendungsbeispiel: Sensor auf der Basis von Geschmackszellen

Das unten vorgestellte Beispiel beschreibt eine Forschungsarbeit aus dem Jahr 2008. Es wurde versucht ein zellbasierter Geschmackssensor auf einer Silizium-Plattform zu realisieren.

## 3.1 Geschmackserkennung allgemein

Geschmackserkennung ist eine alte und sehr wichtige Methode der Chemosensorik um Chemikalien in der Umwelt zu erkennen. In dem letzten Jahrzehnt wurde viel in den Bereichen Genetik und Molekularbiologie geforscht. Unter anderem durch die Anwendung der „patch-clamp“ Technologie konnte der Mechanismus des Geschmackserkennens besser verstanden werden. In bisherigen Geschmackssensoren werden hauptsächlich künstliche Sensoren auf der Basis von sehr sensitiven Polymeren verwendet. Die Sensitivität und Selektivität zur Geschmackserkennung ist bei den künstlichen Sensoren um einiges schlechter als bei tierischen Zellen. Sinneszellen können durch Kontakt mit süßen, sauren oder bitteren Stoffen Aktionspotentiale auslösen.

Für die Erkennung von sauren Stoffen sind Protonen die Haupterreger, welche mit den Ionenkanälen der Geschmackszelle interagieren.  $H^+$ -aktivierte Sauer-Rezeptoren produzieren innerhalb der Zelle einen Strom, dadurch depolarisieren die Geschmackszellen. Spannungsabhängige Ionenkanäle, vor allem  $Na^+$ - und  $K^+$ -Kanäle reagieren auf die Depolarisation und öffnen sich. Durch das gezielte Öffnen der spezifischen Ionenkanäle entstehen Aktionspotentiale. Neuronale Erregung, durch spannungsabhängige Kanäle, basieren grundsätzlich auf den gleichen physikalischen Phänomenen wie die Halbleitertechnologie in der Mikroelektronik. Die Ionenkanäle kann man als lebende Transistoren sehen. [8]

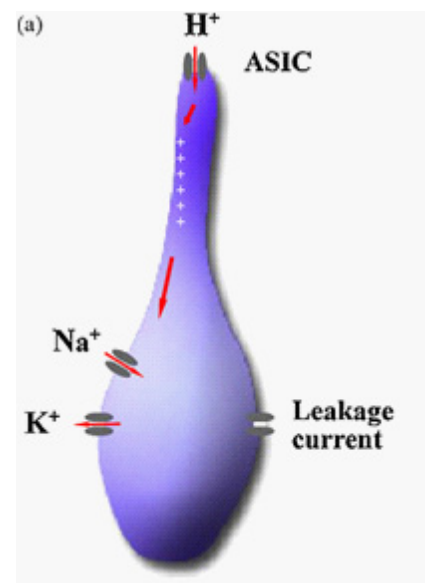


Abbildung 5: Interaktion Sauer-Rezeptor mit Ionenkanälen [8]

## 3.2 Versuchserklärung

Es wurde versucht ein zellbasierter Sensor zu modifizieren der mit sogenannten LAPS (light-addressable potentiometric sensor) gekoppelt ist. Mit Hilfe von LAPS wird die Oberfläche mit einem Lichtstrahl das Oberflächenpotential an beliebigen Punkten detektiert werden. Als LAPS-Chip wurde eine N-Typ Silizium-Wafer verwendet. Auf der Rückseite des Wafers wurde eine  $1\mu m$  dicke Aluminiummembran aufgebracht um einen ohmschen Kontakt zu erreichen. Das System besteht aus zwei Elektroden (Referenzelektrode und Arbeitselektrode).

Ein modulierter Lichtstrahl (Wellenlänge 543.5 nm, Leistung 5mW, Frequenz 4kHz) wurde auf die Oberfläche einer einzelnen Geschmackszelle fokussiert. Dabei wurde das Arbeitspotential so eingestellt, dass der Photostrom sehr sensitiv auf Änderungen des Oberflächenpotentials reagiert. Die Geschmackszellen wurden mit Salzsäure (pH 2 und pH 4) stimuliert. Als Reaktion produzierten die Geschmackszellen extrazelluläre Signale. LAPS detektierte die Änderungen des Oberflächenpotentials, welche mit der Reaktion der Geschmackszellen

korrespondierte. Der korrespondierende Photostrom wurde mit Hilfe eines Potentiostats erfasst. [8]

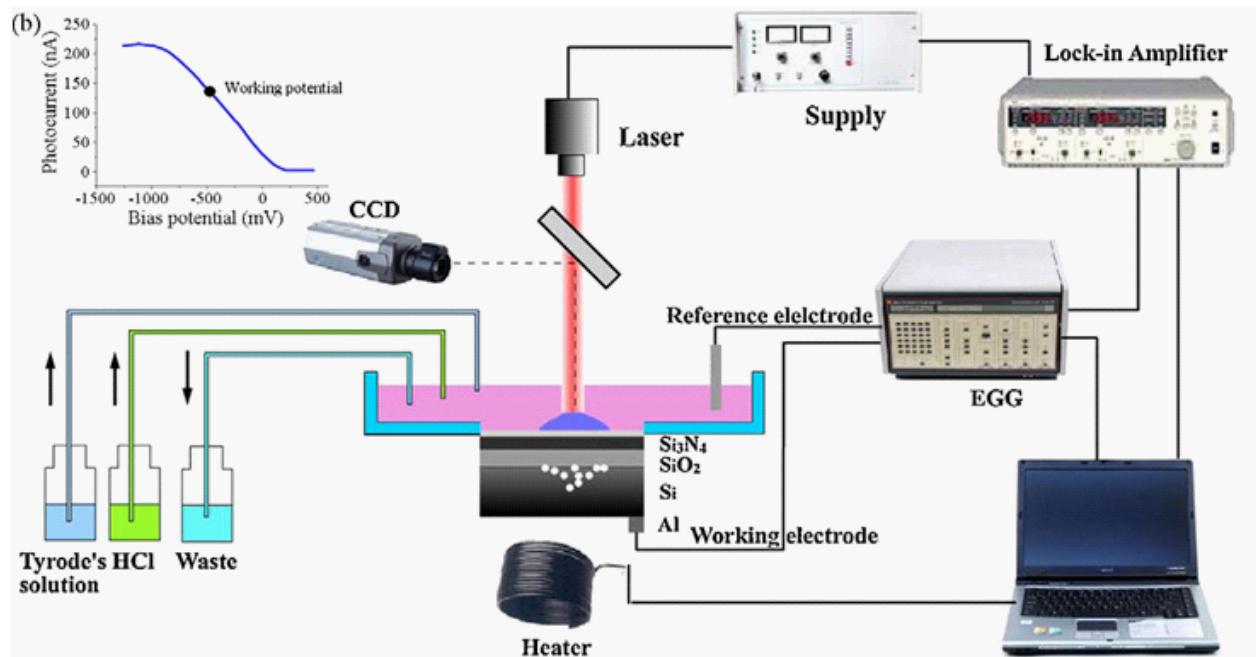


Abbildung 6: Schema LAPS Messsystem [8]

### 3.3 Zell-Chip Schnittstelle

Zwischen der Zelle und der Oberfläche des LAPS-Chips befindet sich eine Elektrolyten-Schicht. Die Zelle wird mittels der Zellmembran und der Chip durch dünne Schichten von  $\text{SiO}_2$  und  $\text{Si}_3\text{N}_4$  von dem leitenden Elektrolyten isoliert. Diese Zell-Chip Schnittstelle wurde als „Sandwich cable model“ definiert. Ein vereinfachtes Punktmodell wurde erstellt um die LAPS-Zelle Schnittstelle zu beschreiben.  $V_M$  und  $V_J$  sind das intrazelluläre, respektive extrazelluläre Potential.  $R_{JM}$  und  $C_M$  sind Widerstand und Kapazität, welche sich durch die Membran ergeben.  $R_J$  ist ein Begrenzungswiderstand zwischen Zelle und Chip. [8]

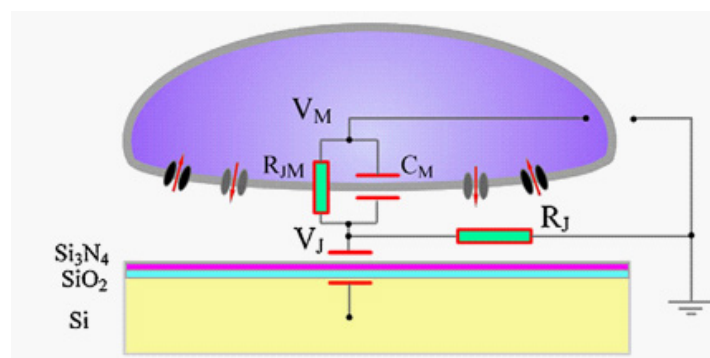


Abbildung 7: Schnittstelle LAPS-Zelle [8]

$$\frac{V_J}{R_J} = \frac{V_M - V_J}{R_{JM}} + C_M \frac{d(V_M - V_J)}{dt}$$

Abbildung 8: DGL für das Punktmodell [8]

### 3.4 Signalauswertung

Die Reaktion wurde vor und nach dem Aufbringen von Säure, von dem LAPS erfasst. In der untenstehenden Darstellung (Abb. 9) ist das Signal vor (c) und nach (a,b) dem Aufbringen der Säure ersichtlich. Es kann ein grosser Unterschied beobachtet werden. Nachdem die Zellen mit der Säure in Kontakt gekommen sind, konnte man Spitzen in der Amplitude feststellen. Diese Spitzen sind auf die entstandenen Aktionspotentiale zurückzuführen, welche durch den Kontakt der Geschmackszellen mit der Säure entstanden. Um auszuschliessen, dass die Spitzen vom pH-Wert der Flüssigkeit und nicht von den Aktionspotentialen der Zellen abhängen könnten, wurde der Versuch auch ohne Zellen durchgeführt. Dieses Signal ist in Abbildung 9c in der Mitte ersichtlich. Es sind keine Spitzen in der Amplitude ersichtlich und damit konnte bewiesen werden, dass die Spitzen von den Zellen abhängen. [8]

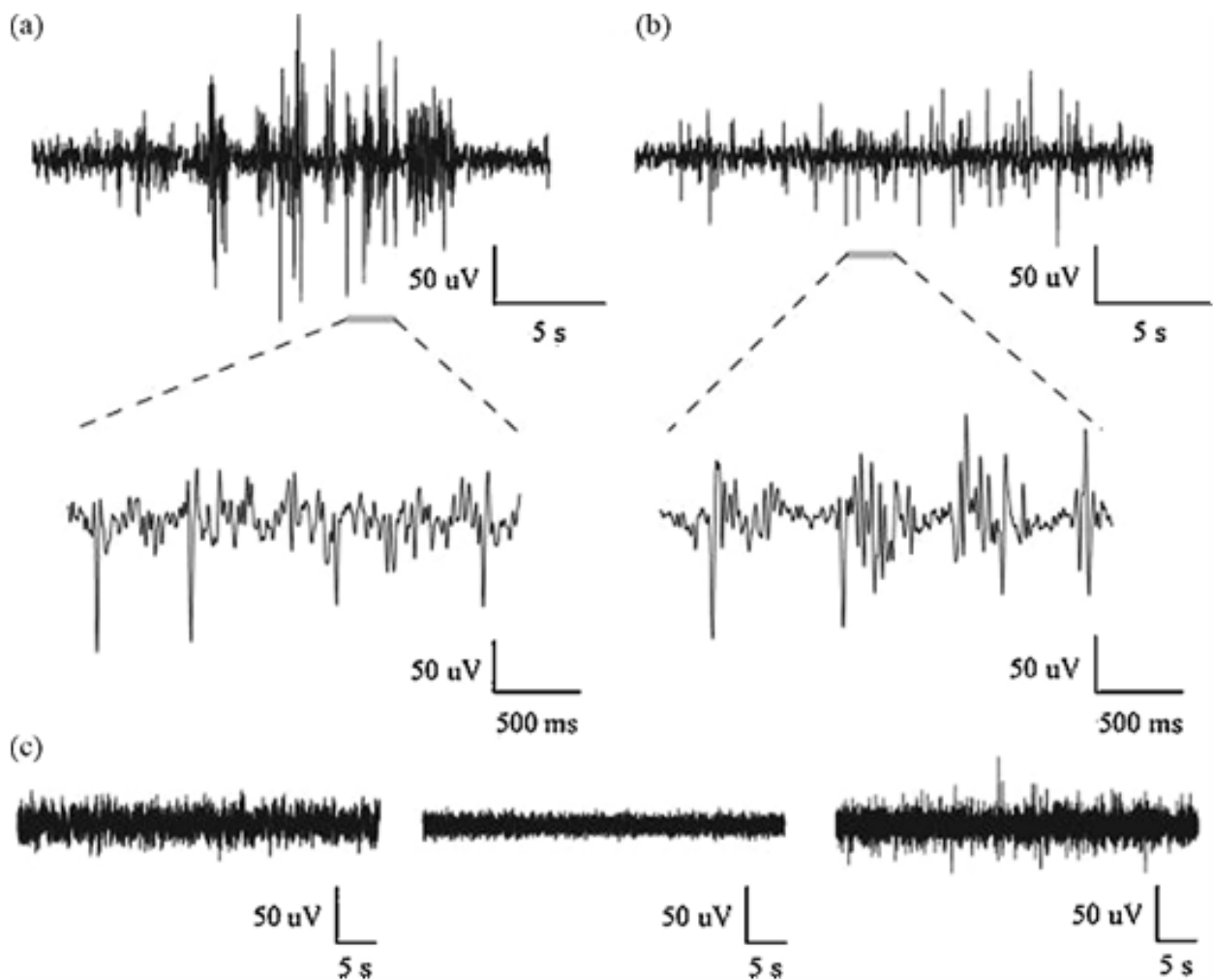


Abbildung 9: Auswertung der Signale [8]

## 4 Ausblick

Zellbasierte Sensoren beinhalten viele verschiedene Anwendungsmöglichkeiten in den verschiedensten Bereichen. Für die Zukunft werden weniger neue Arten von zellbasierten Sensoren erwartet. Die Entwicklungen gehen eher in Richtung Verbesserung der Sensortechnologien. Zum Beispiel gibt es sehr komplexe Biosensoren, welche auf neuronalen Netzwerken basieren, bei denen grosses Entwicklungspotential in ihrer Technologie besteht. Ein genereller Trend ist es mehrere Wandlungsprinzipien miteinander zu kombinieren um einen möglichst kompletten Überblick über den Analyten zu erhalten.

# Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Anwendung verschiedener Messmethoden in einer Durchflusskammer [3].....</i>	<i>4</i>
<i>Abbildung 2: Üblicher Aufbau zur Bestimmung des Widerstandes einer Zellschicht [5].....</i>	<i>5</i>
<i>Abbildung 3: Sensorchip mit 2 IDES [4].....</i>	<i>5</i>
<i>Abbildung 4: Experimenteller Aufbau zur Untersuchung von Zellen mit Raman Spektroskopie [7].....</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 5: Interaktion Sauer-Rezeptor mit Ionenkanälen [8].....</i>	<i>8</i>
<i>Abbildung 6: Schema LAPS Messsystem [8] .....</i>	<i>9</i>
<i>Abbildung 7: Schnittstelle LAPS-Zelle [8].....</i>	<i>9</i>
<i>Abbildung 8: DGL für das Punktmodell [8].....</i>	<i>9</i>
<i>Abbildung 9: Auswertung der Signale [8].....</i>	<i>10</i>

# Literaturverzeichnis

- [1] Schultz, J., Mrksich, M., Bhatia S. N. , Brady D. J., Ricco, A. J., Walt D. R., Wilkins C. L.; Biosensing, International Research and Development, Chapter 4: Cell and Tissue-based Sensors. 2006, S. 54-65
- [2] Ziegler, Christiane; Cell-based biosensors. Fresenius J Anal Chem 366. 2000, S. 552–559.
- [3] Göpel, W., Ziegler, C., Breer, H., Schild, D., Apfelbach, R., Joerges, J., Malaka, R.; Biosensors & Bioelectronics 13. 1998
- [4] Brischwein, M., Herrmann, S., Vonau, W., Berthold, F., Gothe, H., Motrescu, E. R., Wolf, B.; Electric cell-substrate impedance sensing with screen printed electrode. Lab on a Chip. 6, 2006, S. 819-822.
- [5] Wegener, J., Sieber, M., Galla, H-J.; Biochem Biophys. 1996.
- [6] Sapsford, K. E., Bradburne, C., Delehanty, J. B., Medintz, I. L.; Sensors for detecting biological agents. materials today Volume 11 Issue 3. 2008, S. 45.
- [7] Notingher, Ioan; Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors. Sensors 7. 2007, S. 1343-1358
- [8] Chen, Peihua, Liu, Xiao-dong, Wang, Bingqing, Cheng, Gong, Wang, Ping; A biomimetic taste receptor cell-based biosensor for electrophysiology recording and acidic sensation. Sensors and Actuators B 139. 2009, S. 576-583