

Microfluidics for Functional Analysis of Circulating Tumor Cells

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES OF ETH ZURICH
(DR. SC. ETH ZURICH)

presented by
LUCAS ARMBRECHT

M.Sc. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
born on 17.03.1989
citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Petra Stefanie Dittrich, ETH Zurich
Prof. Dr. Nicola Aceto, University of Basel
Prof. Dr. Andreas Hierlemann, ETH Zurich

Lucas Armbrecht

Microfluidics for Functional Analysis of Circulating Tumor Cells
DISS. ETH NO. 26229

First edition 2019

Published by ETH Zürich, Switzerland

Copyright © 2019 by Lucas Armbrecht

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior permission of the author.

Abstract

Microfluidic technologies use micrometer-sized channel networks to handle and manipulate fluids and biological samples. This has made it possible to manipulate and analyze individual cells and led to a huge improvement in our understanding of cell-to-cell heterogeneities. Single-cell analysis is especially important in cancer research, as individual circulating tumor cells (CTCs) promote metastasis and a single surviving cell can cause relapse after treatment.

A variety of microfluidic devices has been developed to compartmentalize individual cells for subsequent analysis. These devices have proven extremely useful to elucidate cell behavior and helped to answer many fundamental biological questions. However, their diagnostic use for analysis of CTCs is limited as these platforms do not match the high capture efficiency, selectivity, and throughput demands for isolation of CTCs from whole blood samples. In contrast, platforms that were developed for efficient CTCs isolation from whole blood do not provide the means for single-cell compartmentalization necessary for functional studies. To advance our understanding of cancer progression, there is a major demand for a platform that performs efficient CTCs isolation in a format compatible with functional single-cell analysis.

To address this unmet analytical need, a microfluidic platform for the extraction and functional analysis of CTCs from whole blood was developed. This thesis is describing the gradual improvement, which started from an existing microchamber technology and finally resulted in a highly efficient and versatile platform for CTC analysis.

At the beginning, a microfluidic device for single cell drug response testing with high throughput is described and evaluated. The device is capable of performing more than 600 single-cell experiments and the results are similar to traditional bulk assays in well plate format. This platform was adapted for multiplexed analysis of three different intracellular proteins on multiple cancer cell lines through the use of magnetic forces and barcoded beads. By combining magnetic magnetic bead traps with high throughput single-cell isolation, we were finally able to realize a device for functional analysis of CTCs from blood samples. The platform was characterized with CTCs from a mouse model

to determine G-CSF secretion levels together with immunostaining for HER2, EpCAM, and CD45. We additionally tested our device with samples from several late stage breast cancer patients, where we found that current culturing conditions are insufficient for functional tests on patient-derived CTCs. Furthermore, a compact system that allows fluorescence analysis of many microfluidic chips with a smartphone to enable point-of-care testing is presented.

Currently, research groups around the world are working on improved CTC culture conditions. Thus, direct functional tests on CTCs using devices such as the presented platform will become commonplace in the near future. It promises to offer unique insight to cancer biology and opportunities in personalized medicine.

Zusammenfassung

Mikrofluidische Systeme verwenden Mikrometer grosse Kanalnetze, um Flüssigkeiten und biologische Proben zu steuern. Mithilfe dieser Systeme ist es überdies möglich, einzelne Zellen zu analysieren. Dies hat zu einer enormen Verbesserung unseres Verständnisses der Heterogenitäten in einzelnen Zellen geführt. Insbesondere für die Krebsforschung sind diese Informationen wichtig, da individuelle zirkulierende Tumorzellen (CTCs) die Bildung von Metastasen verursachen und bereits eine einzige überlebende Zelle bei der Krebsbehandlung einen Rückfall verursachen kann.

Für die nachgeordnete Analyse der Zellen ist es wichtig, diese räumlich voneinander zu isolieren. Hierzu wurden in der Vergangenheit bereits verschiedenste mikrofluidische Systeme entwickelt. Diese Systeme haben sich als äusserst nützlich bei der Aufklärung von zellulären Prozessen erwiesen und konnten zur Beantwortung vieler grundlegender biologischer Fragen beitragen. Ihre diagnostische Anwendung für die Isolation und Analyse von CTCs ist jedoch begrenzt, da die dafür notwendigen hohen Anforderungen an Empfindlichkeit, Selektivität und Durchsatz nicht erfüllt werden. Es gibt allerdings zahlreiche Mikrofluidiklösungen, die speziell für eine effiziente CTCs-Isolierung aus Vollblut entwickelt wurden. Leider bieten diese Systeme wiederum nicht die Möglichkeit zur Isolation einzelner Zellen, wie sie für viele wichtige Studien auf Einzelzelllevel erforderlich wären. Infolgedessen fehlt es derzeit an passenden Systemen für funktionelle Analysen von CTCs.

Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit die Entwicklung einer mikrofluidischen Plattform für die kombinierte Isolation und Analyse von CTCs aus Vollblut vorgestellt. Im Fokus steht dabei die schrittweise Verbesserung einer bestehenden Technologie hin zu einer hocheffizienten und vielseitigen Plattform für die CTC-Analyse.

Zu Beginn wird eine mikrofluidische Plattform zum Test der Medikamentenwirkung auf einzelne Zellen mit erhöhtem Durchsatz erläutert. Das System kann mehr als 600 einzelne Zellen individuell charakterisieren und liefert Ergebnisse, welche mit makroskopischen Tests in Wellplates übereinstimmen. Die Plattform wurde anschliessend weiterentwickelt, sodass drei verschiedene intrazelluläre Prote-

ine gleichzeitig gemessen werden können. Dieses System basiert auf magnetischen Zellfallen und farbkodierten Partikeln und wurde an mehreren Krebszelllinien getestet. Durch die Kombination von magnetischen Zellfallen, farbkodierten Partikel und parallelisierten Kanalnetzwerken für erhöhten Durchsatz wurde schlussendlich ein Gerät für die funktionelle Analyse von CTCs realisiert. Die Plattform wurde mit CTCs aus einem Mausmodell charakterisiert, um die G-CSF-Sekretionsniveaus von einzelnen CTCs mit hoher Empfindlichkeit zu bestimmen. Zusätzlich wurden Proben von Brustkrebspatientinnen in einem späten Krankheitsstadium vermessen. Hierbei stellte sich heraus, dass für eine genaue funktionelle Charakterisierung der CTCs noch verbesserte Kulturbedingungen entwickelt werden müssen. Um zukünftig patientennahe Anwendungen mittels Mikrofluidik-Chips und Fluorezenzmikroskopie zu ermöglichen, wird ausserdem noch ein kompaktes System für eine Analyse mit handelsüblichen Smartphones vorgestellt.

Weltweit arbeiten zahlreiche Forschungsgruppen an verbesserten Kulturmedien und der Gaszusammensetzung für die Kultivierung von CTCs. Es erscheint daher sehr wahrscheinlich, dass in naher Zukunft direkte funktionelle Tests an CTCs mit Systemen wie der vorgestellten mikrofluidischen Plattform möglich sein werden. Dies verspricht ganz neue Einblicke in die biologischen Grundlagen von Krebserkrankungen und neue Möglichkeiten für die personalisierte Medizin.