

EINZELNE ZELLEN BESSER DOSIEREN

In der biologischen Analyse gewinnen Einzelzelltechnologien zunehmend an Bedeutung. Neue Applikationen können die Arbeit deutlich vereinfachen.

von Holger Eickhoff, Alba Simon Munoz und Guilhem Tourniaire; Cellenion SAS

Ergänzend zu den Durchschnittsmessungen an Zellpopulationen bieten Einzelzellmessungen ein feinkörniges Bild komplexer Biologie und demaskieren die in Geweben vorhandene Heterogenität. Mit moderner Mikrofluidik, Elektrophysiologie, hochauflösender Bildgebung, Tiefensequenzierung und Massenspektrometrie-Plattformen zeichnet sich ein detaillierteres Bild des zellulären Subtyps, des physischen Ortes im Gewebe und der klonalen Evolution ab. Darüber hinaus ermöglicht die Empfindlichkeit neuer Methoden die Identifizierung seltener Zellen mit potentiell funktionell oder pathogenen Konsequenzen¹.

Cellenion ist ein auf Einzelzelltechnologien spezialisiertes Start-up und wurde im Mai 2016 in Lyon gegründet. Die Firma ist eine Tochter der SCIENION AG, eines deutschen Precision-Dispensing-Unternehmens mit Sitz in Berlin. Während bei Scienion vorzugsweise diagnostische Applikationen für DNA- oder Proteinassays entwickelt werden, adressiert Cellenion die Dosierung von einzelnen, lebenden Zellen. Die bei Cellenion entwickelten Systeme und Lösungen werden für automatisierte Einzelzellisolationen in analytischen Verfahren und im 3D-Bioprinting angewendet. Die vermarktete CellenONE®-Technologie, in der eine sanfte und akustikbasierte Technologie für die Dosierung von einzelnen Zellen in Flüssigkeitsvolumen von wenigen Pikolitern mit hoher Präzision eingesetzt wird, hat Applikationen im Bereich Klonierungen

(Entwicklung monoklonaler Antikörper, Stammzellen, CRISPR/Cas9), Einzelzellsequenzierungen (scRNA-Seq, scWGS, scATAC-Seq) oder der Isolierung von seltenen Zellen, wie beispielsweise zirkulierenden Tumorzellen (CTCs), und anderen, frei wählbaren Zelltypen wie Bakterien und Sporen.

Das akustische Prinzip der CellenONE-Technologie ermöglicht aufgrund seiner Sanftheit und der geringen auftretenden Scherkräfte eine Überlebensrate von weit über 90% der dosierten Zellen. Diese grundlegende Eigenschaft machen die CellenONE-Geräte zu einer geeigneten Plattform für eine Reihe von Probenvorbereitungen zur Analyse von einzelnen Zellen.

EINZELZELL-ANALYSEVERFAHREN

DNA- und RNA-Sequenzierungstechniken haben zu vielen biologischen Entde-

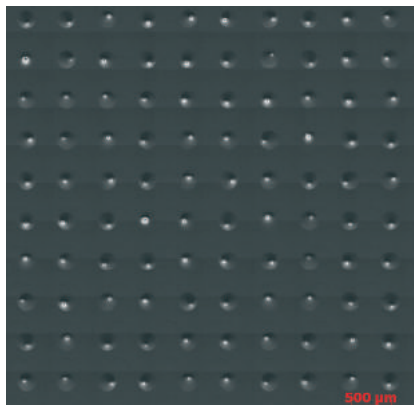


Abb. 1: 100 einzelne Spheroide aus Lungenkrebszellen als gedruckter 10 x 10-Array

ckungen und Fortschritten geführt. Bis vor kurzem waren Millionen von Zellen erforderlich, um genügend DNA (oder RNA) für eine Sequenzierung zu erhalten. Molekularbiologen haben neue Technologien entwickelt, um die Genome oder auch Transkriptome einzelner Zellen zu sequenzieren. Diese Untersuchungen haben signifikant zu einem besseren Verständnis über eine ganze Reihe von Prozessen beigetragen, bei denen die konventionelle Untersuchung von heterogenen Zellverbänden nicht repräsentativ für das ist, was passiert, wenn zelluläre Heterogenität, zum Beispiel bei Krebs, ein Schlüsselproblem darstellt. Technologien zur genauen Isolierung von einzigartigen Zellen, die für die Genese verschiedener Erkrankungen an zentraler Stelle stehen, sind jedoch immer noch selten und für klinische Proben nicht geeignet. Mit dem CellenONE X1 können nun einzelne Zellen in einem Dosierer aus inertem Glas visualisiert und so selektiert werden, dass einzelne Zellen auf oder in verschiedene Substrate abgegeben werden. Diese offene Plattform, in der Zellen und Reagenzien im Pikoliterbereich dosiert und so Assays weiter miniaturisiert werden können, wurde von Nutzern zur Sequenzierung von 40.000 verschiedenen Zellen angewendet. Die eingesetzten Materialien und Zellen führten in diesem Ansatz zu einem durchschnittlichen Preis von nur 0,26 US-Dollar für die Sequenzierung pro Zelle. So konnten miniaturisiert, günstig und im Hochdurchsatz wesentliche Merkmale der zellulären Heterogenität eines

Krebsgewebes, wie negativ ausgewählte Genomtopologien, subklonale Mutationsmuster und Genomreplikationszustände durch Sequenzierung von Einzelzellgenomen mit hoher Genauigkeit effektiv untersucht werden. Der gewählte amplifikationsfreie Einzelzell-Genom-Sequenzierungsansatz konnte auch zeigen, dass eine relativ flache Sequenzierung über Tausende von Genomen die Rekonstruktion von klonalen Genomen bis hin zur Auflösung von Einzelnukleotiden durch Aggregationsanalyse von Zellen ermöglicht, die eine Genomstruktur höherer Ordnung gemeinsam nutzen. Die großräumige Populationsanalyse identifizierte unter Tausenden von Zellen auch einige wenige, seltene Zellen, die mitotische Fehlsegregation ganzer Chromosomen aufwiesen².

Neben den verschiedenen Analyseverfahren bietet die CellenONE-Technologie auch interessante Möglichkeiten in der Gewinnung von monoklonalen Antikör-

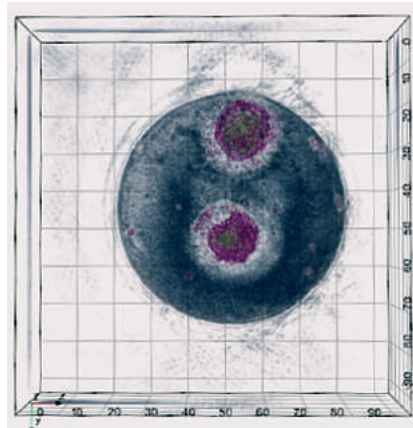


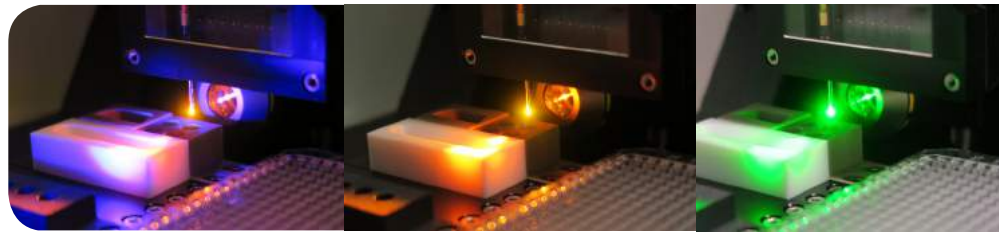
Abb. 2: Zwei einzeln dosierte Fibroblasten in einer Alginatmatrix nach Zugabe in eine kalziumhaltige Lösung (3D-Imaging mit Nanolive 3D Explorer)

pern und Zelllinien, für die eine Automatisierung von Klonierungsschritten vorteilhaft ist. In den CellenONE-Geräten werden dafür insbesondere zwei innovative Technologien verwendet: Image Based Single Cell Isolation (IBSCI®)

und Fluorescence Image Based Single Cell Isolation (FIBSCI®). In beiden Modi entscheidet eine Bildanalysesoftware in Echtzeit anhand automatisch aufgenommener Bilder, ob ein abgegebener Tropfen eine einzelne Zelle enthält. Dabei werden alle einzelnen dispensierten Zellen inklusive einiger Parameter gespeichert. Im IBSCI-Modus werden Durchlichtbilder bezüglich der Größe und Rundheit von Zellen analysiert. Im FIBSCI-Modus werden die Fluoreszenzsignale von bis zu vier Farben in einzelnen Zellen für die Festlegung von Dosierungskriterien verwendet. Die optischen On-Board-Systeme in CellenONE-Geräten ermöglichen dabei eine frei konfigurierbare Beladung von Anwendersubstraten, die 384, 1536 und 3456 Well-Mikrotiterplatten sowie Lab On A Chip-Systeme einschließen.

Die mit der CellenONE-Technologie bislang vereinzelt Zelltypen sind zwischen 2 und 60 µm klein. Zelltypen wie CHO (Chinese Hamster Ovary),

**IBSCI™ & FIBSCI™
Technologies:
Image Based Single Cell
Isolation with Transmission
and Fluorescence Modes**



cellenONE® X1 & F1

HIGH RECOVERY RATE &
HIGH CELL VIABILITY

SINGLE CELL ISOLATION
FOR SEQUENCING AND CLONING



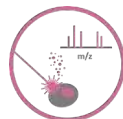
scRNA-Seq



scWGS



scATAC-Seq



scMS



mAb



Stem Cells



CRISPR/CAS9





Der cellenONE F1 isoliert einzelne Zellen, die von Interesse sind, mit Hilfe seiner vier Fluoreszenzdetektionsmodule. Der Piezodispenser ermöglicht die präzise Ablage von Zellen auf einem breiten Spektrum von Substraten

HEK293T, HeLa, A549, PC3, H1975 und HepRG, dazu noch Primärzellen wie PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells, einschließlich B- und T-Zellfraktionen), Fibroblasten, Keratinozyten, Melanozyten, Kardiomyozyten, HUVEC und neurale Stammzellen wurden mit einer Überlebensrate von >90% vereinzelt.

AUF IN DIE 3. DIMENSION

3D-Bioprinting, eine nur entfernt verwandte Art von 3D-Druck, ist ein schnell wachsendes Feld, das nahezu täglich neue

Spieler betreten. Beim 3D-Bioprinting kommen nur einige der additiven Fertigungsprinzipien des konventionellen 3D-Drucks zum Einsatz, da beim 3D-Bioprinting in der Regel hochspezialisierte biologische und biokompatible Materialien verwendet werden müssen. Hohe Drücke oder hohe Temperaturen, wie sie in konventionellen 3D-Druckverfahren verwendet werden, schließen den Druck von einzelnen, lebenden Zellen aus, da diese unter solchen Bedingungen nicht weiterleben. Die CellenONE-Technologie bietet die einzigartige Möglichkeit zweier- oder dreidimensionale Zellsysteme durch nacheinander folgendes Drucken von ein-

ANZEIGE

zelnen Zellen zielgenau und spezifisch zu generieren. Erste Schritte hierfür wurden mit einer Zellverkapselung, bei der eine einzelne lebende Zelle in einer semipermeablen Membran eingeschlossen wird, realisiert. Dafür wurde die Technologie der Zellverkapselung in Alginate, einem natürlichen biologisch abbaubaren Poly-

mer, das die extrazelluläre Matrix nachahmt und sowohl Zellfunktionen als auch den Stoffwechsel unterstützt, mit dem Ziel entwickelt 3D-Kulturen zu erhalten. Für die Erzeugung dieser 3D-Strukturen werden von der Dispenserdüse Alginate-Tröpfchen mit einzelnen Zellen in eine Lösung dosiert, die zweiwertige Kationen enthält³. Die divalenten Kationen, typischerweise Ca²⁺, verursachen bei Diffusion in die Tröpfchen eine Gelierung des Alginats. So können elegant gute Umgebungsvoraussetzungen für eine anschließende Charakterisierung der dosierten, lebenden und interagierenden Zellen und Zellverbände erzeugt werden.

LITERATUR

- 1.) Nature Biotechnology, Single Cell Technology, 1. November 2016
- 2.) Emma Laks et al, Resource: Scalable whole genome sequencing of 40,000 single cells identifies stochastic aneuploidies, genome replication states and clonal repertoires, <http://dx.doi.org/10.1101/411058> doi: bioRxiv preprint first posted online Sep. 7, 2018
- 3.) Ilaria Ghidoni et al, Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine, Cytotechnology. September 2008

KONTAKT

Cellenion SAS,
Pépinière Laënnec
60 av. Rockefeller
69008 Lyon, Frankreich
eickhoff@scienion.de