

**Entwurf und Aufbau eines chipbasierten Selektionssystems für die Klonierung  
therapeutisch relevanter Produktionszellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Ingenieurwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät II

-Physik und Mechatronik-

der Universität des Saarlandes

von

Dipl.-Ing. Christian Kurz

Saarbrücken

2013

Tag des Kolloquiums: 26. September 2013

Dekanin/Dekan: Univ.-Prof. Dr. Christian Wagner

Mitglieder des  
Prüfungsausschusses: Univ.-Prof. Dr. Albrecht Ott  
Univ.-Prof. Dr. Günter R. Fuhr  
Univ.-Prof. Dr. Helmut Seidel  
Dr. Tilman Sauerwald

Die experimentellen Untersuchungen wurden am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) St. Ingbert in den Abteilungen Biohybride Systeme und Biomedizinische Mikrosysteme durchgeführt.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>I</b>
<b>Summary</b>	<b>I</b>
<b>Formelzeichen</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Stand der Technik</b>	<b>1</b>
1.1.1. Biopharmazeutische Proteinherstellung	1
1.1.2. Verfahren zur Zellisolation	4
1.1.3. Biologische Mikro-Elektro-Mechanische Systeme (BioMEMS)	11
<b>2. Problemstellung</b>	<b>22</b>
<b>3. Zielsetzung</b>	<b>24</b>
<b>4. Systemkonzipierung</b>	<b>27</b>
<b>5. Material und Methoden</b>	<b>28</b>
<b>5.1. Material</b>	<b>28</b>
5.1.1. Chemikalien	28
5.1.2. Allgemeine Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien	28
5.1.3. Geräte	29
5.1.4. Medien, Lösungen und Puffer	29
<b>5.2. Methoden</b>	<b>31</b>
5.2.1. Systembeschreibung	31
5.2.2. Zellkultur	40
5.2.3. Impedanz	44
5.2.4. Proteinquantifizierung	47
5.2.5. Antikörperquantifizierung	49
<b>5.3. Experimentelle Aufbauten</b>	<b>50</b>
5.3.1. Hydrodynamische und elektrische Charakterisierung	50
<b>6. Theorie</b>	<b>51</b>
<b>6.1. Impedanz</b>	<b>51</b>
<b>6.2. Hydrodynamischer Widerstand</b>	<b>56</b>
<b>7. Ergebnisse</b>	<b>60</b>
<b>7.1. Systemcharakterisierung</b>	<b>60</b>
7.1.1. Elektrische Charakterisierung	61
7.1.2. Hydrodynamische Charakterisierung	64
<b>7.2. Hydrodynamische Zellvereinzlung</b>	<b>68</b>
7.2.1. Impedanzgesteuerte Zellpositionierung	68
7.2.2. Vereinzlungseffizienz	72
7.2.3. Druckfenster	75
<b>7.3. Bestimmung der Qualität eines Zellproduktionssystems</b>	<b>77</b>
7.3.1. Relevanter Parameter 1: Zellvitalität	77
7.3.2. Relevanter Parameter 2: Produktivität	86
7.3.3. Relevanter Parameter 3: Zellproliferation	93
<b>7.4. Selektion und Systemvalidierung</b>	<b>95</b>
7.4.1. Zellentnahme und Expansion der Zellklone	95

7.4.2. Systemvalidierung: Vergleich der Produktivität	98
<b>Zusammenfassung und Diskussion</b>	<b>107</b>
<b>Ausblick</b>	<b>122</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>124</b>
<b>Publikationen</b>	<b>137</b>
<b>Danksagung</b>	<b>139</b>
<b>Anhang</b>	<b>140</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>146</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>148</b>
<b>Curriculum vitae</b>	<b>149</b>

### Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit ist der Entwurf und Aufbau eines neuartigen Systems, das in der Lage ist eukaryotische Zellen durch einen zellulären Multiparameterdatensatz zu beschreiben und eine Zellklonierung zu ermöglichen. Die Eignung des Systems für die Selektion von hoch-produzierenden Zellen für die Herstellung therapeutischer Proteine wurde mittels eines Protein-exprimierenden und Antikörper-sekretierenden Zelltestsystems geprüft. Als Referenz diente das Durchflusszytometer mit Sortiereinheit, die magnetische Zellseparation, halb feste Zellkulturmedien mit Pickereinheiten und Verdünnungsreihen.

Die Zellen konnten parallel, mit einer hohen Vereinzlungseffizienz, ohne Minderung der Zellvitalität mittels einer entwickelten Positionierungstechnik auf einem Chip separiert werden. Die separierten Zellen konnten anhand der erfassten optischen und elektrischen Signale auf ihre Vitalität, Produktivität und Proliferation untersucht werden. Um auch die produzierte Menge eines Sekrets erfassen zu können, wurde der implementierte Chip mit höherviskosen Medien kombiniert, um die Diffusionsstrecke der Antikörper zu minimieren. Der Chip bietet die Möglichkeit einer on-chip Zellproliferation. Dies erlaubt die Entnahme größerer Zellpopulationen, wodurch sich die Zellklonierungseffizienz erheblich steigern ließ. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass speziell bei zellulären Produktionssystemen der Einsatz des hier entwickelten Selektionssystems die Ausbeute beträchtlich steigern konnte was vor allem bei der Herstellung therapeutischer Proteine einen immensen Fortschritt darstellt.

### Summary

Subject of this work is the design and implementation of a novel system, which separates eukaryotic cells from each other on a chip platform. Further to separation it allows cellular multi-parameter characterization and cell isolation. The suitability of the system for the selection of high-productive cells for the fabrication of therapeutical proteins is proven by a protein-producing and antibody-secreting cell line.

The cells could be successfully singularised on the chip platform by the developed positioning technique with a high efficiency and without decreasing cell viability. The viability, productivity and the proliferation of the singularized cells could be characterized based on optical and electrical signals. To allow the detection of the antibody secretion, the chip system is combined with semi-solid media to minimise antibody diffusion through the media. Cell cloning was successfully performed by a microcapillary mounted onto a micromanipulator. An increasing in the cell cloning efficiency could be achieved by the selection of a whole cell clone. Therefore the chip was expanded by a chip-based proliferation. It could be successfully shown, that using the developed system for cellular production systems could increase the productivity which is a great development in the fabrication pipeline of therapeutical proteins.

## Formelzeichen

Symbol	Bedeutung	Einheit
$\vec{u},  \vec{u} $	Geschwindigkeitsfeld (Vektor, Betrag)	$\text{m s}^{-1}$
$u$	Mittlere Strömungsgeschwindigkeit	$\text{m s}^{-1}$
$\vec{f}^a,  \vec{f}^a $	Kraft pro Einheitsmasse (Vektor, Betrag)	$\text{N kg}^{-1}$
$\vec{J},  \vec{J} $	Stromdichte (Vektor, Betrag)	$\text{A m}^{-2}$
$\vec{H},  \vec{H} $	Magnetische Feldstärke (Vektor, Betrag)	$\text{A m}^{-1}$
$\vec{E},  \vec{E} $	Elektrische Feldstärke (Vektor, Betrag)	$\text{V m}^{-1}$
$\vec{J}'_{\text{reci}}$	Reziprokes Stromdichtevektorfeld	$\text{m}^{-2}$
$\vec{J}'_{\text{cc}}$	Anregungsstromdichtevektorfeld	$\text{m}^{-2}$
$\vec{J}'$	Einheitsstromdichtevektorfeld	$\text{m}^{-2}$
$A$	Querschnittsfläche	$\text{m}^2$
$D, \emptyset$	Durchmesser	$\text{m}$
$d$	Dicke	$\text{m}$
$f$	Frequenz	$\text{Hz}$
$f(x)$	Funktion abhängig von $x$	
$g$	Abstand	$\text{m}$
$H, h$	Höhe	$\text{m}$
$I,  I $	Komplexer Strom, Amplitudenwert	$\text{A}$
$i, j$	Zählerparameter	
$j = \sqrt{-1}$	Imaginäre Einheit	
$l$	Länge	$\text{m}$
$M(i,j)$	Matrixzelle an Position $i,j$	
$n$	Anpassungsparameter für CPE	
$p$	Druck	$\text{Pa}$
$Q$	Volumenstrom	$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$
$Q^o$	Anpassungsparameter für CPE	$\text{F s}^{n-1}$
$r$	Radius	$\text{m}$
$R$	Elektrischer Widerstand	$\Omega$
$R^2$	Korrelationsfaktor	
$Re$	Reynolds-Zahl	
$R_h$	Hydrodynamischer Widerstand	$\text{Pa s m}^{-3}$
$t$	Zeit	$\text{s}$
$U,  U $	Komplexe Spannung, Amplitudenwert	$\text{V}$
$V$	Volumen	$\text{m}^3$
$x, y, z, a$	Parameter	
$Z,  Z $	Komplexe Impedanz, Amplitudenwert	$\Omega$
$Z_t$	Transferimpedanz	$\Omega$

## Abkürzungsverzeichnis

---

$E$	Effizienz	%
$\Phi$	Belegungsdichte	%
$\alpha, \beta, \gamma$	Dispersionen	
$\varepsilon$	Permittivität	$\text{A s V}^{-1} \text{m}^{-1}$
$\varepsilon'$	Realteil der Permittivität	$\text{A s V}^{-1} \text{m}^{-1}$
$\varepsilon''$	Imaginärteil der Permittivität	$\text{A s V}^{-1} \text{m}^{-1}$
$\varepsilon_0$	Dielektrizitätskonstante des Vakuums	$8,854 \times 10^{-12} \text{A s V}^{-1} \text{m}^{-1}$
$\varepsilon_r$	rel. Permittivität	
$\varepsilon'_r$	Realteil der rel. Permittivität	
$\varepsilon''_r$	Imaginärteil der rel. Permittivität	
$\eta$	dynamische Viskosität	$\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$
$\varphi_z, \varphi_u, \varphi_i$	Phasenwinkel	°
$\pi$	Kreiszahl	
$\rho$	Dichte	$\text{kg m}^{-3}$
$\sigma$	Leitfähigkeit	$\text{S m}^{-1}$
$\sigma'$	Realteil der Leitfähigkeit	$\text{S m}^{-1}$
$\sigma''$	Imaginärteil der Leitfähigkeit	$\text{S m}^{-1}$
$\omega = 2 \pi f$	Kreisfrequenz	$\text{s}^{-1}$

## Abkürzungsverzeichnis

### Abkürzung

### Bedeutung

---

$\mu\text{TAS}$	Micro total analysis system
3-D	Dreidimensional
A/D	Analog/Digital
AC	Alternating current
AK	Sekretierter Antikörper
BioMEMS	Biologische Mikro-Elektro-Mechanische Systeme
bzw.	beziehungsweise
CAD	Computer-aided design
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
CPE	Constant phase element
CTC	Circulating tumor cells
DC	Direct current
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
ECIS	Electric cell-substrate impedance sensing
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-linked Immunospot Technique
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FDA	Fluoresceindiacetat
FEM	Finite-Elemente-Methode
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FL-1, FL-3	Fluoreszenz-1, Fluoreszenz-3



FSC	Forward scatter
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ID	Innendurchmesser
KOH	Kaliumhydroxid
LabVIEW	Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench
LD	Limited dilution
LOC	Lab on chip
mA	Markiertes Antigen
MACS	Magnetic activated cell sorting
MEMS	Mikro-Elektro-Mechanische Systeme
PBS	Phosphate-buffered saline
PC	Personal computer
PCR	Polymerase chain reaction
PDMS	Polydimethylsiloxan
PECVD	Plasma-enhanced chemical vapor deposition
PEG	Polyethylenglykol
PET	Polyethylenterephthalat
PI	Propidiumiodid
RIE	Reactive ion etching
rpm	Rounds per minute
SSC	Side scatter
SekAK	Sekundärantikörper
Si	Silizium
Si <sub>x</sub> N <sub>y</sub>	Siliziumnitrid
SiO <sub>2</sub>	Siliziumdioxid
SU-8	Fotolack
UV	Ultraviolett
v/v	volume/volume
z. B.	Zum Beispiel
z. T.	Zum Teil

### **1. Einleitung**

In der Pharmazie gewinnen rekombinante Arzneimittel, so genannte Biopharmazeutika, zunehmend an Bedeutung (Matasci, 2008). Diese Medikamente werden heute ausschließlich über biotechnologische Verfahren hergestellt, wobei Substanzen in großen Mengen (bis zu 20 g l<sup>-1</sup>) und mit hoher Qualität gewonnen werden können (Jostock, 2010).

In dem Herstellungsprozess von therapeutischen Proteinen stellt die Selektion eines geeigneten zellulären Produktionssystems ein zunehmendes Problem dar, da die Selektion idealerweise aus unendlich vielen Klonen erfolgt, das zelluläre Produktionssystem nach mehreren relevanten Parametern ausgewählt werden muss und inhomogene Klone präzise erfasst werden müssen (Mohan, 2008; Seth, 2006; Wurm, 2004). Dabei müssen fortlaufend neue Produktionsorganismen generiert werden, da sich die Produktionszelllinien während dem Herstellungsprozess erschöpfen und nicht ein weiteres mal verwendet werden können. Aktuell bilden Verdünnungsreihen den Standard, um Einzelzellklone zu generieren. Diese Technik besitzt jedoch die Nachteile, dass sie zeitaufwändig und kostenintensiv ist und erst nach der Zellisolation eine Charakterisierung vorgenommen wird. Folglich müssen sehr viele Zellklone generiert werden, wovon meist nur wenige den gegebenen Anforderungen entsprechen (Salmén, 2012). Auch die etablierten Verfahren zur Zellisolation (FACS, MACS, Picksysteme) besitzen Schwächen bei der synchronen Erfassung von mehreren Zellparametern, bei der Bestimmung der Produktivität anhand von Sekreten oder der Generationszeit (Browne, 2007; Carroll, 2004; DeMaria, 2007; Dharshanan, 2011).

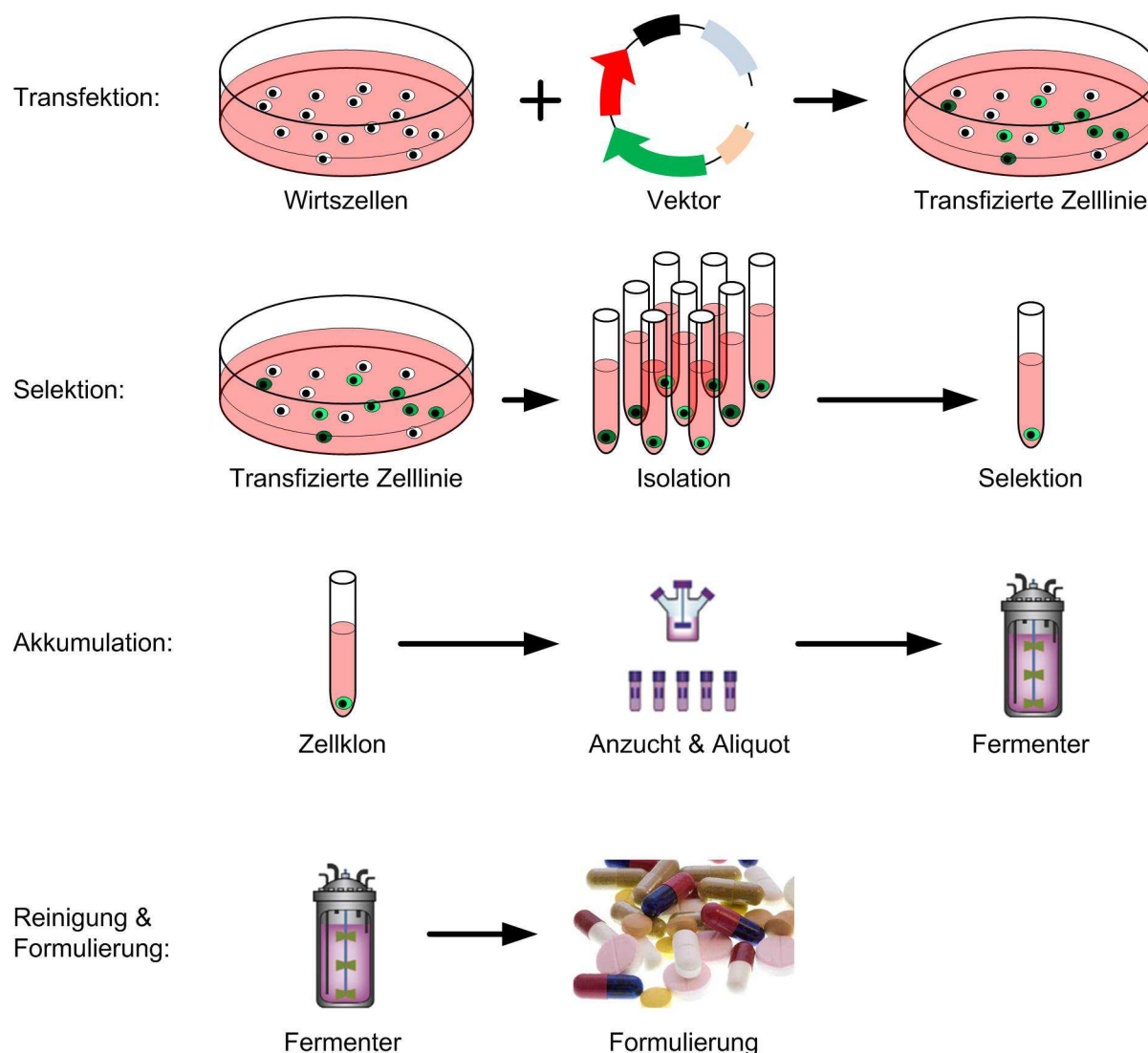
Alle diese Schwachstellen der etablierten Selektionsverfahren wurden in dieser Arbeit aufgegriffen, um ein neuartiges System zu konzipieren und aufzubauen, mit dem es möglich ist, relevante Zellsysteme für die Entwicklung von therapeutischen Proteinen zu generieren.

#### **1.1. Stand der Technik**

##### **1.1.1. Biopharmazeutische Proteinherstellung**

Der klassische Herstellungsprozess von therapeutischen Proteinen basiert auf einem Produktionssystem und kann sich grundsätzlich in vier Schritte gliedern lassen: 1) die

genetische Zellveränderung (Transfektion), 2) die Selektion, 3) die Anzucht der Biomasse und 4) die Aufreinigung des Zielproteins (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1 Schematische Darstellung der wesentlichen Schritte beim Herstellungsprozess von Biopharmazeutika.**

Im ersten Schritt wird in die DNA der Wirtszellen über einen Transfektionsschritt die gewünschte Sequenz zur Proteinherstellung eingebracht. Die transfizierten Zellen werden isoliert, charakterisiert und das beste Produktionssystem selektiert. Eine Akkumulation der Biomasse wird in einem kleinen Reaktorraum durchgeführt. Nach einer Aliquotierung wird die produzierende Population an ein großes Fermentervolumen adaptiert. In verschiedenen Reinigungsschritten werden Zellreste und Medienreste von dem therapeutischen Protein getrennt und abschließend formuliert. Modifiziert nach Matasci et al. (Matasci, 2008)

Während der genetischen Zellveränderung wird eine spezifische Sequenz für die Proteinherstellung mittels eines Vektors in das Wirtsgenom integriert. Als Produktionsorganismen stehen neben Säugetierzellen (z. B. für Erythropoetin) auch Bakterien (z. B. für Insulin) oder Hefezellen (z. B. für Penicillin) zur Verfügung. Dabei besitzen Bakterien und Hefezellen eine sehr gute Proliferation bei einer gleichzeitig einfachen und kostengüns-

tigen Kultivierung, wobei die Herstellung komplexer Proteine nicht möglich ist (Houdebine, 2009; Wurm, 2004). Säugetierzellen sind den humanen Zellen stark verwandt und können abhängig von der Spezies komplexe und humanidentische Proteine exprimieren, was für den Einsatz als Therapeutikum einen erheblichen Vorteil darstellt, wobei jedoch hohe Ansprüche an die Kultivierung gestellt werden müssen (Verma, 1998; Zhu, 2012). Da der Einbau des Vektors in das Wirtsgenom nicht gerichtet erfolgt, ergibt sich eine starke Streuung unter den transfizierten Zellen bezüglich des Einbauorts und der Anzahl an spezifischen Sequenzen im Wirtsgenom (Sautter, 2003; Wurm, 1990). Gerade die unterschiedliche Anzahl aber auch die chromosomale Umgebung der spezifischen Sequenz im Wirtsgenom, verursacht eine unterschiedlich starke Expression des therapeutischen Proteins, sowie Unterschiede in der Stabilität und der Generationszeit (Kim, 1998a; Kim, 1998b; Koyama, 2006).

Aufgrund dieser Schwankungen nach der Transfektion muss eine Selektion erfolgen. Die Selektion eines stabilen, hoch-produzierenden Zellklons stellt heutzutage eine große Herausforderung dar, da nur eine verschwindend geringe Menge an optimalen Produktionssystemen nach dem Transfektionsschritt in der Ausgangspopulation vorliegt (Browne, 2007; Carroll, 2004). Folglich muss die Selektionstechnik eine Hochdurchsatz-Analyse mit einer präzisen Klonidentifizierung vereinen, um idealerweise das leistungsfähigste Produktionssystem aus unendlich vielen Zellen zu identifizieren. Bei der Charakterisierung muss das Selektionssystem eine mehrparametrische Analyse zulassen, da das Produktionssystem im Hinblick auf die Produktivität, Stabilität, Vitalität und Proliferation optimal ausgewählt werden muss (De Jesus, 2011; Hacker, 2009; Matasci, 2008; Mohan, 2008; Seth, 2006). Des Weiteren müssen inhomogene Klone erkannt werden, um ein Überwachsen von hoch-produzierenden Zellen durch schwächer-produzierende Zellen und folglich eine kontinuierliche Produktionsabnahme zu vermeiden (Barnes, 2003; Frame, 1990).

Nachdem das Produktionssystem ausgewählt wurde, schließt sich die Anzucht und Akkumulation der Biomasse bis zu einem Volumen von mehreren Tausend Litern an. Dabei müssen die Kulturbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffgehalt) sehr genau überwacht werden, um die Vitalität und das Wachstum des Produktionssystems aufrecht zu erhalten. Durch eine eingebrachte Sensorik und ein Rührwerkzeug im Reaktorraum wird eine gleichmäßige Verteilung und Überwachung der Parameter sichergestellt. Die Betriebsart des Reaktors (Batch Betrieb, Fed-Batch Betrieb, kontinuierlicher

Betrieb) entscheidet darüber, wie die Eduktzugabe und die Produktentnahme erfolgen. Nach der Entnahme schließt sich eine sehr komplexe Aufreinigung der therapeutischen Proteine an. Dabei wird das Zielprotein von den Zellbestandteilen getrennt, von dem Medium isoliert, in mehreren Reinigungsschritten angereichert und abschließend in der gewünschten Reinheit formuliert.

In dem Herstellungsprozess muss das Produktionssystem sehr viele Zellteilungen leisten können, damit die notwendige Biomasse für den Reaktor mittels des Zellklons erreicht wird. Mit steigender Passagenzahl tritt eine zunehmende Erschöpfung des Produktionssystems in Bezug auf seine Produktivität auf (Calles, 2006; Frame, 1990; Ozturk, 1990; Rolig, 1997). Folglich kann eine Zelllinie nur einmal den Herstellungsprozess durchlaufen und muss anschließend aufgrund der durch die Vielzahl der Zellpassagen nun stark reduzierten Produktivität verworfen werden. Unter demselben Aspekt muss auch die Menge an hergestellten Aliquots des produzierenden Klons gesehen werden, da für das Aliquotieren Biomasse benötigt wird, welche nur durch zusätzliche Zellteilungen erreicht werden kann. Folglich kann nur eine limitierte Anzahl an Aliquots gebildet werden, da sich sonst die Zellen schon bei den zur Herstellung der Aliquots nötigen Zellteilungen erschöpfen und somit Ihre Leistungsfähigkeit schon eingebüßt haben, bevor die Produktion der eigentlichen Zielproteine beginnt. Demnach ist die Menge eines generierten Produktionssystems stark begrenzt, wodurch eine stetige Selektion von neuen Produktionsorganismen stattfinden muss. Dabei kann durch die erhebliche Varianz der transfizierten Zellen nicht gewährleistet werden, dass immer dasselbe Produktionssystem in der Ausgangspopulation vorliegt und folglich isoliert und dem Herstellungsprozess zugrunde gelegt werden kann.

### **1.1.2. Verfahren zur Zellisolation**

Makroskopische Systeme, wie das Durchflusszytometer mit Sortiereinheit (*fluorescence activated cell sorter*, FACS), magnetische Zellsortierer (*magnetic activated cell sorter*, MACS), die Verwendung von höherviskosen Zellmedien oder Verdünnungsreihen (*limited dilution*, LD) sind mögliche Zellisolationsverfahren. Die Sortierung läuft dabei meist sequentiell ab, das heißt, dass Zellen einer Probe nacheinander eine Analyseeinheit passieren, wobei überwiegend ein indirekter Nachweis des Sortierparameters verwendet wird (Krauter, 2000). Beim indirekten Nachweis werden beispielsweise fluoreszierende Proteine, wie das grün fluoreszierende Protein (GFP) der Meeresqualle, oder Farbstoffe

eingesetzt, um Zellbestandteile, wie z. B. der Zellkern oder die Zellmembran, farblich zu markieren.

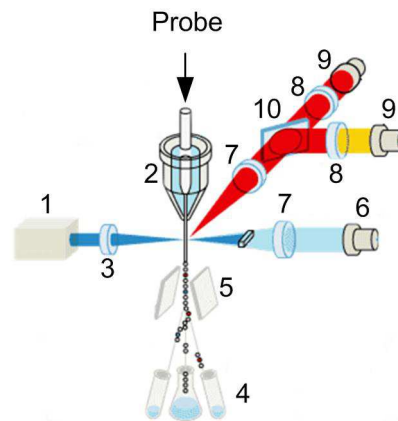
Im Nachfolgenden werden die gängigen Selektionsverfahren kurz vorgestellt.

### **Durchflusszytometer mit Sortiereinheit**

Das Durchflusszytometer mit Sortiereinheit (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) ist ein Gerät, um im Hochdurchsatz große Mengen an Zellen (bis zu  $5 \times 10^4$  Zellen  $s^{-1}$ ) zu analysieren (al-Rubeai, 1991; al-Rubeai, 1993). Der Einsatzbereich einer solchen Einheit umfasst die quantitative Bestimmung der Proteinexpression in Zellen, die Untersuchung der Zellviabilität sowie die Genexpression (Villas, 1998). Einzelne Zellen können schon bei einer geringen Auftretswahrscheinlichkeit in der Ursprungspopulation detektiert werden und mit einer zusätzlichen Einheit und Software kloniert werden (Battye, 2000). Bei diesem Verfahren liegen jedoch die Beschränkungen darin, dass Zellen nur seriell und in Suspension untersucht werden können und eine große Probenmenge von mindestens  $1 \times 10^5$  Zellen benötigt wird (Sharipo, 2003). Zusätzlich müssen invasive Färbetechniken eingesetzt werden, wobei hier die Markierung direkt der entsprechenden Zelle zugeordnet und an diese gebunden sein muss. Zellsekrete können ohne weiteren Aufwand nicht quantifiziert werden oder als Selektionsparameter dienen. Auch ist eine zeitabhängige Analyse dynamischer Veränderungen nicht möglich.

Der prinzipielle Aufbau eines Durchflusszytometers mit Sortiereinheit wird im Nachfolgenden kurz erläutert (Abb. 1.2). Der Flüssigkeitsstrom wird durch die Flusszelle in einen Tropfenstrom überführt, wobei idealerweise jeder Tropfen nur eine Zelle enthält. Der Tropfenstrom wird an einer optischen Sensoreinheit vorbeigeführt. Dabei passieren die Zellen einzeln einen Laser. Das Laserlicht wird an der Zelle gestreut sowie, falls die Zelle fluoreszenzmarkiert ist, ein Fluoreszenzsignal emittiert. Diese beiden zelltypischen Signale werden über optische Detektoren erfasst und mittels einer zentralen Recheneinheit ausgewertet. Das gestreute Licht besteht aus dem Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC; in Richtung des einfallenden Strahls) und dem Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC; etwa rechtwinklig zum einfallenden Strahl). Die Zellgröße wird durch das Vorwärtsstreulicht ermittelt. Dabei haben große Zellen ein großes Vorwärtsstreulichtsignal, kleinere Zellen ein entsprechend kleineres Signal. Zellgranularitäten bzw. die intrazelluläre Beschaffenheit (z. B. Menge an Lysosomen) werden durch das Seitwärtsstreulicht charakterisiert. Die Anzahl der Fluorochrome, welche in einer durchflusszytometrischen Analyse

erfasst werden können, sind durch die eingebauten Fotodetektoren limitiert. Für die Selektion werden die Zellen entsprechend ihrer Markierung über elektrische Aufladungen bzw. mechanisch aus dem Zellstrom aussortiert.



**Abb. 1.2 Schematische Darstellung des Durchflusszytometers mit Sortiereinheit.**

Der Zellstrom wird über die Flusszelle in einzelne Tropfen überführt, in denen idealerweise die Zellen vereinzelt vorliegen. Nach dem Passieren der optischen Einheit und der Echtzeitauswertung werden die Tropfen beispielsweise elektrisch aufgeladen und über ein elektrisches Feld am Ausgang der Sortiereinheit abgelenkt und in die Auffanggefäße sortiert. 1 Laser, 2 Flusszelle, 3 Fokussierlinse, 4 Auffanggefäße, 5 Ablenkplatten, 6 Lichtdetektor, 7 Sammellinsen, 8 Filter, 9 Fluoreszenzdetektor, 10 Lichtteiler. Modifiziert nach Givan (Givan, 2001).

## Magnetische Zellseparation

Bei der magnetischen Zellseparation (*magnetic activated cell sorting, MACS*) wird der Einfluss magnetischer Kräfte genutzt, um eine Selektion durchzuführen. Über ein geeignetes Koppelsystem werden magnetische Partikel an z. B. Proteine auf der Zelloberfläche geheftet. Dabei muss der Koppelmechanismus für eine positive Trennung so gewählt werden, dass er gerade an den gewünschten Zellparameter bindet, meist spezifische Antikörper. Die magnetisch markierten Zellen werden anschließend durch eine Wassersäule transportiert, auf welche senkrecht zur Transportrichtung ein Magnetfeld wirkt. Zellen, welche eine Markierung tragen, werden durch das wirkende Kraftfeld in der Säule gehalten bzw. abgelenkt. Unmarkierte Zellen fallen aufgrund der Gravitationskraft durch die Säule. Eine positive, d. h. die Zielzellen sind magnetisch markiert, wie auch negative, wobei hier die unerwünschten Zellen magnetisch markiert sind, Trennung ist mit dem MACS Verfahren möglich.

Wie bei dem Durchflusszytometer ist auch bei diesem Verfahren eine relativ große Probenmenge notwendig. Eine Analyse auf Einzelzellebene ist nur bedingt möglich, ein

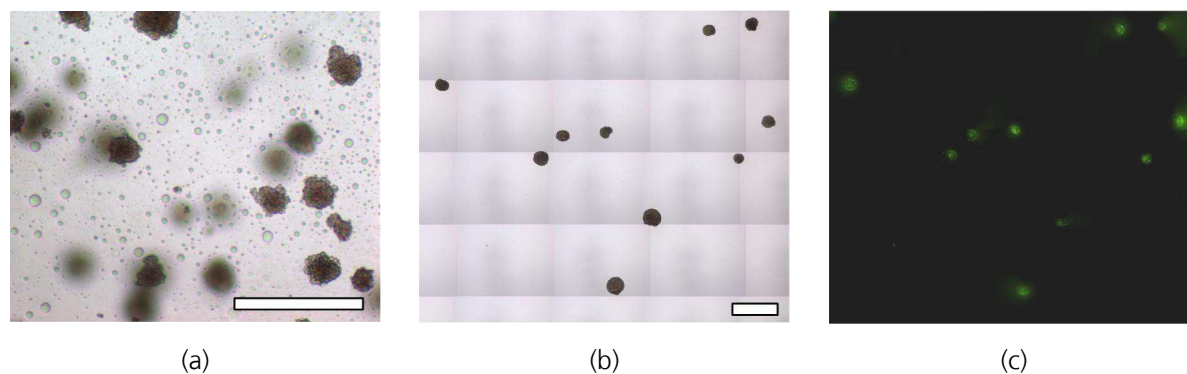
geeignetes Koppelsystem ist vonnöten und dynamische Verhaltensweisen der Zellen können signaltechnisch nicht erfasst werden. Ferner kann eine Selektion nach hochproduzierenden Zellsystemen mit der MACS-Technik nicht realisiert werden.

### **Halbfeste Kulturmedien mit Pickereinheiten**

Durch das Einbetten der Zellen in halbfeste Kulturmedien, wie Softagar, ist gewährleistet, dass Zellen in einem gewissen Abstand zueinander vorliegen. Das halbfeste Medium ist von der Zusammensetzung ein gleichwertiger Ersatz für das sonst übliche flüssige Zellkulturmedium. Somit kann ein Zellwachstum stattfinden. Die höhere Viskosität des Softagars führt dazu, dass die Zellen in der Gelmatrix gefangen sind, wodurch das Zellwachstum zu einer Bildung von 3-D Zellaggregaten führt. Zudem können die Kolonien mit hohen Produktausbeuten identifiziert werden. Dies ist möglich, da die Diffusion des Sekrets im höherviskosen Medium gering ist und so dem produzierenden Klon zugewiesen werden kann. Zur Quantifizierung der Produktausbeute wird ein produktspezifischer, fluoreszenzkonjugierter Antikörper zugegeben, welcher an das Sekret bindet (Lee, 2006). Kolonien mit hoher Antikörperproduktivität weisen somit einen stark fluoreszierenden Hof auf, welcher über ein bildbasierendes Verfahren detektiert werden kann (Abb. 1.3).

Bei Verwendung von Pickrobotern, wie sie z. B. im ClonePix System der Firma Genetix zum Einsatz kommen, werden die Zellen in großen Kulturplatten (6-Lochplatte) in Softagar ausgesät (vergleichbar mit Abb. 1.3b). Dadurch ist der Einsatz großer Mengen (ca. 2 ml) an höherviskosem Medium notwendig. Beim Aussäen werden geringe Zellkonzentrationen verwendet ( $300 - 1000 \text{ Zellen ml}^{-1}$ ), um eine hohe Klonierungswahrscheinlichkeit gewährleisten zu können. Das Auffinden der vereinzelt Zellen im Softagar ist selbst mithilfe einer Automatisierung fast unmöglich, da Zellen in unterschiedlichen Ebenen und mit einer großen Distanz zueinander beim Ausplattieren zu liegen kommen (s. Abb. 1.3a). Darum müssen die Platten zunächst für 5 – 14 Tage inkubiert werden, bis kleine Zellkolonien entstanden sind, welche optisch erfassbar sind (Dharshanan, 2011; Mason, 2012). Dabei werden Fehlvereinzlungen durch zusammenhängende Zellen beim Ausplattieren der Zellen in diesem Prozess nicht erfasst. Anschließend entnimmt und separiert ein Pickroboter mittels Mikrokapillaren die Zellen aus dem Gel.





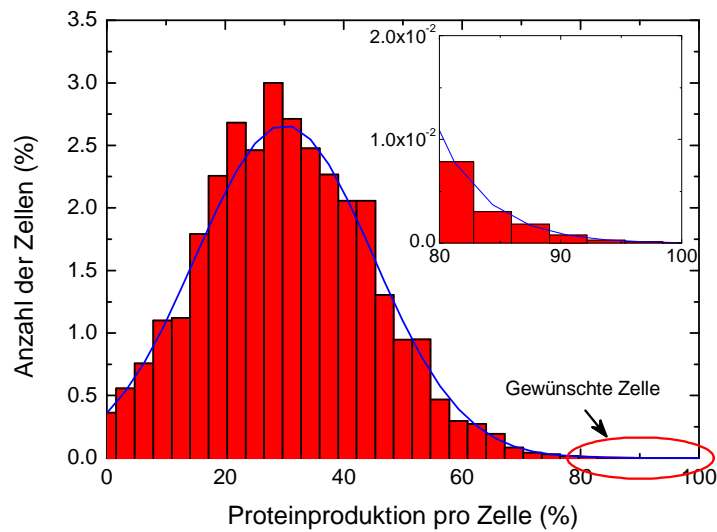
**Abb. 1.3 Hybridomzellen ausplattiert in einer 6-Lochplatte und kultiviert in Softagar.**

(a) 3-D Zellaggregate der Hybridomkolonien sind in höherviskosem Medium detektierbar, wobei sie in unterschiedlichen Ebenen zu liegen kommen (Maßbalken = 500  $\mu$ m). (b) Ausschnitt einer Hellfeldrasterung einer 6-Lochplatte mit kultivierten Hybridomzellen in Softagar. Dabei wurde im Vergleich zu a) die Zellen in einer sehr geringen Konzentration ausplattiert (Maßbalken = 1 mm). (c) Durch den Einsatz des fluoreszenzkonjugierten Antigens und des höherviskosen Mediums lässt sich die Menge des Antikörperssekrets über die Stärke des fluoreszierenden Hofes feststellen und dem jeweiligen Zellklon zuweisen. Fluoreszenzaufnahme des Hellfeldausschnitts aus b).

Ein Zusammenhang zwischen der Dopplungszeit der Zellen und der Viskosität des Mediums haben Harlow et al. aufgezeigt, wobei die Proliferationsgeschwindigkeit in Softagar geringer war (Harlow, 1988). Somit führen gleiche Inkubationszeiten in höherviskosem Medium im Vergleich zu dem sonst üblichen flüssigen Zellkulturmedium zu kleineren Populationsgrößen. Daraus resultiert bei einem längeren Kultivierungszeitraum eine geringere Biomasse, was zu einer Verzögerung im Herstellungsprozess von Biopharmazeutika führt, was unter dem Gesichtspunkt des Hochdurchsatzes nicht tolerierbar ist. Folglich sind längere Inkubationszeiten in Softagar, wie sie bei Pickrobotern Verwendung findet, eher hinderlich und ergeben Verzögerungen im Entwicklungsprozess der rekombinanten Arzneimittel.

### Verdünnungsreihen

Bei der Zellisolation mittels Verdünnungsreihen (*limited dilution*, LD) werden Zellkonzentrationsreihen erstellt, damit die Wahrscheinlichkeit eines einzelnen Zellklons bei der Befüllung der Separationsgefäße sehr hoch ist. Dabei wird die Zellkonzentration der Ausgangslösung so eingestellt, dass sich in dem Flüssigkeitsvolumen, mit welchem die Separationsgefäße (z. B. Lochplatten oder Mikrokavitäten) befüllt werden, nach der Statistik möglichst oft eine isolierte Zelle befindet.



**Abb. 1.4 Darstellung eines möglichen Proteinproduktionsprofils einer Zellpopulation.**

Die Proteinproduktion einer heterogenen Zellpopulation ist in dieser Darstellung einer gaußförmigen Normalverteilung mit einem Maximum bei einer 30 %-igen Produktion angeglichen. Dabei sollen Zellen erkannt und kloniert werden, welche eine Produktion größer 80 % besitzen.

Bei adhären wachsenden Zellen sind Verdünnungsreihen mit optischer Kontrolle eine gute Alternative, um eine Klonierung zu gewährleisten, da die Zellen an die Wachstumsflächen der Gefäße anwachsen und eine optische Überprüfung der Vereinzlung gut durchführbar ist. Bei Suspensionszellen kann auch nach mehreren Selektionsdurchgängen nicht unbedingt eine Monoklonalität sichergestellt werden, da eine optische Kontrolle der Vereinzlung nur schwer möglich ist (Coller, 1986; Underwood, 1988). Dies liegt daran, dass die Suspensionszellen sich nicht alle in einer Ebene befinden und sich somit nicht alle in der Fokusebene des optischen Geräts befinden. Ein auf der LD-Technik basierendes Verfahren ist arbeitsintensiv und unspezifisch, da keine gezielte Auswahl getroffen werden kann (Gaillet, 2010; Puck, 1955; Rossi, 2011). Beispielsweise ergibt sich für das Proteinproduktionsprofil eine gaußförmige Verteilung, mit einem Maximum bei einer 30 %-igen Produktion (Abb. 1.4). Die Zellen mit einer Produktion größer als 80 % sind beispielsweise die hochproduzierenden Zielzellen und sollen kloniert werden. Dabei liegt die Auftretswahrscheinlichkeit solcher Zellen bei unter 0,5%. Ist eine homogene Verteilung in der Zellsuspension gegeben und wird angenommen, dass bei der Separierung über die Verdünnungsreihen immer nur eine Zelle in den Separationsgefäßen abgelegt wird, müssten 2000 Zellklone generiert werden, um einen Zellklon zu erhalten, der die gewünschte Eigenschaft (Produktion > 80 %) besitzt. Dies

entspricht einem Einsatz von 21 96-Lochplatten. Bei einer gewünschten Produktion > 90 %, wäre die Wahrscheinlichkeit < 0,1 ‰, somit bräuchte man mehr als 10000 Zellklone. Dies entspricht einem Einsatz von 105 96-Lochplatten. Auch bei diesem Verfahren werden sehr große Flüssigkeitsvolumen und große Probenvolumen verwendet, um das manuelle Pipettieren zu ermöglichen.

### Einstufung der gängigen Selektionsverfahren

Für eine Gegenüberstellung der gängigen Methoden wurden diese anhand ihres Hochdurchsatzes, der Vereinzelnung, der Möglichkeit Zellen zu charakterisieren, der Klonierung und der Kosten untersucht. In Tabelle 1 sind die Vor- und Nachteile der oben aufgeführten gängigen Methoden zur Zellisolation in einer Übersicht zusammengefasst.

**Tabelle 1 Einstufung der gängigen Methoden zur Zellanalyse und -selektion. Bewertet werden die Hochdurchsatzfähigkeit, die Möglichkeit zur Zellvereinzelnung, die Zellcharakterisierung und Zellisolierung sowie die Kosten.**

In der Matrix beschreiben die Symbole +, o, - eine positive, neutrale und negative Einordnung der Technik. Das Feld der Charakterisierung wurde bei der LD-Technik frei gelassen, da eine Charakterisierung nicht vor der Isolation erfolgt.

	FACS	MACS	Softagar	LD
<b>Hochdurchsatzfähig</b>	<b>++</b>	<b>+o</b>	<b>-o</b>	<b>--</b>
<b>Vereinzelnung</b>	<b>oo</b>	<b>oo</b>	<b>oo</b>	<b>+o</b>
Mechanische Probenbelastung	-o	oo	oo	+o
Detektion von Fehlvereinzelnungen	+o	-o	-o	oo
<b>Charakterisierung</b>	<b>oo</b>	<b>-o</b>	<b>+o</b>	
Parallele Analyse	+o	-o	+o	
Adhärente Zellen	--	--	+o	
Dynamische Effekte	--	--	+o	
Zellsekrete	+o	--	++	
Genauigkeit der Analyse	+o	+o	oo	
<b>Klonierung</b>	<b>+o</b>	<b>--</b>	<b>+o</b>	<b>oo</b>
<b>Kosten</b>	<b>-o</b>	<b>oo</b>	<b>--</b>	<b>oo</b>
Integrationspotential	--	-o	--	oo
Dauer, Arbeitsaufwand	+o	+o	-o	--
Größe	--	-o	--	+o

Alle bisher beschriebenen Verfahren arbeiten mit sehr großen Flüssigkeitsmengen bzw. Probenmengen (Sharipo, 2003). Da die Größe und Menge der Analyseprodukte meist im Bereich von wenigen Nanometern bzw. Nanolitern liegen, wurden in den letzten Jahren Systemminiaturisierungen in den Mikro- und Nanometerbereich vorgenommen, um schneller, präziser und mittels kleinerer Flüssigkeitsvolumen eine Detektion vornehmen zu können (Dittrich, 2006a).

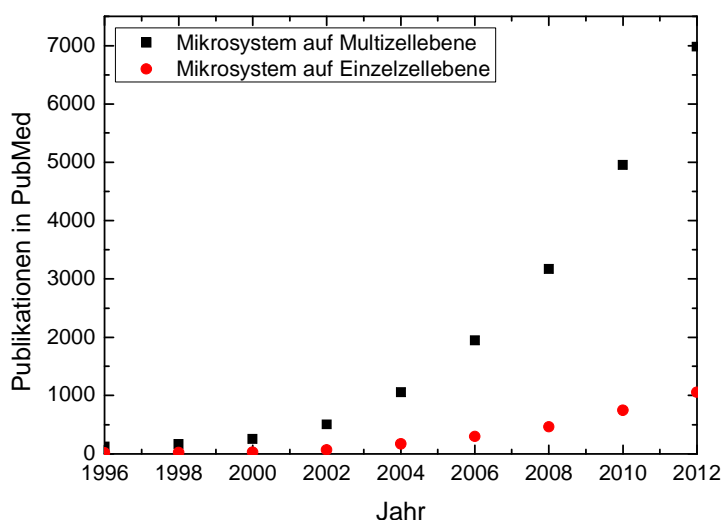
### **1.1.3. Biologische Mikro-Elektro-Mechanische Systeme (BioMEMS)**

Der Begriff biologische Mikro-Elektro-Mechanische Systeme (BioMEMS) beschreibt eine Familie von Anordnungen, in denen elektrische, mechanische, chemische und mikrofluidische Ansätze kombiniert werden (Bhushan, 2007; Durack, 2000). Dabei sprechen die geringen Flüssigkeitsmengen, die niedrigen Kosten, der geringe Platzverbrauch, die Portabilität und das hohe Integrationspotential in größere analytische Systeme für den breiten Einsatz miniaturisierter Zelllabore (*lab on chip*, LOC) oder mikroanalytischer Systeme (*micro total analysis system*,  $\mu$ TAS) (Dittrich, 2006b; Kitamori, 2004; Manz, 1990; Whitesides, 2006). Ferner können BioMEMS durch die geringen Kosten als Einwegprodukt genutzt werden, so dass der Aufbau keine mehrmalige Sterilisation zulassen muss.

Die Herstellungsprozesse für den Aufbau solcher miniaturisierter biologischer Labore umfassen im Allgemeinen die Mikrobearbeitung von Silizium, lithografische Prozessschritte, chemisches Ätzen, Laserabtragung, Fotopolymerisation sowie Mikroformung und -prägung (Beebe, 2002; Biran, 2002; Brehm-Stecher, 2004; Chován, 2002; Fu, 1999; Pethig, 1998; Wakamoto, 2001). Bei diesen Verfahren werden meist Materialien wie Glas, Polymethylmethacrylat, Polyimid, Silizium, Polydimethylsiloxan, Polyethylenglykol oder Polyethylenterephthalat eingesetzt (Bashir, 2004; Wise, 1991). Mithilfe von Strukturierungs- und Abformungstechniken können zum einen fluidische Strukturen, wie Kanäle, Mikroventile, Mikropumpen und Reservoirs (Reyes, 2002) in den Materialien realisiert werden, zum anderen lassen sich auch sensorische Elemente und elektrische Mikroelektroden in die Kanalstrukturen einbinden (Lin, 2006; Schade-Kampmann, 2008).

Bis heute ist das Streben ungebrochen sogar ganze biologische Analyseverfahren auf einem einzigen Chip zu integrieren. Die Vielzahl der dabei umgesetzten zellbasierten Verfahren umfasst die Zellkultivierung (Di Carlo, 2006; Li, 2010), Zellsortierung (Shirasaki, 2006; Takahashi, 2004), Lysierung von Zellen (Schilling, 2002), Zellfusionierung (Strömberg, 2001), Untersuchung der DNA (Foquet, 2002; Tegenfeldt, 2004) sowie biochemische Analysen (Sato, 2002; Son, 2008). Bei den LOCs und  $\mu$ TAS, welche in der Literatur beschrieben werden, kann grundsätzlich zwischen zwei Arten von BioMEMS unterschieden werden (Abb. 1.5). Die eine Hauptgruppe separiert die Zellen räumlich voneinander (Einzelzellebene), bei der anderen Gruppe wird keine räumliche Trennung erzwungen (Multizellebene). Ein wachsendes Interesse an zellbasierten Mikro-

systemen für biologische Fragestellungen ist festzustellen, wobei die Analyse auf Einzelzellbasis weniger oft in mikrobasierten Systemen untersucht wurde. Eine aktuelle Literaturrecherche ergab, dass im Jahr 2012 zu den Mikrosystemen auf Multizellebene 6980 Publikationen und zu den Mikrosystemen auf Einzelzellebene 1060 Publikationen existierten.



**Abb. 1.5** Anzahl der Veröffentlichungen in der PubMed Datenbank, die zu zellbasierten Mikrosystemen erschienen sind.

Die Bezeichnung „Mikrosysteme auf Multizellebene und Einzelzellebene“ steht dabei für Systeme, welche Zellen auf einem Chip bzw. Einzelzellen auf einem Chip analysieren. Erweitert nach Lindström und Svahn (Lindström, 2011).

Bei der Etablierung eines geeigneten Produktionssystems für die Herstellung therapeutischer Proteine und der damit zusammenhängenden Charakterisierung und Klonierung muss eine Betrachtung auf Einzelzellebene erfolgen. Nachfolgend werden Möglichkeiten von chipbasierten Zellvereinzelung aufgezeigt.

### Zellvereinzelung auf dem Chip

Eine sehr gängige und häufig angewandte Methode, um Zellen räumlich voneinander zu separieren, ist der Einsatz von Begrenzungsstrukturen (z. B. Mikrogitter oder Mikrokavitäten). Auch wurden Sauglöcher (Cho, 2007; Hosokawa, 2009; Thielecke, 1999), Mikrowürfel (Salazar, 2007; Wang, 2010) oder Flüssigkeitsgrenzflächen (Boedicker, 2009; Joensson, 2009) als alternative Möglichkeiten für die Zellvereinzelung angewandt.

In Tabelle 2 sind einige Entwicklungsstufen zur Zellseparation mittels Mikrokavitäten dargestellt. Der Einsatz von Mikrokavitäten ist in der Literatur beschrieben worden, um

Stammzellen zu kultivieren (Moeller, 2008), oder um den Sauerstoffumsatz von Zellen (Molter, 2009) und verschiedene Zellparameter zu erfassen (Deutsch, 2006).

Rettig et al. untersuchten und charakterisierten die Mikrokavitäts-technik bezüglich der Sedimentationszeit und Zellvereinzelung (Rettig, 2005). Dabei wurden kritische Parameter, wie die Mehrfachbelegung oder die Verdunstung, sehr genau analysiert. Einer Mehrfachbelegung bei größeren Kavitäten konnte z. T. nur durch eine sehr genaue Anpassung der Zellkonzentration an die Anzahl der Mikrokavitäten entgegengewirkt werden. Das Entfernen falsch abgelegter Zellen bei kleineren Kavitäten wurde durch zusätzliche Spülvorgänge im Prozess realisiert. Das Verhältnis zwischen Durchmesser  $D$  und Höhe  $H$  für die Einzelzellbelegung wurde als optimal empfunden, wenn das Verhältnis von  $H$  zu  $D$  ungefähr 1 entsprach und gleichzeitig  $D$  größer als der Zelldurchmesser aber kleiner als der doppelte Zelldurchmesser war. Der Verdunstung in den einzelnen Kavitäten wurde durch die Verwendung eines gemeinsam genutzten Flüssigkeitsvolumens oberhalb des Arrays entgegengewirkt. Somit ist jedoch eine Kreuzkontamination zwischen den Kavitäten generell möglich.

**Tabelle 2 Entwicklung der Zellvereinzelung mittels Mikrokavitäten (Lindström, 2011).**

Als Materialien für die Mikrokavitäten wurden Glasfasern, Fotolack (SU-8), Polyethylenglykol (PEG) und Polydimethylsiloxan (PDMS), Glas und Silizium eingesetzt.

	Form	Material	Größe	Kavitätenzahl
Taylor, 2000	Hexagonal	Glasfaser	< 30 $\mu\text{m}$	~ 100
Chin, 2004	Rechteckig	SU-8	> 100 $\mu\text{m}$	~ 10000
Revzin, 2005	Rechteckig	PEG	< 30 $\mu\text{m}$	~ 10000
Rettig, 2005	Rund	PDMS	30 – 50 $\mu\text{m}$	~ 10000
Deutsch, 2006	Hexagonal	Glas	< 30 $\mu\text{m}$	~ 10000
Tokimitsu, 2007	Rund	Silizium	< 30 $\mu\text{m}$	~ 100000

Eine weitere Möglichkeit, um Zellen auf dem Chip zu vereinzeln, ist der Einsatz von Sauglöchern. In Tabelle 3 sind Entwicklungsstufen der Verwendung von Mikrolöchern zur Zellseparation dargestellt. Mikrolöcher wurden hauptsächlich für die elektrische Signalerfassung an Einzelzellen (Bao, 1992; Cho, 2007), zur Elektroporation (Huang, 2003), zur Elektrofusion (Ziegler, 2005), zur Detektion der Genexpression und zur Immunphänotypisierung (Hosokawa, 2009) genutzt. Die untersuchten Systemrahmenbedingungen umfassten bislang die elektrische Charakterisierung des Arrays (Cho, 2009a), die Belegungseffizienz (Hosokawa, 2009; Matsunaga, 2008) und die Einstellung eines optimalen Positionierungsdrucks zur nicht-invasiven Zellpositionierung (Thielecke, 1999). Bei den angeführten Literaturstellen stand immer die Machbarkeit der Verfahren im

Vordergrund. Darum wurden bislang nur kleinere Arraygrößen eingesetzt. Jedoch kann in gewissen Grenzen die Größe der Arrays leicht skaliert werden, wodurch die Menge der möglichen analysierbaren Zellen gesteigert werden kann.

**Tabelle 3 Entwicklung der Zellvereinzelung mittels Mikrosauglöcher.**

Als Materialien für die Array-Membran dienten bislang Silizium (Si), Siliziumoxid ( $\text{SiO}_2$ ), Siliziumnitrid ( $\text{Si}_x\text{N}_y$ ) und Polyethylenterephthalat (PET) sowie Nickel und Polykarbonat. Die Membrandicke und der Lochdurchmesser sind durch  $d_{\text{Membran}}$  und  $D_{\text{Loch}}$  gekennzeichnet.

	Material	$d_{\text{Membran}}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{\text{Loch}}$ ( $\mu\text{m}$ )	Lochanzahl
Schmukler, 1988	Polykarbonat	13	1,85	$4,22 \times 10^5$ Poren $\text{cm}^{-2}$
Hediger, 1999	Si, $\text{SiO}_2$	20	2 – 40	5
Thielecke, 1999	$\text{Si}_x\text{N}_y$	1	2, 3, 4, 5, 6	16
Matsunaga, 2008	PET	38	2, 5, 10	100
Hosokawa, 2009	PET	38	2	10000
Hosokawa, 2010	Nickel	keine Angabe	8, 9, 10, 11	10000

Entwickelte Mikrosysteme für biologische Fragestellungen müssen aufgrund der geforderten Sterilität meist gekapselt aufgebaut werden, so dass der Einsatz von berührungslosen Manipulationstechniken zur Bewegung des Probenmaterials notwendig wird. Dabei wurden optische, elektrokinetische und hydrodynamische Manipulationsmethoden auf Mikrostrukturebene realisiert (Ashkin, 1987; Fuhr, 1994; Nilsson, 2009).

### **Mechanische, optische und elektrokinetische Manipulation**

Bei der mechanischen Manipulation werden häufig Greif-, Halte- oder Bewegungswerkzeuge in Manipulatoren eingebunden. Bei der Verwendung einer solchen Technik muss gewährleistet sein, dass eine Öffnung in dem aufgebauten System existiert (Love, 2006; Lu, 2010; Matsuoka, 2005). Für gekapselte Systeme werden hauptsächlich Spritzenpumpen, Ventile sowie Mikrostrukturen zum Bewegen der Zellen verwendet (Fröhlich, 2000; Fröstl, 2000; Zelle, 1951). Diese Verfahren üben eine mechanische Belastung, in Form von Scherstress, auf die Zellen aus, was die Zellviabilität bei minimalem Stress positiv, bei zu hohem Stress negativ beeinflussen kann (Ludwig, 1993).

Bei der optischen Manipulation (Stüber, 2010) werden energiereiche Laser als optische Pinzetten eingesetzt, um Zellen einzufangen, zu bewegen, zu ziehen und zu verdrehen (Brehm-Stecher, 2004; Ericsson, 2000; Kuo, 2001; Merz, 2000; Roberts, 1997). Der Vorteil einer solchen Technik liegt darin, dass eine berührungslose Manipulation gewährleistet ist. Somit können Zellen in sterilen und geschlossenen Kanalstrukturen bewegt werden. Nachteilig an dieser Methode ist, dass Zellen einer starken optischen

Strahlenbelastung ausgesetzt sind, wodurch die Zellviabilität verringert werden kann (Atif, 2010).

Die Methode der elektrokinetischen Manipulation nutzt elektrische Felder, welche auf polarisierbare Materie (z. B. Zellen) wirken. Mithilfe der Elektrorotation wie auch der Dielektrophorese, können Zellen berührungslos manipuliert und positioniert werden (Fuhr, 1994; Hunt, 2006; Müller, 1999; Shafiee, 2009). Auch bei diesem Verfahren ist eine thermische Belastung der Materie durch die elektrischen Felder nicht völlig auszuschließen (Jaeger, 2007).

Im Nachfolgenden sind einige BioMEMS detaillierter beschrieben. Dabei werden speziell Chipsysteme erläutert, welche Zellen separieren können. Auch werden Mikrosysteme vorgestellt, welche für die Separierung hoch-produzierender Zellen einsetzbar wären. Dabei ist eine Unterteilung, wie in Abb. 1.5 dargestellt, bezüglich Multi- und Einzelzellenebene vorgenommen worden.

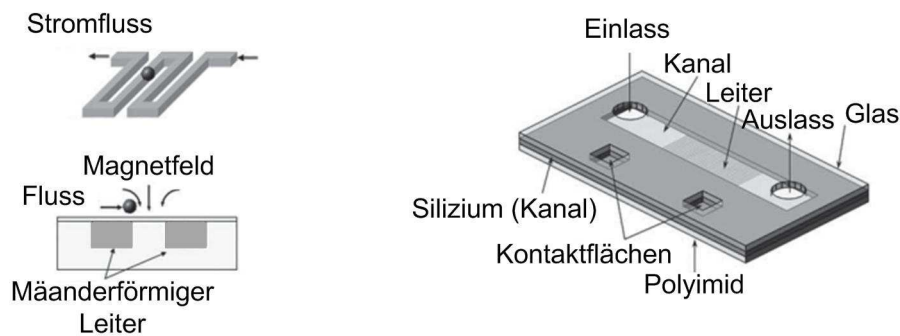
### **BioMEMS zur Zellseparation auf Multizellebene**

Die ersten beschriebenen chipbasierten Systeme waren Zellsortierer. Da Zellproben in Sortierern nicht kultiviert werden müssen, war die Realisierung einer physiologischen Umgebung in diesen Systemen nicht nötig, was den Aufbau erleichterte.

Viele Arbeitsgruppen haben sich damit beschäftigt, das FACS Prinzip auf einem Chip zu realisieren (Fu, 2002; Krüger, 2002; Wang, 2005; Wolff, 2003). Dabei wurden bislang immer Mikrokanäle eingesetzt, die die Probe an optischen Sensoren vorbeiführen. Für diese Applikation wurden die Mikrokanäle so dimensioniert, dass die Höhe und Breite etwa dem Durchmesser einer Zelle entsprachen. Somit können Zellen getrennt hintereinander in den Kanalstrukturen bewegt, charakterisiert und anschließend über Mikroventile entsprechend sortiert werden. Durch die Modifizierungen nach Fu et al. konnte die Probe mehrmals die optische Einheit passieren (Fu, 1999). In diesem Verfahren ist sowohl eine Vorwärts- als auch Rückwärtssortierung möglich, wobei eine falsche oder ungenaue Zuordnung reduziert werden konnte. Als weiterer Sortieralgorithmus wurden das MACS Verfahren mikrotechnisch umgesetzt (Modak, 2009; Xia, 2006). Choi realisierte das MACS Verfahren auf Silizium/Polyimidbasis (Abb. 1.6) (Choi, 2006). Dabei werden die Zellen über eine Fluidik in das System gebracht. Durch das Einprägen eines Gleichstroms in den mäanderförmigen Leiter wird ein Magnetfeld erzeugt. Somit erfahren die in das Kanalsystem eingeschleusten Zellen mit angehafteten magnetischen Parti-



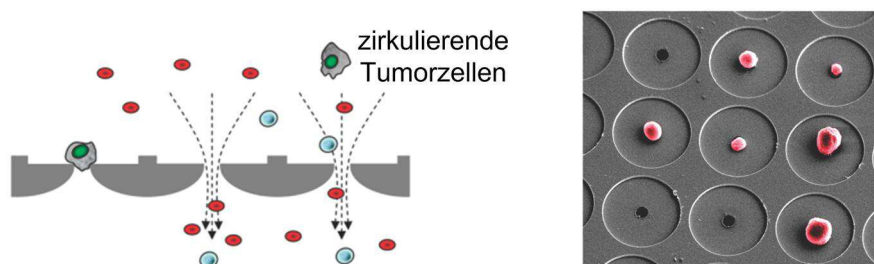
keln neben der anhaltenden Strömung eine magnetische Kraft und werden im Kanal oberhalb der mäanderförmigen Struktur gehalten. Alle Zellen ohne magnetische Partikel werden hingegen durch den anhaltenden Fluss aus dem Kanal gespült. Durch das Ausschalten des Gleichstroms wird das Magnetfeld abgeschaltet und die magnetischen Partikel mit den daran bindenden Zellen können aus dem System entfernt werden.



**Abb. 1.6 Realisierung einer magnetischen Sortiereinheit in einem Mikrosystem.**

Durch das Einprägen eines Gleichstroms entlang des mäanderförmigen Leiters bildet sich ein Magnetfeld im Kanal aus. Die elektrische Verbindung zur Gleichstromquelle wird mittels der Kontaktflächen durchgeführt. Die Zellen werden über den Einlass in den Kanal gebracht. Magnetische Partikel erfahren neben dem anhaltenden Spülfluss eine magnetische Kraft und werden in der Kanalstruktur gehalten. Modifiziert nach Choi (Choi, 2006).

Für die Sortierung nach Zellgröße und Deformierbarkeit entwickelten Hosokawa et al. ein Mikrolochararray (Abb. 1.7) (Hosokawa, 2010). Als Zelltestsystem wurden zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTC) verwendet, welche in einer Blutprobe detektiert werden sollen. CTCs treten meist schon in frühen Krankheitsstadien im peripheren Blut oder Knochenmark bei Patienten mit Krebserkrankung auf. Dabei ist die Auftrittswahrscheinlichkeit dieser Zellen im Bereich von  $0,1 - 10^{-5} \%$  (Neugebauer, 2010; Pachmann, 2005), was das Auffinden erschwert.



**Abb. 1.7 Mikrolochararray für das Trennen von CTCs aus dem peripheren Blut.**

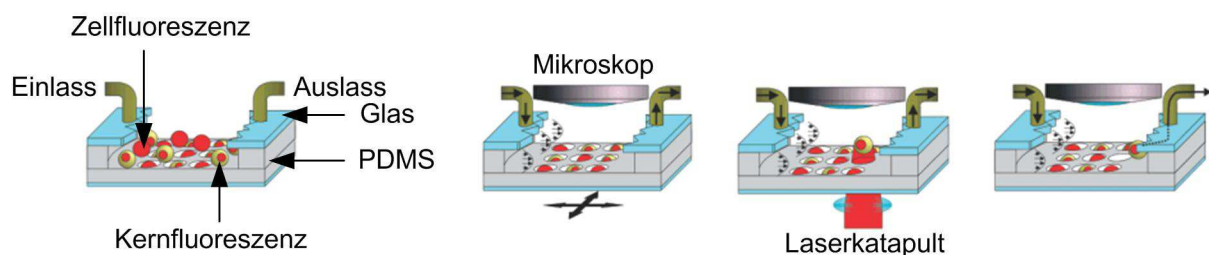
Zellen werden mittels des Mikrolochararrays gesiebt. Dabei dienen die Größe sowie die Deformierbarkeit der Zellen als Sortierparameter. Links: Schematische Darstellung der Zelltrennung mittels Mikrosieb. Rechts: Rasterelektronenmikroskopiebild von eingefangenen Brustkrebszellen (MCF-7) auf den Mikrolöchern. Lochdurchmesser und Pitch betragen  $9 \mu\text{m}$  bzw.  $60 \mu\text{m}$ . Nach Hosokawa et al. (Hosokawa, 2010).

Um Erythrozyten und Leukozyten aus dem peripheren Blut zu filtern, sind Mikroporen mit Durchmesser von  $\geq 8 \mu\text{m}$  vonnöten (Chien, 1970; Shapiro, 1976; Zabaglo, 2003). Deshalb wurde bei dem in Nickel realisierten System von Hosokawa et al. das Array mit Lochdurchmessern von  $8 - 11 \mu\text{m}$  realisiert. Die Flussrate wurde zwischen  $200 - 1000 \mu\text{l min}^{-1}$  variiert, um eine möglichst effiziente Trennung der gewünschten Zellen (hier: MCF-7,  $\varnothing_{\text{Zelle}} \approx 22,5 \mu\text{m}$ ) zu erlangen. Mithilfe einer solchen Anordnung konnte eine 80 %-ige Trennung mit einer 98 %-igen Viabilität erreicht werden.

### BioMEMS zur Zellseparation auf Einzelzellebene

Um einzelne Zellen noch spezifischer aus einem gesamten Pool zu trennen, muss die Analyse und die Isolierung auf Einzelzellebene vorgenommen werden.

Für die Trennung von fluoreszenzmarkierten Zellen ist in Kovac und Voldman (Kovac, 2007) ein optofluidisches System beschrieben, welches auf dem Einsatz von Mikrokavitäten basiert (Abb. 1.8).



**Abb. 1.8 Aufbau eines MEMS zur Zellseparation auf Einzelzellebene. Selektionskriterium: Fluoreszenzsignal (Kernfluoreszenz).**

Darstellung eines miniaturisierten Sortiersystems auf der Basis von Glas und PDMS, wobei kleine Kavitäten in PDMS abgeformt sind. Die Probe wird in den Kanal gespült, die Partikel sedimentieren und setzen sich in den Kavitäten ab. Daraufhin werden Spülschritte durchgeführt und die Partikel optisch analysiert. Die identifizierten Zellen können über ein optisches Katapult aus den Kavitäten geschossen werden und über den Fluidikaufsatz aus dem System transportiert werden. Modifiziert nach Kovac und Voldman (Kovac, 2007).

Die Zellen werden über einen Fluidikaufsatz und einen Fluss in das System eingeschleust. Nach dem erfolgreichen Einbringen der Zellen in das System wird der Fluss abgeschaltet. Darauf sedimentieren die eingebrachten Zellen und setzen sich in den Kavitäten ab. Überschüssige Zellen werden abgespült, so dass die verbliebenen Zellen vereinzelt in den Mikrokavitäten vorliegen und daraufhin optisch analysiert und mittels eines Laserkatapults separiert werden können. Mit einer solchen Anordnung konnten pro Stunde  $60 - 70$  Zellen mit einer Reinheit von  $81 - 89 \%$  isoliert werden. Die möglichen Verunreinigungen wurden durch Zellen verursacht, welche sowohl durch den Waschprozess nicht

erfolgreich entfernt worden sind als auch ohne Laserkatapult aus den Kavitäten befördert wurden. Ein erhöhtes Auftreten des Zelltods, ausgelöst durch Scherstress oder thermische Erwärmung, war in diesem Verfahren nicht erkennbar. Der Verlust von herausgeschossenen Zellen auf dem Transportweg lag bei 18 – 28 %. Während der durchgeführten Versuche von Kovac und Voldman stellte sich als größter limitierender Faktor bei dieser Einheit das manuelle Umsetzen der Zellen aus dem Reservoir am Ausgang des Systems in eine Lochplatte heraus. Bei zwei durchgeführten Experimenten wurde in 27 % bzw. 74 % der Fälle ein erfolgreicher Transfer erzielt (Kovac, 2007).

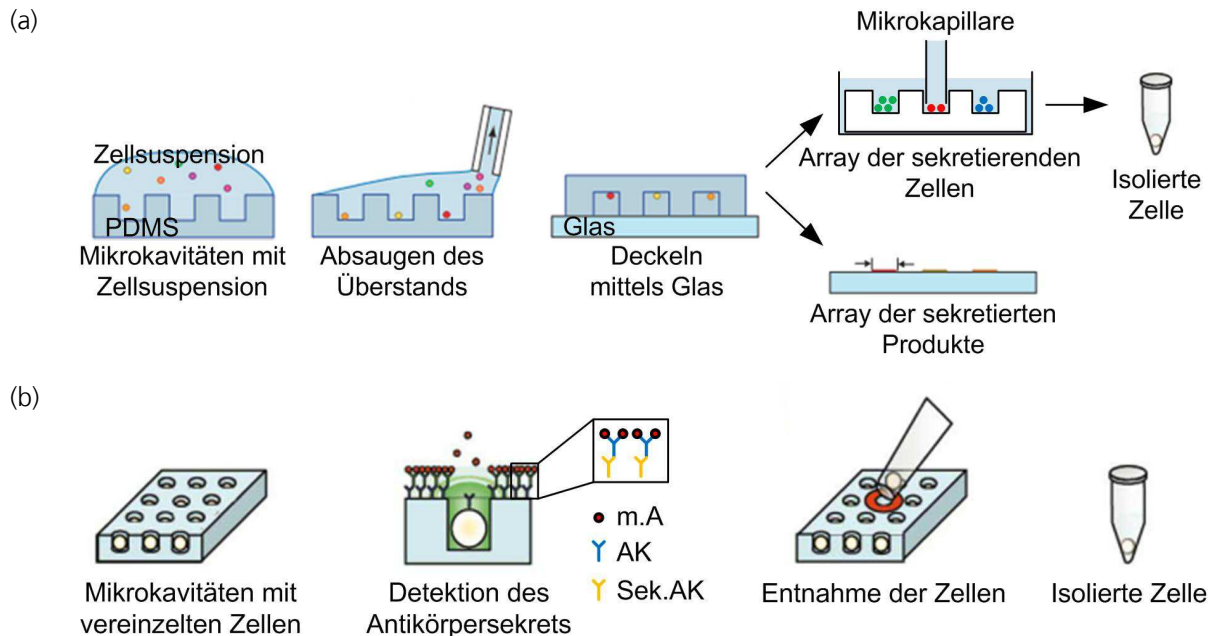
Eine weitere Möglichkeit Zellen zu isolieren, sind Mikrolochararray-Chips mit adaptierter Mikromanipulationseinheit. Bei dieser Methode werden die Zellen aktiv durch einen konstanten Fluss oder Unterdruck auf den Positionierungsstellen eingefangen. Sedimentationszeiten und Zellkonzentrationen sind somit keine entscheidenden Parameter. Zellen, welche zwischen den Löchern durch Sedimentation auf der Chipmembran zum Liegen kommen, können nach dem Positionierprozess über Waschschriffe abgespült werden (Thielecke, 1999). Dabei wurden Zellvereinzlungs-Effizienzen von 70 – 80 % (Matsunaga, 2008) bei 100 Zellen (10 x 10 Array) und 76 – 94 % (Hosokawa, 2009) bei 1000 – 9000 Zellen erzielt. Ein zunehmendes Auftreten des Zelltods beim Positionieren mit einer Flussrate von  $180 \mu\text{l min}^{-1}$  war nicht erkennbar.

Durch den Einsatz einer Mikrokapillare und eines Mikromanipulator sind einzelne Zellen von der Lochstruktur abgenommen worden, wobei der Isolierparameter die intrazelluläre Fluoreszenz war (Hosokawa, 2009). Eine Vitalitätsprüfung der isolierten Zellen ist nicht durchgeführt worden, da direkt nach der Separierung eine Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) angeschlossen wurde. Die PCR ist ein invasives Verfahren, um die DNA zu vervielfältigen. Es liegt also noch kein Ergebnis darüber vor, wie schonend der Einsatz einer Mikropipette in Kombination mit einer solchen Plattform ist. Auch wurden die Zellproliferation, die Sekretion oder der Einsatz von halbfesten Zellkulturmedien auf der Array-Plattform bislang noch nicht untersucht.

### **BioMEMS zur Identifikation von Antikörper-sekretierenden Einzelzellen**

Für die Generierung von Antikörper-sekretierenden Zelllinien werden in der Literatur Mikrosysteme beschrieben, die die Zellen vereinzeln und das Sekret quantifizieren können. Dabei werden hauptsächlich Mikrokapillaren verwendet (Jin, 2009; Love, 2006; Tajiri, 2007; Tokimitsu, 2007; Yamamura, 2005). Zwei Verfahren werden im Nachfol-

genden vorgestellt, welche an das enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) Verfahren (Abb. 1.9a) und an das enzymgekoppelte Immunospot (*enzyme-linked immunospot technique*, ELISPOT) Verfahren (Abb. 1.9b) angelehnt worden sind.



**Abb. 1.9** Zwei mögliche Verfahren basierend auf Mikrokavitäten-Plattformen, um Antikörper-sekretierende Zellen zu identifizieren und zu isolieren.

(a) Aus PDMS wurden Mikrokavitäten abgeformt, um Antikörper-sekretierende Zellen voneinander zu trennen (Love, 2006). Die Zellsuspension wird aufgebracht, der Überstand abgesaugt und die Mikrokavitäten mit einer Glasplatte verschlossen. Nach weniger als 12 Stunden konnte die Antikörpersekretion an der Glasplatte detektiert werden. Darauf wird der hoch-produzierende Zellklon aus der entsprechenden Kavität mittels einer Mikrokapillare entnommen und isoliert. (b) Mikrokavitäten wurden verwendet, deren Oberfläche mittels eines Sekundäntikörpers (Sek.AK) beschichtet waren (Jin, 2009). Die sekretierten Antikörper (AK) der Zellen werden von dem Sekundäntikörper immobilisiert. Markierte Antigene (m.A.), welche dem Medium zugesetzt sind, binden an den sekretierten Antikörper. Dadurch entsteht ein Fluoreszenzring um die Mikrokavitäten, was eine Identifikation der Zellen, die Antikörper gegen das Antigen produzieren, zulässt und eine Selektion ermöglicht. Modifiziert nach Love et al. (Love, 2006) und Jin et al. (Jin, 2009).

ELISA und ELISPOT basieren auf ähnlichen Verfahren, um Sekrete nachweisen zu können. Das Hauptaugenmerk des ELISA Verfahren liegt darin, die Menge des Sekrets zu einem bestimmten Zeitpunkt gemittelt über die gesamten Zellen zu bestimmen, wobei das ELISPOT Verfahren eine Aussage über die Anzahl der sekretierenden Zellen gibt. In dem Verfahren angelehnt an ELISA (Abb. 1.9a) werden Mikrokavitäten mit einem Durchmesser von 50 – 100 µm in PDMS abgeformt (Love, 2006). Der Zelldurchmesser lag zwischen 10 – 20 µm. Durch den wesentlich größeren Kavitätendurchmesser muss bei der Applizierung der Zellsuspension die Zellkonzentration sehr präzise eingestellt

werden, um eine Mehrfachbelegung von einzelnen Kavitäten zu reduzieren. Nach einer Sedimentationszeit von 3 – 5 min waren etwa 50 – 75 % der Kavitäten mit 1 bis 3 Zellen belegt. Nach der Sedimentationszeit diente eine Glasplatte zur Deckelung der Kavitäten. Somit sind Kreuzkontaminationen ausgeschlossen und das jeweilige Flüssigkeitsreservoir der Kavitäten hat direkten Kontakt mit einer bestimmten Stelle auf der Glasplatte. Bei dem Entfernen der Glasplatte bleibt ein Teil des Flüssigkeitsvolumens und somit des Sekrets an der Glasplatte haften und kann daraufhin nachgewiesen werden. Nach weniger als 12 Stunden konnte die Sekretion detektiert und quantifiziert werden. Nach einer 4-tägigen Kultivierung in den Mikrokavitäten wurden die Zellklone mittels einer Mikrokapillare entnommen und in eine 96-Lochplatte transferiert. Die dabei erreichte Klonierungseffizienz lag bei 84 %. Durch das große Gefäßvolumen und die damit verbundene Verdünnung des Sekrets müssen die Zellen eine starke Sekretion aufweisen bzw. es muss auf sehr sensitive Messmethoden zurückgegriffen werden, um das Sekret nachweisen zu können.

In dem Verfahren angelehnt an ELISPOT (Abb. 1.9b) werden wiederum Mikrokavitäten eingesetzt, wobei die Fläche um die Mikrokavitäten mit einem Sekundärantikörper beschichtet ist. Dieser Sekundärantikörper ist gegen den Zielantikörper gerichtet. Dem Medium wird zusätzlich ein fluoreszenzmarkiertes Antigen zugegeben, welches an den Zielantikörper koppeln kann. Der Kavitätendurchmesser ist nur geringfügig größer als der Zelldurchmesser (Jin, 2009). Somit ist ein präzises Einstellen der Zellkonzentration nicht mehr nötig, da in jeder Kavität nur maximal eine Zelle Platz findet. Nach der erfolgreichen Sedimentation befinden sich idealerweise in jeder Kavität nur eine Zelle und das Flüssigkeitsvolumen um die Kavitäten ist zellfrei. Sekretieren die abgelegten Zellen den Zielantikörper koppelt dieser an den auf der Oberfläche um die Kavität befindlichen Sekundärantikörper. Der Zielantikörper ist somit immobilisiert und das markierte Antigen kann sich an den Zielantikörper anlagern, wodurch sich ein fluoreszierender Ring um die Kavitäten mit den gewünschten Zielzellen ergibt. Die Zielzellen konnten daraufhin wiederum über eine Mikrokapillare aus den Kavitäten genommen werden und isoliert werden. Dabei zeigte sich durch die geringen Abstände zwischen den Mikrokavitäten eine erhöhte Entnahme umliegender Zellen zu der Zielzelle.

Der Einsatz von Mikrokavitäten zur Generierung von Zelllinien mit monoklonaler Antikörperproduktion hat sich als ein mögliches Verfahren herausgestellt, um Zellen schonend voneinander zu separieren. Jedoch ist die Vereinzelung der Zellen in den Kavitäten

sehr stark abhängig von der Kavitätengröße. Wird die Kavitätengröße reduziert, vergrößert sich die Vereinzlungseffizienz. Gleichzeitig sind jedoch mit einer erhöhten Verdunstung, einer schlechteren Benetzung der Mikrokavitäten, sowie Blaseneinschlüsse in den Kavitäten und zunehmenden Schwierigkeiten bei der Zellentnahme zu rechnen. Außerdem sind Kreuzkontaminationen der Sekrete, falls ein gemeinsames Flüssigkeitsvolumen über dem Array genutzt wird, generell nicht auszuschließen.

## **2. Problemstellung**

Der Einsatz von rekombinanten Arzneimitteln, so genannten Biopharmazeutika, hat in der Therapie in den letzten Jahren stark zugenommen (Hacker, 2009; Lua, 2012; Matasci, 2008). Um die wachsende Nachfrage zu decken und die immer höheren Sicherheitsanforderungen zu erfüllen, wird der Herstellungsprozess fortlaufend optimiert.

Die Gewinnung von Biopharmazeutika erfolgt aus gentechnisch veränderten Organismen. Dazu wird während der Transfektion eine spezifische Sequenz für das Zielprotein in die Wirtszelle eingebracht, wodurch sich genetische Unterschiede innerhalb der Zellpopulation ergeben. Diese Unterschiede führen dazu, dass sich eine große Varianz der Produktionssysteme bezüglich der Produktivität, Stabilität, Vitalität und Proliferation ergibt. Da diese Parameter eine große Relevanz im Bezug auf die Qualität eines Produktionssystems haben, muss eine Selektion erfolgen. Diese Selektion stellt eine große Herausforderung im Herstellungsprozess von Biopharmazeutika dar, da 1) idealerweise unendlich viele Zellklone charakterisiert werden müssen, um das beste Produktionssystem aus allen möglichen Zellklonen selektieren zu können. 2) inhomogene Klone müssen exakt lokalisiert werden, um ein Überwachsen hoch-produzierender Zellen durch schwächer-produzierende Zellen ausschließen zu können. 3) die Selektionstechnik muss eine mehrparametrische Analyse unterstützen, um die oben aufgeführten relevanten Parameter für ein Produktionssystem gleichzeitig zu erfassen und 4) die Selektion muss schnell und wirtschaftlich sein.

Aktuell werden sehr häufig Verdünnungsreihen genutzt, um Zellklone zu generieren. Diese Technik ist sehr kostenintensiv, zeitintensiv und bei einer geringen Auftretswahrscheinlichkeit der Zielzellen in der Ausgangspopulation generell nicht geeignet (Screening: ~ 125 Klone pro Woche; Angabe entnommen aus ClonePix 2 Broschüre). In durchflusszytometrischen und magnetischen Zellsortierern liegt der Fokus darauf, Zellen im Hochdurchsatz zu analysieren. Somit befinden sich die Zellen nur innerhalb eines Bruchteils ihres Zellzykluses in der Sensoreinheit, wodurch eine präzise Quantifizierung des Zellsystems nicht möglich ist und nur ein verschwindend geringer Bereich des Zellzykluses abgedeckt wird. Folglich ist das Erfassen der Proliferation oder zellzyklusabhängiger Prozesse mit einer solchen Technik nicht möglich. Ferner gestaltet sich die Bestimmung der Produktivität bezüglich eines Zellsekrets als schwierig, da eine Zuordnung des Sekrets zu dem produzierenden Zellsystem nur mit erhöhtem Aufwand möglich ist. Höher-

viskose Medien mit Pickeinheiten können inhomogene Klone nur mit erhöhtem Aufwand identifizieren und benötigen lange Inkubationszeiten (5 – 14 Tage), wodurch der komplette Herstellungsprozess verlangsamt wird (Screening des ClonePix 2 Systems: ~ 3500 Klone pro Woche; Angabe entnommen aus ClonePix 2 Broschüre). Ferner müssen große Mengen an höherviskosem Gel und Lochplatten eingesetzt werden, um eine effiziente Zellvereinzelung zu erreichen.

In den vergangenen Jahren gelangen zunehmend Mikrosysteme in den Fokus der Forschung, um im Hinblick auf relevante Zellsysteme für die Herstellung von Biopharmazeutika eine Klonierung vorzunehmen, da sie neben einem hohen Maß an Integrationspotential auch kostengünstig und portabel sind (Gong, 2010; Jin, 2011; Jin, 2009; Love, 2006; Ogunniyi, 2009; Panagiotou, 2011). Dabei wird hauptsächlich auf Kavitätenchips zurückgegriffen, um Zellen voneinander zu separieren, zu charakterisieren und zu isolieren. Diese Technik besitzt den Nachteil, dass die Kavitätengröße sehr stark mit der Vereinzelungsdichte auf dem Chip zusammenhängt. Dieser Zusammenhang ist hinderlich bei der Untersuchung der Proliferation, da diese nur in größeren Kavitäten erfolgen kann, um die Zellpopulation aufnehmen zu können, wodurch sich eine starke Verringerung der Vereinzelungsdichte auf dem Chip ergibt. Ferner ergeben sich große Schwierigkeiten bei der Entnahme der Zielzellen aus sehr kleinen Kavitäten.

Gerade im Hinblick auf das Screening unendlich vieler Zellen in verschwindend geringer Zeit zur Generierung eines stabilen, hoch-produzierenden zellulären Produktionssystems weisen die etablierten Verfahren Schwachstellen auf. Vor diesem Hintergrund besteht die Notwendigkeit der Entwicklung neuartiger Selektionssysteme, welche die genannten Probleme lösen und die Generierung von Produktionsorganismen für die Herstellung von Biopharmazeutika zulassen.



### **3. Zielsetzung**

Ein neuartiges Prinzip für ein Zellselektionssystem sieht vor, basierend auf einem Array-Chip eine hochparallele Zellpositionierung und –vereinzelung vorzunehmen und dieses Positioniersystem mit einer Pickeinheit zur Zellentnahme zu kombinieren. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu überprüfen, inwiefern sich das entwickelte Prinzip eignet, für die Herstellung von Biopharmazeutika relevante Zelllinien zu generieren. Dabei ist zu untersuchen in welchem Umfang das Selektionsprinzip die im Folgenden beschriebenen Anforderungen erfüllt. Die Anforderungen an das Selektionsprinzip bestehen darin, 1) ein parallel durchgeführtes Screening von etwa 1000 Zellen und eine Klonierung von einer Zelle pro Minute zu erreichen, 2) homogene Zellklone präzise zu erfassen und 3) die Produktionssysteme anhand der Proliferation, Produktion und Vitalität zu charakterisieren, und basierend auf den erfassten Daten die Zellen unter dem Gesichtspunkt der Produktivitätssteigerung zu klonieren.

Des Weiteren sind erste Versuche mit einer Parallelität von mehr als 100000 Zellen durchzuführen, um die Hochdurchsatzfähigkeit des Systems beurteilen zu können.

#### **Anforderungen an den Aufbau des Selektionssystems**

Es wird der Ansatz verfolgt, das Selektionssystem basierend auf einem Array-Chip mit adaptierter Positioniertechnik aufzubauen und mit einer Pickeinheit zu versehen.

Die Verwendung eines Array-Chips erlaubt es, die Vorteile der MEMS-Technik (niedrigere Kosten, geringe Volumen, Platzersparnis) mit einer hochgradigen Parallelisierung und Zelladressierung auf kleinstem Raum zu kombinieren. Folglich ist es denkbar, die synchrone Erfassung von mehreren Parametern mit der Hochdurchsatz-Anforderung an das System zu vereinen und so gegenüber einer sequentiellen Analyse Vorteile im Hinblick auf die Geschwindigkeit und die Lokalisierung eines Klons zu erreichen. Durch die Adaption einer aktiven Positioniertechnik besteht die Möglichkeit, eine höhere Vereinzelungsdichte gegenüber reinen Kavitätenchips zu erzielen, welche nur über sedimentierte Zellen nach dem Zufallsprinzip belegt werden. Da die Zellen anhand ihrer Proliferation auf dem Chip charakterisiert werden müssen, muss ein Entnahmewerkzeug gewählt werden, welches sich auch für die Isolation von größeren Zellpopulationen eignet.

### **Anforderung an die Erfassung relevanter Parameter für Produktionssysteme**

Relevante Parameter für Zellproduktionssysteme sind die Produktivität, Stabilität, Proliferation und Vitalität. Die Beurteilung der Stabilität kann nur durch Untersuchungen der Zellgenetik mittels invasiver Methoden (z. B. durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) erfolgen, wodurch die Zelle massiv geschädigt wird. Folglich kann dieser Parameter nicht in die Charakterisierung des Produktionssystems aufgenommen werden, wenn sich an die Charakterisierung eine Zellklonierung anschließen soll. Die Proliferation kann gut über das Zählen der Populationsverdopplungen festgestellt werden. Dazu muss untersucht werden, ob eine räumliche Abgrenzung der einzelnen Zellklone in dem entwickelten miniaturisierten System realisierbar ist und wie sich das Proliferationsverhalten der Zellpopulationen auf dem Chipsystem ausbildet. Falls ein Erfassen der Proliferation auf dem Chip möglich sein sollte, so wären zellzyklusabhängige Vorgänge erfassbar, was einen immensen Vorteil gegenüber der Durchflusszytometrie oder den magnetischen Zellsortierern darstellen würde. Es ist zu untersuchen, ob der Parameter Vitalität mittels der Impedanzspektroskopie erfassbar ist. Diese Methode hätte Vorteile gegenüber einer in der Zellbiologie üblichen Lebend/Tot-Färbung, da sie nicht-invasiv und einfach durchzuführen ist und ein hohes Automatisierungspotential besitzt. Die Produktivität eines Zellsystems kann anhand von Fluoreszenzmarkierungen am Zielprotein quantifiziert werden. Dabei können die therapeutischen Proteine zum einen im Zellvolumen vorliegen oder auch in den extrazellulären Raum sezerniert werden. Die Quantifizierung der Produktivität anhand eines Sekrets ist im Vergleich zu einem intrazellulären Protein erheblich schwieriger, da dazu untersucht werden muss, wie Zellsekrete auf dem Chip immobilisiert werden können und ob eine exakte Zuordnung zu dem jeweiligen produzierenden Zellklon auf kleinstem Raum vorgenommen werden kann.

### **Validierung des aufgebauten Systems**

Im Hinblick auf eine Produktionssteigerung müssen die Zielzellen mit einer hohen Produktion ausgewählt und von dem Chip entnommen und kloniert werden. Dabei ist zu untersuchen, welcher Gewinn beim Einsatz mit dem aufgebauten Selektionssystem erzielt werden kann.

In vergleichenden Untersuchungen zu gängigen Verfahren sind Zellklone zum einen über Verdünnungsreihen zum anderen über einen Tecan Pickroboter in Kombination mit einem Roche Cellavista Analyzer zu selektieren. In Bezug darauf ist zu prüfen, inwiefern

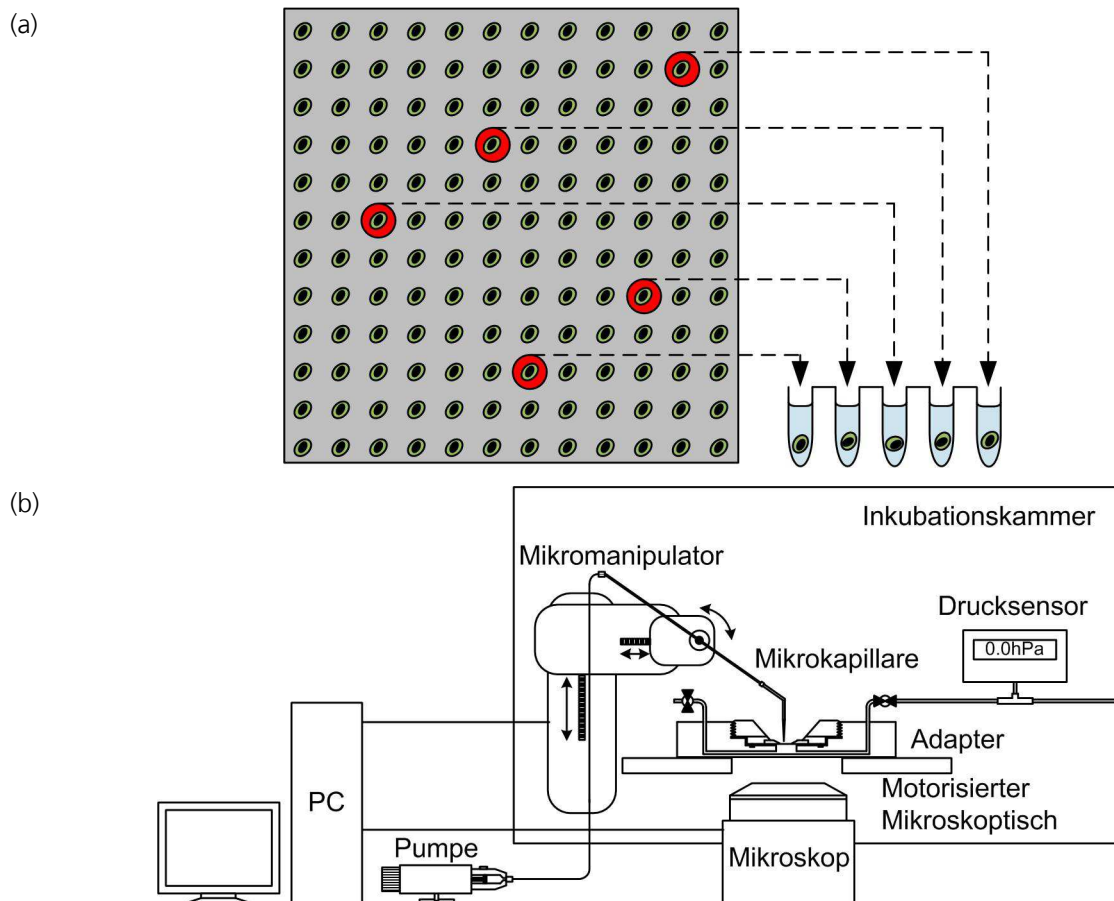
der gewinnbringende Einsatz des aufgebauten Systems unter dem Aspekt einer Produktionssteigerung mit etablierten Methoden vergleichbar ist. Vergleichende Studien sind durchzuführen und dabei sind das Durchflusszytometer mit Sortiereinheit und magnetische Zellsortierer als Referenz einzusetzen. Die unterschiedlichen Verfahren sind unter Gesichtspunkten wie der Hochdurchsatzfähigkeit, der Multiparameterbeschreibung von Zellen, der Quantifizierung von Zellsekreten, der Erfassung von dynamischen Zellvorgängen und der Zellprobenmenge gegenüberzustellen.

#### 4. Systemkonzipierung

Das Konzept des Selektionssystems für die Etablierung therapeutisch relevanter Produktionszellen umfasste die parallele Anordnung der Zellen auf einem Chip und die Klonierung der Zielzellen. Für das System mussten die folgenden Komponenten entwickelt werden (Abb. 4.1):

- Chip
- Fluidikeinheit
- Unterdrucksystem
- Bildverarbeitungssoftware

Die Entwicklung der Komponenten werden in Kapitel 5 erläutert.



**Abb. 4.1 Schematische Darstellung des Konzepts für das Selektionssystem.**

(a) Zellen werden parallel auf einem Chip abgelegt. Dadurch können die Zellen sehr gut adressiert, lokalisiert und gleichzeitig alle Zellen charakterisiert werden. Die Zielzellen werden nach der Charakterisierung in die Isolationsgefäße überführt. (b) Schematische Darstellung der Selektionseinheit, bestehend aus einer zentralen Recheneinheit (PC), einem Mikromanipulator mit Mikrokapillare und angeschlossener Pumpe, einem inversen Mikroskop mit Inkubationskammer und dem fluidischen Adapter mit Ansaugsystem.

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Material

#### 5.1.1. Chemikalien

Reagenzien und Kits	Hersteller
CASYton	Innovatis, Reutlingen
CloneDetect (Anti-Mouse K8220)	Genetix, Dornbach
DMEM/F12	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt
FACS-Flow, -Clean, -Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoresceindiacetat (FDA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Marburg
HT-Supplement	PAN Biotech, Aidenbach
Panserin C6000	PAN Biotech, Aidenbach
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Penizillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Softagar (CloneMedia K8610)	Genetix, Dornach
Triton-X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

#### 5.1.2. Allgemeine Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
15 ml, 50 ml Röhrrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Dichtungsring	Schlösser, Mengen
Einmalpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
FACS-Röhrrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Golddraht (0,5 mm)	AlfaAesar, Karlsruhe
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kryo-Röhrrchen (2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Lochplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Objektträger, silanisiert	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Plastikpetrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Silikonkleber (MED-1000)	NuSil Technology, Carpinteria (USA)
Siliziumwafer (300, 500 µm dick)	Siegert Consulting e.K., Aachen
Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm)	Fisher Scientific, Schwerte
Transferpipetten (Custom Tip Typ I)	Eppendorf, Hamburg
NanoPort Assembly	Besta, Wilhelmsfeld
Zellfilter, 40 µm Nylon	BD, Heidelberg
Zellkulturgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen

### 5.1.3. Geräte

Geräte	Hersteller
A/D-Karte (NI USB-6009)	National Instruments, München
Begasungsbrutschrank (BBD6220)	Heraeus, Hanau
DC-Spannungsquelle	Voltcraft, Hirschau
Druckregelventil	Festo, Esslingen-Berkheim
Drucksensor (112LP10D-PCB)	SensorTechnics, Purchheim
Drucksensor (HCXM010D6V)	SensorTechnics, Purchheim
Durchflusszytometer, FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Biberach a.d. Riss
Impedanzanalysator (Solartron 1260)	Solartron Analytical, Farnborough (UK)
Impedanzschnittstelle (Solartron 1294)	Solartron Analytical, Farnborough (UK)
Inkubationseinheit	Evotec Technologies, Düsseldorf
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Biberach a.d. Riss
Mikromanipulator (Patchman)	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop, Axiophot, Durchlichtmikroskop mit Phasenkontrast- und Fluoreszenzfilter	Zeiss, Jena
Mikroskop, IX70 und IX81, inverse Durchlicht-Mikroskope mit Phasenkontrast- und Fluoreszenzfilter und SIS CC12 CLR Farbkamera	Olympus, Hamburg
Oberflächenprofilometer xy	NanoFocus AG, Oberhausen
Niederdruckregelventil	Marsh BelloFram, Nottingham (UK)
Präzisionsölpumpe (CellTram vario)	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank (-80 °C), HFU 486 HERA freeze	Thermo Scientific, Langenselbold
Vakuumsaugdüse	Festo, Esslingen-Berkheim
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad (37 °C)	Julabo Labortechnik, Seelbach
Zellzählgerät, CASY-TT	Innovatis, Reutlingen
Zentrifuge Biofuge Primo R	Thermo Scientific, Langenselbold

Computer-Software	Hersteller
Analysis Cell^P	Olympus SIS, Hamburg
AxioVision 4.5	Zeiss, Jena
CellQuest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg
COMSOL Multiphysics Version 4.2	Comsol, Göttingen
LabView 8.2	National Instruments, München
NI Vision Development Module	National Instruments, München
ZPlot	Scribner Associates, North Carolina (USA)
ZView	Scribner Associates, North Carolina (USA)

### 5.1.4. Medien, Lösungen und Puffer

#### Medien der Zellkultur

Kulturmedium der Arpe-19 Zellen:

FKS	10 % (v/v)
Penizillin/Streptomycin in DMEM/F12	100 Unit ml <sup>-1</sup> /100 µg ml <sup>-1</sup>

Einfriermedium der Arpe-19 Zellen:

Kulturmedium	95 % (v/v)
DMSO	5 % (v/v)

Kulturmedium der CHO-Zellen:

HT-Supplement	2 % (v/v)
Zeocin	0,3 % (v/v)
Penizillin/Streptomycin in Panserin C6000	100 Unit ml <sup>-1</sup> /100 µg ml <sup>-1</sup>

Einfriermedium der CHO-Zellen:

Kulturmedium	70 % (v/v)
FKS	20 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

R10-Kulturmedium der Hybridomzellen:

FKS	10 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	50 µM
Penizillin/Streptomycin in RPMI-1640	100 Unit ml <sup>-1</sup> /100 µg ml <sup>-1</sup>

R20-Kulturmedium der Hybridomzellen:

FKS	20 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	50 µM
Penizillin/Streptomycin in RPMI-1640	100 Unit ml <sup>-1</sup> /100 µg ml <sup>-1</sup>

Einfriermedium der Hybridomzellen:

R10-Kulturmedium	40 % (v/v)
FKS	50 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

Die Hybridomzellen sind nach dem Auftauen drei Wochen lang in R20-Medium kultiviert worden. Anschließend wurde das R20-Medium nach und nach durch R10-Medium ersetzt.

PI/FDA-Färbelösung (Lebend/Tot-Färbung):

PI	40 µg ml <sup>-1</sup>
FDA in PBS	30 µg ml <sup>-1</sup>

## Verwendete Zellen

Zelltyp	Zellwachstum	Zelleigenschaft
Arpe-19	Adhärent	-
PBMC	Suspension	-
CHO-Wildtyp	Suspension	Keine Proteinexpression (Referenz)
CHO-DG44 pTracer	Suspension	GFP-Expression
54K(1)-5 Hybridom	Suspension	Sekretion des Antikörpers mAk54K

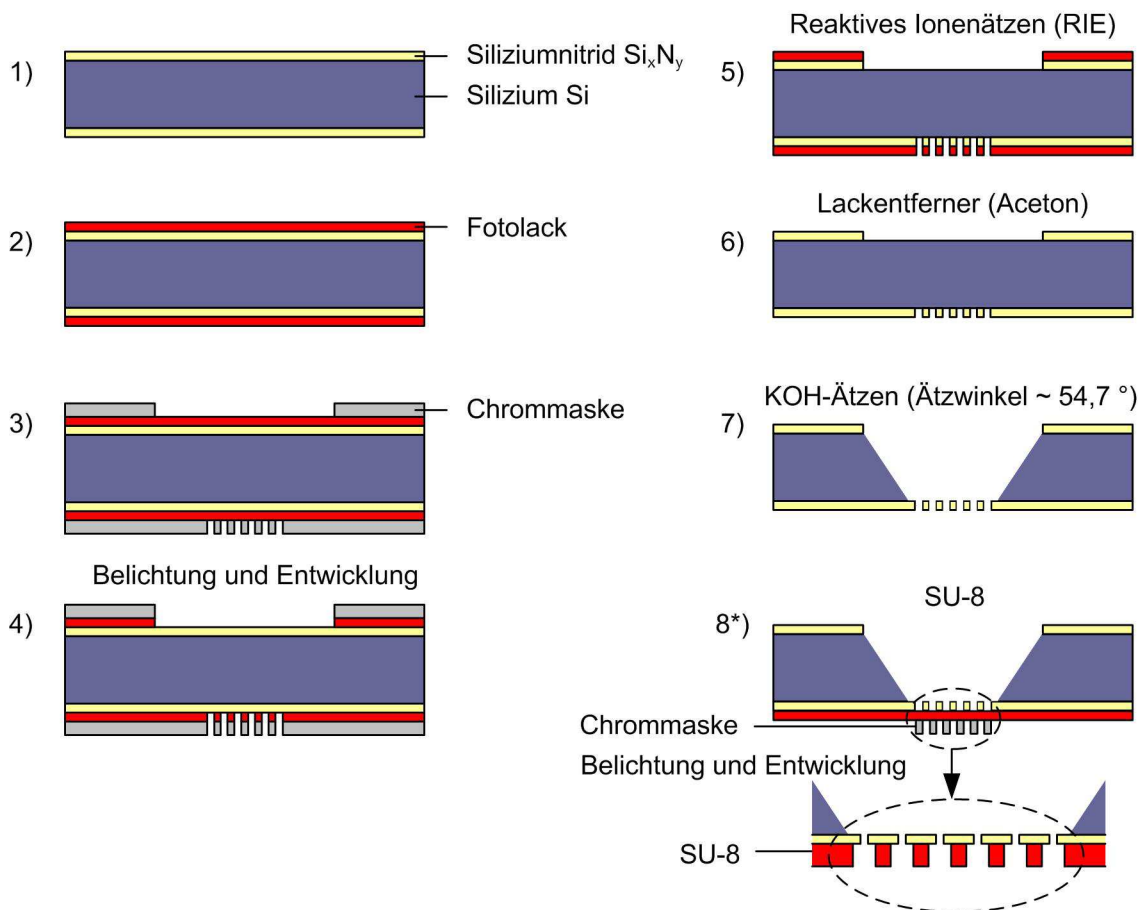
## 5.2. Methoden

### 5.2.1. Systembeschreibung

Zur chipbasierten Zellvereinzelung dienen mit Methoden der Mikrosystemtechnik aufgebaute Mikrolochararray-Chips, ein Fluidikadapter sowie ein Unterdrucksystem. Der Aufbau dieser drei wesentlichen Bestandteile der Fluidikeinheit wird im Folgenden erläutert.

#### Mikrolochararray-Chip

Die Mikrolochararray-Chips wurden schrittweise mittels mikroprozessentechnischer Methoden hergestellt (Abb. 5.1).



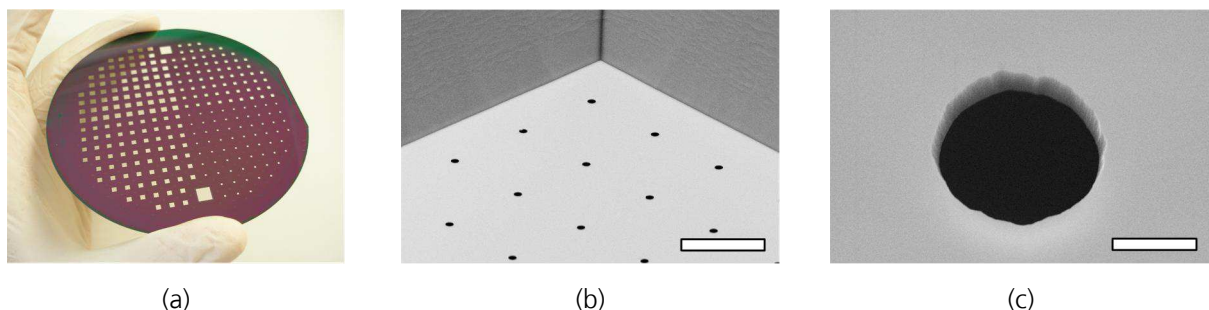
**Abb. 5.1 Prozesse zur Herstellung eines Mikrolochararray-Chips.**

Die Siliziumnitridschicht wird über eine plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidung (PECVD) auf dem beidseitig polierten  $\langle 100 \rangle$  Siliziumwafer abgeschieden, über Fotolithografie die Strukturen der Chrommasken auf den Wafer übertragen und über reaktives Ionenätzen (RIE) sowie chemisches Nassätzen die Strukturen freigelegt. In Prozessschritt 8\* werden auf der  $\text{Si}_x\text{N}_y$ -Membran zusätzlich Begrenzungsstrukturen realisiert, indem eine aufgeschleuderte Fotolackschicht (SU-8) strukturiert wird.



Als Trägermaterial für die Biochips dienten 4 inch  $\langle 100 \rangle$  Siliziumwafer mit Dicken von  $500 \pm 5 \mu\text{m}$  und  $300 \pm 5 \mu\text{m}$ . Beidseitig wurden über plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidungen (*plasma-enhanced chemical vapor deposition*, PECVD) 870 nm dicke, spannungsarme Siliziumnitridschichten ( $\text{Si}_x\text{N}_y$ ) aufgebracht. Mithilfe fotolithografischer Schritte und anschließender Ätzprozesse erfolgte eine Strukturierung der beiden Nitridschichten. Dazu wurde ein Positivlack auf den Wafer aufgeschleudert, durch eine Chrommaske hindurch belichtet und anschließend entwickelt. Auf der Waferoberseite erfolgte so der Übertrag des Locharrays in den Fotolack, auf der Waferunterseite führten ähnliche Prozessschritte zur Übertragung der Strukturen großräumiger Öffnungen. Mithilfe des reaktiven Ionenätzens (*reactive ion etching*, RIE) wurde anschließend nacheinander das Nitrid auf beiden Waferseiten an jenen Stellen entfernt, welche nicht mehr mit Fotolack bedeckt waren. Nach dem RIE-Prozessschritt wurde der übrige Fotolack mithilfe eines Lackentferners (Aceton) vom Wafer genommen. Über ein nasschemisches Ätzverfahren (KOH-Ätzen, d.h. Ätzen von Silizium in wässriger Kaliumhydroxidlaugung) wurde eine Kavität in das Silizium geätzt, wobei die Nitridschicht des Locharrays als Ätzstopp bzw. die großräumige Öffnung als Ätzmaske diente. Es resultierte ein für einen  $\langle 100 \rangle$  Siliziumwafer typischer Ätzwinkel der  $[100]$ -Ebene zur  $[111]$ -Ebene von  $54,7^\circ$ . Das Vereinzeln der Chips erfolgte durch Ansägen der fertig prozessierten Wafer auf 200  $\mu\text{m}$  Tiefe und anschließendes Brechen.

Die makroskopischen wie auch mikroskopischen Aufnahmen eines fertig prozessierten Wafers ohne SU-8 Begrenzungsstrukturen zeigten eine Einteilung des Wafers in vier Quadranten (Abb. 5.2).



**Abb. 5.2** Darstellung eines fertig prozessierten Wafers und Mikrolocharray-Chips ohne SU-8 Kavitäten.

(a) Abbildung eines fertig prozessierten 4 inch Wafers. Dieser ist in vier Quadranten mit unterschiedlichen Membran- und Array-Größen eingeteilt. Rasterelektronenmikroskopaufnahmen des (b) Übergangs zwischen der perforierten Membran und der Siliziumkavität (Maßbalken = 50  $\mu\text{m}$ ) und (c) eines Mikrolochs (Maßbalken = 2,5  $\mu\text{m}$ ).

Die Chips der unterschiedlichen Quadranten unterschieden sich in der Array-Größe und im Loch-Loch-Abstand (Pitch) und damit in der Membranlänge. Die einzelnen Quadranten auf dem Wafer untergliederten sich in 10 x 10, 20 x 20 Locharrays mit einem Pitch von 60 µm, sowie 35 x 35 Locharrays mit 40 µm und 60 µm Pitch. Dabei resultierten Membranlängen von 595, 1215, 1545 und 2135 µm. Der Lochdurchmesser betrug bei diesen Arrays 5 µm. Bei den 1 x 1 und 3 x 3 Arrays, welche in der elektrischen Sensoreinheit verwendet wurden, war die Kavitätenseite mit einer zusätzlichen Nitridschicht passiviert. Die resultierende Membrandicke ergab sich bei diesen Array-Größen zu 1,6 µm. Das Außenmaß der Chips mit einer 5 mm Membran lag nach der Vereinzelung bei (8,8 mm)<sup>2</sup> die übrigen Chips hatten Außenabmessungen von (4,4 mm)<sup>2</sup>. In Tabelle 4 sind die Parameter der in dieser Arbeit verwendeten Mikrolocharray-Chips angeführt.

**Tabelle 4 Auflistung der Dimensionen der verwendeten Mikrolocharray-Chips.**

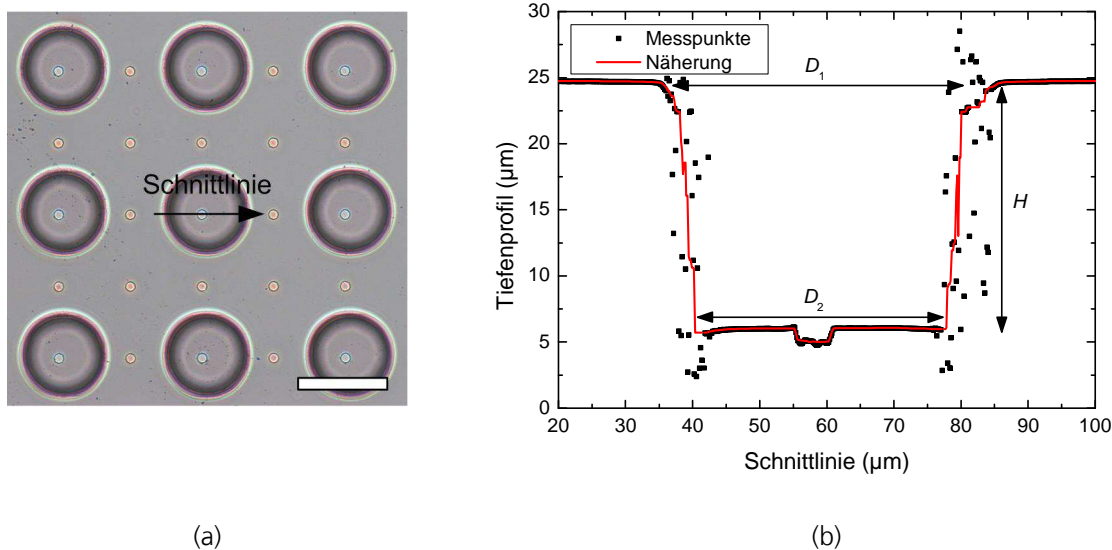
Parameter, wie die Dicke des Wafers ( $d_{\text{Wafer}}$ ), die Membranlänge ( $l_{\text{Membran}}$ ), die Membrandicke ( $d_{\text{Membran}}$ ) und der Lochradius ( $r_{\text{Loch}}$ ) sowie der Pitch sind darin aufgelistet. Eingerahmt sind die Array-Größen, welche der Wafer in Abb. 5.2a beinhaltet.

Lochanzahl	$d_{\text{Wafer}}$ (µm)	$l_{\text{Membran}}$ (µm)	$d_{\text{Membran}}$ (nm)	$r_{\text{Loch}}$ (µm)	Pitch (µm)
1 x 1	500 ± 5	50 ± 7	870, 1600	2,5	-
1 x 1	500 ± 5	100 ± 7	870, 1600	2,5	-
3 x 3	500 ± 5	150 ± 7	870, 1600	2,5	40
10 x 10	300 ± 5	595 ± 7	870	2,5	60
20 x 20	300 ± 5	1215 ± 7	870	2,5	60
35 x 35	300 ± 5	1545 ± 7	870	2,5	40
35 x 35	300 ± 5	2135 ± 7	870	2,5	60
265 x 265	500 ± 5	5000 ± 7	870	1	15
400 x 400	500 ± 5	5000 ± 7	870	1	10

Sollbruchstellen (nicht im Prozessablauf in Abb. 5.1 dargestellt) sind für eine Chipvariante um die Mikrolöcher des 1 x 1 und 3 x 3 Arrays gelegt worden. Die Perforationsgräben um die Sauglöcher wurden durch einen weiteren RIE-Prozess in die 870 nm dicke Nitridschicht (ca. 500 nm tief) geätzt, wobei die Tiefe durch die Ätzzeit eingestellt wurde. Mit diesen Chips sollte geprüft werden, ob durch gezieltes Ausüben eines Drucks innerhalb der Sollbruchstelle Teilstücke aus der Chipmembran herausgelöst werden können, ohne die restliche Membran zu beschädigen. Dieses Vorgehen sollte dazu genutzt werden, adhärent wachsende Zellen auf den Mikrolöchern aus der Nitridmembran zu lösen und somit aus dem System transportieren zu können (s. Anhang Abb. A.6).

Zur Realisierung von Begrenzungsstrukturen auf der Membran wurde in einem zusätzlichen Prozessschritt (8\* in Abb. 5.1) eine 20 µm dicke SU-8 Schicht (Negativlack) auf die

bereits mit Mikrolöchern versehene Siliziumnitridmembran aufgeschleudert und fotolithografisch strukturiert. In Abb. 5.3 ist neben einer mikroskopischen Aufnahme einer Lochmembran mit aufgesetzten SU-8 Kavitäten auch ein Tiefenprofil dargestellt. Der Chipausschnitt zeigt, dass nur jedes zweite Loch eine SU-8 Kavität besitzt (Abb. 5.3a). Dies war dem Mangel an Platz geschuldet, da die Lochmaske aus Kostengründen nicht verändert wurde.



**Abb. 5.3 Darstellung eines Locharrayausschnitts mit SU-8 Kavitäten sowie eines Tiefenprofils entlang einer vorgegebenen Schnittlinie.**

(a) Mikroskopbild eines Ausschnitts der Chipmembran mit SU-8 Kavitäten (Maßbalken = 50 µm). (b) Tiefenprofil entlang der Schnittlinie aus a). Die Messpunkte der mittels eines Oberflächenprofilometers der Firma NanoFocus durchgeführten Messung sind durch die Symbole, die Mittelung der Messpunkte durch die durchgezogene Linie dargestellt. Die Durchmesser  $D_1$ ,  $D_2$  und die Höhe  $H$  haben die Werte 43,2 µm, 36,6 µm und 18,6 µm.

In dem Tiefenprofil, welches mittels eines Oberflächenprofilometers der Firma NanoFocus aufgenommen wurde (Abb. 5.3b), ist eine Verjüngung des Kavitätendurchmessers von 43,2 µm auf 36,6 µm auf einer Höhe von 18,6 µm erkennbar. Zusätzlich war eine leichte Dejustage aus der zentralen Position des Mikrolochs zu der SU-8 Kavität auszumachen. Die optimalen Dimensionen der SU-8 Kavitäten (Maskendimensionen) sind in Tabelle 5 bezüglich der Array-Größen dargestellt. Der Vergleich der Oberflächenprofilometermessung (Abb. 5.3) mit der Soll-Dimensionierung aus Tabelle 5 zeigte, dass die tatsächlichen Chipabmessungen geringfügig von den Sollwerten abwichen. Es ergaben sich ein Höhenverlust von 1,4 µm und eine maximale Verringerung des Kavitätendurchmessers von 3,4 µm.

Da die aufgebauten Chips in einer Fluidik eingesetzt werden, muss die Benetzbarkeit untersucht werden. In früheren Studien wurde gezeigt, dass die Benetzbarkeit der Siliziumnitridmembran durch ein Sauerstoffplasma verbessert werden konnte (Frank, 2005). Ohne Sauerstoffplasma wurde ein Kontaktwinkel zwischen einem flüssigen Medium (Wasser) und der Membran von  $60^\circ$  gemessen, nach einer Aktivierung verringerte sich der Winkel auf  $6^\circ$ .

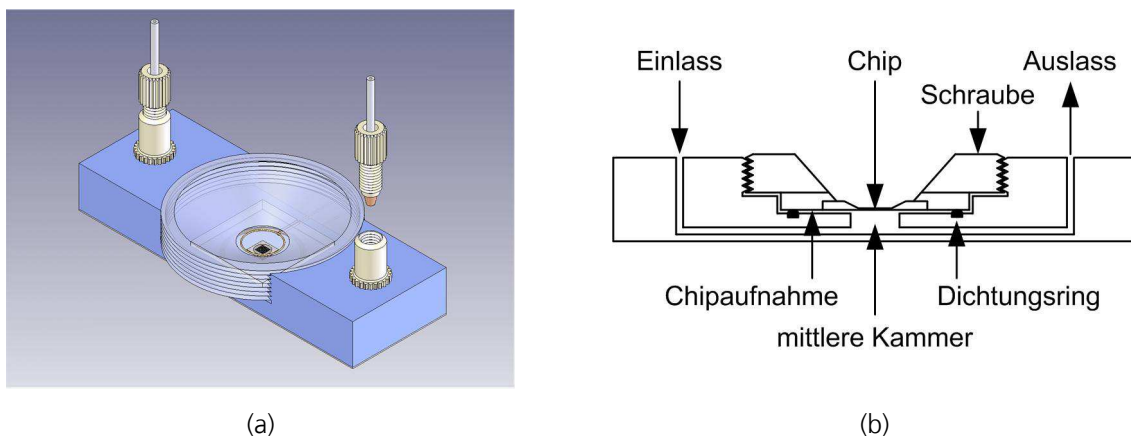
**Tabelle 5 Auflistung der Soll-Dimensionen der SU-8 Kavitäten.**

Aufgelistet sind der Radius der SU-8 Kavität  $r_{\text{Kavität}}$ , die Dicke der SU-8 Schicht  $d_{\text{SU-8}}$  sowie der Pitch der Kavitäten und der Löcher.

Array-Größe	Lochpitch ( $\mu\text{m}$ )	Kavitätenpitch ( $\mu\text{m}$ )	$d_{\text{SU-8}}$ ( $\mu\text{m}$ )	$r_{\text{Kavität}}$ ( $\mu\text{m}$ )
10 x 10	60	120	20	30
20 x 20	60	120	20	30
35 x 35	40	80	20	25
35 x 35	60	120	20	30

### Fluidikadapter

Der entwickelte Fluidikadapter wurde aus Makrolon gefertigt und bestand aus drei separaten Teilen: dem Adapterkörper, der Verschluss-Schraube und der Chipaufnahme (Abb. 5.4).



**Abb. 5.4 Adapter für die Schnittstelle zwischen Fluidik und Chip.**

(a) CAD-Zeichnung des entwickelten Adapters für die Ankopplung des Unterdrucksystems an den Array-Chip. (b) Längsschnitt durch den aufgebauten Adapter. Der Array-Chip wird in die Chipaufnahme mittels eines Silikonklebers eingebracht und über die Schraube auf den Dichtungsring gedrückt. Nach Kurz et al. (Kurz, 2011c).

Die Vorteile von Makrolon sind, dass es biokompatibel, optisch transparent und autoklavierbar ist und in Kontakt mit 70 %-igem Ethanol und Lösungsmittel keine Materialver-

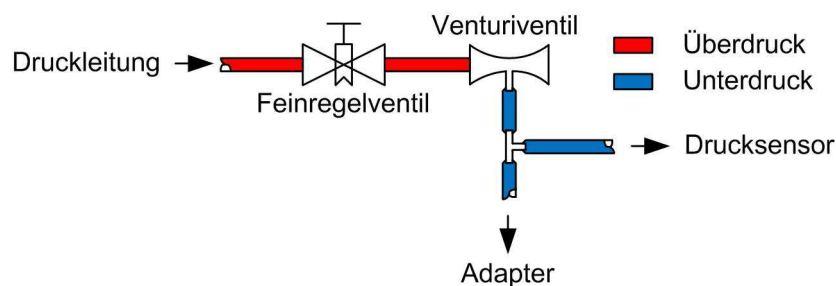
änderung zeigt. Die Einzelteile des Adapters wurden feinmechanisch hergestellt. Der in den Adapterkörper gefräste Fluidikkanal war nach unten hin offen und wurde mithilfe eines Objektträgers gedeckelt. Nach der Deckelung ergab sich ein Arbeitsabstand für die inverse Mikroskopie von 2,3 mm. Dieser Abstand entsprach der Distanz zwischen Chipmembran und Adapterunterseite. Für die Anschlüsse an Ein- und Auslass des Adapters wurden Upchurch Nanoports angebracht und aufgeklebt. In die Chipaufnahme wurde der verwendete Array-Chip mittels Silikonkleber eingeklebt und mithilfe der Verschluss-Schraube auf den unten liegenden Dichtungsring gepresst. Dadurch, dass die Drehbewegung auf die Chipaufnahme und nicht auf den Chip ausgeübt wurde, war weitestgehend verhindert, dass Zug- bzw. Druckspannung direkt auf die Chipmembran wirkten. Somit wurde eine mechanische Membranbeschädigung beim Zusammenbringen der Einzelteile vermieden. Das Fluidiksystem war oberhalb des Chips offen. Aufgrund der konischen Form konnten eine Befüllung, eine Zellentnahme bzw. eine nachträgliche Färbung der Zellen einfach durchgeführt werden.

Für die Befüllung des Systems mit flüssigem Medium wurden an Ein- und Auslass Schließventile mit nachgeschalteter Handregelpumpe angebracht, die Chipaufnahme und die Schraube wurden entfernt und das flüssige Medium in die resultierende Vertiefung pipettiert. Mit den Handregelpumpen wurde ein Unterdruck generiert und Medium luftblasenfrei in den Ein- und Auslasskanal gefördert. Der Vorteil des Befüllens mittels Unterdruck an Ein- und Ausgang des Adapters war, dass Partikel, welche sich möglicherweise in den Schläuchen oder Anschlüssen befanden, nicht in den Adapter gespült sondern in Richtung der Handregelpumpen befördert wurden. Die Schließventile sind nach erfolgreichem Befüllen geschlossen und die Handregelpumpen entfernt worden. Die Vertiefung (mittlere Kammer) wurde wiederum mit Medium geflutet, die Chipaufnahme mit integriertem Chip eingesetzt und mittels der Verschluss-Schraube fluidisch dicht verschlossen.

### **Unterdrucksystem**

Für die Realisierung des konstanten Unterdrucks diente Druckluft aus einer Standarddruckleitung, welche mittels einer Venturidüse in einen Unterdruck transferiert worden ist (Abb. 5.5). Der Überdruck von 1000 hPa konnte durch das Niederdruckregelventil (Feinregelventil) in einer feinen Auflösung variiert werden. Dabei wurde der fein eingestellte Überdruck über eine Vakuumsaugdüse geleitet, wobei der Überdruck in einen

Saugdruck gewandelt worden ist. Der Unterdruck wurde zum einen an die Fluidik angekoppelt, zum anderen mittels eines Drucksensors überwacht. Der Ausgang des Drucksensors (112LP10D-PCB) lieferte dabei eine Spannung, welche proportional zum anliegenden Druck war. Für eine computergestützte Überwachung und Dokumentation des Drucks wurde die Spannung mit einer A/D-Karte digitalisiert und in einen Computer eingespeist. Das digitale Signal wurde über ein in der LabView Entwicklungsumgebung geschriebenes Computerprogramm in den anliegenden Unterdruck umgerechnet, aufgezeichnet und grafisch ausgegeben. Das Blockdiagramm der entwickelten Software ist im Anhang dargestellt (Abb. A.4).



**Abb. 5.5 Schematischer Aufbau des Unterdrucksystems zur Zellpositionierung.**

Der Überdruck der Standarddruckluftleitung wird über einen Druckminderer auf ca. 1000 hPa vorgeregelt, durch ein Feinregelventil in minimalen Schritten eingestellt und durch ein Venturiventil in einen Saugdruck transferiert und an den Adapter sowie zur Echtzeitüberwachung an einen Drucksensor angekoppelt.

### Positionier- und Klonierprozess

Für die Zelleselektion wurden die Zellen in einem ersten Schritt hydrodynamisch auf dem Chip räumlich separiert. Bei dieser hydrodynamischen Positionierungstechnik waren das nutzbare Druckfenster zur nicht-invasiven Zellvereinzelung, die maximale Vereinzelungseffizienz und die optimale Zellzugabe wichtige zu untersuchende Systemparameter.

Das Druckfenster sollte so gewählt werden, dass eine Positionierung möglich war aber Zellen nicht durch den Positionierungsdruck geschädigt bzw. durch die Löcher gesaugt wurden. Für die Experimente wurden  $5 \times 10^4$  CHO-Zellen in 600  $\mu\text{l}$  Volumen auf den Array-Chip appliziert, die Zellen bei unterschiedlichen Druckdifferenzen über der Membran (5, 7, 12, 20 hPa) auf dem Chip separiert und überschüssige Zellen, welche sich durch Sedimentation auf der Membran zwischen den Löchern abgesetzt hatten, weggespült. Dazu ist das Volumen über dem Chip mehrfach abgenommen und durch frisches Medium ersetzt worden. Die möglichen auftretenden Schädigungen während der Posi-

tionierung waren an der Zellmembran zu erwarten. Um eine mögliche Zellmembranschädigung beim Positioniervorgang festzustellen, wurde zur Bestimmung der Zellmortalität 5 µl Propidiumiodid (PI) der Stammlösung (2 mg ml<sup>-1</sup> PI in destilliertem Wasser) auf die Probe appliziert und für 1 min inkubiert. Der fluoreszierende DNA-Farbstoff PI kann nur in Zellen mit einer geschädigten Zellmembran eindringen und in die DNA interkalieren. Damit fluoreszieren Zellen mit geschädigter Membran rot (roter Zellkern). Daraufhin wurde die Zahl der toten Zellen auf den Positionierungsstellen anhand des roten Fluoreszenzsignals manuell gezählt und die Zellmortalität berechnet, nach:

$$\text{Zellmortalität [\%]} = \frac{\text{Anzahl der toten Zellen auf den Positionierungsstellen}}{\text{Gesamtzahl der Zellen auf den Positionierungsstellen}} \times 100 \quad (5-1)$$

Die Vereinzlungseffizienz auf der Chipoberfläche ist ein Maß für die maximale Anzahl an möglichen Zellklonen und wird durch die Zahl der Mehrfachbelegungen und Fehlstellen auf dem Array dezimiert. Mehrfachbelegungen klassifizierten dabei Positionierungsstellen, welche mit mehr als einer Zelle belegt sind, Fehlstellen kennzeichneten unbelegte Positionen. Die Vereinzlungseffizienz berechnet sich nach:

$$E_{\text{Vereinzlung}} [\%] = \frac{\text{Positionierungsstellen} - \text{Mehrfachbelegungen} - \text{Fehlstellen}}{\text{Positionierungsstellen}} \times 100 \quad (5-2)$$

Für die Bestimmung der maximalen Vereinzlungseffizienz wurden 1) die applizierte CHO-Zellzahl variiert und keine Spülschritte vorgenommen und 2) eine wesentlich größere CHO-Zellzahl als Positioniermöglichkeiten appliziert und Spülschritte nachgeschaltet. Für 1) wurden unterschiedlich viele Zellen (150, 450, 1000, 1400, 2100, 2900, 7200, 1,4 x 10<sup>4</sup> Zellen jeweils in 600 µl Kulturmedium) auf den Chip appliziert, manuell resuspendiert, um eine homogene Zellverteilung zu erzielen, und bei einem Druckgradienten von 2,5 hPa über der Chipmembran auf den Löchern eingefangen. Dazu wurde der Druckgradient für 1 min angelegt, die Zellen in diesem Zeitraum positioniert, eine mikroskopische Rasterung der gesamten Membran vorgenommen und die belegten Löcher sowie die Mehrfachbelegungen manuell gezählt. Aus diesen Messreihen konnte neben der Vereinzlungseffizienz auch die optimale Zellzugabe ermittelt werden. Die optimale Zellzugabe beschreibt den Wert an applizierten Zellen, der minimal notwendig ist, um die maximale Vereinzlungseffizienz zu erreichen. Für 2) wurden 5 x 10<sup>4</sup> Zellen in 600 µl Kulturmedium auf den Array-Chip appliziert und eine manuelle Resuspension des Flüssigkeitsvolumens vorgenommen. Nach dem Positioniervorgang erfolgte ein Spülprozess bei dem Zellen, welche sich durch Sedimentation auf der Membran zwi-

schen den Löchern abgesetzt hatten, entfernt wurden. Dazu wurde das Volumen über dem Chip mehrfach abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Anschließend wurde die Vereinzelungseffizienz durch manuelles Auszählen ermittelt.

Nach dem Vereinzeln ließen sich die auf dem Chip abgelegten Zellen mittels des Mikroskops analysieren und charakterisieren. Identifizierte Zellen konnten anschließend mit Hilfe des Mikromanipulators und der Mikrokapillare, die über eine Kapillarenhalterung mit einer Präzisionsölpumpe verbunden war, vom Locharray-Chip genommen werden. Zu Beginn wurde die Kapillarenspitze in die Fokusebene des Mikroskops gebracht und der Mikromanipulator daraufhin nur noch in z-Richtung bewegt. Die Bewegung in x- und y-Richtung erfolgte über einen motorisierten Mikroskoptisch. Vor der Zellentnahme wurde die Mikrokapillare in zellfreies Medium getaucht und mit Medium befüllt. Dies war notwendig, um der Kapillarkraft beim Eintauchen der unbefüllten Kapillare und damit einer eventuellen unspezifischen Zellentnahme entgegenzuwirken. Der Positionierungsdruck war bei der Zellentnahme stets an der Chiprückseite angelegt, da ohne anliegenden Positionierungsdruck vermehrt Zellen, die auf Nachbarlöchern positioniert waren, zusätzlich zur Zielzelle in die Kapillare aufgenommen wurden. Für die Entnahme wurden die Zellen komplett in die Kapillare eingesaugt und die korrekte Entnahme optisch überwacht. Die entnommenen Zellen wurden in U-förmige 96-Lochplatten überführt, welche mit 50 µl Kulturmedium pro Kavität befüllt waren. Die U-Form wurde gewählt, um die optische Detektion der Suspensionszellen zu erleichtern. Bei der Expansion der Zellklone wurde das Mediumvolumen der Kavitäten der 96-Lochplatte nach folgendem Schema auf 200 µl aufgefüllt:

- Zugabe von 50 µl Kulturmedium nach 6 Tagen Inkubation
- Zugabe von 50 µl Kulturmedium nach weiteren 5 Tagen Inkubation
- Zugabe von 50 µl Kulturmedium nach weiteren 4 Tagen Inkubation

Danach wurden die Zellklone in 24-Lochplatten überführt und weiterkultiviert. 6 Tage nach der Isolierung erfolgte die Ermittlung der Klonierungseffizienz nach:

$$E_{\text{Klonierung}} [\%] = \frac{\text{gesamte isolierte Klone} - \text{tote Klone}}{\text{gesamte isolierte Klone}} \times 100 \quad (5-3)$$

Während der gesamten Zellisolation wurde die Inkubationseinheit um das Mikroskop auf 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 80 % relative Luftfeuchtigkeit eingestellt. Die Inkubationskammer wurde vor allen Experimenten desinfiziert. Zur Sterilisierung des Fluidikadapters



wurde dieser einen Tag vor der Durchführung des Experiments für ca. eine Stunde in 70 % Ethanol eingelegt und konnte anschließend unter der Sterilbank ausdampfen.

## **5.2.2. Zellkultur**

### **Zelllinien und Polymer/Polymer-DNA Komplex**

In dieser Arbeit wurden als adhärent wachsende Zellsysteme humane Arpe-19 Zellen (*arising retina pigment epithelial cells*, ATCC-Nr. CRL-2302) verwendet. Als Suspensionszellen dienten neben mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC), welche von Frau Dr. A. Germann aufgereinigt und tiefgefroren für diese Arbeiten bereitgestellt (Germann, 2011) wurden, auch ein Wildtyp der chinesischen Hamsterovarienzellen (*chinese hamster ovary*, CHO), heterogen transfizierte CHO-DG44 pTracer Zellen, sowie Antikörper-sekretierende 54K(1)-5 Hybridomzellen. Die transfizierte Zelllinie CHO-DG44 pTracer exprimiert das grün fluoreszierende Protein (GFP). CHO-Zellen sind die am häufigsten genutzten Zellen in der biotechnologischen Produktion von Wirkstoffen. Dabei stammen alle immortalisierten CHO-Zelllinien von einem einzigen chinesischen Zwerghamster ab (Puck, 1957;1958a; Puck, 1958b; Tjio, 1958). Die Hybridomzelllinie 54K(1)-5 produziert den murinen, monoklonalen Antikörper mAk54K. Dieser bindet an das Antigen der 54K Replikase des Tabak Mosaikvirus. Hybridomzelllinien werden durch die Fusionierung aus Antikörper-produzierenden B-Zellen mit Myelomzellen gewonnen. Dadurch entsteht eine immortalisierte Zelllinie mit Antikörperproduktion. Diese beiden Zelllinien wurden von Frau K. Hauten und Herrn Prof. Dr. S. Schillberg (Fraunhofer IME) bereitgestellt.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Polymere bzw. Polymer-DNA Komplexe, zur Induktion von Zellmembranänderungen, wurden von Frau Dr. V. Toncheva und Herrn Prof. Dr. P. Dubruel (PBM Universität Gent) zur Verfügung gestellt. Polymere werden heutzutage vermehrt als nicht-virale DNA-Vehikel eingesetzt.

### **Zellkultivierung**

Alle Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank kultiviert.

### *Subkultivierung/Passagieren adhärenter Zellen*

Um ein kontinuierliches Wachstum der verwendeten Zelllinien in-vitro zu garantieren, musste das Kulturmedium in regelmäßigen Abständen erneuert werden. Für die adhärenth wachsenden Arpe-19 Zellen dienten T-25 Flaschen mit Wachstumsflächen von 25 cm<sup>2</sup> als Kulturgefäße. Nach Erreichen einer etwa 90 %-igen Konfluenz, d. h. etwa 90 % der möglichen Wachstumsfläche war durch den Zellrasen bedeckt, wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde der Zellrasen zunächst mit 5 ml PBS gewaschen, und danach mit 1 ml Trypsin/EDTA (0,05 %) für 3 min bei 37 °C inkubiert. Trypsin/EDTA ist ein Verdauungsenzym, welches die auf der Zelloberfläche befindlichen Proteine, somit auch die Adhäsionsproteine, spaltet. Die Zellen wurden anschließend durch ein shake-off von der Wachstumsfläche gelöst und mit 5 ml Zellkulturmedium von der Wachstumsfläche abgespült. Die Zugabe des Zellkulturmediums inhibiert die Wirkung des Trypsins. Die erhaltene Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt, bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das gewonnene Zellpellet in 2 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:30 in einer neuen T-25 Kulturflasche in 5 ml Medium ausplattiert. Drei Tage nach der Passage erfolgte ein Mediumwechsel.

### *Subkultivierung von Suspensionszellen*

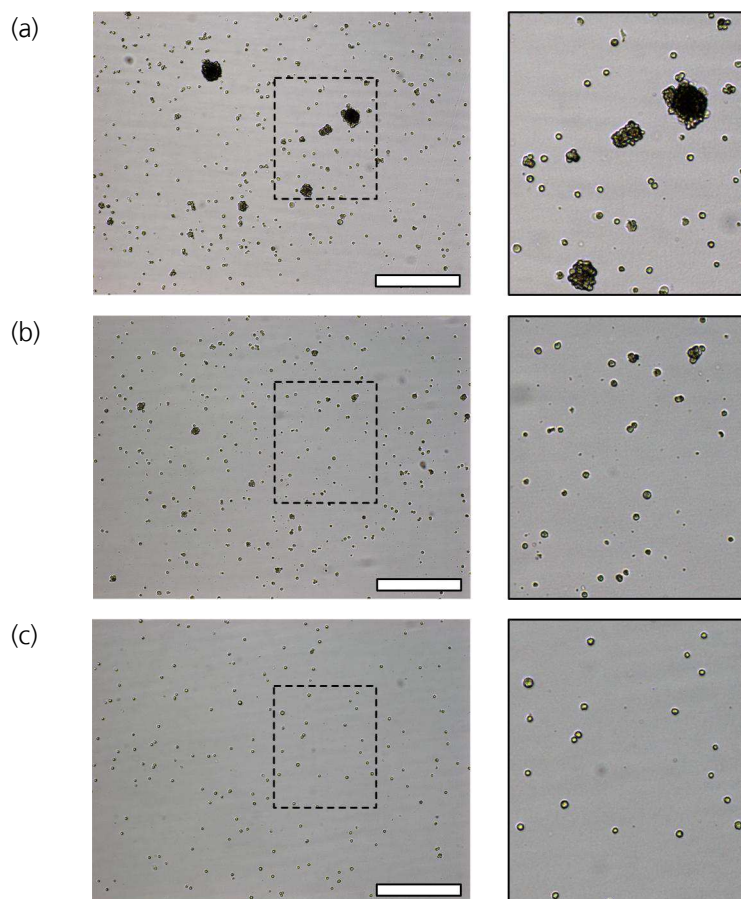
Als Kulturflaschen dienten bei den Suspensionszelllinien, CHO- und Hybridomzellen, jeweils T-25 Flaschen, mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup>. Suspensionszellen haben nicht die Fähigkeit an einer Oberfläche anzuwachsen, wodurch die Menge der Zellen in Suspension und nicht die Ermittlung der Konfluenz für den Zeitpunkt der Passage diente.

CHO-Zellen zeigten eine starke Agglomeration. Deshalb wurde die gesamte Zellsuspension der T-25 Flasche zunächst mithilfe eines Zellsiebs mit Porengröße 40 µm filtriert. Die Hybridomzelllinie zeigte hingegen nur eine geringe Zellagglomeration, daher konnte das Filtrieren entfallen. Die Zellsuspensionen der beiden Zelllinien wurden bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml frischem Medium resuspendiert. Nach einer Zellzahlbestimmung wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in einer T-25 Flasche in 5 ml Medium aufgenommen. Nach 4 Tagen Inkubation wurden der Hybridom- und CHO-Zellkulturflasche 1 – 2 ml Zellsuspension entnommen und durch Zellkulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden 1-mal wöchentlich subkultiviert.

Die CHO-Zelllinie zeigte einen prozentualen Anteil an lebenden Zellen in der Kultur von ca. 94 %. Dieser Wert wurde mittels einer Tot-Färbung durch Zugabe von Propidiumiodid und einer Zählung in einer Neubauer-Zählkammer aus ungefähr 1600 Zellen ermittelt. Aus der Bestimmung der Zellmortalität mittels des CASY-TT Zellzählgeräts ergab sich ein Wert von ca. 98 %.

### Vorbereitung der Zellsuspension für die chipbasierte Vereinzelnung

Die verwendeten CHO-Suspensionszellen zeigten trotz der fehlenden Adhärenzproteine eine starke Zellagglomeration (Abb. 5.6). Für eine hohe Vereinzelnungseffizienz auf den Mikrolöchern war es notwendig Mehrfachbelegungen zu minimieren. Somit war es zwingend erforderlich, dass Zellen gut getrennt voneinander vorliegen und Zellagglomerationen möglichst komplett vermieden wurden.



**Abb. 5.6 Vergleich der beiden Vereinzelnungsmöglichkeiten zur Vermeidung von Zellagglomeraten in der Zellsuspension.**

(a) Mikroskopische Aufnahmen von CHO-Zellen, welche direkt der Kulturflasche entnommen wurden; Zellagglomerate sind deutlich sichtbar. (b) CHO-Zellen nach der Nutzung eines Zellsiebs mit Porengröße 40 µm. Die Anzahl der Agglomerate ist geringer und sehr große Agglomerate sind komplett verschwunden. (c) CHO-Zellen nach dem Filtern durch ein Zellsieb mit Porengröße 40 µm und nach Behandlung mit Trypsin/EDTA. Es sind nur noch vereinzelt sehr kleine Zellagglomerate zu erkennen. Außerdem zeigt der Vergleich der Bilder, dass mit zunehmenden Reinigungsschritten die Zellzahl rückläufig ist (Maßbalken = 500 µm).

Um eine möglichst perfekte Zellvereinzelnung für die Versuche zu erreichen, wurden die Zellen sowohl mit einem Zellsieb als auch mit Trypsin/EDTA behandelt. Nach einer Filtrierung mittels Zellsieb mit Porengröße von 40 µm waren nur noch geringfügige Agglomerate

rationen in der Suspension zu erkennen. Für die Behandlung mittels Trypsin/EDTA wurde die gesiebte Zellsuspension bei 1000 rpm für 1 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert, wiederum bei 1000 rpm für 1 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Trypsin/EDTA resuspendiert und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5 ml Zellkulturmedium hinzugegeben und resuspendiert und bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Der Vergleich der unterschiedlichen Methoden zeigte, dass die Zellsuspension nach der Filtrierung noch kleinere Zellagglomerate beinhaltete, welche jedoch nach der Behandlung mit Trypsin/EDTA fast komplett verschwunden waren. Jedoch wiesen gerade Zellagglomerationen sehr viele tote Zellen innerhalb der Zellansammlung auf. Dieser Nachweis wurde mittels Tot-Färbung erbracht. Wurde Trypsin/EDTA bei der Zellvereinzelung verwendet, verringerte sich der Anteil der Zellagglomerate jedoch bei einem erhöhten Anteil an toten Zellen in der Suspension und folglich auch auf den Mikrolöchern. Daher wurde für die nachfolgenden Experimente kein Trypsin/EDTA zum Auftrennen von Zellagglomeraten eingesetzt, sondern lediglich das Zellsieb benutzt. Durch die Nutzung des Zellsiebs werden sehr viele potentielle zelluläre Produktionssysteme verworfen. In künftigen Studien sollte nochmals die Möglichkeit Trypsin/EDTA als Vereinzelungsmethode einzusetzen, aufgegriffen werden, um nicht große Mengen an Biomasse ohne Charakterisierung zu verlieren.

### **Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometer**

Das Durchflusszytometer (FACS) wurde in dieser Arbeit verwendet, um die separierten CHO-Zellklone anhand ihrer GFP-Expression zu analysieren und der Ursprungskultur gegenüberzustellen. In der Suspensionskultur wurde bei den Subkultivierungen stets ein Teil der toten Zellen mitgeführt. Somit musste bei der durchflusszytometrischen Analyse zuerst die toten Zellen ausgegrenzt werden, um bei der Analyse der GFP-Expression nur lebende Zellen zu erfassen. Mittels einer Tot-Färbung konnte eine Trennung der toten von den lebenden Suspensionszellen erreicht werden. Für die Aufbereitung der Zellsuspension für die FACS Messung diente folgendes Protokoll:

Es wurden immer  $1 \times 10^6$  Zellen in einer Zellsuspension für die Analyse verwendet. Um die Zellen von dem Zellmedium zu reinigen, wurden diese zweimal abzentrifugiert (1000 rpm für 3 min), der Überstand abgesaugt und in 1 ml frischem PBS resuspendiert.

Danach wurden die Zellen mit  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  PI der Stammlösung für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unmittelbar vor der FACS Messung wurden die erhaltenen Proben mittels eines Vortex-Schüttlers nochmals resuspendiert. Die FACS Messung wurde solange durchgeführt bis sich im Zielbereich  $2 \times 10^4$  analysierte Zellen befanden.

### **Anpassen der Kulturmedien an die Zellklonierung**

Bei der Zellklonierung sind die Viabilität und die Generation der Zellklone sehr stark abhängig von dem verwendeten Medium (Itoh, 1995; Sanford, 1961; Zhu, 1993). Darum war die Optimierung des Klonierungsmediums bezüglich Wachstumsfaktoren, Botenstoffe und Nährstoffe ein wichtiger Schritt bei der Zellisolation. Eine Medienkonditionierung wurde vorgenommen, um die Mortalität der isolierten Zellen zu minimieren. Sowohl bei den CHO-Klonen als auch bei den Hybridom-Klonen dienten Medien mit einer 1-tägigen Konditionierung als Klonierungsmedium. Dabei ergab sich für die 1-tägige Medienkonditionierung eine  $72,4 \pm 3,7$  %-ige CHO-Klonierungseffizienz und eine  $67,9 \pm 12,0$  %-ige Hybridom-Klonierungseffizienz. Für das konditionierte Medium wurden  $4 \times 10^6$  Zellen in 10 ml frischem Zellkulturmedium angesetzt und für einen Tag inkubiert. Daraufhin wurde das Medium von den Zellen durch einen Spritzenvorsatzfilter gereinigt.

### **5.2.3. Impedanz**

Die Aufnahme der Impedanz über der Frequenz (Impedanzspektroskopie) kann dazu genutzt werden, um nicht-invasiv biologisches Gewebe und Zellsuspensionen zu untersuchen. Aufgrund der elektrischen Eigenschaften von Zellen, können je nach untersuchtem Frequenzbereich, Änderungen anderer Zellparameter erschlossen werden. Die Probe kann bei diesem Verfahren berührungslos kontaktiert werden (Impidjati, 2005). Dazu wird die Leitfähigkeit des flüssigen Mediums in den mikrofluidischen Kanälen genutzt, um den Stromfluss über die zu untersuchende Zellprobe zu führen und folglich das elektrische Verhalten der Probe auch ohne direkten Kontakt zur Elektrodenstruktur zu erfassen. Die Kombination von mikrofluidischen Kanälen mit integrierten Elektroden wie auch die Verwendung von Planarelektroden haben sich als geeignete Verfahren herausgestellt, um biologische Zellsysteme elektrisch zu charakterisieren (Giaever, 1984). Das Erfassen der Zell-Substrat-Interaktion (*electric cell-substrate impedance sensing*, ECIS) adhärent wachsender Zellen mittels Planarelektroden ist das Verfahren, welches am häufigsten in der einschlägigen Literatur beschrieben wird. Dabei wurde die Methode

eingesetzt, um die Zellmorphologie (Giaever, 1993), das Zellwachstum (Cho, 2008; Luong, 2001), den Zelltod (Arndt, 2004; Campbell, 2007), Zellbewegungen (Linderholm, 2006), Zytotoxizität (Xiao, 2002; Xiao, 2003) sowie die Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke (Treeratanapiboon, 2005) und die Zell-Substanz-Interaktion (Chanana, 2005) signaltechnisch zu erfassen. Des Weiteren wurden impedanzgestützte Systeme bei Untersuchungen wie der osteogenen, adipogenen und neuronalen Zelldifferenzierung für die dynamische Erfassung des Differenzierungszustands eingesetzt (Cho, 2009b; Hildebrandt, 2010; Park, 2011). In weiteren Ansätzen wurden Kapillar- und Kavitätensysteme angewandt, um 3-D Zellaggregate bzw. Einzelzellen elektrisch zu charakterisieren (Cheung, 2005; Kloss, 2008; Reiningger-Mack, 2002; Schade-Kampmann, 2008; Thielecke, 2001a;b).

### **Elektrische Erfassung der Zellvitalität**

Ein wichtiger Parameter für die Qualität eines Zellproduktionssystems, ist die Zellvitalität. Denn nur ein vitales Zellsystem kann ein Klonwachstum hervorrufen und später große Biomassen, wie sie in den Fermentern benutzt werden, erzeugen. Eine zerstörte Zellmembran stellt ein totes Zellsystem dar. In der Biologie wird als gängige Methode zur Detektion einer Membranschädigung die Lebend/Tot-Färbung angewandt, wobei häufig die fluoreszierenden Farbstoffe Propidiumiodid (PI) und Fluoresceindiacetat (FDA) eingesetzt werden (Jones, 1985). Dabei kann der fluoreszierende DNA-Farbstoff PI nur in Zellen mit einer geschädigten Zellmembran eindringen und in die DNA interkalieren. FDA wird hingegen von vitalen und metabolisch aktiven Zellen aufgenommen, die Acetatreste werden enzymatisch in lebenden Zellen abgespaltet, wobei das entstandene Fluorescein von intakten Zellmembranen zurückgehalten wird. Damit fluoreszieren Zellen mit intakter Zellmembran grün, Zellen mit geschädigter Membran hingegen rot (roter Zellkern).

Das elektrische Verhalten der Membran wird zum einen durch die Barrierefunktion der Doppellipidschicht zwischen zwei leitfähigen, flüssigen Medien, zum anderen durch das Auftreten aktiver Zellmembranänderungen (z. B. durch Ionenkanäle) beschrieben. Die Membrandoppelschicht kann demnach vereinfacht elektrisch als Kondensator mit parallelem Widerstand modelliert werden (Abb. 5.7) (McAdams, 1995). Eine genauere Beschreibung der kapazitiven Zellmembraneigenschaft kann durch ein konstantes Phasenelement vorgenommen werden, da sich am Übergang der Zellmembran zum flüssigen

Medium eine Phasengrenze ausbildet (Grimnes, 2000). Für den niederfrequenten Bereich (ca. 1 kHz) wird der spezifische Widerstand einer Membran bezogen auf die Einheitsfläche in der Literatur mit Werten von 1 bis  $10^4 \Omega \text{ cm}^{-2}$  angegeben (Adam, 1977; McAdams, 1995). Untersuchungen der Kapazität von elektrisch inaktiven Zellen ergaben Werte von 1 bis  $2 \mu\text{F cm}^{-2}$ , wobei ein stabiler Kapazitätswert zwischen 1 Hz bis 1 kHz zu erkennen war (Asami, 1990).

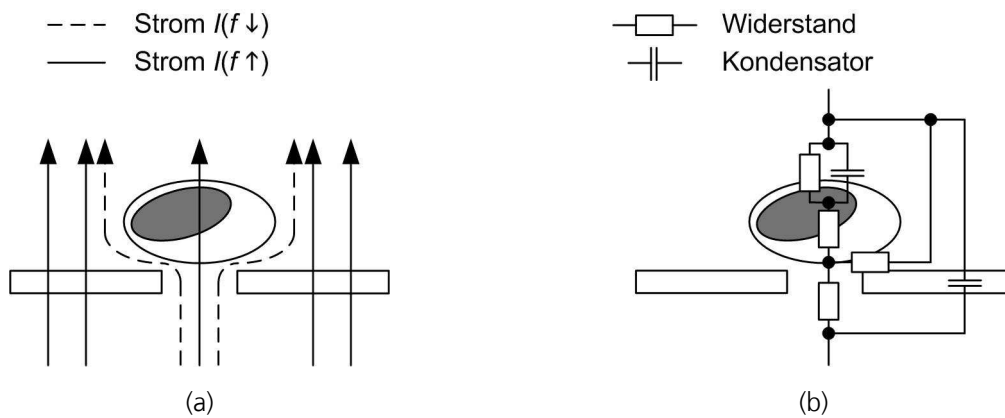
Für den Nachweis von Membranschädigungen hat Höber gezeigt, dass Membranlöcher Einfluss auf das elektrische Verhalten einer Zellsuspension haben können (Höber, 1910;1912;1913). Später untersuchte Asami Membranlöcher mithilfe numerischer Berechnungen (Asami, 2006). Wäre es möglich, Membranperforationen nicht-invasiv auch auf Einzelzellebene zu detektieren, so könnte die Zellvitalität vor der Zellselektion geprüft werden, um tote Zellsystem für den Klonierungsschritt bzw. von weiteren Analyse-schritten auszuschließen.

In dieser Arbeit wurde die Impedanzspektroskopie für die Ermittlung von Membranschädigungen verwendet. Zusätzlich wurden über Messungen und Berechnungen basierend auf der Finiten-Elemente Methode der Einfluss von Zellgrößenänderungen und das Adhäsionsverhalten auf die Impedanz untersucht. Starke Größenänderung von Zellen, welche beispielsweise während der Apoptose und Nekrose (Formen des Zelltods) auftreten, lassen auf eine verminderte Vitalität hindeuten. Auch das Ablösen adhärent wachsender Zellen vom Wachstumssubstrat ist ein Anzeichen einer Reduktion der Vitalität (Bakken, 1987; Chen, 1997).

Dazu wurde zunächst das elektrische Verhalten des aufgebauten Systems im Leerzustand vermessen. Für die Leermessung wurde der Fluidikadapter mit PBS befüllt, die verschiedenen Array-Größen (1 x 1, 3 x 3, 10 x 10, 20 x 20, 35 x 35 Löcher) eingesetzt und bei Raumtemperatur vermessen. Für eine Kalibrierung des Sensors zur Erfassung von Membranlöchern ist als Substanz Triton-X-100 verwendet worden. Die Applikation des Detergens Triton-X-100 auf Zellsysteme führte zu einer Desintegration der Lipid-Membran. Anschließend wurden Auswirkungen von Polymer- und Polymer-DNA-Komplexen, auf das Zellsystem untersucht. Polymere werden immer häufiger als DNA-Vehikel eingesetzt, um nicht-viral DNA in eine Wirtszelle einzuschleusen. Somit besitzen sie eine Membrangängigkeit und können folglich Membranänderungen auslösen.

Einzelzellen wurden für die Versuche auf dem Mikroloch immobilisiert und die Impedanz bei 1 kHz über der Zeit nach der Applikation erfasst (Abb. 5.7). Für das Einfangen der

Zellen auf dem Mikroloch wurde ein Druckgefälle von ungefähr 5 Pa verwendet. Dieser Unterdruck wurde nach dem Adhäsionsprozess auf 20 Pa vergrößert, um eine erhöhte Immobilisierung zu garantieren.



**Abb. 5.7 Stromlaufschema am Mikroloch mit positionierter Zelle.**

(a) Durch die elektrische Eigenschaft der Zellmembran und der Chipmembran kann der niederfrequente Strom  $I(f \downarrow)$  nur zwischen Zelle und Chipmembran fließen. Hochfrequenter Strom  $I(f \uparrow)$  kann die Chipmembran und Zellmembran passieren. (b) Das elektrische Ersatzschaltbild kann aus der Anordnung der Zelle auf dem Mikroloch abgeleitet werden.

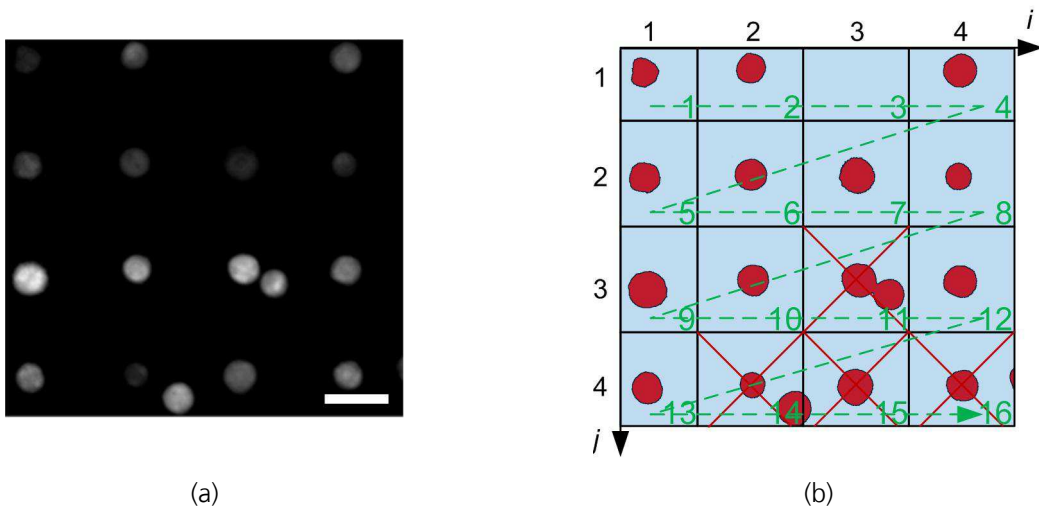
#### 5.2.4. Proteinquantifizierung

Für die Generierung eines zellulären Produktionssystems ist die Produktivität das entscheidendste Kriterium. Um Zellen mit hoch-produzierenden Eigenschaften aus der Ursprungskultur zu isolieren, muss die Produktivität jeder einzelnen Zelle ermittelt werden. Als Modell wurde eine Protein-exprimierende Zelllinie (CHO-DG44) verwendet, welche das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert. Die CHO-Zellen zeigten eine starke Heterogenität in der Proteinproduktion (GFP-Expression), was in der Intensität des Fluoreszenzsignals zu erkennen war. Über das Fluoreszenzsignal der einzelnen Zellen kann auf die Produktion, d. h. die Menge der pro Zeiteinheit und pro Zelle produzierten Proteine geschlossen werden.

Da GFP ein fluoreszierendes Protein ist und leicht mittels optischer Verfahren nachweisbar ist, wurde ein bildbasiertes Verfahren zur Proteinquantifizierung entwickelt. Eine Bildverarbeitungssoftware wurde in der Entwicklungsumgebung LabView erstellt (Abb. 5.8b und Abb. A.5). Als Ausgangsmaterial für den Softwarealgorithmus diente ein 8-bit konvertiertes Graustufenbild der Fluoreszenzaufnahme der positionierten CHO-Zellen (Abb. 5.8a).



Zunächst unterteilt die Software den Array in gleich große quadratische Matrixfelder, wobei sich im Zentrum die positionierte Zelle bzw. das Mikroloch befindet. Felder mit Mehrfachbelegungen werden automatisch erkannt und für die anschließende Quantifizierung der GFP-Expression ignoriert (in Abb. 5.8b durch Kreuze markiert). Die Entscheidung über eine Mehrfachbelegung wird zum einen durch die Zellgröße zum anderen durch die Anzahl der Zellen im Feld getroffen. Die Quantifizierung der GFP-Produktion wird anhand des 8-bit Graustufenbilds ermittelt. Dabei besitzt ein schwarzes Pixel einen Wert von 0 ein weißes Pixel einen Wert von 255 ( $2^8 - 1$ ). Folglich korreliert eine hohe Produktion des fluoreszierenden Proteins mit hellen Pixeln und somit mit großen Pixelwerten.



**Abb. 5.8** Entwickelte Software zur quantitativen Bestimmung der intrazellulären GFP-Expression der positionierten CHO-Zellen.

(a) 8-bit Graustufenbild des Fluoreszenzbilds der positionierten CHO-Zellen (Maßbalken = 25 µm). (b) Binärwertbild des Fluoreszenzbilds aus a), wobei der Array mit den positionierten Zellen in einzelne Felder unterteilt ist. Die Zellen bzw. Mikrolöcher befinden sich im Zentrum der einzelnen Felder. Mehrfachbelegungen eines Feldes sind durch Kreuze markiert. Die Positionsnummern (1 – 16) der Zellen auf dem Chip werden aufsteigend von links oben nach rechts unten im Array durchnummeriert.

Da die CHO-Zellen keine homogene Proteinverteilung im intrazellulären Bereich zeigten (s. Abb. 5.8a), war es für eine präzise Quantifizierung notwendig, die Produktion und folglich die Pixelwerte, über ein größeres Volumen zu integrieren. Darum wurde in dieser Arbeit eine Pixeladdition innerhalb der Matrixfelder ( $i,j$ ) durchgeführt, wodurch die komplette Zellfläche mitberücksichtigt und die Proteinproduktion nach der folgenden Summenformel quantifiziert wurde:

$$f_{\text{Zielprotein}}(i,j) = \sum_{x=\text{Pixel}} \sum_{y=\text{Pixel}} \text{Pixelwert}(x,y) \quad (5-4)$$

### **5.2.5. Antikörperquantifizierung**

Als weiteres Modell zur Bestimmung der Produktivität wurde eine Hybridomzelllinie (54K(1)-5 Hybridom) verwendet. Diese Zelllinie zeigte eine heterogene Antikörpersekretion. Um die hoch-produzierenden Zellen zu lokalisieren, war wiederum eine Betrachtung auf Einzelzellebene notwendig. Dabei war ein entscheidender Schritt die Antikörpersekretion den einzelnen Zellen zuweisen und quantifizieren zu können. Eine präzise Zuordnung der Antikörpersekretion bezüglich der sezernierenden Zellen konnte nur durch die Vermeidung von Kreuzkontaminationen erzielt werden. Dazu wurde der Einsatz von halbfesten Kulturmedien, zur Verringerung der Diffusionsstrecke des Sekrets, untersucht. Folglich musste für die spätere Isolation der Zielzellen das Klonierungswerkzeug auch eine Entnahme von Zellen aus halbfestem Kulturmedium zulassen.

### **Höherviskoses Medium**

Der Einsatz des höherviskosen Mediums unterstützt zum einen das Wachstum in Populationen, zum anderen werden die produzierten Antikörper in unmittelbarer Nähe zur Zellkolonie präzipitiert. Das Softagar für die Hybridomzellen wurde über Nacht im Kühlschrank komplett aufgetaut. Danach wurde das Gel einige Stunden bei Raumtemperatur gelagert und 1 % Penizillin/Streptomycin sowie 0,1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugegeben. Das Gesamtvolumen des Softagars wurde mit sterilem und destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt, aliquotiert und konnte daraufhin wieder eingefroren werden. Für den Nachweis der Antikörper wurden dem Softagar 100 Unit ml<sup>-1</sup> des antikörperbasierten Fluoreszenzerkennungsreagenz CloneDetect zugegeben, behutsam vermischt und vor direkter Lichteinstrahlung geschützt. Für das Arbeiten in einer Lochplatte wurden etwa 300 Zellen mit 2 ml Gel vermischt, wobei laut Herstellerempfehlung die zugegebene Zellsuspension 10 % des Gesamtvolumens nicht übersteigen soll. Damit war die Viskosität des Gels gewahrt und einzeln vorliegende Zellen waren nach dem Dispensieren des Softagars detektierbar. Etwa 2 ml Softagar wurden in eine Kavität einer 6-Lochplatte gegeben und für 5 – 14 Tage bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach dem Inkubationszeitraum konnten einzeln vorliegende Zellklone im Mikroskop detektiert werden. Die Diffusion des Zellsekrets wurde durch die höhere Viskosität des Mediums verringert, wodurch sich eine hohe Sekretichte um produzierende Zellpopulationen im Gel ergab. Das Sekret immobilisiert den spezifisch gegen das Sekret gerichteten fluoreszenzmarkierten Antikörper, wodurch sich ein fluoreszierender

Hof ergab. Um die Menge des Antikörpersekrets zu quantifizieren, wurde die Intensität des grünen Fluoreszenzsignals (die Menge des FITC-markierten Sekundärantikörpers) genutzt. Dazu diente ein Fluoreszenzbild, wobei der durchschnittliche Pixelwert ermittelt wurde:

$$\bar{f}_{\text{Zielprotein}}(i, j) = \frac{\sum_{x=\text{Pixel}} \sum_{y=\text{Pixel}} \text{Pixelwert}(x, y)}{\sum \text{Pixel}} \quad (5-5)$$

Zellen mit starkem Fluoreszenzhof weisen einen hohen gemittelten Pixelwert auf, was mit einer hohen Anreicherung des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers und damit einer großen Antikörperproduktivität korrelierte.

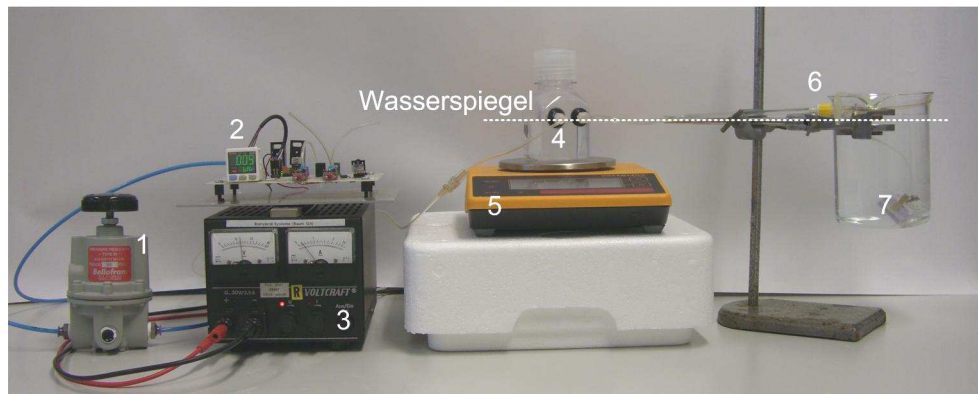
### 5.3. Experimentelle Aufbauten

#### 5.3.1. Hydrodynamische und elektrische Charakterisierung

##### **Aufbau zur Messung des hydrodynamischen Widerstands**

Der hydrodynamische Widerstand einer Fluidikzelle ist ein wichtiger Parameter, um die in dieser Arbeit abgeleiteten Parameter, wie z. B. den Positionierungsdruck, auf ähnliche Systeme übertragen zu können. In der einschlägigen Literatur wurde bislang nur der Druck oder der Volumenstrom bei der chipbasierten Zellvereinzelung angegeben, was eine Vergleichbarkeit unmöglich macht (Hosokawa, 2010; Thielecke, 1999).

Für die Ermittlung des hydrodynamischen Widerstands der Chip-Adaptereinheit (Abb. 5.4) wurde ein geschlossener Container mit zwei Anschlüssen versehen. Ein Anschluss wurde über einen Spritzenvorsatzfilter mit Porengröße 0,45 µm mit dem Chipadapter verbunden. Die andere Anschlussseite am Container wurde mit dem Drucksystem ohne Venturidüse verbunden (Abb. 5.5), wobei der Druck  $p_{\text{in}}$  mithilfe eines Sensors erfasst wurde (Abb. 5.9). Das Schlauchsystem vom Container zum Adapter wurde luftblasenfrei mit Wasser befüllt und der Container auf eine Waage gestellt. Der Füllstand des Becherglases mit Adapter wurde dem Füllstand des Containers angepasst. Der Startzeitpunkt für die Messung wurde erst nach einer bestimmten Gewichtsabnahme definiert. Somit war sichergestellt, dass sich das System in einem eingeschwungenen Zustand befand. Für die Messungen wurden Zeiten  $\Delta t$  notiert, nach denen eine bestimmte Gewichtsreduktion erzielt worden war. Mit diesen Messwerten wurde der Volumenstrom  $Q$  ermittelt. Damit konnte der hydrodynamische Widerstand der Chip-Adaptereinheit nach Gleichung (6-10) berechnet werden.



**Abb. 5.9 Messaufbau zur Ermittlung des hydrodynamischen Widerstands.**

Fotografische Darstellung des Messplatzes: 1 Feinregelventil, 2 Drucksensor, 3 DC-Spannungsquelle, 4 Container, 5 Waage, 6 Spritzenvorsatzfilter, 7 Becherglas mit Adapter.

### Ankopplung der elektrischen Signalerfassung an das System

Für die Impedanzankopplung an das Mikrolochchip-Adapter-System wurde der Adapter mit zwei Bohrungen mit einem Durchmesser von 0,6 mm versehen, durch welche Golddrähte gezogen, mit Silikonkleber befestigt und fluidisch dicht abgeschlossen wurden. Dabei befand sich eine Elektrode oberhalb, die andere unterhalb des Mikrolocharray-Chips. Zwischen Ober- und Unterseite des Lochchips wurde eine elektrische Spannung eingepreßt, so dass der resultierende elektrische Strom durch die Mikrolöcher geflossen war bzw. durch die kapazitive Eigenschaft der  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran beeinflusst wurde. Die beiden Golddrähte wurden über Koaxialkabel und Mikroklemmen mit einem Impedanz-Messplatz (Solartron 1260, 1294) verbunden. Bei allen Messungen wurde eine 2-Punkt-Messung durchgeführt. Bei einer 2-Punkt-Messung beeinflussen zusätzlich fest/flüssig Phasengrenzen an der Elektrode, Zuleitungswiderstände sowie Kontaktwiderstände die Messreihen.

## 6. Theorie

### 6.1. Impedanz

Die elektrische Impedanz ist über das Verhältnis des angelegten Stroms/der angelegten Spannung zur resultierenden Spannung/zum resultierenden Strom (Ursache-Wirkungs-Prinzip) im komplexen Raum definiert. Dabei sind der Strom  $I$  bzw. die Spannung  $U$  über den Amplitudenwert ( $|I|$ ,  $|U|$ ) und die Phasenverschiebung ( $\varphi_I$ ,  $\varphi_U$ ) komplett beschrieben. Es sei für den komplexen Strom:

$$I [A] = |I| \cdot \exp[j \cdot (\omega t + \varphi_I)] = |I| \cdot [\cos(\omega t + \varphi_I) + j \cdot \sin(\omega t + \varphi_I)] \quad (6-1)$$

und für die komplexe Spannung:

$$U [V] = |U| \cdot \exp[j \cdot (\omega t + \varphi_U)] = |U| \cdot [\cos(\omega t + \varphi_U) + j \cdot \sin(\omega t + \varphi_U)] \quad (6-2)$$

damit ergibt sich die Impedanz mit Gleichung (6-1) und (6-2) zu:

$$Z [\Omega] = \frac{U}{I} = \frac{|U| \cdot \exp[j \cdot (\omega t + \varphi_U)]}{|I| \cdot \exp[j \cdot (\omega t + \varphi_I)]} = \frac{|U|}{|I|} \cdot \exp[j \cdot (\varphi_U - \varphi_I)] = |Z| \cdot \exp(j \cdot \varphi_Z) \quad (6-3)$$

Dabei ist  $|Z|$  der Amplitudenwert,  $\varphi_Z$  der Phasengang der Impedanz  $Z$  und  $j = \sqrt{-1}$ . Aus der Impedanz biologischer Systeme können die Permittivität  $\varepsilon$  und die Leitfähigkeit  $\sigma$  ermittelt werden. Beide Größen werden im komplexen Raum dargestellt und sind gegeben durch (Grimnes, 2000):

$$\varepsilon [F m^{-1}] = \varepsilon' - j \cdot \varepsilon'' = (\varepsilon'_r - j \cdot \varepsilon''_r) \varepsilon_0 \quad (6-4)$$

$$\sigma [S m^{-1}] = \sigma' - j \cdot \sigma'' \quad (6-5)$$

Für biologische Systeme wurde die Frequenzabhängigkeit sowohl der Dielektrizitätskonstante als auch der Leitfähigkeit zum ersten Mal von Schwan dazu verwendet, um eine Einteilung des Frequenzspektrums in drei Bereiche vorzunehmen (Schwan, 1957). Diese wurden als Dispersionen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) bezeichnet und wurden für Muskelgewebe im Bereich um 100 Hz, 1 MHz und 10 GHz angesiedelt. Das Auftreten von Dispersionen ist gegeben durch den strukturellen Aufbau und die physikochemischen Eigenschaften an Grenzflächen von Zellen (Tabelle 6). Demnach muss je nach zu untersuchendem Zellparameter das entsprechende Frequenzband gewählt werden.

**Tabelle 6 Zuordnung der Dispersionen zu den jeweiligen Frequenzbereichen und die jeweils möglichen Ursachen (Grimnes, 2000; Schwan, 1957).**

Dispersion	Frequenzbereich	Ursache
$\alpha$	mHz – kHz	Gegenionen an der Zellmembran, Ionenkanäle, aktive Zellmembraneffekte
$\beta$	0,001 – 100 MHz	Zellmembrankapazität, Antwort auf Proteinmoleküle, Organellen
$\gamma$	0,1 – 100 GHz	Dipoleffekte

### Elektrodenimpedanz und Phasengrenzen

Da in der aufgebauten Sensoreinheit die Elektroden und die Chipmembran direkten Kontakt zum Zellkulturmedium haben, soll das elektrische Verhalten an einer solchen Grenzfläche diskutiert werden. Helmholtz (1879), Gouy-Chapman (1909 bzw. 1913)

und Stern (1924) haben die elektrochemischen Eigenschaften an Phasengrenzen untersucht und Modelle zum Beschreiben des Grenzverhaltens erstellt (Chapman, 1913; Gouy, 1910; von Helmholtz, 1879).

An Phasengrenzen zwischen Festkörpern mit fixierten Ladungsträgern werden Gegenionen aus der flüssigen, salzhaltigen Phase angezogen (Grahame, 1947). Diese kapazitive Schicht ist nach ihrem Entdecker Helmholtz benannt. Gouy und Chapman verwendeten die Poisson-Gleichung, um die Anziehung der Gegenionen an der Phasengrenze zu beschreiben und die Boltzman-Gleichung, um die Diffusion der Ladungsträger von Bereichen hoher Konzentration weg, darzustellen.

An der Grenzfläche zwischen einer Elektrode und einem Elektrolyten kann, bei einer eingepprägten Gleichspannung (DC-Spannung), zum einen bei geringen Spannungen eine reine Umladung durch die sich ausgebildete Kapazität ohne Ladungstransfer stattfinden, zum anderen, bei größeren Potentialen, eine irreversible Oberflächen-Redoxreaktion eintreten (Hofmann, 2009). Dabei werden die Ladungen der Ionen an den entsprechenden Elektroden ausgeglichen. Eine Elektrodenoberflächenkorrosion ist die Folge.

Das Verhalten der Phasengrenze gegenüber Wechselspannungen (AC-Spannungen) ist eine reine Adsorption und Desorption an der Elektrodenoberfläche (Hofmann, 2009). Dabei wird die Oberflächenladung verändert aber es findet kein Elektronenaustausch statt (Grimnes, 2000). Für die elektrische Modellierung des Fest/Flüssig-Phasenübergangs werden in der Regel fiktive Bauelemente in Betracht gezogen, wie das Warburg-Element oder konstante Phasen-Element (*constante phase element*, CPE), um das signalfrequenzabhängige Verhalten nachzubilden. Die Impedanz eines CPE ist durch folgenden Zusammenhang gegeben:

$$Z_{\text{CPE}} [\Omega] = \frac{1}{(j\omega)^n Q^\circ} \quad (6-6)$$

Strebt der Parameter  $n$  des CPE gegen eins, so ist das elektrische Verhalten eines solchen Elements gleich einer idealen Kapazität. Der Parameter  $Q^\circ$  trägt dabei die Dimension  $F s^{n-1}$ .

In dieser Arbeit wurden zur elektrischen Charakterisierung und Modellierung der Phasengrenze zwischen der  $\text{Si}_x\text{N}_y$ -Membran und der Elektrolytlösung sowie für die Elektrodenimpedanz jeweils konstante Phasenelemente verwendet.

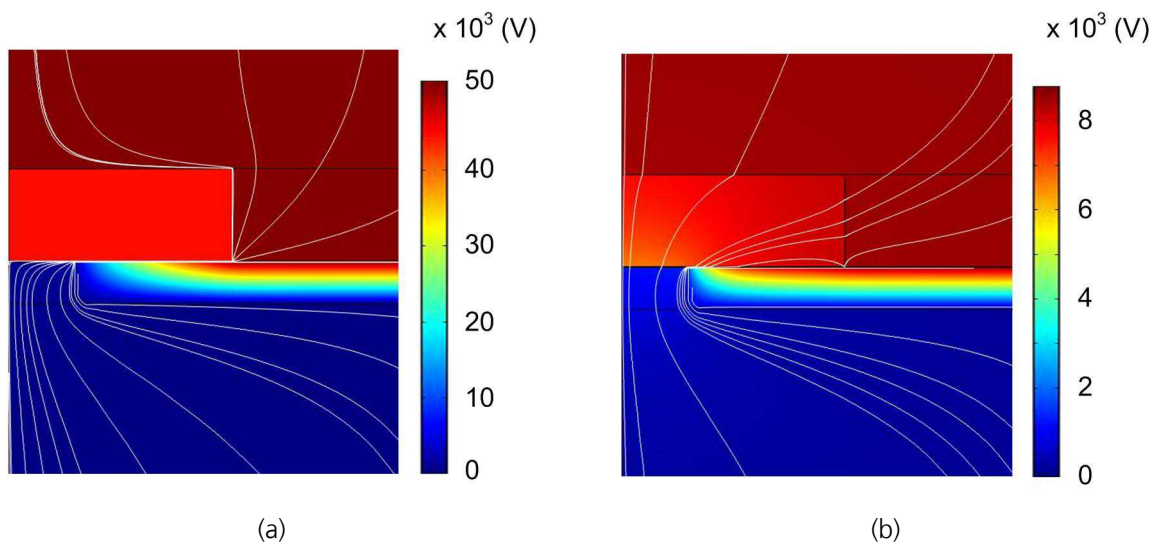


membran) ein lineares und isotropes Verhalten aufweisen. Somit besitzen die Leitfähigkeit  $\sigma$  und die relative Permittivität  $\epsilon_r$  skalare Werte. Die entsprechenden Werte wurden der Literatur entnommen und sind in Tabelle 7 angeführt.

**Tabelle 7 Elektrische Eigenschaften der Teilbereiche dargestellt in Abb. 6.1 für die numerische Berechnung. Nach Elshabini und Barlow, Grimnes und Martinsen, Malmivuo und Plonsey (Elshabini-Riad, 1998; Grimnes, 2000; Malmivuo, 1995).**

	Leitfähigkeit $\sigma$ ( $S\ m^{-1}$ )	rel. Permittivität $\epsilon_r$
Zellkulturmedium	1,6	80
Zytoplasma	0,5	80
Chipmembran ( $Si_xN_y$ )	$10^{-12}$	5,5
Zellmembran	$10^{-7}$	11,3

Trotz der starken Vereinfachungen kann die Ausbildung von Adhäsionsproteinen im Modell durch einen engeren Kontakt zum Substrat, und somit durch einen geringeren Substratabstand  $g$ , nachgestellt werden. Den Einfluss einer Zellgrößenänderung auf die Impedanz wird durch den Zellradius im FEM-Modell erfasst. Zusätzlich kann die Tauglichkeit des Mikrolochchips zur elektrischen Erfassung von Zellmembranänderungen anhand des Modells geprüft werden durch Änderung der Zellmembranleitfähigkeit (Abb. 6.2) sowie Zellmembranlöcher mit unterschiedlichen Radien (Abb. A.3).



**Abb. 6.2 Darstellung des Einflusses der Membranleitfähigkeit  $\sigma_{\text{Membran}}$  auf den Betrag der Impedanz.**

Der Zellradius entsprach bei der Simulation  $8,5\ \mu\text{m}$  und der Abstand der Zelle zum Chip war  $25\ \text{nm}$ . Die Impedanz wurde bei einer Frequenz von  $1\ \text{kHz}$  ausgewertet. Die Ausgabe der FEM-Simulation für die Leitfähigkeiten von  $1 \times 10^{-9}\ S\ m^{-1}$  ist in (a) für  $5 \times 10^{-4}\ S\ m^{-1}$  ist in (b) dargestellt. Die Oberflächenfärbung soll dabei den Verlauf des elektrischen Potentials und die Strömungslinien den Verlauf der Stromdichte darstellen.



Die numerische Berechnung basiert auf der Annahme, dass eine Stromdichte auftritt, wenn ein elektrisches Feld an einem dielektrischen Material anliegt (Harrington, 1961) und ist gegeben durch:

$$\nabla \vec{H} \text{ [A m}^{-2}] = \vec{J} = (\sigma + j \cdot \omega \epsilon_0 \epsilon_r) \vec{E} \quad (6-7)$$

Dabei ist  $\vec{J}$  die Stromdichte,  $\vec{H}$  das magnetische Feld,  $\vec{E}$  das elektrische Feld,  $\omega$  die Kreisfrequenz,  $\epsilon_0$  die Dielektrizitätskonstante des Vakuums und  $j = \sqrt{-1}$ . Basierend auf dem wechselseitigen Leitungsfeld ergibt sich eine allgemeingültige Formulierung für die Transferimpedanz  $Z_t$  zu (Grimnes, 2000):

$$Z_t \text{ [\Omega]} = \iiint_V \frac{1}{\sigma} (\vec{J}'_{cc} \cdot \vec{J}'_{reci}) dv \quad (6-8)$$

Dabei kennzeichnen  $\vec{J}'_{reci}$  das reziproke Stromdichtevektorfeld und  $\vec{J}'_{cc}$  das Anregungsstromdichtevektorfeld. Gleichung (6-8) vereinfacht sich für eine 2-Punkt-Messung, da bei einer solchen Konfiguration die Anregungsstromdichte sowie die reziproke Stromdichte identisch sind, zu:

$$Z \text{ [\Omega]} = \iiint_V \frac{1}{\sigma} |\vec{J}'|^2 dv \quad (6-9)$$

Dabei steht  $\vec{J}'$  [m<sup>-2</sup>] für das Einheitsstromdichtevektorfeld. Die Impedanz wurde in einem numerischen Verfahren mittels der Finite-Elemente-Methode (FEM) ermittelt, wobei als Simulationswerkzeug COMSOL Multiphysics (Version 4.2) verwendet wurde.

## 6.2. Hydrodynamischer Widerstand

Für das Positionieren der Zellen auf den Löchern wurde eine hydrodynamische Positioniertechnik verwendet. Um die Fluidodynamik des Systems zu beschreiben, wurde der hydrodynamische Widerstand über die Relation des anliegenden Druckgradienten  $\Delta p$  und des Volumenstroms  $Q$  für laminare Strömungen ermittelt (Beebe, 2002; Choi, 2010b; Grollius, 2008) sowie eine Bestimmung der Reynolds-Zahl vorgenommen.

$$R_h \text{ [Pa s m}^{-3}] = \Delta p / Q \quad (6-10)$$

Die Reynolds-Zahl gibt die Grenze zwischen einem turbulenten und laminaren Strömungsverhalten wieder. Die Reynolds-Zahl berechnet sich nach der folgenden Relation:

$$Re = \frac{\rho \cdot u \cdot D_{\text{Rohr}}}{\eta} \quad (6-11)$$

mit der dynamischen Viskosität  $\eta$ , der Dichte  $\rho$  dem inneren Durchmesser  $D_{\text{Rohr}}$  der Rohrleitung und der mittleren Strömungsgeschwindigkeit  $u$ . In hydraulisch glatten Röhren wird ab einer kritischen Reynolds-Zahl von 2300 von einem turbulenten Strömungsverhalten gesprochen. Bei der fluidischen Untersuchung von Mikrostrukturen liegt meist eine laminare Strömung vor, wobei der Übergang zwischen einer turbulenten zu einer laminaren Strömung bei Reynolds-Zahlen von 200 bis 700 beobachtet worden ist (Peng, 1995; Wu, 1984). Dabei wandert die Reynolds-Zahl mit abnehmender Kanalweite zu kleineren Werten (Peng, 1995).

Um das Verhalten des Arrays zu beschreiben, ergibt sich der gesamte hydrodynamische Widerstand  $R_{h,\text{ges}}$  aus der Parallelschaltung der einzelnen fluidischen Lochwiderstände:

$$R_{h,\text{ges}} [\text{Pa s m}^{-3}] \stackrel{\text{keine fluidische Beeinflussung der Löcher}}{=} \frac{1}{\sum_{i=1}^a \frac{1}{R_{i,h}}} \stackrel{\text{für gleich dimensionierte Löcher}}{=} \frac{R_h}{a} \quad (6-12)$$

Der Gesamtvolumenstrom  $Q_{\text{ges}}$  ergibt sich unter der Annahme einer laminaren Strömung mit Gleichung (6-10) und (6-12) zu:

$$Q_{\text{ges}} [\text{m}^3 \text{s}^{-1}] = \frac{\Delta p}{R_{h,\text{ges}}} = \frac{a}{R_h} \Delta p \quad (6-13)$$

Somit ergibt sich der Volumenstrom durch die einzelne Löcher mit (6-13) zu:

$$Q_i [\text{m}^3 \text{s}^{-1}] = \frac{Q_{\text{ges}}}{a} = \frac{\Delta p}{R_h} \quad (6-14)$$

Aus Gleichung (6-14) ist zu erkennen, dass der Volumenstrom durch ein Loch nicht von der Anzahl der Löcher eines Locharray-Chips abhängig ist, solange eine laminare Strömung zugrunde liegt und es keine fluidische Beeinflussung der Löcher untereinander gibt. Somit wird der erste Partikel bei konstant gehaltenem Unterdruck mit der gleichen Geschwindigkeit auf die Positionierungsstelle gezogen wie der letzte Partikel. Damit ist der Positionierungsdruck pro Partikel unabhängig von der Belegungsdichte.

Damit die Herleitung auch für das aufgebaute Chip-System zutreffend ist, muss die Annahme einer laminaren Strömung und einer fluidischen Unabhängigkeit der Löcher untereinander zutreffen. Deshalb wird das Strömungsverhalten durch numerische und analytische Berechnungen der Reynolds-Zahl in Kapitel 7 genauer untersucht und diskutiert.

## Numerische Berechnungen des hydrodynamischen Widerstands

Für die Beschreibung der Fluidodynamik wurde von einer inkompressiblen, homogenen Flüssigkeit ausgegangen. Damit ist die Dichte des Mediums ein konstantes Skalar und besitzt weder eine zeitliche noch räumliche Abhängigkeit (Becker, 1995).

$$\rho(x, y, z, t) \text{ [kg m}^{-3}\text{]} \stackrel{\text{inkompressibel}}{=} \rho(x, y, z) \stackrel{\text{homogen}}{=} \rho \quad (6-15)$$

Für die numerische Berechnung der Bewegung des inkompressiblen, homogenen, flüssigen Mediums wurde die allgemeine Navier-Stokes Gleichung und die Kontinuitätsgleichung verwendet. Die Navier-Stokes Gleichung und die Kontinuitätsgleichung, welche aus dem Gesetz der Massenerhaltung hervorgehen, lauten (Caffarelli, 1982; Ferziger, 2002):

$$\rho \left( \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + (\vec{u} \cdot \nabla) \vec{u} \right) - \Delta \vec{u} + \nabla p = \rho \vec{f}^a \quad (6-16)$$

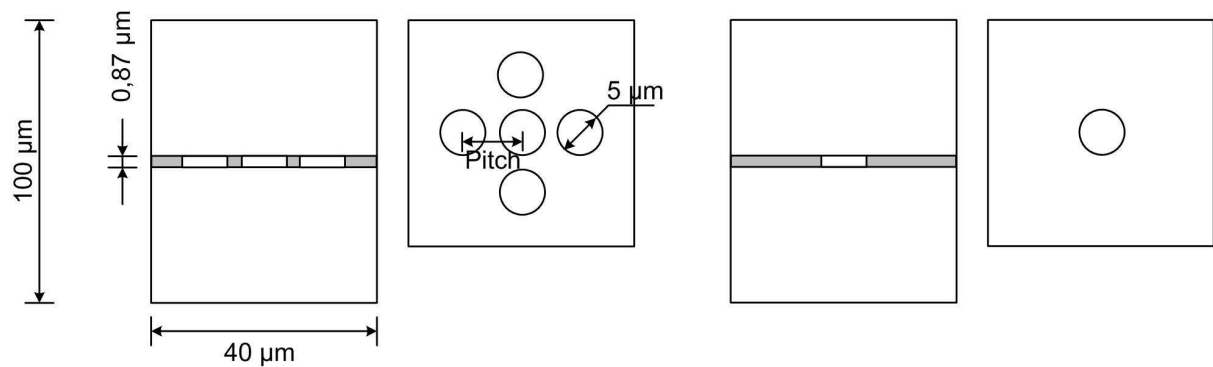
$$\text{div } \vec{u} = 0 \quad (6-17)$$

Dabei sind  $\vec{u}$  das Geschwindigkeitsfeld,  $\eta$  die dynamische Viskosität und  $\vec{f}^a$  die spezifisch von außen angreifende Kraft bezogen auf die Einheitsmasse.

Für die numerische Berechnung des hydrodynamischen Widerstands wurden die Gleichungen (6-16) und (6-17) angewandt. Dabei wurden die physikalischen Eigenschaften von Wasser bei einer Temperatur von 20 °C für die Berechnung herangezogen ( $\rho = 999,55 \text{ kg m}^{-3}$  und  $\eta = 0,001 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Die Nitridmembran des Locharray-Chips wurde zur Vereinfachung der Berechnung als steife, unflexible Membran modelliert (Abb. 6.3). Das Druckgefälle über der Membran wurde variiert und der Volumenstrom durch ein Loch (Abb. 6.4) über ein Flächenintegral berechnet, nach:

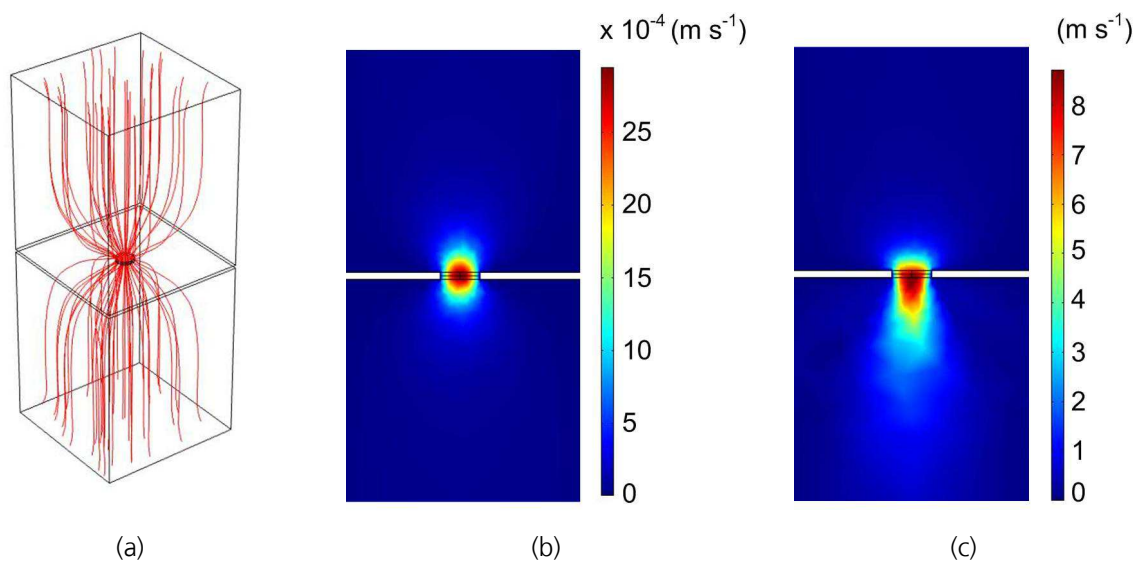
$$Q \text{ [m}^3 \text{ s}^{-1}\text{]} = \iint_A \vec{u} \cdot d\vec{a} \quad (6-18)$$

Das 5-Lochensemble wurde genutzt, um die fluidische Beeinflussung benachbarter Löcher abhängig vom Pitch zu untersuchen (Abb. 6.3).



**Abb. 6.3** Darstellung der Aufsicht und des Querschnitts für die Simulation eines 5-Lochensembles des Mikrolocharrays und eines 1 x 1 Mikrolocharrays (nicht maßstabsgetreu).

Für die Untersuchung der fluidischen Abhängigkeit der Löcher vom Pitch wurde zur Vereinfachung und zur Reduktion des numerischen Rechenaufwands nur die vier der zentralen Lochposition am nächsten liegenden Löcher im Modell vorgesehen. Der Pitch wurde für die Untersuchung variiert bei einer konstanten Kantenlänge des Modells von 40 µm. Die Fluidodynamik wurde mittels der Finite-Elemente-Methode (FEM) gelöst, wobei wiederum COMSOL Multiphysics (Version 4.2) als Simulationswerkzeug diente.



**Abb. 6.4** Darstellung des Geschwindigkeitsfelds des simulierten Körpers aus Abb. 6.3.

(a) Strömungslinien des Geschwindigkeitsfelds durch das Mikroloch bei einer Druckdifferenz von 0,1 hPa. Die Druckdifferenz wurde an Ober- und Unterseite des Modells eingepreßt, wobei an der Oberseite der Druck bei 1000 hPa konstant gehalten und an der Unterseite Drücke kleiner als 1000 hPa eingepreßt wurden. (b) Geschwindigkeitsfeld [ $\text{m s}^{-1}$ ] durch das Mikroloch bei 0,1 hPa und (c) bei 500 hPa Druckdifferenz.

## 7. Ergebnisse

Bei der biotechnologischen Herstellung rekombinanter Arzneimittel ist vor allem der Schritt der Selektion geeigneter Produktionsorganismen schwierig, da dabei idealerweise unendlich viele Zellen präzise anhand mehrerer Parameter charakterisiert werden müssen.

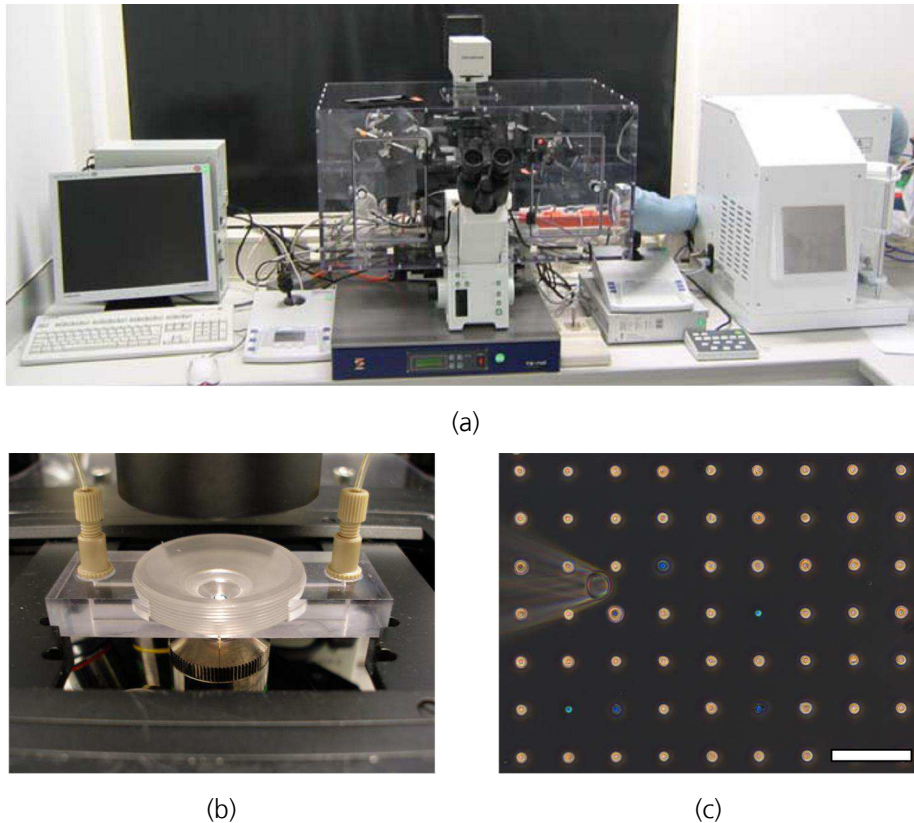
Erst wenn dem Herstellprozess ein qualitativ hochwertiges Zellsystem als Ausgangsmaterial zugrunde liegt, können die anschließenden Prozessoptimierungen bei der Herstellung der therapeutischen Proteine eine hohe Ausbeute erzielen und die Sicherheitsanforderungen erfüllen. Unter diesem Aspekt war es das Ziel dieser Arbeit, ein Zellisolationssystem zu entwerfen und aufzubauen, welches systematisch Zellklone nach der Vitalität, Produktivität und Proliferation charakterisieren und isolieren kann.

### 7.1. Systemcharakterisierung

Nachdem die Anforderungen an das System definiert und die Bestandteile (Chip, Adapter, Unterdrucksystem, Mikroskop mit Manipuliereinheit) aufgebaut wurden, war zunächst eine Systemcharakterisierung erforderlich (Abb. 7.1).

Da die Zellen optisch sowie elektrisch untersucht werden sollten, war eine optische und elektrische Charakterisierung des Systems im Leerzustand (ohne Zellen) notwendig, um die optischen Eigenschaften der Siliziumnitridmembran und des Adapters zu prüfen. Da die Zellen durch eine hydrodynamische Positionierungstechnik in der Fluidikeinheit auf den Mikrolöchern separiert werden sollten, mussten die fluidischen Systemeigenschaften und die Möglichkeit zur nicht-invasiven Zellpositionierung untersucht werden. Ferner war die Biokompatibilität von  $\text{Si}_x\text{N}_y$  eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz des entwickelten Array-Chips in Kombination mit Zellen, da die Zellen einen direkten Kontakt zur Nitridmembran des Chips eingehen.

Eine Untersuchung der optischen Merkmale von  $\text{Si}_x\text{N}_y$  wurde in Kohl et al. beschrieben (Kohl, 2011). Dabei zeigte sich, dass Siliziumnitrid sehr gute optische Eigenschaften besitzt und sogar Vorteile gegenüber Polystyrol, aus welchem die meisten Zellkulturgefäße aufgebaut sind, aufweist. Die Biokompatibilität von  $\text{Si}_x\text{N}_y$  wurden von Kotzar et al. in BioMEMS untersucht und bestätigt (Kotzar, 2002). Darum wurden die optische Eigenschaft sowie die Biokompatibilität im Weiteren nicht nochmals untersucht.



**Abb. 7.1 Darstellung des Systems zur Charakterisierung und Klonierung.**

(a) Fotografische Darstellung des Komplettsystems, bestehend aus Mikroskop mit Inkubationseinheit, Mikromanipulationsvorrichtung und zentraler Recheneinheit. (b) Fluidikadapter unter dem Mikroskop. (c) Positionierte CHO-Zellen auf dem Mikrolocharray-Chip mit Mikrokapillare (Maßbalken = 100  $\mu\text{m}$ ).

### 7.1.1. Elektrische Charakterisierung

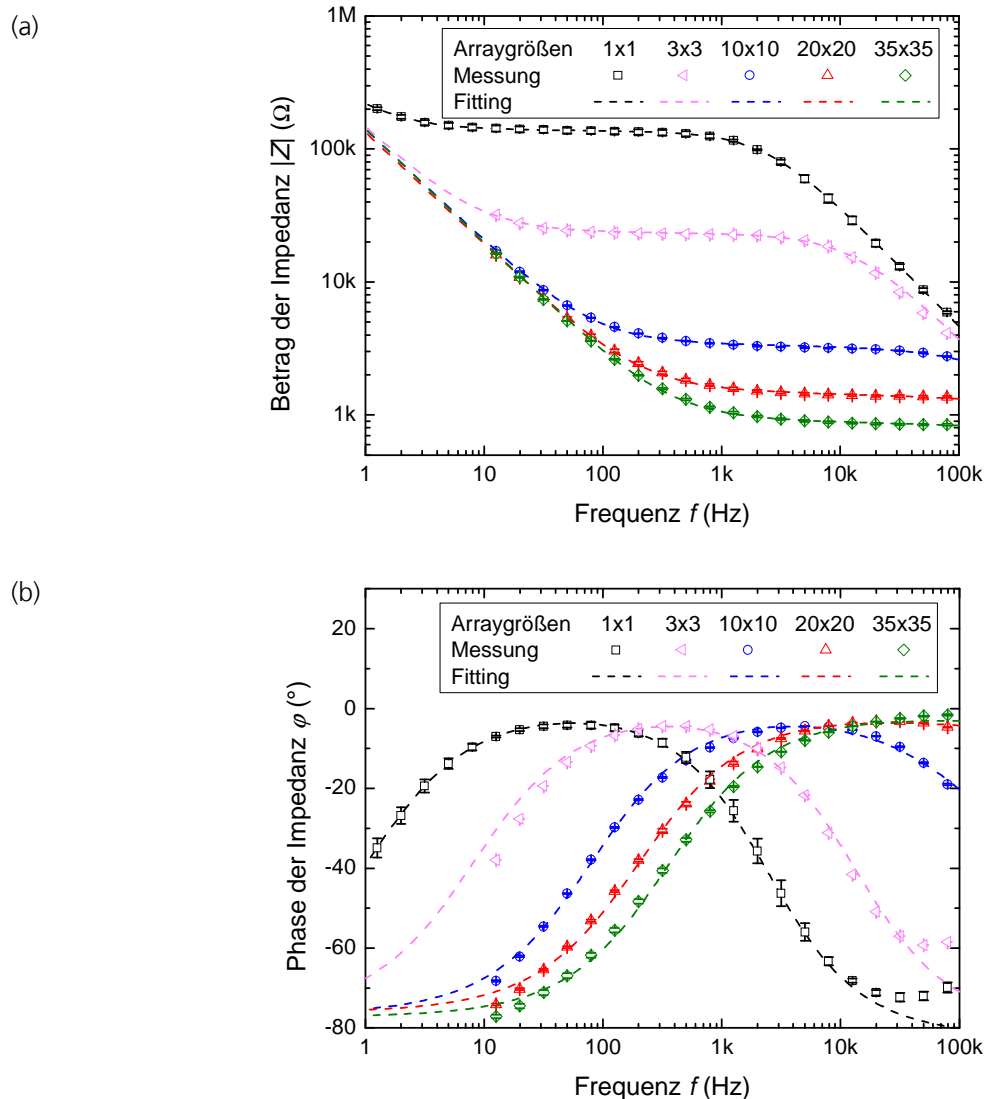
Bevor das entwickelte System als elektrische Sensoreinheit zur Erfassung von Zellvitalitätsparametern zum Einsatz kommen konnte, war das Impedanzspektrum der Messzelle zunächst im leeren Zustand zu erfassen und zu modellieren. Damit konnte der nutzbare Frequenzbereich zur Erfassung der Zellimpedanz für den Sensor ermittelt werden.

Für alle Array-Größen wiesen die Impedanzspektren ähnliche Verläufe auf (Abb. 7.2). Wurde der Frequenzbereich von der geringsten bis zur höchsten gemessenen Frequenz durchlaufen, so zeigte der Betrag der Impedanz zunächst einen Abfall, erreichte ein stabiles Plateau und fiel danach wiederum ab (Abb. 7.2a). Der Phasengang stieg zunächst an, ging in einen Maximalwert nahe  $0^\circ$  über und sank danach wiederum ab (Abb. 7.2b). Für den  $1 \times 1$  Array-Chip stieg die Phase oberhalb von 30 kHz wiederum an, wobei hier eine stärkere Abweichung zur modellierten Kurve (Fitting) zu erkennen war. Es war festzustellen, dass bei größeren Arrays der Übergang in den Plateaubereich des

Impedanzbetrags bei höheren Frequenzen zu finden war. Auch im Phasengang verschob sich das ausgeprägte Maximum bei größeren Arrays hin zu höheren Frequenzen.

### Elektrische Modellierung der Chip-Fluidikeinheit

Die Impedanzverläufe aus Abb. 7.2 wurden dazu genutzt, um das Verhalten des Gesamtsystems elektrisch und physikalisch nachzubilden.

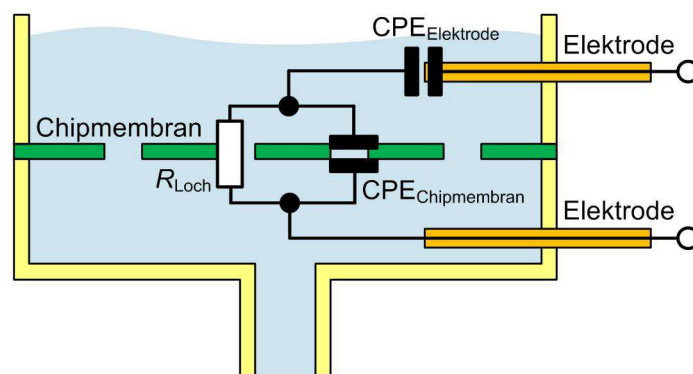


**Abb. 7.2 Elektrische Systemcharakterisierung mit unterschiedlich großen Array-Chips (1 x 1, 3 x 3, 10 x 10, 20 x 20 und 35 x 35 Löcher).**

Der Fluidikadapter wurde mit unterschiedlich großen Mikrolocharray-Chips für die jeweiligen Messungen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) befüllt und eine 2-Punkt-Messung durchgeführt. Dabei wurde jede Chipvariante dreimal vermessen. (a) Betragsverlauf und (b) Phasenverlauf dargestellt über der Frequenz. Für den Fit wurden die Parameter des Schaltungsmodells nach Abb. 7.3 entsprechend den Messpunkten berechnet.

Das vereinfachte elektrische Ersatzschaltbild bestand aus zwei konstanten Phasenelementen (*constant phase element*, CPE) und einem Widerstand (Abb. 7.3). Die konstanten Phasenelemente ( $CPE_{\text{Elektrode}}$ ,  $CPE_{\text{Chipmembran}}$ ) repräsentierten jeweils die fest/flüssig Phasengrenzen an Elektrode und Chipmembran und der Widerstand  $R_{\text{Loch}}$  den sich einstellenden elektrischen Widerstand durch die Löcher des Arrays (Abb. 7.3). Durch den physikalischen Aufbau der Sensoreinheit mit Chip lagen  $R_{\text{Loch}}$  und  $CPE_{\text{Chipmembran}}$  parallel zueinander und in Serie zu  $CPE_{\text{Elektrode}}$ . Einflüsse des Mediums, Streukapazitäten und Zuleitungsinduktivitäten wurden im Modell vernachlässigt. Die Parameter der Schaltungsnachbildung wurden an die gemessenen Kurven angeglichen und berechnet (Fitting in Abb. 7.2).

Die berechneten Parameterwerte sind im Anhang in Tabelle 16 dargestellt. Die Werte zeigten, dass sich mit zunehmender Lochzahl und Membranfläche der Widerstandswert  $R_{\text{Loch}}$  und die Parameterwerte des konstanten Phasenelements  $CPE_{\text{Chipmembran}}$  ändern. Mit zunehmender Array-Größe sank  $R_{\text{Loch}}$ , durch die größere Durchtrittsfläche für den Strom. Mit zunehmender Membranfläche (größere Arrays folgich auch eine größere wirksame Kapazitätsfläche) zeigten die CPE Parameterwerte der Membran  $n_{\text{Chipmembran}}$  eine Verringerung und  $Q_{\text{Chipmembran}}^{\circ}$  eine Vergrößerung. Die CPE-Parameter der Elektrode ( $Q_{\text{Elektrode}}^{\circ}$ ,  $n_{\text{Elektrode}}$ ) wiesen näherungsweise konstante Werte auf. Der Vergleich des elektrischen Lochwiderstands  $R_{\text{Loch}}$  zu Literaturwerten zeigt eine gute Übereinstimmung und ist im Anhang in Abb. A.2 dargestellt.



**Abb. 7.3** Äquivalentes Ersatzschaltbild für den Messaufbau mit Mikrolocharray-Chip (ohne Zelle).

Die konstanten Phasenelemente  $CPE_{\text{Elektrode}}$  und  $CPE_{\text{Chipmembran}}$  sowie der elektrische Widerstand  $R_{\text{Loch}}$  repräsentieren die Elektrodenimpedanz, den kapazitiven Charakter der Membran gegenüber der salzhaltigen Lösung sowie den Widerstand durch die Mikrolöcher (Kurz, 2011a).



Durch das Messen und Modellieren des Sensorsystems im Leerzustand war es möglich den nutzbaren Frequenzbereich für die unterschiedlichen Array-Größen abzugrenzen. Da das Zellsystem auf das Mikroloch aufgebracht wird, muss das Frequenzfenster so gewählt werden, dass die Impedanz der Leermessung hauptsächlich durch den Lochwiderstand beschrieben wird. Damit kann eine Impedanzänderung am Mikroloch durch das Aufbringen des Zellsystems erfasst werden.

Bei zu hohen Frequenzen ist kein Stromfluss durch das Mikroloch mehr zu erkennen, da der Strom über die Kapazität der Membran kurzgeschlossen wird (s. Abb. 5.7). Bei zu geringen Frequenzen ist der kapazitive Einfluss der Elektrode dominierend und sperrt den Stromfluss. Ist die Phase annähernd 0, so ist die Impedanz rein resistiv und wird hauptsächlich durch den Lochwiderstand beschrieben. Folglich ergab sich der nutzbare Frequenzbereich des 1 x 1 Array-Chips von 10 Hz bis 1 kHz. Darum wurde in dieser Arbeit, zur Erfassung von Vitalitätsparametern einer Zelle und speziell zur Detektion von Veränderungen an der Zellmembran, das elektrische Sensorsystem in einer 1 x 1 Array-Chipkonfiguration und bei einer Frequenz von 1 kHz betrieben (s. Tabelle 6).

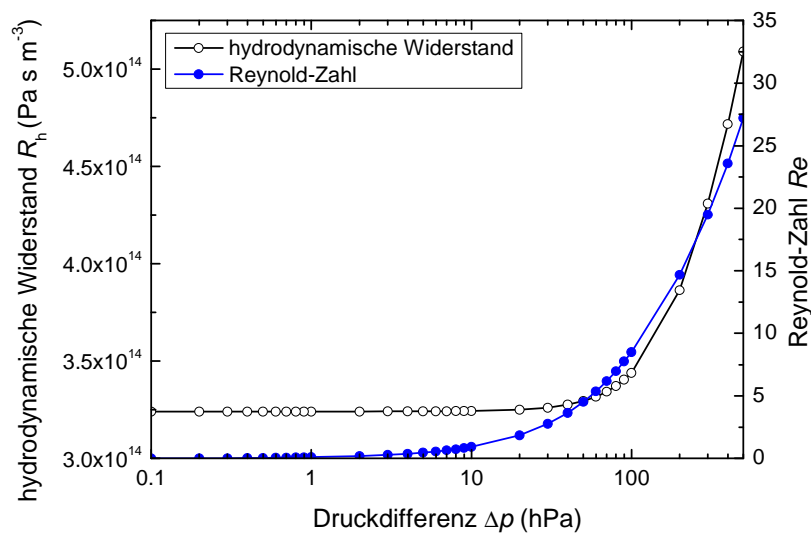
Ferner wurde die Impedanz dazu genutzt, den Belegungszustand während der Zellpositionierung eines 35 x 35 Arrays auch ohne optische Kontrolle zu erfassen (s. Kapitel 7.2.1).

### **7.1.2. Hydrodynamische Charakterisierung**

Über eine hydrodynamische Positionierungstechnik sollten die Zellen auf den Mikrolöchern des Chips eingefangen werden. Um eine schonende Positionierung des Zellmaterials zu garantieren, musste die Fluidodynamik im System und die Zellmortalität beim Positionieren genauer untersucht werden.

Bei der hydrodynamischen Charakterisierung wurden die fluidische Beeinflussung der Löcher untereinander und das Strömungsverhalten untersucht, was über die Ermittlung der Reynolds-Zahl geschah. Ist keine fluidische Beeinflussung der Löcher untereinander und gleichzeitig eine laminare Strömung gegeben und auf der Membranunterseite ein konstanter Unterdruck angelegt, dann ist der Positionierungsdruck an allen Löchern der Membran gleich und unabhängig von der Belegungsdichte (s. Kapitel 6.2). Folglich ist in diesem Fall kein Regelkreis für den Positionierungsdruck notwendig. Des Weiteren wurde der hydrodynamische Widerstand der Messzelle ermittelt. Diese Größe hat einen maßgeblichen Einfluss auf andere Systemparameter, wie z. B. auf den Positionierungs-

druck. Der hydrodynamische Widerstand der Messzelle ist leicht auf andere ähnliche Systeme übertragbar und ist daher eine geeignete Größe, um verschiedene Systeme miteinander zu vergleichen. Für die Untersuchung der Strömungseigenschaften wurde der hydrodynamische Widerstand  $R_h$  eines 1 x 1 Mikrolocharrays in einem numerischen Verfahren berechnet und die Reynolds-Zahl nach Gleichung (6-11) ermittelt (Abb. 7.4). Der hydrodynamische Widerstand wies bis zu einem Druckgradienten von 10 hPa über der Chipmembran einen konstanten Wert von  $3,24 \times 10^{14} \text{ Pa s m}^{-3}$  auf. Gleichzeitig nahm die Reynolds-Zahl einen Wert von unter 1 an (Abb. 7.4). Oberhalb von 10 hPa stiegen die Reynolds-Zahl und der hydrodynamische Widerstand an. Ein solcher Anstieg ist gleichbedeutend mit einer Zunahme von turbulenten Strömungseigenschaften.



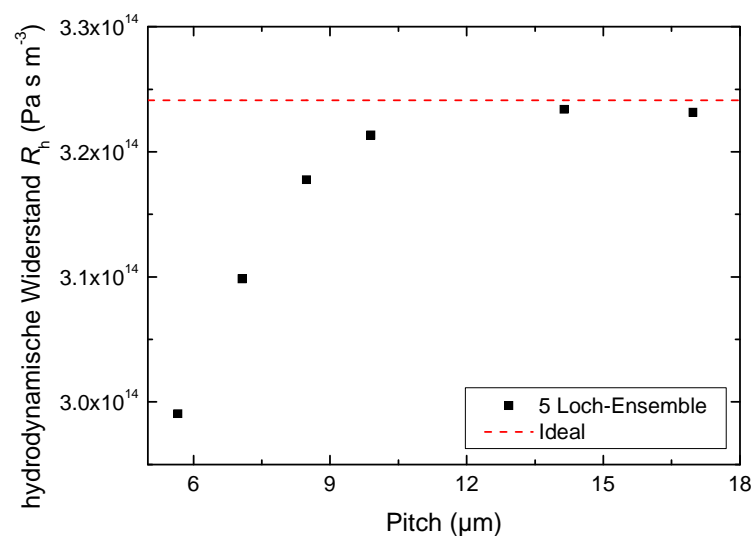
**Abb. 7.4** Darstellung des numerisch berechneten hydrodynamischen Widerstands sowie der nach Gleichung (6-11) berechneten Reynolds-Zahl eines Mikrolochs bei unterschiedlichen Druckdifferenzen über der Membran.

Das Mikroloch hatte einen Radius von  $2,5 \mu\text{m}$  und eine Höhe von  $0,87 \mu\text{m}$ . Bis zu einer Druckdifferenz von 10 hPa sind ein konstanter hydrodynamischer Widerstand und eine konstante Reynolds-Zahl zu erkennen. Oberhalb von 10 hPa ist ein Anstieg der beiden Parameter zu verzeichnen. Für die Berechnungen wurden die Eigenschaften von Wasser bei einer Temperatur von  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  herangezogen.

Um die hydrodynamische Beeinflussung benachbarter Löcher zu ermitteln, wurden die numerischen Berechnungen auf das 5-Lochensemble nach Abb. 6.3 angewandt. Dabei wurde der hydrodynamische Widerstand des mittleren Lochs berechnet (Abb. 7.5). Nur bei einer laminaren Strömung kann der Positionierungsdruck von der Belegungsdichte entkoppelt werden. Für die Berechnungen wurde daher als Druckdifferenz über der Membran 1 hPa gewählt, da gemäß Abb. 7.4 die Reynoldszahl bei dieser Druckdifferenz sehr klein ist und man auf jeden Fall von einer laminaren Strömung ausgehen kann.

In dem 5-Lochensemble wurde nur der hydrodynamische Widerstand des zentralen Lochs aus Abb. 6.3 numerisch ermittelt und mit dem Widerstand eines frei stehenden Mikrolochs verglichen (ideale Kennlinie). Die Berechnung des hydrodynamischen Widerstands in dem modellierten 5-Lochensemble zeigte für Pitchwerte kleiner 12  $\mu\text{m}$  eine verstärkte Abweichung zu der idealen Kennlinie (Abb. 7.5). Folglich war eine fluidische Beeinflussung benachbarter Löcher für Pitchwerte kleiner 12  $\mu\text{m}$  gegeben.

In dieser Arbeit wurden für die Zellselektion ausschließlich Arrays mit einem Pitch von 40  $\mu\text{m}$  und 60  $\mu\text{m}$  bei einem Positionierungsdruck von kleiner 5 hPa verwendet. Somit lag eine fluidische Beeinflussung benachbarter Löcher nicht vor und eine laminare Strömung war im System vorhanden. Wie die Herleitung aus Kapitel 6.2 zeigte, konnte folglich durch einen konstanten Unterdruck der Positionierungsdruck von der Belegungsdichte entkoppelt werden und so auf einen Regelkreis verzichtet werden.

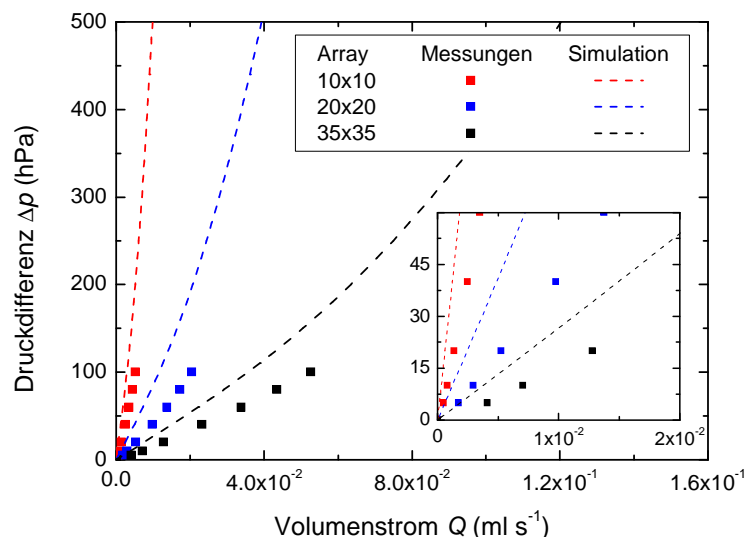


**Abb. 7.5 Einfluss des Pitches auf den hydrodynamischen Widerstand  $R_h$ .**

Für die Simulation wurde das 5-Lochensemble aus Abb. 6.3 herangezogen und der Pitch variiert. Der Druckgradient über der Membran wurde auf 1 hPa eingestellt und der hydrodynamische Widerstand des mittleren Lochs ermittelt. Die ideale Kennlinie ist der hydrodynamische Widerstand eines einzelnen frei stehenden Mikrolochs.

Der hydrodynamische Widerstand der Messzelle wurde zunächst ohne Chip und dann in Kombination mit unterschiedlichen Array-Größen gemessen. Mittels des hydrodynamischen Widerstands lassen sich künftig Parameter, wie z. B. der Positionierungsdruck, auf ähnliche fluidische Systeme übertragen. Für den Vergleich zwischen den Messreihen und der FEM-Simulation, wurde der hydrodynamische Widerstand für die Simulationskennlinien eines frei stehenden Mikrolochs (1 x 1 Array) numerisch berechnet und nach Glei-

chung (6-12) auf die entsprechende Array-Größe hochskaliert. Dies ist zumindest für ein laminares Strömungsverhalten zulässig. Da in dieser Arbeit nur Chips mit 40  $\mu\text{m}$  und 60  $\mu\text{m}$  Pitch untersucht wurden und oberhalb eines Pitches von 12  $\mu\text{m}$  die fluidische Beeinflussung der Löcher untereinander vernachlässigbar war, waren die Voraussetzungen für ein Hochskalieren erfüllt. Die aus Simulation und Messung ermittelten Kennlinien für den hydrodynamischen Widerstand zeigen eine vom Verlauf her gute Übereinstimmung (Abb. 7.6), wobei ein höherer Volumenstrom  $Q$  in der Messung zu erkennen ist. Im unteren Druckbereich ( $< 30$  hPa) ist annähernd ein lineares Verhalten zwischen der anliegenden Druckdifferenz über der Membran  $\Delta p$  und dem Volumenstrom  $Q$  durch die Löcher zu erkennen. Nimmt die Druckdifferenz über der Membran Werte größer 30 hPa an, so ist eine zunehmende Abweichung vom linearen Zusammenhang zwischen  $\Delta p$  und  $Q$  zu erkennen. Folglich kann auch in diesem Kurvenverlauf der Übergang von einem laminaren in ein turbulentes Strömungsverhalten gefunden werden. Die hydrodynamischen Widerstände der verschiedenen Chipgrößen sind in Tabelle 8 dargestellt, wobei sich ein höherer Widerstand bei kleineren Array-Größen ergibt. Die Messwerte zeigen im Vergleich zur numerischen Berechnung eine ungefähre Halbierung des hydrodynamischen Widerstands für alle Array-Größen.



**Abb. 7.6** Gegenüberstellung der approximierten Simulationsergebnisse und der Messergebnisse für die Untersuchung des hydrodynamischen Widerstands.

Die gestrichelte Linie soll dabei den Verlauf der Druckdifferenz  $\Delta p$  über dem Volumenstrom  $Q$  für die numerische Berechnung kennzeichnen. Dabei wurde der Volumenstrom  $Q$  auf die entsprechende Array-Größe hochgerechnet ( $\text{Array-Größe} \times Q_{1 \text{ Lochchip}}$ ).

**Tabelle 8 Vergleich der gemessenen und numerisch berechneten hydrodynamischen Widerstände für die unterschiedlichen Array-Größen.**

Array-Größen	Simulation (Pa s m <sup>-3</sup> )	Messung (Pa s m <sup>-3</sup> )
10 x 10	3,24 x 10 <sup>12</sup>	1,61 x 10 <sup>12</sup>
20 x 20	8,10 x 10 <sup>11</sup>	4,09 x 10 <sup>11</sup>
35 x 35	2,65 x 10 <sup>11</sup>	1,72 x 10 <sup>11</sup>

## 7.2. Hydrodynamische Zellvereinzlung

Für die Entwicklung eines Zellselektionssystems, welches Zellen nach mehreren relevanten Parametern isolieren kann, ist das parallele Ablegen der Zellen an definierten Stellen der erste entscheidende Schritt. Somit können die Zellen exakt lokalisiert und adressiert werden und folglich mehrmals und über einen längeren Zeitraum analysiert werden, was gegenüber dem Durchflusszytometer einen immensen Vorteil darstellt. Für das Ablegen der Zellen an den definierten Stellen wurde die hydrodynamische Positionierungstechnik in Kombination mit dem Chip und einem Fluidikadapter genutzt.

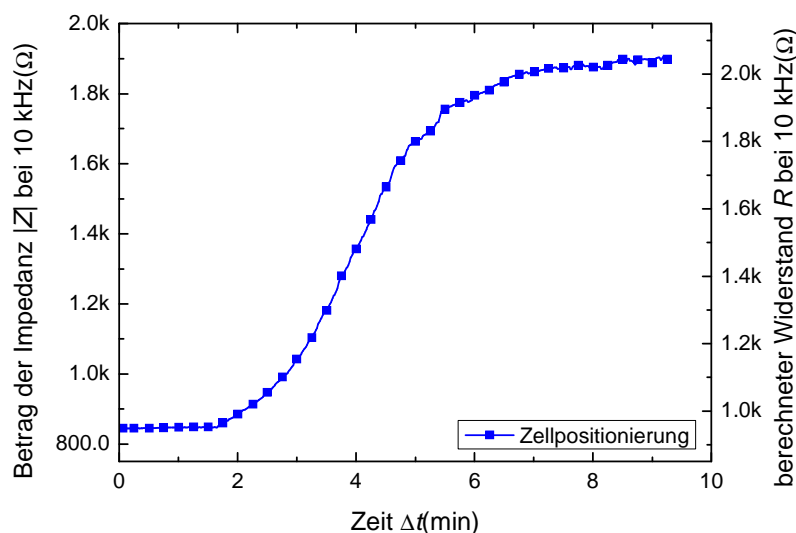
Es wurde ein Verfahren entwickelt, um die Belegungsdichte der Positionierungsstellen mit Zellen auch ohne optische Kontrolle in Echtzeit zu erfassen. Dieses ist im Gegensatz zu optischen Verfahren auch einsetzbar, wenn in der Zellkultur lichtempfindliche Substanzen, wie z. B. fluoreszenzmarkierte Antikörper, verwendet werden. Bei Verwendung des neuen Verfahrens sind außerdem auch sehr große Array-Chips, welche nicht in ihrer Gesamtheit im Mikroskopbild dargestellt werden können, einsetzbar. Das Verfahren ist in Unterkapitel 7.2.1 näher beschrieben.

Ferner wurde bei der Belegung die maximale Vereinzlungseffizienz bestimmt, d. h. der prozentuale Anteil an abgelegten Einzelzellen zu den Positionierungsstellen. Mithilfe der Vereinzlungseffizienz konnte eine Aussage getroffen werden über die Anzahl der maximal möglichen Zellklone auf einem Chip. Um Zellen beim Auftreffen auf den Löchern nicht zu schädigen, wurde das Druckfenster ermittelt, innerhalb dem es möglich war, Zellen zu positionieren, ohne eine Erhöhung der Zellmortalität zu erzielen. Die detaillierten Ergebnisse sind in den Unterkapitel 7.2.2 und 7.2.3 dargestellt.

### 7.2.1. Impedanzgesteuerte Zellpositionierung

Sehr große Array-Chips oder das Vorhandensein von lichtempfindlichen Substanzen erlauben es nicht, die Belegung der Positionierungsstellen mittels optischer Kontrolle in Echtzeit zu erfassen. Eine zu lange Belichtungszeit kann dabei eine Schädigung bzw. Zerstörung der lichtempfindlichen Substanzen hervorrufen. Bei großen Array-Chips

ergibt sich die Schwierigkeit, dass nicht der komplette Positionierungsbereich des Chips im Mikroskop dargestellt werden kann (Abb. 7.9). Deshalb wurde die Möglichkeit einer impedanzgesteuerten Erfassung der Chipbelegung ohne optische Kontrolle untersucht. Dazu wurden die Elektroden oberhalb und unterhalb der Chipmembran genutzt, um die Impedanz während des Positioniervorgangs zu erfassen. Der Betrag des Impedanzverlaufs (35 x 35 Array) bei einer Zellpositionierung bei 10 kHz ist in Abb. 7.7 dargestellt. Als Frequenz wurde 10 kHz gewählt, da bei dieser Frequenz die Impedanz eines 35 x 35 Arrays einen fast ausschließlichen resistiven Charakter zeigt und folglich fast nur von dem Lochwiderstand beeinflusst wird (s. Abb. 7.2). Bis zu einer Zeit  $\Delta t$  von 1,7 min (102 s) war der Array unbelegt und der Impedanzbetrag sowie der berechnete Widerstand  $R$  hatten die Werte 840  $\Omega$  und 960  $\Omega$ . Der Widerstand  $R$  wurde nach dem Ersatzschaltbild aus Abb. 7.3 berechnet, unter der Annahme, dass  $CPE_{\text{Elektrode}}$  und  $CPE_{\text{Chipmembran}}$  bei der Positionierung konstant waren. Die Parameterwerte für  $CPE_{\text{Elektrode}}$  und  $CPE_{\text{Chipmembran}}$  wurden Tabelle 16 für einen 35 x 35 Arrays entnommen. Ab einer Zeit von 1,7 min stieg der Betragsverlauf streng monoton an. Dabei fand der größte Anstieg in den ersten drei Minuten der Positionierung statt. Nach einem Zeitraum von 7 min wurde der Anstieg des Impedanzbetrags geringer und eine Sättigung des Impedanzbetrags wurde erreicht.



**Abb. 7.7 Impedanzverlauf und Veränderung des Widerstandsverhältnisses während des Positioniervorgangs auf einem 35 x 35 Array.**

Darstellung des Impedanzbetrags  $|Z|$  bei 10 kHz und des daraus berechneten Widerstands  $R$  bei der Positionierung von Zellen in Zellkulturmedium auf den Mikrolöchern. Die Werte bis 1,7 Minuten repräsentieren einen vollkommen unbelegten Chip. Bei der Positionierung erhöht die Zell-Lochbelegung den Widerstand bis eine Sättigung erreicht wird.

Um zu eruieren, ob bei der Positionierung ein allgemeingültiger Zusammenhang zwischen dem Impedanzbetrag und der Belegung der Mikrolöcher besteht, wurden die Impedanzverläufe bei der Belegung für unterschiedliche Array-Größen, Mediumviskositäten, Druckgradienten über der Membran und Zellkonzentrationen ermittelt. Es zeigte sich bei allen durchgeführten Versuchen ein reproduzierbares Verhalten (Abb. 7.8). Um das Verhalten zu beschreiben, wurde die Belegungsdichte  $\Phi$  ins Verhältnis zum Impedanzbetrag  $|Z|$  bei 10 kHz gesetzt (Abb. 7.8).

Bei der elektrischen Erfassung der Belegungsdichte war zunächst ein größerer Anstieg der Lochbelegung im Vergleich zum Impedanzanstieg zu verzeichnen. Wurde die Belegungsdichte des Arrays größer, so kippte dieser Zusammenhang und der Anstieg des Impedanzbetrags war im Vergleich zur Lochbelegung größer. Damit ergab sich kein lineares Verhältnis zwischen der Lochbelegung und dem Impedanzbetrag. Dies könnte möglicherweise mit einer elektrischen Abhängigkeit benachbarter Löcher zusammenhängen. Für die mathematische Beschreibung des Verhältnisses zwischen der Belegungsdichte und des Impedanzbetrags wurden aus allen Messungen (19 unterschiedliche Messreihen) der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Diese Daten wurden dann in Origin 8.0 genutzt, um über eine nichtlineare Anpassung das  $\Phi$ - $|Z|$ -Verhältnis zu berechnen. Dieses ergab sich zu:

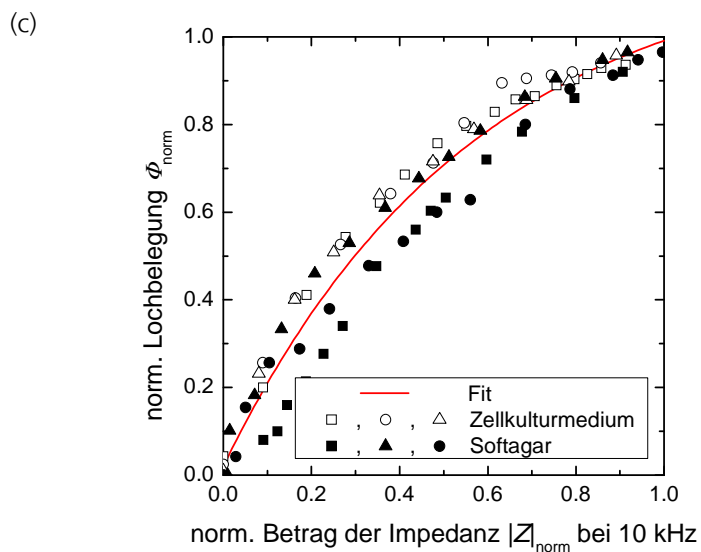
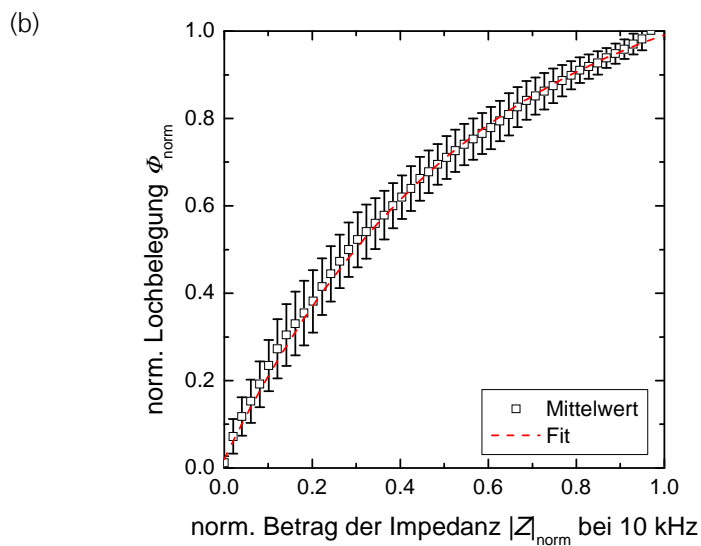
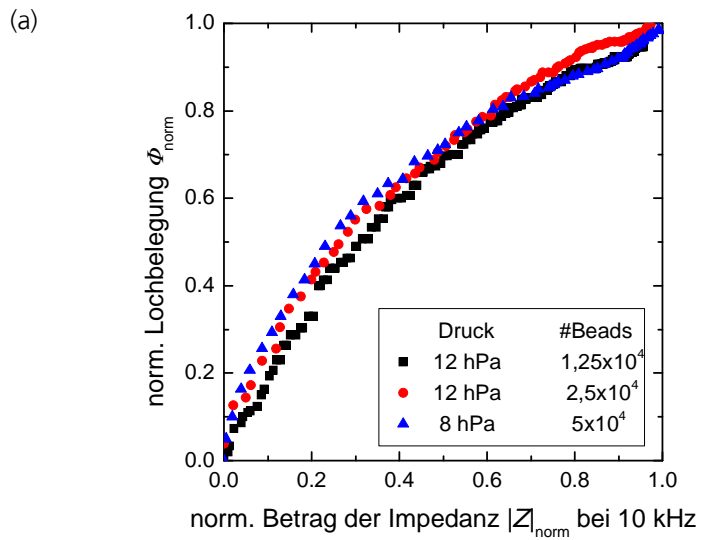
$$\Phi_{\text{norm}} = 1,19 - 1,17 \cdot 0,17^{|Z|_{\text{norm}}} \quad (7-1)$$

Mit  $R^2 = 0,999$ . Dabei berechnete sich der normalisierte Betrag  $|Z|_{\text{norm}} = (|Z| - |Z|_{\text{unbesetzt}}) / (|Z|_{\text{vollbesetzt}} - |Z|_{\text{unbesetzt}})$  und  $\Phi_{\text{norm}} = (\text{Anzahl der belegten Löcher}) / (\text{Anzahl der gesamten Array-Löcher})$ .

Für die Nutzung der impedanzgesteuerten Positionierung muss zuvor eine Kalibrierung erfolgen, um die beiden Extremwerte  $|Z|_{\text{vollbesetzt}}$  und  $|Z|_{\text{unbesetzt}}$  zu erlangen.

Der Vergleich der Näherungsformel mit den Messdaten zeigte eine Abweichung im Fall der Positionierung von Zellen in Zellkulturmedium von weniger als 9 % und weniger als 13 % für den Fall der Positionierung von Beads in höherviskosem Medium (Abb. 7.8c).

Durch die impedanzgesteuerte Zellpositionierung war es möglich, nicht nur den Endzustand bei der Positionierung zu erfassen (Sättigung in Abb. 7.7), sondern den Belegungszustand des Chips aus dem gemessenen Impedanzbetrag zu jedem Zeitpunkt abzuleiten.



**Abb. 7.8** Korrelation zwischen der normalisierten Lochbelegung ( $\phi_{\text{norm}}$ ) und der normalisierten Impedanzmessung ( $|Z|_{\text{norm}}$ ).

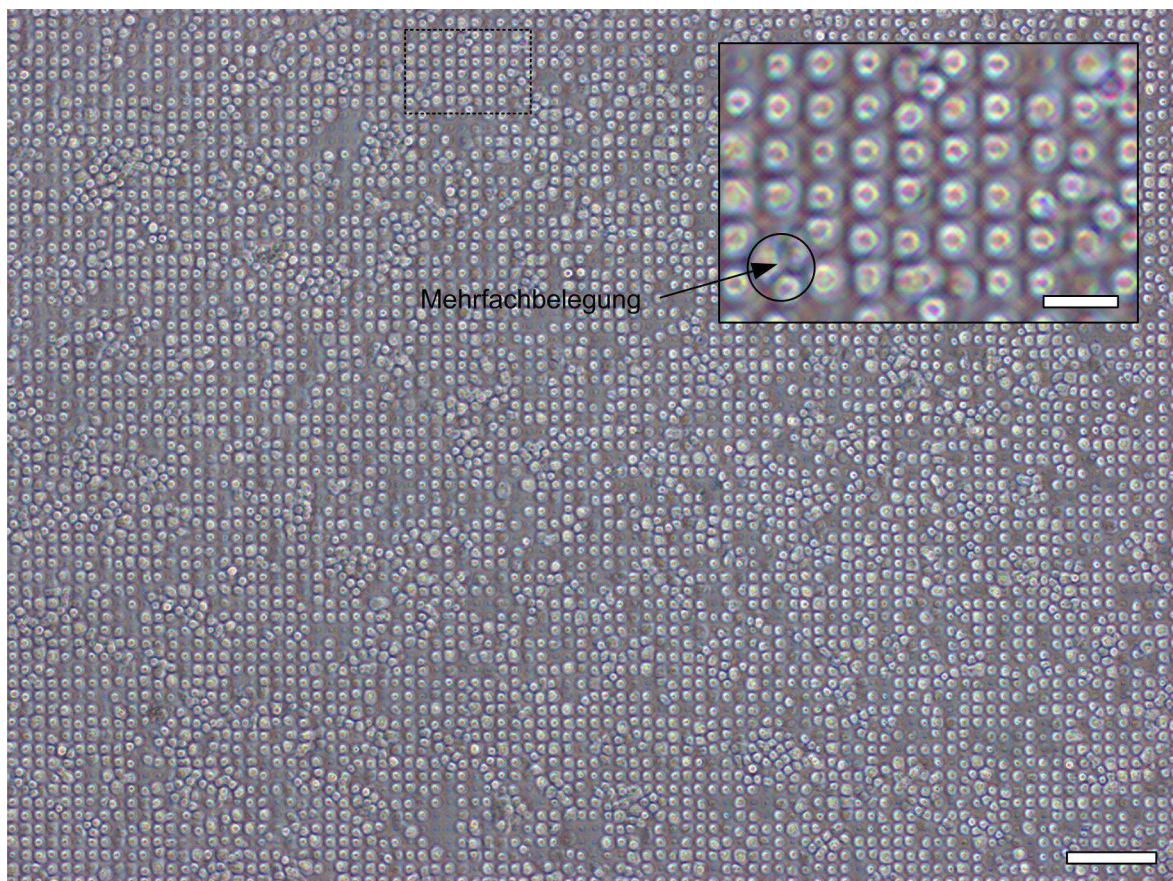
(a) Auswahl von 3 aus 19 Messungen mit verschiedenen großen Arrays, Partikelkonzentrationen und Druckgradienten. (b) Mittelung der Experimente sowie die Darstellung einer mathematischen Näherungsformel für das  $\phi$ - $|Z|$  Verhältnis nach Gleichung (7-1). (c) Vergleich der Messungen mit  $1 \times 10^5$  Beads in 200  $\mu\text{l}$  Softagar bei einem Unterdruck zwischen 5 – 13 hPa, sowie mit  $5 \times 10^4$  Zellen in 600  $\mu\text{l}$  Medium bei 5 hPa mit der mathematischen Näherung. Nach Kurz et al. (Kurz, 2011b).



### 7.2.2. Vereinzlungseffizienz

Die Vereinzlungseffizienz gibt direkt Aufschluss darüber wie „Ideal“ die Zellen auf den Positionierstellen abgelegt wurden. Somit kann direkt von der Array-Größe und der Vereinzlungseffizienz auf die maximal möglichen Zellklone geschlossen werden.

Die Positionierungsversuche auf unterschiedlichen Array-Größen zeigten, dass es durch eine Hochskalierung der Array-Größe möglich war mehr Zellen zu positioniert, wodurch sich auch eine größere Anzahl an Zellklonen ergab (Abb. 7.9). Gerade bei der Verwendung sehr großer Array-Chips konnte nicht die komplette Positionierfläche im Mikroskop dargestellt werden. Hier wurde die impedanzgesteuerte Positionierung genutzt, um den Belegungszustand zu erfassen.



**Abb. 7.9 Positionierte Zellen auf einem Mikrolocharry-Chip.**

Ausschnitt eines 400 x 400 Arrays besetzt mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Maßbalken = 100 µm), mit vergrößert dargestelltem Bereich (Maßbalken = 25 µm)

Bei der Zellpositionierung zeigte sich, dass es auf dem Mikrolocharry-Chip auch Positionierstellen ohne Belegung und mit Mehrfachbelegung gab. Fehlstellen reduzieren die Anzahl der möglichen Zellklone auf dem Chip und verringern folglich die Vereinzlungs-

effizienz. Da mehrfach belegte Löcher von der weiteren Verwendung und Auswertung ausgeschlossen werden, reduzieren Mehrfachbelegungen ebenfalls die Vereinzlungseffizienz. Für die Bestimmung der maximalen Vereinzlungseffizienz wurden zunächst mehr Zellen (CHO-Zellen) appliziert als Löcher auf der Membran vorhanden waren. Dem Positionierprozess wurden daraufhin Spülschritte nachgeschaltet, um die sedimentierten, überschüssigen, nicht positionierten Zellen von der Membran zu entfernen. Ein solches Vorgehen bietet sich gerade dann an, wenn viele Zellen in einer Probe vorhanden sind und es keine Möglichkeit gibt die Zellkonzentration zu bestimmen und an die Lochzahl des Arrays anzupassen.

Um die Vereinzlungseffizienz nach Gleichung (5-2) zu ermitteln, wurden ~ 1000 Lochpositionen von drei unterschiedlichen mit Zellen belegten Array-Chips betrachtet. Neben der Anzahl der Fehlstellen, d. h. Positionierungsstellen ohne Zellbelegung, und Mehrfachbelegung, d. h. Positionierungsstellen belegt mit mehr als einer Zelle, wurde die Vereinzlungseffizienz in Tabelle 9 angeführt.

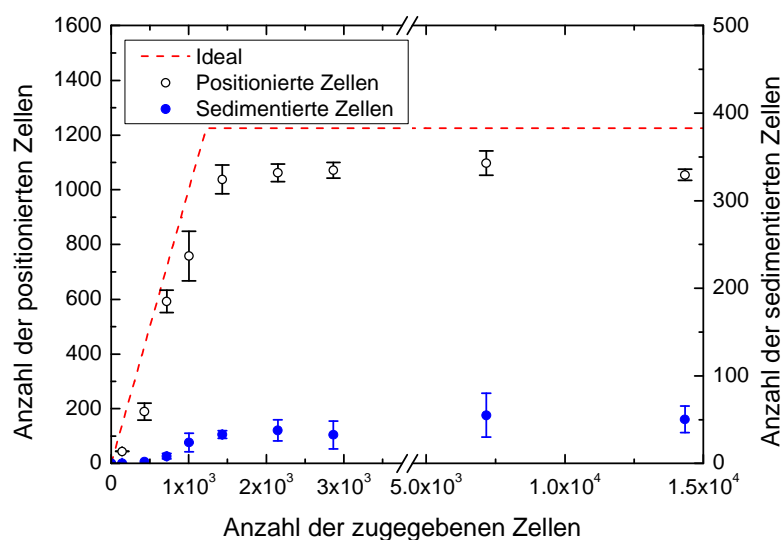
**Tabelle 9 Darstellung der Vereinzlungseffizienz bei der Positionierung von CHO-Zellen auf einem Mikrolocharray.**

Die Fehlstellen auf einem Array sind dabei die unbelegten Löcher. Unter einer Mehrfachbelegung wurden Löcher zusammengefasst, welche mit mehr als einer Zelle belegt waren.

	Fehlstellen	Mehrfachbelegungen	Vereinzlungseffizienz
Chip 1	5,3 %	13,3 %	81,3 %
Chip 2	6,7 %	12,3 %	81 %
Chip 3	13,3 %	6,7 %	80 %
Mittelwert ± Standardabweichung	8,4 ± 4,3 %	10,8 ± 3,6 %	80,8 ± 0,7 %

Durch die Applikation einer Zellzahl, die größer war als die Anzahl der auf dem Chip vorhandenen Positionierungsstellen, und dem Nachschalten von Spülschritten, konnte eine Vereinzlungseffizienz von  $80,8 \pm 0,7$  % erzielt werden (Tabelle 9). Ferner war zu erkennen, dass eine Vergrößerung der Anzahl der Fehlstellen mit einem verringerten Anteil an Mehrfachbelegungen einhergegangen war (s. Chip 3 in Tabelle 9). Die Ursache dafür konnte möglicherweise in den manuell, d. h. der Spülfluss konnte nicht auf einen bestimmten Wert eingestellt werden, durchgeführten Spülschritten liegen. Dabei konnte ein zu stark durchgeführtes Spülen zu einem vermehrten Ablösen bereits positionierter Zellen geführt haben, wobei gleichzeitig die Anzahl der Mehrfachbelegungen dezimiert wurde.

Ferner können Spülschritte zu einem erhöhten Scherstress führen, welcher die Zellviabilität heruntersetzen kann. Zur Vermeidung von Spülschritten wurde ein zweiter Ansatz verfolgt, bei dem die Zellzahl an die Lochanzahl angepasst wurde. Auch für diese Methode wurde die Vereinzelungseffizienz unter der Berücksichtigung von Fehlstellen und Mehrfachbelegungen nach Gleichung (5-2) ermittelt. Für die Ermittlung der Vereinzelungseffizienz wurde die Menge der zugegebenen Zellen variiert und nach der Positionierung die Fehlstellen und Mehrfachbelegungen ausgezählt. Es wurden für jeden Messwert in Abb. 7.10 drei komplette Chips nach dem Positionieren untersucht (insgesamt 3675 ausgezählte Lochpositionen pro Messpunkt, d.h. pro Chip wurden 1225 Positionierungsstellen betrachtet).



**Abb. 7.10** Positionierung von unterschiedlich zugegebenen Zellzahlen auf einem 35 x 35 Array mit 40  $\mu\text{m}$  Pitch bei einem Druckgradienten über der Chipmembran von 2,5 hPa.

Der Druckgradient wurde eine Minute lang angelegt. Dabei wurden die Zellen positioniert, daraufhin die komplette Chipmembran mikroskopisch abgerastert und die positionierten Zellen auf den Löchern, sowie die sedimentierten Zellen neben den Löchern gezählt.

Bei der Ermittlung der Vereinzelungseffizienz stellte sich bei Zugabe von 1400 Zellen ein Wert von  $84,7 \pm 4,3 \%$  ein (Abb. 7.10). 1400 Zellen entsprachen einem 14,3 %-igen Überschuss an Zellen im Vergleich zur Zahl der Positionierungsstellen (35 x 35 Array). Wenn die Zugabe der applizierten Zellen zwischen 2000 und  $1,4 \times 10^4$  variiert wurde, ergab sich eine Vereinzelungseffizienz von  $87,5 \pm 2,7 \%$ . Die Menge der Fehlstellen und Mehrfachbelegungen konnte durch die Abweichung der Messwerte zur idealen Kennlinie abgeschätzt werden (ideale Kennlinie: alle Positionierungsstellen sind genau mit einer Zelle belegt). Ferner war zu erkennen, dass die Anzahl der sedimentierten Zellen

auf der Membran trotz der erhöhten Zellzugabe bei einer 1-minütigen Positionierung nicht proportional zugenommen hat und bei einer Zugabe von  $1,4 \times 10^4$  Zellen bei ungefähr  $50 \pm 15$  lag.

Werden beide Verfahren miteinander verglichen, so ergaben sich eine größere Vereinzlungseffizienz, einen geringeren Scherstress und einen geringeren Zellverbrauch, wenn die zugegebene Zellzahl eingestellt wurde. Folglich belief sich die maximale Vereinzlungseffizienz für die  $35 \times 35$  Array-Größe auf  $87,5 \pm 2,7$  % bei einer applizierten Zellzahl von 2000 bis  $1,4 \times 10^4$  Zellen, was einem 63,3 bis 1042,9 %-igem Zellüberschuss entsprach. Als optimale (Kosten/Nutzen Betrachtung) Zellzugabe konnte ein 14,3 %-iger Zellüberschuss gesehen werden, da sich hier bereits eine Vereinzlungseffizienz von annähernd 85 % eingestellt hat.

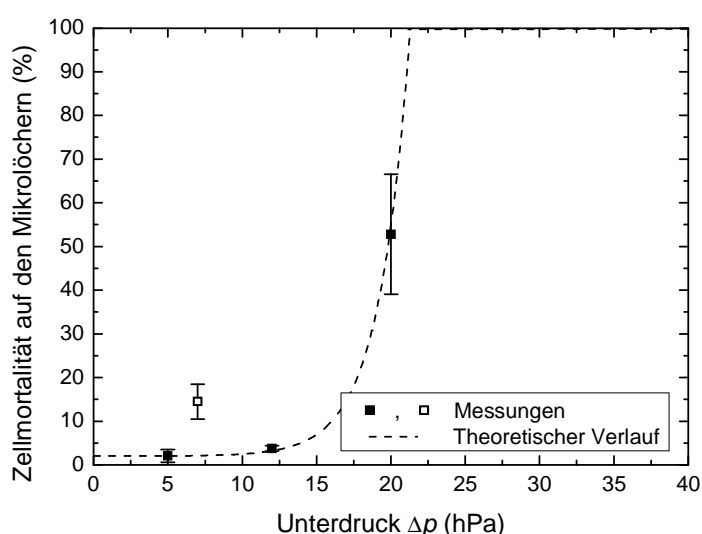
### **7.2.3. Druckfenster**

Je höher der Ansaugdruck gewählt wird, desto zuverlässiger kann ein Wegspülen von bereits positionierten Zellen verhindert werden. Auf der anderen Seite kann sich ein zu hoher Ansaugdruck negativ auf die Zellviabilität auswirken. Daher ist es wichtig das Druckfenster zu ermitteln, bei dem die Zellen beim Auftreffen auf den Positionierstellen nicht geschädigt und so die Zellviabilität nicht beeinträchtigt wird. Dazu wurden die Zellen (hier: CHO-Zellen) bei unterschiedlichen Druckgradienten positioniert, manuelle Spülprozesse angeschlossen und eine Tot-Färbung, durch die Zugabe von Propidiumiodid, durchgeführt. Die Zellmortalität auf dem Chip wurde nach Gleichung (5-1) für jeden Druckgradienten bestimmt. Dabei wurden für jedes Druckgefälle etwa 1000 Zellen überprüft.

Es ergab sich eine Zellmortalität von unter 4 % bei Druckdifferenzen über der Chipmembran von 5 und 12 hPa (Abb. 7.11). Dies entsprach in etwa dem Anteil an toten Zellen in der Suspensionskultur (6 % für manuelles Zählen über Neubauer-Zählkammer, 2 % für CASY-Messung). Folglich beeinflusste die Positionierung bei diesen Druckgradienten die Zellviabilität nicht. Bei 20 hPa war ein Anstieg der Zellmortalität auf über 50 % zu verzeichnen, wobei die Standardabweichung zunahm. Die Vergrößerung der Standardabweichung kann damit begründet werden, dass bei 20 hPa Unterdruck Zellen ( $\varnothing_{\text{Zelle}} \approx 14 \mu\text{m}$ ) bereits durch die Mikrolöcher gesaugt worden sind, wodurch sich für die durchgeführten Versuche unterschiedlich dicht belegte Chips ergaben. Bei 7 hPa nahm die Zellmortalität einen Wert von annähernd 14 % an. Auch bei diesem Positionierungs-

druck war ein Anstieg der Standardabweichung zu verzeichnen. Dieser Wert fällt auf den ersten Blick aus den Messreihen, da sich bei 12 hPa wiederum eine geringere Zellmortalität ergab. Bedenkt man jedoch, dass der Spülprozess manuell durchgeführt worden war, kann gerade bei 7 hPa ein zu starkes Spülen für den Anstieg der Mortalität verantwortlich gewesen sein. Ferner kann das zu starke Spülen dazu geführt haben, dass sich bereits positionierte Zellen abgelöst haben, folglich unterschiedlich dicht belegte Chips ergaben, und sich dadurch der Anstieg in der Standardabweichung ergab.

Spülprozesse, solange sie manuell durchgeführt werden, können zu einer erhöhten Zellmortalität auf den Positionierungsstellen führen. Außerdem ist bei einem manuellen Waschschrift der Spüldruck/die Flussrate nicht einfach zu justieren, so dass sich ein Ablösen bereits korrekt abgelegter Zellen von den Positionierstellen ergeben kann. Folglich sind manuelle Spülschritte im System kein adäquates Mittel, um falsch abgelegte Zellen von der Positionierfläche zu entfernen.



**Abb. 7.11** Untersuchung von verschiedenen Druckgefällen  $\Delta p$  über der Chipmembran auf die Zellschädigung.

$5 \times 10^4$  Zellen wurden auf einen  $35 \times 35$  Locharray-Chip appliziert und mit unterschiedlichen Drücken positioniert, danach wurde eine Tot-Färbung (PI) durchgeführt und die toten positionierten Zellen ins Verhältnis zu der gesamten positionierten Zellzahl gesetzt. Jeder Messpunkt wurde durch manuelles Zählen von etwa 1000 Zellen von drei unterschiedlichen Positionierungsversuchen ermittelt. Zusätzlich wurde ein möglicher theoretischer Unterdruck-Zellmortalitätsverlauf im Diagramm eingefügt.

Der Einfluss der Entnahme und Kultur der Zellklone auf die Vitalität wurde ebenfalls untersucht und ist in Kapitel 7.4.1 beschrieben.

### **7.3. Bestimmung der Qualität eines Zellproduktionssystems**

Nachdem die chipbasierte Zellvereinzelung an definierten Stellen untersucht wurde und die kritischen Parameter aufgezeigt worden sind, war der zweite entscheidende Schritt bei der Zellselektion die Charakterisierung und Identifizierung von Zellklonen mit herausragenden Eigenschaften.

Gerade bei der Generierung von stabilen, hoch-produzierenden Zellsystemen ist ein einziger Parameter zur präzisen Identifikation nicht ausreichend. Anhand der Impedanzspektroskopie, der Quantifizierung der intrazellulären Proteinexpression am Beispiel des einfach nachzuweisenden grün fluoreszierenden Proteins (GFP), sowie der Detektion von Zellsekreten und Proliferation sollten die relevanten Parameter (Produktivität, Proliferation und Vitalität) für produzierende Zellsysteme abgeleitet und die Chipplattform auf ihre Multiparameterfähigkeit beurteilt werden.

#### **7.3.1. Relevanter Parameter 1: Zellvitalität**

Bei der Selektion von Zellsystemen für die Herstellung therapeutischer Proteine ist die Zellvitalität ein ganz entscheidender Parameter. Nur ein vitales Zellsystem kann ein Klonwachstum gewährleisten, später an größere Biomassen (Fermentervolumen) angepasst werden und eine permanent hohe Produktausbeute garantieren. Die Zelladhäsion, eine Zellgrößenänderung (z. B. bei der Apoptose und Nekrose) sowie das Membranverhalten können die Vitalität einer Zelle widerspiegeln. Nimmt die Zellgröße stark zu oder ab, kann dies das erste Anzeichen einer abnehmenden Zellvitalität sein. Hingegen kann eine ausgeprägte Zelladhäsion ein Zeichen eines vitalen adhärenen Zellsystems sein. Auch das Membranverhalten und die Membranintegrität einer Zelle geben Aufschlüsse über die Vitalität.

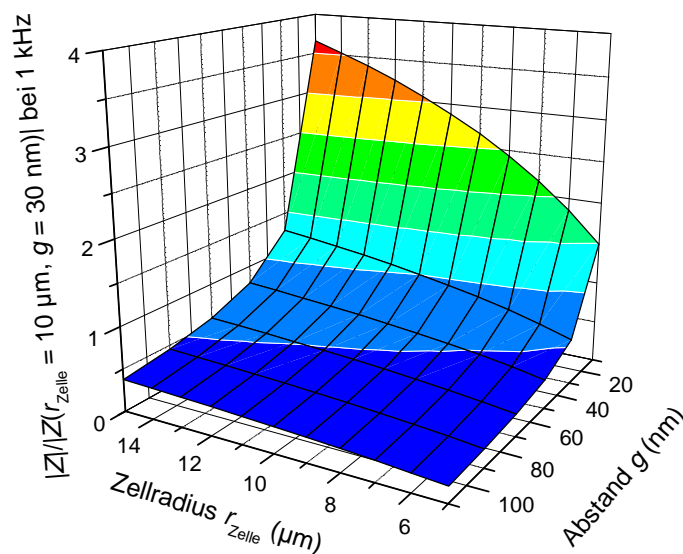
Es wurde untersucht, ob sich die Messgröße „elektrische Impedanz“ eignet, um die oben genannten Parameter zu messen. Zum Erfassen der Impedanz oder einer Impedanzänderung sind keine teuren und arbeitsintensiven Färbetechniken nötig und die Messung kann nicht-invasiv erfolgen. Um minimale Zellmembranänderungen und –perforationen auszulösen und Membrangängigkeiten zu simulieren, wurden neben Triton-X-100, Polymere sowie Polymer-DNA Komplexe als Testsubstanzen eingesetzt. Numerische Berechnungen, basierend auf der Finiten-Elemente Methode (FEM), wurden erstellt, um die Auswirkung von morphologischen und membranspezifischen Zelländerungen auf den Betrag der Impedanz theoretisch zu untersuchen.

Da die elektrische Sensoreinheit in einer 1 x 1 Array-Konfiguration einen nutzbaren Frequenzbereich von 10 Hz bis 1 kHz besitzt, wurden alle Untersuchungen bei 1 kHz durchgeführt. Bei dieser Frequenz hat die Kapazität der Membran einen stabilen Wert, so dass Membranänderungen detektierbar sind (Asami, 1990).

### Berechnungen zur morphologischen Zelländerung und Membranperforation

Der Einfluss relevanter Größen der Zellvitalität, wie beispielsweise der Zellgröße  $r_{\text{Zelle}}$  und der Zelladhäsion (Zell-Substratabstand  $g$ ), auf den Betrag der Impedanz wurden näher untersucht. Insbesondere bei der Apoptose und Nekrose, beides Arten des Zelltods, finden starke Änderungen des Zellvolumens statt.

Die Berechnungen ergaben, dass mit zunehmender Zellausdehnung und mit abnehmendem Abstand zwischen Zelle und Chip der Betrag der Impedanz ansteigt (Abb. 7.12). Dabei zeigte die Reduktion des Abstands im Bereich um 20 bis 40 nm den größten Anstieg. Aus diesen theoretischen Betrachtungen kann abgeleitet werden, dass sowohl der Einfluss der Zellgröße als auch der Zell-Substratabstand die Impedanz in einer Mikrolochanordnung verändert. Da beide Parameter die Impedanz beeinträchtigen, müsste zusätzlich über ein Mikroskopbild die Zellgröße ermittelt werden, um auf den Zell-Substratabstand schließen zu können.

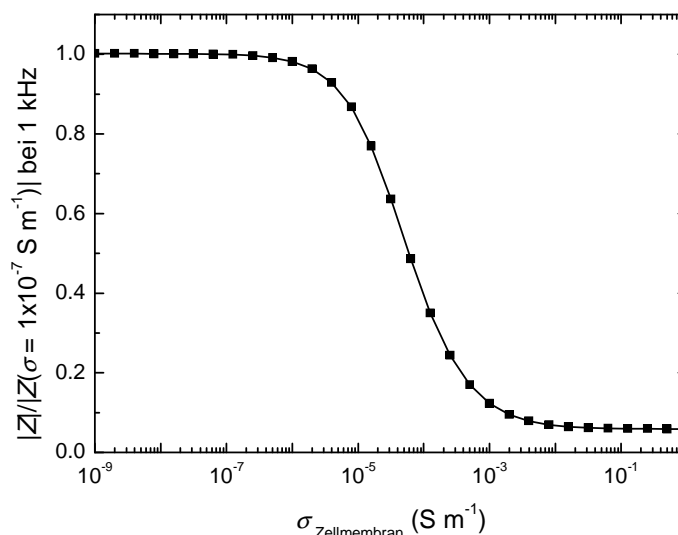


**Abb. 7.12** FEM-Simulation zu morphologischen Veränderungen des Zellmodells aus Abb. 6.1. Der Impedanzbetrag der Simulationsergebnisse wurde bei 1 kHz ausgewertet.

Darstellung des Einflusses der Zellgröße  $r_{\text{Zelle}}$  und des Abstands zwischen Zelle und Chipmembran  $g$  auf den Betrag der Impedanz. Die Impedanz wurde auf den Betragswert bei einem Zellradius von 10  $\mu\text{m}$  und bei einem Abstand zwischen Zelle und Chipmembran von 30 nm normiert ( $|Z| = 4,87 \text{ M}\Omega$ ).

Für die theoretische Untersuchung von Membranänderungen und –perforationen (Abb. A.3) auf das Impedanzverhalten, wurden neben Membranlöcher mit unterschiedlichen Radien auch Änderungen der Membranleitfähigkeit im Simulationsmodell aus Abb. 6.1 vorgenommen. Dabei kann die Änderung der Membranleitfähigkeit ( $\sigma_{\text{Zellmembran}}$ ) beispielsweise mit dem Transport der therapeutischen Proteine über die Membran zusammenhängen (Abb. 7.13).

Es zeigte sich, dass eine Änderung der Leitfähigkeit nur in einem bestimmten Bereich ( $10^{-5} - 2 \times 10^{-4} \text{ S m}^{-1}$ ) die Impedanz beeinflusst. Zwischen einer Leitfähigkeit von  $10^{-9} - 10^{-5} \text{ S m}^{-1}$  zeigte die normierte Impedanz einen Wert nahe 1, d. h. die Membran zeigte ein Verhalten vergleichbar einer idealen Kapazität für das niederfrequente Signal bei 1 kHz. Wurde die Leitfähigkeit erhöht, sank der Membranwiderstand parallel zur Membrankapazität (s. Abb. 5.7), so dass die Zellmembran leitend für niederfrequente Signale wurde und der normierte Impedanzbetrag auf einen Wert unter 0,1 sank. Folglich kann die Membranleitfähigkeit mittels der Impedanz in einer Mikrolochanordnung bei 1 kHz nur in einem sehr schmalen Band detektiert werden. Diese Änderung der Impedanz lässt nur eine Aussage über ein lebendes ( $\sigma_{\text{Lebend}} \approx 10^{-7} \text{ S m}^{-1}$ ) und totes Zellsystem ( $\sigma_{\text{Tot}} \approx 10^{-3} \text{ S m}^{-1}$ ) zu, eine langsame Veränderung des Vitalitätszustands über die Membranleitfähigkeit ist nicht möglich (Pethig, 1997).



**Abb. 7.13** Darstellung des Einflusses der Membranleitfähigkeit  $\sigma_{\text{Zellmembran}}$  auf den Betrag der Impedanz.

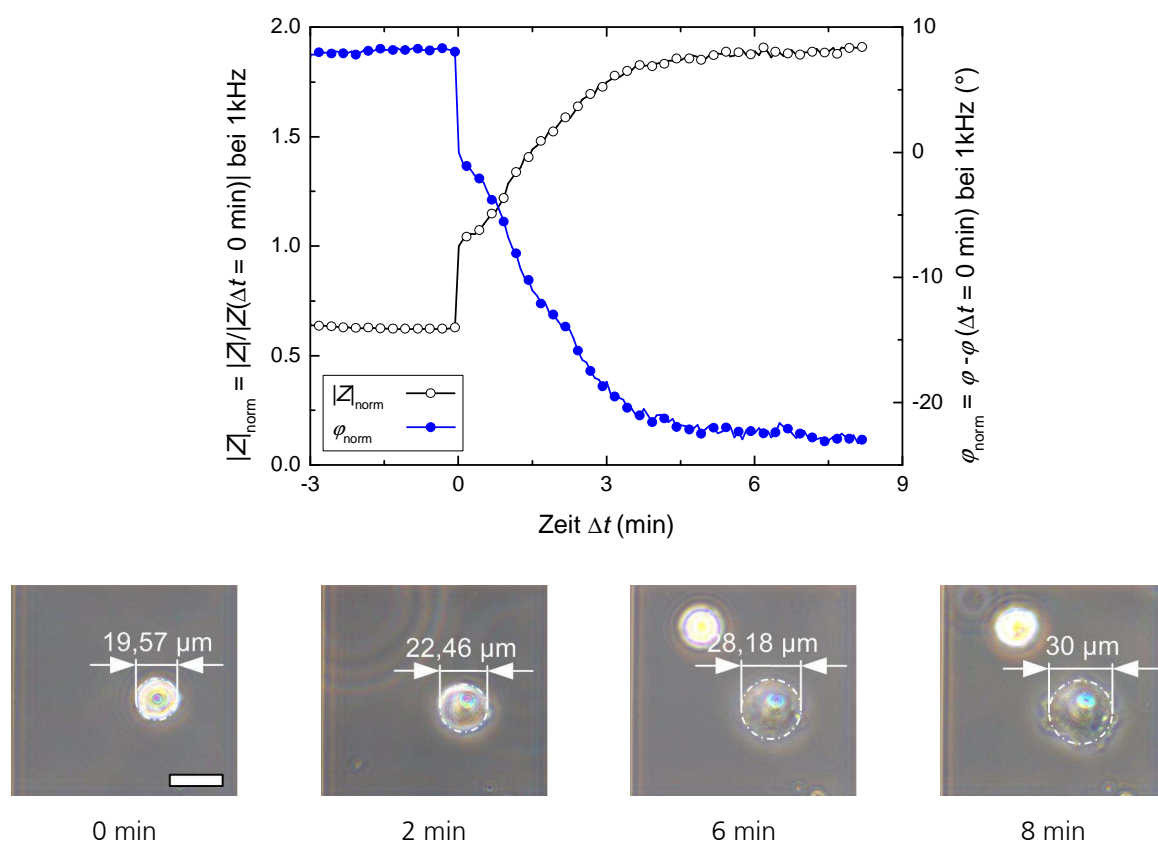
Der Zellradius entsprach bei der Simulation  $8,5 \mu\text{m}$  und der Abstand der Zelle zum Chip war  $25 \text{ nm}$ . Die Impedanz wurde bei einer Frequenz von  $1 \text{ kHz}$  ausgewertet. Die berechneten Werte wurden auf den Impedanzbetrag bei einer Leitfähigkeit der Membran von  $1 \times 10^{-7} \text{ S m}^{-1}$  normiert.



Um die berechneten Parameter zur Zellvitalität signaltechnisch zu erfassen, wurden Auswirkungen von Modellsubstanzen auf das Zellsystem bzw. Modellszenarien betrachtet. Änderungen der Zellgröße und des Zell-Substratabstands wurden während der Zelladhäsion untersucht. Zellmembranänderungen wurden durch die Testsubstanzen Triton-X-100 und Polymer bzw. Polymer-DNA Komplexe realisiert.

### Signaltechnische Erfassung der Zelladhäsion

Durch numerische Berechnungen wurde gezeigt, welche Auswirkungen eine Zellgrößenänderung bzw. eine Reduktion des Zell-Substratabstands auf die Impedanz haben kann (Abb. 7.12). Änderungen des Zellsystems in der Größe (starke Ausdehnung, Schrumpfung) und in dem Abstand zum Substrat (Ablösen adhärenter Zellen) können beispielsweise dazu dienen, die Vitalität eines Zellproduktionssystems zu beurteilen.



**Abb. 7.14** Zeitlicher Verlauf der Zelladhäsion einer positionierten Arpe-19 Zelle: Korrelation von Phasenkontrastbildern und der elektrischen Signalerfassung bei 1 kHz.

Der sprunghafte Anstieg der Impedanz bei 0 min korreliert mit dem Erscheinen der Einzelzelle über dem Loch. Der weitere Anstieg der Impedanz kann durch das Anhaften und Ausbreiten der Zelle auf der Chipmembran beschrieben werden. Der Anhaftungs- und Adhäsionsprozess ist in den Phasenkontrastbildern zu erkennen. Zusätzlich zu der positionierten Zelle erscheint im Mikroskopbild nach 6 min eine weitere Zelle, welche sich auf der Chipmembran absetzt. Die Größenänderung der immobilisierten Zelle wurde in den Bildern gekennzeichnet (Maßbalken = 25  $\mu\text{m}$ ). Die Impedanzparameter wurden auf die Werte bei  $\Delta t = 0 \text{ min}$  normiert ( $|Z| = 182,15 \text{ k}\Omega$ ;  $\varphi = -21,37^\circ$ ). Nach Kurz et al. (Kurz, 2011a).

Um sowohl eine Zellgrößenänderung als auch eine Veränderung des Zell-Substratabstands elektrisch in einem Array-Chip-System zu erfassen, wurde die Zelladhäsion einer adhären wachsenden Zelle nach der Positionierung auf dem Mikroloch untersucht (Abb. 7.14). Dabei verringerte sich beim Anwachsen der Zelle auf der Chipmembran der Zell-Substratabstand und gleichzeitig ergab sich durch die Abplattung der Zelle eine größere Zellfläche, welche das Mikroloch bedeckte.

Die dargestellte normierte Impedanz bei einer Frequenz von 1 kHz wies einen stabilen und konstanten Wert sowohl in Betrag ( $|Z_{\text{norm}}| \approx 0,63$ ) als auch im Phasengang ( $\varphi_{\text{norm}} \approx 8^\circ$ ) für  $\Delta t < 0$  min auf. Bei 0 min wurde die Arpe-19 Zelle auf das Mikroloch gezogen. Die Phase und der Betrag zeigten dabei eine sprunghafte Änderung, wobei die Phase fiel und der Betrag stieg. Die Impedanzparameter wurden auf die Werte bei  $\Delta t = 0$  min normiert. Nach dem Einfangen der Zelle auf dem Mikroloch zeigten die Phasenkontrastbilder ein Ausbreiten und Anhaften der Zelle auf der  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran. Die Änderungen der zellbedeckten Membranfläche am Mikroloch und der Impedanz während der Adhäsion wurden in Tabelle 10 aufgelistet. Die beiden Impedanzparameter erreichten bei etwa 8 min nach der Positionierung eine Sättigung ( $|Z_{\text{norm}}| \approx 1,91$ ;  $\varphi_{\text{norm}} \approx -23^\circ$ ).

**Tabelle 10 Auflistung der Größenänderung der Zelle sowie die Änderungen der Impedanzparameter während der Zelladhäsion. Parameter entnommen aus Abb. 7.14.**

Der Zell-Substratabstand  $g$  wurde aus dem Vergleich der unnormierten Impedanzbeträgen  $|Z|$  der Simulationsergebnisse aus Abb. 7.12 (Mathematische Erweiterung auf  $g = 1,5 \mu\text{m}$ ) mit den Messergebnissen aus Abb. 7.14 ermittelt.

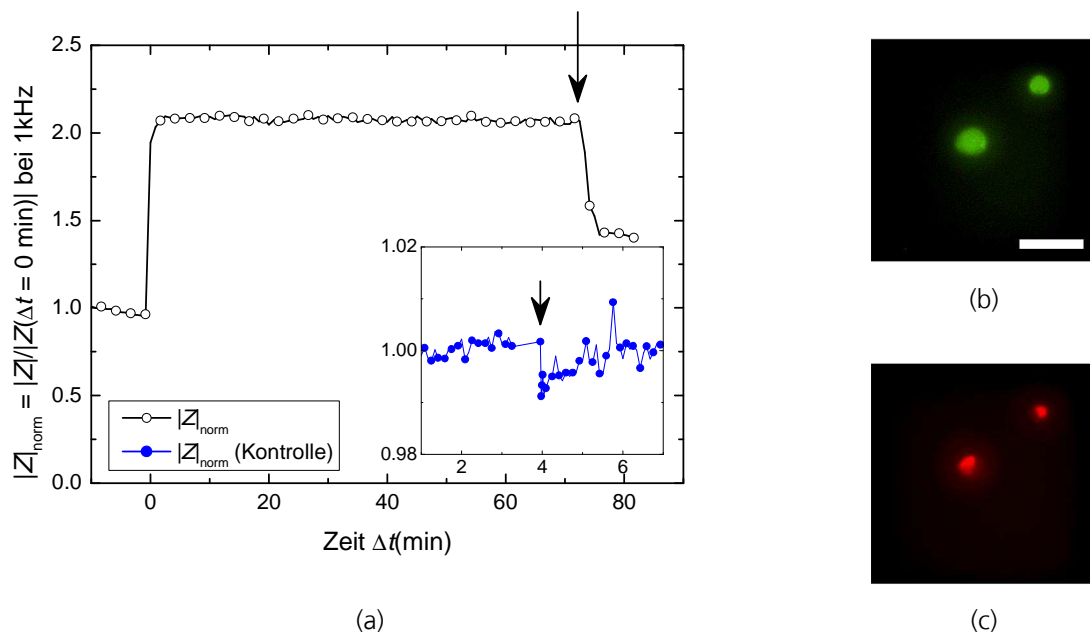
Zeit $\Delta t$ (min)	Zellradius $r_{\text{zelle}}$ ( $\mu\text{m}$ )	Zell-Substratabstand $g$ ( $\mu\text{m}$ )	Normierter Betrag $ Z _{\text{norm}}$	Normierte Phase $\varphi_{\text{norm}}$ ( $^\circ$ )
0	9,79	0,96	1	0
2	11,23	0,65	1,55	-13,44
6	14,09	0,60	1,89	-22,44
8	15	0,61	1,91	-22,60

### Echtzeiterfassung von Membrangängigkeiten und Membranperforationen

Um neben der Zellgröße und des Zell-Substratabstands auch Membranänderungen und Perforationen zu erfassen, wurden Modellsubstanzen eingesetzt. Somit konnte die Vitalität auch über das Membranverhalten beurteilt werden.

Das Detergens Triton-X-100 wurde eingesetzt, um Membranen unfixierter Zellen zu permeabilisieren. Eine permeabilisierte Membran ist ein Zeichen einer verminderten Vitalität. Zusätzlich wurden die Messergebnisse über eine Lebend/Tot-Färbung validiert

(Abb. 7.15). Beim Positionieren der Zelle (bei 0 min) war wiederum das bereits oben beschriebene charakteristische Sprungverhalten der Impedanz zu erkennen. Die Normierung des Impedanzbetrags wurde auf den Wert ohne eingefangene Zelle bezogen. Dabei war schon ungefähr 5 min nach der Zellpositionierung ein stabiles Verhalten der Impedanzparameter zu erkennen (Abb. 7.15a). Der konstante Wert des normierten Betrags betrug 2,08. Bei  $\Delta t = 74$  min wurde das Medium gegen die 0,5 %-ige Triton-X-100 Lösung getauscht, was wiederum eine direkte sprunghafte Antwort in der Impedanz zeigte. Dabei fiel der Impedanzbetrag  $|Z|_{\text{norm}}$  auf einen Wert von 1,4 ( $\Delta|Z|_{\text{norm}} \approx 0,7$ ). Die Lebend/Tot-Färbung zeigte vor der Triton-X-100 Applikation grün fluoreszierende Zellen (Abb. 7.15b, vitale Zellen) und nach der Triton-X-100 Zugabe rot fluoreszierende Zellkerne (Abb. 7.15c, tote Zellen).



**Abb. 7.15 Zugabe einer 0,5 %-igen Triton-X-100 Lösung zu einer positionierten Arpe-19 Zelle bei  $\Delta t = 74$  min. Die Impedanz wurde auf das System ohne Zelle normiert.**

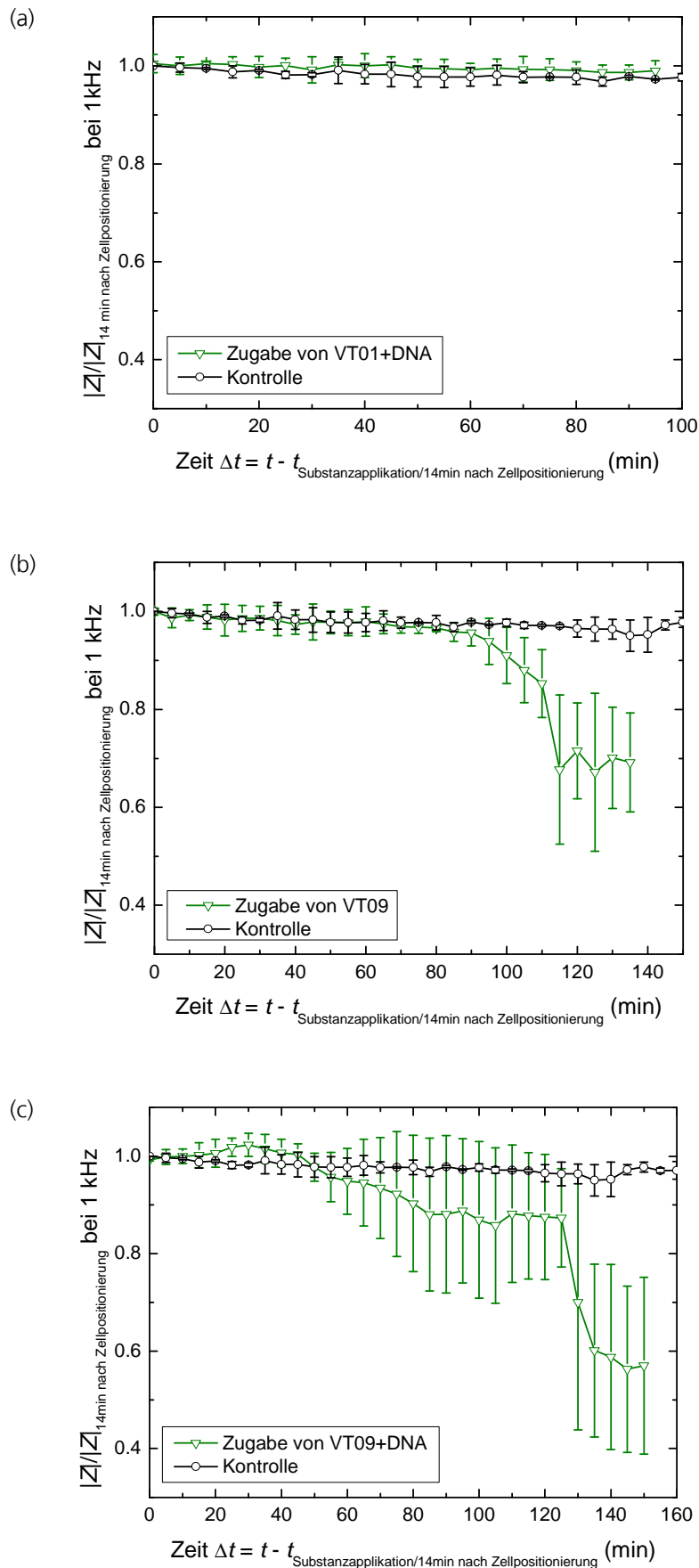
(a) Impedanzverlauf bei der Zellpositionierung, Zelladhäsion und der Applikation von Triton-X-100. Der Impedanzbetrag zeigt ein ähnlich sprunghaftes Verhalten bei der Zellpositionierung wie in Abb. 7.14. Nach der Applikation von Triton-X-100 (durch Pfeil markiert) zeigt der Betrag wiederum eine direkte sprunghafte Antwort. Die Kontrolle zeigt den Einfluss des Medienwechsels ohne Anwesenheit einer Zelle auf den Impedanzbetrag. Bei dieser Messung wurde das Zellkulturmedium durch die Triton-X-100 Lösung bei  $\Delta t = 4$  min ersetzt (durch den Pfeil markiert). Die Lebend/Tot-Färbung mittels Fluoresceindiacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI) zeigt (b) vor der Triton-X-100 Zugabe FDA-positive Zellen (Maßbalken = 25  $\mu\text{m}$ ), (c) nach Triton-X-100 Applikation PI-positive Kernfärbungen.

Eine Kontrollmessung diente zur Untersuchung der Auswirkung des Medienwechsels auf die Impedanz (Abb. 7.15a). Die Kontrolle zeigte, dass der Austausch des Zellkulturmediums gegen die Triton-X-100 Lösung (gekennzeichnet durch den Pfeil) zu einem vorü-

bergehenden Einbruch des Impedanzbetrags um etwa 0,01 führte. Der normierte Betrag stieg daraufhin wiederum an und näherte sich dem ursprünglichen Wert vor der Applikation an. Abgesehen von der nur ca. eine Minute andauernden geringfügigen Impedanzänderung scheint die Zugabe von Triton-X-100 keinen Einfluss auf die Impedanz des Kulturmediums gehabt zu haben. Die in Abb. 7.15 (obere Kurve) dargestellte Änderung der Impedanz ist daher ausschließlich auf die Zellmembranperforationen zurückzuführen. Somit können Vitalitätsänderungen, speziell Membranperforationen, induziert durch stark toxische Substanzen auch ohne optische Fluoreszenzmarkierungen detektiert werden.

Um auch geringe Membraninteraktionen zu untersuchen, wurden Polymer und Polymer-DNA-Komplexe als Testsubstanzen verwendet. Die Impedanzverläufe nach der Applikation von Polymerlösungen bzw. Polymer-DNA Komplexlösungen zeigen, dass nach der Zugabe der Polymer- bzw. Polyplexlösung keine direkte Änderung des Impedanzbetrags zu erkennen ist (Abb. 7.16). Der Vergleich des Impedanzbetrags nach der Applikation von VT01+DNA und der Kontrolle zeigt über den kompletten Zeitraum keine nennenswerten Unterschiede (Abb. 7.16a). Der normalisierte Impedanzbetrag der Kontrolle und der VT09-Zugabe wiesen innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 80 min gleiche Verläufe auf (Abb. 7.16b). Auch bewegte sich die Standardabweichung im selben Wertebereich. Im Bereich von 80 min bis 115 min sank der normalisierte Impedanzwert nach der VT09-Zugabe von nahe 1 auf einen Wert von ungefähr 0,7 ab und blieb daraufhin stabil. Dieser starke Abfall lässt die Vermutung zu, dass ähnlich der Triton-X-100 Applikation, eine Membranschädigung aufgetreten war.

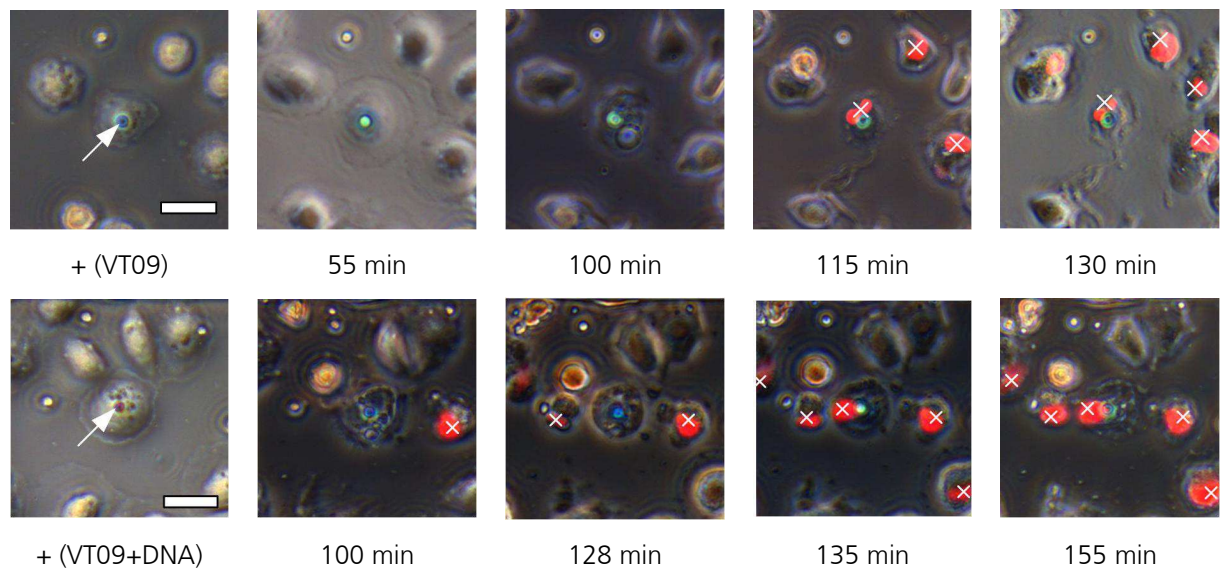
Der tendenzielle Impedanzverlauf nach VT09+DNA-Zugabe zeigte zunächst einen Anstieg auf 1,03 bei 30 min und fiel danach ab, wobei die Standardabweichung zunahm (Abb. 7.16c). Zwischen 85 min und 125 min wurde ein Plateau bei einem Wert von 0,85 erreicht. Ein weiterer Abfall von 125 min bis 140 min folgte, wobei ein Wert von 0,55 erzielt wurde, welcher danach stabil blieb. Der Vergleich dieses Verlaufs mit den theoretischen Untersuchungen und der Triton-X-100 Applikation ließ die Annahme zu, dass zunächst eine Größenänderung oder eine Änderung des Zell-Substratabstands für die Änderung der Impedanz bis 125 min verantwortlich war und danach die Membran der positionierten Zelle permeabilisiert wurde.



**Abb. 7.16** Verlauf des Betrags der Impedanz nach Polymer bzw. Polymer-Komplex Applikation. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden aus drei Experimenten ermittelt.

In allen Diagrammen diente Zellmedium mit positionierter und adhärierter Arpe-19 Zelle als Kontrolle. Die gemessenen Impedanzbeträge  $|Z|$  wurden alle auf den gemessenen Betragswert bei 14 min normiert. Die zeitliche Referenz für die Zeitnahme  $\Delta t$  ist für die Kontrolle 14 min nach der Zellpositionierung ( $t_{14 \text{ min nach Zellpositionierung}}$ ) und für die Applikation der Agenzien der Applikationszeitpunkt ( $t_{\text{Substanzapplikation}}$ ). Nach Zugabe von (a) VT01+DNA, von (b) VT09 und von (c) VT09+DNA. Nach Kurz et al. (Kurz, 2011a).

Die Impedanzverläufe nach Zugabe von VT09 und VT09+DNA wurden zusätzlich mit einer Tot-Färbung überprüft. Die Propidiumiodid (PI)-Färbelösung wurde der Polymer-, Polyplex-Lösung beigemischt. PI kann in Zellen mit geschädigter Zellmembran eindringen und in die DNA interkalieren. Somit kann eine geschädigte Zellmembran durch einen rot fluoreszierenden Zellkern (rote Färbungen, weiße Kreuze in Abb. 7.17) detektiert werden. Die Fluoreszenzbilder wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommen und den Phasenkontrastbildern überlagert (Abb. 7.17). Nach VT09-Zugabe zeigte die immobilisierte Zelle auf dem Mikroloch (Pfeil markiert in Abb. 7.17) eine PI-positive Kernfärbung nach 115 min. Auch andere Zellen neben der positionierten Zelle zeigten PI-positive Kernfärbungen. Zusätzlich wiesen alle Zellen auf der Chipmembran nach der Polymerapplikation eine starke Veränderung in ihrer Morphologie auf. 100 min nach Zugabe von VT09+DNA zeigten die ersten Zellkerne eine PI-positive Kernfärbung, jedoch nicht die immobilisierte Zelle. Diese zeigte erst nach 135 min eine PI-Kernfluoreszenz. Nach der Applikation von VT09+DNA waren wiederum morphologische Änderungen sichtbar, jedoch nicht so ausgeprägt wie im Falle der VT09-Zugabe.



**Abb. 7.17 Mikroskopische Aufnahmen (Phasenkontrast überlagert mit PI-Fluoreszenz) einer immobilisierten Zelle neben anderen Zellen auf der Siliziumnitridmembran (Maßbalken = 25 µm).**

Nach Applikation von Polymer (VT09) bzw. Polymerkomplex (VT09+DNA) und Zugabe von Propidiumiodid (PI) auf die immobilisierte Einzelzelle (in den linken Bildern durch einen Pfeil markiert) wurde das Zellverhalten mikroskopisch beobachtet. Nach VT09-Zugabe konnte eine Zellschrumpfung ab 55 min über den kompletten zeitlichen Verlauf festgestellt und nach 115 min eine Zellmembranperforierung erkannt werden (rot gefärbter und durch Kreuz markierter Zellkern). Nach VT09+DNA-Zugabe konnte erst nach 135 min ein gefärbter Zellkern der immobilisierten Zelle erkannt werden, wobei die Zellgröße sich nur minimal verändert hatte. Neben der immobilisierten Zelle weisen auch andere Zellen eine PI-positive Kernfärbung (durch Kreuze markiert) auf. Modifiziert nach Kurz et al. (Kurz, 2011a).

Bemerkenswert ist, dass der steile Abfall des Impedanzbetrags früher zu detektieren ist als die Rotfärbung des Zellkerns. Das deutet darauf hin, dass das impedanzgestützte Verfahren sensitiver ist als die Nachweismethode mittels PI-Färbung. Auch die zwischen 30 min und 85 min aufgetretene Änderung des Impedanzbetrags nach der VT09+DNA-Zugabe konnte durch die PI-Zugabe nicht nachgewiesen werden. Dabei können möglicherweise Membrantransportvorgänge ohne Membranperforation oder Zellgrößenänderungen für diesen Impedanzverlauf verantwortlich gewesen sein.

Somit ließen sich mithilfe der elektrischen Sensoreinheit nicht-invasiv Zellparameter, die die Zellvitalität widerspiegeln, über einen längeren Zeitraum (~ 3 Stunden) beobachten und aufzeichnen. Gerade im Hinblick auf die Zielanwendung dieser Arbeit, nämlich die Herstellung therapeutischer Proteine, sind Informationen über die Zellvitalität, neben einer hohen Produktion, ein entscheidendes Kriterium für die Zellauswahl. Die elektrisch erfassten Daten im Zusammenspiel mit den mikroskopischen Aufnahmen konnten neben morphologischen Zelländerungen auch Membranperforationen erfassen. Folglich können tote Zellsysteme schnell mittels der Impedanz erkannt werden und für die nachfolgenden Analyseverfahren zur Ermittlung der Produktivität und Proliferation ausgeschlossen werden. Dadurch kann der Durchsatz gesteigert werden, da die Anzahl der Zellen durch den Impedanzschritt verringert wird.

### **7.3.2. Relevanter Parameter 2: Produktivität**

Neben der Zellvitalität ist die Produktionseigenschaft ein wichtiger Parameter für ein Zellproduktionssystem zur Herstellung von therapeutischen Proteinen. Nur eine Zelllinie mit einer permanent hohen Produktion von beispielsweise 50 – 90 pg pro Zelle und Tag kann später auch eine große Ausbeute an therapeutischen Proteinen erzielen (Wurm, 2004).

Für die Abschätzung der Produktivität wurden zwei Modellzelllinien eingesetzt. Zum einen wurden CHO-DG44 pTracer Zellen zum anderen 54K(1)-5 Hybridomzellen verwendet. Die CHO-Zellen exprimieren das grün fluoreszierende Protein (GFP), welches sich im intrazellulären Raum befindet und zur Beurteilung der Produktivität diente. Die Hybridomzellen sekretieren den Antikörper mAK54K, welcher zur Beurteilung der Produktivität dieser Zelllinie dienen soll. Um die Produktivität einzelner Zellen zu beurteilen, wurden bildbasierte Verfahren eingesetzt. Dabei bestand die größte Herausforderung darin, die Diffusionsstrecke des Antikörpersekrets zu minimieren, um den einzelnen

Zellen genau ihre Menge an produzierten Antikörper zuordnen zu können. Auch musste eine chipbasierte Kultivierung möglich sein, um über den Kultivierungszeitraum eine Anreicherung der Sekretmenge pro Zelle zu erhalten, und damit über gängige Methoden quantifizierbar zu machen.

### **Zielprotein: GFP**

Zur Quantifizierung des im intrazellulären Raum befindlichen grün fluoreszierenden Proteins diente die selbst entwickelte Software aus Abb. 5.8 (s. auch Abb. A.5 im Anhang). Die Auswertung der Experimente sollte automatisiert erfolgen, um die Detektion von hoch-produzierenden Zielzellen aus einer großen Menge an Ausgangszellen zu ermöglichen, die Analysezeit zu beschleunigen und reproduzierbare Ergebnisse zu erlangen. Die Software arbeitet nacheinander alle Chippositionen, an denen Zellen abgelegt sein können, ab. Dazu unterteilt sie zunächst den Array-Chip in gleich große Felder, wobei jeweils das Mikroloch mit positionierter Zelle im Zentrum lag. Für die Quantifizierung der Proteinmenge pro Zelle wurde auf Basis des Fluoreszenzbilds in jedem Feld eine Pixelsumme durchgeführt. Damit dieses Vorgehen fehlerfrei arbeitet, muss die Software in der Lage sein, Felder mit mehr als einer Zelle (Mehrfachbelegungen) zu detektieren (s. Abb. 5.8). Folglich musste eine automatische Erkennung von Mehrfachbelegungen in der Softwareroutine implementiert werden und Felder mit einer solchen Belegung von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Für die Entscheidung ob ein Feld mehrfach belegt ist, zog der Algorithmus neben der Anzahl der Partikel pro Feld auch die Zellgröße (Zellagglomerate) heran. Für die Ermittlung des Fehlers, welchen der Algorithmus zur automatisierten Erkennung von Mehrfachbelegungen macht, wurden vier unterschiedlich dicht belegte Array-Ausschnitte gewählt (~ 2000 ausgewertete Zellen). Es wurden sowohl die richtig/falsch Zuordnung (Software entscheidet korrekte Belegung bei einer fehlerbehafteten Belegung) als auch die falsch/richtige Zuordnung (Software entscheidet fehlerhafte Belegung bei einer korrekten Belegung) ermittelt. Dazu wurden die Array-Ausschnitte mittels der Software ausgewertet und anschließend die Ausgabe manuell überprüft (Tabelle 11).

Für die quantitative Analyse der Proteinproduktion wurde die Pixeladdition nach Gleichung (5-4) berechnet. Das bildbasierte Verfahren gibt als Ausgabe neben der Pixelsumme, die Zellgröße mit der zugehörigen Positionierungsstelle zurück. Damit ist es möglich Punktauftragungen zu erzeugen, die die Pixelsumme zum einen in Relation zur



Positionierungsstelle zum anderen zur Zellgröße setzen (Abb. 7.18a und b). Die Auftragung der Pixelwerte über der Lochposition zeigt, dass zwischen  $6 - 8 \times 10^4$  eine Häufung der Zellen zu finden ist. Die Grenze für hoch-produzierende CHO-Zellen lag in dieser Arbeit bei  $10 \times 10^4$ . Um die Verteilung der Proteinproduktion darzustellen, wurde ein Histogramm entwickelt (Abb. 7.18c). Dazu wurde der Raum der Pixeladdition aus Abb. 7.18a in gleich große Bereiche unterteilt [ $(4 < z \leq 4,5; 4,5 < z \leq 5; \dots) \times 10^4$ ]. Das Histogramm zeigt, dass die GFP-Produktion der Zellen etwa einer Gaußverteilung entspricht. Unterhalb einer Pixelsumme von  $5 \times 10^4$  waren kaum Zellen zu finden. Oberhalb einer Pixelsumme von  $10 \times 10^4$ , welche den Bereich Zellen hoher Produktivität eingrenzt, sinkt die Auftretswahrscheinlichkeit unter 4 %. Zwischen den Pixelsummen  $6 - 8 \times 10^4$  sind die meisten eingefangenen Zellen zu finden.

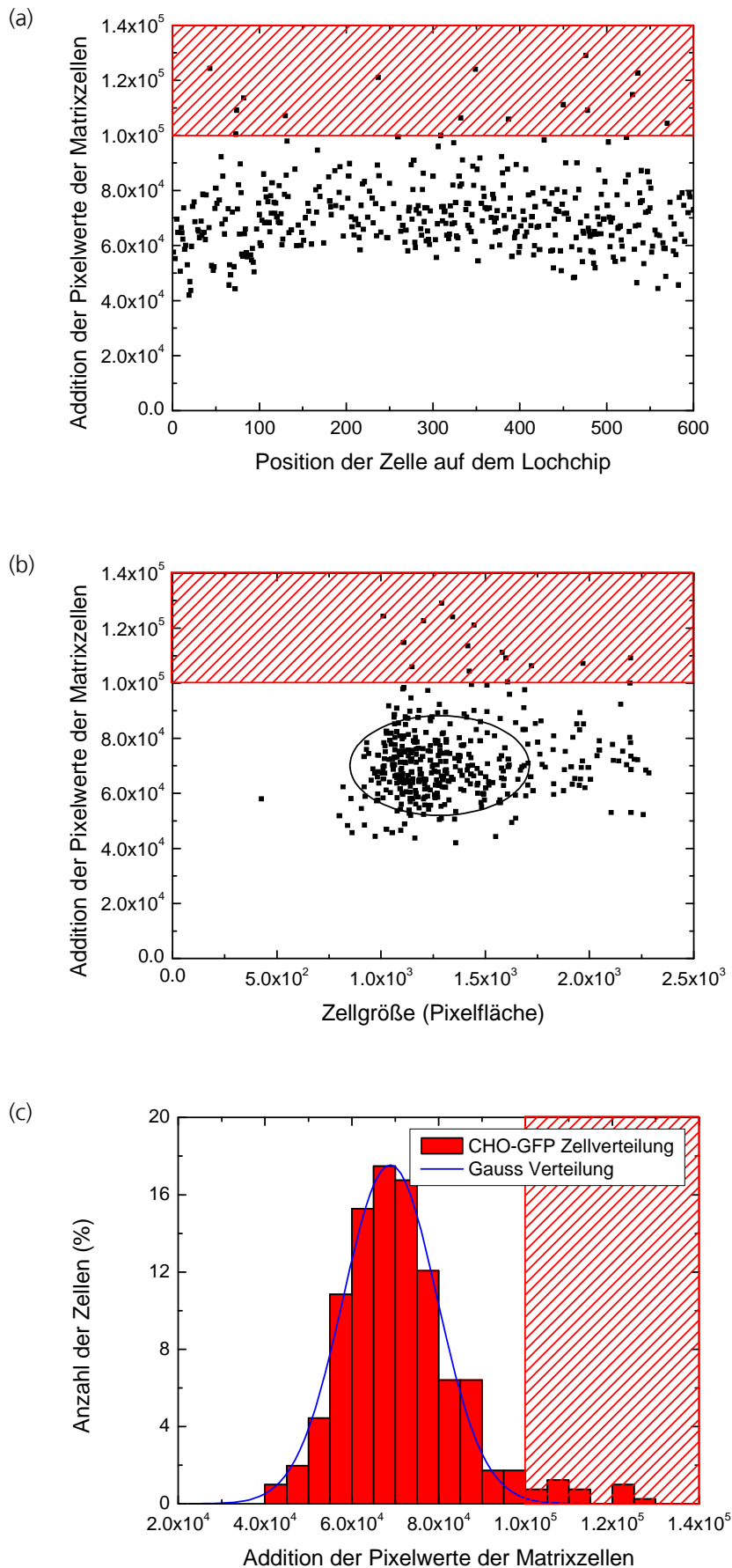
**Tabelle 11 Fehlerabschätzung der Bildverarbeitungssoftware durch die Auswertung der falschen Zuordnungen eines Matrixfelds.**

Unter einer richtig/falschen Zuordnung ist eine fehlerhafte Belegung zu verstehen, wobei die Software sich auf eine korrekte Belegung festlegt. Bei einer falsch/richtigen Zuordnung entscheidet sich die Software für eine fehlerhafte Belegung, obwohl die Belegung korrekt ist.

	Ausschnittslage	Belegungsdichte	Richtig/falsch	Falsch/richtig
Chip 1	Ecke	67 %	1,04 %	2,86 %
Chip 2	Seite	75 %	1,33 %	4,67 %
Chip 3	Zentrum	86 %	2,34 %	2,00 %
Chip 4	Zentrum	95 %	2,11 %	5,79 %
			$1,70 \pm 0,62$ %	$3,83 \pm 1,71$ %

Die Auftragung der Pixelsumme über der Zellgröße zeigt, dass keineswegs große Zellen die höchste Produktion besitzen. Kleine Zellen zeigten hingegen eine geringe Proteinproduktion. Zellen mit einer Pixelfläche von  $1 - 1,5 \times 10^3$  beinhalteten die besten Produktionssysteme. Zusätzlich wurde in dieser Punktauftragung versucht eine Zellpopulation (Bereich der höchsten Zelldichte) festzulegen und einzugrenzen. Anhand dieser Grafiken und der von der Software hinterlegten Informationen kann direkt die Zelle mit der größten und niedrigsten GFP-Expression ermittelt und zusätzlich die Position auf dem Array abgelesen werden.

Durch das Verwenden einer automatisierten Analyse konnten hoch-produzierende Zellen sehr präzise, reproduzierbar und schnell aus einer großen Zellmenge identifiziert und gleichzeitig deren Array-Position abgelesen werden. Die Analysezeit für einen  $35 \times 35$  Array betrug 5 s. Somit wurde die Proteinmenge einer Zelle in etwa 4 ms ermittelt.



**Abb. 7.18** Quantitative Abschätzung der intrazellulären GFP-Expression der positionierten CHO-Zellen auf den Mikrolöchern mittels der selbst entwickelten Software routine.

CHO-Zellen wurden auf den Mikrolöchern des Array-Chips positioniert. Über die selbst entwickelte Software wurde die Proteinproduktion der Zellen mittels einer Pixeladdition analysiert. (a) Punktauftragung der GFP-Expression (Pixeladdition) pro Zelle bezogen auf die jeweilige Position der Zelle auf dem Array. Die Position der Zellen auf dem Chip wurden wie in Abb. 5.8 bestimmt. Für die Ermittlung der Intensität wurde die Pixelwertaddition nach Gleichung (5-4) berechnet. (b) Auftragung der Pixelwertaddition über der Zellgröße sowie eine Eingrenzung der Zellpopulation größter Zelldichte. (c) Histogrammdarstellung der GFP-Fluoreszenzintensität pro Zelle extrahiert aus a). Dabei wurde eine Einteilung der Intensität in gleich große Intervallbereiche ( $4 - 4,5$ ;  $4,5 - 5$ ; ...)  $\times 10^4$  genutzt, um die Zelhäufigkeit in den ermittelten Bereichen zu erhalten. In allen Diagrammen wurde zusätzlich der Bereich der hoch-produzierenden Zellen eingegrenzt (rot schraffiert).

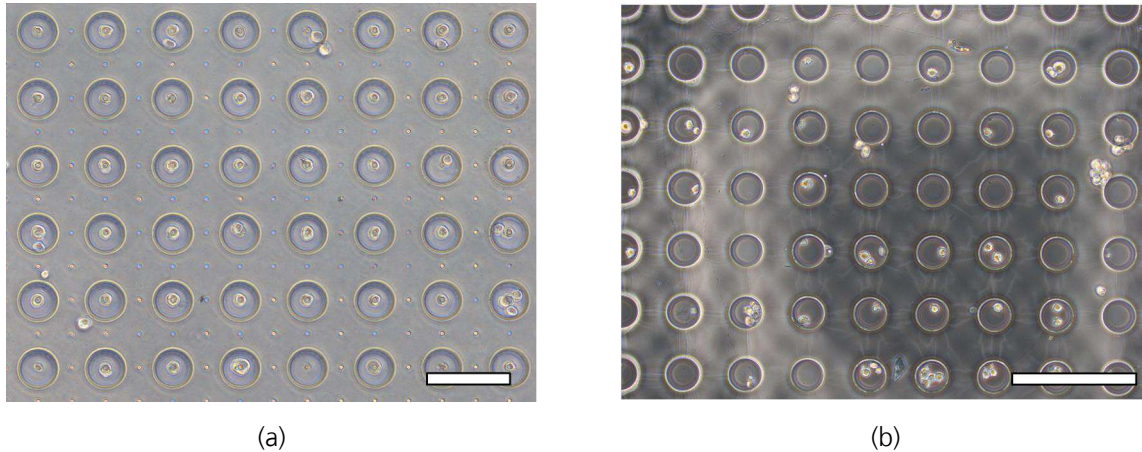
## Zielprotein: Antikörper

Für die Einordnung der Produktivität von Zellen nach ihrer Antikörperproduktion musste ein Weg gefunden werden, die Antikörpermenge, welche in den extrazellulären Raum transportiert wird, den jeweiligen Zellen zuzuordnen. Dazu war es zwingend erforderlich, die Diffusionsstrecke des Sekrets zu minimieren. Da die Antikörper keine optische Markierung tragen, musste ferner das Sekret sichtbar gemacht werden, um überhaupt eine Quantifizierung der Sekretmenge über bildbasierte Verfahren vornehmen zu können. Außerdem musste garantiert werden, dass eine ausreichende Menge des Analyseprodukts vorliegt, um über geeignete Messmethoden die Quantifizierung der Menge vornehmen zu können.

Für die Verringerung der Diffusionsstrecke des Sekrets wurde die Viskosität des verwendeten Mediums erhöht. Bei der Vereinzelung der Hybridomzellen auf dem Array-Chip unter Verwendung von höherviskosem Medium wurde zunächst versucht die Hybridomzellen in dem höherviskosen Medium zu rezipieren und danach auf den Mikrolöchern zu positionieren. Jedoch war durch das höherviskose Medium und die damit zusammenhängende längere Positionierungsdauer dieses Vorgehen ungeeignet und führte zu einer erhöhten Zellmortalität während der Positionierung. Darum wurde die Zellpositionierung in flüssigem Zellmedium (R10-Medium) durchgeführt und anschließend das Medium nach und nach durch die Applikation eines höherviskosen Gels ersetzt. Bei diesem Vorgehen musste die Chipplattform verändert werden, da sich zeigte, dass bei der Zugabe des höherviskosen Mediums bereits positionierte Zellen durch das absinkende Gel von den Mikrolöchern heruntergedrückt wurden. Folglich führte der Austausch des flüssigen „Positioniermediums“ gegen das höherviskose Medium zu einer Entpositionierung der vereinzelt Zellen auf dem Mikrolocharray. Um das Entpositionieren zu unterbinden, wurden zusätzlich um die Positionierstellen (Mikrolöcher) Begrenzungsstrukturen in Form von SU-8 Kavitäten aufgesetzt.

Zunächst wurden zwei verschiedene Chipaufbauten bezüglich ihres Einflusses auf die Vereinzelung der Zellen in den Kavitäten untersucht (Abb. 7.19): 1) Kombination der Kavitäten mit den Mikrolöchern und 2) Kavitäten allein, d. h. ohne Mikrolöcher. Es zeigte sich, dass durch die aktive Positionierung mittels Unterdruck eine sehr gute Vereinzelung erzielt werden konnte (Abb. 7.19a). Es waren kaum Mehrfachbelegungen oder Fehlstellen in den Kavitäten vorhanden. Auch war die Anzahl der Zellen, welche auf der SU-8 Schicht zwischen den Kavitäten zu liegen kamen, sehr gering. Eine Gelapplikation

war möglich, ohne dass die vereinzelt Zellen aus den Kavitäten gespült worden sind. Im Vergleich dazu war eine Vereinzelung in den Kavitäten ohne die zusätzliche Positionierung mittels der Mikrolöcher praktisch nicht möglich. Es zeigten sich viele Mehrfachbelegungen und Fehlstellen in den Kavitäten (Abb. 7.19b).

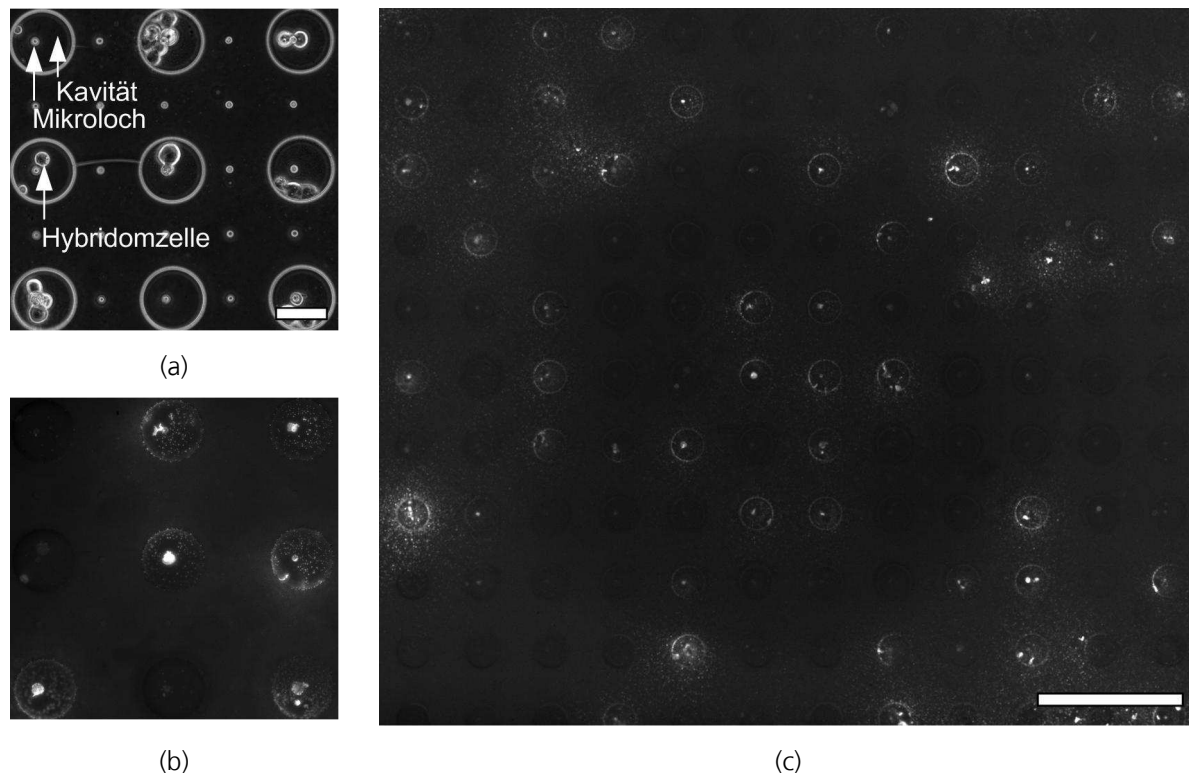


**Abb. 7.19 Darstellung von abgelegten Zellen in den SU-8 Kavitäten mit und ohne aktiver Positionierungstechnik/Mikrolöchern.**

(a) Kombination der Mikrolöcher mit den Kavitäten bei der Positionierung:  $5 \times 10^5$  Hybridomzellen in  $600 \mu\text{l}$  flüssigem Zellkulturmedium wurden auf den Chip aufgebracht, mittels Unterdruck positioniert und das Zellkulturmedium gegen das höherviskose Medium ausgetauscht. Es sind fast ausschließlich richtig abgelegte Zellen zu erkennen. (b) Einsatz nur der Kavitäten:  $5 \times 10^5$  CHO-Zellen in  $600 \mu\text{l}$  wurden auf den Chip aufgebracht. Nach erfolgter Sedimentation wurde die Vereinzelung der Zellen in den Kavitäten beurteilt. Es ist zu erkennen, dass viele der Kavitäten Fehlstellen bzw. Mehrfachbelegungen aufweisen (Maßbalken =  $100 \mu\text{m}$ ).

Um die Menge des Antikörpersekrets quantifizieren zu können und so die Produktivität der Zellen zu beurteilen, wurde das höherviskose Medium mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper versetzt (Kapitel 5.2.5). Nach der Vereinzelung der Zellen in den Mikrokapazitäten und der Zugabe des höherviskosen Mediums mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper, wurde die gesamte Chipoberfläche mikroskopisch untersucht und Mehrfachbelegungen, welche einen heterogenen Zellklon hervorrufen würden, markiert und von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Nach einer anschließenden 3-tägigen Inkubation konnte eine deutliche Akkumulation des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers erkannt werden (Abb. 7.20). Dabei konnte die Inkubation ohne permanenten Positionierungsdruck erfolgen. Die Ausschüttung des Zielproteins war im Fluoreszenzbild deutlich erkennbar. Es zeigte sich, dass die Ansammlung des Zielproteins (Antikörpersekret) vor allem am Rand der SU-8 Kavitäten, zwischen den Zellen und im Mikroloch erfolgte (Abb. 7.20b). An diesen Stellen war das Fluoreszenzsignal deutlich

stärker. Im intrazellulären Raum war kein Signal zu finden. Nach der 3-tägigen Inkubation war noch keine Kreuzkontamination, d. h. ein Vermischen der Fluoreszenzsignale benachbarter Zellklone, zu erkennen (Abb. 7.20b und c). Folglich war eine Quantifizierung des Antikörpersekrets über die Intensität des Fluoreszenzsignals und eine Zuordnung zu dem jeweiligen Zellklon, zumindest bei dem hier verwendeten Chip mit einem Kavitätendurchmesser von 60  $\mu\text{m}$  und einem Pitch von 120  $\mu\text{m}$ , möglich.



**Abb. 7.20** Abgelegte Hybridomklone in höherviskosem Medium in den SU-8 Mikrokavitäten. Nach einer 3-tägigen Inkubation kann die Akkumulation des Antikörpersekrets über den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper deutlich erkannt werden.

(a) Phasenkontrastbild der abgelegten Hybridomzellen in den SU-8 Kavitäten nach 3-tägiger Inkubation in höherviskosem Medium. Es zeigte sich eine deutliche Proliferation. (b) Fluoreszenzbild des Mikrokavitätenausschnitts aus a). Die sekretierten Antikörper sind deutlich über den zugegebenen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper sichtbar und können dem jeweiligen Zellklon gut zugeordnet werden (Maßbalken = 50  $\mu\text{m}$ ). (c) Fluoreszenzbild eines größeren Ausschnitts des Kavitätenarrays mit Mikrolöchern. Auch hier ist das Fluoreszenzsignal des Sekundärantikörpers gut detektierbar und den jeweiligen Mikrokavitäten, d. h. den jeweiligen Zellklonen gut zuzuordnen (Maßbalken = 250  $\mu\text{m}$ ).

Bei der quantitativen Abschätzung der Produktivität wurde wiederum auf die selbst entwickelte Software zurückgegriffen. Wiederum wurde der Chip in gleich große Felder eingeteilt, bei denen die Mikrokavitäten jeweils im Zentrum lagen. Eine mittlere Pixelsumme wurde daraufhin berechnet, um die Fluoreszenzintensität pro Feld festzustellen. Dabei wurden Kavitäten, welche nach der Vereinzelung und Gelapplikation eine Mehr-

fachbelegung aufgewiesen haben, nicht berücksichtigt. Da sich während der 3-tägigen Inkubation eine Proliferation, d. h. ein Zellwachstum, in den einzelnen Kavitäten ergab (Abb. 7.20a), wurde eine Normalisierung der Intensität auf die Zellzahl pro Kavität durchgeführt.

Somit war es möglich über die modifizierte Chipplattform die Produktivität auch einer sekretierenden Zelllinie zu beurteilen und quantitativ zu erfassen. Es konnten dabei optisch markierte Proteine bildbasiert erfasst werden, welche sich zum einen im intrazellulären Raum befanden, als auch in den extrazellulären Raum abgesondert worden sind. Folglich konnte mittels des realisierten Systems und der entwickelten Auswertesoftware nun neben der Zellvitalität auch der Parameter „Produktion“ ermittelt werden.

### **7.3.3. Relevanter Parameter 3: Zellproliferation**

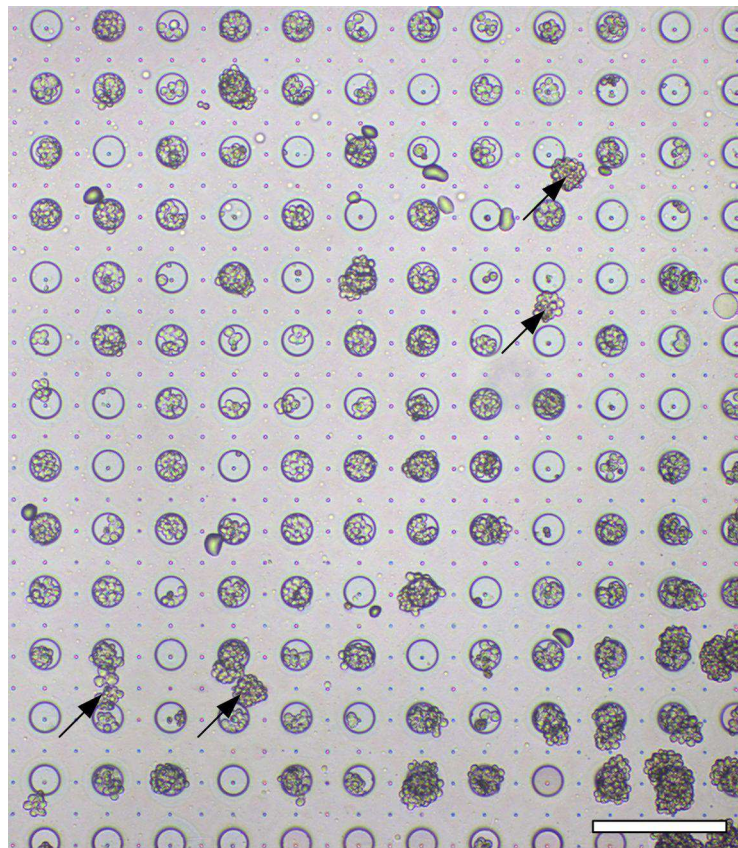
Ein weiterer Parameter für die Selektion von hoch-produzierenden Zelllinien für die Herstellung von therapeutischen Proteinen ist die Zellproliferation, d. h. das Zellwachstum. Nur Zelllinien, die ein permanent hohes Wachstum zeigen, sind auch geeignet für die Akkumulation großer Biomassen. Ein Volumen in einem großen Fermenter kann z. B. 20000 Liter betragen (Birch, 2006).

Durch das Aufsetzen von SU-8 Kavitäten auf die Mikrolochmembran konnte schon nach einer 3-tägigen Inkubation ein Zellwachstum erkannt werden (Abb. 7.20a). Bei dieser chipbasierten Kultivierung konnten die Zellklone durch die SU-8 Begrenzungsstrukturen um die Mikrolöcher ohne permanenten Positionierungsdruck in den Kavitäten gehalten werden.

Um zu prüfen, ob eine längere Kultivierung als 3 Tage auf der Chipoberfläche möglich ist, wurde der Inkubationszeitraum der Zellen auf der Chipoberfläche bis zu 8 Tage ausgedehnt. Nach einer 8-tägigen Inkubation waren viele der Kavitäten mit einzelnen Zellklonen, die typischerweise mehr als 20 Zellen zählten, belegt (Abb. 7.21). Der Chipausschnitt in Abb. 7.21 beinhaltet 168 Kavitäten auf einer Fläche von nur 2,19 mm<sup>2</sup> wobei 114 Kavitäten mit einem Klon belegt waren. Ferner variierten die Proliferationseigenschaften von Klon zu Klon sehr stark, wodurch eine Selektion des Klons mit der geringsten Dopplungszeit, d. h. mit dem schnellsten Wachstum, gut durchführbar wäre. Es war zu erkennen, dass die Höhe der SU-8 Kavitäten von 20 µm möglicherweise nicht optimal war, da z. T. die Zellkolonien nicht mehr in den Kavitäten gehalten werden konnten (Abb. 7.21, durch Pfeile markiert). Ein Ineinanderwachsen benachbarter Klone

war nach einer 8-tägigen Inkubation nur in sehr wenigen Fällen zu erkennen (Abb. 7.21, rechte untere Ecke). Grundsätzlich ist das aufgebaute System also geeignet, um die Proliferationseigenschaften der einzelnen Klone zu erfassen. Momentan geschieht das noch nicht automatisiert durch die Software, sondern durch Zählen der Zellen eines Klons durch den Benutzer.

Folglich gestattet die entwickelte Chipplattform die Charakterisierung eines Zellproduktionssystems anhand von drei verschiedenen Parametern, nämlich der Vitalität, der Produktion und des Wachstums. Alle diese Parameter können nicht-invasiv und auf einem einzigen Chip, teilweise auch parallel zueinander, erfasst werden.



**Abb. 7.21** Hellfeldbild von vereinzelt Hybridomzellen nach einer 8-tägigen Kultivierung in den SU-8 Kavitäten des Mikrolochchips.

Hybridomzellen wurden in Zellkulturmedium angesaugt, das Medium gegen das höherviskose Medium getauscht und die Zellen über einen Zeitraum von 8 Tagen kultiviert. In vielen Kavitäten sind kleine Zellklone zu erkennen. Klone, welche die Kavität verlassen haben oder neben den Kavitäten liegen, sind durch Pfeile gekennzeichnet (Maßbalken = 250  $\mu\text{m}$ ).

## **7.4. Selektion und Systemvalidierung**

Als letzter Schritt schloss sich bei dem aufgebauten Zellselektionssystem die Zellentnahme an. Da in dieser Arbeit nur eine sehr geringe Anzahl der positionierten Zellen isoliert werden sollten, wurden die Zielzellen von dem Chip entnommen und separiert.

Die Zellen wurden dazu auf dem Chip mittels des erwähnten hydrodynamischen Positioniersystems an den definierten Stellen, den Mikrolöchern, abgelegt. Danach kann die Vitalität, Produktivität und das Wachstum der abgelegten Zellen bestimmt werden. Gerade für die Herstellung von therapeutischen Proteinen wurde die Produktivität der generierten Zelllinie als der entscheidende Parameter angenommen, so dass in dieser Arbeit für die Selektion nur die Produktionseigenschaften der Zellen herangezogen wurden. Bei der Selektion wurde auf eine Monoklonalität der Zelllinie geachtet, d. h. die Zelllinie muss aus einer einzigen Zelle hervorgegangen sein. Monoklonale Zelllinien haben aufgrund ihrer Homogenität Vorteile im Vergleich zu heterogenen Populationen. Beispielsweise kann durch eine Heterogenität im Zellstamm die Möglichkeit bestehen, dass schwächere Produktionszellen eine stärkere Proliferation besitzen und somit über einen längeren Zeitraum die hoch-produzierenden Zellen überwachsen, so dass die Ausbeute sinkt (Frame, 1990).

Für die Systemvalidierung wurde die Produktivität der generierten Zellklone mit der Produktivität der Ursprungspopulation verglichen. Für die Selektion und die Systemvalidierung wurden die beiden produzierenden Zelllinien, d. h. die CHO-DG44 pTracer Zellen und die 54K(1)-5 Hybridomzellen, verwendet.

### **7.4.1. Zellentnahme und Expansion der Zellklone**

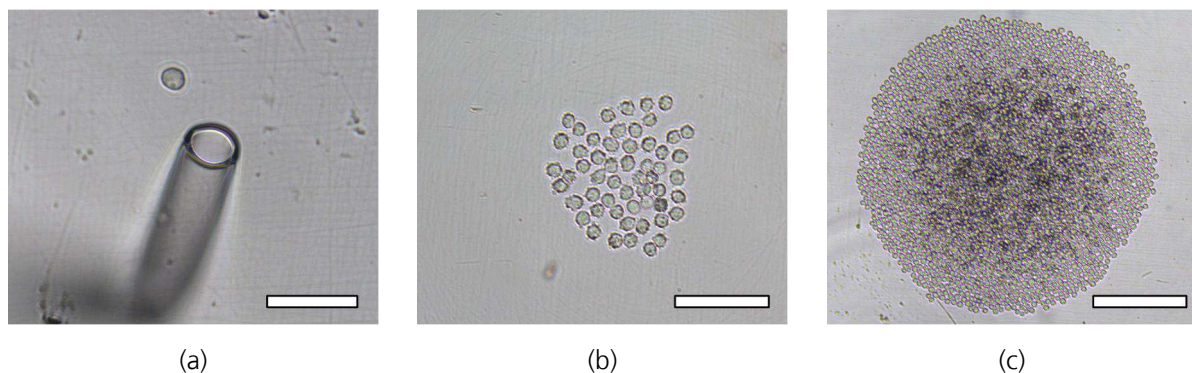
Die Entnahme und Separierung der Zellen wurden mittels einer Kapillare durchgeführt. Dazu wurde die Zielzelle komplett in die Kapillare aufgenommen und in die Kavität einer 96-Lochplatte überführt.

#### **Selektion der CHO-DG44 pTracer Zellen**

Erste Experimente wurden mit den CHO-Zellen durchgeführt, bei denen die Menge des produzierten GFP jeweils anhand einer einzigen Zelle bestimmt werden konnte. In diesem Fall wurden dann auch nur jeweils einzelne Zellen von den Positionierungsstellen des Lochchips entnommen.



Bei der Entnahme der einzelnen CHO-Zellen lag stets der Positionierungsdruck an der Chipunterseite an. Ohne den Positionierungsdruck war zu erkennen, dass die Zellen nicht auf den Positionierungsstellen blieben, und so eine gezielte Entnahme unmöglich war. Es wurden zunächst unterschiedliche Innendurchmesser der Mikrokapillaren von  $\sim 6 \mu\text{m}$ ,  $15 \mu\text{m}$ ,  $30 \mu\text{m}$  und  $40 \mu\text{m}$  verwendet und auf ihre Eignung bei der Zellentnahme der CHO-Zellen, welche im Durchschnitt einen Durchmesser von ungefähr  $14 \mu\text{m}$  hatten, getestet. Es zeigte sich, dass Kapillardurchmesser die kleiner als der Zelldurchmesser oder gleich groß waren, sich für die Zellentnahme nicht eigneten. War der Innendurchmesser kleiner als der Zelldurchmesser, war ein vergrößerter Unterdruck in der Kapillare vonnöten, um die Zellen komplett aufzunehmen. Dies brachte zum einen eine erhöhte unspezifische Zellentnahme, d. h. umliegende Zellen wurden zusätzlich zur Zielzelle mit in die Kapillare aufgenommen, zum anderen Zellschädigungen mit sich. Beim Einsatz von Kapillaren mit einem Innendurchmesser von  $30 - 40 \mu\text{m}$  konnten in 4 Versuchsreihen insgesamt 327 Zielzellen von den Mikrolöchern in die Separationsgefäße (96-Lochplatten) überführt werden, wobei 69 Klone daraufhin ein Wachstum zeigten. Die 4 Versuchsreihen ergaben eine Klonierungseffizienz von  $21,1 \pm 0,5 \%$ . Bei dieser Zellklonierung wurde jeweils nur eine CHO-Zelle in die Isolationsgefäße überführt, wobei ein 1-tägig hoch konditioniertes CHO-Medium in den Separationsgefäßen eingesetzt wurde (Abb. 7.22a).



**Abb. 7.22 Isolation und Expansion eines CHO-Zellklons.**

(a) Transfer einer CHO-Zelle mithilfe einer Mikrokapillare (Innendurchmesser ID =  $40 \mu\text{m}$ ) in ein Isolationsgefäß (Kavität einer 96-Lochplatte) mit konditioniertem Medium (Maßbalken =  $100 \mu\text{m}$ ). (b) Mikroskopische Dokumentation der selbigen Zelle aus a) nach einer 5-tägigen Kultivierung (Maßbalken =  $100 \mu\text{m}$ ). (c) Mikroskopische Dokumentation der selbigen Zelle aus a) nach einer 10-tägigen Kultivierung (Maßbalken =  $250 \mu\text{m}$ ).

Auf dem Transportweg vom Array zum Isolationsgefäß gingen durch den größeren Innendurchmesser im Vergleich zum Zelldurchmesser nahezu 10 % der in die Mikroka-

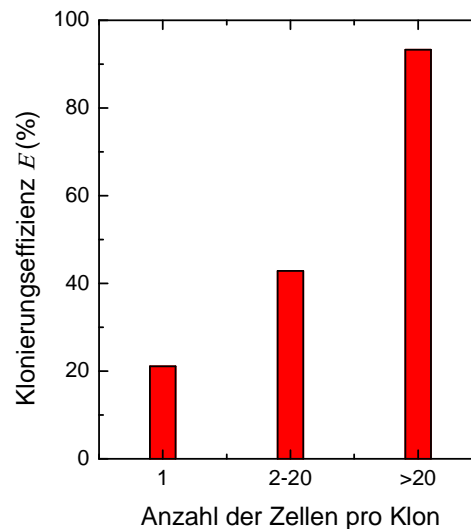
pillare aufgenommenen Zellen verloren. Für die manuelle Vereinzelung von 96 Zellen wurden 90 min benötigt, was ungefähr 1 min pro Klon entspricht. Das korrekte Ablegen des Zellklons in den Isoliergefäßen wurde optisch kontrolliert. Folglich war eine monoklonale Zelllinie garantiert. Nach dem Transfer wurden die isolierten Zellen in regelmäßigen Zeitabschnitten optisch untersucht und das Klonwachstum geprüft. Nach einer 5-tägigen Kultivierung des Zellklons konnten bereits mehr als 50 Zellen erkannt werden (Abb. 7.22b). Nach einer 10-tägigen Inkubation (Abb. 7.22c) hatte sich schon eine Zellpopulation aus mehreren Hundert Zellen gebildet.

### **Selektion der 54K(1)-5 Hybridomzellen**

Die weiteren Versuche zur Zellentnahme wurden mit sekretausschüttenden Hybridomzellen durchgeführt. Für die Selektion der Hybridomklone musste zunächst eine mehrtägige Kultivierung der vereinzelten Zellen auf dem Chip erfolgen, um eine Akkumulation der Sekretmenge zu erreichen. Dadurch ergaben sich Klonpopulationen in den SU-8 Kavitäten, welche aus mehr als einer Zelle bestanden. Da sich zeigte, dass der Zelltransfer einer CHO-Zelle pro Klon nur eine Klonierungseffizienz von  $21,1 \pm 0,5 \%$  ergab, wurde die Möglichkeit gesehen diesen Wert durch den Transfer mehrerer Zellen eines Klons zu steigern. Durch ein solches Vorgehen wurde einer Zellschädigung einzelner Zellen beim Transfer nicht entgegengewirkt, aber durch die größere Zellzahl pro Klon kann davon ausgegangen werden, dass zumindest eine Zelle den Transfer ohne Schädigung übersteht. Bei der Separation der Hybridomklone wurde in den Separationsgefäßen Medium mit einer 1-tägigen Konditionierung verwendet. Die Klongrößen nach einer 2-, 3-, 4-, und 5-tägigen Kultivierung wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Dabei besaß die erste Gruppe zwischen 2 – 20 Zellen pro Klon die zweite Gruppe mehr als 20 Zellen. Anhand der beiden Hybridomgruppen sollte die Klonierungseffizienz nach Gleichung (5-3) berechnet und mit der CHO-Klonierungseffizienz, bei der jeweils eine Zelle pro Klon überführt wurde, verglichen werden (Abb. 7.23).

Durch eine größere Klonpopulation konnte die Klonierungseffizienz, d. h. das Klonwachstum nach dem Transfer, gesteigert werden. Beim Transfer von einer Zelle pro Klon wurde eine Effizienz von etwa 21 % erzielt. Durch eine Steigerung der Klongröße auf 2 – 20 Zellen wurden 43 % und bei mehr als 20 Zellen pro Klon wurde eine Klonierungseffizienz von ca. 93 % erzielt (Abb. 7.23). Bei allen umgesetzten Zellklonen war weder eine Kontamination noch eine Verunreinigung durch Mykoplasmen feststellbar.

Folglich kann der Verlust bzw. die Mortalität eines gesamten Zellklons bei der Entnahme und auf dem Transferweg dadurch vermieden werden, dass ein Klon erst dann entnommen wird, wenn er eine Größe von mindestens 20 Zellen erreicht hat. Somit ist bei Einsatz der oben beschriebenen Zellentnahmemethode eine chipbasierte Kultivierung der Zellen im Verlauf der Selektion zwingend notwendig, um die Klonierungseffizienz des Systems zu erhöhen.



**Abb. 7.23** Untersuchung der Klonierungseffizienz beim Umsetzen unterschiedlicher Zellzahlen pro Klon.

Untersuchung der Klonmortalität beim Überführen der Zellklone mittels einer Mikrokapillare mit Innendurchmesser zwischen 30 – 40  $\mu\text{m}$  von dem Mikrolocharray in das Isolationsgefäß (96-Lochplatte). Der Wert für die Klonierungseffizienz bei einer Zelle pro Klon ist der CHO-Klonierung entnommen (327 Klonen). Die anderen beiden Werte wurden aus insgesamt 21 umgesetzten Hybridomklonen ermittelt.

#### 7.4.2. Systemvalidierung: Vergleich der Produktivität

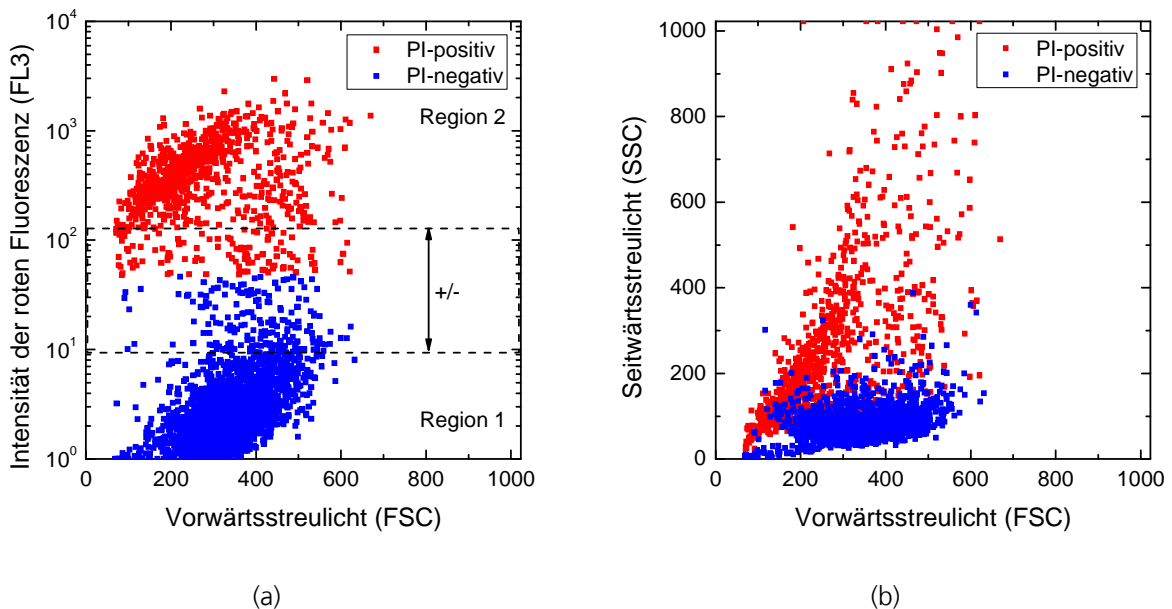
Mithilfe der chipbasierten Vereinzelung, der Quantifizierung der Produktionseigenschaften der CHO-Zellen und der Hybridomzellen und der anschließenden Isoliermethode mittels Mikrokapillare wurden insgesamt 69 monoklonale CHO-Zelllinien und 8 monoklonale Hybridomzelllinien generiert.

Für die Systemvalidierung wurde die Produktivität der generierten Klone und der Ausgangspopulation mit etablierten Methoden untersucht und verglichen. Somit war es möglich, den Gewinn durch den Einsatz des Systems hinsichtlich einer Steigerung der Produktivität der Zellen abzuschätzen.

## Produktivität der CHO-Klone

Durch eine durchflusszytometrische Analyse wurde die GFP-Produktivität der CHO-Zellklone und der Ausgangskultur ermittelt. Anhand dieser Messwerte konnte überprüft werden, ob eine Steigerung der Produktivität über den Weg der chipbasierten Selektion erreicht werden konnte.

In der CHO-Suspensionskultur befand sich zu jedem Zeitpunkt ein Anteil an toten Zellen. Um bei der durchflusszytometrischen Analyse nur das Produktionsverhalten von lebenden Zellen der Ausgangskultur und der Klone miteinander zu vergleichen, musste zunächst eine Trennung der lebenden von den toten Zellen erfolgen. Mittels einer Totfärbung mit PI fluoreszierten Zellen mit geschädigter Zellmembran rot, wodurch eine Bereichstrennung über das rote Fluoreszenzsignal erzielt werden konnte (Abb. 7.24).



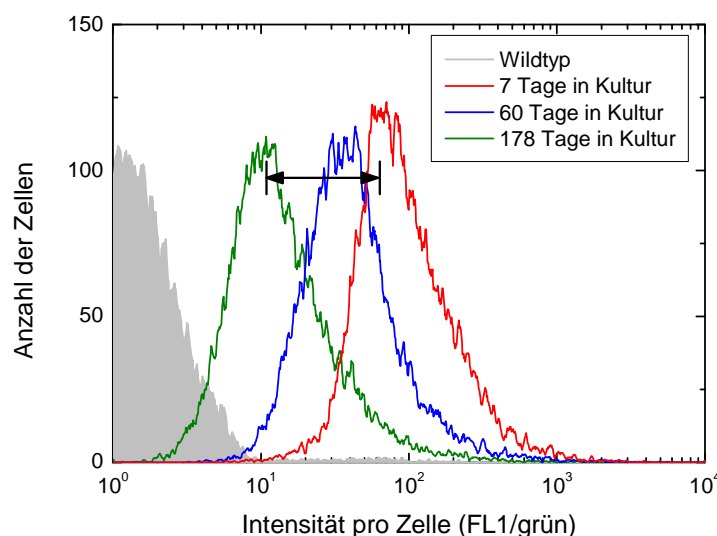
**Abb. 7.24 Durchflusszytometrische Analyse (Punktauftragung) der CHO-Ursprungskultur nach einer Behandlung mit 0,05 % PI.**

(a) Auftragung des roten Fluoreszenzsignals gegenüber dem Vorwärtsstreulicht. Jeder Punkt stellt eine analysierte Zelle dar. Region 1 verkörpert die PI-negativen Zellen (blau), also die lebende Kultur, Region 2 repräsentiert die PI-positiven Zellen (rot), also die tote Kultur. Der gestrichelt eingezeichnete Bereich (+/-) markiert die schwach positiven bzw. schwach negativen Zellen. (b) Punktauftragung des Seitwärtsstreulichts gegenüber dem Vorwärtsstreulicht der Ursprungskultur aus a), wiederum mit der PI-positiven und negativen Population.

Wurde die Intensität des roten Fluoreszenzsignals (FL3) gegenüber der Größe (FSC) aufgetragen, konnte die Population der vitalen Zellen von den toten Zellen abgegrenzt werden (Abb. 7.24a). Die PI-positiven Zellen entsprachen dabei den toten Zellen, die vitale Zellpopulation wurde durch die PI-negative Region dargestellt. Wurde die Granula-

rität (SSC) gegenüber der Größe (FSC) dargestellt, konnten wiederum beide Populationen getrennt voneinander detektiert werden (Abb. 7.24b). In dieser Auftragsung konnte festgestellt werden, dass tote Zellen eine erhöhte Granularität aufwiesen (erhöhter SSC Wert). In den Punktauftragungen entspricht ein Punkt im Diagramm jeweils einer analysierten Zelle. Zelltrümmer wurden durch die Parametrisierung des Durchflusszytometers ausgeschlossen.

Um die Produktivität der einzelnen CHO-Zelllinien miteinander zu vergleichen, wurden mittels des Durchflusszytometers Histogramme aufgenommen, welche die Häufigkeit der Zellen bei einer bestimmten grünen Fluoreszenzintensität (FL1) abbilden. Die Stärke der grünen Fluoreszenz lag dabei in direktem Zusammenhang mit der Produktivität des grün fluoreszierenden Proteins. Besitzt eine Zelllinie hoch-produzierende Eigenschaften, so spiegelt sich dies in der Lage der maximalen Zelhäufigkeit bei einem großen Wert auf der FL1-Skala im Histogramm wieder. Alle im Folgenden betrachteten CHO-Kulturen bestehen aus GFP-exprimierenden Zellen. Einzige Ausnahme ist der Wildtyp, der kein GFP exprimiert.



**Abb. 7.25 Untersuchung der GFP-Expression der CHO-Mutterkultur bei unterschiedlichen Kulturzeiten sowie der Wildtypzelllinie.**

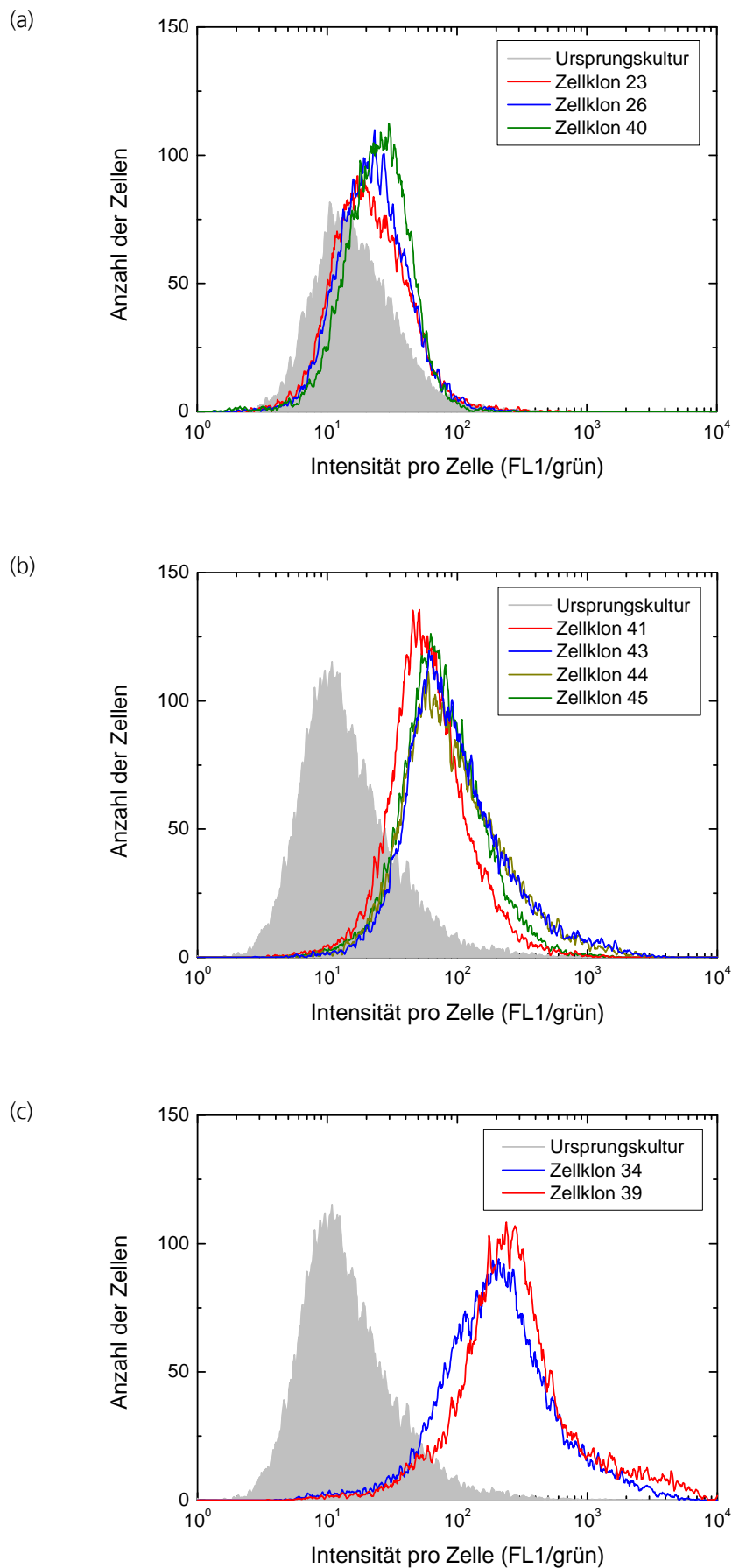
Im Vergleich zum Wildtyp zeigt die GFP-exprimierende Zelllinie eine deutliche Erhöhung des grünen Fluoreszenzsignals (FL1). Wird das Fluoreszenzsignal der GFP-exprimierenden Ausgangskultur über den Zeitraum der Kultivierung untersucht, so sind Schwankungen im Maximalwert sowie in der gesamten Verteilung zu erkennen. Mit zunehmender Kultivierungszeit nimmt die GFP-Expression ab.

Bei dem Vergleich der Proteinproduktion der CHO-Kultur über die Inkubationszeit, zeigte sich, dass das Alter der Kultur einen erheblichen Einfluss auf die Produktivität besaß

(Abb. 7.25). Es ergab sich eine Reduktion der grünen Fluoreszenzintensität und somit auch in der Proteinproduktion mit steigendem Alter der Kultur. War die Zelllinie 7 Tage in Kultur, lag das Maximum der Zellverteilung über der grünen Fluoreszenzintensität noch bei 60 (Maximum der roten Kurve in Abb. 7.25) auf der FL1-Skala und ging nach einer 178-tägigen Kultivierung auf 10 (Maximum der grünen Kurve in Abb. 7.25) zurück. Somit ergaben sich ein Verlust der Produktivität mit steigendem Alter und damit eine Annäherung an den Wildtyp. Folglich ist die Inkubationszeit ein nicht zu vernachlässigender Parameter bei dem Vergleich der Produktivität von CHO-Klonen und der Ausgangskultur. Um den Inkubationszeitraum bei dem Vergleich richtig zu erfassen, wurde die Ursprungskultur, aus der die CHO-Zellklone generiert worden sind, jeweils zusätzlich zu den Klonen in der Zellkultur mitgeführt. Zum Zeitpunkt der durchflusszytometrischen Analyse der Klone wurde immer auch die Ursprungskultur analysiert.

Für die Gegenüberstellung der GFP-Produktivität der selektierten CHO-Klone gegenüber der Ursprungskultur wurde die Fluoreszenzintensität mittels des Durchflusszytometers bestimmt und als Histogramme aufgetragen (Abb. 7.26). Aus den Histogrammen kann für verschiedene Klone eine unterschiedlich starke Verschiebung des Maximums der Zellverteilung über der grünen Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Ursprungskultur hin zu größeren FL1-Intensitäten (grünes Fluoreszenzsignal) erkannt werden. Diese Verschiebungen wurden dazu genutzt, um die Produktionseigenschaften der Zellklone qualitativ gegenüber der Ursprungskultur einzustufen. Lag die Vergrößerung der grünen Fluoreszenzintensität der maximalen Zellhäufigkeit der Zellklone zur Ursprungskultur im Bereich um 10, 50 oder 250, so werden diese Zellsysteme in dieser Arbeit als schwach-, mittel- oder hoch-produzierende Zellsysteme bezeichnet. Bei der Expansion der Zellklone war zu erkennen, dass gerade die hoch-produzierenden Zellklone ein deutlich schwächeres Zellwachstum zeigten.

Im Vergleich wird ersichtlich, dass sich die Produktionseigenschaften der einzelnen Klone teilweise stark voneinander unterscheiden, was möglicherweise an einer hohen Instabilität der eingesetzten CHO-Zelllinie lag.



**Abb. 7.26 Vergleich der Proteinproduktion (über die grüne Fluoreszenzintensität: FL1-Signal) der selektierten Zellklone mit der Ursprungskultur über eine durchflusszytometrische Analyse.**

Eine größere Intensität im grünen Fluoreszenzsignal entspricht dabei einer größeren Menge an grün fluoreszierendem Protein (GFP) und damit einer besseren Produktionseigenschaft. Der Übersichtlichkeit halber sind nicht alle Messkurven in einem einzigen Diagramm dargestellt. Stattdessen sind in jedem der drei Diagramme Kurven von Klonen mit ähnlichen Produktionseigenschaften zusammengefasst. In (a) sind Kurven von schwach-, in (b) von mittel- und in (c) von hoch-produzierenden Zellklonen im Vergleich zur Ursprungskultur dargestellt.

Um das chipbasierte Selektionsverfahren mit anderen Zellklonierungsverfahren zu vergleichen, wurden 37 Klone mittels Verdünnungsreihen generiert. Die qualitative Ermittlung der Produktivität der verschiedenen Klone erfolgte mittels des Durchflusszytometers. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 12 aufgelistet. Bei der Verwendung von Verdünnungsreihen konnten nur zwei Klone generiert werden, welche eine geringfügige Verbesserung der Produktionseigenschaft gegenüber der Ausgangskultur zeigten. Hingegen ergab sich bei mehr als der Hälfte der Klone, welche über die chipbasierte Technik selektiert wurden, eine höhere Proteinproduktion.

**Tabelle 12 Auflistung der mit dem chipbasierten Verfahren, bzw. mit der LD-Technik generierten CHO-Klone.**

Eine Einstufung der GFP-Produktivität der Klone nach der FACS-Analyse und Gegenüberstellung zur Ursprungskultur wurde vorgenommen. Zellklone die im Vergleich zur Ursprungskultur eine Verschiebung des Maximums der Zellverteilung über der grünen Fluoreszenzintensität (FL1-Signal) um ~ 10, ~ 50 und ~ 250 zeigten, sind als schwach-, mittel- und hoch-produzierende Zelllinien in dieser Arbeit eingestuft worden.

	Keine Verbesserung	Schwach	Mittel	Hoch
Chip	27	17	20	5
LD	35	2	-	-

### Produktivität der Hybridomklone

Die generierten Hybridomklone wurden, nach einer chipbasierten Kultivierung von 5 Tagen und nach der Quantifizierung der Produktivität über die Pixeladdition und den fluoreszenzkonjugierten Sekundärantikörper, isoliert (Abb. 7.27a). Nach einer 30-tägigen Expansion der Klone wurde die Produktivität der Hybridomklone und der Ursprungskultur durch ein etabliertes Protokoll am Fraunhofer IME bestimmt (Tabelle 13, Tabelle 14).

**Tabelle 13 Vergleich der Produktivität von Hybridomzellen über den Kultivierungszeitraum.**

Wiederum konnte eine Abhängigkeit der Produktivität von der Inkubationszeit ausgemacht werden.  $1 \times 10^5$  Zellen einer frisch aufgetauten Kultur sekretierte während einer 6-tägigen Inkubation ca.  $86 \mu\text{g ml}^{-1}$  Antikörper. Hingegen sank die Produktivität nach einer 3-monatigen Kultur auf einen Wert von ca.  $63 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

	Menge an AK ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
3-monatige U-Kolonie	62,7
Frisch aufgetaute U-Kolonie	85,7

Dieses Verfahren basiert auf dem enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Es zeigte sich bei der Hybridomzelllinie, dass die



Produktion mit steigender Inkubationszeit einen Rückgang aufwies, was in Analogie zur CHO-Kultur steht. Eine frisch aufgetaute 54K(1)-5 Hybridomkultur zeigte eine Produktivität von ca.  $86 \mu\text{g ml}^{-1}$  Antikörper, wobei eine 3-monatige Kultur eine Produktivität von nur noch ca.  $63 \mu\text{g ml}^{-1}$  besaß. Deshalb wurde auch hier die Ursprungskultur jeweils immer in der Zellkultur mitgeführt, um unterschiedliche Inkubationszeiten der Ursprungskultur gegenüber den Klonen zu vermeiden.

**Tabelle 14 Auflistung der mittels ELISA am Fraunhofer IME durchgeführten Quantifizierung der Produktivität der chipbasierten selektierten Klone und der über das Pickroboter+Cellavista-Verfahren selektierten Klone.**

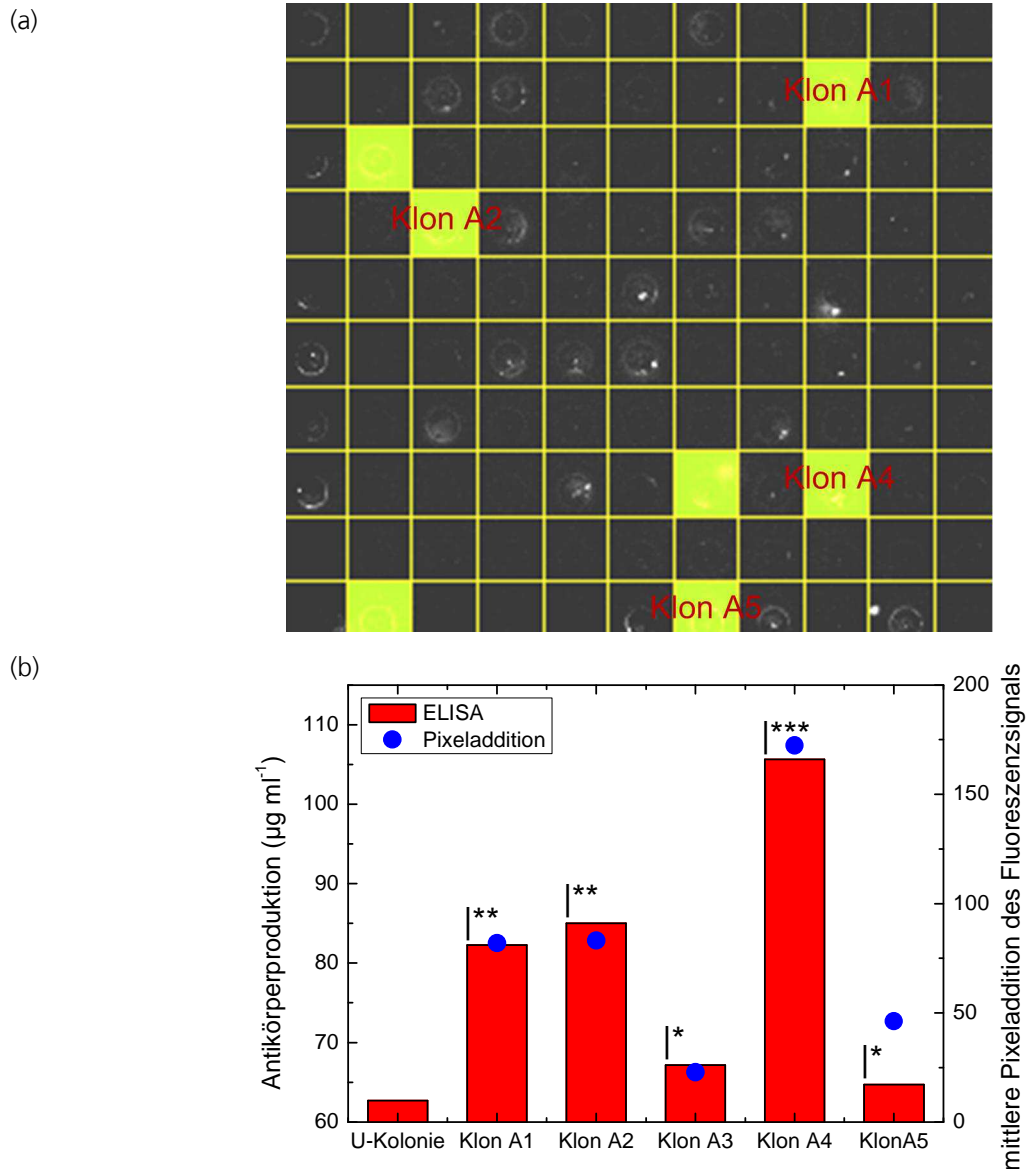
Durch die chipbasierte Selektion konnte für jeden Klon (Klon A1-A5, B1, B2, B4) gegenüber der Ursprungskolonie (3-monatige U-Kolonie, s. Tabelle 13) eine Steigerung der Antikörperproduktion erzielt werden. Das beste Produktionssystem (A4), welches über das chipbasierte Verfahren generiert wurde, sekretierte eine Menge von  $106 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Mittels des Pickroboter+Cellavista-Verfahrens konnte die Produktivität auf maximal  $130 \mu\text{g ml}^{-1}$  gesteigert werden (A2\*). Die Mengenangaben ergaben sich aus der ELISA Messung für eine eingesetzte Anfangszellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Medium nach einer 6-tägigen Inkubation.

Chipbasierte Verfahren	Menge an AK ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Pickroboter+Cellavista System	Menge an AK ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
Klon A1	82,3	Klon A1*	79,6
Klon A2	85,8	Klon A2*	130,3
Klon A3	67,2	Klon A3*	81,3
Klon A4	105,7	Klon A4*	100,5
Klon A5	64,7		
Klon B1	71,8		
Klon B2	63,2		
Klon B4	93,3		

Um einen Vergleich zu einem etablierten Verfahren zu erlangen, wurden am Fraunhofer IME mittels eines Pickroboters in Kombination mit einem Cellavista Analyzer aus der 3-monatigen Hybridomursprungskolonie (U-Kolonie) vier Klone selektiert. Dabei zeigte sich, dass ein Klon (Klon A2\*) der über das Pickroboter+Cellavista System selektiert wurde, eine größere Produktivität von  $130 \mu\text{g ml}^{-1}$  gegenüber dem Klon A4 (selektiert über das chipbasierte Verfahren) aufwies (Tabelle 14).

Um die Eignung der Pixeladdition für die Bestimmung der Produktivität der Zellklone zu prüfen, wurden die gewonnenen ELISA-Daten den Pixeladditionswerten gegenübergestellt (Abb. 7.27b). In Abb. 7.27b wurde eine qualitative Einteilung der Klone in drei Gruppen vorgenommen. Der hoch-produzierende Klon (\*\*\*) in Abb. 7.27b konnte durch beide Verfahren eindeutig identifiziert werden. Die beiden mäßig-produzierenden Klone (\*\* in Abb. 7.27b) werden sowohl durch die ELISA-Messung (roten Säulen) als auch durch die Pixeladdition (blauen Punkte) als gleich stark produzierend eingestuft.

Auch bei den schwach-produzierenden Klonen (\* in Abb. 7.27b) lieferten sowohl die ELISA-Messungen als auch die Pixeladdition jeweils ähnliche Werte. Lediglich der bei Klon A5 ermittelte Wert der Pixeladdition zeigte eine Abweichung zur ELISA-Messung. Somit lieferten beide Methoden qualitativ gleiche Aussagen über die Produktivität.



**Abb. 7.27 Charakterisierung der Sekretauusschüttung nach dem Selektionsschritt, sowie der Vergleich der Antikörperquantifizierung über ELISA und Pixeladdition.**

(a) Analyse des gebundenen markierten Sekundärantikörpers mittels der selbst entwickelten Software. Die Array-Plattform wird in gleich große Matrixfelder eingeteilt. Eine Pixeladdition nach Gleichung (5-5) wird für jedes Feld ermittelt. Farblich markiert sind die Felder mit den größten Pixeladditionswerten. (b) Quantifizierung des Antikörpersekrets mittels der ELISA-Messung und der Pixeladdition. Über den Selektionsschritt konnte die Produktivität der Klone (speziell Klon A4) gegenüber der Ursprungskolonie (U-Kolonie) deutlich erhöht werden. Beide Verfahren zur Quantifizierung der Sekretmenge liefern annähernd dieselben Ergebnisse. Die Markierungen sollen die hoch- (\*\*\*) , mittel- (\*\*) und schwach-produzierenden (\*) Zellklone kennzeichnen.

Es zeigte sich auch hier, dass eine Steigerung der Produktivität über den Umweg des Selektionsschritts erzielt werden konnte. Durch das verwendete Selektionsverfahren lassen sich gezielt Zellklone auswählen und separieren, die eine größere Produktivität als die Ursprungskolonie (U-Kolonie in Abb. 7.27b) aufweisen. Dabei zeigte Klon A4 die größte Produktivität mit ca.  $106 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Folglich konnte fast eine Verdopplung der Produktivität erzielt werden. Gerade bei dem Wachstum der unterschiedlichen Klone war wieder zu erkennen, dass der Klon mit der größten Produktivität auch die größte Generationszeit besaß (Tabelle 15).

**Tabelle 15 Auflistung des Proliferationsverhaltens der Klone in den Kavitäten des Chips.**

Nach einer 5-tägigen Kultur wurden die Klone in Kavitäten einer 96-Lochplatte umgesetzt und dabei die Anzahl der Zellen pro Klon erfasst. Zusätzlich wurden die Generationszeiten bestimmt.

	Qualitative Bestimmung der Produktivität	Anzahl der Zellen nach 5 Tagen pro Kavität	Generationszeit in Stunden
Klon A1	Mittel	21	27,32
Klon A2	Mittel	20	27,76
Klon A3	Schwach	30	24,46
Klon A4	Hoch	6	46,42
Klon A5	Schwach	> 50	< 21,26
Klon B1	Schwach	25	25,84
Klon B2	Schwach	20	27,76
Klon B4	Mittel	27	25,24

### **Zusammenfassung und Diskussion**

Bei der Herstellung von Medikamenten wird immer häufiger auf biotechnologische Verfahren zurückgegriffen (Kim, 2012; Matasci, 2008). Dabei spielen therapeutische Proteine, wie monoklonale Antikörper, Enzyme oder Fusionsproteine, eine erhebliche Rolle und sind als Wirkstoffe in der Therapie nicht mehr wegzudenken (Walsh, 2005;2010).

Um Produktionsorganismen zu erzeugen, wird in die DNA von Wirtszellen eine spezifische Sequenz eingebracht. Durch diesen Transfektionsschritt entstehen Zellpopulationen, die starke Heterogenitäten bezüglich der Vitalität, Produktivität, Proliferation und Stabilität aufweisen. Die Anforderungen an ein Produktionssystem sind, dass eine Adaption an große Fermentervolumen möglich ist und erhöhter Scherstress im Fermenter das Produktionsverhalten und die Vitalität des Zellsystems nicht heruntersetzen (Chisti, 2000). Folglich müssen die Zellen neben einer guten Produktionseigenschaft und einer hohen Stabilität auch eine hohe Zellvitalität und ein gutes Zellwachstum aufweisen (Betenbaugh, 2004; Simpson, 1998; Wurm, 2004). Darum muss eine Charakterisierung der Zellen mittels der vier genannten Parameter vorgenommen werden, um die möglichen zellulären Produktionssysteme qualitativ einzuordnen. Basierend auf der Charakterisierung muss der produzierende Zellklon isoliert werden, um eine Zelllinie mit idealen Eigenschaften dem Herstellungsprozess zugrunde zu legen.

Bei der mehrparametrischen Charakterisierung und Selektion stoßen gängige Verfahren und etablierte Systeme an ihre Grenzen (Browne, 2007). Beispielsweise kann 1) das Durchflusszytometer mit Sortiereinheit (FACS) Sekrete nur mit erhöhtem Aufwand quantifizieren (Manz, 1995), 2) die magnetische Zellsortierung (MACS) keine Selektion nach hoch-produzierenden Zellen vornehmen (Carroll, 2005; Mattanovich, 2006) und 3) halb feste Zellkulturmedien mit Pickereinheiten benötigen lange Inkubationszeiten zur Akkumulation des Zielprodukts (Browne, 2007). Gerade höherviskose Medien sorgen zusätzlich für eine geringere Proliferation der Zellen (Harlow, 1988). Folglich führen lange Inkubationszeiten im Gel zu einem geringeren Klonwachstum im Vergleich zum üblichen flüssigen Kulturmedium, was den gesamten Herstellungsprozess therapeutischer Proteine verlangsamt. Zellarray-Chips oder Mikrokanäle erlauben eine Zellcharakterisierung mit anschließender Selektion, wobei eine Charakterisierung von mehreren Zellparametern in einem miniaturisierten Chipsystem zur präzisen Charakterisierung

bislang nicht verfolgt wurde (Li, 2010; Sieben, 2007; Tajiri, 2007; Xiao, 2003; Yamamura, 2005).

Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit ein Zellisolationssystem zu konzipieren und aufzubauen, mit dem es möglich ist einzelne Zellen nach den relevanten Parametern zu charakterisieren und basierend darauf qualitativ hochwertige Zellklone, insbesondere für die Herstellung therapeutischer Proteine, zu generieren.

### **Aufbau und Charakterisierung des chipbasierten Selektionsverfahren**

Um Zellen einzeln charakterisieren und entnehmen zu können, musste eine Separierung der Zellen erreicht werden. Für den Vereinzlungsschritt wurde der Ansatz verfolgt, Zellen parallel auf einem Chip zu separieren. Die Parallelisierung hat gegenüber der sequentiellen Analyse wesentliche Vorteile. 1) das Zellsystem ist sehr gut adressierbar, d. h. die Zellen sind lokalisierbar, 2) die Zellen können länger und sogar mehrmals analysiert werden und 3) ganz unterschiedliche Analyseverfahren können auf dasselbe Zellsystem angewandt werden.

Bei der Positioniertechnik wurde ein konstanter Unterdruck eingesetzt, da dadurch die Belegungsdichte vom Positionierungsdruck entkoppelt werden konnte. Somit kann im Vergleich zu einem konstanten Fluss der Einsatz eines Regelkreises entfallen. Im Vergleich zu den gängigen Verfahren zur Zellmanipulation erlaubte die hydrodynamische Positioniertechnik in Kombination mit dem Chip eine parallele Manipulation sehr vieler Zellen. Ferner sprachen die einfache Bedienung und die geringen Kosten für den Einsatz dieser Technik. Im Vergleich dazu können Mikrokanäle in Kombination mit Mikrostrukturen nur bedingt mit höherviskosen Medien kombiniert werden. Zusätzlich ist ein aufwändiges Chipdesign aus vielen Prozessschritten nötig, was erhöhte Kosten bedeutet (Di Carlo, 2006; Faley, 2008; Hua, 2009). Andere Manipulationstechniken, wie optische Pinzetten, Feldkäfige oder Dielektrophoresechips, können für die Manipulation von einzelnen Zellen eingesetzt werden (Ashkin, 1987; Cabrera, 2001; Fuhr, 1994; Grier, 2003; Hughes, 2002; Kremser, 2004; MacDonald, 2003). Jedoch ist ein paralleles Manipulieren mehrerer Zellen nur mit einer steigenden Komplexität der Hardwarekomponenten erreichbar (Chiou, 2005; Fréna, 2003; Voldman, 2006; Werner, 2011). Neben der immensen Parallelisierung sind auch die geringe Positionierungsfläche und die Volumensparnis ein Aspekt, welcher für den Einsatz eines Chips sprechen. So konnten auf einer Chipfläche von nur 4,4 mm<sup>2</sup> in 600 µl Volumen etwa 1000 Zellklone generiert werden.

Im Vergleich dazu benötigen Verdünnungsreihen in Kavitäten einer 96-Lochplatte mit standardmäßig 100 µl Medium und einer Wachstumsfläche von 0,34 cm<sup>2</sup> pro Kavität für 1000 Klone 100 ml Medium bei einer Fläche von 340 cm<sup>2</sup>. Das ClonePix System der Firma Genetix benötigt für 600 – 2000 Zellen, 2 ml Medium auf einer Wachstumsfläche von 9,6 cm<sup>2</sup>. Durch die kleine Dokumentationsfläche auf dem Chip konnten Fehlvereinzlungen, die zu einer Ausbildung von heterogenen Zellklonen führen, auf den Positionierstellen sehr präzise erkannt werden. Diese Zellklone besitzen den Nachteil, dass der Klon aus mehr als einer Zelle hervorgeht. Gerade für die Herstellung therapeutischer Proteine soll die Produktivität eines Klons konstant hoch sein, um eine hohe Ausbeute zu erzielen. Werden heterogene Klone im Fermenter eingesetzt, so kann dieser Klon aus schwächer- und stärker-produzierenden Zellen zusammengesetzt sein. Die schwachproduzierenden Zellen zeigen im Allgemeinen eine kürzere Dopplungszeit, so dass sie die hochproduzierenden Zellen überwachsen, was zu einer stetigen Abnahme der Ausbeute führt (Barnes, 2003; Frame, 1990).

Der Mikrolochararray-Chip wurde erfolgreich mittels mikroprozesstechnischer Verfahren basierend auf einem Siliziumwafer aufgebaut. Mikrolochchips haben gegenüber reinen Kavitätenchips Vorteile, da die Zellen aktiv auf dem Chip separiert werden. Folglich müssen keine Anforderungen an die Dimensionierung der Chips gestellt werden, da durch Spülschritte überschüssige Zellen zwischen den Positionierstellen entfernt werden können. Jedoch sollten die Spülprozesse automatisiert durchgeführt werden, um die Vitalität der Zellen zu erhalten. Bei reinen Kavitätenchips muss die Kavitätendimensionierung sehr genauen Anforderungen entsprechen, um eine hohe Vereinzlungsdichte zu erzielen. Ferner können Spülschritte nicht dazu verwendet werden, um einer Mehrfachbelegung in den Kavitäten entgegenzuwirken (Chin, 2004; Deutsch, 2006; Hosokawa, 2010; Love, 2006; Matsunaga, 2008; Ogunniyi, 2009; Schmukler, 1988; Taylor, 2000; Thielecke, 1999; Tokimitsu, 2007).

In vergleichbaren Studien auf Chips mit Mikrolochanordnungen konnte eine Abhängigkeit der Vereinzlungseffizienz zu der Arraygröße festgestellt werden (Hosokawa, 2009; Matsunaga, 2008). Dabei wurde für vergleichbare Arraygrößen Effizienzen von 76 – 94 % erreicht. Bei reinen Kavitätenchips ist die Vereinzlungseffizienz stark abhängig von der Relation der Kavitätengröße zur Zellgröße (Rettig, 2005). Um den gewinnbringenden Einsatz durch die zusätzliche Positionierung in den Kavitäten zu eruieren, müssen demnach entsprechende Kavitätengrößen miteinander verglichen werden. In dieser

Arbeit konnte durch den aktiven Transport der Zellen in die Kavitäten eine Vereinzelnung von 75 – 85 % bei einer Kavität mit einer Fläche von 2827  $\mu\text{m}^2$  erreicht werden. In der Literatur beschriebene Systeme mit vergleichbaren Kavitätenfläche von 8100  $\mu\text{m}^2$ , 2827  $\mu\text{m}^2$ , 2500  $\mu\text{m}^2$  und 1257  $\mu\text{m}^2$ , jedoch ohne Positioniermöglichkeit, erzielten hingegen nur eine Vereinzelnungseffizienz von 25 %, 30 %, 30 – 50 % und 20 – 40 % (Chin, 2004; Ogunniyi, 2009; Rettig, 2005; Zaretsky, 2012).

Qualitativ hochwertige Produktionssysteme sind nur in einer verschwindend geringen Menge in der Ausgangspopulation vorhanden. Folglich sollen idealerweise alle zur Verfügung stehenden Zellen charakterisiert werden. Dazu war ein wichtiger zu untersuchender Aspekt, welcher Zellüberschuss im Vergleich zu den Positionierungsstellen ausreicht, um annähernd die maximale Vereinzelnungseffizienz zu erreichen. Die optimale Zellzugabe ergab sich bei einem 14 %-igen Überschuss an Zellen im Vergleich zu den Positionierungsstellen. Der Überschuss an Zellen im Vergleich zu den Positionierungsstellen war nötig, da Zellen sich zum einen noch im Flüssigkeitsvolumen über dem Chip befinden und zum anderen an den Wänden des Adapters oder der Siliziumkavität anhaften können. Im Vergleich zum Durchflusszytometer ist ein 14 %-iger Zellüberschuss ein sehr guter Wert, da bei einer durchflusszytometrischen Analyse normalerweise ein 400 %-iger Überschuss eingesetzt wird (MitoSciences Protocol).

Somit konnten durch die Positioniertechnik und den Einsatz des Chips, nicht-invasiv die Zellen mit einer hohen Vereinzelnungseffizienz separiert werden, was die Grundvoraussetzung für die anschließende Charakterisierung der separierten Zellen und den Selektionsschritt war.

Der Selektionsschritt sollte eine Entnahme von adhärent wachsenden Zellen, von Zellen aus höherviskosen Medien und von ganzen Zellpopulationen ermöglichen. Als Manipulationsverfahren stehen die geläufigen Methoden basierend auf optischen oder elektrischen Kraftfeldern bzw. mechanischen Manipulationswerkzeugen zur Verfügung (Ericsson, 2000; Fröhlich, 2000; Fröstl, 2000; Hunt, 2006; Müller, 1999; Shafiee, 2009; Stüber, 2010; Zelle, 1951). Sowohl die optische als auch die elektrische Manipulation benötigt für die Entnahme ganzer Zellhaufen aus höherviskosen Medien größere Kräfte (Ashkin, 1992; Pohl, 1951;1958), wobei bislang ungeklärt ist, ob eine solche Entnahme überhaupt realisiert werden kann. Darum wurde in der vorliegenden Arbeit eine mechanische Manipulationsmethode verwendet und die Zellen über eine Mikrokapillare ent-

nommen, welche von einem Mikromanipulator geführt wurde (Choi, 2010a; Hosokawa, 2009; Zelle, 1951).

Die neuartige Kombination aus Mikrokapillare und Mikrolochchip zur Zellisolation wurde bislang in der Literatur nur einmal beschrieben. Hosokawa et al. verwendeten diese Kombination ohne jedoch die Vitalität der entnommenen Zellklone geprüft zu haben (Hosokawa, 2009). Somit gibt es aktuell noch keine Daten, wie schonend die Kombination aus Mikrolochchip und Mikrokapillare bei der Entnahme für das Zellsystem ist und ob überhaupt eine Zellklonierung erreicht werden kann.

Vor diesem Hintergrund wurde zunächst untersucht, welche Art der Zellentnahme sich am besten eignet und welche Klonierungseffizienz sich einstellt. Lu et al. zeigten, dass der Transfer basierend auf einer kompletten Aufnahme der Zelle in die Kapillare mit einer nur an der Kapillarenöffnung gehaltenen Zelle Nachteile bezüglich der Transferzeit und der Transferrate besitzt (Lu, 2010). Trotz dieser Nachteile wurde sich dafür entschieden die Zelle komplett in die Kapillare aufzunehmen, da so keine präzise Kontrolle des Ansaugdrucks nötig ist, und die Zelle auf dem durch die Luft geführten Transferweg von Chip zu Isolationsgefäß keinen Kontakt mit der umliegenden Luft hat.

Mit Kapillarendurchmessern, welche kleiner oder im Bereich des Zelldurchmessers lagen, konnte beobachtet werden, dass die Zellen bei der Aufnahme in die Kapillare sehr starken mechanischen Kräften ausgeliefert waren. Die Zellen wurden in die Länge gezogen, wobei sich nach dem Transfer keine Klonierung einstellte. Vergleichende Studien der Literatur zum Zelltransfer mit Kapillaren zeigen, dass Zellverformungen oder dauerhafte Zellschädigungen bei der Aufnahme in Kapillaren mit kleinerem Durchmesser möglich sind (Hochmuth, 2000; Lu, 2010). Eine erfolgreiche Klonierung ergab sich für Innendurchmesser von 30  $\mu\text{m}$  und 40  $\mu\text{m}$ , wobei keine Verformung der Zelle bei der Aufnahme in die Kapillare festgestellt werden konnte. Durch die höhere Viskosität des Mediums, im Falle der Hybridomzellen, war die Aufnahme der Zielzellen in die Kapillare sehr viel langsamer und konnte folglich sehr gut im Mikroskop dokumentiert werden. In Kombination mit flüssigem Medium war der Entnahmezeitraum der Zelle von den Positionierstellen in die Kapillare viel kürzer, was die Dokumentation schwieriger gestaltete. Um den Nachweis der Zellaufnahme auch in flüssigem Medium zu gewährleisten, könnte ein automatisiertes Pumpensystem in Kombination mit einer Mikroskopüberwachung und einer Regelschleife verwendet werden (Zhang, 2012). Bei dem Einsatz des flüssigen Mediums gingen etwa 10 % der aufgenommenen CHO-Zellen auf dem Transportweg



verloren. Dies wurde möglicherweise durch das Anhaften der Zelle in der Kapillarinnenwand verursacht, so dass beim Ablegen der Zelle in das Isolationsgefäß diese nicht mehr aus der Kapillare befördert werden konnte. Folglich ist unter dem Gesichtspunkt der Dokumentation des Transferprozesses und der Transferrate die Verwendung eines höherviskosen Mediums dem flüssigen Medium in Kombination mit einer Kapillare vorzuziehen.

Für die manuelle Isolation eines Zellklons wurde etwa eine Minute benötigt. Gerade bei einer geringen Auftrittswahrscheinlichkeit der Zielzellen sind erhöhte Transferzeiten nicht ausschlaggebend, so dass in diesem Fall auf eine solche Selektionstechnik zurückgegriffen werden kann (Yamamura, 2005). Werden diese Werte mit der optischen Selektion nach Kovac et al. verglichen, so lag dort die Entnahmezeit auch bei etwa einer Minute pro Zellklon, wobei die Entnahmeeffizienz starke Schwankungen zwischen 25 und 100 % zeigte (Kovac, 2007). Yamamura et al. benötigten 5 – 10 min, um eine Zielzelle mittels eines manuell gesteuerten Mikromanipulators von einem Kavitätenchip zu entnehmen und zu isolieren (Yamamura, 2005).

Eine wesentliche Erhöhung der Klonierungseffizienz konnte, wie schon in Love et al. gezeigt, durch die Entnahme ganzer Klonpopulationen erreicht werden (Love, 2006).

Das System aus Mikrolochchip und Mikrokapillare konnte sehr robust betrieben werden, da die Mikroskopsteuersoftware das Auslesen der Position des Mikromanipulators gestattet. Folglich konnte die Position des Mikromanipulators im Berührungspunkt der Kapillarenspitze mit der Membran ermittelt werden. Dieser Wert wurde als Referenz bei der Zellentnahme genutzt.

### **Prüfung der Multiparameterfähigkeit des Verfahrens**

Das Ziel der Charakterisierung war, Zellparameter zu erfassen, welche eine Aussage darüber zulassen, wie gut ein Zellklon für die Herstellung therapeutischer Proteine geeignet ist. Gerade Parameter, wie die Vitalität, das Wachstum und die Produktionseigenschaft haben sich in der Vergangenheit als geeignet herauskristallisiert (Betenbaugh, 2004; Wurm, 2004).

Die bis heute aufgebauten miniaturisierten Systeme lassen eine Mehrfachanalyse nach unterschiedlichen Parametern nicht zu. Die meisten gängigen Verfahren legen nur Wert auf die Hochdurchsatzfähigkeit (Choi, 2006; Modak, 2009; Schade-Kampmann, 2008; Wang, 2005; Xia, 2006). Folglich passieren die Zellen sehr schnell eine Sensoreinheit,

wodurch die Analyse eine erhöhte Ungenauigkeit besitzt und dynamische Zellvorgänge nicht erfassbar sind. Ferner müssen bei den gängigen Verfahren die Zellen während des kompletten Analysezeitraums in einer Suspension vorliegen. Demzufolge können adhären wachsende Zellen nicht in ihrem physiologischen Zustand untersucht werden.

Vor diesem Hintergrund wurde versucht die Chipplattform zum Ableiten mehrerer relevanter Parameter zu nutzen. Es wurde geprüft, ob sich die Chipplattform eignet, um Vitalitätsparameter mittels Impedanzmessungen und daher nicht-invasiv abzuleiten, sowie die Produktivität und das Proliferationsverhalten einzelner Zellklone zu erfassen. Folglich können in die Zellcharakterisierung alle drei ermittelten Parameter einfließen, was die Voraussetzung für eine präzise Identifikation der Zielzellen für die Herstellung von Biopharmazeutika ist.

### *Erfassung von Vitalitätsparametern*

Die Größenänderung der Zellen kann als Kontrollparameter für die Vitalität herangezogen werden (Bakken, 1987; Chen, 1997). Während der Apoptose, dem kontrollierten Zelltod, ist eine starke Verringerung des Zellvolumens zu erkennen, hingegen findet bei der Nekrose, eine weitere Art des Zelltods, eine starke Zunahme des Zellvolumens statt (Bortner, 2002; Elmore, 2007; Kerr, 1972; Majno, 1995). Auch kann das Ablösen eines adhären wachsenden Zellsystems ein Anzeichen für den Zelltod sein (Bursch, 2000). Ferner spiegelt der Zustand der Zellmembran die Zellvitalität wider, da eine Zelle mit einer zerstörten Zellmembran nicht lebensfähig ist und häufig in der Zellbiologie über eine Tot-Färbung nachgewiesen wird (Jones, 1985).

Auf Basis dieser Kenntnisse wurden Zellgrößenänderungen, der Zell-Substratabstand sowie das Membranverhalten nicht-invasiv und ohne Markersubstanzen über die Aufnahme der elektrischen Impedanz erfasst, um so Aussagen über die Zellvitalität zu erhalten. Der Einfluss von Größenänderungen und Zell-Substratabstandsänderungen der positionierten Zelle auf die Impedanz wurde zum einen über numerische Berechnungen zum anderen über die Aufzeichnung der Impedanz während der Zelladhäsion untersucht. Die Zelladhäsion wurde in der Vergangenheit schon des Öfteren in elektrischen Sensorsystemen ausgenutzt, um die Vitalität von Zellsystemen nachzuweisen (Asphahani, 2007; Ceriotti, 2007; Ehret, 1998; Guo, 2006). Dabei kann die Zelladhäsion in die Zellanheftung, Zellspreizung, der Organisation des Zytoskeletts und der fokalen Adhäsionskomplexbildung untergliedert werden (LeBaron, 2000). Bei der Zellanheftung

kontaktiert die Zelle zunächst das Substrat nur schwach (Gimond, 1997). Während der Zellspreizung findet ein Abflachen und Ausbreiten der Zelle über dem Substrat statt. Eine feste Kontaktierung der Substratoberfläche durch die Zelle wird erreicht, indem das Zytoskelett aktiviert wird und Stressfasern sowie fokale Adhäsionskomplexe ausgebildet werden. Somit findet während der Zelladhäsion auf dem Chip neben der Vergrößerung der „zellbedeckten“ Fläche am Mikroloch auch eine Reduktion des Abstands zwischen Zelle und Substrat statt. Durch den Vergleich der Phasenkontrastbilder mit den Messungen der Zelladhäsion und den numerischen Berechnungen konnte sowohl eine Veränderung des Zell-Substratabstands ( $\Delta g \approx 0,31 \mu\text{m}$ ) als auch eine Zellgrößenänderung ( $\Delta r_{\text{Zelle}} \approx 5 \mu\text{m}$ ) detektiert werden. Dabei zeigte der Zell-Substratabstand in der Mikrolochanordnung den größeren Einfluss auf das Impedanzverhalten, da der größte Impedanzanstieg mit einer großen Abstandsänderung und nur einer geringfügigen Zellgrößenänderung korrelierte. Durch die starken Vereinfachungen des numerischen Modells war es nicht möglich ähnliche Zell-Substratabstände von 15 – 40 nm aufgeführt in der Literatur für adhärenzte Zellen zu erhalten (Giebel, 1999; Izzard, 1976). Erstaunlich war, dass schon acht Minuten nach der Zellpositionierung konstante und stabile Impedanzparameter detektiert werden konnten. Die Dauer der optischen Untersuchung der Adhäsion in der Zellkultur lag zwischen 0,5 und 2 Stunden. Die kurze Zeit für die Zellausbreitung und Anhaftung könnte möglicherweise damit zusammenhängen, dass der Unterdruck eine stimulierende Wirkung auf die Zelladhäsion hatte (Schwartz, 2008).

Um jedoch alle oben genannten Parameter gleichzeitig zu erfassen, ist die Impedanz als alleiniges Instrument nicht ausreichend. Das liegt daran, dass eine Verringerung der Impedanz durch mehrere Effekte, wie beispielsweise durch ein Ablösen der Zelle, durch eine Verkleinerung der Zellgröße oder durch eine Membranpermeabilisierung, hervorgerufen werden kann. Deshalb müssen, wie in dieser Arbeit gezeigt, zusätzlich zur Impedanz auch Mikroskopbilder sowie Berechnungen zur genauen Dateninterpretation herangezogen werden. Nur so kann die jeweilige Parameteränderung (Größe, Zell-Substratabstand, Membranperforation) eindeutig der Änderung im Impedanzverlauf zugeordnet werden, wobei eine Markersubstanz, wie z. B. das gesundheitsgefährdende Propidiumiodid, nicht mehr benötigt wird. Im Vergleich zu der Verwendung von Planarelektroden hat das mikrolochbasierte Verfahren in einer 1 x 1 Chipkonfiguration erhebliche Vorteile, da das elektrische Signal einzelner Zellen und nicht eines kompletten Zellverbands erfasst wird (Giaever, 1993). Bei einem Zellrasen können neben der Wirkung

des Agens, Zellkontakte (Arndt, 2004), die Höhe der Konfluenz oder das Zellwachstum (Xiao, 2003) das Impedanzverhalten stark beeinflussen. Damit ist die gemessene Impedanz ein integraler Wert von unterschiedlichen Parametern und zusätzlich gemittelt über eine große Zellzahl, wodurch eine präzise Interpretation der Messsignale auch über zusätzliche Mikroskopbilder und Berechnungen kaum möglich ist.

Bislang konnte in anderen Arbeiten das elektrische Signal an Einzelzellen etwa 20 Minuten lang aufgezeichnet werden (Cho, 2007; Malleo, 2010), was in diesen Arbeiten auszureichen schien, um schnelle Membranänderungen induziert durch stark toxische Substanzen zu untersuchen. Auch die Verwendung von optischen Pinzetten erlaubte keine längere Untersuchung der eingefangenen Zellen (Werner, 2011). Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass durch die Feinjustage des Positionierungsdrucks der mögliche Beobachtungszeitraum auf ungefähr drei Stunden ausgedehnt werden konnte, was einer Vergrößerung des Analysezeitraums im Vergleich zur Literatur um Faktor neun entspricht (Cho, 2007; Malleo, 2010; Werner, 2011). Durch die Vergrößerung des Analysezeitraums konnte ein sehr sensibles Verhalten der Mikrolochanordnung gegenüber Membranperforationen festgestellt werden, da das Impedanzverhalten früher eine Signaländerung zeigte als das optische Signal über biologische Marker zu detektieren war. Folglich sind Membranperforationen über die Aufzeichnung der Impedanz schneller erfassbar als mit einer optischen Detektion der Markersubstanz Propidiumiodid. Mittels der Erfassung der Impedanz können tote Zellen ohne den Einsatz von Markersubstanzen detektiert und lokalisiert werden. Dadurch ergibt sich eine Optimierung des Systems in der Analysezeit, da neben Positionierstellen mit Mehrfachbelegungen auch tote Zellsysteme auf den Mikrolöchern für die weiteren Betrachtungen wegfallen. Folglich kann sich durch diesen einfachen Analyseschritt eine beträchtliche Erhöhung des Durchsatzes ergeben.

### *Erfassung der Produktionseigenschaften*

Für die Bestimmung des Parameters „Produktivität“ wurde in dieser Arbeit eine Antikörper-sekretierende sowie eine Protein-exprimierende Zelllinie, welche das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert, verwendet. Dabei soll ein bildbasiertes Verfahren die Produktivität ermitteln und für die Quantifizierung von Zellsekreten der Chip mit höher-viskosem Medium kombiniert werden. Dabei musste untersucht werden, wie das Softagar auf die separierten Zellen appliziert werden kann.

Die Proteinmenge einer Zelle, solange das Protein fluoreszenzmarkiert ist, kann heutzutage über das Durchflusszytometer im Hochdurchsatz quantitativ erfasst werden (Borth, 2000/2001; Herzenberg, 2002; Sklar, 2007). Nachteilig an diesem Verfahren ist jedoch, dass die analysierten Zellen dem Beobachter nicht optisch vorliegen, Zellen nur in Suspension analysierbar sind und sich eine gewisse Ungenauigkeit durch die schnelle Analyse ergibt. Ferner ist die Interpretation der generierten Daten nicht einfach (Herzenberg, 2006). In der Vergangenheit ist das Durchflusszytometer mit Sortiereinheit schon häufig auf einem Chip implementiert worden (Fu, 2002; Krüger, 2002; Wang, 2005; Wolff, 2003). Dazu wurden häufig Kanalstrukturen eingesetzt, welche die Zellen sehr schnell an einer optischen Sensoreinheit vorbeiführen. Fu et al. zeigten, dass eine Reduktion der ungenauen oder falschen Zuordnung möglich ist, wenn die Probe mehrmals die Sensoreinheit passiert (Fu, 1999). Eine Methode, die viele Zellen parallel ablegt und analysiert, wurde bislang nur vereinzelt untersucht (Gong, 2010; Wlodkowic, 2009; Yamamura, 2005). Im Vergleich zu Kanalstrukturen, können durch das parallelisierte Ablegen vieler Zellen diese länger in der Sensoreinheit verbleiben, wodurch eine exakte Quantifizierung erreicht wird und somit falsche Zuordnungen komplett eliminiert werden, bei vergleichbarem Zelldurchsatz.

Die Menge des grün fluoreszierenden Proteins pro Zelle der verwendeten Zelllinie konnte über bildbasierte Verfahren quantifiziert werden, wobei die Protein-Fluoreszenzintensität-Relation ausgenutzt wurde. Diese Relation besagt, dass die Stärke der Fluoreszenzintensität mit der Menge an Protein pro Zelle korreliert (Meng, 2000). In dieser Arbeit wurde ein bildbasiertes Verfahren entwickelt, um schnell und präzise die Produktivität von vielen Zellen zu bestimmen. Gerade am Beispiel der Dateninterpretation, der Datenanalyse und der Möglichkeit zur Datenkontrolle hat das mikrolochbasierte System wesentliche Vorteile gegenüber dem Durchflusszytometer. Dabei kann die Ausgabe der Bildverarbeitungssoftware zu jedem Zeitpunkt manuell überprüft werden.

Für die Abschätzung der Produktivität einer sekretierenden Zelllinie kann das durchflusszytometrische Verfahren nicht ohne zusätzliche zeitaufwändige und kostspielige Schritte angewendet werden. In Asemissen et al. war es nur über den Umweg einer Affinitätsmatrix, welche das Sekret an die Zellmembran bindet, möglich, eine Quantifizierung der Sekretmenge vorzunehmen (Asemissen, 2001; Manz, 1995). Die geläufigeren Verfahren zur Detektion von Antikörpersekreten sind der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest und das enzymgekoppelte Immunospot Verfahren (Ekerfelt, 2002; Tanguay, 1994).

Diese Methoden wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen in der Vergangenheit in miniaturisierten Zelllaboren umgesetzt, wobei jedoch viele Arbeitsschritte benötigt werden, um entweder die Chipoberfläche zu modifizieren oder die Menge an Sekret nachzuweisen (Jin, 2009; Love, 2006; Ogunniyi, 2009; Song, 2009). Den Klon mit der höchsten Produktion nur durch die Zugabe eines Gels, auf einem Chip mittels Fluoreszenzmessung zu identifizieren, wurde dabei nicht in Betracht gezogen.

Vor diesem Hintergrund sollte die Eignung eines höherviskosen Mediums zur Reduktion der Diffusionsstrecke und zur Akkumulation des Sekrets auf dem entwickelten Mikrolocharray-Chip untersucht werden, um damit auf kleinstem Raum den Klonen genau ihre produzierte Sekretmenge zuordnen zu können. Die Verwendung des höherviskosen Mediums in Kombination mit dem Mikrolochchip ist ein ganz neuer Ansatz und konnte selbst nach intensiver Recherche nicht in der Literatur gefunden werden. Dazu musste zunächst eine Möglichkeit entwickelt werden, um die Applikation des höherviskosen Mediums mit der Positionierungstechnik zu kombinieren. Wurde die Positionierung der Zellen in flüssigem Medium vorgenommen und daraufhin das Medium durch das Gel ersetzt, so konnte eine „Entpositionierung“ der abgelegten Zellen beobachtet werden. Dabei bildete sich durch das Absinken des Gels im flüssigen Medium eine Gelfront aus, welche die eingefangenen Zellen von den Positionierungsstellen abspülte. Das Positionieren der Zellen in höherviskosem Medium, erhöhte den Positionierungszeitraum, welcher zu einer vergrößerten Zellmortalität führte. Nur durch den Aufsatz der SU-8 Kavitäten wurde einem „Entpositionieren“ der abgelegten Zellen bei der Zugabe des höherviskosen Mediums entgegengewirkt.

Frame und Hu zeigten, dass in einer heterogenen Population ein „Überwachsen“ der hoch-produzierenden Zellen durch schwach-produzierende Zellen stattfinden kann, wodurch die Produktivität der Gesamtpopulation über einen längeren Zeitraum sinkt (Frame, 1990). Folglich mussten Mehrfachbelegungen einer Kavität ausgeschlossen werden. Fehlvereinzlungen konnten auf dem Chip im Vergleich zu einer 6-Lochplatte, wie sie in dem Pickroboter der Firma Genetix zum Einsatz kommen, nach der Gelapplikation sehr gut detektiert werden, da der Positionierbereich klein war und gleichzeitig die Kavitäten und somit die Zellen in einer Fokusebene lagen.

Durch die höhere Viskosität des Mediums konnte eine Reduzierung der Diffusionsstrecke bei einer gleichzeitigen Akkumulation des Sekrets erreicht werden. Durch die Zugabe eines fluoreszenzkonjugierten Antikörpers konnte die Menge des Antikörpersekrets

direkt abgeschätzt werden. Der fluoreszierende Sekundärantikörper bindet an den sekretierten Antikörper, so dass die Stärke des Fluoreszenzsignals in direktem Zusammenhang zur Menge des Antikörpersekrets steht. Das Sekret konnte in den SU-8 Kavitäten gehalten werden, da sich ein deutlich sichtbarer Fluoreszenzring am Kavitätenrand durch den Sekundärantikörper ausbildete. Durch die Kavitätendimensionierung war auch nach einer 3-tägigen Inkubation noch keine Kreuzkontamination, d. h. eine Vermischung der sekretierten Antikörper benachbarter Zellklone, zu erkennen. Demzufolge war eine eindeutige Zuordnung der Sekretmenge zu den jeweiligen produzierenden Klonen möglich. Die Sekretmenge konnte wiederum über die automatisierte Bildverarbeitung schnell und präzise quantifiziert werden. Im Vergleich dazu können Kreuzkontaminationen in Kavitätenchips mit flüssigem Medium nicht komplett ausgeschlossen werden (Jin, 2009; Song, 2009). Über eine vergleichende Studie konnte mittels ELISA eine gute Übereinstimmung der aufgebauten Bildverarbeitung mit der angewandten ELISA Methode im Bezug auf die Quantifizierung der Antikörperproduktion gefunden werden.

Folglich konnte durch die Modifikation der Chipplattform, d. h. durch das Aufbringen der Kavitäten, eine Quantifizierung sowohl der intrazellulären Proteinmenge als auch von Zellsekreten erreicht werden. Dabei ließ die adaptierte Bildverarbeitung eine schnelle, präzise und zuverlässige Bestimmung zu. Somit lassen sich durch den beschriebenen Charakterisierungsschritt hoch-produzierende Zellen auf dem Array-Chip sehr genau lokalisieren und von schwach-produzierenden unterscheiden.

### *Erfassung der Proliferation*

Die in der Literatur beschriebenen Mikrolochararray-Chips wurden bislang noch nicht verwendet, um das Proliferationsverhalten von Suspensionszellen zu untersuchen (Cho, 2007; Hosokawa, 2009; Matsunaga, 2008; Thielecke, 1999). In Cho et al. wurde eine Proliferation von adhärent wachsenden L929-Zellen auf Mikrolöchern gezeigt (Cho, 2007).

Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit, durch den Aufsatz von SU-8 Kavitäten, Begrenzungsstrukturen geschaffen, die auch die Proliferation von Suspensionszellen auf dem Chip ermöglicht und somit das Beurteilen der Zellklone anhand ihrer Generationszeit zulässt. Dabei war die chipbasierte Kultivierung ohne permanenten Unterdruck möglich. Es konnte ein sehr heterogenes Wachstum detektiert werden, wobei hoch-

produzierende Zellen eine längere Generationszeit besaßen als schwächerproduzierende Zellsysteme. Dieser Zusammenhang wurde bereits in vergleichbaren Studien belegt (Bae, 1995; Chuck, 1992; Lee, 1991). Im Hinblick auf dynamische Zellvorgänge, wie z. B. der Proliferation, hat das aufgebaute System sowohl gegenüber dem Durchflusszytometer als auch der magnetischen Zellsortierung immense Vorteile. Sowohl das Durchflusszytometer als auch die magnetische Zellsortierung erlauben weder eine Kultivierung der Zellen im System noch eine Erfassung von dynamischen Zellvorgängen.

### **Validierung des aufgebauten Systems**

Nachdem die Zellen über einen Multiparameterdatensatz beschrieben werden konnten, sollte abschließend der gewinnbringende Einsatz des Systems untersucht werden. Der Fokus lag dabei auf einer gesteigerten Produktivität der Zellklone, was für die Ausbeute an therapeutischen Proteinen das entscheidende Kriterium darstellt. Als vergleichende Studie wurde eine Selektion über ein Pickroboter+Cellavista System und über Verdünnungsreihen, welche am häufigsten bei der Zellklonierung Verwendung finden (Duvall, 2011; Puck, 1955; Sabourin, 2011; Seitz, 2011), durchgeführt.

Bei allen Zellisolierungen konnten weder Kontaminationen noch Mykoplasmen in der Kultur detektiert werden. Es zeigte sich, dass das chipbasierte Verfahren in Kombination mit der Bildverarbeitung eine Entnahme von hochproduzierenden CHO-Zellen unterstützt, da 61 % der Klone eine höhere Produktivität gegenüber der Ursprungspopulation besaßen. Im Falle des grün fluoreszierenden Proteins konnte eine maximale Steigerung der Produktivität um den Faktor 25 erzielt werden. Im Vergleich dazu konnten Verdünnungsreihen bei nur etwa 5 % der generierten Klone eine Steigerung der Produktivität liefern, wobei nur eine 2 – 4 fache Steigerung der Produktionseigenschaft erzielt werden konnte. In Salmén et al. wurden 1300 Klone über Verdünnungsreihen generiert, wovon nur 167 Klone (13 %) den Anforderungen entsprachen (Salmén, 2012). Bei diesen Untersuchungen wird die Schwachstelle von Verdünnungsreihen offen dargelegt, da ein solches Verfahren keine Charakterisierung der Zellen beinhaltet und folglich keine systematische Entnahme stattfindet (Browne, 2007; Dharshanan, 2011; Underwood, 1988).

Die Hybridomklone auf dem Chip zeigten schon nach weniger als drei Tagen eine Anreicherung des Sekrets, die ausreichend war, um eine Quantifizierung der Sekretmenge und eine Isolierung der Klone vorzunehmen. Im Hinblick auf die Reduktion der Analyse-



zeit konnte in vergleichenden Studien schon in wesentlich kürzeren Zeiten die Menge an Zellsekreten quantitativ erfasst werden (Love, 2006; Ogunniyi, 2009), wobei im Vergleich zu Verdünnungsreihen mit ELISA, durch die benötigte Antikörpermenge, wesentlich mehr Zeit in Anspruch genommen werden muss. Wird die Zeit bis zur Klonselktion in Betracht gezogen so ist das in dieser Arbeit entwickelte System (4 Tage) fast doppelt so schnell im Vergleich zum ClonePix System der Firma Genetix (7 Tage) (Dharshanan, 2011).

Die Produktivität aller Klone konnte über den Selektionsschritt vergrößert werden, wobei eine maximale Steigerung um das 1,7-fache gegenüber der Ausgangskultur erzielt wurde. Über das Pickroboter+Cellavista Verfahren konnte in einer vergleichenden Studie die Produktivität um maximal den Faktor 2,1 gegenüber der Ursprungskultur gesteigert werden.

Wie schon bei den CHO-Zellen zeigte auch bei den Hybridomzellen der Klon mit dem geringsten Wachstum die stärkste Produktivität. Die ermittelte Abhängigkeit der Produktivität von der Generationszeit eines Zellproduktionssystems bestätigt die Datenlage der Literatur (Bae, 1995; Chuck, 1992; Frame, 1990; Lee, 1991).

Die Volumenbegrenzung des Fermenters im Batch Betrieb stellt eine Limitierung der zugegebenen Biomasse dar, könnte aber mit schneller wachsenden, geringer produzierenden Zellsystemen im Vergleich zu einem Zellklon mit einer größeren Generationszeit und Produktivität in der gleichen Zeit öfters befüllt werden. Dabei könnte der gleiche Gewinn an therapeutischen Proteinen erzielt werden, wobei durch das öftere Befüllen des Fermentervolumens größere Mengen an Rohstoffen, wie z. B. Medium, eingesetzt werden müssten, was eine Erhöhung der Kosten ergeben würde. Gerade am Beispiel der Ausbeute von therapeutischen Proteinen muss folglich eine Optimierung des Wachstums und der Produktivität erfolgen, um das beste Kosten-Nutzen Ergebnis zu erlangen. Bei der Expansion und einer längeren Kultivierung der Zellklone zeigte sich, dass die Produktivität mit fortschreitender Dauer der Kultivierung rückläufig war. Die Ursache für die Reduktion der Produktivität wurde bislang durch Instabilitäten des Zellsystems begründet (Barnes, 2003), wobei nicht-produzierende Zellen auftreten können (Kromenaker, 1994; Merritt, 1993), welche die produzierenden Zellen überwachsen und somit die Gesamtproduktivität sinkt. Eine umstrittene Datenlage ergibt sich bei der Ursachenforschung für das Auftreten von nicht-produzierenden Zellen in Hybridomzelllinien (Chuck, 1992; Coco-Martin, 1992; Frame, 1990; Heath, 1990; Ozturk, 1990). Im

Fälle der CHO-Zellen ist die Datenlage eindeutiger, wobei hier die Abnahme der Produktivität meist durch chromosomale Neuordnungen erklärt wird (Bacsi, 1986; Flintoff, 1984; Rolig, 1997). Dabei kann die Abnahme der Produktivität bis zu 80 % bei Hybridom- und CHO-Zellen betragen (Merritt, 1993; Weidle, 1988). Demnach muss eine stetige Kontrolle der Produktivität des Zellsystems erfolgen, um einer nachlassenden Ausbeute an therapeutischen Proteinen mit einer erneuten Selektion entgegenzuwirken. Nachteilig im Vergleich zum Stand der Technik ist momentan, dass jegliche Automatisierung fehlt und sehr viele manuelle Schritte für die Klonierung nötig sind. Somit können bei den einzelnen Arbeitsschritten, z. B. beim Waschschrift, bei der Zugabe des Gels oder bei der Zellentnahme, durch die manuelle Bedienung des Anwenders große Varianzen auftreten, welche zum Scheitern der Zellklonierung führen können. Auch ist der Adapter momentan noch kein Einwegprodukt, so dass aufwändige Sterilisationsprozesse notwendig sind. Ferner muss auf größere Arrays übergegangen werden, um konkurrenzfähig gegenüber den etablierten Systemen zu sein.

Trotz der momentan noch vorliegenden Nachteile konnte in dieser Arbeit erfolgreich ein miniaturisiertes Selektionssystem aufgebaut werden, welches durch den Einsatz des Array-Chips leicht skalierbar ist und damit große Mengen an Zellen analysierbar macht. Einzelzellen können nicht-invasiv über eine hydrodynamische Positioniertechnik parallel mit räumlicher Trennung in einem Raster abgelegt werden. Höherviskose Medien sind durch die aufgesetzten Kavitäten einsetzbar und zusätzlich kann eine chipbasierte Expansion realisiert werden. Eine Steigerung der Klonierungseffizienz konnte durch die Entnahme größerer Zellkolonien erreicht werden. Mittels der modifizierten Mikrolocharray-Plattform, der Erfassung der Impedanz, der Verwendung von höherviskosem Medium und einer automatisierten Bildverarbeitung war es möglich relevante Parameter für ein produzierendes Zellsystem zu erfassen.

Es konnten gezeigt werden, dass sich durch das aufgebaute Selektionssystem die Produktivität durch einen Selektionsschritt von hoch-produzierenden Zellen erheblich steigern lässt. Damit kann ein solches System für die Optimierung von Zelllinien im Hinblick auf eine gesteigerte Ausbeute und höhere Qualität der therapeutischen Proteine für rekombinante Arzneimittel eingesetzt werden.

## Ausblick

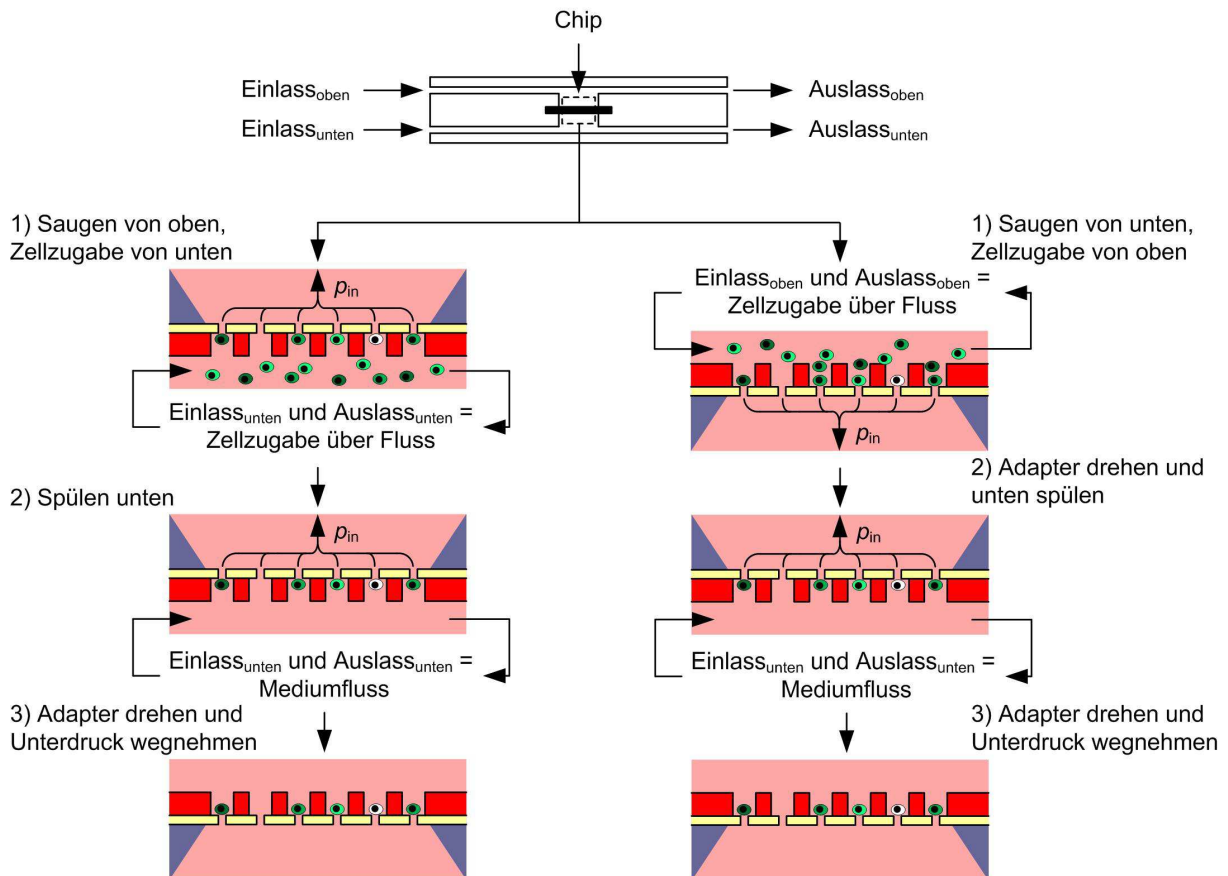
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das entworfene und aufgebaute Zellselktionssystem gewinnbringend in der Steigerung der Produktivität relevanter Zelllinien zur Herstellung von Biopharmazeutika eingesetzt werden kann. Es konnte sowohl eine Steigerung in der Proteinexpression als auch in der Antikörpersekretion durch die Selektion hoch-produzierender Zellen erzielt werden. Um das System für die Anreicherung der therapeutischen Proteine für industrielle Applikationen nutzen zu können, ist eine Automatisierung aller Schritte unumgänglich. So könnte beispielsweise das Mitschreiben der Impedanz dazu genutzt werden, um die vollständige Belegung des Chips zu detektieren und folglich den Schritt der Zellcharakterisierung automatisch anzustoßen.

Bei der Zellvereinzelung könnte zusätzlich zur hydrodynamischen Positionierung die Gravitation ausgenutzt werden. Dazu könnten die Zellen entgegen der Gravitation angesaugt, bzw. der Adapter nach dem Positioniervorgang gedreht werden. Dabei wäre möglicherweise eine Beschichtung der Chipoberfläche mit Teflon von Vorteil, um die Zellhaftung der sedimentierten Zellen an der Oberfläche zu minimieren. Folglich könnten Mehrfachbelegungen und sedimentierte Zellen komplett vermieden werden (Abb. A.1). Eine Möglichkeit zur Selektion adhärent wachsender Zellen auf den Positionierungsstellen, wäre die langsame Manipulation nach Thielecke et al. mit der Array-Plattform zu kombinieren (Thielecke, 2005). Auch wäre der Einsatz eines energiereichen Lasers möglich, um die nicht erwünschten Zellen auf dem Chip zu schädigen und folglich nur die Zielzellen auf dem Chip zu belassen und den kompletten Chip weiterzukultivieren.

Für eine erhöhte Sterilität und einen geeigneten Fluidikaufsatz sollte die Adaptereinheit geschlossen aufgebaut werden. Dabei wäre der Einsatz eines Septumverschluss vorstellbar, um trotzdem eine Möglichkeit zu besitzen, mittels des Kapillarsystems Zellen zu entnehmen.

Um die Multiparameterfähigkeit zu erweitern, könnte die Chipplattform mit der nicht-invasiven Raman-Spektroskopie verbunden werden. Durch die hydrodynamische Positioniertechnik kann der Wirkung des Lasers als optische Pinzette entgegengewirkt werden. Damit können selbst Zellen in wässriger Lösung mit mehr als nur einem Raman-Spektrum abgebildet werden. Es ist sogar möglich, das gesamte Zellvolumen der vereinzelte vorliegenden Zellen durch Raman-Spektren abzubilden, was einen zusätzlichen Informationsgewinn bedeuten würde.

Gerade die Multiparameterfähigkeit ist in Hinblick auf seltene Zellen wichtig, um eine präzise Identifikation zu erzielen. Solche Zellen könnten beispielsweise zirkulierende Tumorzellen sein, die schon in sehr frühen Stadien von Krebserkrankungen auftreten und eine sehr geringe Auftretswahrscheinlichkeit besitzen.



**Abb. A.1** Darstellung einer möglichen Verbesserung der Zellvereinzelung auf dem Chip.

Ein symmetrischer Adapter müsste eingesetzt werden, welcher auf dem Mikroskopisch rotierbar ist. Bei der verbesserten Zellvereinzelung wird zusätzlich zum hydrodynamischen Positionieren die Gravitation ausgenutzt. Zellen können somit über Kopf angesaugt bzw. die positionierten Zellen im Adapter auf den Kopf gedreht werden. Überschüssige Zellen fallen von der Membran und können über einen Spülfluss aus dem System entfernt werden.

Das in dieser Arbeit beschriebene Zellisolationssystem ist unter dem Aspekt der Generierung von hoch-produzierenden Zelllinien für die Pharmaindustrie konzipiert und aufgebaut worden. Durch die oben genannten Optimierungen wäre ein weiterer Einsatzbereich des Systems auch in der Diagnostik möglich. Dabei könnte durch die Multiparameteranalyse einer Blutprobe eine sehr genaue Diagnose möglich werden und die Therapiemöglichkeiten noch individueller adaptiert werden.

---

**Literaturverzeichnis**

- Adam, G., Läuger, P., Stark, G. (1977). *Physikalische Chemie und Biophysik*, Hochschultext (Berlin Heidelberg, Springer).
- al-Rubeai, M., Emery, A. N. (1993). Flow cytometry in animal culture. *Nat Biotechnol* *11*, 572-9.
- al-Rubeai, M., Emery, A. N., Chalder, S. (1991). Flow cytometric study of cultured mammalian cells. *J Biotechnol* *19*, 67-81.
- Arndt, S., Seebach, J., Psathaki, K., Galla, H. J., Wegener, J. (2004). Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis. *Biosens Bioelectron* *19*, 583-94.
- Asami, K. (2006). Effects of membrane disruption on dielectric properties of biological cells. *J Phys D: Appl Phys* *39*, 4656-63.
- Asami, K., Takahashi, Y., Takashima, S. (1990). Frequency domain analysis of membrane capacitance of cultured cells (HeLa and myeloma) using the micropipette technique. *Biophys J* *58*, 143-8.
- Asemissen, A. M., Nagorsen, D., Keilholz, U., Letsch, A., Schmittel, A., Thiel, E., Scheibenbogen, C. (2001). Flow cytometric determination of intracellular or secreted IFN $\gamma$  for the quantification of antigen reactive T cells. *J Immunol Methods* *251*, 101-8.
- Ashkin, A. (1992). Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophys J* *61*, 569-82.
- Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Yamane, T. (1987). Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature* *330*, 769-71.
- Asphahani, F., Zhang, M. (2007). Cellular impedance biosensors for drug screening and toxin detection. *Analyst* *132*, 835-41.
- Atif, M., Firdous, S., Nawaz, M. (2010). Laser-induced effects in different biological samples. *Lasers Med Sci* *25*, 545-50.
- Bacsi, S. G., Wejksnora, P. J. (1986). Effect of increase in ploidy on the activation of nucleolar organizer regions in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Exp Cell Res* *165*, 283-9.
- Bae, S. W., Hong, H. J., Lee, G. M. (1995). Stability of transfectomas producing chimeric antibody against the pre-S2 surface antigen of hepatitis B virus during a long-term culture. *Biotechnol Bioeng* *47*, 243-51.
- Bakken, L. R., Olsen, R. A. (1987). The relationship between cell size and viability of soil bacteria. *Microb Ecol* *13*, 103-14.
- Bandiera, L., Borgo, M., Cellere, G., De Toni, A., Santoni, L., Bersani, C., Paccagnella, A. (2006). Electrical modeling of a biochip for genetic manipulation of single cells Paper presented at: Electron Devices Meeting, 2006. IEDM '06. International.
- Bao, J. Z., Davis, C. C., Schmukler, R. E. (1992). Frequency domain impedance measurements of erythrocytes. Constant phase angle impedance characteristics and a phase transition. *Biophys J* *61*, 1427-34.
- Barnes, L. M., Bentley, C. M., Dickson, A. J. (2003). Stability of protein production from recombinant mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* *81*, 631-9.
- Bashir, R. (2004). BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects. *Adv Drug Deliver Rev* *56*, 1565-86.
- Battye, F. L., Light, A., Tarlinton, D. M. (2000). Single cell sorting and cloning. *J Immunol Methods* *243*, 25-32.
- Becker, R. (1995). An Adaptive Finite Element Method for the Incompressible Navier-Stokes Equations on Time-Dependent Domains. Dissertation.
- Beebe, D. J., Mensing, G. A., Walker, G. M. (2002). Physics and applications of microfluidics in biology. *Annu Rev Biomed Eng* *4*, 261-86.

- Betenbaugh, M. J., Arden, N., Nivitchanyong, T. (2004). Cell Engineering Blocks Cell Stress and Improves Biotherapeutic Production. *Bioprocess J* 3, 23-28.
- Bhushan, B. (2007). Nanotribology and nanomechanics of MEMS/NEMS and BioMEMS/BioNEMS materials and devices. *Microelectron Eng* 84, 387-412.
- Biran, I., Walt, D. R. (2002). Optical imaging fiber-based single live cell arrays: a high-density cell assay platform. *Anal Chem* 74, 3046-54.
- Birch, J. R., Racher, A. J. (2006). Antibody production. *Adv Drug Deliver Rev* 58, 671-85.
- Boedicker, J. Q., Vincent, M. E., Ismagilov, R. F. (2009). Microfluidic confinement of single cells of bacteria in small volumes initiates high-density behavior of quorum sensing and growth and reveals its variability. *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 5908-11.
- Borth, N., Zeyda, M., Kunert, R., Katinger, H. (2000/2001). Efficient selection of high-producing subclones during gene amplification of recombinant Chinese hamster ovary cells by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnol Bioeng* 71, 266-73.
- Bortner, C. D., Cidlowski, J. A. (2002). Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. *Cell Death Differ* 9, 1307-10.
- Brehm-Stecher, B. F., Johnson, E. A. (2004). Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 538-59.
- Browne, S. M., Al-Rubeai, M. (2007). Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol* 25, 425-32.
- Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, C., Fröhwein, U., Schulte-Hermann, R. (2000). Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann NY Acad Sci* 926, 1-12.
- Cabrera, C. R., Yager, P. (2001). Continuous concentration of bacteria in a microfluidic flow cell using electrokinetic techniques. *Electrophoresis* 22, 355-62.
- Caffarelli, L., Kohn, R., Nirenberg, L. (1982). Partial regularity of suitable weak solutions of the Navier-Stokes equations. *Commun Pur Appl Math* 35, 771-831.
- Calles, K., Svensson, I., Lindskog, E., Häggström, L. (2006). Effects of conditioned medium factors and passage number on Sf9 cell physiology and productivity. *Biotechnol Progr* 22, 394-400.
- Campbell, C. E., Laane, M. M., Haugarvoll, E., Giaever, I. (2007). Monitoring viral-induced cell death using electric cell-substrate impedance sensing. *Biosens Bioelectron* 23, 536-42.
- Carroll, S., Al-Rubeai, M. (2004). The selection of high-producing cell lines using flow cytometry and cell sorting. *Expert Opin Biol Ther* 4, 1821-9.
- Carroll, S., Al-Rubeai, M. (2005). ACSF labelling and magnetic cell separation: a rapid method of separating antibody secreting cells from non-secreting cells. *J Immunol Methods* 296, 171-8.
- Cerioti, L., Ponti, J., Colpo, P., Sabbioni, E., Rossi, F. (2007). Assessment of cytotoxicity by impedance spectroscopy. *Biosens Bioelectron* 22, 3057-63.
- Chanana, M., Gliozzi, A., Diaspro, A., Chodnevskaia, I., Huewel, S., Moskalenko, V., Ulrichs, K., Galla, H. J., Krol, S. (2005). Interaction of polyelectrolytes and their composites with living cells. *Nano Lett* 5, 2605-12.
- Chapman, D. L. (1913). A contribution to the theory of electrocapillarity. *Phil Mag* 25, 475-81.
- Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M., Ingber, D. E. (1997). Geometric control of cell life and death. *Science* 276, 1425-8.
- Cheung, K., Gawad, S., Renaud, P. (2005). Impedance spectroscopy flow cytometry: on-chip label-free cell differentiation. *Cytom Part A* 65, 124-32.
- Chien, S., Usami, S., Dellenback, R. J., Gregersen, M. I. (1970). Shear-dependent deformation of erythrocytes in rheology of human blood. *Am J Physiol* 219, 136-42.
- Chin, V. I., Taupin, P., Sanga, S., Scheel, J., Gage, F. H., Bhatia, S. N. (2004). Microfabricated platform for studying stem cell fates. *Biotechnol Bioeng* 88, 399-415.

- Chiou, P. Y., Ohta, A. T., Wu, M. C. (2005). Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images. *Nature* *436*, 370-2.
- Chisti, Y. (2000). Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends Biotechnol* *18*, 420-32.
- Cho, S. (2009a). Electrical resistance characterization of insulating membrane with multipore. *J Electroanal Chem* *629*, 69-72.
- Cho, S., Gorjup, E., Thielecke, H. (2009b). Chip-based time-continuous monitoring of toxic effects on stem cell differentiation. *Ann Anat* *191*, 145-52.
- Cho, S., Thielecke, H. (2007). Micro hole-based cell chip with impedance spectroscopy. *Biosens Bioelectron* *22*, 1764-8.
- Cho, S., Thielecke, H. (2008). Electrical characterization of human mesenchymal stem cell growth on microelectrode. *Microelectron Eng* *85*, 1272-74.
- Choi, J. H., Ogunniyi, A. O., Du, M., Kretschmann, M., Eberhardt, J., Love, J. C. (2010a). Development and optimization of a process for automated recovery of single cells identified by microengraving. *Biotechnol Progr* *26*, 888-95.
- Choi, J. W. (2006). Fabrication of micromachined magnetic particle separators for bioseparation in microfluidic systems. In *Microfluidic Techniques*, S. D. Minteer, ed. (New Jersey, Humana Press), pp. 65-81.
- Choi, S., Lee, M. G., Park, J. K. (2010b). Microfluidic parallel circuit for measurement of hydraulic resistance. *Biomicrofluidics* *4*.
- Chován, T., Guttman, A. (2002). Microfabricated devices in biotechnology and biochemical processing. *Trends Biotechnol* *20*, 116-22.
- Chuck, A. S., Palsson, B. O. (1992). Population balance between producing and nonproducing hybridoma clones is very sensitive to serum level, state of inoculum, and medium composition. *Biotechnol Bioeng* *39*, 354-60.
- Coco-Martin, J. M., Oberink, J. W., Brunink, F., Van der Velden-de Groot, T. A., Beuvery, E. C. (1992). Instability of a hybridoma cell line in a homogeneous continuous perfusion culture system. *Hybridoma* *11*, 653-65.
- Coller, H. A., Coller, B. S. (1986). Poisson statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality. *Method Enzymol* *121*, 412-7.
- De Jesus, M., Wurm, F. M. (2011). Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *Eur J Pharm Biopharm* *78*, 184-8.
- DeMaria, C. T., Cairns, V., Schwarz, C., Zhang, J., Guerin, M., Zuena, E., Estes, S., Karey, K. P. (2007). Accelerated clone selection for recombinant CHO CELLS using a FACS-based high-throughput screen. *Biotechnol Progr* *23*, 465-72.
- Deutsch, M., Deutsch, A., Shirihai, O., Hurevich, I., Afrimzon, E., Shafran, Y., Zurgil, N. (2006). A novel miniature cell retainer for correlative high-content analysis of individual untethered non-adherent cells. *Lab Chip* *6*, 995-1000.
- Dharshanan, S., Chong, H., Hung, C. S., Zamrod, Z., Kamal, N. (2011). Rapid automated selection of mammalian cell line secreting high level of humanized monoclonal antibody using Clone Pix FL system and the correlation between exterior median intensity and antibody productivity. *Electron J Biotechn* *14*.
- Di Carlo, D., Wu, L. Y., Lee, L. P. (2006). Dynamic single cell culture array. *Lab Chip* *6*, 1445-9.
- Dittrich, P. S., Manz, A. (2006a). Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* *5*, 210-8.
- Dittrich, P. S., Tachikawa, K., Manz, A. (2006b). Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Anal Chem* *78*, 3887-908.
- Durack, G. (2000). Cell-Sorting Technology. In *Emerging Tools for Single-Cell Analysis: Advances in Optical Measurement Technologies*, G. Durack, J. P. Robinson, eds. (New York, John Wiley & Sons), pp. 1-20.

- Duvall, M., Bradley, N., Fiorini, R. N. (2011). A novel platform to produce human monoclonal antibodies: The next generation of therapeutic human monoclonal antibodies discovery. *MAbs* 3, 203-8.
- Ehret, R., Baumann, W., Brischwein, M., Schwinde, A., Wolf, B. (1998). On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures. *Med Biol Eng Comput* 36, 365-70.
- Ekerfelt, C., Ernerudh, J., Jenmalm, M. C. (2002). Detection of spontaneous and antigen-induced human interleukin-4 responses in vitro: comparison of ELISPOT, a novel ELISA and real-time RT-PCR. *J Immunol Methods* 260, 55-67.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
- Elshabini-Riad, A., Barlow, F. (1998). *Thin film technology handbook* (New York, McGraw-Hill).
- Ericsson, M., Hanstorp, D., Hagberg, P., Enger, J., Nyström, T. (2000). Sorting out bacterial viability with optical tweezers. *J Bacteriol* 182, 5551-5.
- Faley, S., Seale, K., Hughey, J., Schaffer, D. K., VanCompernelle, S., McKinney, B., Baudenbacher, F., Unutmaz, D., Wikswo, J. P. (2008). Microfluidic platform for real-time signaling analysis of multiple single T cells in parallel. *Lab Chip* 8, 1700-12.
- Ferziger, J. H., Peric, M. (2002). *Computational Methods for Fluid Dynamics*. (Berlin Heidelberg, Springer).
- Flintoff, W. F., Livingston, E., Duff, C., Worton, R. G. (1984). Moderate-level gene amplification in methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cells is accompanied by chromosomal translocations at or near the site of the amplified DHFR gene. *Mol Cell Biol* 4, 69-76.
- Foquet, M., Korlach, J., Zipfel, W., Webb, W. W., Craighead, H. G. (2002). DNA fragment sizing by single molecule detection in submicrometer-sized closed fluidic channels. *Anal Chem* 74, 1415-22.
- Frame, K. K., Hu, W. S. (1990). The loss of antibody productivity in continuous culture of hybridoma cells. *Biotechnol Bioeng* 35, 469-76.
- Frank, R. (2005). *Reflektometrische und integriert optische Sensoren für die Bioanalytik*. Dissertation.
- Frénéa, M., Faure, S. P., Pioufle, B. L., Couquet, P., Fujita, H. (2003). Positioning living cells on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis. *Mater Sci Eng C* 23, 597-603.
- Fröhlich, J., König, H. (2000). New techniques for isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiol Rev* 24, 567-72.
- Fröstl, J. M., Overmann, J. (2000). Phylogenetic affiliation of the bacteria that constitute phototrophic consortia. *Arch Microbiol* 174, 50-8.
- Fu, A. Y., Chou, H. P., Spence, C., Arnold, F. H., Quake, S. R. (2002). An integrated microfabricated cell sorter. *Anal Chem* 74, 2451-7.
- Fu, A. Y., Spence, C., Scherer, A., Arnold, F. H., Quake, S. R. (1999). A microfabricated fluorescence-activated cell sorter. *Nat Biotechnol* 17, 1109-11.
- Fuhr, G., Müller, T., Schnelle, T., Hagedorn, R., Voigt, A., Fiedler, S., Arnold, W. M., Zimmermann, U., Wagner, B., Heuberger, A. (1994). Radio-frequency microtools for particle and live cell manipulation. *Naturwissenschaften* 81, 528-35.
- Gaillet, B., Gilbert, R., Broussau, S., Pilotte, A., Malenfant, F., Mullick, A., Garnier, A., Massie, B. (2010). High-level recombinant protein production in CHO cells using lentiviral vectors and the cumate gene-switch. *Biotechnol Bioeng* 106, 203-15.
- Germann, A., Schulz, J. C., Kemp-Kamke, B., Zimmermann, H., von Briesen, H. (2011). Standardized Serum-Free Cryomedia Maintain Peripheral Blood Mononuclear Cell Viability, Recovery, and Antigen-Specific T-Cell Response Compared to Fetal Calf Serum-Based Medium. *Biopreserv Biobank* 9, 229-36.
- Giaever, I., Keese, C. R. (1984). Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 3761-4.
- Giaever, I., Keese, C. R. (1993). A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature* 366, 591-2.



- Giebel, K., Bechinger, C., Herminghaus, S., Riedel, M., Leiderer, P., Weiland, U., Bastmeyer, M. (1999). Imaging of cell/substrate contacts of living cells with surface plasmon resonance microscopy. *Biophys J* 76, 509-16.
- Gimond, C., Sonnenberg, A. (1997). Activation States of Integrins. In *Integrin-Ligand Interaction*, J. A. Eble, K. Kuhn, eds. (New York, Springer), pp. 219-40.
- Givan, A. L. (2001). Principles of flow cytometry: an overview. *Methods Cell Biol* 63, 19-50.
- Gong, Y., Ogunniyi, A. O., Love, J. C. (2010). Massively parallel detection of gene expression in single cells using subnanolitre wells. *Lab Chip* 10, 2334-7.
- Gouy, M. (1910). Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte. *J Phys Theor Appl* 9, 457-68.
- Grahame, D. C. (1947). The electrical double layer and the theory of electrocapillarity. *Chem Rev* 41, 441-501.
- Grier, D. G. (2003). A revolution in optical manipulation. *Nature* 424, 810-6.
- Grimnes, S., Martinsen, Ø. G. (2000). *Bioimpedance and bioelectricity basics* (San Diego, Academic Press).
- Grollius, H.-W. (2008). *Grundlagen der Hydraulik* (München, Carl Hanser Verlag).
- Guo, M., Chen, J., Yun, X., Chen, K., Nie, L., Yao, S. (2006). Monitoring of cell growth and assessment of cytotoxicity using electrochemical impedance spectroscopy. *BBA-Gen Subjects* 1760, 432-9.
- Hacker, D. L., De Jesus, M., Wurm, F. M. (2009). 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - where do we go from here? *Biotechnol Adv* 27, 1023-7.
- Harlow, E., Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual* (New York, Cold Spring Harbor).
- Harrington, R. F. (1961). *Time-harmonic electromagnetic fields* (New York, McGraw-Hill).
- Heath, C., Dilwith, R., Belfort, G. (1990). Methods for increasing monoclonal antibody production in suspension and entrapped cell cultures: biochemical and flow cytometric analysis as a function of medium serum content. *J Biotechnol* 15, 71-89.
- Hediger, S., Sayah, A., Gijs, M. A. M. (1999). Fabrication of a novel microsystem for the electrical characterization of cell arrays. *Sensor Actuat B-Chem* 56, 175-80.
- Herzenberg, L. A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., Herzenberg, L. A. (2002). The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem* 48, 1819-27.
- Herzenberg, L. A., Tung, J., Moore, W. A., Herzenberg, L. A., Parks, D. R. (2006). Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat Immunol* 7, 681-5.
- Hildebrandt, C., Büth, H., Cho, S., Impidjati, Thielecke, H. (2010). Detection of the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 2D and 3D cultures by electrochemical impedance spectroscopy. *J Biotechnol* 148, 83-90.
- Höber, R. (1910). Eine Methode, die elektrische Leitfähigkeit im Innern von Zellen zu messen. *Pflug Arch Eur J Phy* 133, 237-53.
- Höber, R. (1912). Ein zweites Verfahren die Leitfähigkeit im Innern von Zellen zu messen. *Pflug Arch Eur J Phy* 148, 189-221.
- Höber, R. (1913). Messungen der innern Leitfähigkeit von Zellen. *Pflug Arch Eur J Phy* 150, 15-45.
- Hochmuth, R. M. (2000). Micropipette aspiration of living cells. *J Biomech* 33, 15-22.
- Hofmann, M. (2009). *Integrierte Impedanzspektroskopie aerober Zellkulturen in biotechnologischen Hochdurchsatzscreenings*. Dissertation.
- Hosokawa, M., Arakaki, A., Takahashi, M., Mori, T., Takeyama, H., Matsunaga, T. (2009). High-density microcavity array for cell detection: single-cell analysis of hematopoietic stem cells in peripheral blood mononuclear cells. *Anal Chem* 81, 5308-13.

- Hosokawa, M., Hayata, T., Fukuda, Y., Arakaki, A., Yoshino, T., Tanaka, T., Matsunaga, T. (2010). Size-selective microcavity array for rapid and efficient detection of circulating tumor cells. *Anal Chem* **82**, 6629-35.
- Houdebine, L. M. (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microb* **32**, 107-21.
- Hua, S. Z., Pennell, T. (2009). A microfluidic chip for real-time studies of the volume of single cells. *Lab Chip* **9**, 251-6.
- Huang, X., Nguyen, D., Greve, D. W., Domach, M. M. (2004). Simulation of microelectrode impedance changes due to cell growth. *IEEE Sens J* **4**, 576-83.
- Huang, Y., Rubinsky, B. (2003). Flow-through micro-electroporation chip for high efficiency single-cell genetic manipulation. *Sensor Actuat A-Phys* **104**, 205-12.
- Hughes, M. P. (2002). Strategies for dielectrophoretic separation in laboratory-on-a-chip systems. *Electrophoresis* **23**, 2569-82.
- Hunt, T. P., Westervelt, R. M. (2006). Dielectrophoresis tweezers for single cell manipulation. *Biomed Microdevices* **8**, 227-30.
- Impidjati, Leonard, F., Thielecke, H. (2005). Evaluation of a capillary measuring system for the characterisation of small tissue samples by impedance spectroscopy at higher frequencies. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **1**, 678-81.
- Itoh, T., Mitsuhashi, J. (1995). Effects of Various Conditioned Media on Proliferation of an Isolated Single Cell from Insect Cell Lines. *In vitro cell dev-An* **31**, 814-16.
- Izzard, C. S., Lochner, L. R. (1976). Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J Cell Sci* **21**, 129-59.
- Jaeger, M. S., Mueller, T., Schnelle, T. (2007). Thermometry in dielectrophoresis chips for contact-free cell handling. *J Phys D: Appl Phys* **40**, 95-105.
- Jin, A., Ozawa, T., Tajiri, K., Obata, T., Kishi, H., Muraguchi, A. (2011). Rapid isolation of antigen-specific antibody-secreting cells using a chip-based immunospot array. *Nat Protoc* **6**, 668-76.
- Jin, A., Ozawa, T., Tajiri, K., Obata, T., Kondo, S., Kinoshita, K., Kadowaki, S., Takahashi, K., Sugiyama, T., Kishi, H., Muraguchi, A. (2009). A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. *Nat Med* **15**, 1088-92.
- Joensson, H. N., Samuels, M. L., Brouzes, E. R., Medkova, M., Uhlén, M., Link, D. R., Andersson-Svahn, H. (2009). Detection and analysis of low-abundance cell-surface biomarkers using enzymatic amplification in microfluidic droplets. *Angew Chem Int Edit* **48**, 2518-21.
- Jones, K. H., Senft, J. A. (1985). An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem* **33**, 77-9.
- Jostock, T., Li, J. (2010). Expression of IgG Antibodies in Mammalian Cells. In *Antibody Engineering*, R. Kontermann, S. Dübel, eds. (Berlin Heidelberg, Springer ), pp. 517-29.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57.
- Kim, J. Y., Kim, Y. G., Lee, G. M. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biot* **93**, 917-30.
- Kim, N. S., Kim, S. J., Lee, G. M. (1998a). Clonal variability within dihydrofolate reductase-mediated gene amplified Chinese hamster ovary cells: stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol Bioeng* **60**, 679-88.
- Kim, S. J., Kim, N. S., Ryu, C. J., Hong, H. J., Lee, G. M. (1998b). Characterization of chimeric antibody producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol Bioeng* **58**, 73-84.
- Kitamori, T., Tokeshi, M., Hibara, A., Sato, K. (2004). Peer Reviewed: Thermal Lens Microscopy and Microchip Chemistry. *Anal Chem* **76**, 52A-60A.

- Kloss, D., Kurz, R., Jahnke, H. G., Fischer, M., Rothermel, A., Anderegg, U., Simon, J. C., Robitzki, A. A. (2008). Microcavity array (MCA)-based biosensor chip for functional drug screening of 3D tissue models. *Biosens Bioelectron* *23*, 1473-80.
- Kohl, Y., Oostingh, G. J., Sossalla, A., Duschl, A., von Briesen, H., Thielecke, H. (2011). Biocompatible micro-sized cell culture chamber for the detection of nanoparticle-induced IL8 promoter activity on a small cell population. *Nanoscale Res Lett* *6*.
- Kotzar, G., Freas, M., Abel, P., Fleischman, A., Roy, S., Zorman, C., Moran, J. M., Melzak, J. (2002). Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices. *Biomaterials* *23*, 2737-50.
- Kovac, J. R., Voldman, J. (2007). Intuitive, image-based cell sorting using optofluidic cell sorting. *Anal Chem* *79*, 9321-30.
- Koyama, Y., Banzai, T., Sonezaki, S., Kusano, K. (2006). Stable expression of a heterogeneous gene introduced via gene targeting into the HPRT locus of human fibrosarcoma cells. *Biotechnol Bioeng* *95*, 1052-60.
- Krauter, R. (2000). Mikrostrukturierte Oberflächen für die Bioanalytik. *BioTec* *2*, 16.
- Kremser, L., Blaas, D., Kenndler, E. (2004). Capillary electrophoresis of biological particles: viruses, bacteria, and eukaryotic cells. *Electrophoresis* *25*, 2282-91.
- Kromenaker, S. J., Srien, F. (1994). Stability of producer hybridoma cell lines after cell sorting: a case study. *Biotechnol Prog* *10*, 299-307.
- Krüger, J., Singh, K., O'Neill, A., Jackson, C., Morrison, A., O'Brien, P. (2002). Development of a microfluidic device for fluorescence activated cell sorting. *J Micromech Microeng* *12*, 486-94.
- Kuo, S. C. (2001). Using Optics to Measure Biological Forces and Mechanics. *Traffic* *2*, 757-63.
- Kurz, C. M., Büth, H., Sossalla, A., Vermeersch, V., Toncheva, V., Dubruel, P., Schacht, E., Thielecke, H. (2011a). Chip-based impedance measurement on single cells for monitoring sub-toxic effects on cell membranes. *Biosens Bioelectron* *26*, 3405-12.
- Kurz, C. M., Maurer, A., Thees, K., Schillberg, S., Velten, T., Thielecke, H. (2011b). Impedance-controlled cell entrapment using microhole-array chips allows the isolation and identification of single, highly productive cells. *Sensor Actuat B-Chem* *158*, 345-52.
- Kurz, C. M., Thielecke, H. (2011c). Characterisation of the deflection of thin perforated SiN membranes of micro-hole array chips used for the cell selection. *Microelectron Eng* *88*, 1782-84.
- LeBaron, R. G., Athanasiou, K. A. (2000). Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopedic materials. *Tissue Eng* *6*, 85-103.
- Lee, C., Ly, C., Sauerwald, T., Kelly, T., Moore, G. (2006). High-throughput screening of cell lines expressing monoclonal antibodies. *Bioprocess Int* *4*, 32-35.
- Lee, G. M., Varma, A., Palsson, B. O. (1991). Application of population balance model to the loss of hybridoma antibody productivity. *Biotechnol Progr* *7*, 72-5.
- Li, W., Knoll, T., Thielecke, H. (2010). On-chip integrated lensless microscopy module for optical monitoring of adherent growing mammalian cells. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* *2010*, 1012-5.
- Lin, C. F., Lee, G. B., Wang, C. H., Lee, H. H., Liao, W. Y., Chou, T. C. (2006). Microfluidic pH-sensing chips integrated with pneumatic fluid-control devices. *Biosens Bioelectron* *21*, 1468-75.
- Linderholm, P., Braschler, T., Vannod, J., Barrandon, Y., Brouard, M., Renaud, P. (2006). Two-dimensional impedance imaging of cell migration and epithelial stratification. *Lab Chip* *6*, 1155-62.
- Lindström, S., Andersson-Svahn, H. (2011). Miniaturization of biological assays -- overview on microwell devices for single-cell analyses. *BBA-Gen Subjects* *1810*, 308-16.
- Love, J. C., Ronan, J. L., Grotenbreg, G. M., van der Veen, A. G., Ploegh, H. L. (2006). A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies. *Nat Biotechnol* *24*, 703-7.
- Lu, Z., Moraes, C., Ye, G., Simmons, C. A., Sun, Y. (2010). Single cell deposition and patterning with a robotic system. *PLoS One* *5*.

- Lua, L. H. L., Chuan, Y. P. (2012). Advances in Protein Production Technologies. In Biopharmaceutical Production Technology, G. Subramanian, ed. (Weinheim, Wiley), pp. 43-77.
- Ludwig, A., Kretzmer, G. (1993). Shear stress induced variation of cell condition and productivity. *J Biotechnol* 27, 217-23.
- Luong, J. H., Habibi-Rezaei, M., Meghrou, J., Xiao, C., Male, K. B., Kamen, A. (2001). Monitoring motility, spreading, and mortality of adherent insect cells using an impedance sensor. *Anal Chem* 73, 1844-8.
- MacDonald, M. P., Spalding, G. C., Dholakia, K. (2003). Microfluidic sorting in an optical lattice. *Nature* 426, 421-4.
- Majno, G., Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15.
- Malleo, D., Nevill, J. T., Lee, L. P., Morgan, H. (2010). Continuous differential impedance spectroscopy of single cells. *Microfluid Nanofluid* 9, 191-98.
- Malmivuo, J., Plonsey, R. (1995). Bioelectromagnetism: principles and application of bioelectric and biomagnetic fields (New York, Oxford University Press).
- Manz, A., Graber, N., Widmer, H. M. (1990). Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensor Actuat B-Chem* 1, 244-48.
- Manz, R., Assenmacher, M., Pflüger, E., Miltenyi, S., Radbruch, A. (1995). Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1921-5.
- Mason, M., Sweeney, B., Cain, K., Stephens, P., Sharfstein, S. T. (2012). Identifying bottlenecks in transient and stable production of recombinant monoclonal-antibody sequence variants in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Progr* 28, 846-55.
- Matasci, M., Hacker, D. L., Baldi, L., Wurm, F. M. (2008). Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects. *Drug Discov Today Technol* 5, e37-e42.
- Matsunaga, T., Hosokawa, M., Arakaki, A., Taguchi, T., Mori, T., Tanaka, T., Takeyama, H. (2008). High-efficiency single-cell entrapment and fluorescence in situ hybridization analysis using a poly(dimethylsiloxane) microfluidic device integrated with a black poly(ethylene terephthalate) micromesh. *Anal Chem* 80, 5139-45.
- Matsuoka, H., Komazaki, T., Mukai, Y., Shibusawa, M., Akane, H., Chaki, A., Uetake, N., Saito, M. (2005). High throughput easy microinjection with a single-cell manipulation supporting robot. *J Biotechnol* 116, 185-94.
- Mattanovich, D., Borth, N. (2006). Applications of cell sorting in biotechnology. *Microb Cell Fact* 5.
- McAdams, E. T., Jossinet, J. (1995). Tissue impedance: a historical overview. *Physiol Meas* 16, A1-13.
- Meng, Y. G., Liang, J., Wong, W. L., Chisholm, V. (2000). Green fluorescent protein as a second selectable marker for selection of high producing clones from transfected CHO cells. *Gene* 242, 201-07.
- Merritt, S. E., Palsson, B. O. (1993). Loss of antibody productivity is highly reproducible in multiple hybridoma subclones. *Biotechnol Bioeng* 42, 247-50.
- Merz, A. J., So, M., Sheetz, M. P. (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* 407, 98-102.
- Modak, N., Datta, A., Ganguly, R. (2009). Cell separation in a microfluidic channel using magnetic microspheres. *Microfluid Nanofluid* 6, 647-60.
- Moeller, H. C., Mian, M. K., Shrivastava, S., Chung, B. G., Khademhosseini, A. (2008). A microwell array system for stem cell culture. *Biomaterials* 29, 752-63.
- Mohan, C., Kim, Y. G., Koo, J., Lee, G. M. (2008). Assessment of cell engineering strategies for improved therapeutic protein production in CHO cells. *Biotechnol J* 3, 624-30.

- Molter, T. W., McQuaide, S. C., Suchorolski, M. T., Strovas, T. J., Burgess, L. W., Meldrum, D. R., Lidstrom, M. E. (2009). A microwell array device capable of measuring single-cell oxygen consumption rates. *Sensor Actuat B-Chem* *135*, 678-86.
- Müller, T., Gradl, G., Howitz, S., Shirley, S., Schnelle, T., Fuhr, G. (1999). A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles. *Biosens Bioelectron* *14*, 247-56.
- Neugebauer, U., Bocklitz, T., Clement, J. H., Krafft, C., Popp, J. (2010). Towards detection and identification of circulating tumour cells using Raman spectroscopy. *Analyst* *135*, 3178-82.
- Nilsson, J., Evander, M., Hammarström, B., Laurell, T. (2009). Review of cell and particle trapping in microfluidic systems. *Anal Chim Acta* *649*, 141-57.
- Ogunniyi, A. O., Story, C. M., Papa, E., Guillen, E., Love, J. C. (2009). Screening individual hybridomas by microengraving to discover monoclonal antibodies. *Nat Protoc* *4*, 767-82.
- Ozturk, S. S., Palsson, B. O. (1990). Loss of antibody productivity during long-term cultivation of a hybridoma cell line in low serum and serum-free media. *Hybridoma* *9*, 167-75.
- Pachmann, K., Clement, J. H., Schneider, C. P., Willen, B., Camara, O., Pachmann, U., Höffken, K. (2005). Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clin Chem Lab Med* *43*, 617-27.
- Panagiotou, V., Love, K. R., Jiang, B., Nett, J., Stadheim, T., Love, J. C. (2011). Generation and screening of *Pichia pastoris* strains with enhanced protein production by use of microengraving. *Appl Environ Microbiol* *77*, 3154-6.
- Park, H. E., Kim, D., Koh, H. S., Cho, S., Sung, J. S., Kim, J. Y. (2011). Real-time monitoring of neural differentiation of human mesenchymal stem cells by electric cell-substrate impedance sensing. *J Biomed Biotechnol* *2011*.
- Peng, X. F., Wang, B. X., Peterson, G. P., Ma, H. B. (1995). Experimental investigation of heat transfer in flat plates with rectangular microchannels. *Int J Heat Mass Tran* *38*, 127-37.
- Pethig, R., Burt, J. P. H., Parton, A., Rizvi, N., Talary, M. S., Tame, J. A. (1998). Development of biofactory-on-a-chip technology using excimer laser micromachining. *J Micromech Microeng* *8*, 57-63.
- Pethig, R., Markx, G. H. (1997). Applications of dielectrophoresis in biotechnology. *Trends Biotechnol* *15*, 426-32.
- Pohl, H. A. (1951). The Motion and Precipitation of Suspensoids in Divergent Electric Fields. *J Appl Phys* *22*, 869-71.
- Pohl, H. A. (1958). Some effects of nonuniform fields on dielectrics. *J Appl Phys* *29*, 1182-88.
- Puck, T. T. (1957). The genetics of somatic mammalian cells. *Adv Biol Med Phys* *5*, 75-101.
- Puck, T. T. (1958a). Growth and genetics in somatic mammalian cells in vitro. *J Cell Compar Physl* *52*, 287-311.
- Puck, T. T., Cieciura, S. J., Robinson, A. (1958b). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* *108*, 945-56.
- Puck, T. T., Marcus, P. I. (1955). A Rapid Method for Viable Cell Titration and Clone Production with Hela Cells in Tissue Culture: The Use of X-Irradiated Cells to Supply Conditioning Factors. *Proc Natl Acad Sci USA* *41*, 432-7.
- Reininger-Mack, A., Thielecke, H., Robitzki, A. A. (2002). 3D-biohybrid systems: applications in drug screening. *Trends Biotechnol* *20*, 56-61.
- Rettig, J. R., Folch, A. (2005). Large-scale single-cell trapping and imaging using microwell arrays. *Anal Chem* *77*, 5628-34.
- Revzin, A., Sekine, K., Sin, A., Tompkins, R. G., Toner, M. (2005). Development of a microfabricated cytometry platform for characterization and sorting of individual leukocytes. *Lab Chip* *5*, 30-7.
- Reyes, D. R., Iossifidis, D., Auroux, P. A., Manz, A. (2002). Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Anal Chem* *74*, 2623-36.

- Roberts, S. K., Dixon, G. K., Dunbar, S. J., Sanders, D. (1997). Laser ablation of the cell wall and localized patch clamping of the plasma membrane in the filamentous fungus *Aspergillus*: characterization of an anion-selective efflux channel. *New Phytol* *137*, 579-85.
- Rolig, R. L., Layher, S. K., Santi, B., Adair, G. M., Gu, F., Rainbow, A. J., Nairn, R. S. (1997). Survival, mutagenesis, and host cell reactivation in a Chinese hamster ovary cell ERCC1 knock-out mutant. *Mutagenesis* *12*, 277-83.
- Rossi, D. L., Rossi, E. A., Goldenberg, D. M., Chang, C. H. (2011). A new mammalian host cell with enhanced survival enables completely serum-free development of high-level protein production cell lines. *Biotechnol Progr* *27*, 766-75.
- Sabourin, M., Huang, Y., Dhulipala, P., Beatty, S., Liu, J., Slade, P., Barrett, S., Wang, S. Y., Winkler, K., Seitz, S., *et al.* (2011). Increasing antibody yield and modulating final product quality using the FreedomTM CHO-STM production platform. *BMC Proc* *5 Suppl* *8*.
- Salazar, G. T., Wang, Y., Young, G., Bachman, M., Sims, C. E., Li, G. P., Allbritton, N. L. (2007). Micropallet arrays for the separation of single, adherent cells. *Anal Chem* *79*, 682-7.
- Salmén, A., Lindgren, K., Bylund, L., Gelius, G., Fenge, C., Skoging-Nyberg, U. (2012). Automation of cell line development using the OptiCHO expression system. In Proceedings of the 21st Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dublin, Ireland, June 7-10, 2009, N. Jenkins, N. Barron, P. Alves, eds. (Netherlands, Springer), pp. 507-10.
- Sanford, K. K., Covalsky, A. B., Dupree, L. T., Earle, W. R. (1961). Cloning of mammalian cells by a simplified capillary technique. *Exp Cell Res* *23*, 361-72.
- Sato, K., Yamanaka, M., Takahashi, H., Tokeshi, M., Kimura, H., Kitamori, T. (2002). Microchip-based immunoassay system with branching multichannels for simultaneous determination of interferon-gamma. *Electrophoresis* *23*, 734-9.
- Sautter, K. (2003). Gentechnische Verfahren zur Erzeugung und Selektion von hochproduzierenden CHO-Zellen. Dissertation.
- Schade-Kampmann, G., Huwiler, A., Hebeisen, M., Hessler, T., Di Bernardino, M. (2008). On-chip non-invasive and label-free cell discrimination by impedance spectroscopy. *Cell Proliferat* *41*, 830-40.
- Schilling, E. A., Kamholz, A. E., Yager, P. (2002). Cell lysis and protein extraction in a microfluidic device with detection by a fluorogenic enzyme assay. *Anal Chem* *74*, 1798-804.
- Schmukler, R., Johnson, G., Bao, J. Z., Davis, C. C. (1988). Electrical impedance of living cells: A modified four electrode approach. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 899-901.
- Schwan, H. P. (1957). Electrical properties of tissue and cell suspensions. In *Advances in biological and medical physics*, J. H. Lawrence, C. A. Tobias, eds. (New York, Academic Press), pp. 147-209.
- Schwartz, M. A., DeSimone, D. W. (2008). Cell adhesion receptors in mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol* *20*, 551-6.
- Seitz, S., von Horsten, H., Rose, T., Sandig, V., Winkler, K. (2011). Toolbox approach for fast generation of stable CHO production cell lines from different hosts. *BMC Proc* *5 Suppl* *8*.
- Seth, G., Hossler, P., Yee, J. C., Hu, W. S. (2006). Engineering cells for cell culture bioprocessing--physiological fundamentals. *Adv Biochem Eng Biotechnol* *101*, 119-64.
- Shafiee, H., Caldwell, J. L., Sano, M. B., Davalos, R. V. (2009). Contactless dielectrophoresis: a new technique for cell manipulation. *Biomed Microdevices* *11*, 997-1006.
- Shapiro, H. M., Schildkraut, E. R., Curbelo, R., Laird, C. W., Turner, B., Hirschfeld, T. (1976). Combined blood cell counting and classification with fluorochrome stains and flow instrumentation. *J Histochem Cytochem* *24*, 396-401.
- Sharipo, H. M. (2003). *Practical flow cytometry*. (New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.).
- Shirasaki, Y., Tanaka, J., Makazu, H., Tashiro, K., Shoji, S., Tsukita, S., Funatsu, T. (2006). On-chip cell sorting system using laser-induced heating of a thermoreversible gelation polymer to control flow. *Anal Chem* *78*, 695-701.

- Sieben, V. J., Debes Marun, C. S., Pilarski, P. M., Kaigala, G. V., Pilarski, L. M., Backhouse, C. J. (2007). FISH and chips: chromosomal analysis on microfluidic platforms. *IET Nanobiotechnol* 1, 27-35.
- Simpson, N. H., Singh, R. P., Perani, A., Goldenzon, C., Al-Rubeai, M. (1998). In hybridoma cultures, deprivation of any single amino acid leads to apoptotic death, which is suppressed by the expression of the bcl-2 gene. *Biotechnol Bioeng* 59, 90-8.
- Sklar, L. A., Carter, M. B., Edwards, B. S. (2007). Flow cytometry for drug discovery, receptor pharmacology and high-throughput screening. *Curr Opin Pharmacol* 7, 527-34.
- Son, S., Grover, W. H., Burg, T. P., Manalis, S. R. (2008). Suspended microchannel resonators for ultralow volume universal detection. *Anal Chem* 80, 4757-60.
- Song, Q., Han, Q., Bradshaw, E. M., Kent, S. C., Raddassi, K., Nilsson, B., Nepom, G. T., Hafler, D. A., Love, J. C. (2009). On-chip activation and subsequent detection of individual antigen-specific T cells. *Anal Chem* 82, 473-7.
- Strömberg, A., Karlsson, A., Ryttsén, F., Davidson, M., Chiu, D. T., Orwar, O. (2001). Microfluidic device for combinatorial fusion of liposomes and cells. *Anal Chem* 73, 126-30.
- Stüber, C., Kiebling, T., Fritsch, A., Wetzels, F., Schulze, C., Strehle, D., Käs, J. (2010). Optical Cell Manipulation. In *Handbook of nanotechnology*, B. Bhushan, ed. (Heidelberg, Springer), pp. 1201-25.
- Tajiri, K., Kishi, H., Tokimitsu, Y., Kondo, S., Ozawa, T., Kinoshita, K., Jin, A., Kadowaki, S., Sugiyama, T., Muraguchi, A. (2007). Cell-microarray analysis of antigen-specific B-cells: single cell analysis of antigen receptor expression and specificity. *Cytom Part A* 71, 961-7.
- Takahashi, K., Hattori, A., Suzuki, I., Ichiki, T., Yasuda, K. (2004). Non-destructive on-chip cell sorting system with real-time microscopic image processing. *J Nanobiotechnology* 2.
- Tanguay, S., Killion, J. J. (1994). Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine Cytokine Res* 13, 259-63.
- Taylor, L. C., Walt, D. R. (2000). Application of high-density optical microwell arrays in a live-cell biosensing system. *Anal Biochem* 278, 132-42.
- Tegenfeldt, J. O., Prinz, C., Cao, H., Huang, R. L., Austin, R. H., Chou, S. Y., Cox, E. C., Sturm, J. C. (2004). Micro- and nanofluidics for DNA analysis. *Anal Bioanal Chem* 378, 1678-92.
- Thielecke, H., Impidjati, Zimmermann, H., Fuhr, G. R. (2005). Gentle cell handling with an ultra-slow instrument: creep-manipulation of cells. *Microsyst Technol* 11, 1230-41.
- Thielecke, H., Mack, A., Robitzki, A. (2001a). Biohybrid microarrays--impedimetric biosensors with 3D in vitro tissues for toxicological and biomedical screening. *Fresenius J Anal Chem* 369, 23-9.
- Thielecke, H., Mack, A., Robitzki, A. (2001b). A multicellular spheroid-based sensor for anti-cancer therapeutics. *Biosens Bioelectron* 16, 261-9.
- Thielecke, H., Stieglitz, T., Beutel, H., Matthies, T., Ruf, H. H., Meyer, J. U. (1999). Fast and precise positioning of single cells on planar electrode substrates. *IEEE Eng Med Biol Mag* 18, 48-52.
- Tjio, J. H., Puck, T. T. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J Exp Med* 108, 259-68.
- Tokimitsu, Y., Kishi, H., Kondo, S., Honda, R., Tajiri, K., Motoki, K., Ozawa, T., Kadowaki, S., Obata, T., Fujiki, S., et al. (2007). Single lymphocyte analysis with a microwell array chip. *Cytom Part A* 71, 1003-10.
- Treeratanapiboon, L., Psathaki, K., Wegener, J., Looareesuwan, S., Galla, H. J., Udomsangpetch, R. (2005). In vitro study of malaria parasite induced disruption of blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 810-8.
- Underwood, P. A., Bean, P. A. (1988). Hazards of the limiting-dilution method of cloning hybridomas. *J Immunol Methods* 107, 119-28.
- Verma, R., Boleti, E., George, A. J. (1998). Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J Immunol Methods* 216, 165-81.
- Villas, B. H. (1998). Flow cytometry: an overview. *Cell Vis* 5, 56-61.

- Voldman, J. (2006). Electrical forces for microscale cell manipulation. *Annu Rev Biomed Eng* 8, 425-54.
- von Helmholtz, H. L. F. (1879). Studies of electric boundary layers. *Ann Phys Chem* 7, 337-82.
- Wakamoto, Y., Inoue, I., Moriguchi, H., Yasuda, K. (2001). Analysis of single-cell differences by use of an on-chip microculture system and optical trapping. *Fresenius J Anal Chem* 371, 276-81.
- Walsh, G. (2005). Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. *Trends Biotechnol* 23, 553-8.
- Walsh, G. (2010). Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* 28, 917-24.
- Wang, M. M., Tu, E., Raymond, D. E., Yang, J. M., Zhang, H., Hagen, N., Dees, B., Mercer, E. M., Forster, A. H., Kariv, I., *et al.* (2005). Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching. *Nat Biotechnol* 23, 83-7.
- Wang, Y., Phillips, C., Xu, W., Pai, J. H., Dhopeswarkar, R., Sims, C. E., Allbritton, N. (2010). Micro-molded arrays for separation of adherent cells. *Lab Chip* 10, 2917-24.
- Weidle, U. H., Buckel, P., Wienberg, J. (1988). Amplified expression constructs for human tissue-type plasminogen activator in Chinese hamster ovary cells: instability in the absence of selective pressure. *Gene* 66, 193-203.
- Werner, M., Merenda, F., Piguet, J., Salathé, R. P., Vogel, H. (2011). Microfluidic array cytometer based on refractive optical tweezers for parallel trapping, imaging and sorting of individual cells. *Lab Chip* 11, 2432-9.
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442, 368-73.
- Wise, K. D., Najafi, K. (1991). Microfabrication techniques for integrated sensors and microsystems. *Science* 254, 1335-42.
- Wlodkowic, D., Faley, S., Zagnoni, M., Wikswo, J. P., Cooper, J. M. (2009). Microfluidic single-cell array cytometry for the analysis of tumor apoptosis. *Anal Chem* 81, 5517-23.
- Wolff, A., Perch-Nielsen, I. R., Larsen, U. D., Friis, P., Goranovic, G., Poulsen, C. R., Kutter, J. P., Telleman, P. (2003). Integrating advanced functionality in a microfabricated high-throughput fluorescent-activated cell sorter. *Lab Chip* 3, 22-7.
- Wu, P. Y., Little, W. A. (1984). Measurement of the Heat Transfer Characteristics of Gas Flow in Fine Channels Heat Exchangers for Microminiature Refrigerators. *Cryogenics* 24, 415-20.
- Wurm, F. M. (1990). Integration, amplification and stability of plasmid sequences in CHO cell cultures. *Biologicals* 18, 159-64.
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22, 1393-8.
- Xia, N., Hunt, T. P., Mayers, B. T., Alsberg, E., Whitesides, G. M., Westervelt, R. M., Ingber, D. E. (2006). Combined microfluidic-micromagnetic separation of living cells in continuous flow. *Biomed Microdevices* 8, 299-308.
- Xiao, C., Lachance, B., Sunahara, G., Luong, J. H. (2002). Assessment of cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing: concentration and time response function approach. *Anal Chem* 74, 5748-53.
- Xiao, C., Luong, J. H. (2003). On-line monitoring of cell growth and cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing (ECIS). *Biotechnol Progr* 19, 1000-5.
- Yamamura, S., Kishi, H., Tokimitsu, Y., Kondo, S., Honda, R., Rao, S. R., Omori, M., Tamiya, E., Muraguchi, A. (2005). Single-cell microarray for analyzing cellular response. *Anal Chem* 77, 8050-6.
- Zabaglo, L., Ormerod, M. G., Parton, M., Ring, A., Smith, I. E., Dowsett, M. (2003). Cell filtration-laser scanning cytometry for the characterisation of circulating breast cancer cells. *Cytom Part A* 55, 102-8.
- Zaretsky, I., Polonsky, M., Shifrut, E., Reich-Zeliger, S., Antebi, Y., Aidelberg, G., Waysbort, N., Friedman, N. (2012). Monitoring the dynamics of primary T cell activation and differentiation using long term live cell imaging in microwell arrays. *Lab Chip* 12, 5007-15.
- Zelle, M. R. (1951). A simple single-cell technique for genetic studies of bacteria. *J Bacteriol* 61, 345-9.



- Zhang, X., Leung, C., Lu, Z., Esfandiari, N., Casper, R. F., Sun, Y. (2012). Controlled aspiration and positioning of biological cells in a micropipette. *IEEE T Bio-Med Eng* 59, 1032-40.
- Zhu, J. (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv* 30, 1158-70.
- Zhu, Y., Jin, B., Sun, C., Huang, C., Liu, X. (1993). The effects of hybridoma growth factor in conditioned media upon the growth, cloning, and antibody production of heterohybridoma cell lines. *Hum Antibodies Hybridomas* 4, 31-5.
- Ziegler, D., Coquet, P., Tixier-Mita, A., Tresset, G., Fujita, H., Takeuchi, S. (2005). Microfluidic device for immobilization of bio-vesicles towards controlled on-chip electrofusion Paper presented at: Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, 2005. Digest of Technical Papers. TRANSDUCERS '05. The 13th International Conference on.

## Publikationen

### Fachzeitschriften

**Kurz C.**, Büth H., Sossalla A., Vermeersch V., Toncheva V., Dubruel P., Schacht E., Thielecke H. "Chip-based impedance measurement on single cells for monitoring sub-toxic effects on cell membranes." *Biosens Bioelectron* 2011; 26(8), 3405-12.

**Kurz C.**, Maurer A., Thees K., Schillberg S., Velten T., Thielecke H. "Impedance-controlled cell entrapment using microhole-array chips allows the isolation and identification of single, highly productive cells." *Sens Actuat B: Chem* 2011; 158(1), 345-52.

Borgulya M., **Kurz C.**, Knoll T., Velten T., Vieth M., Manner H., Ell C., Pech O. "Diagnosis of early Barrett's neoplasia and esophageal squamous cell neoplasia by electrical bio-impedance spectroscopy in human tissue." Eingereicht in *Gastroenterology*.

**Kurz C.**, Brenner A., Sossalla A., Dörge T., Johann R., Erhardt S., Carstensen S., Knoll T., Hauten, K., Schillberg S., Velten T. "Selection of high-producing cells from a novel miniaturized microhole-array chip platform." Manuskript in Entstehung.

### Proceedings

**Kurz C.**, Büth H., Thielecke H. "Influence of Transfection Process on Single Cell Impedance." 14th International Conference on Electrical Bioimpedance and the 11th Conference on Biomedical Applications of EIT. *J. Phys.: Conf. Ser.* 224, 2010

**Kurz C.**, Thielecke H. "Characterisation of the deflection of thin perforated SiN membranes of micro-hole array chips used for the cell selection." *Microelectron Eng* 2011; 88(8), 1782-4.

**Kurz C.**, v.d. Moosdijk S., Thielecke H., Velten T. "Towards a cellular multi-parameter analysis platform: Fluorescence in situ hybridization (FISH) on microhole-array chips" *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2011, 8408-11.

Borgulya M., **Kurz C.**, Knoll T., Velten T., Vieth M., Ell C., Pech O. "Diagnosis of early Barrett's neoplasia and esophageal squamous cell neoplasia by electrical bio-impedance spectroscopy in human tissue" *Gastrointestinal endoscopy* 75 2012, AB127.

### Vorträge

**Kurz C.**, Büth H., Thielecke H. "Influence of Transfection Process on Single Cell Impedance." Vortrag anlässlich der 14th International Conference on Electrical Bioimpedance and the 11th Conference on Biomedical Applications of EIT (ICEBI) in Gainesville (Florida), 4.-8.04.2010

**Kurz C.**, Sossalla A., Thielecke H. "Characterization of the Deflection of Thin perforated Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Membranes from Microhole Arrays used for the Cell Selection", Vortrag anlässlich der 36th International Conference on Micro & Nano Engineering (MNE) in Genua (Italien), 19.-22.09.2010

Thielecke H., **Kurz C.**, Kohl Y., Büth H. "Chip-supported characterisation of single cells." Vortrag anlässlich der 7th Münster Conference on Single Cell and Molecule Analysis, 3.-4.11.2010

**Kurz C.**, v.d. Moosdijk S., Thielecke H., Velten T. "Towards a cellular multi-parameter analysis platform: Fluorescence in situ hybridization (FISH) on microhole-array chips" Vortrag anlässlich der 33rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC) in Boston (Massachusetts), 29.08.-4.09.2011

Borgulya M., **Kurz C.**, Knoll T., Velten T., Vieth M., Ell C., Pech O. „Diagnosis of early Barrett's neoplasia and esophageal squamous cell neoplasia by electrical bio-impedance spectroscopy in human tissue" Vortrag anlässlich der Digestive Disease Week 2012 in San Diego (Kalifornien), 19.05.-22.05.2012

Borgulya M., **Kurz C.**, Knoll T., Velten T., Vieth M., Ell C., Pech O. „Virtuelle Biopsie durch elektrische Bioimpedanzspektroskopie in Ösophaguskarzinomen" Vortrag anlässlich der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für viszeral- und Stoffwechselerkrankungen, 19.09.-22.09.2012

## Poster

**Kurz C.**, Cho S., Büth H., Thielecke H. "Influence of the electrode radius on the impedance spectra of cell-covered disc-electrodes" Poster anlässlich der 35th International Conference on Micro & Nano Engineering (MNE) in Ghent (Belgien), 28.09-1.10.2009.

Neugebauer U., Bocklitz T., **Kurz C.**, Thielecke H., Clement J., Krafft C., Popp J. "Towards Detection and Identification of Circulating Tumour Cells". Poster anlässlich der SPEC 2010 in Manchester (Großbritannien), 26.06.-01.07.2010.

Neugebauer U., Bocklitz T., **Kurz C.**, Thielecke H., Clement J., Hochhaus A., Krafft C., Popp J. "A New Approach towards the Detection and Identification of Circulating Tumour Cells". Poster anlässlich der Jahrestagung der deutschen, österreichischen und schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie in Berlin, Oktober 2010.

Neugebauer U., Bocklitz T., **Kurz C.**, Thielecke H., Clement J., Hochhaus A., Krafft C., Popp J. "Raman-spectroscopy based cell identification on a microhole array chip", Poster anlässlich des 10<sup>th</sup> workshop on biosensors and bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis (BBMEC) in Weimar, 19.06.-22.06.2011

**Kurz C.**, Sossalla A., Knoll T., Velten T. "Cytometry on a chip platform", Poster anlässlich des BubbleTech to BioApp Workshops in Saarbrücken (KIST), 17.-18.10.2011

## Auszeichnungen

Posterpreis "Towards Detection and Identification of Circulating Tumour Cells". Poster anlässlich der SPEC 2010 in Manchester (Großbritannien), 26.06.-01.07.2010.

### **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. G. R. Fuhr danke ich für die Möglichkeit meine Arbeit am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) durchführen zu dürfen und das mir damit entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. H. Seidel danke ich für die freundliche Übernahme des Mitberichts.

Herrn Dr. H. Thielecke und Herrn Dr. Th. Velten danke ich für die stets hilfreiche Unterstützung in allen Belangen, die wertvollen Diskussionen und den Beistand bei organisatorischen Fragen.

Herrn Dipl.-Ing. Th. Dörge, Herrn M.Sc. A. Sossalla, Herrn Dipl.-Ing. A. Brenner und Herrn Dipl.-Ing. Th. Knoll für die Herstellung der Mikrolocharray-Chips und ihre Bereitschaft zu kritischen Diskussionen. Herrn Dr. R. Johann für das Design des Unterdrucksystems. Herrn Dipl.-Biol. S. Erhardt und Frau S. Carstensen für die Einführung in die Zellbiologie und die teilweise Übernahme der Zellkultur.

Frau K. Hauten und Herrn Prof. Dr. S. Schillberg (Fraunhofer IME) danke ich für das bereitstellen der Protein-exprimierenden und Antikörper-sekretierenden Zelllinien.

Frau Dr. V. Toncheva und Herrn Prof. Dr. P. Dubruel (PBM Universität Gent) danke ich für die Herstellung der Polymer und Polymer-DNA Komplexe.

Herrn Dr. E. Gorjup, Frau Dr. Y. Kohl, Frau Dr. S. Wagner, Frau M.Sc. A. Moosmann, Frau med. vet. S. Kurz und Frau G. Kurz für die Durchsicht des Manuskriptes und die fördernden kritischen Anmerkungen.

Allen Kolleginnen und Kollegen am Institut danke ich für die vielen fruchtbaren Diskussionen und die Zusammenarbeit im Laufe dieser Arbeit.

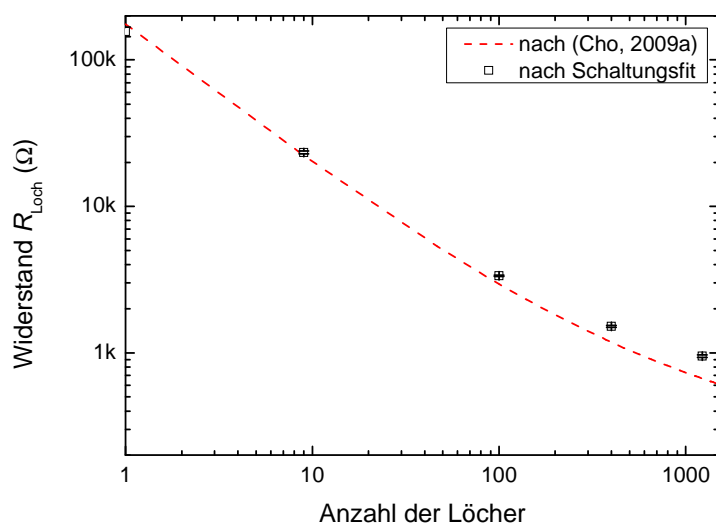
Ein großer Dank gilt allen Studenten, welche ich während dieser Arbeit betreut habe, und die daraus resultierenden Ergebnisse zu dieser Arbeit.

Mein besonderer Danke geht an meine Eltern, Geschwister und Frau S. Kohl für die immerwährende Unterstützung, das mir entgegengebrachte Verständnis und das sie mir immer den Rücken freigehalten haben.

## Anhang

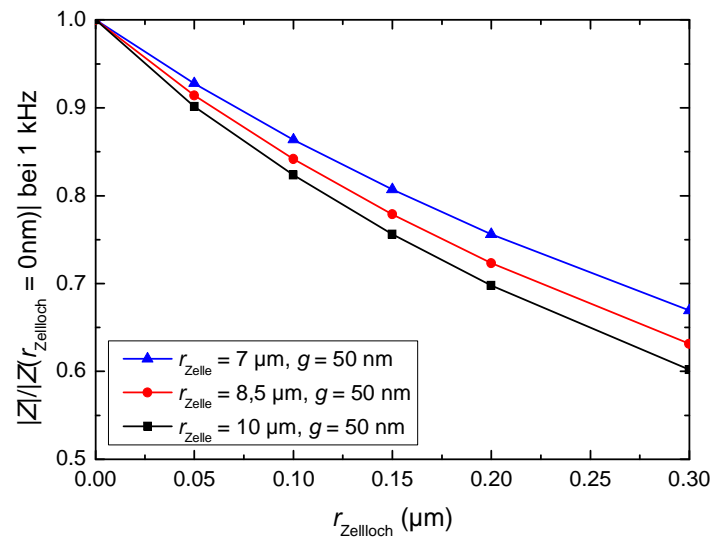
**Tabelle 16** Darstellung der Parameterwerte für die Anpassung des äquivalenten Ersatzschaltbilds nach Abb. 7.3 an die gemessenen Impedanzwerte nach Abb. 7.2.

	1 x 1 Array	3 x 3 Array
$R_{\text{Loch}} (\Omega)$	$(156,13 \pm 12,03) \times 10^3$	$(23,33 \pm 0,52) \times 10^3$
$Q_{\text{Chipmembran}}^{\circ} (\mu\text{F s}^{n_{\text{Chipmembran}}-1})$	$(1,476 \pm 0,297) \times 10^{-3}$	$(1,836 \pm 0,324) \times 10^{-3}$
$n_{\text{Chipmembran}}$	$0,890 \pm 0,014$	$0,888 \pm 0,025$
$Q_{\text{Elektrode}}^{\circ} (\mu\text{F s}^{n_{\text{Elektrode}}-1})$	$1,480 \pm 0,073$	$1,499 \pm 0,079$
$n_{\text{Elektrode}}$	$0,918 \pm 0,073$	$0,849 \pm 0,009$
	10 x 10 Array	20 x 20 Array
$R_{\text{Loch}} (\Omega)$	$3360,7 \pm 27,0$	$1514,3 \pm 26,5$
$Q_{\text{Chipmembran}}^{\circ} (\mu\text{F s}^{n_{\text{Chipmembran}}-1})$	$(1,020 \pm 0,073) \times 10^{-2}$	$1,463 \pm 0,043$
$n_{\text{Chipmembran}}$	$0,717 \pm 0,004$	$0,322 \pm 0,002$
$Q_{\text{Elektrode}}^{\circ} (\mu\text{F s}^{n_{\text{Elektrode}}-1})$	$1,495 \pm 0,031$	$1,587 \pm 0,004$
$n_{\text{Elektrode}}$	$0,850 \pm 0,003$	$0,845 \pm 0,005$
	35 x 35 Array	
$R_{\text{Loch}} (\Omega)$	$948,3 \pm 19,6$	
$Q_{\text{Chipmembran}}^{\circ} (\mu\text{F s}^{n_{\text{Chipmembran}}-1})$	$7,669 \pm 0,073$	
$n_{\text{Chipmembran}}$	$0,226 \pm 0,003$	
$Q_{\text{Elektrode}}^{\circ} (\mu\text{F s}^{n_{\text{Elektrode}}-1})$	$1,455 \pm 0,051$	
$n_{\text{Elektrode}}$	$0,859 \pm 0,005$	

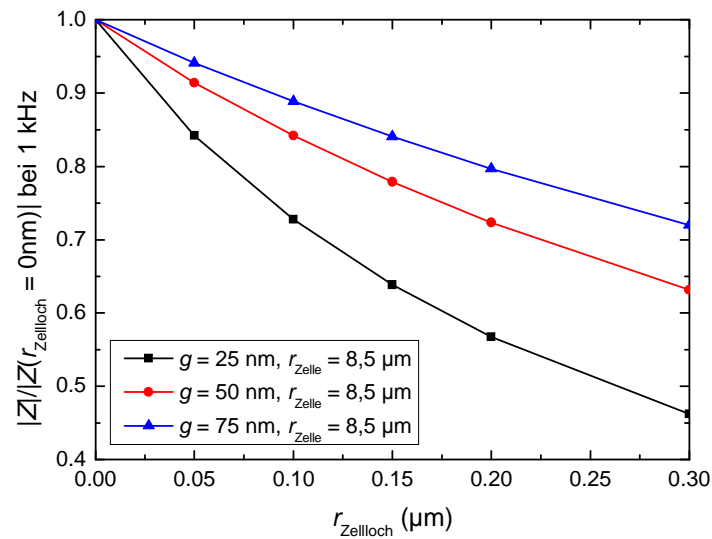


**Abb. A.2** Vergleich des gemessenen und ermittelten Lochwiderstands aus Tabelle 16 mit der Literatur (Cho, 2009a).

(a)



(b)



**Abb. A.3 Darstellung der FEM-Simulationsergebnisse für Zellmembranperforierungen.**

Die simulierten Betragswerte wurden bei 1 kHz ausgewertet und auf den Impedanzbetrag ohne Zellmembranloch normiert. Darstellung des Einflusses von verschiedenen großen Membranlöchern mit (a) unterschiedlicher Zellgröße und (b) unterschiedlichen Abständen der Zelle zur Chipmembran.

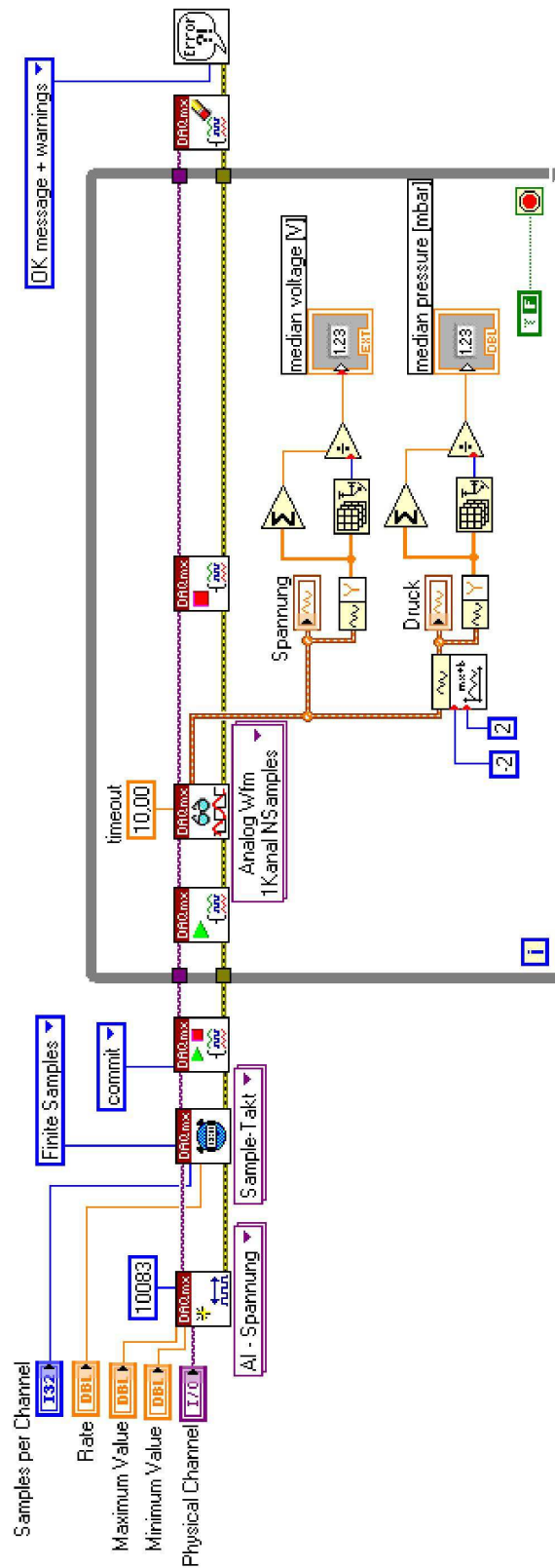


Abb. A.4 Blockschildbild des entwickelten LabView Programms zur visuellen Darstellung des Unterdrucks über eine A/D-Karte.

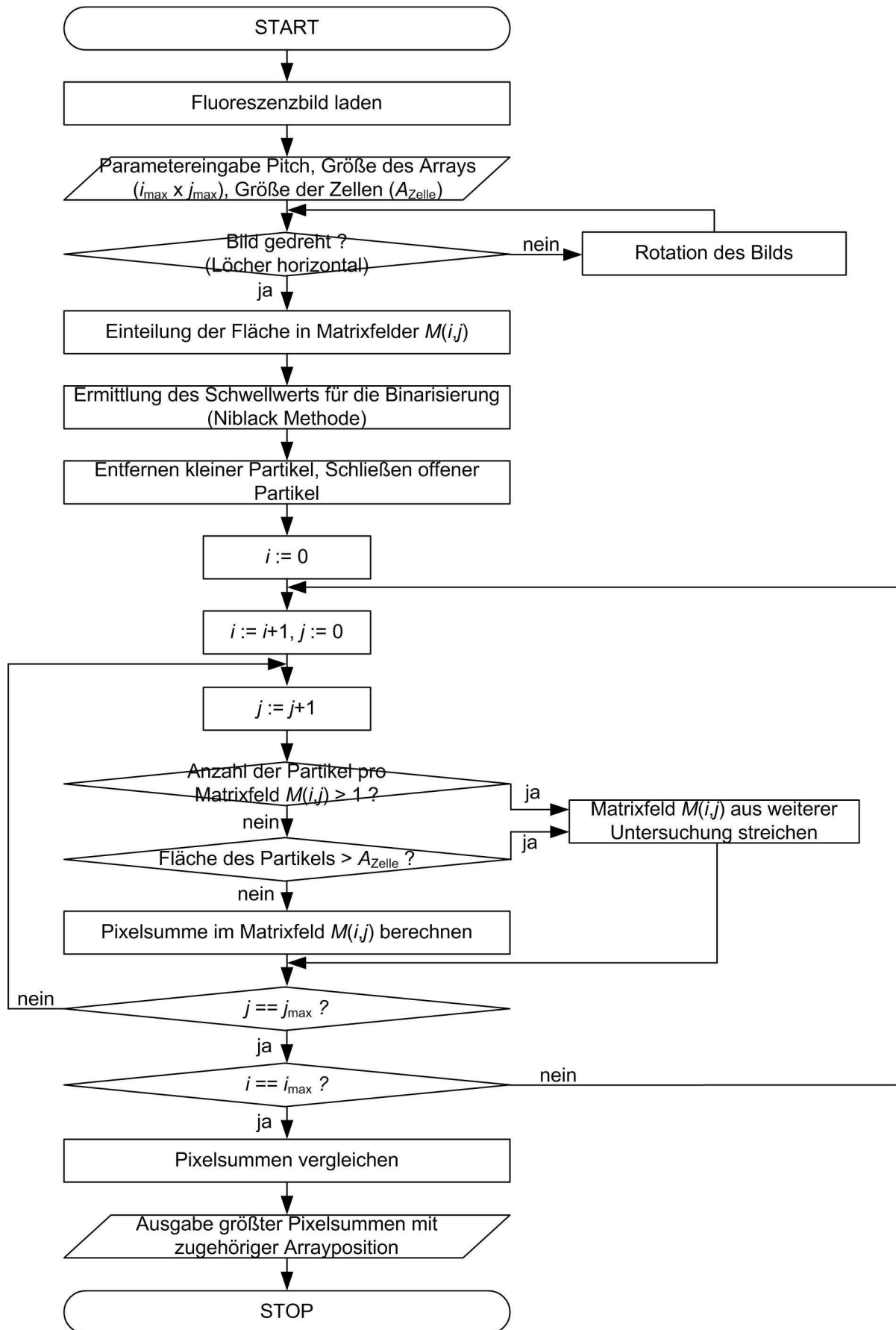


Abb. A.5 Fließschema für das LabVIEW Programm zur Quantifizierung der Produktivität. Mehrfachbelegungen wurden automatisch erkannt und die Quantifizierung wurde über eine Pixeladdition durchgeführt.



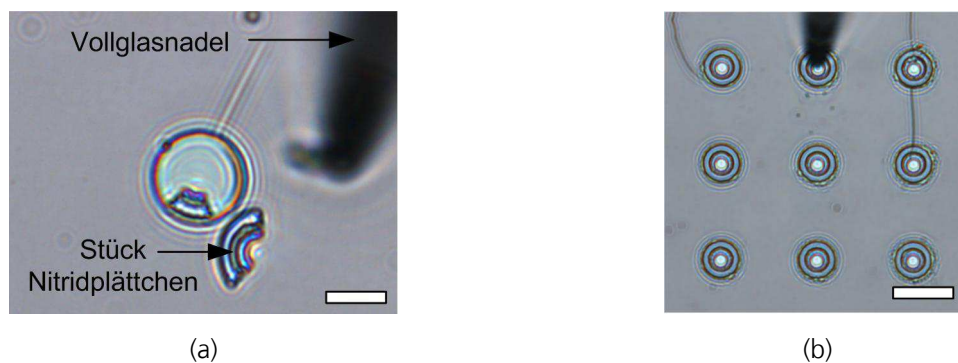
## Ablösen adhären wachsender Zellen im System

Da gegebenenfalls eine Selektion auch von adhären Zellen, z. B. nach einer nicht-invasiven elektrischen Analyse, im System integriert werden soll, müssen neben der Möglichkeit Zellen mithilfe von Trypsin/EDTA abzulösen auch Methoden untersucht werden, um ganz gezielt einzelne Zellen zu entnehmen.

Zum einen wurde versucht ein vorperforiertes Plättchen um das Saugloch herauszustanzen, zum anderen, die Zellen mechanisch zu lösen.

### *Herausstanzen von vorperforierten $Si_xN_y$ -Plättchen um das Mikroloch*

Um adhären wachsende Zellen auf dem Mikroloch nicht ablösen zu müssen, wurde versucht Nitridplättchen um das Mikroloch herauszustanzen. Dabei sollte die gewünschte Zelle beim Stanzen auf dem Nitridplättchen verbleiben und das „Zell-Nitridplättchen-Schiff“ durch einen geeigneten Fluidikaufsatz aus dem Adapter transportiert werden. Dazu wurden Sollbruchstellen um das Mikroloch in die Nitridmembran geätzt. Mithilfe einer Vollglasnadel wurde auf eine Stelle innerhalb der Sollbruchstelle Druck ausgeübt bis ein Reißen der Membran bzw. ein Lösen des Plättchens zu erkennen war (Abb. A.6).



**Abb. A.6 Darstellung von Stanzversuchen um Nitridplättchen herauszuberechnen. Als Stanzwerkzeug diente eine selbst gezogene Vollglasnadel.**

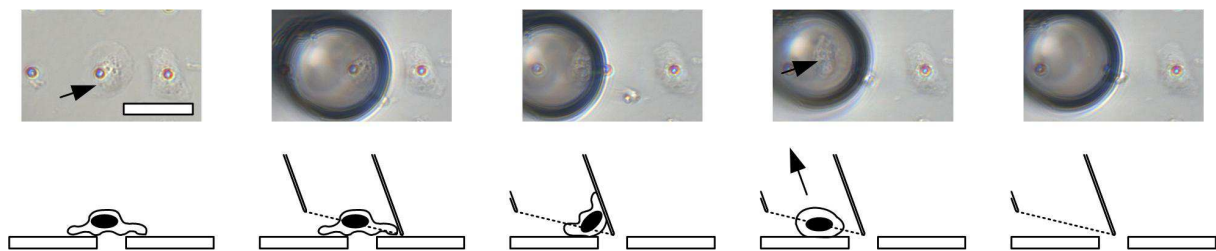
Die Sollbruchstellen um die Sauglöcher wurden 500 nm tief in die 870 nm dicke Nitridmembran geätzt. (a) Teilweises Stanzen eines Nitridplättchens um das Mikroloch eines 1 x 1 Arrays. Dabei ist das Stanzplättchen gerissen und Teilstücke sind in der Perforation hängen geblieben (Maßbalken: 10 µm). (b) Durch das Drücken auf die Perforation ergibt sich ein Reißen der kompletten Membran eines 3 x 3 Arrays (Maßbalken: 25 µm).

Bei dem Stanzversuch an einem 1 x 1 Chip war zu erkennen, dass ein Stanzen des Nitridplättchens generell möglich war, jedoch bei den durchgeführten Experimenten eine Zerstörung der umliegenden Membran bzw. des gestanzten Plättchens nicht vermieden werden konnte (Abb. A.6a). Bei größeren Arrays (3 x 3 Array) zeigte sich, dass die

Druckausübung zu einem kompletten Reißen der Membran um den Druckpunkt führte (Abb. A.6b). Folglich war das Lösen adhärent wachsender Zellen durch Stanzen mit einer Membranperforierung wie sie in dieser Arbeit verwendet worden ist nur bedingt möglich.

#### *Mechanisches Ablösen der Zellen mittels Mikropipette*

Als Alternative zum Stanzen wurde die Mikrokapillare zum mechanischen Lösen der Zellen gesehen. Die Kapillare wurde dafür als Zellschaber eingesetzt. Die Kapillare wurde über der Zelle auf die Chipmembran gedrückt. Dabei konnte der Berührungspunkt der Kapillare mit der  $\text{Si}_x\text{N}_y$ -Membran im Mikroskop beobachtet werden, in dem die Kapillare statt nach unten aus der Fokusebene heraus eine Bewegung in xy-Ebene vollführte (Kapillare bog sich leicht). Die Chipoberfläche konnte daraufhin abgekratzt und die Zelle gelöst werden. Bei den meisten Versuchen zeigte sich, dass die Zelle durch den Kratzprozess gelöst aber nicht vollkommen von der Chipmembran entfernt werden konnte (Abb. A.7). Erst durch das an die Kapillare angeschlossene Pumpensystem konnte die Zelle durch die Saugkraft vollkommen gelöst und in die Kapillare aufgenommen werden. Umliegende Zellen wurden bei einer solchen Entnahme nicht geschädigt. Die auf diese Weise entnommenen Arpe-19 Zellen wurden in 96-Lochplatten mit 50  $\mu\text{l}$  Medium pro Kavität transferiert, für 5 Tage inkubiert und nach dieser Inkubationszeit auf Proliferation überprüft. Die Klonierungseffizienz lag bei 65 %, wobei das Medium nicht an die Zellklonierung angepasst wurde (Experiment wurde nur einmal durchgeführt).



**Abb. A.7** Abkratzen adhärent wachsender Zellen von der Mikroloch-Membran.

Darstellung einiger mikroskopischer Aufnahmen während des Abkratzens. Dabei wird eine Kapillare (ID = 40  $\mu\text{m}$ ) auf die Membran gedrückt und rückwärts gegen die Zelle bewegt (Maßbalken = 40  $\mu\text{m}$ ). Nach dem teilweisen Lösen der Zelle von der Membran wird diese über einen angelegten Saugdruck in die Kapillare aufgenommen.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Schematische Darstellung der wesentlichen Schritte beim Herstellungsprozess von Biopharmazeutika.	2
Abb. 1.2	Schematische Darstellung des Durchflusszytometers mit Sortiereinheit.	6
Abb. 1.3	Hybridomzellen ausplattiert in einer 6-Lochplatte und kultiviert in Softagar.	8
Abb. 1.4	Darstellung eines möglichen Proteinproduktionsprofils einer Zellpopulation.	9
Abb. 1.5	Anzahl der Veröffentlichungen in der PubMed Datenbank, die zu zellbasierten Mikrosystemen erschienen sind.	12
Abb. 1.6	Realisierung einer magnetischen Sortiereinheit in einem Mikrosystem.	16
Abb. 1.7	Mikrolocharray für das Trennen von CTCs aus dem peripheren Blut.	16
Abb. 1.8	Aufbau eines MEMS zur Zellseparation auf Einzelzellebene. Selektionskriterium: Fluoreszenzsignal (Kernfluoreszenz).	17
Abb. 1.9	Zwei mögliche Verfahren basierend auf Mikrokavitäten-Plattformen, um Antikörpersekretierende Zellen zu identifizieren und zu isolieren.	19
Abb. 4.1	Schematische Darstellung des Konzepts für das Selektionssystem.	27
Abb. 5.1	Prozesse zur Herstellung eines Mikrolocharray-Chips.	31
Abb. 5.2	Darstellung eines fertig prozessierten Wafers und Mikrolocharray-Chips ohne SU-8 Kavitäten.	32
Abb. 5.3	Darstellung eines Locharrayausschnitts mit SU-8 Kavitäten sowie eines Tiefenprofils entlang einer vorgegebenen Schnittlinie.	34
Abb. 5.4	Adapter für die Schnittstelle zwischen Fluidik und Chip.	35
Abb. 5.5	Schematischer Aufbau des Unterdrucksystems zur Zellpositionierung.	37
Abb. 5.6	Vergleich der beiden Vereinzelmöglichkeiten zur Vermeidung von Zellagglomeraten in der Zellsuspension.	42
Abb. 5.7	Stromlaufschema am Mikroloch mit positionierter Zelle.	47
Abb. 5.8	Entwickelte Software zur quantitativen Bestimmung der intrazellulären GFP-Expression der positionierten CHO-Zellen.	48
Abb. 5.9	Messaufbau zur Ermittlung des hydrodynamischen Widerstands.	51
Abb. 6.1	Darstellung des Modells für die FEM-Simulationen.	54
Abb. 6.2	Darstellung des Einflusses der Membranleitfähigkeit $\sigma_{\text{Membran}}$ auf den Betrag der Impedanz.	55
Abb. 6.3	Darstellung der Aufsicht und des Querschnitts für die Simulation eines 5-Lochensembles des Mikrolocharrays und eines 1 x 1 Mikrolocharrays (nicht maßstabsgetreu).	59
Abb. 6.4	Darstellung des Geschwindigkeitsfelds des simulierten Körpers aus Abb. 6.3.	59
Abb. 7.1	Darstellung des Systems zur Charakterisierung und Klonierung.	61
Abb. 7.2	Elektrische Systemcharakterisierung mit unterschiedlich großen Array-Chips (1 x 1, 3 x 3, 10 x 10, 20 x 20 und 35 x 35 Löcher).	62
Abb. 7.3	Äquivalentes Ersatzschaltbild für den Messaufbau mit Mikrolocharray-Chip (ohne Zelle).	63
Abb. 7.4	Darstellung des numerisch berechneten hydrodynamischen Widerstands sowie der nach Gleichung (6-11) berechneten Reynolds-Zahl eines Mikrolochs bei unterschiedlichen Druckdifferenzen über der Membran.	65
Abb. 7.5	Einfluss des Pitches auf den hydrodynamischen Widerstand $R_h$ .	66
Abb. 7.6	Gegenüberstellung der approximierten Simulationsergebnisse und der Messergebnisse für die Untersuchung des hydrodynamischen Widerstands.	67
Abb. 7.7	Impedanzverlauf und Veränderung des Widerstandsverhältnisses während des Positioniervorgangs auf einem 35 x 35 Array.	69
Abb. 7.8	Korrelation zwischen der normalisierten Lochbelegung ( $\Phi_{\text{norm}}$ ) und der normalisierten Impedanzmessung ( $ Z _{\text{norm}}$ ).	71
Abb. 7.9	Positionierte Zellen auf einem Mikrolocharray-Chip.	72
Abb. 7.10	Positionierung von unterschiedlich zugegebenen Zellzahlen auf einem 35 x 35 Array mit 40 $\mu\text{m}$ Pitch bei einem Druckgradienten über der Chipmembran von 2,5 hPa.	74
Abb. 7.11	Untersuchung von verschiedenen Druckgefällen $\Delta p$ über der Chipmembran auf die Zellschädigung.	76
Abb. 7.12	FEM-Simulation zu morphologischen Veränderungen des Zellmodells aus Abb. 6.1. Der Impedanzbetrag der Simulationsergebnisse wurde bei 1 kHz ausgewertet.	78

Abb. 7.13	Darstellung des Einflusses der Membranleitfähigkeit $\sigma_{\text{Zellmembran}}$ auf den Betrag der Impedanz.	79
Abb. 7.14	Zeitlicher Verlauf der Zelladhäsion einer positionierten Arpe-19 Zelle: Korrelation von Phasenkontrastbildern und der elektrischen Signalerfassung bei 1 kHz.	80
Abb. 7.15	Zugabe einer 0,5 %-igen Triton-X-100 Lösung zu einer positionierten Arpe-19 Zelle bei $\Delta t = 74$ min. Die Impedanz wurde auf das System ohne Zelle normiert.	82
Abb. 7.16	Verlauf des Betrags der Impedanz nach Polymer bzw. Polymer-Komplex Applikation. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden aus drei Experimenten ermittelt.	84
Abb. 7.17	Mikroskopische Aufnahmen (Phasenkontrast überlagert mit PI-Fluoreszenz) einer immobilisierten Zelle neben anderen Zellen auf der Siliziumnitridmembran (Maßbalken = 25 $\mu\text{m}$ ).	85
Abb. 7.18	Quantitative Abschätzung der intrazellulären GFP-Expression der positionierten CHO-Zellen auf den Mikrolöchern mittels der selbst entwickelten Softwareroutine.	89
Abb. 7.19	Darstellung von abgelegten Zellen in den SU-8 Kavitäten mit und ohne aktiver Positionierungstechnik/Mikrolöchern.	91
Abb. 7.20	Abgelegte Hybridomklone in höherviskosem Medium in den SU-8 Mikrokavitäten. Nach einer 3-tägigen Inkubation kann die Akkumulation des Antikörpersekrets über den fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörper deutlich erkannt werden.	92
Abb. 7.21	Hellfeldbild von vereinzelt Hybridomzellen nach einer 8-tägigen Kultivierung in den SU-8 Kavitäten des Mikrolochchips.	94
Abb. 7.22	Isolation und Expansion eines CHO-Zellklons.	96
Abb. 7.23	Untersuchung der Klonierungseffizienz beim Umsetzen unterschiedlicher Zellzahlen pro Klon.	98
Abb. 7.24	Durchflusszytometrische Analyse (Punktauftragung) der CHO-Ursprungskultur nach einer Behandlung mit 0,05 % PI.	99
Abb. 7.25	Untersuchung der GFP-Expression der CHO-Mutterkultur bei unterschiedlichen Kulturzeiten sowie der Wildtypzelllinie.	100
Abb. 7.26	Vergleich der Proteinproduktion (über die grüne Fluoreszenzintensität: FL1-Signal) der selektierten Zellklone mit der Ursprungskultur über eine durchflusszytometrische Analyse.	102
Abb. 7.27	Charakterisierung der Sekretauusschüttung nach dem Selektionsschritt, sowie der Vergleich der Antikörperquantifizierung über ELISA und Pixeladdition.	105
Abb. A.1	Darstellung einer möglichen Verbesserung der Zellvereinzlung auf dem Chip.	123
Abb. A.2	Vergleich des gemessenen und ermittelten Lochwiderstands aus Tabelle 16 mit der Literatur (Cho, 2009a).	140
Abb. A.3	Darstellung der FEM-Simulationsergebnisse für Zellmembranperforierungen.	141
Abb. A.4	Blockschaltbild des entwickelten LabView Programms zur visuellen Darstellung des Unterdrucks über eine A/D-Karte.	142
Abb. A.5	Fließschema für das LabView Programm zur Quantifizierung der Produktivität. Mehrfachbelegungen wurden automatisch erkannt und die Quantifizierung wurde über eine Pixeladdition durchgeführt.	143
Abb. A.6	Darstellung von Stanzversuchen um Nitridplättchen herauszubereiten. Als Stanzwerkzeug diente eine selbst gezogene Vollglasnadel.	144
Abb. A.7	Abkratzen adhärent wachsender Zellen von der Mikroloch-Membran.	145

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Einstufung der gängigen Methoden zur Zellanalyse und -selektion. Bewertet werden die Hochdurchsatzfähigkeit, die Möglichkeit zur Zellvereinzelung, die Zellcharakterisierung und Zellisolierung sowie die Kosten.	10
Tabelle 2	Entwicklung der Zellvereinzelung mittels Mikrokavitäten (Lindström, 2011).	13
Tabelle 3	Entwicklung der Zellvereinzelung mittels Mikroauglöcher.	14
Tabelle 4	Auflistung der Dimensionen der verwendeten Mikrolochararray-Chips.	33
Tabelle 5	Auflistung der Soll-Dimensionen der SU-8 Kavitäten.	35
Tabelle 6	Zuordnung der Dispersionen zu den jeweiligen Frequenzbereichen und die jeweils möglichen Ursachen (Grimnes, 2000; Schwan, 1957).	52
Tabelle 7	Elektrische Eigenschaften der Teilbereiche dargestellt in Abb. 6.1 für die numerische Berechnung. Nach Elshabini und Barlow, Grimnes und Martinsen, Malmivuo und Plonsey (Elshabini-Riad, 1998; Grimnes, 2000; Malmivuo, 1995).	55
Tabelle 8	Vergleich der gemessenen und numerisch berechneten hydrodynamischen Widerstände für die unterschiedlichen Array-Größen.	68
Tabelle 9	Darstellung der Vereinzelungseffizienz bei der Positionierung von CHO-Zellen auf einem Mikrolochararray.	73
Tabelle 10	Auflistung der Größenänderung der Zelle sowie die Änderungen der Impedanzparameter während der Zelladhäsion. Parameter entnommen aus Abb. 7.14.	81
Tabelle 11	Fehlerabschätzung der Bildverarbeitungssoftware durch die Auswertung der falschen Zuordnungen eines Matrixfelds.	88
Tabelle 12	Auflistung der mit dem chipbasierten Verfahren, bzw. mit der LD-Technik generierten CHO-Klone.	103
Tabelle 13	Vergleich der Produktivität von Hybridomzellen über den Kultivierungszeitraum.	103
Tabelle 14	Auflistung der mittels ELISA am Fraunhofer IME durchgeführten Quantifizierung der Produktivität der chipbasierten selektierten Klone und der über das Pickroboter +Cellavista-Verfahren selektierten Klone.	104
Tabelle 15	Auflistung des Proliferationsverhaltens der Klone in den Kavitäten des Chips.	106
Tabelle 16	Darstellung der Parameterwerte für die Anpassung des äquivalenten Ersatzschaltbilds nach Abb. 7.3 an die gemessenen Impedanzwerte nach Abb. 7.2.	140

## Curriculum vitae

### Persönliche Angaben

Name: Christian Kurz  
Anschrift: Rathausstraße 28, 66292 Riegelsberg  
Geburtsdatum: 15. August 1981  
Geburtsort: Aalen  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Bildungsweg

2001 Abitur am Max-Planck Gymnasium in Schorndorf  
2001-2002 Wehrdienst mit Lehrgang zum Kfz-Instandsetzer und eingesetzt als Kfz-/Pz-Schlosser im 2. InstBtl 210 in Ellwangen.  
2002 Studium der Elektrotechnik und Informationstechnik an der Universität Stuttgart mit dem Studienschwerpunkt Kommunikationstechnik und der Vertiefungslinie Hochfrequenztechnik.  
2005 Wahlstudienarbeit am Institut für Energieübertragung und Hochspannungstechnik (IEH) an der Universität in Stuttgart.  
2005-2006 Auslandssemester an der Technischen Universität in Eindhoven.  
2006-2007 Studienarbeit am Institut für Elektrische und Optische Nachrichtentechnik (INT) an der Universität Stuttgart.  
2007-2008 Diplomarbeit am Institut für Nachrichtenübertragung (INUE) an der Universität Stuttgart.  
2008-2012 Promotion in den Abteilungen Biomedizinische Mikrosysteme von Dr. T. Velten und Biohybride Systeme von Dr. H. Thielecke am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert.

### Tätigkeiten

2002 dreimonatiges Praktikum in der Forschungs- und Entwicklungsabteilung der Friedrich Lütze GmbH & Co. in Weinstadt.  
2005 Betreuung des EMV-Grundlagenpraktikums des Instituts für Hochfrequenztechnik (IHF) der Universität Stuttgart für E-Technik Student des 4.Semesters.  
2007 siebenmonatiges Praktikum im EMV-Zentrum der Porsche Engineering Services GmbH in Bietigheim-Bissingen.  
2008 Hilfwissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Nachrichtenübertragung (INUE) an der Universität in Stuttgart.