

Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung von Sauerstoff-sensitiven 3D-Zellkultursystemen auf Mikrokavitätenarray-Basis

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

von der KIT-Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
genehmigte

DISSERTATION

von
M.Sc. Christoph Grün
aus Landau

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2023

Erstgutachter: Prof. Dr. Eric Gottwald

Zweitgutachter: Prof. Dr.-Ing. Alexander Grünberger



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International Lizenz (CC BY-SA 4.0):
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.de>

Inhalt

1	Zusammenfassung.....	VII
2	Abstract	IX
3	Einleitung.....	11
3.1	3D-Zellkulturtechniken	11
3.1.1	Gerüststrukturen für die 3D-Zellkultur.....	12
3.1.2	Scaffold-freie 3D-Zellkulturen	14
3.2	Mikrothermoformen und Mikrokavitätenarrays	18
3.3	Mikrobioreaktoren.....	19
3.3.1	Definition: Mikrobioreaktor (MBR) vs. Organ-on-Chip (OoC).....	19
3.3.2	Mikrobioreaktor für Mikrokavitätenarrays	20
3.3.3	Modulare Konzepte – Entfernung von Luftblasen	20
3.4	Sauerstoffmessungen in Zellkulturen	21
3.4.1	Die Funktion von Sauerstoff in der Atmungskette	22
3.4.2	Sauerstoff in der Zellkultur: Von der Normoxie zur Physioxie.....	23
3.4.3	Methoden zur Sauerstoffmessung in der Zellkultur	26
3.4.4	Lumineszenzlöschung – Dynamisches Quenching.....	28
3.4.5	Anwendung der dynamischen Fluoreszenzlöschung.....	31
4	Ziel der Arbeit.....	33
5	Material und Methoden.....	35
5.1	Material.....	35
5.1.1	Verbrauchsmaterial.....	35
5.1.2	Chemikalien.....	36
5.1.3	Zellkulturmedien	38
5.1.4	Zellen/Zelllinien	40
5.1.5	Geräte	40
5.1.6	Software.....	41
5.2	Methoden.....	42
5.2.1	Herstellung und Charakterisierung der Mikrokavitätenarrays	42

Inhalt

5.2.2	Allgemeine Zellkultur	45
5.2.3	Kultivierung der Zellen in sticky slides und CellCrown™-Inserts.....	46
5.2.4	Hanging Drop Kulturen	47
5.2.5	3D-Zellkultivierung in (Sensor-)Arrays	48
5.2.6	Färbungen	49
5.2.7	Mikroskopie	50
5.2.8	LDH-Assay	51
5.2.9	Einfluss von Isoprenalin auf die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten	54
5.2.10	Sauerstoffmessung – VisiSens TD	54
5.2.11	Auswertung der Sauerstoffmessung	56
5.2.12	3D Mito Stress Test	57
5.2.13	Mito Complex Assay	59
5.2.14	Statistische Betrachtungen	61
5.2.15	Prototypenerstellung.....	62
5.2.16	Testaufbau Blasenfallen – MBR	63
6	Ergebnisse	65
6.1	Formversuche und Foliencharakterisierung.....	66
6.1.1	Vorversuche: Thermoformen kommerziell erhältlicher Sensorfolien.....	66
6.1.2	Optimierung des Folienmaterials	67
6.1.3	Temperaturstabilität der Sensorfarbstoffe	71
6.1.4	Weiterentwicklung der Formmasken	71
6.1.5	Messung der Formtiefen: Lichtmikroskop vs. Digitalmikroskop	78
6.1.6	Fluoreszenzspektrum der Folien	78
6.2	Biokompatibilität der Folien	79
6.2.1	Toxizitätsbestimmung mit dem LDH-Assay.....	79
6.2.2	Zellproliferation sowie Lebend-Tot-Färbungen.....	87
6.2.3	Vergleich der Beschichtungen	92
6.3	Entwicklung statischer und mikrofluidischer Kultivierungssysteme	98

6.3.1	Statische Systeme	99
6.3.2	Mikrofluidische Systeme	102
6.4	Anwendung am Funktionsmodell & Biologische Modelle	114
6.4.1	Optimierung der Auswertung	115
6.4.2	Kultivierung von HepG2-Zellen in Sensorarrays	120
6.4.3	P19-Zellen in Sensorarrays	123
6.4.4	Kardiomyozyten in Sensorarrays	126
6.4.5	Einfluss von Isoprenalin	130
6.4.6	Zellatmungsgifte	132
6.4.7	3D Mito Stress Test	133
6.4.8	Mito Complex Assay	143
6.4.9	Variation des Fasenwinkels	145
7	Diskussion	149
	Optimieren des Mikrothermoformens	149
	Exkurs: Kovalente Bindung von Sensorfluorophoren an mikrostrukturierte Oberflächen ..	150
	Technische Entwicklung und Charakterisierung der Sensorarrays	156
	Entwicklung von Systemen zur statischen und fluidischen Zellkultur in (Sensor-)Arrays ..	160
	Validieren der Sensorarrays am biologischen Funktionsmodell	162
8	Fazit und Ausblick	173
9	Abkürzungsverzeichnis	175
10	Abbildungsverzeichnis	176
11	Tabellenverzeichnis	180
12	Literatur	181
13	Danksagungen	193
	Anhang	195

1 Zusammenfassung

Ein grundlegendes Problem der Medikamentenentwicklung ist, dass sich Daten aus *in vitro*-Experimenten nur eingeschränkt auf die *in vivo*-Situation übertragen lassen. Dies führt dazu, dass Tierversuche – trotz Weiterentwicklungen in den Bereichen der 3D-Zellkultur und Organ-on-Chips – nach wie vor der Goldstandard in der Wirkstofftestung sind. Dennoch müssen immer wieder Medikamente auch nach der Zulassung aufgrund von Nebenwirkungen vom Markt genommen werden. Der Bedarf an physiologischen 3D-Zellkulturmodellen als Alternative zu den Tierversuchen ist daher groß. Allerdings kann Sauerstoff, der Bestandteil der meisten Biomoleküle und zudem zentrales Element des zellulären Metabolismus ist, in 3D-Zellkulturen bisher nicht zufriedenstellend gemessen werden. Bisherige Ansätze ermöglichen nur eine punktluelle, in Bezug auf das Kultursystem globale oder rein zweidimensionale Messung. Für die Einstellung und Kontrolle gewebetypischer Sauerstoffkonzentrationen muss eine Messung aber in der Mikroumgebung der Zellen erfolgen. Zudem würde eine solche Messung auch eine vollkommen neue Charakterisierung der Auswirkung von Testsubstanzen auf die zelluläre Atmung ermöglichen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde hierfür das am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) entwickelte Verfahren zum Mikrothermoformen von Folien für die Verwendung Sauerstoff-sensitiver Folien optimiert. Dadurch konnten Sauerstoff-sensitive Mikrokavitätenarrays, sogenannte Sensorarrays, hergestellt werden. Die einzelnen Mikrokavitäten hatten einen Durchmesser von 300, 500 bzw. 800 μm bei einer Tiefe von bis zu 400 μm . Durch Beschichtung mit BIOLFOAT™ konnten in den Mikrokavitätenarrays Sphäroide aus HepG2- bzw. humanen Stammzell-abgeleiteten Kardiomyozyten generiert werden. Mit Hilfe der Sensorarrays war es erstmals möglich Sauerstoff in unmittelbarer Nähe der Sphäroide zu messen. Eine Weiterentwicklung der Mikrokavitäten mit einer Fase am Kavitäteneingang wurde am 22.06.2022 zum Patent angemeldet. Dadurch wurde zudem die Messung von Sauerstoffgradienten oberhalb der Zellen ermöglicht. Während der Entwicklung wurden verschiedene Folienprototypen, die von der Fa. PreSens Precision Sensing GmbH (Regensburg) mit Sensorfarbstoff beschichtet wurden, hinsichtlich ihrer Biokompatibilität und Sensorantwort untersucht. Für statische Experimente mit den Sensorarrays wurden Zellkulturinserts entwickelt, die bis zu vier parallele Versuche in einem Insert ermöglichten. Für fluidische Kulturen wurde ein modularer Mikrobioreaktor entwickelt, der die Sensorarrays aufnehmen konnte und zudem über eine Blasenfalle verfügte. Dieser kann als Grundlage für regelbare mikrofluidische Plattformen dienen, die in dieser Arbeit skizziert wurden.

Mit Hilfe der Sensorarrays konnte in biologischen Funktionsmodellen – in der vorliegenden Arbeit waren dies die Leberkarzinomzelllinie HepG2 sowie P19- und humane Stammzell-abgeleitete Kardiomyozyten – bspw. die Auswirkung von Atmungsketteninhibitoren auf Sphäroide untersucht werden. Hierfür wurde ein 3D-Mito Stress Test etabliert. Die verwendeten Messsysteme ermöglichten die Betrachtung von bis zu 20 Mikrokavitäten pro Messzeitpunkt. Hierfür wurde mit Hilfe der Open Source Software CellProfilerTM eine Auswertemethode entwickelt, die automatisiert die Mikrokavitäten erkennt und die Sauerstoffkonzentrationen in den einzelnen Bereichen der Mikrokavitäten, also der Bereiche der Sphäroide und verschiedenen Segmenten der Faser, berechnen kann. Damit konnte die Gradientenbildung über den Sphäroiden während der Kultivierung gezeigt werden. Durch die Mikroskopierbarkeit der Sensorarrays war es zudem möglich parallel auch weitere Untersuchungen der Sphäroide oder Organoiden durchzuführen. Am Beispiel humaner Stammzell-abgeleiteter Kardiomyozyten konnte der Einfluss von Isoprenalin auf die Schlagfrequenz der Sphäroide durch einen genetisch-codierten Calciumsensor in Kombination mit der Änderung der Sauerstoffkonzentration gemessen werden. Aufbauend auf diese Technik können in Zukunft neuartige, sogenannte 3D-Physioxie-Assays etabliert werden.

2 Abstract

A major issue in drug development is the limited transferability of data from *in vitro* experiments to the *in vivo* situation. As a result, animal testing – despite further developments in the fields of 3D cell culture and organ-on-chips – remains the gold standard in drug development. Nevertheless, drugs are repeatedly withdrawn from the market after approval. The need for physiological 3D cell culture models is high. Oxygen, which is a component of most biomolecules and also a key element of cellular metabolism, cannot yet be adequately measured in 3D cell cultures. Previous approaches only allow a point-based measurement that is global with regard to the culture system or solely two-dimensional. However, for the adjustment and control of tissue-specific oxygen concentrations, oxygen measurement must be performed in the microenvironment of the cells. Moreover, such a method would also facilitate a completely new characterization of the effect of test substances on cellular respiration.

Within the scope of this PhD thesis, the process for microthermoforming films developed at the Karlsruhe Institute of Technology (KIT) was optimized for the use of oxygen-sensitive films for this specific task. This enabled oxygen-sensitive microcavity arrays, so-called sensor arrays, to be formed. The individual microcavities had diameters of 300, 500 and 800 μm , respectively, with a depth of up to 400 μm . By coating the microcavity arrays with BIOLFOATTM, spheroids of HepG2- or human stem cell-derived cardiomyocytes could be generated. It was possible for the first time to measure oxygen in the immediate vicinity of the spheroids. A patent application for a further development of the microcavities with a bevel at the cavity inlet was filed on June 22, 2022. This bevel also made it possible to measure oxygen gradients above the cells. During development, various polymer foils, coated with oxygen-sensitive fluorophors by PreSens Precision Sensing GmbH (Regensburg, Germany) were investigated with regard to their biocompatibility and sensor response.

For static experiments using the sensor arrays, cell culture inserts were developed that allowed up to four parallel experiments in one insert. For fluidic cultures, a microbioreactor was engineered that was able accommodate the sensor arrays and also featured a debubbler. This can serve as the starting point for controllable microfluidic platforms, which were outlined in this work.

With the help of the sensor arrays, the effect of respiratory chain inhibitors on spheroids could be investigated in biological functional models. In the presented thesis these were the liver carcinoma cell line HepG2 as well as P19- and human stem cell-derived cardiomyocytes. For this purpose, a 3D mito stress assay was established. The measurement systems used allowed

the observation of up to 20 microcavities per measurement time point. For this purpose, an evaluation method was developed with the help of the open source software CellProfiler™, which can automatically recognize the microcavities and calculate the oxygen concentrations in the individual areas of the microcavities, i.e. the areas of the spheroids and various segments of the bevel. This allowed the gradient formation above the spheroids during cultivation to be demonstrated. The microscopy capability of the sensor arrays also made it possible to perform further studies of the spheroids or organoids in parallel. Using human stem cell-derived cardiomyocytes as an example, the influence of isoprenaline on the beating frequency of the spheroids could be measured by a genetically encoded calcium sensor in combination with the change in oxygen concentration. Based on these techniques, novel so-called 3D physioxia assays can be established in the future.

3 Einleitung

Die eingeschränkte Übertragbarkeit von Daten aus *in vitro*-Experimenten auf die *in vivo*-Situation ist ein zentrales Problem im Bereich der Medikamentenentwicklung und Wirkstofftestung. Dies rührt daher, dass Tierversuche nach wie vor der Goldstandard für die Bestimmung von Pharmakokinetik, Pharmakodynamik sowie der Toxizität von Wirkstoffkandidaten im Bereich der Medikamentenentwicklung sind. Doch existieren erhebliche Unterschiede in der Verstoffwechslung von Medikamenten, z.B. in der Leber [1]. So ist bekannt, dass Ratten und Mäuse, die zu 80% für die o.g. Tierversuche herangezogen werden, das für den Menschen wichtigste Phase I-Enzym in der Leber, die Monooxygenase Cytochrom P450 3A4, nicht besitzen und damit die Übertragbarkeit der Daten auf die menschliche Situation sehr schwierig ist [2-4]. So verwundert es nicht, dass in den letzten 60 Jahren 462 zugelassene Medikamente aufgrund toxischer Nebenwirkungen, die während der vorangegangenen Tests nicht festgestellt wurden, vom Markt genommen werden mussten [5]. Es wird angenommen, dass insgesamt bis zu 40 % der Wirkstoffkandidaten während der präklinischen und klinischen Phase aufgrund von Toxizität aus der Entwicklungspipeline herausfallen [6], wobei Leber- und Kardiotoxizität die Hauptursachen dafür sind [7].

Es gibt daher einen großen Bedarf an physiologischeren Modellen für die *in vitro*-Testung, um die Übertragbarkeit der Daten auf die humane Situation zu verbessern. Einen vielversprechenden Ansatz dazu bieten 3D-Zellkultur- [8, 9] oder auch Organ-on-Chip-Modelle [10, 11]. Ein Parameter, der jedoch bisher nur unzureichend in diesen 3D-Modellen charakterisiert und gemessen werden kann, ist die Sauerstoffkonzentration, da sich unter anderem Sauerstoffgradienten in diesen Zellkulturmodellen ausbilden [12]. In Ermangelung geeigneter Testmethoden wird daher in den meisten Modellen mit unphysiologisch hohen Sauerstoffkonzentrationen kultiviert. Versuche werden derzeit meist unter Umgebungsatmosphäre durchgeführt, die zu einer Hyperoxie und den damit verbundenen Veränderungen im Stoffwechsel der Zellen führt [13, 14]. Um dies genauer einordnen zu können, werden im Folgenden verschiedene Zellkulturtechniken und Methoden der Sauerstoffmessung detailliert betrachtet.

3.1 3D-Zellkulturtechniken

Die klassische zweidimensionale Zellkultur gibt es inzwischen schon mehr als ein Jahrhundert [15] und hat sich auch aufgrund zahlreicher Vorteile, wie vergleichsweise günstige Durchführung und einfaches Handling, sowie der Vielzahl möglicher Assays immer wieder bewährt [16]. Doch gerade diese Einfachheit der Modelle bewirkt auch einige Limitierungen.

Durch die zweidimensionale Kultivierung als Monolayer fehlen die gewebetypischen Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakte [16, 17]. Daher unterscheiden sich 3D- von 2D-Zellkulturen insbesondere auch hinsichtlich der Proliferation [18], Morphologie [19], Differenzierung sowie Signaltransduktion [20, 21](Tabelle 1). So zeigen bspw. 3D-Zellkulturen eine deutlich höhere Resistenz gegenüber Bestrahlungen im Bereich der Tumorthherapie [22] oder gegenüber Wirkstoffen bzw. Toxinen [23-25].

Tabelle 1: Vergleich ausgewählter Parameter in 2D- und 3D-Zellkulturen (vgl. [8, 26]).

	2D	3D	Literatur
Morphologie	Wachstum in Monolayern auf dem Boden der Kultivierungsgefäße	In 3D, vergleichbarer zu Geweben	[16]
Zell-Zell- bzw. Zell-EZM-Kontakte	Hauptsächlich Zell-Oberflächen-Kontakte, daher limitierte Zell-Zell-Kontakte	Zellen können physiologischere Interaktionen mit anderen Zellen und der EZM eingehen	[17, 27-29]
Proliferation	Oftmals schnelleres Zellwachstum.	Proliferation ist vergleichbar mit der <i>in vivo</i> -Situation	[28]
Differenzierung	Differenzierung der Zellen kann eingeschränkt sein.	Durch physiologischere Umgebung ist die Differenzierung der Zellen <i>in vivo</i> -ähnlicher.	[30-34]
Wirkstoff-metabolismus/-sensitivität	Geringer Metabolismus und große Unterschiede hinsichtlich Sensitivität gegenüber Testsubstanzen.	Große Unterschiede im Metabolismus im Vergleich zu 2D. Generell eine höhere Resistenz ggü. Testsubstanzen.	[23, 24, 35]
Weitere Merkmale		Mechanische Stimulation möglich.	[16, 36]

Generell können 3D-Zellkulturmodelle unterteilt werden in solche mit und solche ohne Gerüststrukturen, auch Scaffolds genannt.

3.1.1 Gerüststrukturen für die 3D-Zellkultur

Scaffolds für 3D-Zellkulturen haben die Funktion die extrazelluläre Matrix (EZM) nachzubilden bzw. zu ersetzen. Ein Hauptvolumenanteil von Geweben wird durch die EZM eingenommen, die sich unter anderem aus Proteinen, Proteoglykanen und Polysacchariden zusammensetzt [37]. Die Bestandteile der EZM werden durch die Zellen produziert und in den extrazellulären

Raum freigesetzt [38]. Es gibt verschiedene Ansätze diese Scaffolds zu kategorisieren. Eine Möglichkeit ist es zwischen den natürlichen EZM-basierten Scaffolds (z.B. Kollagen, dezellularisierte Gewebe), den synthetischen Polymerscaffolds (z.B. Polycaprolakton, PLA), den (semi-) synthetischen Hydrogelen (z.B. Gelatine-Methacrylat (GelMA)), sowie metallischen und mineralischen Scaffolds zu unterscheiden [18, 39]. Eine Übersicht über verschiedene Materialien, deren Eigenschaften und Anwendungsgebiete ist in Tabelle 2 dargestellt. Neben den Materialien können sich die Scaffolds auch in ihrer Form unterscheiden. Fasern, die durch Elektrosponnen hergestellt wurden, stellen ebenfalls eine Art der Scaffolds dar, die jedoch aus einem der zuvor genannten Materialien bestehen [40, 41]. Eine weitere Möglichkeit Gerüststrukturen aus verschiedenen Materialien zu erstellen bietet das 3D-Bioprinting [42-45].

Tabelle 2: Übersicht über verschiedene Gerüststrukturen für die 3D-Zellkultur.

<i>Material</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Anwendungen</i>	<i>Literatur</i>
<i>Natürliche EZM-basierte Scaffolds</i>			
<ul style="list-style-type: none"> • Kollagen • Laminin • Fibrin • Alginat • Hyaluronsäure • Dezellularisierte Gewebe 	<ul style="list-style-type: none"> • Geben <i>in vivo</i>-Situation wieder • Variationen je nach Charge möglich • Risiko von Kontaminationen • Nicht immer genau definierte Bestandteile • Schlechte mechanische Eigenschaften 	<ul style="list-style-type: none"> • Durch <i>in vivo</i>-Ähnlichkeit oft für Differenzierungen • Tissue Engineering z.B. im Bereich Wundheilung 	[38, 46-49]
<i>Synthetische Polymerscaffolds</i>			
<ul style="list-style-type: none"> • Polyethylen-glykol (PEG) • Polyactid-co-Glycolid (PLGA) • Polycaprolakton (PCL) • Polyactide (PLA) 	<ul style="list-style-type: none"> • Definierte (mechanische/chemische) Eigenschaften • Mechanisch stabiler als Hydrogele • Reproduzierbar • Kombinierbar mit bspw. Biomolekülen • Teilw. biol. abbaubar • Schlechte Zelladhäsion • Oberflächenmodifikationen meist notwendig, aber möglich (z.B. Plasmabehandlung, Coating) 	<ul style="list-style-type: none"> • Reproduzierbare Trägerstruktur für z.B. Wachstumsfaktoren, Wirkstoffapplikation • Tissue Engineering 	[43, 50, 51]

<i>(semi-)synthetische Hydrogele</i>			
<ul style="list-style-type: none"> • GelMA • PCL-Gelatine 	<ul style="list-style-type: none"> • Hydrophile Polymer-netzwerke • Können auf natürlichen Materialien (z.B. Gelatine, Kollagen) oder synthetischen (z.B. PEG) basieren • Reproduzierbare mechanische/ chemische Eigenschaften • In gewissen Maßen definierbar • Optimierbar für Zelladhäsion 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>in vitro</i>-Modelle • Stammzell-basierte Therapien • 3D-Bioprinting 	[52-57]
<i>Metallische/mineralische Scaffolds</i>			
<ul style="list-style-type: none"> • Magnesium (-legierungen) • Titan (-legierungen) • Hydroxylapatit • Versch. Glase 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine biol. Aktivität auf der Oberfläche • Starke mech. Belastung möglich • Poröse Strukturen 	<ul style="list-style-type: none"> • Beschichtung mit bspw. Kollagen • Verwendung im Bereich der Implantate • Osteoblasten-differenzierung • Tissue Engineering & Knochen-rekonstruktion 	[51, 58, 59]
<i>Fasern (Elektrospinning)/Hohlfasern</i>			
<ul style="list-style-type: none"> • Verschiedene Materialien verwendbar 			[40, 60, 61]

3.1.2 Scaffold-freie 3D-Zellkulturen

Die Scaffold-freie 3D-Zellkultur ermöglicht ein spontanes Aggregieren der Zellen durch Bildung von Zell-Zell-Kontakten ohne Verwendung einer Stützstruktur. Dazu muss die Adhäsion an die Oberflächen der Zellkulturgefäße vermieden werden. Grundsätzlich erfolgt dieser Prozess in drei Stufen [62](Abbildung 1). In der ersten Stufe kommt es mit Hilfe der RGD-Sequenzen und Integrine zu einer losen Aggregatbildung über von den Zellen synthetisierte EZM [63-65].

Durch Expression und Akkumulation von Cadherin verdichten sich die Aggregate in der zweiten Stufe und bilden in der dritten Stufe durch Cadherin-Cadherin-Bindungen die Sphäroide aus [65].

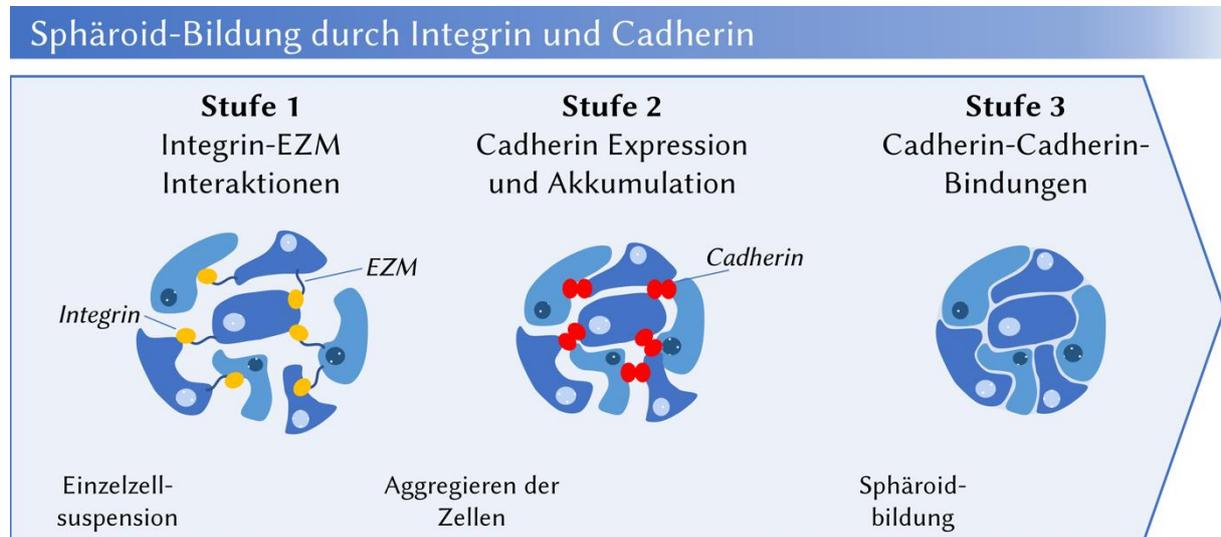


Abbildung 1: Stufen der Sphäroidbildung. Nach Ausbildung loser Aggregate über Integrin-EZM-Interaktionen kommt es zur verstärkten Expression der Cadherine und zur Sphäroidbildung über Cadherin-Bindungen. (Abbildung modifiziert nach [62])

Um die Aggregation der Zellen und die Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte zu gewährleisten, können verschiedene Methoden angewandt werden (Abbildung 2). Die älteste stellt die Hanging Drop-Methode dar, die schon vor mehr als hundert Jahren zur Generierung von neuronalen Zellaggregaten verwendet wurde [66]. Dabei werden Tropfen mit einer Zellsuspension auf den Deckel einer Petrischale gegeben, der invertiert wird. Durch Gravitation sinken die Zellen zum Scheitelpunkt des Tropfens ab und aggregieren dort. Der Boden der Petrischale wird mit Wasser befüllt, um die Feuchtigkeit in der Kultur konstant zu halten und ein Austrocknen der Tropfen zu vermeiden. So wurde bspw. von Kelm et al. gezeigt, dass mit dieser Hanging Drop-Methode hergestellte HepG2-Sphäroide gewebeähnliche Eigenschaften zeigten [67]. Auch für die Differenzierung von Stammzellen ist diese Methode geeignet [68]. Die Hanging Drop-Methode ist generell beschränkt auf eine Tropfengröße von maximal ca. 50 μl , da die Oberflächenspannung größere Tropfen nicht ermöglicht [69]. Eine Weiterentwicklung dieser Technologie durch spezielle Platten versucht die Limitierung hinsichtlich der Produktion größerer Mengen der Sphäroide durch die Tropfengröße zu umgehen, indem die Anzahl der Tropfen erhöht wird. Hierfür wurde bspw. eine Platte entwickelt, auf der bis zu 384 Tropfen gleichzeitig generiert werden [70].

Eine andere Möglichkeit, um ein Aggregieren der Zellen zu fördern, stellen nicht-anhaftende Oberflächen (engl. non-adherent surfaces) dar. Da die Zellen nicht anwachsen können, kommt

es zu einem sogenannten „Forced Floating“ [42]. Dies kann durch Beschichtung von Zellkulturoberflächen mit hydrophilen Polymeren erreicht werden. Gheytauchi et al. verwendeten beispielsweise poly-HEMA-beschichtete Petrischalen für die Generierung von Caco-2-Sphäroiden [71]. Generell unterscheiden sich aber hierbei die Größen und Formen der Sphäroide stark, sodass die Reproduzierbarkeit sinkt [69]. Durch den Einsatz von 96-Well-Platten mit U-förmigem Boden, die entsprechend beschichtet sind, kann dies teilweise verhindert werden, weil sich die Zellzahl pro Well genau definieren lässt. Dadurch ist diese Methode, was die Reproduzierbarkeit der Sphäroidgrößen und -formen angeht, mit der Hanging Drop-Methode vergleichbar [72]. HepG2-Sphäroide, die in low attachment-U-Platten generiert wurden, konnten gut für Tumormodelle verwendet werden und zeigten eine erhöhte Expression Leber-spezifischer Gene und eine höhere Sensitivität für Genotoxizitätsuntersuchungen [73]. Zudem können mit der „Forced Floating“-Methode auch größere Sphäroide generiert werden [74]. Ruland et al. beschreiben eine Plattform auf Basis von PEG-Styrol-Maleinsäure-Copolymeren [75]. Über ein Anker-Molekül können diese an Polymeroberflächen (z.B. Polystyrol (PS)) adsorbieren. Durch Funktionalisierung der Moleküle können Beschichtungsreagenzien hergestellt werden, die ein Anhaften der Zellen an den Oberflächen verhindern. Auf Grundlage dieser Co-Polymere vertreibt die Fa. faCellitate das Beschichtungsreagenz BIOFLOAT™, mit dem sich auch U-Platten beschichten lassen [76]. Cox et al. beschreiben ein Lebermodell mit primären humanen Hepatozyten in mit BIOFLOAT™-beschichteten Mikrokavitätenarrays aus PS mit einem Durchmesser von 500 µm [77]. Sphäroide können auch generiert werden, indem Zellen durch externe Kräfte in Suspension gehalten werden und dort aggregieren. Hier sind die Systeme für „Magnetic Levitation“ die verbreitetsten, bei denen durch Anlegen eines Magnetfelds und Verwendung von magnetischen Nanopartikeln die Zellen in einem schwebenden/schwimmenden Zustand gehalten werden [78, 79].

Dynamische Systeme sind unter anderem dafür geeignet größere Mengen an Sphäroiden zu generieren, wobei es verschiedene Formen dieser (Mikro-)Bioreaktoren für verschiedene Anwendungen gibt [80]. Weit verbreitet sind hier gerührte (Mikro-)Bioreaktoren [81, 82], Spinner Flasks [68, 83] sowie verschieden Varianten der Rotating-Wall-Vessel-Bioreaktoren [84, 85].

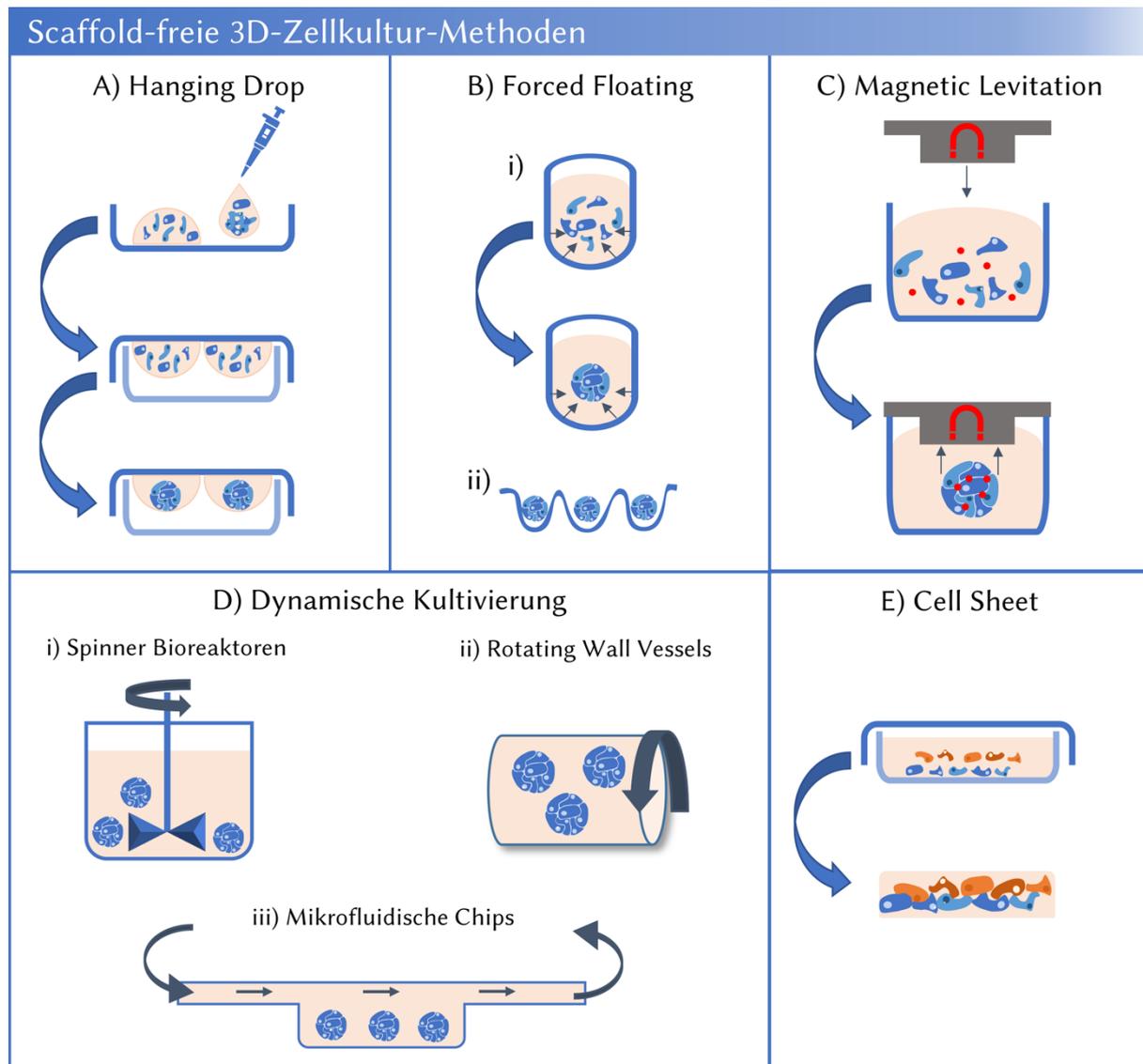


Abbildung 2: Übersicht über verschiedene Methoden der Scaffold-freien 3D-Zellkultur. A) Bei der Hanging Drop-Methode wird die Zellsuspension zunächst auf den Deckel einer Petrischale pipettiert, nach Invertieren sinken die Zellen durch die Gravitation im Tropfen an den tiefsten Punkt und aggregieren dort. B) Durch Beschichtung der Zellkulturoberfläche wird beim Forced Floating ein Adhären der Zellen verhindert, wodurch die Zellen in Suspension Zell-Zell-Kontakte ausbilden und aggregieren. Dies kann i) in beschichteten Platten mit U-Boden erfolgen oder ii) auch in sogenannten Mikrokavitätenarrays. C) Die Zellen aggregieren an magnetischen Nanopartikeln, die durch ein angelegtes Magnetfeld in einem schwimmenden Zustand sind. D) Bei dynamischen Methoden wird durch Scherkräfte ein Adhären der Zellen an den Wänden der Kultivierungsgefäße vermieden. Dies kann i) in Spinner-Bioreaktoren, ii) in Rotating Wall Vessels oder iii) in mikrofluidischen Systemen erfolgen. E) Durch aufeinanderliegende Monolayer von Zellen können sogenannte Cell Sheets kultiviert werden.

Daneben können auch mikrofluidische Chips zur Generierung von Sphäroiden genutzt werden [86-88]. Eine Scaffold-freie Variante, die keine Sphäroide umfasst und daher hier nur am Rande erwähnt werden soll, ist die Cell Sheet Technologie. Hierbei werden Zellen in Form von gestapelten Monolayern kultiviert, wobei sie Zell-Zell-Kontakte ausbilden [42, 89]. Durch Verwendung Temperatur-sensitiver Polymere können diese Zellstapel dann von der Oberfläche gelöst werden [90].

Die beschriebenen Methoden eignen sich alle, mit Ausnahme der Cell Sheets, zur Generierung von Sphäroiden, also kugelförmigen Zellaggregaten, aus einem oder mehreren Primärzelltypen oder Zelllinien. Eine komplexere Form der Zellaggregate stellen die sogenannten Organoide dar. Hierbei handelt es sich um selbstaggregierende 3D-Strukturen aus Stamm- oder Vorläuferzellen [91], die die frühe Organentwicklung sowohl zellulär als auch molekular abbilden können [8]. Organoide enthalten zudem verschieden strukturierte Bereiche. Die von Draxhli et al. beschriebenen Herzorganoide (heart-forming organoids, HFO) umfassen bspw. eine Myokardschicht, die von einer Endokard-ähnlichen Zellschicht ausgekleidet und einem Septum transversum-ähnlichen Bereich umgeben ist [92, 93]. Durch die spontane Schlagaktivität, die als unabhängiger Parameter analysiert werden kann, eignet sich dieses System deshalb wie kein anderes für die humane Kardiotoxizitätstestung.

3.2 Mikrothermoformen und Mikrokavitätenarrays

Die am KIT entwickelten Mikrokavitätenarrays ermöglichen die dreidimensionale Kultivierung von Zellen. Bei den Kavitäten handelt es sich um Vertiefungen mit einem Durchmesser von 300 - 800 μm und einer Tiefe von bis zu 500 μm . In diesen Mikrokavitätenarrays konnte bspw. die 3D-Kultivierung von HepG2-Zellen [94] oder auch die Bildung der hämatopoetischen Stammzellnische gezeigt werden [95, 96]. Die Mikrostrukturierung bietet hier eine gewisse Scaffold-Funktion, wobei auch eine Sphäroid-Generierung nach der Forced Floating-Methode möglich ist [77]. Daher enthält dieser Ansatz sowohl Aspekte der Scaffold-basierten als auch der Scaffold-freien 3D-Zellkultivierung. Die Herstellung der Mikrokavitätenarrays basiert auf dem am KIT entwickelten Mikrothermoformverfahren, auch SMART (engl. Substrate Modification And Replication by Thermoforming, Abbildung 3) genannt [97-99].

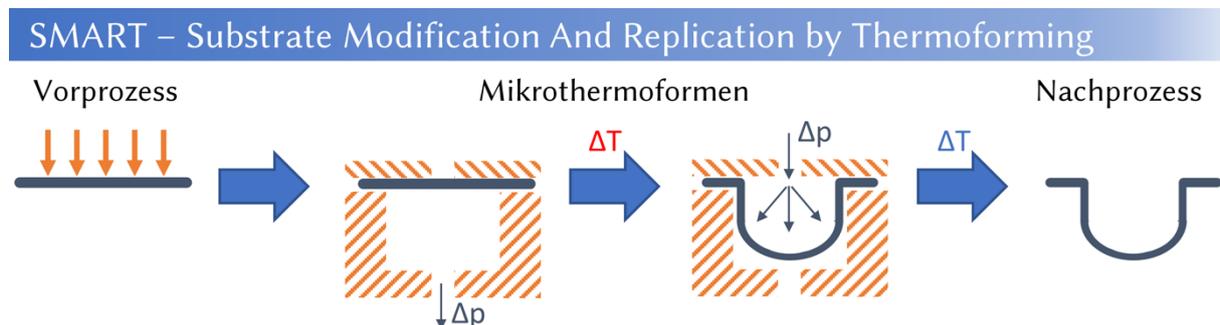


Abbildung 3: Darstellung des SMART-Prozesses, bestehend aus drei Schritten: In einem Vorprozess kann die Folie funktionalisiert/modifiziert werden. Um poröse Mikrostrukturen zu generieren, erfolgt hier ein Beschuss mit Schwerionen. Das eigentliche Mikrothermoformen erfolgt in einer Thermoformanlage. Die Folie wird in eine (Messing-)Formmaske gelegt, die evakuiert wird. Nach Erhitzen auf eine Temperatur im Bereich der Glasübergangstemperatur des Polymers wird die Folie mit Druck beaufschlagt und in die Formmaske gepresst. Nach dem Abkühlen bleibt diese Form erhalten. In einem nachgelagerten Prozess ist die weitere Modifikation der Mikrostrukturen möglich. Beim Beispiel des Schwerionen-Beschusses folgt hier das chemische Nassätzen, um aus den latenten Ionenspuren Poren zu generieren (Abbildung modifiziert nach [100]).

Bei diesem Verfahren wird eine Polymerfolie auf eine Temperatur im Bereich der Glasübergangstemperatur – für Polycarbonat (PC) liegt diese zwischen 149,58 °C [101] und 159 °C [99] – erhitzt und dann durch Beaufschlagen mit Stickstoffüberdruck in eine Formmaske, meist aus Messing, gepresst. Nach dem Abkühlen bleibt die Form erhalten. Dadurch, dass das Polymer nicht komplett geschmolzen wird, bleiben Modifikationen der Polymerfolie während des Formprozesses erhalten [99]. Dies ermöglicht Vor- und Nachprozessierungen der Folien, um verschiedene Modifikationen bzw. Funktionalisierungen zu generieren. Ein Beispiel hierfür sind poröse Mikrostrukturen. Hierbei werden in einem Vorprozess die Folien zunächst mit Schwerionen beschossen, sodass latente Ionenspuren bei gleichzeitigem vollständigen Materialzusammenhalt in der Folie generiert werden. Durch chemisches Nassätzen können danach Poren in der Folie generiert werden, dabei ist die Form und Größe über die Ätzparameter definierbar [102, 103].

3.3 Mikrobioreaktoren

3.3.1 Definition: Mikrobioreaktor (MBR) vs. Organ-on-Chip (OoC)

3D-Zellkulturmodelle, wie auch die zuvor beschriebenen Mikrokavitätenarrays, können statisch oder auch dynamisch kultiviert werden. Für die dynamische Kultivierung von 3D-Zellkulturen werden sogenannte Mikrobioreaktoren (MBR) verwendet. Da die Ausprägungen der MBRs sehr vielseitig sind und auch eine Abgrenzung zu anderen Bezeichnungen, wie den Organ-on-Chips (OoCs), nicht immer eindeutig ist, ist eine Definition des Begriffs MBR notwendig. Eine Möglichkeit zur Herstellung von MBR bietet die Miniaturisierung klassischer Bioreaktoren, wie sie unter anderem auch für die Kultivierung und Generierung größerer Zellmengen verwendet werden, wie die Spinner Flasks, Stirred Tanks oder RWVs (siehe auch Abbildung 2). Daneben gibt es noch Varianten der Hohlfaser-MBR oder MBR mit mechanischer Stimulation [104, 105]. Mikrofluidische MBR, meist mikrofluidische Chips, sind inzwischen weitverbreitete Varianten der MBR, die auch als Vorstufe der komplexeren OoC betrachtet werden können [80]. Hierbei gibt es einen fließenden Übergang und eine genaue Definition und Zuordnung ist mitunter schwierig. Mandenius ordnete MBR eher dem Bioingenieurwesen zu, da sie dazu dienen biologische Reaktionen im Mikromaßstab nachzubilden, während OoC der Nachbildung von Organen mit Körper-ähnlichen Fluiden in miniaturisierter Form dienen [106]. Wird die Verwendung des Begriffs der (mikro-)fluidischen MBR in der Literatur genauer betrachtet, so werden damit meist (mikro-)fluidische Chips bezeichnet, deren zelluläre Modelle kein Organ-ähnliches Niveau erreichen [107, 108]. Jedoch werden auch vermehrt mikrofluidische Chips als OoC bezeichnet, deren zelluläres Modell noch weit entfernt von der Komplexität von Organen ist. Im Rahmen dieser Arbeit wird der Begriff Mikrobioreaktor (MBR) für Systeme verwendet,

die die Kultivierung von 3D-Zellaggregaten ermöglichen, deren Volumen unter 500 µl liegt und die einen aktiven Fluss ermöglichen [80].

3.3.2 Mikrobioreaktor für Mikrokapititätenarrays

In der Arbeitsgruppe Gottwald am Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG) des KIT wurde ein fluidischer MBR (Abbildung 4) für die Kultivierung von HepG2-Zellen [30], sowie dem Aufbau einer artifiziellen, hämatopoetischen Stammzellnische [109] in Mikrokapititätenarrays eingesetzt.

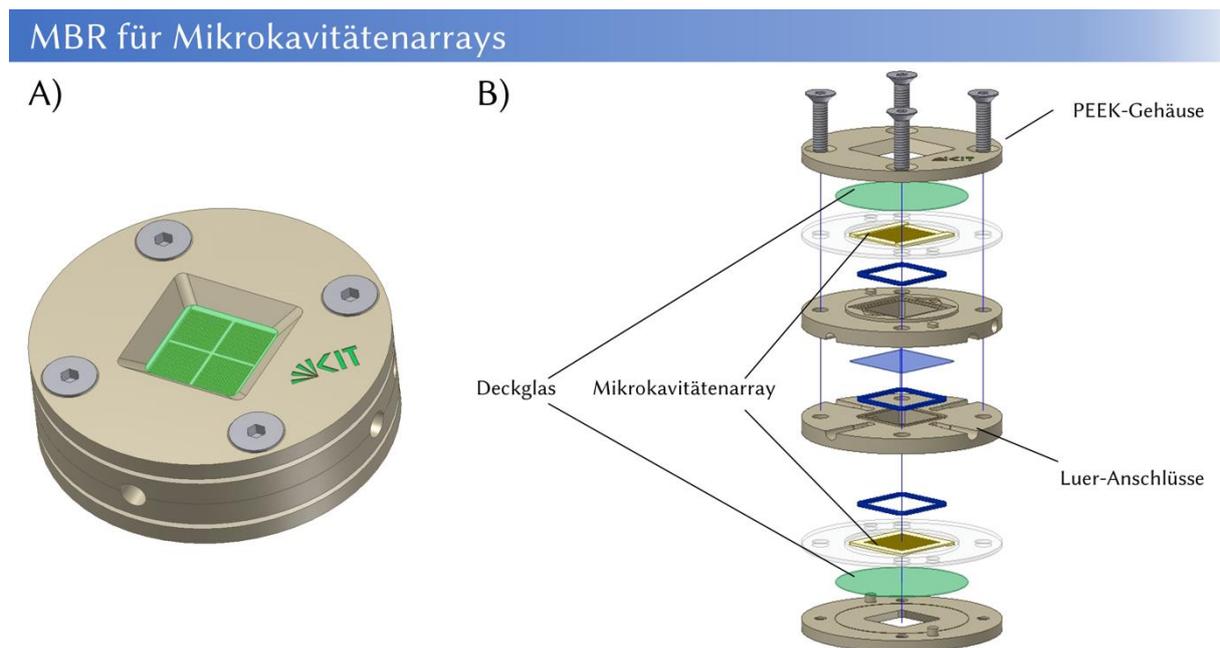


Abbildung 4: Am KIT entwickelter MBR der Arbeitsgruppe Gottwald zur dreidimensionalen Kultivierung verschiedenster Zellen in Mikrokapititätenarrays. Der MBR kann bis zu zwei Mikrokapititätenarrays aufnehmen und wird über Luer-Anschlüsse an eine Fluidik angeschlossen. Sowohl Superfusion als auch Perfusion sind möglich. (Quelle: Arbeitsgruppe Gottwald, KIT)

3.3.3 Modulare Konzepte – Entfernung von Luftblasen

Mikrobioreaktoren beinhalten mindestens ein Kompartiment zur (3D-)Kultivierung von Zellen, sie sind jedoch nicht darauf beschränkt. Einige MBR integrieren auch direkt eine Sensorik für die Analyse [110] oder sind modular aufgebaut [111]. Eine weitere Anforderung an MBR ist es, die reproduzierbare Kultivierung zu gewährleisten. Ein Problem, das alle fluidischen MBR gemeinsam haben, ist die Entstehung von Luftblasen in den Kanälen oder Schläuchen. Gerade bei Langzeitkulturen kann es durch Ausgasen des Mediums und des zellulären Stoffwechsels zur (Luft)Blasenbildung kommen. Diese erhöhen das Totvolumen des Mediums und können Kanäle auch verstopfen [112], was zu einer ungleichmäßigen Medienversorgung führen kann. Zudem führen Luftblasen zu erhöhten Scherkräften an Zellschichten, wodurch diese geschädigt werden und sogar absterben können [113]. Abgesehen von einer direkten Schädigung der Zellen können

Scherkräfte auch die Denaturierung von Proteinen bewirken, die dann auch die Fluidik stören können [114]. Es ist daher notwendig Luftblasen im System zu vermeiden, wofür es verschiedene Ansätze gibt dies entweder direkt im MBR oder nachgeschaltet durch modulare Systeme zu lösen. Grundlegend gibt es hierfür zwei Möglichkeiten: Zum einen die Blasenfallen (engl. bubble traps) und zum anderen Vorrichtungen, die Blasen aus dem System entfernen (engl. debubbler). Im Folgenden wird für beide Ansätze der Begriff Blasenfalle verwendet. Sehr einfache Systeme nutzen den Auftrieb der Luftblasen im Medium aus, um diese in einem über dem eigentlichen Kanal liegenden Kompartiment zu fangen [115]. Diese können von dort auch durch weitere Kanalstrukturen abgeleitet werden [116, 117]. Großer Vorteil dieser Variante ist eine vergleichsweise kostengünstige und einfache Fertigung, da keine weiteren Materialien verwendet werden müssen. Bei zu vielen oder zu großen Luftblasen stoßen diese Methoden jedoch an ihre Grenzen. Um auch über längere Zeiträume zuverlässig Blasen aus dem System entfernen zu können, verwendeten Yu et al. eine 70 µm dicke Polydimethylsiloxan (PDMS)-Membran, die die Oberseite eines mikrofluidischen Kompartiments bildet [112]. Weit verbreitet sind auch Membranen aus Polytetrafluorethylen (PTFE) oder extrudiertem PTFE (ePTFE). Diese können in Schlauchzuleitungen integriert [118] oder auch über mikrofluidische Kanäle gespannt werden [119, 120]. Diese sind inzwischen teilweise als kommerzielle Produkte erhältlich. Ein anderer Ansatz beruht auf kleinen Öffnungen mit einem Durchmesser von unter 50 µm, die hydrophob beschichtet sind und so zwar Luftblasen durchlassen, das Medium aber zurückhalten [121]. Neben der Blasenentfernung kann jedoch auch die gezielte Begasung gewünscht sein, die ebenfalls über PDMS-Membranen erfolgen kann [122, 123]. Dies kann besonders bei regelbaren Systemen und für die Einstellung physiologischer Sauerstoffbedingungen von großem Interesse sein.

3.4 Sauerstoffmessungen in Zellkulturen

Als Bestandteil der meisten Biomoleküle ist Sauerstoff ein zentrales Element des Metabolismus. Molekularer Sauerstoff nimmt zudem 20,95 Vol.-% der Atmosphäre ein. Dies macht Sauerstoff natürlich auch zu einem der wichtigsten Parameter in der Zellkultivierung, der bisher jedoch nicht immer ausreichend berücksichtigt wurde. So wird meist beschrieben, dass Experimente bei 20 oder 21 % Sauerstoff durchgeführt wurden, wobei der korrekte Wert unter Standardbedingungen mit Zusatz von 5 % CO₂, nur bei rund 18 % Sauerstoff liegt [13]. Dies wird in der Literatur meist als „Normoxie“ bezeichnet [124], was noch annähernd auf die Atmosphäre zutrifft, jedoch nicht auf die Situation in Geweben, in denen die Sauerstoffkonzentration bei lediglich 2-6 % liegt [125]. Daher soll zunächst die Bedeutung von Sauerstoff in Zellen sowie in der Zellkultur erläutert werden, wobei auch die Begriffe der Normoxie, Hypoxie und Hyperoxie

definiert werden. Danach werden Methoden vorgestellt, mit denen gelöster Sauerstoff auch in Zellkulturanwendungen gemessen werden kann. Sauerstoff wird während des Energiemetabolismus benötigt, um in der Atmungskette ATP zu generieren.

3.4.1 Die Funktion von Sauerstoff in der Atmungskette

Die Atmungskette bezeichnet den Elektronentransfer von NADH auf Sauerstoff über verschiedene Reaktionen an der inneren Mitochondrienmembran und wird daher auch als Elektronentransportkette (engl. electron transport chain, ETC) bezeichnet [126]. Weitere Begriffe hierfür sind Zellatmung oder mitochondriale Atmung (engl. mitochondrial respiration). Sie dient dazu ATP durch Umsetzung von NADH und FADH_2 aus dem Abbau von Glucose zu CO_2 durch die Glykolyse und den Citratzyklus zu gewinnen. Hierfür wird durch verschiedene Redoxreaktionen an den Komplexen I-IV der Atmungskette ein Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran aufgebaut, der von der ATP-Synthase zur Erzeugung des ATP benötigt wird (Abbildung 5).

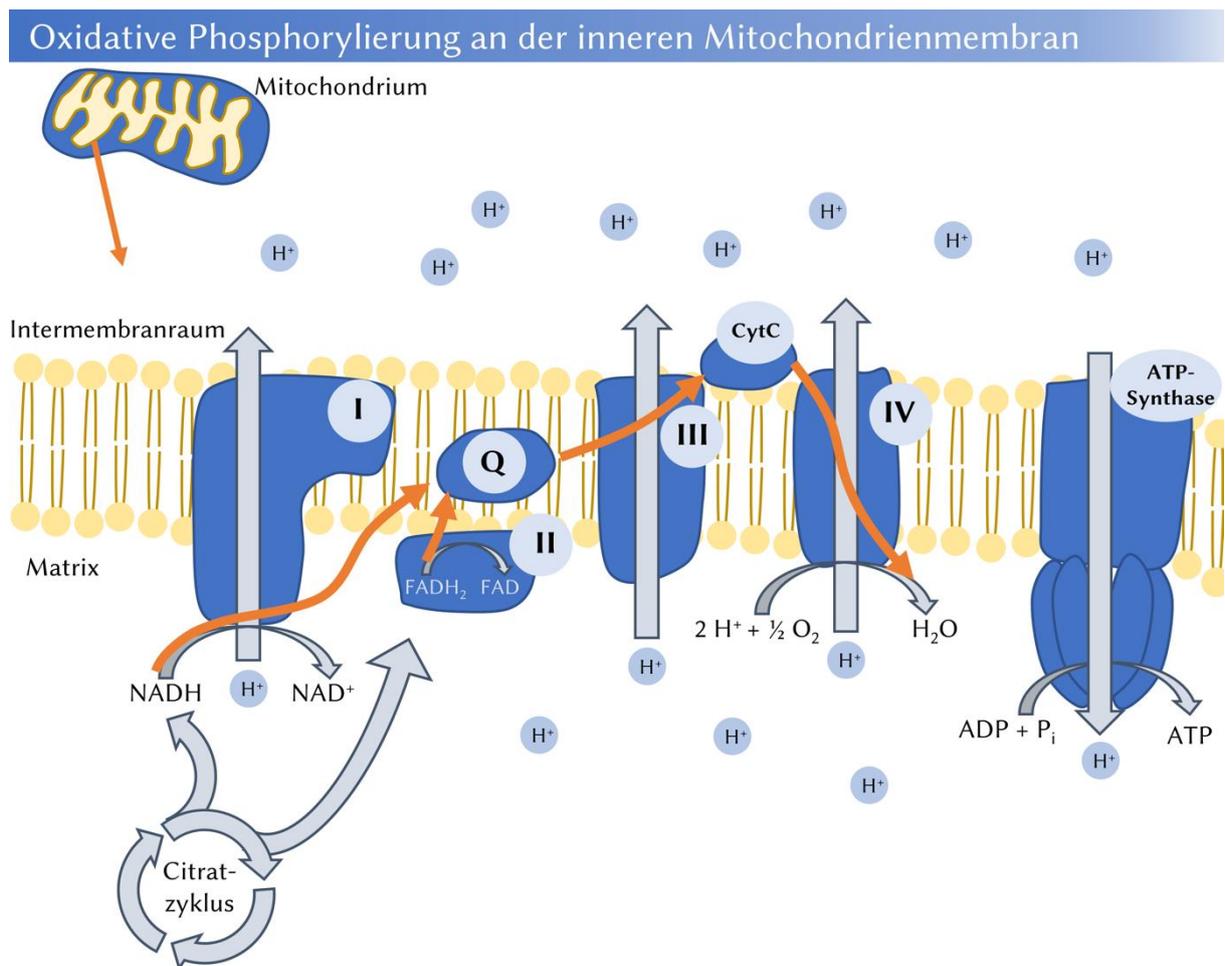


Abbildung 5: Oxidative Phosphorylierung an der inneren Mitochondrienmembran. Die orange-farbenen Pfeile stellen den Elektronenfluss dar.

Dieser Gesamtprozess, die oxidative Phosphorylierung, läuft an der inneren Mitochondrienmembran ab. NADH aus der Glykolyse diffundiert zunächst in den Intermembranraum, wo es über Transportsysteme in die Matrix der Mitochondrien transportiert wird. Dort wird zunächst durch Komplex I (NADH-Dehydrogenase) die Oxidation von NADH katalysiert, wobei zwei Elektronen frei und zwei Protonen in den Intermembranraum transportiert werden. Zusammen mit zwei weiteren Elektronen aus der Oxidation von FADH₂ an Komplex II (Succinat-Dehydrogenase), reduzieren die Elektronen Ubichinon – auch Coenzym Q₁₀ oder Q genannt – zu Ubihydrochinon und übertragen dabei die Elektronen auf Komplex III (Cytochrom-c-Reduktase). Bei der Übertragung der Elektronen durch Komplex III auf Cytochrom C kommt es wieder zum Protonentransport. Anschließend katalysiert Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) die Reduktion von molekularem Sauerstoff, wobei Wasser entsteht und es zur weiteren Translokation von Protonen kommt. Insgesamt wird während des exothermen Elektronenflusses durch Komplexe I, III und IV ein Protonengradient aufgebaut, der von der ATP-Synthase genutzt wird, um ATP zu bilden. [126]

Störungen der Atmungskette als zentralem Element des Energiemetabolismus haben gravierende Auswirkungen auf die Zellen bzw. Organismen. So zeichnen offenbar mitochondriale Dysfunktionen verantwortlich für zahlreiche Krankheitsbilder, wie bspw. Herzerkrankungen [127], Arteriosklerose [128], Parkinsonerkrankungen [129] oder auch Diabetes mellitus [130]. Ein Zusammenhang besteht auch hier zwischen der Dysfunktion der ETC und einer dadurch bedingten verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [130, 131]. Mitochondriale Dysfunktionen können genetischen Ursprungs sein, können aber auch durch Substanzen ausgelöst werden. Da die ETC Sauerstoff umsetzt, kann der Sauerstoffverbrauch entscheidende Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit der ETC bieten. Zudem ist ein physiologischer Sauerstoffgehalt für aussagekräftige Modelle zur Untersuchung der ETC notwendig.

3.4.2 Sauerstoff in der Zellkultur: Von der Normoxie zur Physioxie

Die Bedeutung von Sauerstoff für den Energiemetabolismus zeigt die Notwendigkeit einer geeigneten Sauerstoffversorgung für die Zellkultur. Während in Lebewesen Sauerstoff im Blut durch die Blutgefäße in die Gewebe und somit in die Zellen kommt, erfolgt in der 2D-Zellkultur die Sauerstoffversorgung durch Diffusion in das Medium. In 3D-Zellkulturmodellen ist die Sauerstoffversorgung komplexer, da dieser auch in die Gewebeschichten diffundieren muss [132]. Dies kann zu unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen innerhalb eines Systems und auch zu Sauerstoffgradienten innerhalb der Gewebe führen. Zellkulturexperimente werden meist unter normoxischen Bedingungen durchgeführt, wobei häufig auf die Umgebungs-

atmosphäre, also 20,95 % Sauerstoff verwiesen wird. Als Normoxie bezeichnet man einen Sauerstoffgehalt von 10 – 21 %, während die Hypoxie Sauerstoffkonzentrationen deutlich darunter (unter 5 %) und die Hyperoxie Sauerstoffkonzentrationen darüber, also über 21 % bezeichnet [133]. Die häufig vorkommende Angabe von 20,95 % ist kritisch zu hinterfragen, da häufig für Carbonat-gepufferte Medien 5 % CO₂ zugesetzt wird und zudem eine erhöhte Luftfeuchtigkeit vorliegt, wodurch der Sauerstoffgehalt im Inkubator auf 18,5 % sinkt [125]. Ein weitaus entscheidenderer Faktor ist jedoch, dass diese in der Atmosphäre vorliegende Normoxie nicht identisch ist mit gewebetypischen Sauerstoffkonzentrationen, sodass hierfür der Begriff einer gewebetypischen Normoxie definiert werden muss, die auch als Physioxie bezeichnet wird.

Um sich mit dem Begriff der Physioxie näher zu beschäftigen, stellt sich zunächst die Frage, welche Sauerstoffkonzentrationen *in vivo* vorkommen. Hierfür werden mitunter verschiedene Einheiten verwendet. Neben dem Sauerstoffgehalt bzw. der Sauerstoffkonzentration wird häufig vom Sauerstoffpartialdruck (pO₂) gesprochen, der auch in Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) oder Kilopascal (kPa) angegeben werden kann. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über genäherte Faktoren zur Umrechnung der Einheiten.

Tabelle 3: Genäherte Faktoren zum Umrechnen der gegebenen Einheit (in der Zeile) in die Zieleinheit (in der Spalte) (nach [125]).

	%	kPa	mmHg	μM
%	-	1,02	7,65	13,5
kPa	0,98	-	7,5	13,2
mmHg	0,13	0,132	-	1,76
μM	0,074	0,076	0,57	-

Auf dem Weg des Sauerstoffs durch einen Organismus, durch die Gewebe hin zu den Mitochondrien, sinkt der Partialdruck aufgrund verschiedener Barrieren von 160 mmHg, also rund 21 % O₂, in der Atmosphäre bis unter 9 mmHg, also unter 1,3 % O₂, in den Mitochondrien [134, 135](Tabelle 4). Die gewebetypische Sauerstoffkonzentration, also der Bereich der Physioxie, wird daher zwischen dem Sauerstoffpartialdruck der Atmosphäre und dem in den Mitochondrien erwartet und unterscheidet sich je nach Gewebe erheblich. Zugang zu gewebetypischen Sauerstoffkonzentrationen bieten die Betrachtung von Hypoxiemarkern, verschiedene spektroskopische Methoden, sowie optische Sensoren [125, 135], auf die später eingegangen wird. Wie aus Tabelle 4 ersichtlich wird, liegt die Sauerstoffkonzentration in den Geweben deutlich unter der in der Umgebungsatmosphäre, wodurch die Zellen in Kultur einer Hyperoxie ausgesetzt sind.

Tabelle 4: Sauerstoffkonzentrationen in verschiedenen Geweben *in vivo* im Vergleich zur Umgebungs- bzw. Inkubatoratmosphäre. Die in der Literatur gefundenen Werte sind fett gedruckt, die anderen Einheiten wurden mit den Faktoren aus Tabelle 3 berechnet.

Gewebe/Organ	mmHg	kPa	%	Quelle
Atmosphäre/Luft	160	21,1	20,95	[135]
Inkubator (5 % CO ₂)	141	18,8	18,5	[125]
Trachea	150	~ 19,5	19,7	[125]
Bronchien bis Alveoli	110	12-15	14,5	[136-139]
Arteriellles Blut	100	9-12	13,2	[125, 135]
Leber	31-55	4,1 – 7,3	4-7,2	[125, 140-142]
Knochenmark	41-54	5,4-7,2	5,3-7,1	[143-147]
Hirn/Ventrikel	4-54	0,5-7,2	0,5-7	[146-148]
Endothel (Arterie)	37,5	5	4,9	[149]
Myokard	15-37,5	2-5	2-4,9	[150, 151]
Muskel	29,2 ±1,8	3,9 ±0,2	3,8 ±0,2	[135, 152-154]
Dermis/Haut	24 ±6,4	3,3 ±0,8	3,2 ±0,8	[155]
Zellen	9,9-19	1,3-5,6	1,3-2,5	[135]
Mitochondrien	<9,9	<1,3	<1,3	[135]

Jedoch kann nicht zwangsläufig davon ausgegangen werden, dass die Bedingungen generell zu hoch sind. Je nach Modell kommt es durch eine langsame Diffusion, ein zu großes Volumen, etc. auch zu Bereichen, in denen der Sauerstoffgehalt im Vergleich zur *in vivo*-Situation zu niedrig ist (Hypoxie).

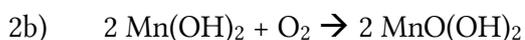
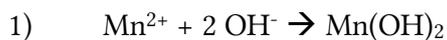
Timpano et al. untersuchten verschiedene Zelltypen in verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen: 21 % O₂ (Normoxie), 1-11 % O₂ (Physioxie) sowie 1 % O₂ (Hypoxie). Danach zeigten bspw. HEK293 und HRPTEC-Zellen unter Physioxie eine höhere Viabilität. Auch die metabolische Aktivität der Mitochondrien war unter Physioxie erhöht, ebenso wie die Expression antioxidativ-wirkender Gene bzw. solchen zur Behebung von DNA-Schäden Sauerstoffabhängig war. Für die vier verwendeten Zellarten konnten die Autoren hier eine sogenannte „goldiloxigen zone“, angelehnt an die Bezeichnung „goldilocks zone“ für die habitable Zone, ermitteln, in der die Sauerstoffkonzentration nicht zu hoch, sodass sie DNA-Schäden ausgelöst

hätte, aber auch nicht zu tief war, sodass es einen negativen Effekt auf die Viabilität gehabt hätte. Diese Zonen unterschieden sich geringfügig für einzelne Zelltypen. [134] Die Kultivierung von Stammzellen aus Fettgewebe (ASCs) auf neonatalen ventrikulären Myozyten der Ratte unter physioxischen Bedingungen (5 % CO₂) zeigte in den Versuchen von Lin et al. einen erhöhten kardioprotektiven Effekt im Vergleich zur normoxischen Kultivierung [156].

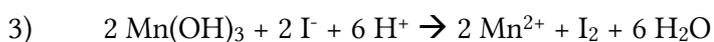
Diese beiden Beispiele zeigen, dass eine Regulation der Sauerstoffkonzentration auf ein physiologisches Niveau essentiell ist, um Ergebnisse zu erhalten, die mit der *in vivo*-Situation vergleichbar sind. Dabei ist es jedoch nicht einfach möglich aus der Sauerstoffkonzentration in der Inkubatorumgebung auf den Sauerstoffgehalt in der Nähe der Zellen zu schließen [125], da sich durch eine langsame Diffusion des Sauerstoffs im Vergleich zum Verbrauch Gradienten und hypoxische Bereiche bilden können [132, 157]. Vielmehr wäre es notwendig den Sauerstoffgehalt kontinuierlich in der Nähe der (3D-)Zellkulturen zu überwachen und ggfls. zu regulieren. Die dafür zur Verfügung stehenden Methoden sollen in den folgenden Abschnitten dargestellt werden.

3.4.3 Methoden zur Sauerstoffmessung in der Zellkultur

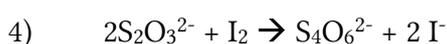
Aufgrund der oben dargestellten Bedeutung von Sauerstoff für biologische bzw. physiologische Prozesse, ist die Messung der Konzentration gelösten Sauerstoffs notwendig. Eine der ersten Möglichkeiten, die heute noch Anwendung findet, war die bereits 1888 entwickelte Winkler-Methode [158]. Dabei wird in alkalischer Lösung Mangan(II)-hydroxid durch Sauerstoff zu Mangan(III)-hydroxid und teilweise zu Mangan(IV)-oxid-hydroxid oxidiert, welche als brauner Niederschlag ausfallen.



Nach Zugabe von Säure wird Mangan(IV) aus der Reaktion 2b durch eine Komproportionierungsreaktion in Mangan(III) umgewandelt, das dann mit zugesetztem Iodid reagiert, wodurch Iod entsteht.



Durch Titration mit Natriumthiosulfat kann die Stoffmenge des gebildeten Iods bestimmt werden.



Da ein Äquivalent Sauerstoff zwei Äquivalenten Thiosulfat-Ionen entspricht, kann darüber die Massenkonzentration gelösten Sauerstoffs berechnet werden [159]. Diese Methode ist vergleichsweise präzise [160], aber nicht für eine kontinuierliche Messung in Zellkulturen geeignet, unter anderem da Sauerstoff verbraucht wird und sich ein Niederschlag bildet. Amperometrische, also elektrochemische Sensoren hingegen sind für kontinuierliche Messungen geeignet [161]. Die in den 1950er Jahren für die Bestimmung des Sauerstoffgehalts im Blut entwickelten Clark-Elektroden, gehören zu den verbreitetsten elektrochemischen Sensoren [162]. Sie ermöglichen die kontinuierliche Sauerstoffmessung in gasförmigen Proben, aber auch die Messung von gelöstem Sauerstoff in flüssigen Proben. Jedoch wird hierbei Sauerstoff reduziert, wodurch die Clark-Elektrode dem zu messenden Medium Sauerstoff entzieht und damit die Messwerte beeinflusst. Zudem ist die Sauerstoffmessung mit Elektroden nur an einem einzelnen Punkt möglich, der meist nicht direkt bei den Zellen, sondern im darüberliegenden Medium ist. Somit kann mit dieser Methode die Konzentration gelösten Sauerstoffs im Medium nur global für das ganze Kultivierungsgefäß bestimmt werden.

Von großem Interesse für Anwendungen in der Zellkultur sind optische Sensoren zur Sauerstoffmessung, die sich unterteilen lassen in direkte Messungen über spektroskopische Methoden bis hin zu Indikator-basierten Messmethoden [163].

Die direkte spektroskopische Messung von molekularem Sauerstoff kann aufgrund charakteristischer Absorptionsbereiche im UV-Bereich bei 145 nm und einem schwächeren bei 760 nm erfolgen [164, 165]. Durch teure und aufwendige Geräte ist der Einsatz dieser Methode daher nur für spezielle Anwendungsfälle zu empfehlen, da zudem auch Wasser oder Kohlenstoffdioxid die Messung stören [163]. Absorptiometrische Methoden basieren auf einer Änderung des Absorptionsspektrums, hervorgerufen durch Sauerstoff an einer Sauerstoffsensitiven Sonde [166]. Bei Leukofarbstoffen kann dies durch einen irreversiblen, sichtbaren Farbumschlag angezeigt werden [167], wodurch diese Methode auch in der Verpackungsindustrie angewandt wird. Für den Einsatz in der Zellkultur eignen diese Methoden sich jedoch nicht. Ein Großteil der optischen Sauerstoffsensoren nutzt die Eigenschaft, dass Sauerstoff als Quencher für lumineszente Sonden dient, auf die im folgenden Abschnitt detailliert eingegangen wird. Insgesamt bieten optische Methoden im Vergleich zur Clarke-Elektrode einige Vorteile: 1) Sauerstoff wird während der Messung nicht verbraucht. 2) Durch Verwendung von Glasfasertechnik sind die Sensoren miniaturisierbar und die eigentliche Sensorschicht kann räumlich getrennt von der Elektronik sein. Dadurch ist 3) eine nicht-invasive Messung möglich. 4) Durch Beschichtung von Folien sind nicht nur einzelne Messpunkte möglich, sondern es können auch größere Flächen betrachtet werden. 5) Verschiedene Sensoren ermöglichen auch

eine parallele Messung bspw. des pH-Werts. 6) Die Sensoren sind vergleichsweise robust, was die Messumgebung angeht, [168] wobei ein Sensor in diesem Sinne den Aufbau aus einer Sauerstoff-sensitiven Sonde, bspw. einem Fluorophor, einer Matrix, die diese Sonde enthält, sowie der dazugehörigen Elektronik, um die Signale auszulesen und die erhaltenen Messwerte zu prozessieren, umfasst [169].

3.4.4 Lumineszenzlöschung – Dynamisches Quenching

Bei der Lumineszenzlöschung dient molekularer Sauerstoff als Quencher, der mit einer angeregten, Sauerstoff-sensitiven lumineszierenden Sonde in einem dynamischen Prozess kollidiert und dadurch die Intensität und die Abklingzeit der lumineszierenden Sonde ändert (Abbildung 6). Je nachdem, ob es sich bei dem Prozess um Fluoreszenz oder Phosphoreszenz handelt, kann auch von Fluoreszenz- bzw. Phosphoreszenzlöschung gesprochen werden. Die Vorgänge sind vergleichbar, sodass im Folgenden der Begriff Fluoreszenz verwendet wird.

Dadurch, dass es sich bei der dynamischen Fluoreszenzlöschung um einen photophysikalischen und nicht um einen photochemischen Effekt handelt, ist er reversibel. Der Zusammenhang zwischen der Fluoreszenz-/Lumineszenzintensität (F) – bzw. auch der Abklingzeit (τ) – und der Konzentration des Quenchers, hier Sauerstoff ($[O_2]$) wird durch die Stern-Volmer-Gleichung (Formel 1) beschrieben [170]:

Formel 1: Stern-Volmer-Gleichung

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV}[O_2]$$

Wobei K_{SV} die Stern-Volmer-Konstante bezeichnet. Dargestellt werden kann dieser Zusammenhang im Stern-Volmer-Plot, wobei der gemessene Zusammenhang geringfügig von dem idealen Zusammenhang, gegeben durch die Gleichung, abweicht [163]. Die Ursachen können hierbei unter anderem in den verwendeten Materialien liegen. Klimant et al. beschreiben, dass sie für ihre adaptierte Stern-Volmer-Gleichung (Formel 2) die Annahme getroffen hatten, dass 15 % des Fluorophors nicht signifikant gequencht wurden [171]. Wird dieser Materialfaktor (A) berücksichtigt, so erhält man folgende adaptierte-Stern-Volmer-Gleichung:

Formel 2: Adaptierte Stern-Volmer-Gleichung (nach [12, 171]).

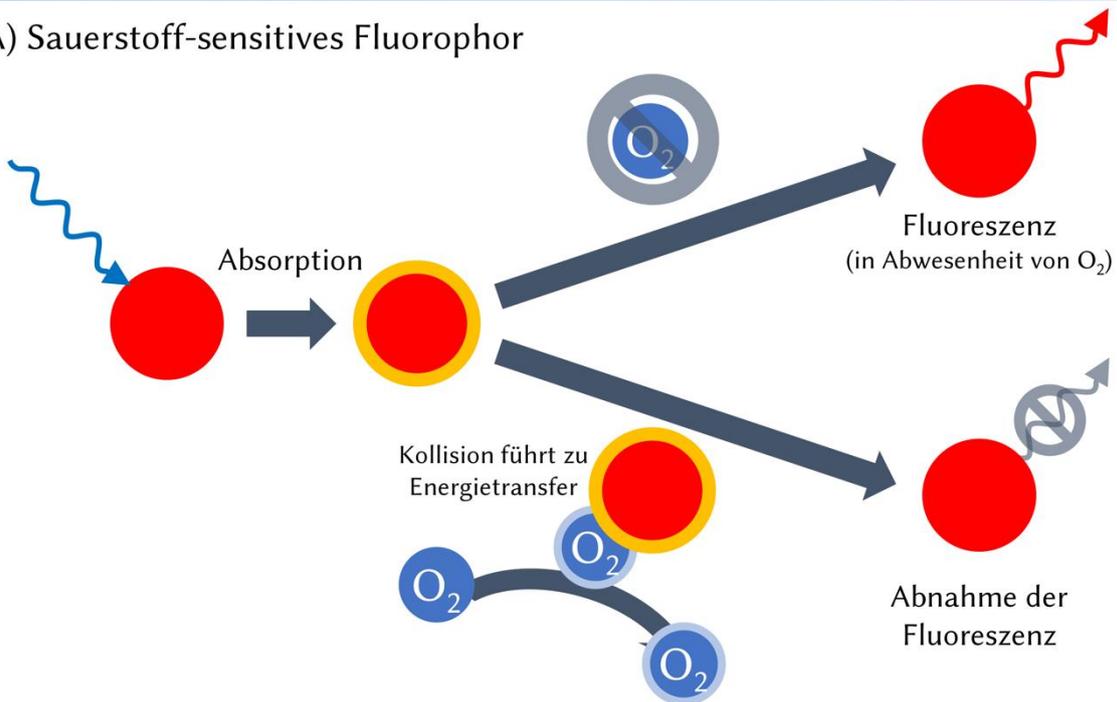
$$\frac{I_0}{I} = \frac{F_0}{F} = \frac{R_0}{R} = \frac{\tau_0}{\tau} = \left(\frac{A}{1 + K_{SV}[O_2]} + (1 - A) \right)^{-1}$$

Wobei I im Allgemeinen für die Intensität steht, F für die Fluoreszenzintensität und R für das Verhältnis zwischen der Intensität eines Sauerstoff-sensitiven- zu der eines Referenzfluorophors (vgl. Abbildung 6). Die Verwendung eines Referenzfluorophors kann Messfehler, die bspw. durch Beschichtungsunterschiede vorkommen, verringern [172].

Für diese Methode gibt es eine breite Palette an Sauerstoff-sensitiven Fluorophoren [173], wobei die meisten aus der Gruppe der Ruthenium(II)-Komplexe stammen (vgl. Tabelle 26). Einige davon, wie z.B. Ru(bipyridin)₃ (Ru(bpy)) oder Ru(1,10-phenanthrolin)₃ (Ru(phen)), sind kommerziell erhältlich. Weitere Beispiele sind Iridium(III)- oder Europium(III)-Komplexe [174]. Besonders gute Eigenschaften zeigen auch Metallporphyrine, wie Platin(II)- bzw. Palladium(II)-Porphyrine [175, 176]. Je nach Anwendungsfall und Umgebung eignen sich daher unterschiedliche Moleküle. Liebsch et al. beschrieben 2000 einen Folien-basierten Ansatz, der Platin(II)-Porphyrin- und Ruthenium(II)-Polypyridyl-Komplexe enthielt und neben O₂ auch CO₂ sowie den pH-Wert in Multiwellplatten messen konnte [177]. Neben der Auswahl der Sauerstoff-sensitiven Sonden beeinflusst auch die Wahl der Matrix bzw. des Trägermaterials die Eigenschaften des Sensors. So können Trägerfolien mit einer (Polymer-)Matrix beschichtet werden, die die Sonden enthält. Es ist aber auch möglich die Sonden (kovalent) an Hydrogele oder Nanopartikel zu binden [163].

Dynamische Fluoreszenzlöschung

A) Sauerstoff-sensitives Fluorophor



B) Referenzfluorophor

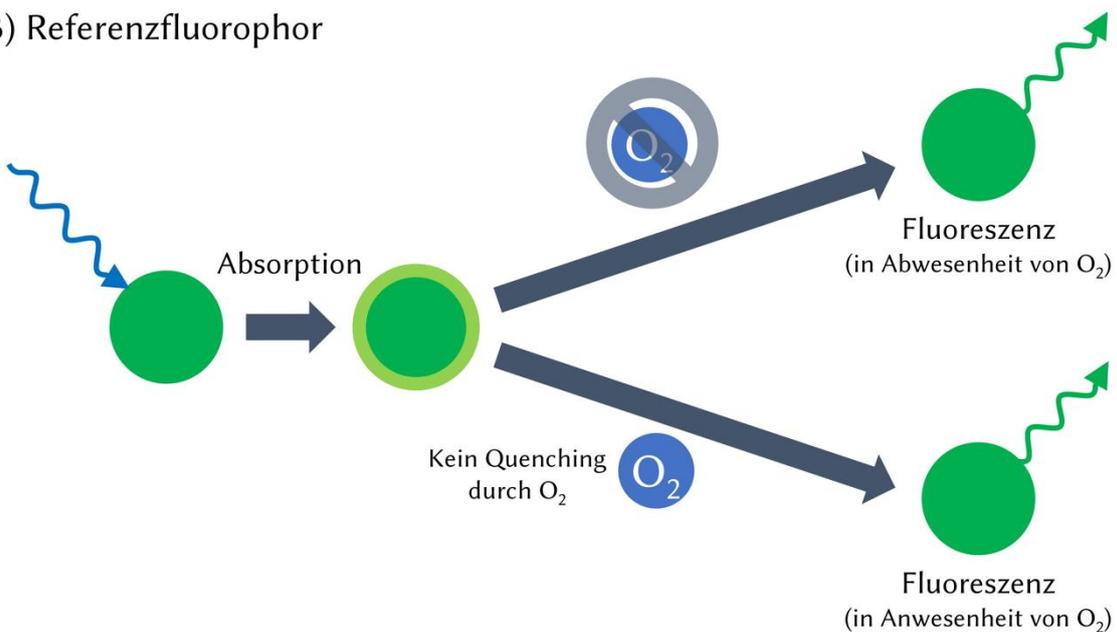


Abbildung 6: Prinzip der dynamischen Fluoreszenzlöschung. A) Durch Licht wird ein Fluorophor, hier eine Sauerstoff-sensitive Sonde, in einen angeregten Zustand versetzt. In Abwesenheit von Sauerstoff kommt es zur Fluoreszenz. Die Anwesenheit von Sauerstoff führt zu dynamischen Kollisionen zwischen Sauerstoff und Fluorophor, wodurch es zu einem Energieübertrag des angeregten Fluorophors auf Sauerstoff kommt, der daraufhin vom Triplett-Zustand (Grundzustand) in den angeregten Singulett-Zustand übergeht. Dieser Übergang ist strahlungsfrei, wodurch die Fluoreszenz abnimmt. B) Kein Unterschied in der Fluoreszenz bei einem Referenzfluorophor. (Abbildung modifiziert nach: [178])

3.4.5 Anwendung der dynamischen Fluoreszenzlöschung

Die Vorteile der Sauerstoffbestimmung durch die dynamische Fluoreszenzlöschung, zeigen sich auch bei Anwendungen im Bereich der Zellkultur. Folien, die mit Platin(II)-Octaethyl-Porphyrin in einem Polymer, beschichtet wurden [176], wurden 2002 von Kellner et al. verwendet, um die Sauerstoffkonzentrationen zweidimensional in Knorpelgewebe *in vitro* zu bestimmen. Die Sauerstoffkonzentration wurde hierbei über eine Änderung der Lumineszenz-Abklingzeit in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration berechnet [179]. Dies erfordert jedoch einen komplexeren Aufbau der optischen Einheit, wie pulsierende LED-Arrays [180], die für die Messung der Fluoreszenz-/Phosphoreszenzlebensdauer benötigt werden. Einfacher ist die ratiometrische Bestimmung, indem wie oben beschrieben, ein Referenzfluorophor mitgemessen wird. Hierfür gibt es kommerziell erhältliche Systeme, u.a. der Fa. PreSens Precision Sensing GmbH (Regensburg), mit denen zweidimensionale Sauerstoffverteilungen gemessen werden können [172, 181]. Neben dem Einsatz der Fluorophore in Folien, können sie auch in Nadel-ähnlichen Sensorsystemen verwendet werden [182]. Durch Bewegung solcher Nadeln entlang der Z-Achse, können Gradienten in Zellkulturmedien bestimmt werden [183]. Dieser Ansatz ist jedoch mit einem erhöhten apparativen Aufwand verbunden. Peniche Silva et al. stellten eine einfachere Methode vor, bei der eine Sauerstoff-sensitive Folie auf einer Rampe mit einer Höhe von 3,3 mm befestigt wurde. Dadurch ist es möglich, Sauerstoffgradienten über Zellmonolayern zu messen. [12]. Im Vergleich zu anderen Methoden oder Ansätzen, wie bspw. Elektrodenbasierten Messungen, kann hierdurch die Sauerstoffverteilung im Zellkulturmedium schon deutlich genauer bestimmt werden. Für Anwendungen in 3D-Zellkulturen eignen sie sich jedoch nicht. Für den Einsatz in der 3D-Zellkultur können Sauerstoff-sensitive Sonden in Hydrogele oder Nanopartikel integriert werden, um so eine dreidimensionale Sauerstoffverteilung messen zu können [184]. Solche Sauerstoff-sensitiven Hydrogele und Nanopartikel eignen sich jedoch nicht für jede Art der 3D-Zellkultur, da bspw. Organoide oder Sphäroide in Suspension kein Hydrogel benötigen. Hinzukommt, dass insbesondere Nanopartikel auch die Zellen beeinflussen und so Ergebnisse verfälschen können. Bisher stellt zudem noch das Messen eine Herausforderung dar. Über die Fluoreszenz-/Phosphoreszenzlebensdauer kann die Sauerstoffkonzentration mit Hilfe der Fluoreszenz-/Phosphoreszenzlebensdauer-mikroskopie (FLIM/PLIM) gemessen werden, was jedoch vergleichsweise lange dauert und die entsprechenden Mikroskope voraussetzt. Petrusek et al. stellten eine einfachere Methode vor, um diese Messungen über die Scan-Geschwindigkeit herkömmlicher Konfokalmikroskope zu ermöglichen [185, 186].

Sauerstoffmessungen auf Grundlage Sauerstoff-sensitiver Sonden, ermöglichen auch eine Reihe von Assays, die zur Charakterisierung von Zellen bzw. des Sauerstoffverbrauchs (oxygen

consumption rate, OCR) dienen. Dies sind bspw. die für das Seahorse XF-Gerät (Agilent Technologies) entwickelten Mito Stress Tests oder Mito Complex Assays [187-190]. Diese Systeme messen jedoch den Sauerstoffverbrauch nur global (also im gesamten Zellkulturkompartiment) in einem Ansatz. Eine räumliche Betrachtung der Sauerstoffkonzentrationen während solcher Assays ermöglicht jedoch weitere Informationen, die mit dem Seahorse XF-Ansatz nicht erhalten werden können [191].

Zusammenfassend gibt es zahlreiche Methoden, um Sauerstoff in Zellkulturen zu messen. Diese sind jedoch meist auf Monolayer beschränkt oder können in 3D-Zellkulturen nur global die Sauerstoffkonzentration bestimmen. Der Verwendung Sauerstoff-sensitiver Hydrogele oder Nanopartikel, ermöglicht zwar die dreidimensionale Sauerstoffmessung, allerdings nur unter erhöhtem apparativem Aufwand. Zudem können Nanopartikel die Zellen beeinflussen. Die Messung der Sauerstoffkonzentration in der Mikroumgebung von Sphäroiden, Organoiden oder anderen 3D-Zellkulturen ist mit diesen Methoden nur beschränkt möglich. Da jedoch, wie auch in 3.4.2 beschrieben, die Sauerstoffkonzentrationen gewebeabhängig sehr unterschiedlich sein können und sich in 3D-Zellkulturen Sauerstoffgradienten ausbilden, ist eine Messung in unmittelbarer Mikroumgebung der Zellen (nicht nur punktuell) notwendig, um physiologische Sauerstoffbedingungen einstellen und aufrechterhalten zu können sowie, um die Auswirkung von Testsubstanzen auf die Zellen, bspw. durch Mito Stress Tests, bestimmen zu können. Hierfür können die Stärken der optischen Sauerstoffmessung über Lumineszenzlöschung gezielt mit der Mikrostrukturierung von Folien kombiniert werden, um neue, Sauerstoff-sensitive Zellkultursysteme zu erhalten.

4 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung von Sauerstoff-sensitiven 3D-Zellkultursystemen auf Mikrokavitätenarray-Basis und deren Evaluierung mit Hilfe biologischer Funktionsmodelle.

Hierfür wurde das Projekt in vier Arbeitsbereiche unterteilt.

1. Mikrothermoformen und Charakterisierung der Sensorfolien
2. Biokompatibilitätstests der Sensorarrays
3. Entwicklung statischer und fluidischer Systeme
4. Anwendungsbeispiele an Funktionsmodellen

Im ersten Schritt sollte das Mikrothermoformen für Sauerstoff-sensitive Folien optimiert werden. Hierfür waren auch Anpassungen der Folientypen und Formmasken vorgesehen. Die generierten Sensorarrays sollten dann hinsichtlich ihrer Sensorantwort untersucht werden.

Für die Eignung in biologischen Modellen sollte danach die Biokompatibilität unterschiedlicher Materialien verglichen und unterschiedliche Beschichtungsreagenzien getestet werden, um verschiedene biologische Funktionsmodelle zu ermöglichen. Ziel der ersten beiden Teilprojekte war es Folientypen und die Geometrien der Sensorarrays für weitere Versuche zu definieren.

Für die Testung der Sensorarrays waren geeignete Systeme notwendig. Hierfür sollten zunächst statische Systeme zur grundlegenden Testung und Charakterisierung definiert und konstruiert werden. In Hinblick auf komplexere fluidische Modelle, auch als Grundlage für regelbare Plattformen, sollten zudem fluidische Systeme entwickelt werden, die dann als Prototypen getestet werden sollten.

Zur Beurteilung der Funktionsfähigkeit der Sensorarrays sollten diese an Funktionsmodellen getestet werden. Hierzu wurden zum einen einfache HepG2-Sphäroide, zum anderen aber auch Kardiomyozytenaggregate verwendet. Für Letztere war es auch ein Ziel, Assays zur Charakterisierung der Respiration an die 3D-Kulturumgebung zu adaptieren.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Verbrauchsmaterial

Tabelle 5: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller	Sitz
CellCrown™ 12NX		Scaffdex	Tampere, Finnland
Corning® Zellkultur-Erlenmeyerkolben		Merck	Darmstadt, DE
ePTFE-Membran, KWO® MultiTex® Platte, 0,5 mm	Muster	REIFF Technische Produkte GmbH	Reutlingen, DE
Nalgene™ Syringe Filter 0,45 µm SFCA	723-2545	Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
O-Ring, NBR 70	370421	Haberkorn GmbH	Wolfurt, Österreich
Pasteurpipetten	612-1702	VWR® Avantor™	Radnor, Philadelphia, USA
Petrischalen (3,5, 6 und 10 cm)		Greiner Bio-One	Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl		Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, DE
PluriStrainer Mini 40 µm		PluriSelect	Leipzig, Deutschland
Reagent Reservoir	89094-664	VWR® Avantor™	Radnor, Philadelphia, USA
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml		Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, DE
Research® plus Pipetten (10, 100, 1000 µl)		Eppendorf	Hamburg, DE
Serologische Glaspipette, 1 ml		Institutsbestand	
Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10, 25, 50 ml)		LLG-Labware	Meckenheim, DE
SF-RPC2/SF-RPC3-Folien		PreSens Precision Sensing GmbH	Regensburg, Deutschland
Tygon-Schlauch, Härte 55, 1,6 x 3,2 mm	2-4451	neoLab® GmbH	Heidelberg, Deutschland
Würfel- und Ringmagnete		Webcraft GmbH	Gottmadingen, DE
Zählkammer Neubauer Improved	40442	Assistent	Sondheim vor der Rhön, DE
Zellkultur Multiwell Platte, Cellstar® (6, 12, 24 und 96 Well)		Greiner Bio-One	Frickenhausen, DE
Zellkultur Petrischale, Cellstar®		Greiner Bio-One	Frickenhausen, DE
Zellkulturflasche T75	734-2313	VWR® Avantor™	Radnor, Philadelphia, USA
Zentrifugenröhrchen 15 ml / 50 ml		Eppendorf	Hamburg, DE

5.1.2 Chemikalien

Tabelle 6: Chemikalien für allgemeine Zellkulturarbeiten sowie Medien/Medienzusätze

Bezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller	Sitz
B-27™ Supplement	17504044	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
BIOFLOAT™ FLEX Coating Solution	F202005	faCellitate	Mannheim, DE
BioWhittaker® PBS (10x)	BE17-517Q	Lonza	Verviers, Belgien
CellTracker™ Green		Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
Collagen (rat tail)	11179179001	Roche Diagnostics Deutschland GmbH	Mannheim, DE
DPBS (10X), Calcium, Magnesium	14080055	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
Fetal Bovine Serum	30-2020	ATCC®	Manassas, VA, USA
Fetal Bovine Serum	7524	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
GlutaMAX™	35050-038	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
MEM	51200-046	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
MEM NEAA	11140-035	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
Natriumpyruvat	11360-039	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
Pen Strep	15140-122	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
Phenolrotlösung	P0290	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Propidiumiodid	40017	Biotium	Fremont, CA, USA
RPMI-Medium 1640	21875-034	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
STEMdiff™ Cardiomyocyte Dissociation Kit	05025	Stemcell™ Technologies	Vancouver, British Columbia, Canada
SYTO™ 16 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain	S7578	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
Trypsin-EDTA (0,25%)	25200056	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
Y-27632 (Dihydrochloride), RHO/ROCK Inhibitor	72304	Stemcell™ Technologies	Vancouver, British Columbia, Canada

Tabelle 7: Allgemeine Chemikalien

Bezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller	Sitz
2-Propanol	9866.4	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE
Agilus30 Black		alphacam GmbH	Schorndorf, DE
DMSO	196055	MP Biomedicals	Santa Ana, CA, USA
Ethanol	K928.2	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Natriumsulfit	8637.1	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE
VeroClear RGD810		alphacam GmbH	Schorndorf, DE

Tabelle 8: Chemikalien für die Tests/Assays (Mito Stress und Mito Complex) sowie Kits.

Bezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller	Sitz
Adenosin-5'-diphosphat Natriumsalz	A2754	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Antimycin A,	A8674	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Bernsteinsäure Dinatriumsalz Hexahydrat	3195.1	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE
Bovine Serum Albumin	A9418	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone Ready Made Solution (FCCP)	SML2959-1ML	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
DL-Äpfelsäure	3034.1	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE
D-Mannitol	M9647	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Doxorubicin (hydrochloride)		Cayman Chemical	Ann Arbor, MI, USA
EGTA	3054.1	Roth	Karlsruhe, DE
HEPES	441476L	VWR Chemicals	Darmstadt, DE
Isoprenalin	462110050	ThermoFisher scientific	Waltham, MA, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	P018.2	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE
Kaliumhydroxid	105033	Merck	Darmstadt, DE
L(+)-Ascorbinsäure	6288.1	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE
LDH-Assay		Roche Diagnostics Deutschland GmbH	Mannheim, DE
Magnesiumchlorid	M8266	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Mitoxantrone (hydrochloride)	14842	Cayman Chemical	Ann Arbor, MI, USA
N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin (TMPD)	T7394	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Oligomycin aus <i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	O4876	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Rotenon	45656	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Saccharose	84097	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Seahorse XF Plasma Membrane Permeabilizer	102504-100	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA

5.1.3 Zellkulturmedien

Tabelle 9: Zusammensetzung des HepG2-Mediums. Für die Standardkultur wurden 0,5 ml einer 0,5 %-igen Phenolrot-Lösung hinzugefügt. Als Assay-Medium ohne Phenolrot.

<i>Bestandteile</i>	<i>Für 500 ml [ml]</i>
<i>Gibco™ MEM</i>	430
<i>Fetal Bovine Serum (ATCC 30-2020)</i>	50
<i>Gibco™ Pen / Strep</i>	5
<i>Gibco™ Natriumpyruvat</i>	5
<i>Gibco™ MEM NEAA</i>	5
<i>Gibco™ GlutaMAX™</i>	5

Tabelle 10: Zusammensetzung des Hela-Mediums. Für die Standardkultur wurden 0,5 ml einer 0,5 %-igen Phenolrot-Lösung hinzugefügt. Als Assay-Medium ohne Phenolrot.

<i>Bestandteile</i>	<i>Für 500 ml [ml]</i>
<i>Gibco™ MEM</i>	430
<i>Fetal Bovine Serum</i>	50
<i>Gibco™ Pen / Strep</i>	5
<i>Gibco™ Natriumpyruvat</i>	5
<i>Gibco™ MEM NEAA</i>	5
<i>Gibco™ GlutaMAX™</i>	5

Tabelle 11: Kardiomyozyten-Medium: RB⁺-Medium.

<i>Bestandteile</i>	<i>[ml]</i>
<i>Gibco™ RPMI-Medium 1640</i>	50
<i>Gibco™ Pen / Strep</i>	0,5
<i>Gibco™ B-27™ Supplement</i>	1

Tabelle 12: Zusammensetzung des P19-Expansionsmediums.

<i>Bestandteile</i>	<i>Für 500 ml [ml]</i>
<i>Gibco™ DMEM, High Glucose</i>	400
<i>Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich, 7524)</i>	75
<i>β-Mercaptoethanol-Lsg. (70 µl in 100 ml PBS^{+/+})</i>	5
<i>Gibco™ Pen / Strep</i>	5
<i>Gibco™ Natriumpyruvat</i>	5
<i>Gibco™ MEM NEAA</i>	5
<i>Gibco™ GlutaMAX™</i>	5

Tabelle 13: Zusammensetzung des P19-Differenzierungsmediums.

<i>Bestandteile</i>	<i>Für 500 ml [ml]</i>
<i>Gibco™ DMEM, High Glucose</i>	370
<i>Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich, 7524)</i>	100
<i>β-Mercaptoethanol-Lsg. (70 µl in 100 ml PBS^{+/+})</i>	5
<i>Gibco™ Pen / Strep</i>	5
<i>Gibco™ Natriumpyruvat</i>	5
<i>Gibco™ MEM NEAA</i>	5
<i>Gibco™ GlutaMAX™</i>	5
<i>DMSO</i>	5

Tabelle 14: 1x MAS-Medium. Gelöst in Wasser. pH-Wert wurde mit Kaliumhydroxid auf 7,4 eingestellt. Danach wurde die Lösung sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Für 2x-MAS wurde die Konzentration entsprechend verdoppelt.

<i>Bestandteile</i>	<i>Konzentration [mM]</i>
<i>D-Mannitol</i>	220
<i>Saccharose</i>	70
<i>Kaliumdihydrogenphosphat</i>	10
<i>Magnesiumchlorid</i>	5
<i>HEPES</i>	3
<i>EGTA</i>	1
<i>Bovine Serum Albumin</i>	0,2 %

Tabelle 15: 1x MAS⁺-Medium. 1x MAS⁺ wurde in 2x MAS und Wasser angesetzt, sodass die Endkonzentrationen von 1x MAS erreicht wurden. Die Lösung wurde erwärmt, der pH-Wert auf 7,4 mit Kaliumhydroxid eingestellt, sterilfiltriert und anschließend bei 4 °C gelagert.

<i>Bestandteile</i>	<i>Konzentration [mM]</i>
<i>DL-Äpfelsäure</i>	1
<i>Gibco™ Natriumpyruvat</i>	10
<i>Adenosin-5'-diphosphat Natriumsalz</i>	4

5.1.4 Zellen/Zelllinien

Tabelle 16: Übersicht über die verwendeten Zellen/Zelllinien.

Zellen/Zelllinie	Transgene Modifikation	Herkunft
HepG2 (HB-8065)	keine	ATCC
Hela (CL-2)	keine	ATCC
P19 (CRL-1825)	keine	ATCC
Kardiomyozyten (mit Kalzium-Indikator) aus MHHi001-A-5	RedStar _{nuc} unter CAG-Promotor, GCaMP6f	AG Zweigerdt, MHH, Hannover [192]
Kardiomyozyten (ohne Kalzium-Indikator) aus MHHi001-A	RedStar _{nuc} unter CAG-Promotor	AG Zweigerdt, MHH, Hannover [193]

5.1.5 Geräte

Tabelle 17: Geräteliste

Bezeichnung	Gerätebeschreibung	Hersteller	Sitz
Objet260 Connex3	PolyJet-Drucker	Stratasys	
Multifuge™ XR3	Zentrifuge mit wechselbaren Einsätzen	Thermo Scientific Inc.	Fisher Waltham, MA, USA
Inkubator	Zellkulturinkubator, CO ₂ -Begasung	Binder	Tuttlingen, DE
Inkubator	Zellkulturinkubator, CO ₂ -Begasung	Memmert	
Pipetboy		Integra	Biebertal, DE
Schüttelwasserbad SW23		Julabo	Seelbach, DE
Sterilbank Safe 2020		Thermo Scientific Inc.	Fisher Waltham, MA, USA
VisiSens TD	Optisches System zur Sauerstoffmessung von Sensorfolien	PreSens Precision Sensing GmbH	Regensburg, DE
Vortex Genie® 2		Scientific Industries	Bohemia, NY, USA
Axio Observer Z1	Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, DE
Peristaltikpumpe RP-QII	Miniatur-Schlauchpumpe	Ismatec	
Lötkolben SP5	Konfokalmikroskop	Leica Microsystems	Wetzlar, DE
Axioskop FS	Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, DE
Mitutoyo Absolute	Digitale Messuhr		

5.1.6 Software

Tabelle 18: Verwendete Software

Software	Version	Anbieter	Verwendung
CellProfiler™	4.2.1.	Broad Institute	Auswertung der Dateien der Sauerstoffmessungen
VisiSens Scientifical	1.0.3.2.	PreSens Precision Sensing GmbH	Live-Sauerstoffmessungen
Zen Pro	2012 (blue edition)	Carl ZEISS Microscopy GmbH	Aufnahme von Bildern am Mikroskop
LAS X Lite		Leica Microsystems	Bearbeiten/Exportieren der cLSM-Aufnahmen
Fusion 360		Autodesk	CAD
ChemDraw	19.1	PerkinElmer	Erstellen von Strukturformeln

5.2 Methoden

Für die Entwicklung sowie Testung der Sensorarrays wurden verschiedene Prozesse und Methoden, teils iterativ, verknüpft (Abbildung 7). So wurden zunächst die technischen Prozesse, also das Mikrothermoformen, optimiert. Nach der Charakterisierung der Sensorarrays, sowohl sensorisch als auch biologisch, wurde das System optimiert, worauf die Etablierung der biologischen Funktionsmodelle folgte.

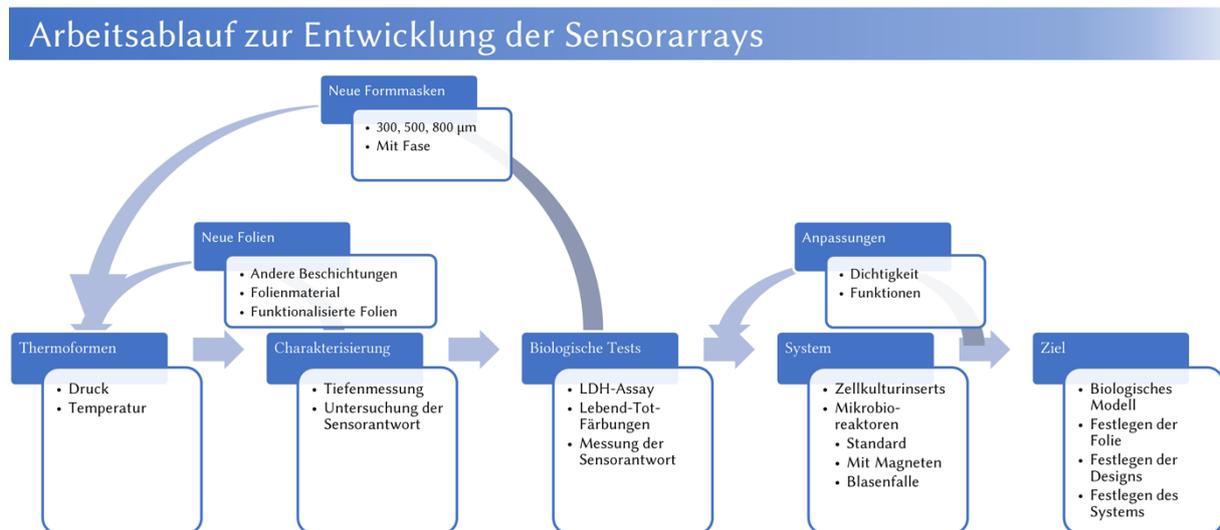


Abbildung 7: Darstellung des Arbeitsablaufs. Grundlage der Arbeit ist das Mikrothermoformen von Sauerstoff-sensitiven Folien. Diese wurde danach hinsichtlich ihrer Formtiefen und der Sensorantwort charakterisiert. Daran anschließend folgte die biologische Validierung, insbesondere Toxizitäts- und Biokompatibilitätstests. Für die Sensorarrays wurden dann geeignete Kultivierungslösungen entwickelt mit dem Ziel der Anwendung in biologischen Modellen. Je nach Ergebnis der einzelnen Arbeitspakete erfolgten mehrere iterative Prozesse, um dem gewünschten Ziel näher zu kommen.

5.2.1 Herstellung und Charakterisierung der Mikrokavitätenarrays

5.2.1.1 Herstellung der Formmasken

Die Standardformmasken (300, 500 und 800 µm) waren bereits in der AG Gottwald vorhanden. Für die neuentwickelten Formmasken mit einer Fase wurden mit Autodesk® Fusion 360™ die Modelle konstruiert und daraus technische Zeichnungen erstellt. Die eigentliche Fertigung erfolgte durch die Werkstätten des KIT (Technik-Haus) durch CNC-Fräsen aus Messingplatten. Die Formmasken wurden mit Hilfe eines Keyence VHX 5000 Digitalmikroskops geprüft. Gesamtaufnahmen der Masken erfolgten mit 20-facher Vergrößerung mit dem Modus „glare reduction“ und der Beleuchtung „full ring“. Die Vermessung der Bohrungen erfolgte mit 200-facher bzw. 500-facher Vergrößerung. Hier wurde mit Hilfe von „Quick Composition and 3D“ eine dreidimensionale Betrachtung ermöglicht, indem das Mikroskop verschiedene Ebenen automatisch fokussierte und eine dreidimensionale Aufnahme anfertigte. Diese wurde durch eine „tilt correction“ ausgerichtet und die Kavitäten ausgemessen.

5.2.1.2 Mikrothermoformen

Das Mikrothermoformen erfolgte in einer am KIT entwickelten Thermoformanlage. Dafür wurden in einem Formwerkzeug zunächst eine Kapton®folie als Schutz eingelegt. Darauf folgte die entsprechende Formmaske sowie die (Sensor-) Folie (kreisförmig mit 40 mm Durchmesser, mit der beschichteten Seite nach oben). Zum Abdichten wurde ein Gummi-O-Ring eingelegt und das Formwerkzeug mit vier Schrauben verschlossen. Alle Einzelteile wurden zunächst durch Abblasen mit Stickstoff gereinigt. Nach Anlegen von Vakuum wurde die Formmaske in der Thermoformanlage (Abbildung 8) auf die Formtemperatur erhitzt. Diese lag für die Formversuche bei 100 – 200 °C, optimalerweise im Bereich der Glasübergangstemperatur der zu formenden Folie. Für das Mikrothermoformen der Sensorfolien SF-RPC2 und SF-RPC3 wurde im Standardprotokoll eine Temperatur von 152,5 °C verwendet. Nach Erreichen der Zieltemperatur wurde die Folie von oben mit Druck beaufschlagt (20 – 22 bar) und unmittelbar nach Erreichen der Zieldrucks in die Vorrichtung zum Abkühlen überführt. Dort wurde das Formwerkzeug mit Hilfe eines Wasserkühlers (20 °C) abgekühlt. Bei 80 °C wurde der Formdruck abgelassen, bei Temperaturen unter 60 °C konnte die Form geöffnet und das Formprodukt entnommen werden. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Kontrolle des Formprozesses.

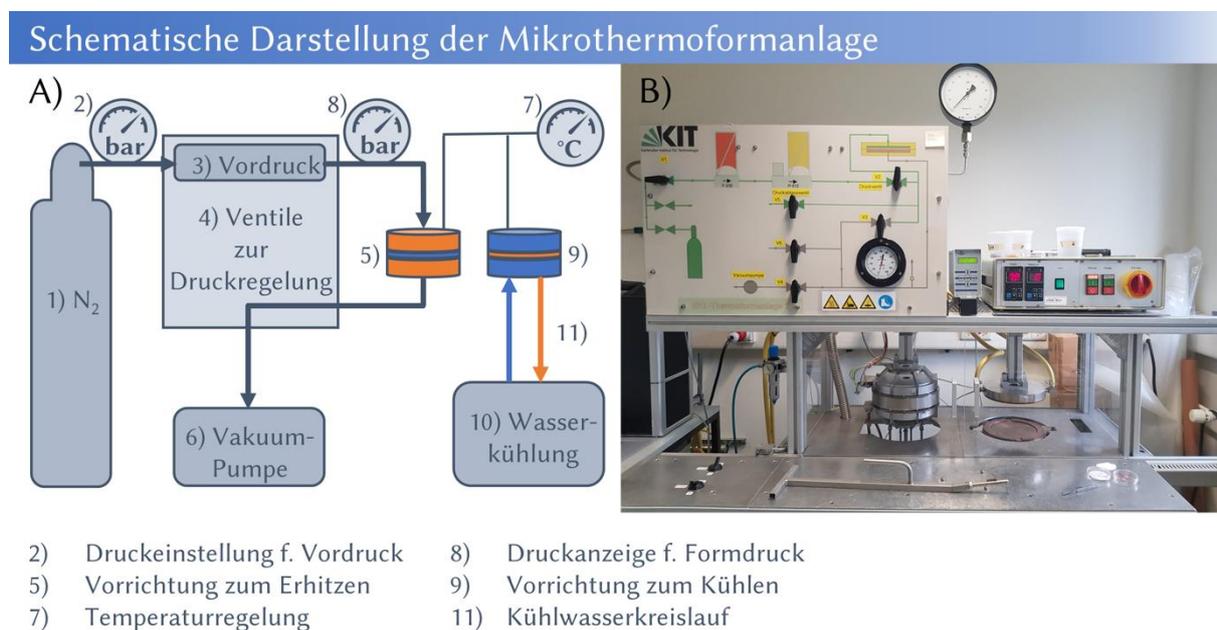


Abbildung 8: Darstellung der Mikrothermoformanlage A) Schematische Darstellung. Mit Hilfe des Stickstoffstroms einer Gasflasche (1) wird zunächst ein Vordruck in einem Gaszylinder aufgebaut (2 und 3). Durch das Bedienfeld mit den Ventilen (4) kann die Vorrichtung zum Erhitzen (5) mit einer Vakuum-Pumpe (6) evakuiert werden. Danach wird die Formmaske in der Vorrichtung zum Erhitzen auf die Formtemperatur gebracht. Diese wird fortlaufend angezeigt (7). Nach Erreichen der Formtemperatur wird der Formdruck angelegt und reguliert (8). Danach wird das Werkzeug in die Vorrichtung zum Kühlen (9) überführt und dort mittels Wasserkühlung (10) und Kühlkreislauf (11) auf die Umgebungstemperatur abgekühlt. B) zeigt die Hauptkomponenten der Anlage, unter anderem das Bedienfeld für die Ventileinstellungen und die Vorrichtungen zum Erhitzen sowie Kühlen.

5.2.1.3 Mikroskopische Kontrolle des Formprozesses

Lichtmikroskopische Kontrolle der Formtiefe

Mit einem Lichtmikroskop (Axioskop FS, Zeiss) wurden die strukturierten Folien hinsichtlich Verschmutzungsgrad sowie eventuell auftretender Formschäden untersucht. Bei Rissbildung wurden die entsprechenden (Sensor-)Arrays nicht weiterverwendet. Die Formtiefen wurden mit Hilfe einer digitalen Messuhr (Mitutoyo Absolute) bestimmt. Hierzu wurde zunächst auf einen Bereich der nicht verformt wurde, also unmittelbar neben den Kavitäten, fokussiert und die Messuhr auf null gesetzt. Anschließend wurde die tiefste Stelle der Kavität fokussiert. Die Differenz entsprach der Formtiefe. Je Formvorgang wurden vier Positionen vermessen, je zwei am Rand des Kavitätenarrays und zwei in der Mitte.

Optische Vermessung der geformten Mikrostrukturen am Digitalmikroskop

Zur genaueren Charakterisierung des Formergebnisses sowie zur Kontrolle der Lichtmikroskopie wurden Stichproben mit einem Digitalmikroskop (Keyence VHX 5000) vermessen. Hierfür wurde der Belichtungsmodus „full ring“ in Kombination mit einer 200-fachen Vergrößerung verwendet. Die Bilder wurden durch den HDR-Modus optimiert und anschließend als „Quick Composition and 3D“ dreidimensional dargestellt. Eine Korrektur erfolgte über die Funktion „tilt correction“.

5.2.1.4 Temperaturversuche

Zur Untersuchung der Temperaturstabilität der Fluorophore wurde die Sensorantwort von Sensorfolien (SF-RPC2, 40 mm Durchmesser) im Inkubator (5 % CO₂, 37 °C) gemessen. Hierfür wurden jeweils zwei Bilder an jeweils drei unterschiedlichen Positionen mit dem VisiSens-System aufgenommen (Gain 20, 1,5 s Belichtung). Anschließend wurden die Folien in der Thermoformanlage unterschiedlichen Temperaturen im Bereich von 50 – 200 °C ausgesetzt, jedoch ohne Formdruck. Nach der Temperaturbehandlung wurden erneut, unter gleichen Bedingungen wie zuvor, Bilder aufgenommen. Mit der Software CellProfilerTM wurden anschließend als Maß für die Temperaturstabilität die Intensitäten des Rot- und des Grün-Kanals gemessen und das Verhältnis des Sensorfluorophors (rot) zum Referenzfluorophor (grün) nach der Temperaturbehandlung im Vergleich zu vorher ermittelt.

5.2.2 Allgemeine Zellkultur

5.2.2.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Die Kultivierung adhärenter Zellen erfolgte unter Standardbedingungen (5 % CO₂, 37 °C) in Polystyrol-Zellkulturflaschen/-platten.

HepG2, humane Leberkarzinomzelllinie

HepG2-Zellen wurden in unbeschichteten T75-Flaschen (Wachstumsfläche 75 cm²) in HepG2-Medium kultiviert. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt. Die Passage erfolgte alle vier bis sieben Tage, sobald die Zellen konfluent waren, im Verhältnis 1:2 bis 1:4. Für das Passagieren wurden die Zellen mit 5 ml 1x PBS^{-/-} gewaschen und zum Ablösen mit 1 ml Trypsin-EDTA für 5 min inkubiert. Die Zellen wurden mit einer 1 ml Glaspipette durch 20-faches Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Zum Abstoppen der Trypsinierung wurden danach 9 ml HepG2-Medium hinzugegeben und das entsprechende Volumen (5 ml bei einem Verhältnis von 1:2, 2,5 ml bei einem Verhältnis von 1:4) in eine neue Zellkulturflasche überführt. Es wurde auf 12 ml HepG2-Medium aufgefüllt.

Falls sich größere Zellaggregate gebildet hatten oder auch für das Aussäen in (Sensor-)Arrays wurde nach dem Abstoppen der Trypsinierung die Zellsuspension auf einen 40 µm Zellsieb gegeben, um eine homogene Einzelzellsuspension zu erreichen.

Hela, humane Zervixkarzinomzelllinie

Hela-Zellen wurden in unbeschichteten T75-Flaschen (Wachstumsfläche 75 cm²) in Hela-Medium kultiviert. Die Passage erfolgte alle drei bis fünf Tage in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:10. Für das Passagieren wurde mit 5 ml 1x PBS^{-/-} gewaschen und zum Ablösen mit 1 ml Trypsin-EDTA für 5 min inkubiert. Zum Abstoppen der Trypsinierung wurden danach 9 ml Hela-Medium hinzugegeben und das entsprechende Volumen in eine neue Zellkulturflasche überführt. Es wurde auf 12 ml Hela-Medium aufgefüllt.

P19-Zellen, murine pluripotente Zellen

Die verwendeten Zellkulturschalen wurden mit Gelatinelösung beschichtet. Dazu wurden für 55 mm Petrischalen 2,5 ml Gelatinelösung (0,2 % (w/v)) verwendet und über Nacht bei 4 °C gelagert. Für die Passage wurde das Medium abgenommen, 2 ml Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben und für 3 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Vorgang mit 3 ml Expansionsmedium gestoppt. Die Suspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen, in das 2 ml Expansionsmedium vorgelegt wurden, überführt und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 6 ml Expansionsmedium resuspendiert. Danach wurde von den beschichteten Petrischalen die Gelatinelösung abgesaugt und die Zellen

1:2 oder 1:3 verdünnt und in insgesamt 6 ml Expansionsmedium in diese überführt und weiter kultiviert. Die Zellen wurden täglich passagiert. Zur Differenzierung der P19-Zellen wurden diese nach einem adaptierten Differenzierungsprotokoll in P19-Differenzierungsmedium in die Sensorarrays ausgesät (siehe 5.2.5.3).

Stammzell-abgeleitete Kardiomyozyten

Die Kardiomyozyten-Sphäroide wurden bei Raumtemperatur in 50 ml Zentrifugenröhrchen in 50 ml RB⁺-Medium verschickt. Die Versanddauer betrug maximal 24 Stunden. Bei Ankunft wurden die Zellen in Zellkultur-Erlenmeyerkolben überführt und unter Standardbedingungen (5 % CO₂, 37 °C) kultiviert. Zur Verwendung wurde ein Teil der Sphäroid-Suspension entnommen und das Medium entsprechend des entnommenen Volumens aufgefüllt. Eine Passage oder ein Mediumwechsel waren nicht notwendig, da die Zellen innerhalb einer Woche nach dem Erhalt verwendet wurden.

5.2.2.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Cryovials mit 1-2 ml Zellsuspension wurden zunächst im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Unmittelbar danach wurde die Zellsuspension in 9 ml entsprechendem Zellmedium aufgenommen und bei 230 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 12 ml entsprechendem Zellmedium aufgenommen und zur Weiterkultivierung in eine T75-Flasche überführt.

Das Einfrieren erfolgte mit Zellmedium, versetzt mit 10 % DMSO. Nach Resuspendieren der gewünschten Zellzahl (i.d.R. 1×10^6) wurden die Cryovials mit der Zellsuspension konstant mit 1 °C/min auf -80 °C abgekühlt und danach zur Lagerung in eine -150 °C-Truhe überführt.

5.2.2.3 Beschichtung

Für die Kultivierung der Zellen auf PC- bzw. Sensorfolien, mussten diese mit Kollagen beschichtet werden. Hierfür wurde zunächst Kollagen in 0,2 % (v/v) Essigsäure gelöst (2 mg/ml). 18 µl der Kollagenlösung wurden mit 132 µl sterilem Wasser verdünnt und direkt in ein Well eines sticky slides (ibidi®) bzw. in ein CellCrownTM-Insert gegeben. Es wurde eine Stunde im Inkubator (37 °C) bzw. über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde zweimal mit PBS^{+/+} gewaschen.

5.2.3 Kultivierung der Zellen in sticky slides und CellCrownTM-Inserts

Zum Test der Folien und auch für die späteren LDH-Assays sowie Lebend-Tot-Färbungen wurden Hela- und HepG2-Zellen auf planaren (Sensor-)Folien kultiviert. Für die Testreihen mit CellCrownTM-Inserts wurden Folien mit einem 16 mm Durchmesser ausgestanzt, in 70 % Isopropanol desinfiziert und nach dem Trocknen in die Inserts eingelegt. Hier konnte bei Bedarf

mit Kollagen beschichtet werden. Danach wurden, wie in Abbildung 9 dargestellt, zunächst 600 µl Medium in das Well vorgelegt und die Luftblase unterhalb der Folie entfernt. Danach wurde das Medium bis auf das Niveau der Inserts wieder abgesaugt. Die Zellsuspension wurde bei Bedarf zentrifugiert (230 g, 5 min) und die gewünschte Zellzahl in 50 µl Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl Medium auf die Folie pipettiert und für 15-45 min. inkubiert. Zuletzt wurden innerhalb des Inserts 550 µl und im Well 400 µl Medium hinzugefügt, sodass das Gesamtvolumen 1200 µl betrug.

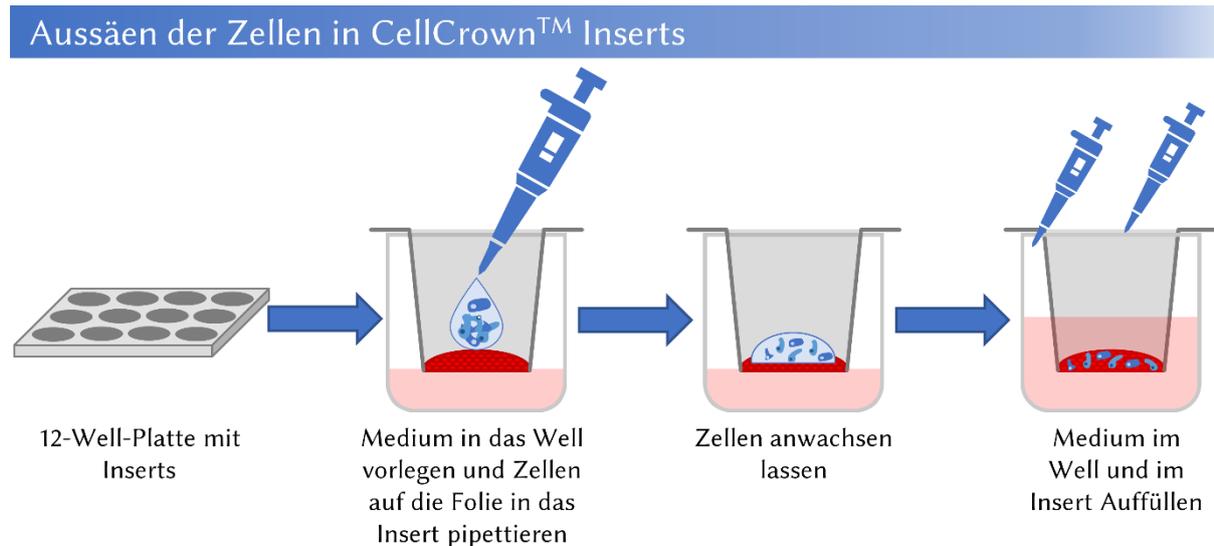


Abbildung 9: Aussäen der Zellen auf die Testfolien, fixiert in den CellCrown™ Inserts in einer 12-Well-Platte.

Für die sticky slides wurden Folien auf 26 x 76 mm zugeschnitten und in 70 % Isopropanol desinfiziert. Nach vollständigem Trocknen wurden die Folien (mit der Sensorseite zu den Wells ausgerichtet) auf die Unterseite der sticky slides geklebt und dort, sofern notwendig, mit Kollagen beschichtet. Die Zellsuspension wurde bei Bedarf zentrifugiert (230 g, 5 min) und die gewünschte Zellzahl in 300 µl Medium resuspendiert. 300 µl der Zellsuspension wurden direkt in jedes Well gegeben und danach für die weiteren Versuche inkubiert.

5.2.4 Hanging Drop Kulturen

Für die Hanging Drop Kulturen wurden in die Deckel von 10 cm-Petrischalen 49 Tropfen (7 x 7) mit je 25 µl Zellsuspension ($2,5 \times 10^4$ HepG2-Zellen/ml) aufgetragen. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurde Phenolrot-freies HepG2-Medium verwendet. In den Boden der Petrischale wurden 5 ml 1x PBS^{-/-} vorgelegt, um ein Austrocknen der Tropfen zu verhindern. Danach wurde der Deckel auf die Petrischale aufgelegt und unter Standardbedingungen kultiviert.

5.2.5 3D-Zellkultivierung in (Sensor-)Arrays

5.2.5.1 *BIOFLOAT™-Beschichtung*

Die BIOFLOAT™-Beschichtung wurde, ausgehend vom Herstellerprotokoll, für die Beschichtung der Sensorarrays optimiert. Daher wurden verschiedene Varianten verwendet.

Variante 1: Isopropanolreihe & Vakuum-Adapter

Zunächst wurden die (Sensor-)Arrays mit einer Isopropanolreihe (100, 70, 50 und 30 % Isopropanol) desinfiziert und entlüftet, indem die Arrays nacheinander für jeweils mindestens 10 Sekunden in die jeweilige Lösung eingetaucht wurden. Anschließend wurden sie in die CellCrown™-Inserts eingelegt und diese in einer 12-Well-Platte fixiert. Danach wurden in das Insert, direkt auf die (Sensor-)Arrays, 300 µl BIOFLOAT™-Lösung pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und die beschichteten Oberflächen für mind. 30 min unter der Sterilbank getrocknet. Um die Mikrokavitäten wieder zu entlüften wurden dann 500 µl Zellkulturmedium oder PBS^{-/-} auf die (Sensor-)Arrays und 600 µl Zellkulturmedium oder PBS^{-/-} in das Well gegeben und die Luftblasen durch Anlegen eines Unterdrucks mit Hilfe des Vakuum-Adapters (Abbildung 42) entfernt.

Variante 2: 70 % Isopropanol & Vakuum-Adapter

Hierfür wurden die (Sensor-)Arrays in 70 % Isopropanol desinfiziert. Anschließend wurden diese komplett getrocknet, in CellCrown™-Inserts eingelegt, in einer 12-Well-Platte fixiert und nach Hinzufügen von 300 µl BIOFLOAT™ mit Hilfe des Vakuum-Adapters entlüftet. Der weitere Beschichtungsprozess erfolgte analog zu Variante 1.

Variante 3: 70 % Isopropanol & Zentrifugation

Hierfür wurden die (Sensor-)Arrays in 70 % Isopropanol desinfiziert. Anschließend wurden diese komplett getrocknet, in CellCrown™-Inserts eingelegt, in einer 12-Well-Platte fixiert und 300 µl BIOFLOAT™ hinzugefügt. Das Entlüften erfolgte dann durch Zentrifugation für 1 min bei 300 g. Dabei konnte es vorkommen, dass die Beschichtungsreagenzien in das Well geflossen sind. In diesem Fall wurden weitere 200 µl BIOFLOAT™ direkt auf das (Sensor-)Array gegeben. Der weitere Beschichtungsprozess erfolgte analog zu Variante 1.

5.2.5.2 *Kollagen-Beschichtung*

Für die Kollagen-Beschichtung wurden die (Sensor-)Arrays zunächst mit einer Isopropanolreihe (100, 70, 50, 30 und 0 % Isopropanol) desinfiziert und entlüftet, indem die Arrays nacheinander für jeweils mindestens 10 Sekunden in die jeweilige Lösung eingetaucht wurden. Anschließend wurden sie in die CellCrown™-Inserts eingelegt und diese in einer 12-Well-Platte fixiert.

Danach wurden in das Insert, direkt auf die (Sensor-)Arrays, 18 µl Kollagenlösung (2 mg/ml in 0,2 % (v/v) Essigsäure) verdünnt mit 132 µl sterilem Wasser gegeben und für 1 h im Inkubator bzw. über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS^{+/+} gewaschen.

5.2.5.3 Aussäen der Zellen auf beschichtete (Sensor-)Arrays

Zum Aussäen der Zellen auf Kollagen- bzw. BIOFLOATTM-beschichtete (Sensor-)Arrays wurde zunächst sämtliche Flüssigkeit innerhalb des Inserts abgenommen. Im Well wurde die Flüssigkeit so weit entfernt, dass sich keine Luftblase unterhalb der Folie bildete. Der verbleibende Rest hatte ein Volumen von 200 µl. Anschließend wurde die gewünschte Zellzahl in 40 bis 60 µl Zellkulturmedium resuspendiert, direkt auf das Array pipettiert und für 15 bis 45 Minuten inkubiert. Sollte der Tropfen direkt verlaufen, wurde direkt Medium ergänzt. Ansonsten wurde nach der Inkubation im Insert auf 600 µl mit Medium aufgefüllt, im Well wurden 400 µl ergänzt. Das Gesamtvolumen betrug 1200 µl. Die Zellen wurden dann bis zum Versuch inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

5.2.6 Färbungen

Zur Visualisierung der Zellen in den (Sensor-)Arrays wurden drei verschiedene Färbemethoden eingesetzt. Für Lebend-Tot-Färbungen wurde die SYTOTM16-Färbung, für die lebenden Zellen, mit der Propidiumiodid-Färbung, für die toten Zellen, kombiniert.

5.2.6.1 SYTOTM16-Färbung

Die SYTOTM16-Färbung erfolgte in bereits ausgesäten Zellen bzw. Sphäroiden. Hierfür wurde die Stammlösung (1 mM in DMSO) 1:200 (für Sphäroide) bis 1:1000 (für 2D-Kulturen) auf eine 1 – 5 µM Arbeitskonzentration in Zellkulturmedium verdünnt. Nach der Färbung (30-45 min bei 37 °C) wurde das Färbemedium abgenommen und durch Zellkulturmedium ersetzt.

5.2.6.2 Propidiumiodid-Färbung

Die Propidiumiodid-Färbung konnte parallel zur SYTOTM16-Färbung in derselben Zellsuspension erfolgen. Zum Färben wurde dann zusätzlich zu SYTOTM16 noch Propidiumiodid hinzugegeben. Hierfür wurde die 1,5 mM (1 mg/ml) Propidiumiodid-Stammlösung 1:500 (für Sphäroide) bis 1:1500 (für 2D-Kulturen) auf eine 0,33 – 1 µM Arbeitskonzentration verdünnt.

5.2.6.3 CellTrackerTM Green-Färbung

Die Zellen wurden vor dem Aussäen mit CellTrackerTM Green (CTG) gefärbt. Hierfür wurden die Zellen gezählt, die gewünschte Zellzahl bei 230 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Zellkulturmedium resuspendiert (bis zu 1 x 10⁶ Zellen/ml). Gefärbt wurde mit 10 µM CTG (Stammlösung 10 mM in DMSO, 1:1000 verdünnt) für 30 min im Inkubator. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS^{+/+} gewaschen, danach in

Zellkulturmedium aufgenommen und schließlich ausgesät. Alternativ konnte mit CTG auch in Monolayern gefärbt werden, hierfür wurde die Färbelösung direkt auf die Zellkultur gegeben und nach 30 min wurde zweimal mit Medium gewaschen.

5.2.7 Mikroskopie

Für einfache mikroskopische Betrachtungen im Routinebetrieb wurde ein inverses Lichtmikroskop (AxioVert.A1, Zeiss, mit Filter für Fluoreszenzbetrachtungen) eingesetzt. Um Zellen/Sphäroide genauer auswerten zu können, wurde ein inverses konfokales Laser Scanning Mikroskop (SP5, Leica) sowie ein Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer.Z1, Zeiss) verwendet.

5.2.7.1 Lichtmikroskopie

Die Betrachtung der Zellen/Sensorarrays sowie die Routinearbeiten mit Zellen (Zählen, Wachstumskontrollen) erfolgte mit einer 50 bis 200-fachen Gesamtvergrößerung an einem inversen Lichtmikroskop.

5.2.7.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (cLSM)

Bei der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie wird jeweils nur eine Fokusebene punktuell bestrahlt und durch das Scannen kann so Ebene für Ebene dargestellt werden, was dreidimensionale Betrachtungen, sog. z-Stacks, der Zellen/Sphäroide ermöglicht. Durch Verwendung verschiedener Anregungswellenlängen der Laser in Verbindung mit einem festgelegten Bereich der Emission, können mehrere Fluorophore gleichzeitig betrachtet werden. Für Lebend-Tot-Färbungen wurde hier der Modus „Sequential Scan“ verwendet, um zunächst das SYTO™16-Signal und danach das Propidiumiodidsignal zu messen.

Tabelle 19: Verwendete Parameter für die einzelnen Farbstoffe. *Anfangs wurde Propidiumiodid mit 514 nm angeregt, dies wurde dann auf 561 nm korrigiert.

Farbstoff	Anregungswellenlänge / nm	Emissionsbereich / nm	Laser	Laser / %
SYTO™16	488 nm	492 – 563 nm	Argon	30 % Laserleistung und 20-25 % Laser Line 488
CellTracker™ Green	488 nm	492 – 563 nm	Argon	30 % Laserleistung und 20-25 % Laser Line 488
Propidiumiodid	514 nm 561 nm*	593-655	Diode	20 % Laser Line 514 30% Laser Linie 561

Die Signalverstärkung (Gain) sowie die Einstellung des Offsets wurden den Aufnahmen jeweils angepasst, da es gerade durch die Sensorfolie hier zu Abweichungen kommen konnte. Aufnahmen wurden mit einem 10-fach Objektiv (HC PL FLUOTAR 10.0x0.30 DRY)

aufgenommen, da für andere Objektive der Arbeitsabstand zu groß war. Für Detailaufnahmen der Kavitäten wurde ein 2-fach Digitalzoom eingesetzt.

Der Pinhole-Durchmesser betrug bei allen Aufnahmen 70,72 μm . Die Auflösung betrug 512 x 512 für einfache Auswertungen bzw. 1024 x 1024 Pixel für Aufnahmen für Abbildungen. Für Detailbetrachtungen der Sphäroide wurde eine Z-Schrittweite (Tiefe) von 2,39 μm , für Betrachtungen der gesamten Kavitäten bis zu 10 μm verwendet. Der Line Average war 2, um Bildfehler zu minimieren. Die Scangeschwindigkeit lag bei 200 Hz. Die jeweils verwendeten Eigenschaften wurden bei den Abbildungen vermerkt.

5.2.7.3 Inverses Fluoreszenzmikroskop

Als Alternative zum cLSM stand ein Zeiss Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer.Z1, Zeiss) zur Verfügung, das vor allem auch für die Aufnahmen der Kardiomyozyten verwendet wurde. Dieses Mikroskop bot den Vorteil, dass es schnellere Aufnahmen ermöglicht, was zur Beobachtung der Schlagfrequenz notwendig war. Für die Mikroskopie der fluoreszierenden Proteine der Kardiomyozyten sowie der SYTOTM16- bzw. PI-Färbungen, wurden entsprechende Filtersets verwendet. Es wurde ein 10x-Objektiv (EC Plan-Neofluar 10x/0.3 Ph1) verwendet. Das Mikroskop verfügte über die Möglichkeit automatisch verschiedene Fokusebenen aufzunehmen (Z-Stacks). Hierfür wurden Schrittweiten von 3,78 bis 10 μm verwendet. Die Belichtungszeit wurde für die einzelnen Proben automatisch angepasst.

Tabelle 20: Übersicht über die Leuchtmittel, Anregungswellenlängen, Emissionsbereiche sowie eingesetzten Filter.

Farbstoff	Anregungs- wellenlänge / nm	Emissionsbereich / nm	Lichtquelle / Intensität	Filter
Grün (SYTO TM 16, CTG, GCaMP6f)	470 nm	500 – 550 nm	Colibri.2 LED / 58,32 %	38 HE Green Fluorescent Prot
Rot (Propidiumiodid, RedStar _{nuc})	555 nm	570 - 640	Colibri.2 LED / 58,32 %	43 HE DsRed
Hellfeld	-	-	6,10 V	81 HE DAPI/FITC/ Rh/Cy5

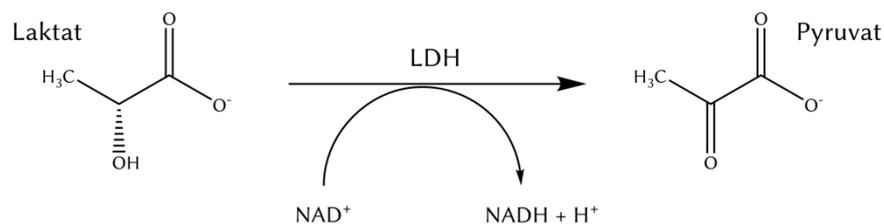
5.2.8 LDH-Assay

Zur Bestimmung der freigesetzten Laktatdehydrogenase (LDH)-Menge, um Rückschlüsse auf den Anteil abgestorbener Zellen ziehen zu können, wurde das Cytotoxicity Detection Kit (LDH) von Roche verwendet. Hierbei handelt es sich um einen kolorimetrischen Assay, der auf der Messung der LDH-Aktivität, die durch die Schädigung der Plasmamembran in das Medium

freigesetzt wird, beruht. Das Enzym kommt in allen Zelltypen vor, daher korreliert die Menge des freigesetzten Enzyms mit der Anzahl toter Zellen. Im Detail wird bei diesem Assay der Zellkulturüberstand als Probe genommen und mit den Reagenzien des Kits versetzt. Die Reaktion (Abbildung 10) besteht aus zwei Schritten. Im ersten Schritt wird durch die LDH Laktat zu Pyruvat umgesetzt, wodurch NADH/H^+ gebildet wird. Im zweiten Schritt katalysiert eine Diaphorase den Protonentransfer von NADH/H^+ auf das Tetrazoliumsalz 2-[4-Iodphenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid (INT), dass hierdurch zum roten Formazansalz reduziert wird.[194] Dieses hat ein Absorptionsmaximum zwischen 500 und 550 nm.

Reaktionsgleichung des LDH-Assays

1. Schritt



2. Schritt

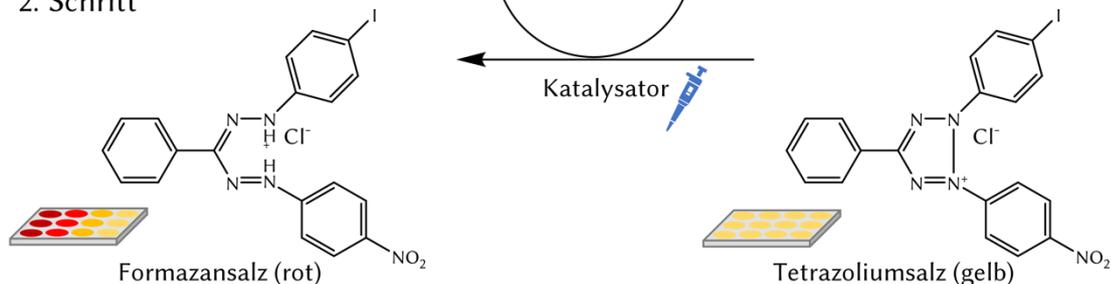


Abbildung 10: Reaktionen des LDH-Assays, in deren Verlauf das rote Formazansalz gebildet wird [194].

Ausgehend vom Standardprotokoll [194] wurde der LDH-Assay für die Biokompatibilitätsuntersuchungen, auch in 3D, adaptiert. Hierfür wurden drei Varianten entwickelt.

5.2.8.1 LDH-Assay in CellCrown™ – Variante 1

Hierfür wurden (Sensor-)Folien bzw. (Sensor-)Arrays in CellCrown™-Inserts eingelegt und HepG2- bzw. Hela-Zellen darin ausgesät (siehe auch 5.2.3). Für die Untersuchung planarer Folien wurden diese zunächst nach dem Standardprotokoll mit Kollagen beschichtet. Es wurde entsprechendes Zellkulturmedium ohne Phenolrot verwendet. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 1150 μl . Alle 24 Stunden wurde das gesamte Medium abgenommen und durch neues ersetzt. Die genommene Probe wurde für 5 min bei 500 g zentrifugiert, um eventuell vorhandene Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde danach abgenommen, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Auswertung bei 4 °C gelagert. Nachdem nach 96 Stunden die letzte Probe genommen wurde, wurden 1150 μl 2 %ige Triton X-100-Lösung (in Phenolrot-

freiem Zellkulturmedium) auf die verbliebenen Zellen gegeben und für mindestens 30 min inkubiert, um alle Zellen zu lysieren. Dies diente als Referenzwert für die Gesamtzellzahl. Danach wurde auch diese Probe bei 500 g für 5 min zentrifugiert.

Zur Durchführung des Assays wurden von den 24, 48, 72 bzw. 96 Stunden-Proben jeweils 100 µl in zwei bzw. drei Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Probe der Gesamtzellzahl wurde 1:10 verdünnt und davon ebenfalls 100 µl in zwei bzw. drei Wells pipettiert. Als Kontrolle diente Zellkulturmedium ohne Phenolrot. Anschließend wurde der Katalysator des Kits 1:46 mit der Färbelösung verdünnt und mit Hilfe einer Mehrkanalpipette wurden jeweils 100 µl zu den Proben gegeben. Der Ansatz wurde für 15 bis max. 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Eventuell auftretende Luftblasen mussten mit Hilfe einer heißen Nadel entfernt werden. Die Absorptionsmessung erfolgte dann bei 460 nm und 600 nm. Der Hintergrundwert bei 600 nm wurde vom Messwert bei 460 nm abgezogen. Anschließend wurde der Hintergrundwert des Mediums von den Messwerten subtrahiert. Die Werte der Duplikate bzw. Triplikate wurden gemittelt. Zur Ermittlung der Gesamt-LDH-Menge wurden dann sämtliche Einzelwerte (24-96 Stunden-Werte) zu den Werten der lysierten Zellen am Ende addiert. Der prozentuale LDH-Anteil zu den einzelnen Zeitpunkten ergab sich dann durch den Anteil der LDH-Menge der Zeitpunkte an der Gesamt-LDH-Menge. Die Werte mehrerer unabhängiger Ansätze wurden gemittelt.

5.2.8.2 LDH-Assay in CellCrownTM – Variante 2

Aufgrund der hohen Abweichungen wurde das Protokoll angepasst, indem für jeden einzelnen Zeitpunkt ein Insert/Well vorbereitet wurde. Nach der Probennahme zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die verbliebenen Zellen lysiert und dienten der Berechnung der Gesamt-LDH-Menge des Ansatzes. Die Verarbeitung der Proben, Lyse sowie die Durchführung und Auswertung des Assays erfolgte ansonsten analog zur Variante 1.

5.2.8.3 LDH-Assay in sticky slides (ibidi®)

Für die Durchführung des LDH-Assays in sticky slides (ibidi®) wurden die zu testenden Folien auf 26 x 76 mm zugeschnitten und zweimal für 30 s in 70 % Isopropanol desinfiziert. Anschließend wurde mit ddH₂O gewaschen. Nach Trocknen der Folien wurden sie auf die Unterseite der 8-Well sticky slides geklebt. Die Kollagen-Beschichtung erfolgte nach dem Standardprotokoll (5.2.2.3). Anschließend wurde die benötigte Zellzahl in 300 µl Zellkulturmedium ausgesät. Alle 24 Stunden wurden Proben genommen. Dazu wurde das Medium abgenommen, zentrifugiert (500 g, 5 min), der Überstand in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 1:4 verdünnt und im Kühlschrank gelagert. Unmittelbar nach der Probennahme wurden zur

Bestimmung der Gesamt-LDH-Menge die verbliebenen Zellen mit 2 % Triton X-100 (in Phenolrot-freiem Zellkulturmedium) für mind. 30 min bei 37 °C lysiert, zentrifugiert (500 g, 5 min), der Überstand in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 1:20 verdünnt und im Kühlschrank gelagert. Die Durchführung des Assays erfolgte dann analog zu 5.2.8.1.

5.2.9 Einfluss von Isoprenalin auf die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten

Hierfür wurden die im Bioreaktor hergestellten Kardiomyozyten-Aggregate der MHH verwendet. 100 µl der Suspension wurden in eine 96-Well-Platte gegeben. Danach wurden die Aggregate mit 0,01 µM bzw. 0,1 µM Isoprenalin behandelt und unmittelbar nach Zugabe wurden einminütige Zeitserien mit dem Fluoreszenzmikroskop (AxioObserver.Z1, Zeiss) aufgenommen. Durch Intensitätsänderungen der grünen Fluoreszenz konnte die Schlagzahl bestimmt werden. In Proof-of-Concept-Versuchen wurde zudem an Kardiomyozyten-Aggregaten, die in den Mikrokavitäten generiert wurden, die Auswirkung von Isoprenalin gezeigt, indem dieses direkt in die Inserts gegeben und der genetisch-codierte Calciumindikator ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch betrachtet wurde.

5.2.10 Sauerstoffmessung – VisiSens TD

Für die Sauerstoffmessungen wurde das VisiSens TD-System der Firma PreSens Precision Sensing GmbH (Regensburg) verwendet. Das System basiert auf der dynamischen Fluoreszenzlöschung und verwendet zur Sauerstoffmessung eine ratiometrische Kalibrierung, die auf unterschiedlichen Emissionswellenlängenbereichen des Sauerstoff-sensitiven Fluorophors, im roten Bereich, und einem Referenzfluorophor, im grünen Bereich, basiert. Während die Fluoreszenzintensität des Sensorfluorophors abhängig von der Sauerstoffkonzentration ist, ist die Intensität des Referenzfluorophors konstant. Im VisiSens-System werden beide Fluorophore mit blauem Licht angeregt, emittieren wie beschrieben aber in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen. Der RGB-Farbchip des im System integrierten USB-Mikroskops kann dadurch das Sensor- und Referenzsignal erfassen und in einem Bild darstellen. Die Auswertung erfolgt später durch Trennung des Bildes in die einzelnen Farbkanäle und Ermittlung eines Intensitätsverhältnisses von rot zu grün. Durch die zeitgleiche Aufnahme des Referenzsignals war es möglich störende Einflüsse, wie inhomogene Belichtung oder unterschiedliche Farbstoffkonzentrationen, bspw. durch das Verstrecken während des Thermoformens, auszuschließen. Um von dem rot-grün-Verhältnis (ratio, R) auf die Sauerstoffkonzentration schließen zu können, musste eine Kalibrierung durchgeführt werden.

5.2.10.1 Kalibrierung

Es wurde eine Zwei-Punkt-Kalibrierung durchgeführt. Ein Punkt liegt bei einer 100 % Sauerstoffsättigung des Mediums, ein zweiter bei 0 % Sauerstoff. Diese sind nachfolgend als 100 % bzw. 0 %-Wert bezeichnet. Das Thermoformen Sauerstoff-sensitiver Folien erfolgte mit Folien mit einem Durchmesser von 40 mm. Das eigentliche Sensorarray hatte einen Durchmesser von 16 mm. Die verbleibenden Randbereiche wurden zur Kalibrierung verwendet. Dadurch konnten für jede Charge Kalibrierwerte erhalten werden, was die Genauigkeit erhöhte. Das Folienstück wurde zur Kalibrierung in eine 55 mm-Petrischale gelegt und im Inkubator auf dem VisiSens TD platziert. Es wurde ein Tropfen (100 µl) ddH₂O auf die Oberseite der Sensorfolie gegeben und, sobald die Versuchsparameter (5 %CO₂, 37 °C) im Inkubator erreicht waren, für mindestens 5 min äquilibriert. Danach wurde ein Bild aufgenommen. Die Signalverstärkung (Gain) musste hierfür mit der des späteren Versuchs übereinstimmen, i.d.R. Gain = 20. Die Belichtungszeit wurde für die einzelnen Folien optimiert und lag i.d.R. zwischen 5 und 15 Sekunden. Neben einem 100 %-Wert bei 5 % CO₂, wurden auch 100 %-Werte ohne zugesetztes CO₂, also mit ca. 0,04 % CO₂ der Umgebungsluft, gemessen. Diese dienten der Auswertung der Mito Stress bzw. Mito Complex Assays und wurden im Folgenden als 0 % CO₂ bezeichnet. Der 0 %-Kalibrierwert wurde aufgenommen, indem ein Tropfen (100 µl) einer 10 mg/ml Natriumsulfitlösung auf die Folie gegeben und gemessen wurde. Das Natriumsulfit wird durch gelösten Sauerstoff zu Natriumsulfat oxidiert, wodurch Sauerstoff in der Lösung entfernt wird. Mit Hilfe der VisSens Scientific 1-Software wurden aus den 100 % und 0 % Sauerstoffwerten die R-Werte für diese beiden Kalibrierpunkte gemessen. Bei diesen R-Werten handelt es sich um das Verhältnis (Ratio) der Fluoreszenzintensität des Rot-fluoreszierenden Sensorfarbstoffes zur Fluoreszenzintensität des Grün-fluoreszierenden Referenzfarbstoffes. Für die Bestimmung des R-Wertes wurden zunächst die Bilder der Kalibrierung geladen. Anschließend wurden jeweils gleichmäßig ausgeleuchtete Bereiche markiert, um die R-Werte für 0 % bzw. 100 % Sauerstoff zu messen. Die Software erstellte zudem eine Datei mit diesen Werten, die den Material-Faktor (A) sowie die Stern-Volmer-Konstante (K_{SV}) enthielt. Durch eine adaptierte Stern-Volmer-Gleichung konnte durch die 2-Punkt-Kalibrierung aus den gemessenen Verhältniswerten (Ratio) die Sauerstoffkonzentration berechnet werden.

Formel 3: Adaptierte Stern-Volmer-Gleichung zur Berechnung der Sauerstoffkonzentration.

$$pO_2 = \frac{R_0 - R}{K_{SV} * ((A - 1) * R_0 + R)}$$

R ₀	Intensitätsverhältnis (Ratio) bei 0 % Sauerstoff (10 mg/ml Natriumsulfit)
R	Intensitätsverhältnis
A	Material-Faktor
K _{SV}	Stern-Volmer-Konstante, berechnet aus den Kalibrierdaten

5.2.10.2 *Einstellung der Belichtungszeit und Aufnahmen*

Die Belichtung musste für die einzelnen Sensorarrays angepasst werden, da diese teilweise durch beschichtungstechnische Vorgänge unterschiedliche Konzentrationen der Fluorophore enthielten und lag zwischen 6 und 19 s. Der Gain durfte nicht verändert werden, weil dadurch die Kalibrierdaten nicht mehr anwendbar gewesen wären. Mit Hilfe der Software konnten dann Einzelaufnahmen, sog. Snapshots, oder auch Zeitserien aufgenommen werden. Für Langzeitbetrachtungen der Kultivierungsvorgänge verschiedener Zellen, wurden Zeitserien mit Aufnahmen im Abstand von 20 bis 60 min aufgenommen.

5.2.11 *Auswertung der Sauerstoffmessung*

Zur Auswertung der Sauerstoffmessungen wurden drei verschiedene Methoden verwendet.

5.2.11.1 *VisiSens ScientifiCal 1*

Nach Abschluss der Messreihe konnten die Zeitserien in VisiSens ScientifiCal 1 geladen werden. Im Datenordner hinterlegte Kalibrierdateien wurden automatisch erkannt und angewandt. In den erzeugten 2D-Darstellungen konnten dann anschließend manuell ROIs eingezeichnet und gemessen werden. Die weitere Datenverarbeitung, also die Auswertung der Kurven der einzelnen ROIs erfolgte über Excel.

5.2.11.2 *VisiSens Live MITOS*

Als Ergänzung zur ersten Methode diente das Plug-In Live MITOS, das es ermöglichte während der Messung bereits verschiedene ROIs auszuwerten. Diese wurden zu Beginn der Messreihe automatisch erkannt. Da es jedoch, insbesondere bei den Mito Stress Tests, häufiger zu einem Shift, also zu leichten Verschiebungen der Sensorarrays während der Messreihe kam, war die Messung nicht zuverlässig. Daher mussten nach Abschluss der Messreihe die Bilder in Teilserien unterteilt werden, in denen kein Shift zu sehen war. Danach mussten diese Teil-Serien einzeln mit Hilfe des Plug-Ins ausgewertet werden. Die weitere Datenverarbeitung und Auswertung erfolgten danach in Excel.

5.2.11.3 *CellProfiler™*

Um die Nachteile der vorherigen Methoden – das manuelle Einzeichnen der ROIs bei der ScientifiCal 1 bzw. die Fehleranfälligkeit durch Shifts des Live MITOS Plug-ins – auszugleichen, wurde eine dritte Methode mit Hilfe der Open Source Software CellProfiler™ etabliert. Hierbei wurde durch mehrere Iterationen eine Pipeline (Abbildung 68) definiert, die verschiedene Module von CellProfiler™ nutzte, um automatisch ROIs zu definieren und die R-Werte daraus berechnen zu können. Für die Durchführung wurde zunächst diese Pipeline und dann der zu untersuchende Datensatz in CellProfiler™ geladen. Die Datenausgabe erfolgte als .csv Datei,

die in Excel weiterverarbeitet wurde. Hierfür wurden die R-Werte mit Hilfe der Formel 3 in Sauerstoffkonzentrationen umgerechnet. Da CellProfiler™ je nach Belichtung einzelne Kavitäten teilweise nicht erkannte, wurde in Excel außerdem jeder Datenpunkt anhand der X,Y-Werte der Objekte aus CellProfiler™ einer Kavität durch Abgleich mit einer Matrix zugeordnet.

Je nach Versuch konnte hier noch eine Normalisierung der Daten erfolgen, um unterschiedliche Belichtungen auszugleichen. So war es bei Langzeitmessungen bspw. möglich die ersten Messwerte auf 100 % zu normieren, da davon ausgegangen wurde, dass hier die Sauerstoffkonzentration im gesamten Sensorarray gleich sein musste. Für den 3D Mito Stress Test wurde der Wert nach FCCP-Zugabe als 0 % normiert, da hier durch einen maximalen Sauerstoffumsatz der Wert in unmittelbarer Nähe der Zellen gegen 0 % gehen musste. Außerdem wurde hier der Wert am Ende des Versuchs, nach Zugabe von Antimycin A und Rotenon, auf 100 % normiert, da durch eine inhibierte Zellatmung die Diffusion von Sauerstoff zu einer maximalen Sättigung des Mediums führte.

Es war dann möglich einzelne ROIs zu mitteln bzw. auch Unterschiede der einzelnen Bereiche darzustellen.

5.2.12 3D Mito Stress Test

Der 3D Mito Stress Test basiert auf einem Protokoll der Fa. Agilent für einen 2D Mito Stress Test im Seahorse XF [187] und wurde im Rahmen dieser Arbeit für die dreidimensionale Anwendung angepasst.

5.2.12.1 Vorbereitung der Zellen

Die Zellaggregate wurden entweder mit Hilfe der Hanging Drop Methode (5.2.4) oder durch Kultivierung in BIOFLOAT™-beschichteten Sensorarrays (5.2.5) generiert. Die Sphäroide aus Hanging Drops (HDS) wurden mit Phenolrot-freiem Zellkulturmedium (entweder HepG2-Medium oder RB⁺-Medium für die Kardiomyozyten) mit 10 mM HEPES (Assay-Medium) vom Deckel der Petrischale gespült. Nachdem die Sphäroide sedimentierten, wurde der Überstand abgenommen, die Sphäroide in 40 µl Assay-Medium aufgenommen und auf die BIOFLOAT™-beschichteten Sensorarrays gegeben. Danach wurden in das Insert und in das Well je 500 µl Assay-Medium hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von 1200 µl vorlag. Bei den in den Mikrokavitäten generierten Sphäroiden (MCS) wurde das Kultivierungsmedium durch 1200 µl Assay-Medium ersetzt. Um die Sensorarrays mit dem VisiSens TD besser betrachten zu können, wurde nur die mittlere Reihe einer 12-Well Platte verwendet. Daher konnten, um ein Austrocknen zu vermeiden, die Wells ober- bzw. unterhalb des Sensorarrays mit 2 ml sterilem Wasser gefüllt werden.

5.2.12.2 Durchführung

Der Mito Stress Test wurde ohne zusätzliches CO₂ im Inkubator (37 °C) durchgeführt. Zunächst wurden die Sensorarrays für einige Minuten inkubiert, um die Platte zu erwärmen, da sich sonst Kondenswasser bilden konnte, was die Messung erschwerte. Danach wurde die geöffnete Platte auf dem VisiSens TD platziert und die Messung gestartet. Aufnahmen erfolgten alle 2 min. Der Gain lag bei 20, die Belichtungszeit bei 6-19 s, je nach Sensorarray. Nach 30-60 min wurde 6 µl der Testsubstanz-Lösung in das Insert sowie in das Well gegeben. Als Testsubstanzen wurden 0,01 µM Isoprenalin (in 1x PBS^{+/+}), 0,2 µM Doxorubicin (in Assay-Medium) bzw. 0,2 µM Mitoxantron (in Assay-Medium) verwendet. Als Kontrolle anstelle der Testsubstanz wurde Assay-Medium verwendet. Da bei Zugabe der Test- und später der Referenzsubstanzen diese 1:100 verdünnt wurden, lag die Ausgangskonzentrationen dieser Lösungen 100-fach über der Zielkonzentration. 30-60 min nach der Testsubstanz folgten die Referenzsubstanzen Oligomycin, FCCP sowie Antimycin A und Rotenon, jeweils im Abstand von 30-60 min. Es wurden verschiedene Konzentrationen der Referenzsubstanzen getestet (Tabelle 21).

Tabelle 21: Verwendete Endkonzentrationen der Referenzsubstanzen.

Zellen	<i>Oligomycin</i> [µM]	<i>FCCP</i> [µM]	<i>Antimycin A & Rotenon</i> [jeweils in µM]
<i>HepG2 (MCS)</i>	4 – 16	2	1
<i>HepG2 (HDS)</i>	4	2	1
<i>Kardiomyozyten</i>	6	10	2

5.2.12.3 Auswertung

Die generierten Daten wurden zunächst durch die Software CellProfilerTM ausgewertet und in Excel weiter prozessiert (siehe 5.2.11.3). Um die Genauigkeit der Kalibrierwerte zu erhöhen, wurden sämtliche Kalibrierdaten einer Folien-Charge gemittelt und für die Auswertung verwendet. Bedingt durch die Methoden zur Generierung der Sphäroide bzw. dem Aussäen der Sphäroide war es möglich, dass einzelne Kavitäten zu kleine oder gar keine Sphäroide enthielten. Zu erkennen war dies daran, dass nach der Kalibrierung die Differenz zwischen den Werten nach der FCCP- und nach der Rotenon/Antimycin A-Zugabe deutlich geringer war, als der Mittelwert. Diese wurden für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Da es zu Abweichungen der Belichtung über die ganze Aufnahme fläche kommen konnte, mussten die Daten normalisiert werden. Die Fa. PreSens empfiehlt hier eine Ein-Punkt-Anpassung (OPA, engl. „one-point adjustment“), hierbei werden die Werte der einzelnen ROIs zu einem Zeitpunkt einem bekannten Sollwert angepasst. Ausgehend davon wurde eine Zwei-Punkt-Anpassung durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die Annahme getroffen, dass durch Zugabe des

Entkopplers FCCP, die zu einem maximalen Sauerstoffumsatz führte, die Sauerstoffkonzentration in der Nähe der Sphäroide auf 0 % sinkt, da der Verbrauch höher als die Diffusion ist. Daher wurde der minimalste Wert jeder einzelnen Kavität nach FCCP-Zugabe auf 0 % normiert. Nach Zugabe von Rotenon und Antimycin A wurde die mitochondriale Atmung vollständig inhibiert. Durch den fehlenden Sauerstoffverbrauch und die Diffusion von Sauerstoff, stieg die Sauerstoffsättigung auf einen Maximalwert an. Die Werte jeder Kavität am Ende der Messung wurden daher auf 100 % normiert.

5.2.13 Mito Complex Assay

Der Mito Complex Assay untersucht die Beeinflussung der Elektronentransportkette durch eine bestimmte Substanz und dient dazu, den inhibierten Komplex zu definieren. Die hier erarbeitete Methode basiert auf einem Protokoll der Fa. Agilent [188, 189, 195].

5.2.13.1 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden analog zum 3D Mito Stress Test vorbereitet. Vor dem Assay wurden die Zellen mit 1x MAS-Medium gewaschen.

5.2.13.2 Durchführung

Zunächst wurde das MAS-Medium durch MAS⁺ (MAS mit 2 nM Seahorse XF Plasma Membrane Permeabilizer) ersetzt und auf dem VisiSens TD platziert. Die Messung erfolgte im Inkubator (37 °C) ohne Zusatz von CO₂. Es wurde jede Minute ein Bild aufgenommen (Gain 20, Belichtungszeit 8-19 s). Es wurden jeweils 6 µl der Test-/Referenzsubstanz-Lösungen im Abstand von 20 min in das Well sowie das Insert gegeben. Zunächst wurde die Testsubstanz 1 µM Antimycin A (bzw. als Kontrolle steriles Wasser) hinzugegeben. Danach folgte jeweils ein Inhibitor gemeinsam mit einem entsprechenden Substrat. Dies waren im ersten Schritt 10 mM Dinatriumsuccinat Hexahydrat (Salz der Bernsteinsäure) und 2 µM Rotenon und dann 0,5 mM N,N,N',N'-Tetramethyl-*p*-phenyldiamin (TMPD) mit 10 mM Ascorbinsäure und 2 µM Antimycin A.

5.2.13.3 Auswertung

Kalibrierung und Auswertung erfolgten analog zum Mito Stress Test, jedoch wurde hier keine Zwei-Punkt Anpassung durchgeführt. Beim Seahorse XF wird die OCR gemessen, in unserem Fall wurde die Sauerstoffsättigung gemessen. Sinkt nach Zugabe der Testsubstanz die OCR, deutet dies auf eine Inhibition der Atmungskette hin, was in diesem Experiment durch einen Anstieg der Sauerstoffkonzentration angezeigt wurde. Je nachdem in welchem Abschnitt des Tests das Absinken der OCR bzw. der Anstieg der Sauerstoffsättigung beobachtet wurde, kann auf den inhibierten Komplex geschlossen werden.

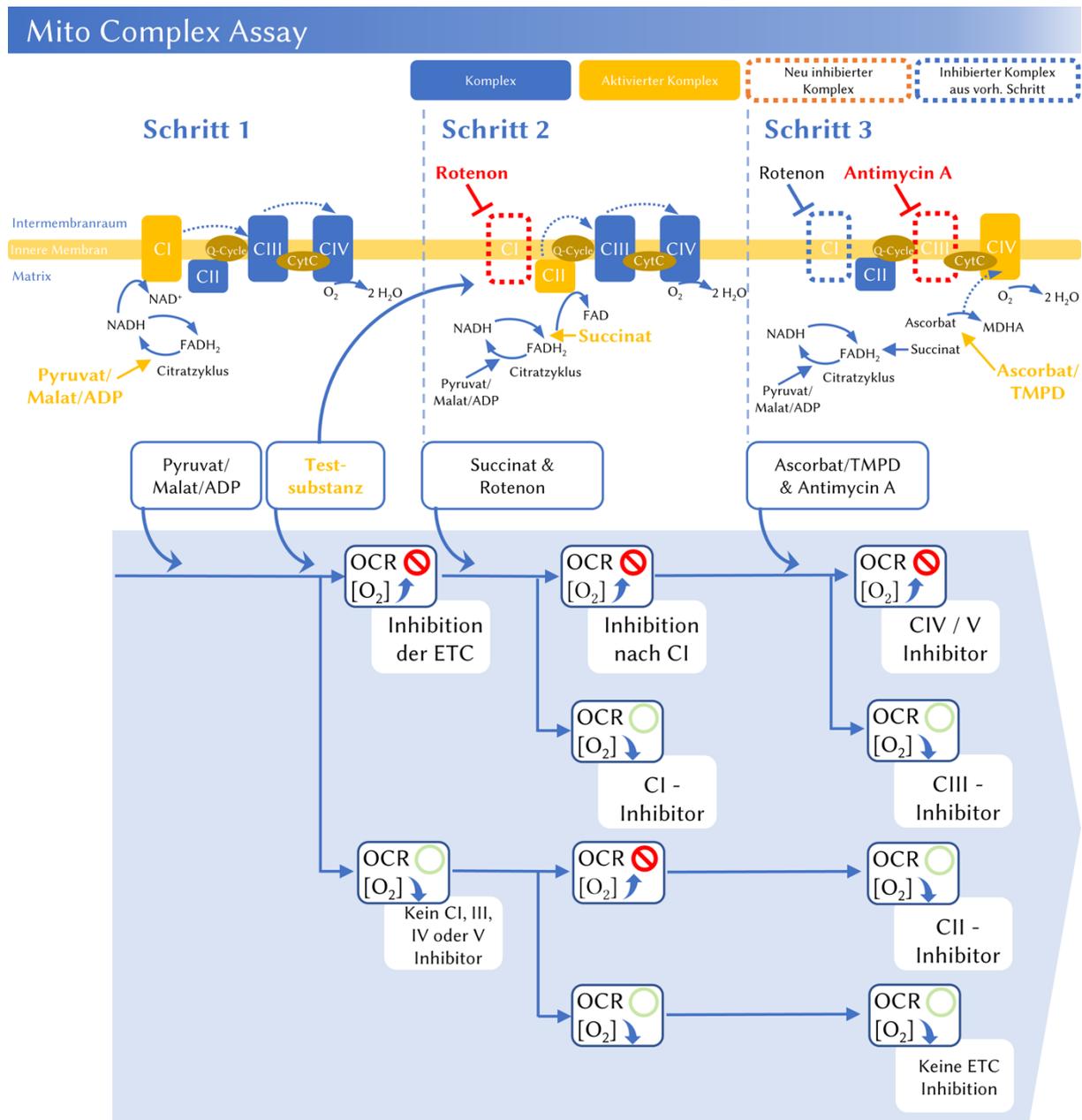


Abbildung 11: Darstellung der einzelnen Schritte des Mito Complex Assays zur Identifikation des Zielkomplexes der Testsubstanz. In den einzelnen Schritten werden immer paarweise Substrat und Inhibitor bereitgestellt. Im ersten Schritt werden die Zellen permeabilisiert und die CI-Substrate Pyruvat, Malat und ADP werden hinzugegeben. Danach folgt die Zugabe der Testsubstanz. Im zweiten Schritt werden Rotenon (CI-Inhibitor) und Succinat (CII-Substrat) hinzugegeben. Im dritten Schritt folgen Ascorbat/TMPD (CIV-Substrat) und Antimycin A (CIII-Inhibitor). Parallel dazu wird die Sauerstoffkonzentration ([O₂]) bzw. im ursprünglichen Assay die OCR, gemessen. Eine sinkende oder keine vorhandene OCR resultiert in einem steigenden Sauerstoffverbrauch, während eine normale OCR zur sinkenden Sauerstoffkonzentration führt. Dadurch kann Rückschlüsse auf den Zielkomplex der Testsubstanz gezogen werden. Steigt nach Zugabe der Testsubstanz die Sauerstoffkonzentration wird die ETC inhibiert. Eine sinkende Sauerstoffkonzentration bedeutet entweder eine CII-Inhibition oder keine ETC-Inhibition. Dies wird durch Schritte 2 und 3 definiert. Folgt auf die sinkende Sauerstoffkonzentration im ersten Schritt eine steigende im zweiten, so inhibiert die Testsubstanz Komplex III, sinkt die Sauerstoffkonzentration hingegen weiter, liegt keine ETC-Inhibition vor. Wenn im ersten Schritt die Sauerstoffkonzentration steigt, im zweiten Schritt durch Anstieg der OCR aber wieder sinkt, liegt ein CI-Inhibitor vor. Wird hingegen weiterhin die ETC inhibiert, also steigt die Sauerstoffkonzentration weiter an, so entscheidet sich im dritten Schritt, ob eine CIV/CV Inhibition (weiterer Anstieg) oder ein CIII-Inhibitor vorliegt (sinken der Sauerstoffkonzentration). (Abbildung modifiziert nach [25])

5.2.14 Statistische Betrachtungen

Für statistische Betrachtungen wurden der Mann-Whitney-U-Test sowie der Kruskal-Wallis-Test (vgl. [196]) mit Hilfe von Excel durchgeführt.

Mann-Whitney-U-Test

Der Mann-Whitney-U-Test (auch Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) vergleicht die Unterschiede zwischen zwei Stichproben ($n < 30$), deren Proben nicht normal verteilt sind, um festzustellen, ob ein statistisch signifikanter Unterschied besteht oder nicht (vgl. [197]). Dazu wurde zunächst jedem Datenpunkt einen Rang (vom kleinsten bis zum größten Wert) mit der Funktion „=RANG.MITTELW()“ zugeordnet. Danach wurden mit Excel die Rangsummen (R_1 und R_2) für jede Gruppe mit „=SUMME()“ und die Stichprobengröße (n_1 und n_2) mit „=ANZAHL()“ bestimmt. Danach wurden für die Gruppen die U-Teststatistiken (U_1 und U_2) berechnet, wobei die kleinere als Gesamt-U-Teststatistik verwendet wurde.

Formel 4: Formel zur Berechnung der U-Teststatistik

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$

Um die Verteilung an eine Normalverteilung anzunähern wurde daraufhin die z-Teststatistik mit folgender Formel berechnet:

Formel 5: Formel zur Berechnung der z-Teststatistik

$$z = (U - n_1 * \frac{n_2}{2}) / \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}$$

Mit diesen Werten kann nun der p-Wert mit der Funktion „=NORM.VERT(z, 0, 1, TRUE)*2“ berechnet werden. Ist dieser Wert größer als das Signifikanzniveau (z.B. 0,05), so ist von keinem signifikanten Unterschied auszugehen.

Kruskal-Wallis-Test

Um zu vergleichen, ob sich mehrere Stichprobengruppen unterscheiden, wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet [198]. Dazu wurde zunächst jedem Datenpunkt einen Rang (vom kleinsten bis zum größten Wert) mit der Funktion „=RANG.MITTELW()“ zugeordnet. Für jede Gruppe wurden dann die Stichprobengröße n , die Rangsummen R sowie R^2/n berechnet. Danach wurde die Teststatistik H und der entsprechende p-Wert berechnet.

Formel 6: Formel zur Berechnung der H-Teststatistik mit der Gesamtstichprobengröße n , der Summe der Ränge für die j -te Gruppe R_j^2 und die Stichprobengröße der j -ten Gruppe n_j .

$$H = \frac{12}{n(n+1)} * \sum \left(\frac{R_j^2}{n_j} \right) - 3(n+1)$$

Ist der p -Wert geringer als das Signifikanzniveau, kann die Nullhypothese, dass es keinen Unterschied gibt, abgelehnt werden. Es liegen also zumindest in einer Gruppe signifikante Unterschiede vor. Ist der p -Wert größer als das Signifikanzniveau, so liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der Stichprobengruppen vor.

5.2.15 Prototypenerstellung

5.2.15.1 Konstruktion und Design / CAD

Um möglichst flexibel bei der Herstellung der Prototypen zu sein, wurden die Konstruktionen selbst durchgeführt. Hierfür wurde Autodesk® Fusion 360™ verwendet. Der Vorteil war, dass hiermit zunächst die Modelle konstruiert und designt werden konnten (CAD, engl. computer-aided design), die Software aber zudem auch Rendern konnte und über einen integrierten Slicer die Vorbereitung der Daten für den 3D-Druck möglich war. Die Konstruktion erfolgte maßgeblich durch parametrische Modellierung.

Bei der Konstruktion der Mikrobioreaktor-Prototypen und Blasenfallen wurden die Vorteile der additiven Fertigung genutzt, mit der bspw. auch innenliegende Kanäle oder Hohlräume realisiert werden konnten. Dennoch wurden die finalen Versionen so optimiert, dass auch Fertigungsmethoden wie CNC-Fräsen oder Spritzguss möglich waren, um die Herstellung für größere Versuchsreihen skalieren zu können. Der 3D-Druck erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dipl.-Ing. Jonas Wohlgemuth am IFG; Fräsarbeiten wurden vom KIT Technik-Haus durchgeführt.

5.2.15.2 3D-Druck: PolyJet

Für die Herstellung der Prototypen fluidischer und medienberührender Bauteile wurde das Polyjetverfahren verwendet, das sich durch die hohe Genauigkeit und damit auch die Möglichkeit kleine Strukturen zu drucken auszeichnet. Gedruckt wurde auf einem Objet260 Connex3 (Stratasys) mit einer Genauigkeit von 0,1 mm und einer Schichtdicke von 16 μm , was glatte Oberflächen ermöglichte. Als Druckmaterial wurde VeroClear gewählt, da dies durchsichtig ist und somit die Beobachtung der Fluide innerhalb der Module ermöglichte. Für gedruckte Dichtungen wurde Agilus30 Black, ein gummiartiges Dichtungsmaterial verwendet. Das PolyJet-Verfahren ermöglichte beide Materialien in einem Vorgang zu drucken. Das verwendete Stützmaterial wurde nach dem Druck durch Waschen in Natronlauge und danach mehrtägigem Waschen in Wasser entfernt.

5.2.15.3 3D-Druck: Fused Deposition Modeling

Nicht-medienberührende Teile, wie Ständer für Zentrifugenröhrchen oder der Plattenadapter für das VisiSens TD, wurden aus Polylactid (PLA) durch Fused Deposition Modeling (FDM) gedruckt.

5.2.15.4 CNC-Fräsen

Die entwickelten Zellkulturinserts sowie deren Halterahmen wurden nach der Prototypen-erstellung durch den PolyJet-Druck auch aus Polycarbonat gefräst.

5.2.15.5 Zusammenbau fluidischer Komponenten

Die gedruckten fluidischen Komponente wurden nach dem Entfernen des Stützmaterials entweder durch Verschrauben oder, je nach Modell, durch Magnete zusammengebaut. Hierfür wurden Neodym Würfelmagnete (Magnetisierung N50, vergoldet) oder Neodym Ringmagnete (Magnetisierung N42, vernickelt) verwendet. Zum Abdichten wurden, je nach Modell Acrylnitril-Butadien-Kautschuk (NBR 70) O-Ringe verwendet.

5.2.15.6 Verschweißen der Zellkulturinserts

Das Verschweißen von Sensorfolien bzw. Sensorarrays auf die gefrästen Zellkulturinserts erfolgte durch den Kooperationspartner Telproecta EOOD (Bulgarien).

5.2.16 Testaufbau Blasenfallen – MBR

Für das Verbinden von fluidischen Bauteilen mit der Pumpe wurden Tygon-Schläuche verwendet. Als Pumpen dienten entweder Miniatur-Schlauchpumpen (RP-QII) mit wechselbarem Pumpenkopf oder Peristaltikpumpen der Fa. Ismatec.

5.2.16.1 Funktionstest der Blasenfalle/Dichtigkeit und Medientest

Für den Funktionstest der Blasenfallen wurden diese mit einer Pumpe verbunden. Über einen 3-Wege-Hahn, der in den Kreislauf integriert war und bei dem einer der Anschlüsse frei blieb, konnten Blasen beliebiger Länge generiert werden. Durch die Länge der Blase im definierten Schlauch, konnte deren Volumen berechnet und genau eingestellt werden.

Mit diesem Aufbau wurden auch die Blasenentfernung in verschiedenen Fluiden (dest. Wasser, PBS^{-/-} sowie HepG2-Medium) bei 1000 µl/min getestet.

6 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein System auf Grundlage Sauerstoff-sensitiver Mikrokavitätenarrays, im folgenden Sensorarrays genannt, entwickelt werden, das es erstmals ermöglicht Sauerstoff in der Mikroumgebung von 3D-Zellkulturen, insbesondere von Sphäroiden, zu messen. Neben einer Charakterisierung dieses Systems hinsichtlich der Sensorantwort und der Biokompatibilität, wurden Anwendungsbeispiele mit Kardiomyozyten- und HepG2-Sphäroiden gezeigt (Abbildung 12). Hierfür konnte unter anderem ein 3D-Mito Stress Test etabliert werden, der die mitochondriale Atmung nach Zugabe von Testsubstanzen charakterisiert.

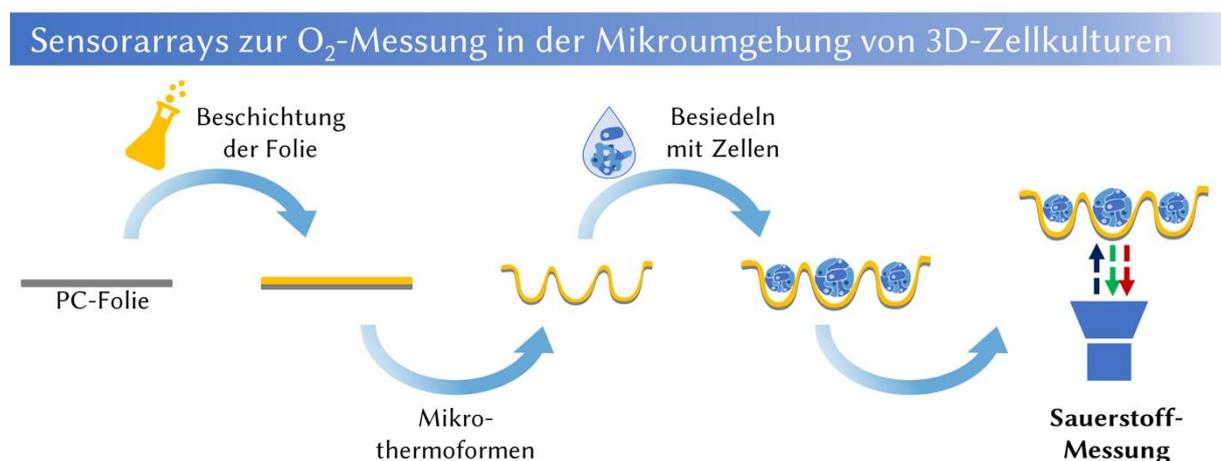


Abbildung 12: Von planaren Folien hin zu Sauerstoff-sensitiven Mikrokavitätenarrays (Sensorarrays). Polycarbonat-Folien wurden in einem ersten Schritt mit einer Fluorophormischung, bestehend aus einem Sauerstoff-sensitiven und einem Referenzfluorophor, beschichtet. Aus diesen Sauerstoff-sensitiven Folien wurden anschließend durch Mikrothermoformen Mikrokavitätenarrays generiert. Zellen, die in diese Mikrokavitäten eingebracht wurden, aggregierten dort zu Sphäroiden. Durch optische Messung konnte dann die Sauerstoffkonzentration in Funktionsmodellen bestimmt werden.

Im Detail sind die Ergebnisse der einzelnen Entwicklungsschritte, angefangen beim Mikrothermoformen, über Biokompatibilitätsuntersuchungen und die Entwicklung geeigneter Kultivierungssysteme, hin zum Anwendungsfall dargestellt (vgl. Abbildung 7).

Die einzelnen Arbeitspakete basieren aufeinander, jedoch waren auch einige Iterationen notwendig, um die Entwicklungen den Anforderungen anzupassen. Im Rahmen der Etablierung des 3D-Mito Stress Tests wurde eine Masterarbeit konzipiert und betreut. Die Ergebnisse dieser Masterarbeit, durchgeführt von Jana Pfeifer, sind ebenfalls Bestandteil der vorgestellten Arbeit und umfassen hauptsächlich die Anpassung des Mito Stress Tests.

6.1 Formversuche und Foliencharakterisierung

Das Mikrothermoformen Sauerstoff-sensitiver Folien bildete die Grundlage der vorliegenden Arbeit. Bei diesem Prozess wurden die zu formenden Folien zunächst erhitzt, um dann durch Druck in die entsprechenden Formmasken abgeformt zu werden. Die Formtemperatur lag dafür im Bereich der Glasübergangstemperatur des jeweiligen Materials. Bei der Wahl der Formtemperatur spielte jedoch auch die Temperaturstabilität der Fluorophore eine Rolle. Erste Vorversuche zeigten, dass ab 160 °C die Sensorantwort nachließ (Abbildung 13). Daher sollten die Formtemperatur und somit auch die Glasübergangstemperatur des Polymers unterhalb dieses Wertes liegen.

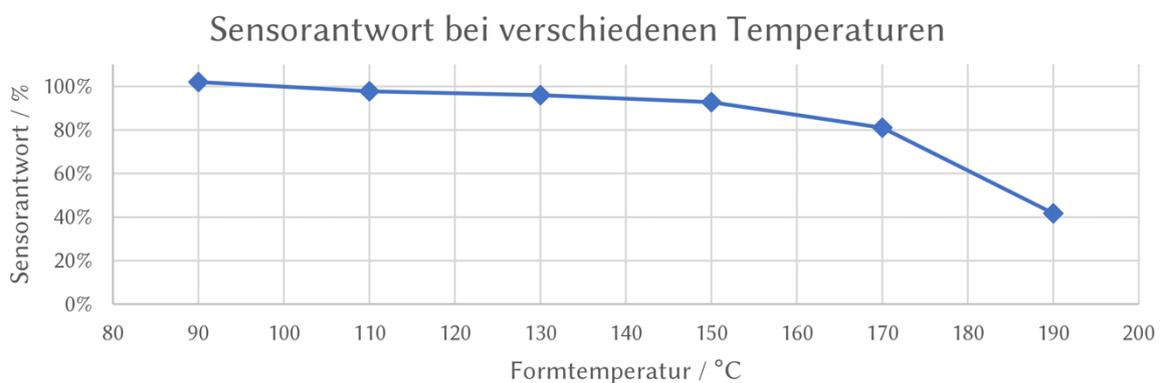


Abbildung 13: Sensorantwort der kommerziell erhältlichen Sensorfolie SF-RPSu4 nach Behandlung mit unterschiedlichen Formtemperaturen. [199]

6.1.1 Vorversuche: Thermoformen kommerziell erhältlicher Sensorfolien

In der Bachelorarbeit von Jakob Heckel wurde die kommerziell erhältliche Sensorfolie SF-RPSu4 für erste Formversuche (Abbildung 14) verwendet [199]. Dabei wurden Mikrokavitätenarrays abgeformt, deren einzelne Mikrokavitäten einen Durchmesser 300, 500 bzw. 800 μm betrug (Abbildung 15). Im Optimalfall liegt die Tiefe der Mikrokavitäten bei rund 300 μm . Mit der Folie SF-RPSu4 konnte, selbst für die 800 μm Kavitäten, dieser Wert nicht erreicht werden.

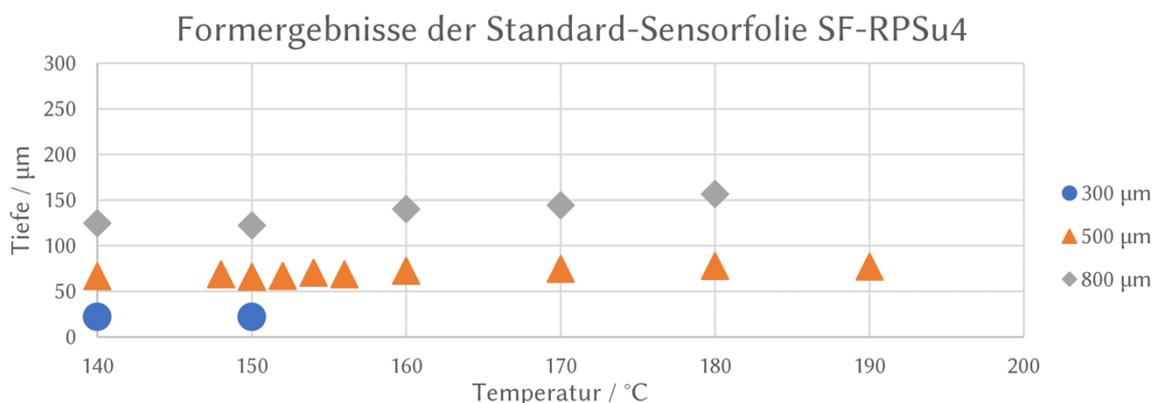


Abbildung 14: Erste Formversuche der Sensorfolie SF-RPSu4 [199].

6.1.2 Optimierung des Folienmaterials

Aus den Vorversuchen wurde ersichtlich, dass sich die Sensorfolie SF-RPSu4 nicht zufriedenstellend formen ließ. Um einen Einfluss der Beschichtung auf das Formergebnis auszuschließen, wurde die Mylar®-Folie, eine biaxial orientierte Polyesterfolie, auf der die Sensorfolie basiert, in einer unbeschichteten Form, also nur die Trägerfolie, getestet. Zudem wurde angenommen, dass eine dünnere Folienstärke einen positiven Einfluss auf die Formtiefen hat. Daher wurde von der PreSens GmbH ein Prototyp der Sensorfolie (RPSU76-C) basierend auf der dünneren Mylar®308 Folie hergestellt. Da sich Kavitäten mit einem größeren Durchmesser einfacher formen ließen, wurden zunächst Folien mit Kavitätendurchmesser von 500 bzw. 800 μm geformt (Abbildung 15).

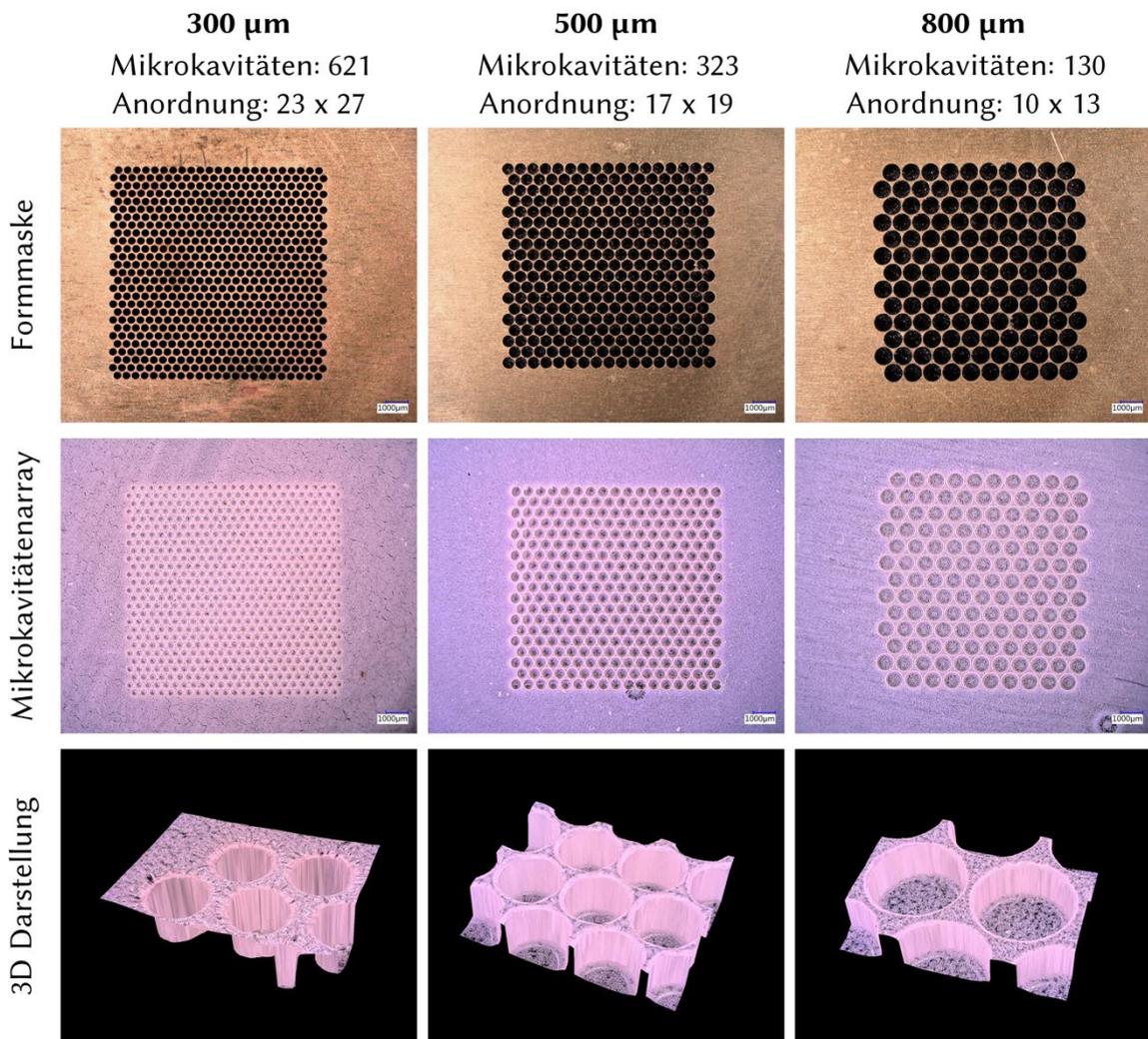


Abbildung 15: Darstellung der Formmasken für Mikrokavitäten mit 300, 500 bzw. 800 μm Durchmesser sowie der damit abgeformten Sensorarrays (SF-RPC2).

Die Ergebnisse (Abbildung 17 B und C) zeigen, dass es keinen Unterschied hinsichtlich der Formtiefe zwischen Sensorfolie und Trägerfolie gibt. Sowohl für die Sensorfolie SF-RPSu4 als auch für deren Trägerfolie Mylar® (SF-RPSu4) lag die Formtiefe im für die Fluorophore

möglichen Temperaturbereich bis 160 °C bei den 500 µm-Formmasken bei 60-70 µm bzw. bei den 800 µm-Formmasken bei rund 125-145 µm. Die Formtiefen der dünneren Sensorfolie SF-RPSu76-C sowie der dazugehörenden Trägerfolie Mylar®308 lagen in einem vergleichbaren Bereich.

Da die Fluorophorbeschichtung keinen Einfluss auf das Thermoformergebnis hatte, wurde auf Polycarbonat-Folien (PC-Folien) als Trägerfolie gewechselt. Diese wurden bereits für andere Anwendungen in der AG Gottwald verwendet und zeigten für das Mikrothermoformen optimale Eigenschaften. Nach Rücksprache wurde durch die PreSens GmbH das Beschichtungsprotokoll für die Verwendung von PC-Folien optimiert. Die zunächst hergestellte Sensorfolie SF-RPC1 war durch den Beschichtungsprozess extrem gewellt, sodass sie sich nicht direkt auf der Formmaske positionieren ließ. Daher wurde eine Wärmebehandlung (Tempern) zum Glätten der Folien als Zwischenschritt eingeführt. Dazu wurden die Folien zwischen PVC-Platten und Papier (Abbildung 16 A) für 20 h bei 90 °C behandelt. Die Folien waren danach zwar immer noch gewellt, ließen sich aber besser auf dem Formwerkzeug positionieren. Längere Wärmebehandlungen wurden vermieden, um die Stabilität der Fluorophore zu gewährleisten.

Tempern der Folienprototypen

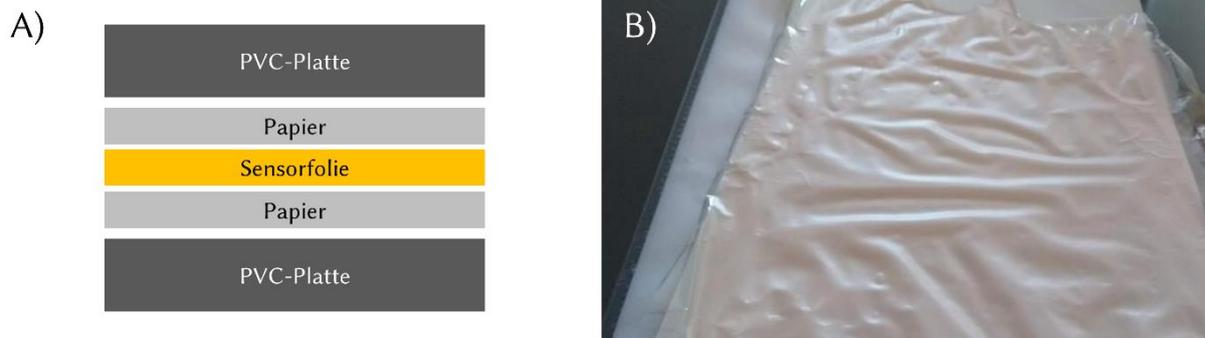
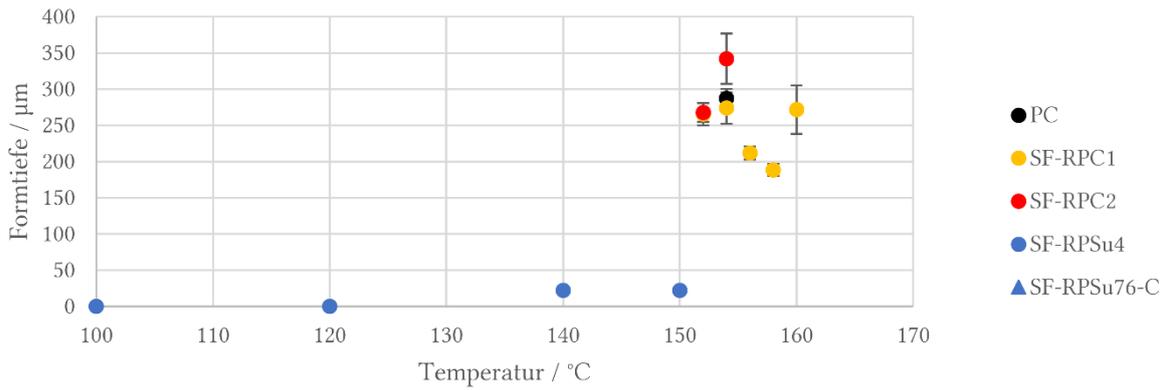


Abbildung 16: Tempern der Folienprototypen. A) Skizze der Anordnung während des Temperns und B) SF-RPC1 Folie nach dem Tempern für 20 h bei 90 °C.

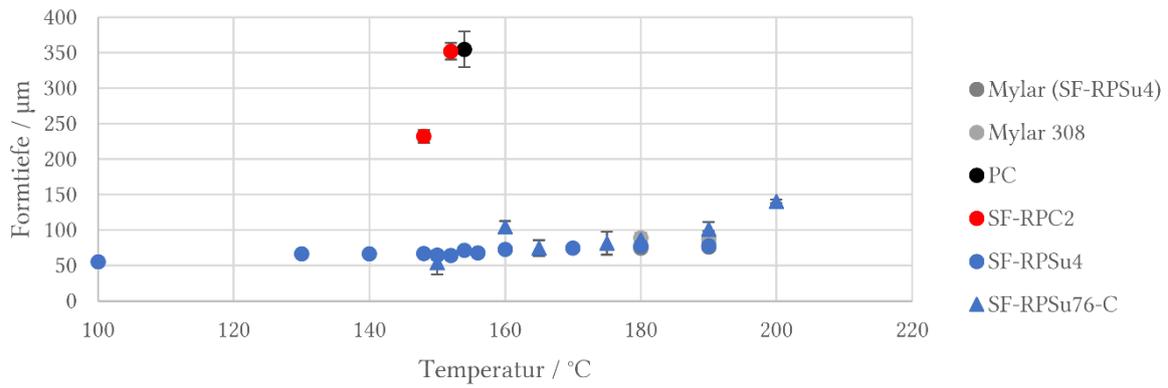
Mit diesen Folien konnten für 500 und 800 µm-Formmasken Formtiefen von bis zu 400 µm erreicht werden. Für die 300 µm-Formmasken wurden mit den Standardbedingungen für PC (154 °C, 21 bar) Formtiefen von rund 200 µm erreicht (Abbildung 17). Wobei hier einige Sensorarrays nicht vermessen werden konnten, da sie beim Entformen, also dem Entfernen aus der Formmaske, aufgrund zu großer Entformkräfte gerissen sind. Die Bedingungen wurden daraufhin angepasst (152 °C, 20-21 bar), woraufhin sich die Folien zuverlässiger mit Formtiefen von ca. 270 µm formen ließen. Der Druckbereich von 20 bis 21 bar lag daran, dass der Druck an der verwendeten Thermoformanlage manuell eingestellt werden musste und es so zu geringen Abweichungen kommen konnte. Jedoch zeigte die Auswertung der Daten, dass bei der

Verwendung einer Formtemperatur von 152 °C die Abweichung des Drucks um bis zu 1 bar keine Auswirkung auf das Formergebnis hatte, während erste Zahlen nahelegten, dass bei höheren Temperaturen (ab 153 °C) eine Erhöhung des Drucks auch zur Änderung der Formtiefe beitrug (Abbildung 18). Um den Zwischenschritt über das Tempern zu vermeiden und die Folien gleichmäßiger formen zu können, wurde nach Rücksprache das Beschichtungsprotokoll durch PreSens weiter optimiert, wobei Details nicht bekannt gegeben werden konnten. Die daraus resultierenden Sensorfolien SF-RPC2 ließ sich zuverlässig formen. Mit diesen Folien konnten Formtiefen erzielt werden, die mit denen der PC-Folien vergleichbar waren (Abbildung 17 A und B). Für biologische Anwendungen im Rahmen dieser Arbeit besonders relevant sind Mikrokavitäten mit einem Durchmesser von 300 µm und einer Tiefe von 250-300 µm, die sich mit der SF-RPC2 Folie generieren ließen.

A) Formmaske: 300 µm



B) Formmaske: 500 µm



C) Formmaske: 800 µm

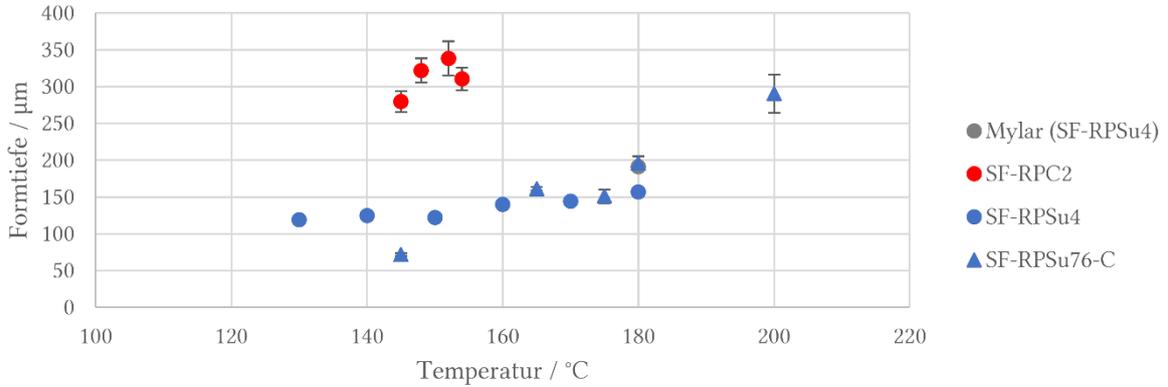


Abbildung 17: Übersicht über die Formversuche mit den drei verschiedenen Standard-Formmasken für Kavitäten mit einem Durchmesser von 300, 500 bzw. 800 µm und verschiedenen (Sensor-) Folien.

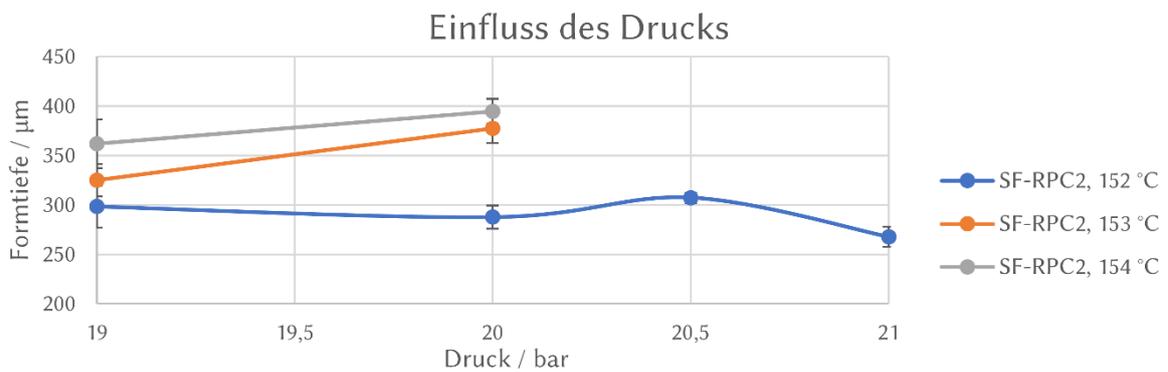


Abbildung 18 Auswertung des Formdrucks auf die Formtiefe bei verschiedenen Temperaturen.

6.1.3 Temperaturstabilität der Sensorfarbstoffe

Wie vorherigen Abschnitt beschrieben, unterschieden sich die Folien-Varianten durch das Material der Trägerfolie, während die verwendeten Fluorophore gleich waren. Die Annahme, dass daher auch die Temperaturstabilität vergleichbar ist, wurde experimentell bestätigt. Dazu wurden Proben der Sensorfolie SF-RPC2 unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt und die Sensorantwort, also das Signal nach der Temperaturbehandlung, in Relation zum Signal vorher betrachtet (Abbildung 19). Hierbei war tendenziell eine Abnahme des Sensorsignals ab 160 °C zu sehen, was mit den Ergebnissen der Vorversuche mit kommerziell erhältlichen Folien (Abbildung 13) übereinstimmte.

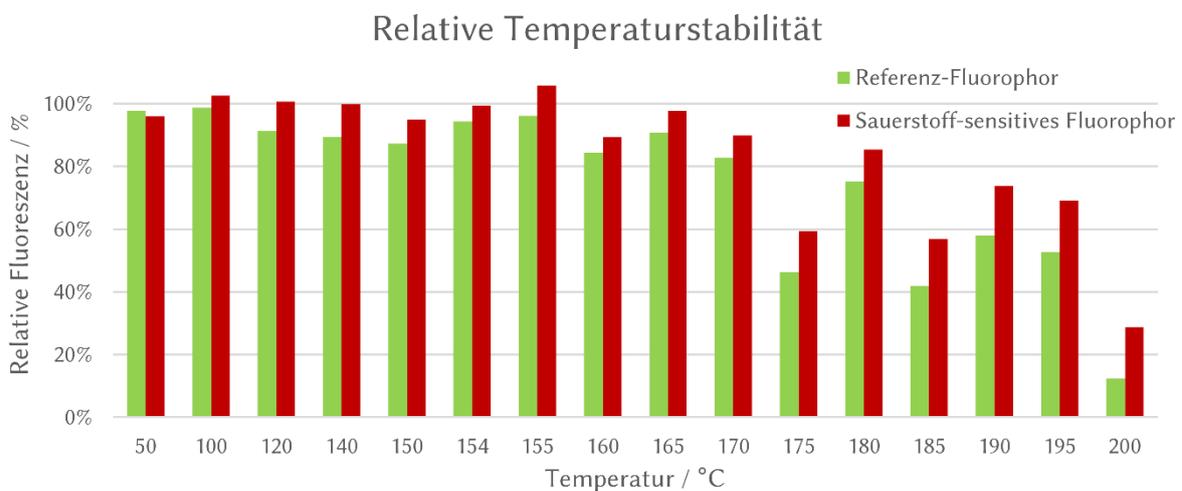


Abbildung 19: Temperaturstabilität der Folie SF-RPC2.

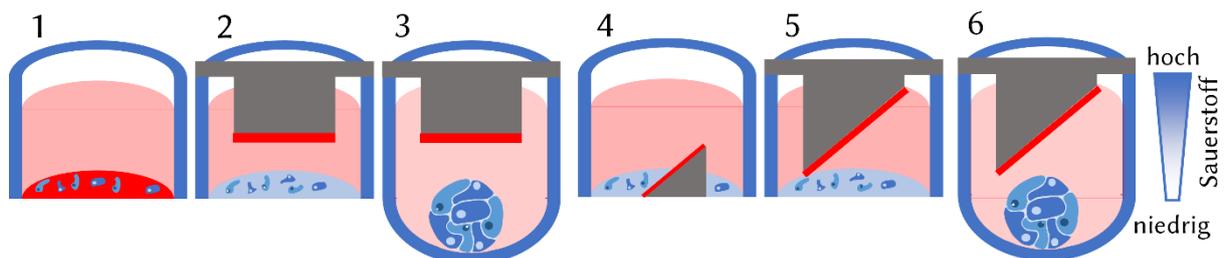
6.1.4 Weiterentwicklung der Formmasken

Durch die bisher verwendeten Formmasken ließen sich Mikrokavitäten formen, die in der Lage sind Sauerstoff in der Mikroumgebung der Sphäroide zu messen (Abbildung 20 B 7). Um jedoch auch einen Sauerstoffgradienten oberhalb der Sphäroide bestimmen zu können, wurde am oberen Ende der Kavität eine Fase eingeführt. Die Mikroskopie erfolgte zweidimensional. Über die Projektion der Fase auf die zweidimensionale Ebene, konnten über die jeweilige Position Rückschlüsse gezogen werden, an welcher Position in z-Ebene die Sauerstoffkonzentration vorlag. Dadurch wird die 3D-Gradienten-Messung trotz zweidimensionaler Bildgebung ermöglicht. Die neu entwickelten Mikrokavitäten mit einer Fase wurden zum Patent angemeldet (Angemeldet am 22.06.2022 unter DE10 2022 115 584.6). Zur Herstellung dieser Mikrokavitäten wurden neue Formmasken entwickelt. Das Thermoformwerkzeug ist für Masken mit einem Durchmesser von 40 mm ausgelegt. Um Material zu sparen, schneller die Formwerkzeuge wechseln zu können und auch skalieren zu können, wurden kleinere Formmasken mit Adapterplatten entworfen und durch CNC-Fräsen hergestellt. Hier wurde eine Adapterplatte

mit einem Durchmesser von 40 mm für Einzelabformungen und eine im Mikrotiterplatten-Format (115 x 78 mm²) für bis zu 12 Abformungen gestaltet (Abbildung 21). Zudem wurden für die Formmasken zur Einzelabformung Bohrungen im Außenbereich vorgesehen, die in Verbindung mit der Pumpe der Thermoformanlage die Positionierung und Fixierung der Folie auf der Formmaske erleichtern. Für die Herstellung mehrerer Abformungen ist ein Adapterrahmen im Mikrotiterplatten-Format vorgesehen.

Sauerstoffmessung in (3D-)Zellkulturen

A) Stand der Technik



B) Sauerstoff-sensitive Mikrokapitätenarrays

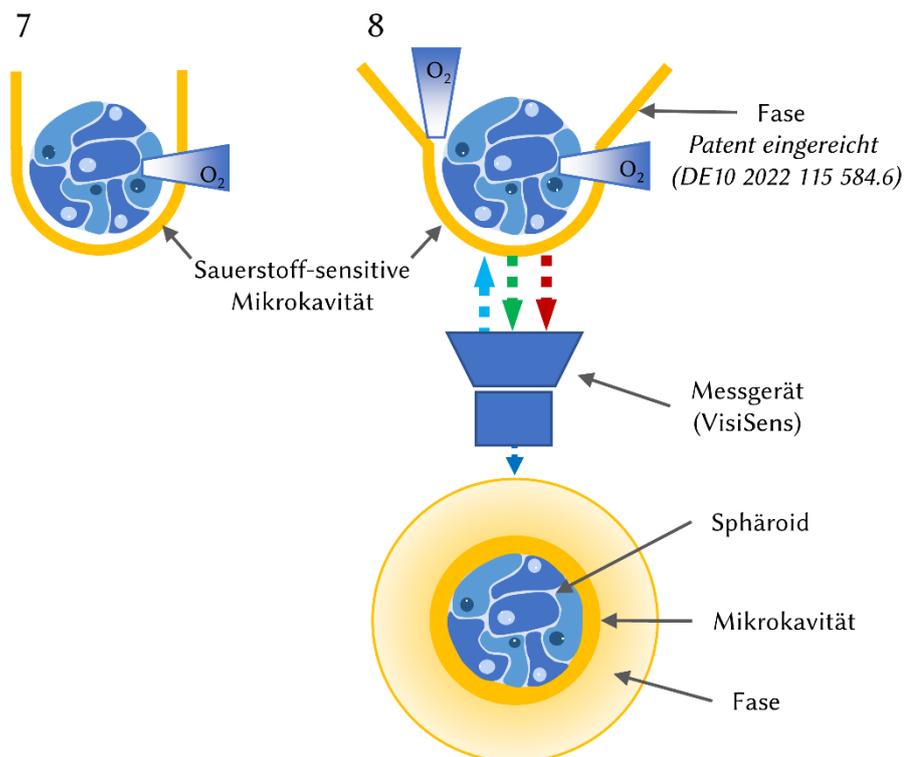


Abbildung 20: Optische Sauerstoffmessung in Zellkulturen. Stand der Technik. 1-3 zeigen Möglichkeiten, um mit planaren Sauerstoff-sensitiven Folien Sauerstoff in Zellkulturen zweidimensional darzustellen. Die Methode aus 2 wird bspw. im Seahorse XF Analyzer der Firma Agilent verwendet. Eine Weiterentwicklung (4) ermöglicht die Messung von Sauerstoffgradienten oberhalb von 2D-Zellkulturen [12] und ist grundsätzlich auch zur Messung oberhalb von Sphäroiden denkbar (6). Die Verwendung Sauerstoff-sensitiver Mikrokapitäten (7) ist neu und ermöglicht die Sauerstoffmessung in der Mikroumgebung von 3D Zellkulturen. Um auch hier Gradienten oberhalb der Sphäroide messen zu können, wurde eine Fase eingeführt (8). Diese Idee wurde zum Patent angemeldet (DE10 2022 115 584.6).

Entwicklung verschiedener Formmasken

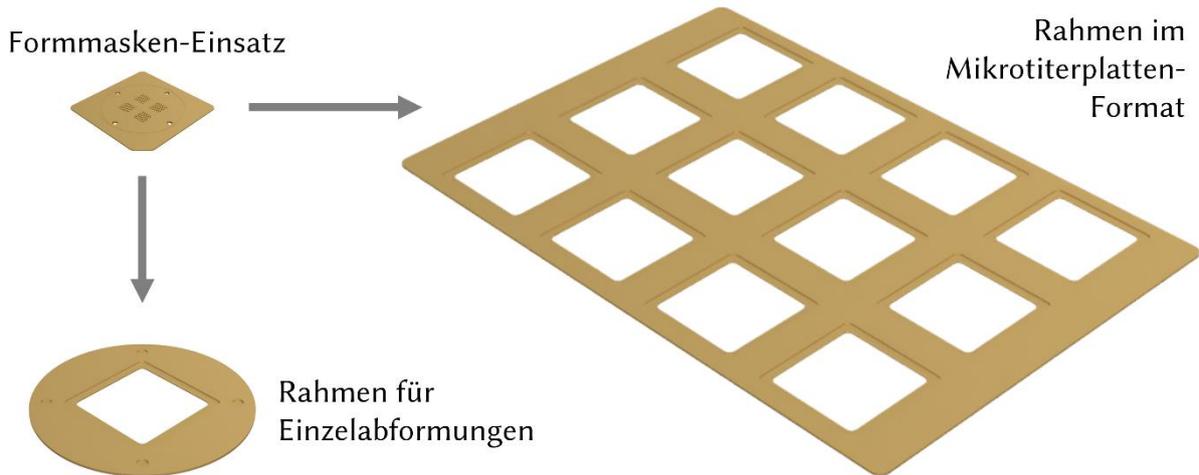


Abbildung 21: Verschiedene Rahmen für die Formmasken. Ziel ist es, flexibel verschiedene Geometrien auch mit höherem Durchsatz formen zu können.

In einem ersten Entwicklungszyklus wurden zwei Formmasken getestet. Beide verfügten über 64 (8 x 8) Mikrokavitäten, die versetzt zueinander angeordnet sind. Sie unterschieden sich jedoch im Öffnungswinkel der Fase (60° bzw. 90°). Bei einem identischen Kavitätendurchmesser am oberen bzw. unteren Ende der Fase, resultiert dies in einer Tiefe der Fase von 170 μm (60°) bzw. 100 μm (90°) (Abbildung 22). Mit beiden Formmasken konnten zufriedenstellende Formergebnisse erzielt werden (Abbildung 23 und Abbildung 25 A & B). Als Referenz diente hier jeweils eine nicht-beschichtete PC-Folie gleicher Stärke (50 μm).

Detailansicht der Öffnungswinkel der Fase

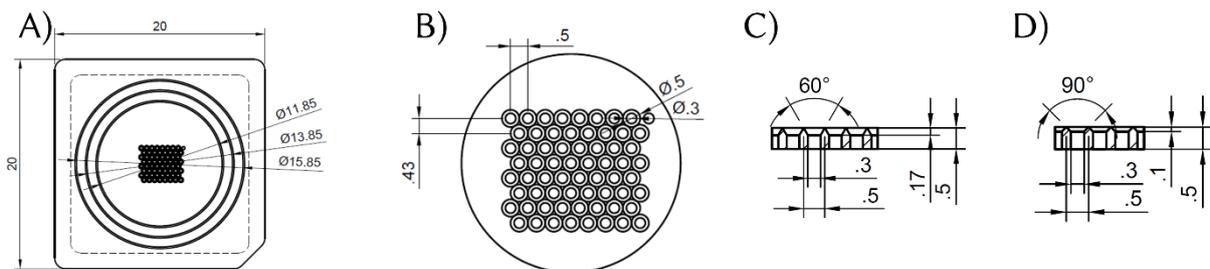


Abbildung 22: Skizze der Formmasken-Einsätze. A) Größe des Einsatzes mit Schneidehilfen für 12, 14 bzw. 16 mm. B) Detailansicht der Bohrungen zum Abformen der Mikrokavitäten. C) und D) Querschnitt der Bohrungen zur Formung von Mikrokavitäten mit 60° Öffnungswinkel (C) und 90° Öffnungswinkel (D).

Eine Fase, die sich über einen größeren Bereich in z-Richtung erstreckt (60°), sollte besser die Gradienten darstellen können. Da jedoch nicht ersichtlich war, ob bei diesem Winkel von der Fase zur Kamera genügend Signal vorhanden ist, wurde ein flacherer Winkel (90°) getestet. Nachdem jedoch das Signal der 60°-Fase ausreichend war, wurde dieser Winkel für weitere Versuche und Formmasken verwendet. Da die Formmasken am oberen Ende der Fase über einen Durchmesser von 500 μm verfügen und die Bohrung für die eigentliche Mikrokavität einen

Durchmesser von $300\ \mu\text{m}$ hat, wurden diese Formmasken mit der Größenbezeichnung $500/300\ \mu\text{m}$ versehen. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurde eine weitere Formmaske entwickelt, mit der sich Sensor-Arrays mit vier unabhängigen Kavitätenfeldern mit je 30 (5×6) Mikrokavitäten formen lassen. Diese wurden entwickelt, um sie direkt mit Zellkulturinserts mit vier Kammern zu verschweißen, um so ein Testsystem zu generieren, in dem gleichzeitig vier verschiedene Versuche durchgeführt werden konnten. Erste Tests zeigten, dass dies möglich ist (siehe 6.3.1.2). Sowohl die Formmasken, also auch die geformten Sensorarrays wurden mittels Digitalmikroskop stichprobenweise charakterisiert, um bspw. den Öffnungswinkel (Abbildung 24 A) oder die Durchmesser/Tiefen der Kavitäten (Abbildung 24 B) zu bestimmen.

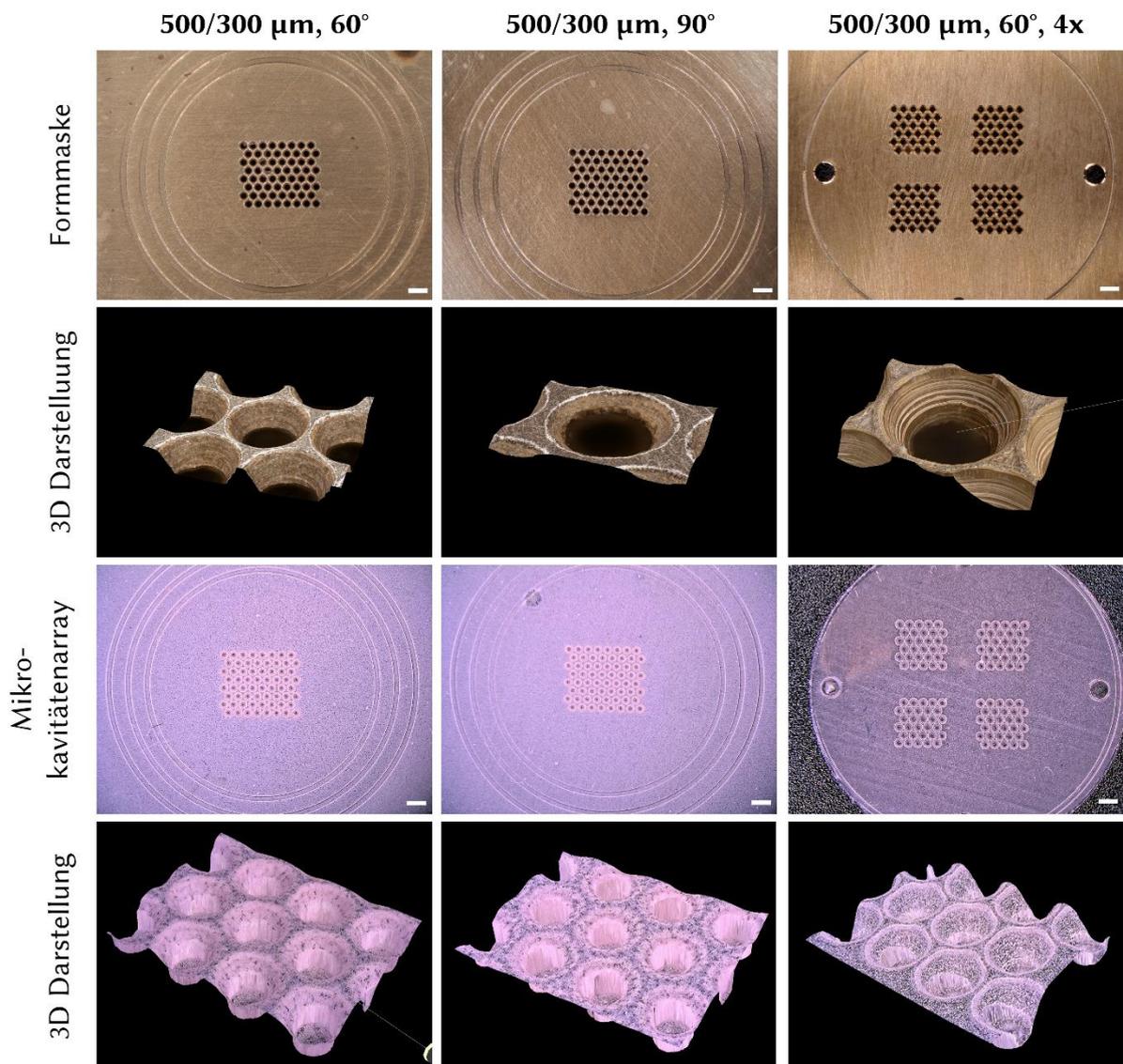


Abbildung 23: Darstellung der Formmasken mit einer 60° bzw. 90° Fase und dem Design mit vier Kavitärentfeldern.

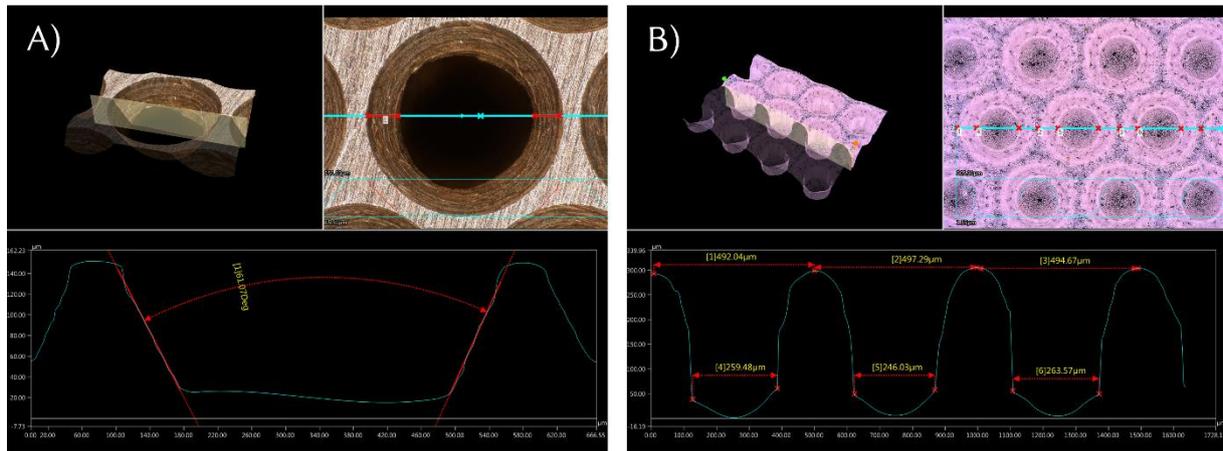
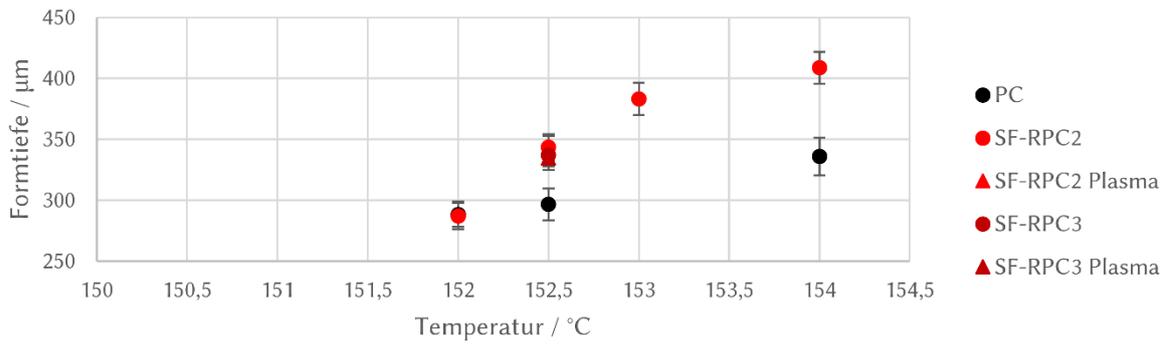


Abbildung 24: Charakterisierung der Formmasken (A) und der Folien (B) mittels Digitalmikroskop.

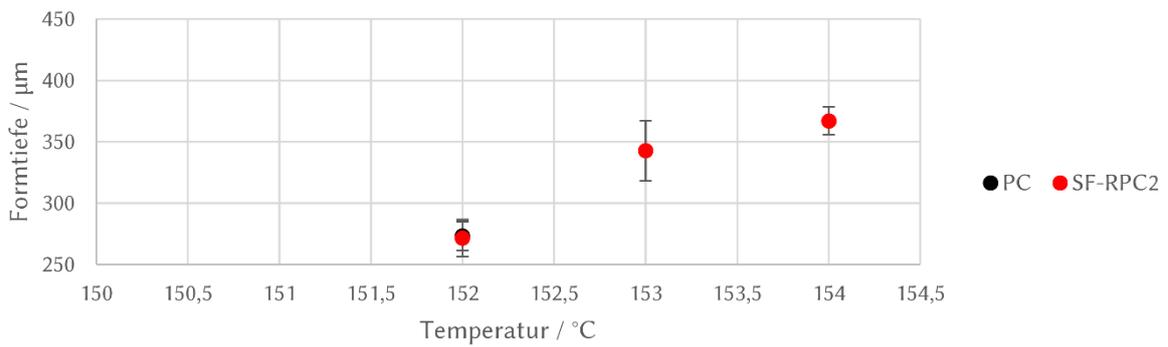
Mit diesen Formmasken wurden die SF-RPC2-Folien geformt. Dabei zeigten sich Formtiefen, die vergleichbar mit denen der PC-Folie waren. Teilweise waren die Mikrokanalitäten der Sensorarrays sogar etwas tiefer (Abbildung 25). Ein weiterer Prototyp der Folien (SF-RPC3) unterschied sich im Verhältnis des Sauerstoff-sensitiven Fluorophors zum Referenzfluorophor von der SF-RPC2-Folie. Durch einen höheren Anteil des Referenzfluorophors können bessere Messergebnisse erzielt werden. Zusätzlich wurde noch eine für Zellkultur optimierte Variante der beiden Folientypen erstellt, die mit Argon-Plasma behandelt wurde. Da die Folien alle auf der PC-Trägerfolie basieren, wurde erwartungsgemäß kein Unterschied der Formtiefen zwischen den Folien festgestellt. Die Formtiefen mit einem Fasenwinkel von 60° sind etwas tiefer, als die der 90° -Formmaske (Abbildung 25 A und B).

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass bei einem Kavitäten-Design mit einer Fase von 60° die Eigenschaften für die in dieser Arbeit auftretenden Fragestellungen am geeignetsten waren. Um die Sensorarrays in ausreichender Zahl produzieren zu können, wurde daher für das Standardwerkzeug eine optimierte Formmaske entwickelt, mit der gleichzeitig drei Sensorarrays geformt werden konnten (Abbildung 26 A). Die Kavitätenanzahl wurde auf 80 (10×8) erhöht und somit dem Field of View der zweiten Generation der VisiSens Systeme angepasst. Zudem wurde um das Mikrokanalitätenfeld eine Stufe von $50 \mu\text{m}$ integriert, die das Aussäen der Zellen erleichtern sollte (Abbildung 26 F).

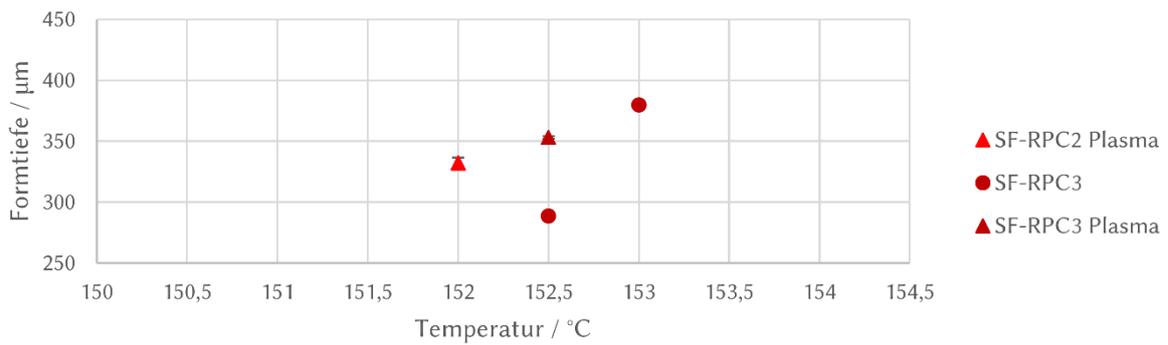
A) 500/300 μm , 60°



B) 500/300 μm , 90°



C) 4x 500/300 μm , 60°



D) 3x 500/300 μm , 60°

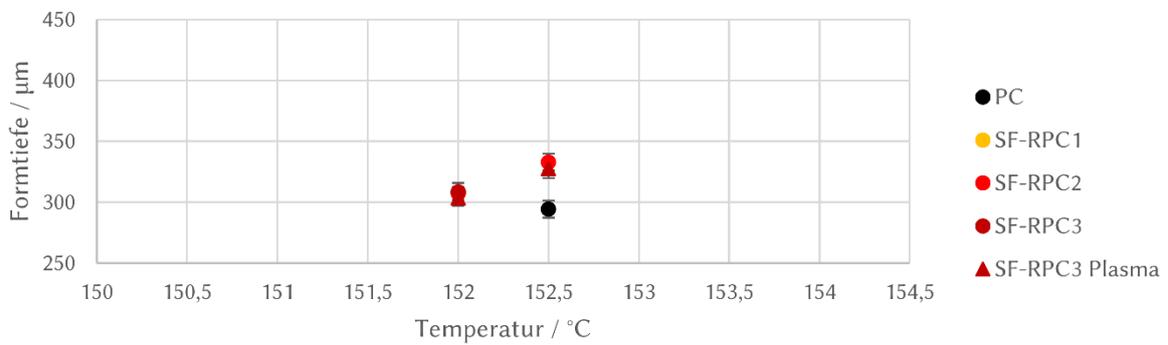


Abbildung 25: Formtiefen für die vier neu entwickelten Formmasken.

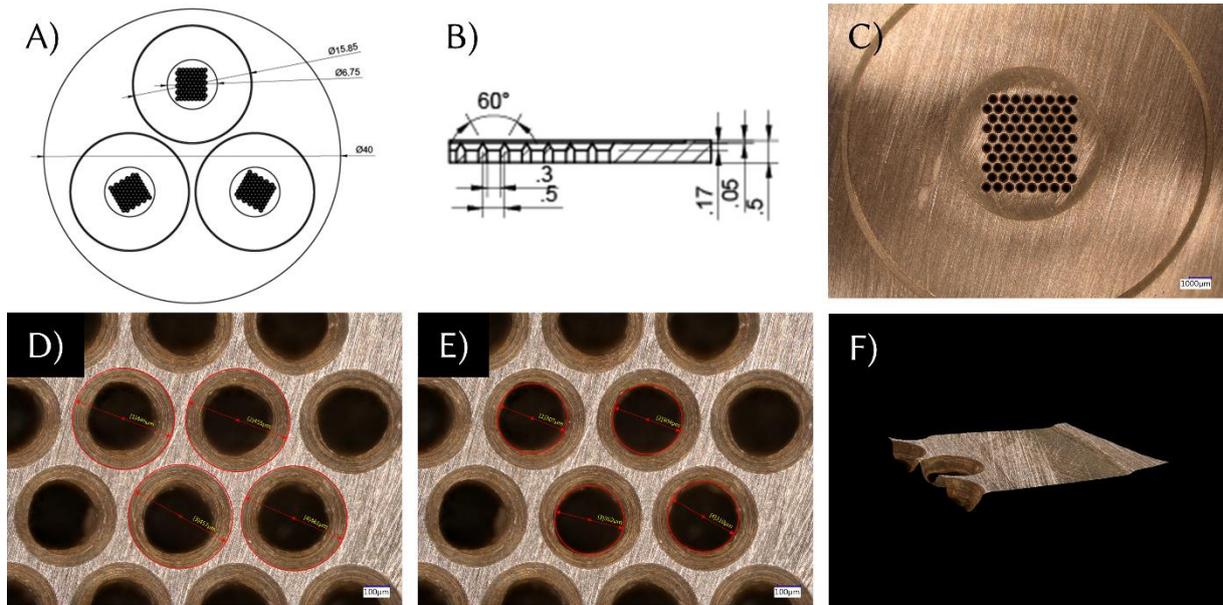


Abbildung 26: Formmaske zur Herstellung von drei Sensorarrays in einem Formprozess. A) Technische Zeichnung, die die Anordnung der einzelnen Sensorarrays auf der Formmaske darstellt. B) Querschnitt mit Öffnungswinkel der Fase. C) Mikroskopische Aufnahme der Formmaske. D) Vermessung des äußeren Bereichs der Fase. E) Vermessung der Bohrung. F) Querschnitt einer Bohrung, zu erkennen ist die Vertiefung, die das Aussäen der Zellen erleichtert.

Um genauere Informationen über die Sauerstoffsättigung im Bereich der Fase zu erhalten, wurde zudem eine Formmaske ähnlich wie die in Abbildung 26, jedoch mit einem Fasenwinkel von 30° angefertigt (Abbildung 27). Auch mit dieser Formmaske konnten Formtiefen von bis zu 360 µm erhalten werden.

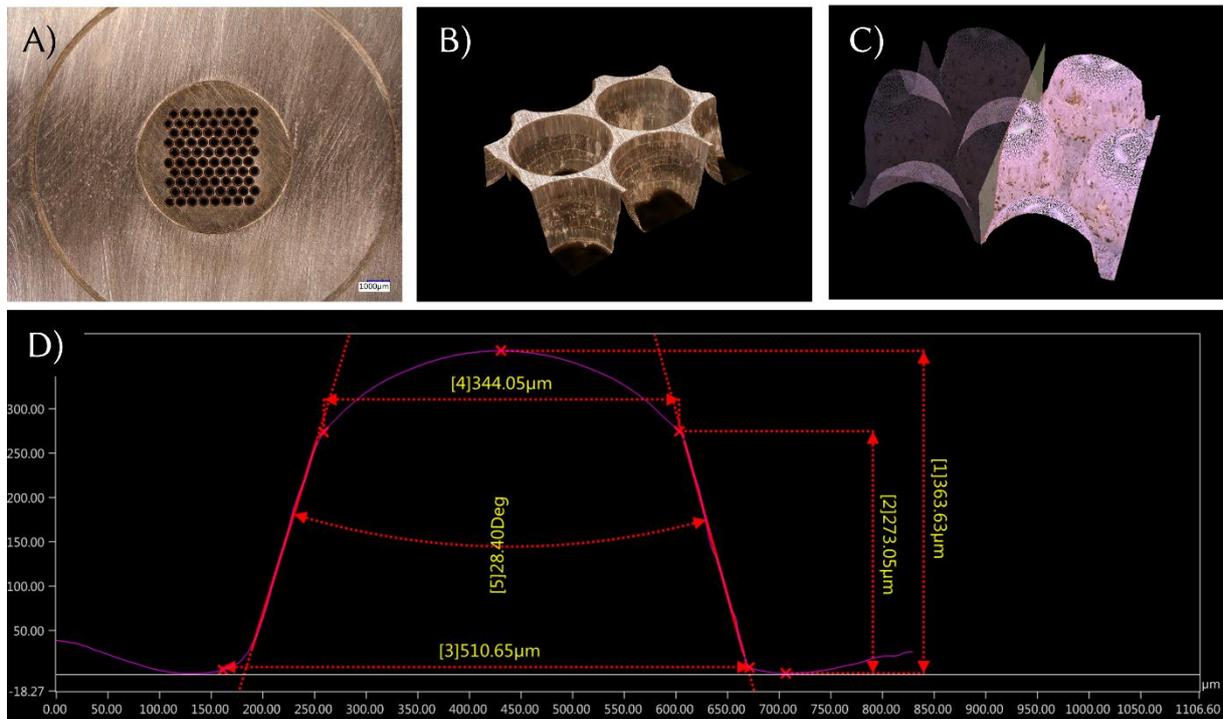


Abbildung 27: Formmaske mit einer 30°-Fase. A) 500/300-Formmaske mit einem Öffnungswinkel von 30°. B) Detailansicht der gefrästen Vertiefungen. C) 3D Darstellung einer Abformung aus SF-RPC3+Plasma und D) Vermessung der Abformungen.

6.1.5 Messung der Formtiefen: Lichtmikroskop vs. Digitalmikroskop

Das Vermessen der Sensorarrays mittels Digitalmikroskop (Abbildung 24 A) ist zwar sehr genau, jedoch bei höheren Stückzahlen nur stichprobenweise möglich. Um jedoch ein umfassendes Bild über die Reproduzierbarkeit des Formvorgangs zu erhalten, war es während der Prozessoptimierung notwendig, die Formtiefen nach jeder Abformung zu kontrollieren. Dies erfolgte mittels Lichtmikroskop in Verbindung mit einer Mikrometerschraube. Dabei wurde jeweils auf eine nicht geformte Ebene und auf den tiefsten Punkt der Mikrokavitäten fokussiert. Die Höhendifferenz entsprach der Formtiefe der Mikrokavitäten. Da dieses Vorgehen generell fehleranfälliger ist, wurde in Stichproben die hierdurch ermittelte Formtiefe mit den Messergebnissen aus einer Vermessung mittels Digitalmikroskop verglichen. Die Abweichungen lagen hierbei meist bei deutlich unter 10 μm (Abbildung 28). Die Methode war also ausreichend genau, um die Formergebnisse kontrollieren zu können.

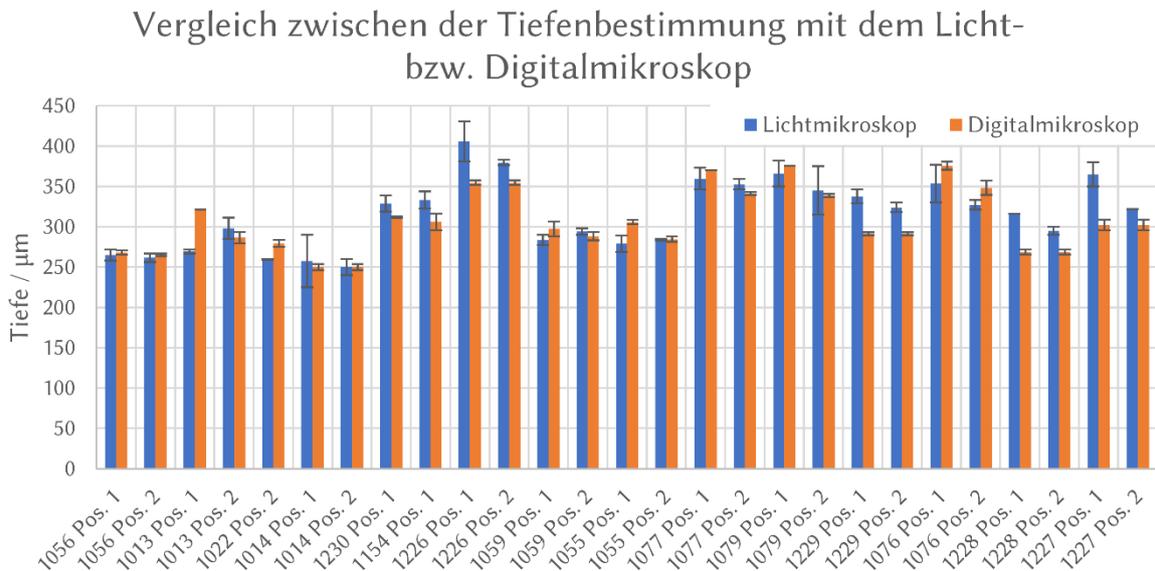


Abbildung 28 Formtiefen ausgewählter Sensorarrays bestimmt mit einem Lichtmikroskop in Verbindung mit einer Mikrometerschraube bzw. einem Digitalmikroskop.

6.1.6 Fluoreszenzspektrum der Folien

Von Seiten der PreSens Precision Sensing GmbH war bekannt, dass für die Beschichtung der Folien ein Sauerstoff-sensitives Fluorophor, dessen Emission im roten Bereich liegt, sowie ein Referenzfluorophor, dessen Emission im grünen Bereich liegt, verwendet wurde. Gerade für die Fluoreszenzmikroskopie und die Auswahl geeigneter Färbemethoden war daher die Kenntnis der Emissionsspektren wichtig. Daher wurden die Sensorfolien hinsichtlich ihrer Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen mit Hilfe eines Leica SP5 Konfokalmikroskops charakterisiert.

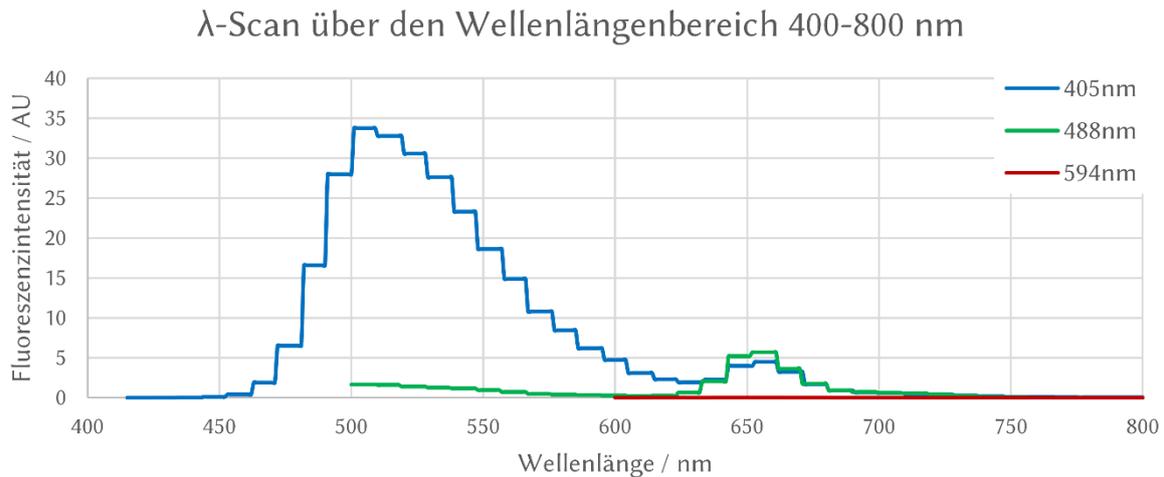


Abbildung 29: Lambda-Scan mit verschiedenen Anregungswellenlängen.

Im VisiSens-System werden die Fluorophore mit LEDs im blauen Bereich des Spektrums angeregt und emittieren, wie bereits beschrieben, im roten bzw. grünen Bereich. Wie zu erwarten, konnten zwei Emissionspeaks der Fluorophore nach Anregung mit 405 nm gemessen werden. Ein Emissionsmaximum lag bei 500-510 nm, das zweite bei 650-660 nm. Bei Anregung mit 488 nm wurde ein Emissionsmaximum bei 650-660 nm gemessen. Bei einer Anregung mit 594 nm konnte keine Emission gemessen werden.

6.2 Biokompatibilität der Folien

Die Biokompatibilität der verwendeten Sensorfolien war ein grundlegendes Kriterium für die weitere Verwendung der Folien in Zell-basierten Assays. Unterschiedliche Materialien bzw. deren Oberflächen können einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum von Zellen haben. Das Standardzellkulturmaterial ist Polystyrol, das sich hervorragend für die Kultivierung vieler Zellen eignet. Für die Sauerstoff-sensitiven Mikrokavitätenarrays wurden jedoch Polycarbonat-Folien verwendet, die zudem noch mit Fluorophoren modifiziert wurden. Die Biokompatibilität bzw. Zytotoxizität wurde mittels Laktat-Dehydrogenase-Assay (LDH-Assay) und mikroskopisch mit einer Lebend-Tot-Färbung untersucht. Für den späteren Einsatz in der 3D-Zellkultur wurden zudem verschiedene Beschichtungsmethoden der Folien bzw. Mikrokavitätenarrays getestet, um das Wachstumsverhalten auf den Oberflächen zu untersuchen.

6.2.1 Toxizitätsbestimmung mit dem LDH-Assay

Beim LDH-Assay handelt es sich um einen kolorimetrischen *in vitro*-Test zur quantitativen Bestimmung der Zytotoxizität. Hintergrund ist, dass tote Zellen das Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH) aus dem Cytoplasma freisetzen. LDH führt während des Assays zur Bildung eines roten Formazan-Salzes. Die Menge des Formazans ist dabei direkt proportional zur freigesetzten LDH-Menge und ermöglicht so die Bestimmung der Zellzahl abgestorbener Zellen.

6.2.1.1 LDH-Assay in CellCrown™ Inserts

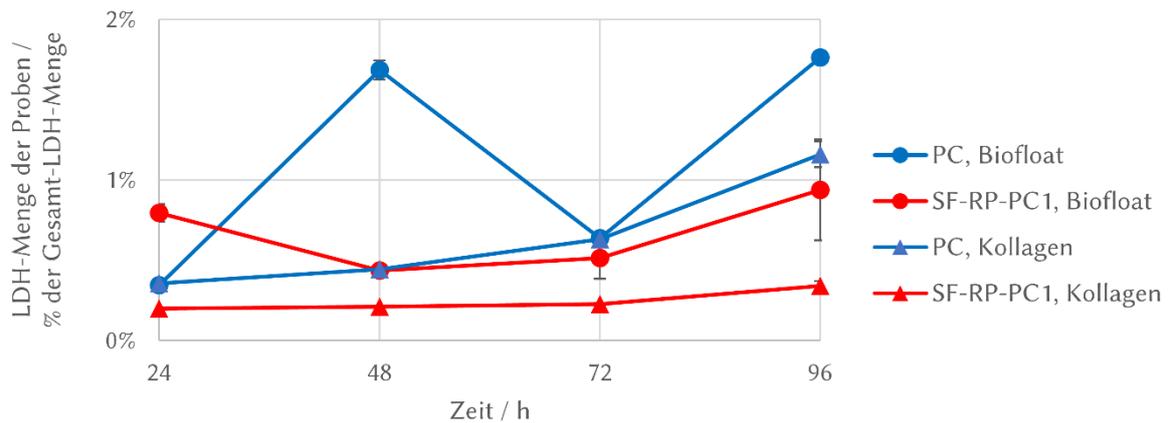
Eine Möglichkeit Testfolien als Substrat für 2D-Zellkulturen bereitzustellen, wäre diese in Multiwellplatten oder Petrischalen zu legen bzw. zu kleben. Bei Ersterem ist jedoch das Problem, dass diese aufschwimmen können und so kein gleichmäßiges Zellwachstum ermöglicht wird. Das Verkleben auf den Plattenboden hingegen birgt die Gefahr, dass der Klebstoff ebenfalls einen Einfluss auf das Zellwachstum hat. Daher wurden die zu testenden Folien in einem Zellkulturinsert (CellCrown™) fixiert, nachfolgend auch als „Insert“ bezeichnet, und in eine 12-Well-Platte eingebracht (Abbildung 9). Da HepG2-Sphäroide als erstes biologisches Funktionsmodell angedacht waren, wurde diese Zelllinie zunächst für die Biokompatibilitätsuntersuchungen verwendet. Zudem wurden Tests mit Hela-Zellen durchgeführt, da diese zu den häufig verwendeten Zelllinien gehören. Tabelle 22 fasst die Versuche zur Toxizität/Biokompatibilität zusammen.

Tabelle 22: Übersicht über die Biokompatibilitätsexperimente. Die Tabelle gibt an, welche Zellen in den Experimenten verwendet wurden, mit welchem Zellkultursystem sie durchgeführt wurden und, ob zudem noch eine mikroskopische Untersuchung erfolgte.

Versuch	Verwendete Zellen	CellCrown™ – 1	CellCrown™ – 2	Ibidi Sticky Slides	Sensor- arrays	LDH	Mikros- kopie
V1	HepG2	Ja			Ja	Ja	
V2	HepG2	Ja			Ja	Ja	
V3	HepG2	Ja				Ja	
V4	HepG2	Ja				Ja	
V5	HepG2		Ja			Ja	Ja
V6	HepG2		Ja			Ja	Ja
V7	HepG2, Hela	Ja					Ja
V8	HepG2		Ja			Ja	Ja
V9	HepG2				Ja	Ja	Ja
V10	Hela		Ja			Ja	
V11	HepG2		Ja			Ja	
V12	Hela		Ja			Ja	
V13	HepG2			Ja		Ja	
V14	Hela			Ja		Ja	
V15	HepG2, Hela			Ja		Ja	
V16	HepG2	Ja			Ja	Ja	Ja
V17	HepG2, Hela			Ja		Ja	Ja

In einem ersten Versuch (V1) wurden HepG2-Zellen in Mikrokavitäten aus der Sensorfolie SF-RPC1 bzw. PC als Kontrolle kultiviert. Diese wurden zum einen mit BIOFLOAT™ oder Kollagen beschichtet. Alle 24 Stunden wurde das Medium komplett, sowohl aus dem Insert als auch aus dem darunterliegenden Well, als Probe entnommen und neues Medium ergänzt. Nach 96 Stunden wurden die verbleibenden Zellen mittels 2 % Triton X-100 lysiert und dienten der Bestimmung des Gesamt-LDHs (Abbildung 30 A).

A) Versuch 1: Vergleich der Mikrokavitäten aus SF-RPC1 und PC



B) Verteilung der LDH-Menge im Insert sowie dem Well

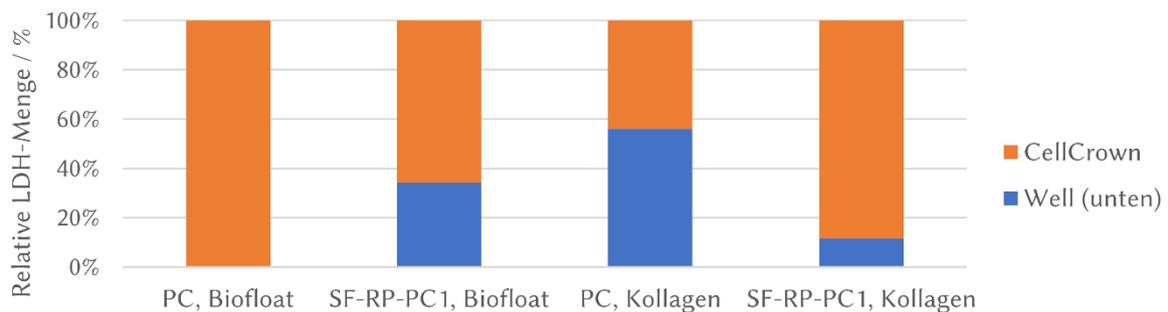


Abbildung 30: Erste LDH-Assays in CellCrown™-Inserts. A) Auswertung der LDH-Messung in den Mikrokavitäten. Die freigesetzte LDH-Menge wurde in Relation zur Gesamt-LDH-Menge gesetzt. B) Verteilung der LDH-Mengen nach 96 Stunden zwischen CellCrown™-Inserts und den darunterliegenden Wells.

Zur Bestimmung des Gesamt-LDHs wurden nach 96 Stunden die verbleibenden Zellen im Insert sowie im Well separat lysiert und die gemessenen LDH-Mengen getrennt dargestellt (Abbildung 30B). Es ist aufgrund dieser Daten davon auszugehen, dass sich Zellen sowohl in den Inserts, als auch in den Wells befanden. Da die in den Wells nicht unmittelbar der zu untersuchenden Folie ausgesetzt waren, wurde dies als Nachteil des Systems definiert. Zudem kann es zu Verfälschungen kommen, da die BIOFLOAT™-Beschichtung ein Anhaften der Zellen verhindert und so Zellen bei der Probennahme dem Versuch entnommen werden können. Daher wurden in den folgenden Versuchen planare Folien eingesetzt, um die Biokompatibilität in Monolayer zu überprüfen. Zudem wurde hierfür der dann neue Folientyp SF-RPC2 verwendet.

Für Versuche V2, V3 sowie V4 wurden planare Folien in CellCrowns™ eingebracht. Auch hier wurde das Medium alle 24 h abgenommen und durch neues ersetzt.

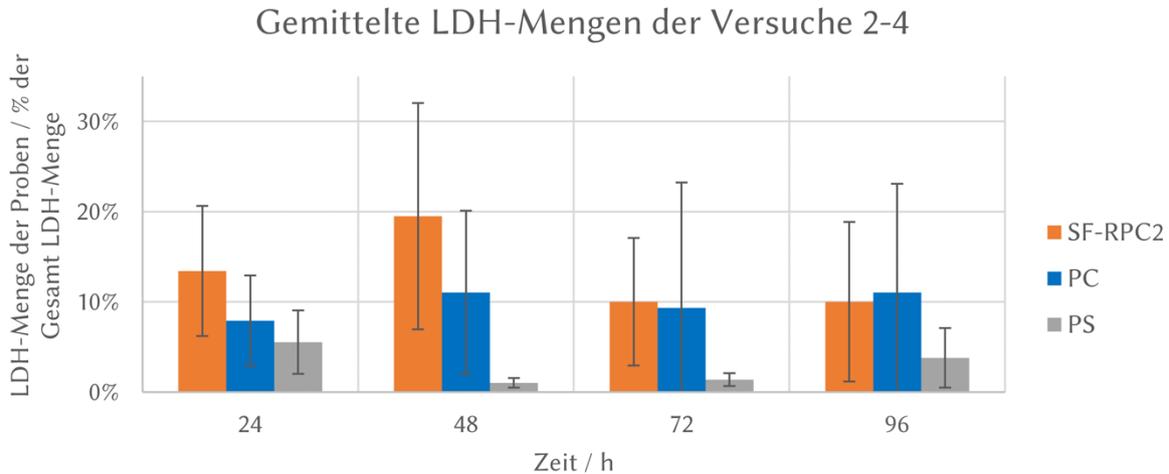
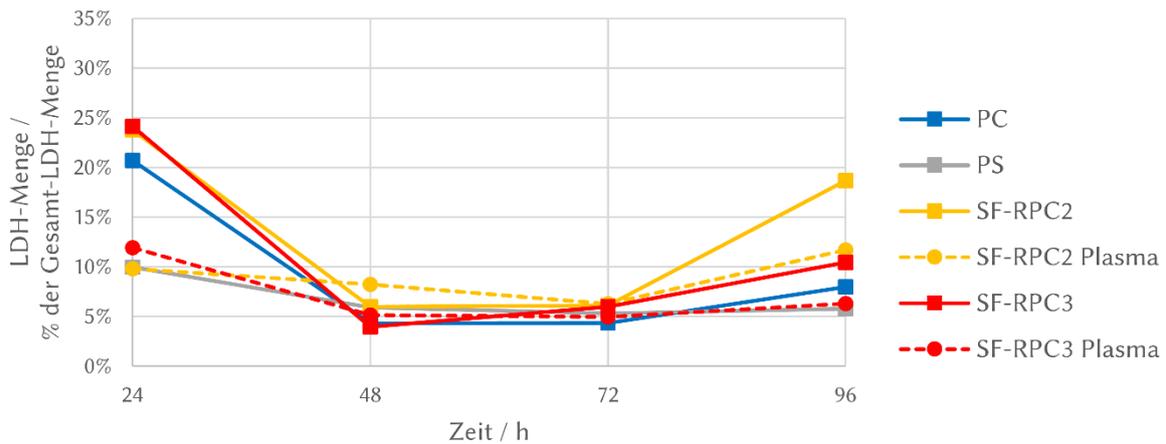


Abbildung 31: Darstellung der Ergebnisse von V2, V3 sowie V4. Die Probennahme der Versuche erfolgte im Abstand von 24 Stunden, indem das Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt wurde.

Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse dieser drei Versuche. Zwischen den einzelnen Messwerten waren hohe Abweichungen zu erkennen. Die Daten für PS wurden nicht mit dem CellCrown™-System gewonnen, sondern durch Kultivierung von Zellen in Standard-Zellkulturplatten. Während der Versuche wurden die Zellen lichtmikroskopisch beobachtet. Die erhöhte freigesetzte LDH-Menge nach 48 Stunden ließ auf einen höheren Anteil toter Zellen schließen. In der lichtmikroskopischen Beobachtung konnte das nicht beobachtet werden. Auch die Unterschiede zwischen den Duplikaten eines Versuchs (a und b) waren zu groß. Es wurde daher ein methodischer Fehler vermutet, woraufhin das Protokoll angepasst wurde.

Für die Versuche 5, 6, 8, 10, 11 und 12 wurde für jeden zu messenden Zeitpunkt ein CellCrown™-Insert mit entsprechender Folie vorbereitet. Für den Gesamt-LDH-Wert wurde nicht die Summe aller Messwerte verwendet. Stattdessen wurden die verbliebenen Zellen im Insert unmittelbar nach der Probennahme lysiert und dienten zusammen mit der freigesetzten LDH-Menge als Gesamt-LDH-Wert für jeden einzelnen Zeitpunkt.

A) LDH-Assay mit HepG2-Zellen: V5, 6, 8 und 11



B) LDH-Assay mit Hela-Zellen: V10 und 12

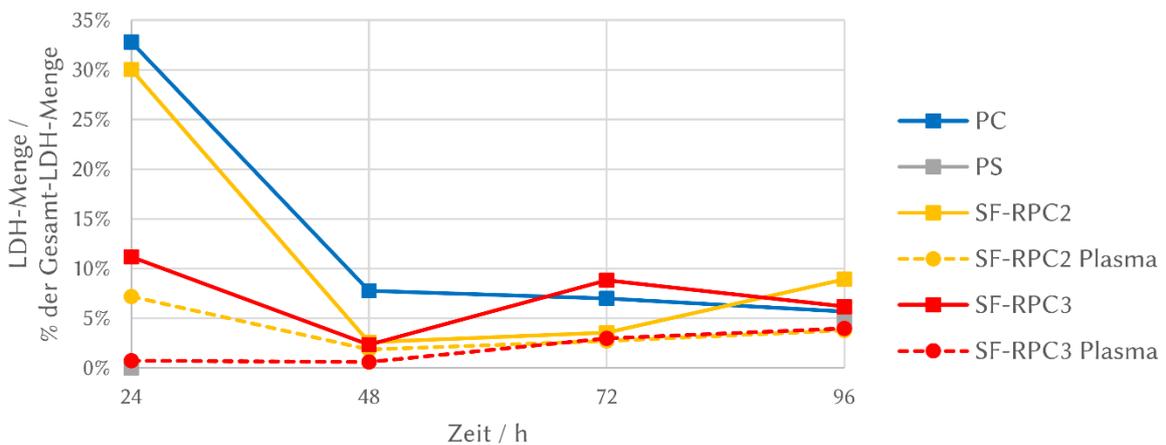


Abbildung 32: Darstellung der LDH-Versuche 5, 6, 8, 11 (HepG2) bzw. 10 und 12 (Hela) (n=3).

Es konnte vor allem zu Beginn ein höherer relativer LDH-Wert gemessen werden. Die Plasma-behandelten Varianten der Folien lagen deutlich unter den nicht behandelten Folien, im Bereich der PS-Referenz. Hierzu wurden ergänzend auch Lebend-Tot-Färbungen durchgeführt (siehe 6.2.2).

6.2.1.2 LDH-Assay in sticky slides (ibidi®)

Da dennoch die Abweichungen zwischen den einzelnen Versuchen relativ hoch waren und vor allem der hohe 24-Stunden-Wert nicht eindeutig erklärbar war, wurde das Protokoll für die folgenden Experimente nochmals optimiert. Statt des Einlegens in CellCrowns™ wurden die Folien nun auf sticky slides der Firma ibidi® geklebt. Dadurch war das Medienvolumen geringer und es konnte gewährleistet werden, dass beim Aussäen keine Zellen verloren gingen. Es wurden jedoch nur die besonders relevanten Werte nach 24 bzw. 96 h gemessen.

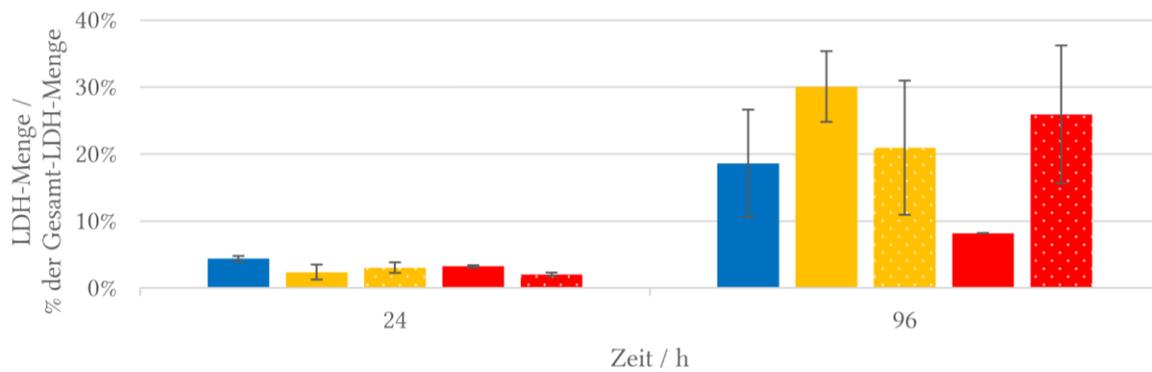
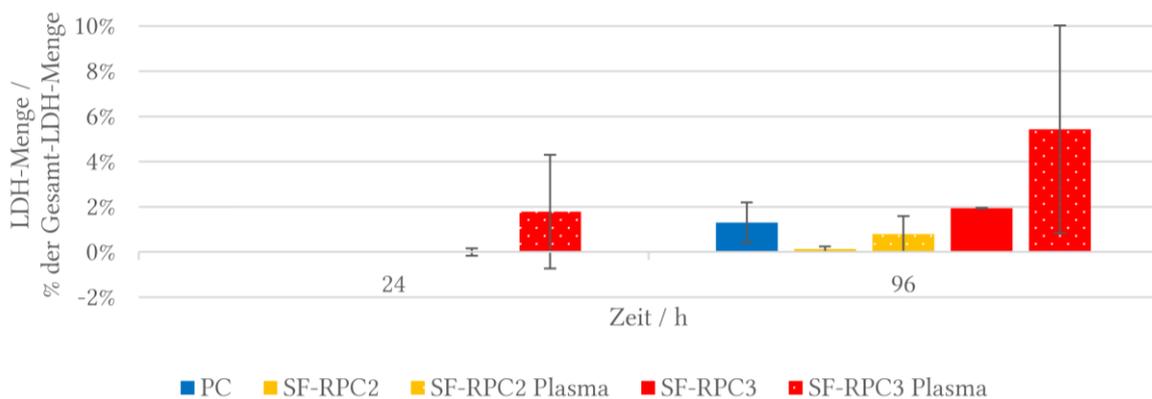
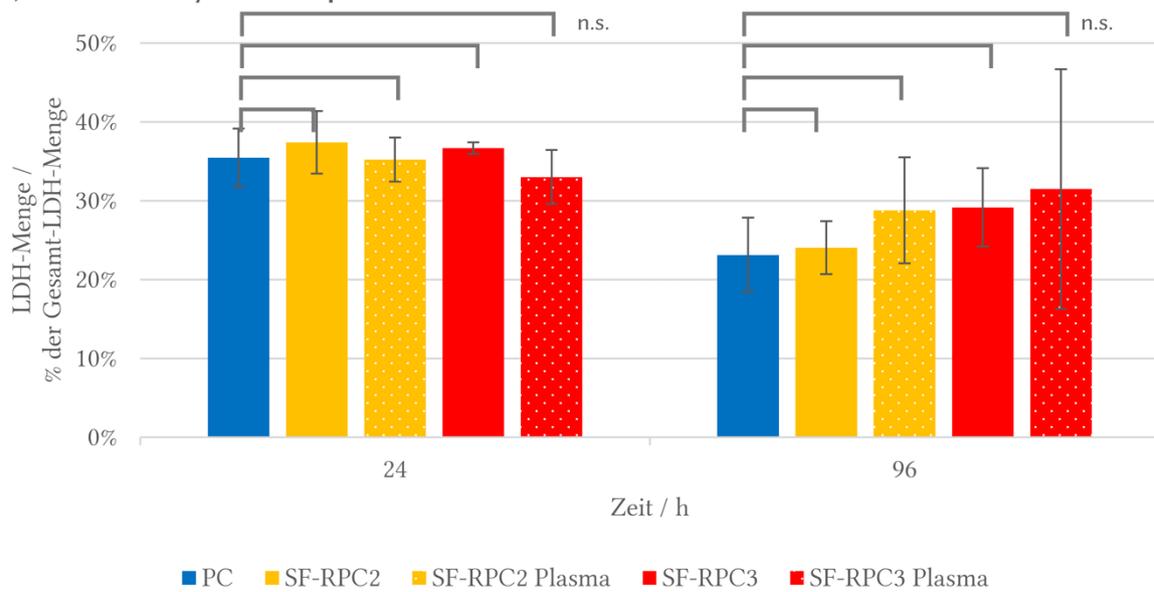
A) 2×10^4 Hela-Zellen (V14)B) 5×10^3 Hela-Zellen (V15)

Abbildung 33 Ergebnisse der LDH-Assays in sticky slides mit Hela-Zellen. A) 20.000 Hela-Zellen (Versuch 14) und B) 5.000 Hela-Zellen (Versuch 15) (n=2).

In Versuch 14 (Abbildung 33 A) wurden 2×10^4 Hela-Zellen pro Well der sticky slides ausgesät. Durch mikroskopische Aufnahmen konnte beobachtet werden, dass diese Zellzahl vermutlich zu hoch war. Daher wurde dieser Versuch als V15 mit nur 5×10^3 Hela-Zellen pro Well wiederholt. In beiden Fällen konnte beobachtet werden, dass nach 24 h die freigesetzte LDH-Menge vergleichbar mit der der PC-Folie war. In V15 (Abbildung 33 B) war die freigesetzte LDH-Menge der Zellen auf der SF-RPC3+Plasma-Folie deutlich höher, jedoch war auch der Fehler hier größer. Aufgrund der geringen Stichprobengröße (n=2) und der daraus resultierenden fehlenden statistischen Analyse, sind die Ergebnisse jedoch nur als Tendenzen zu werten.

A) LDH-Assay mit HepG2-Zellen: V14 & 15



B) Darstellung als Box-Plot

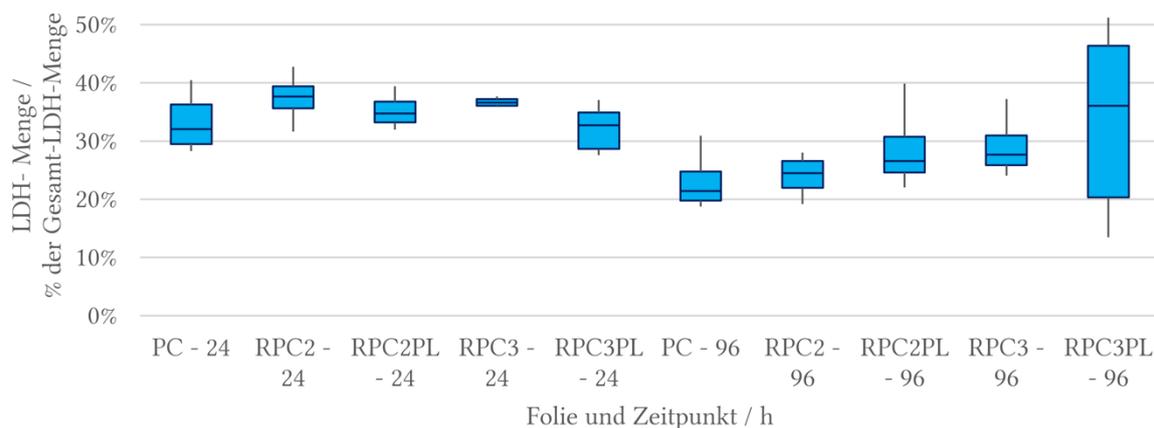


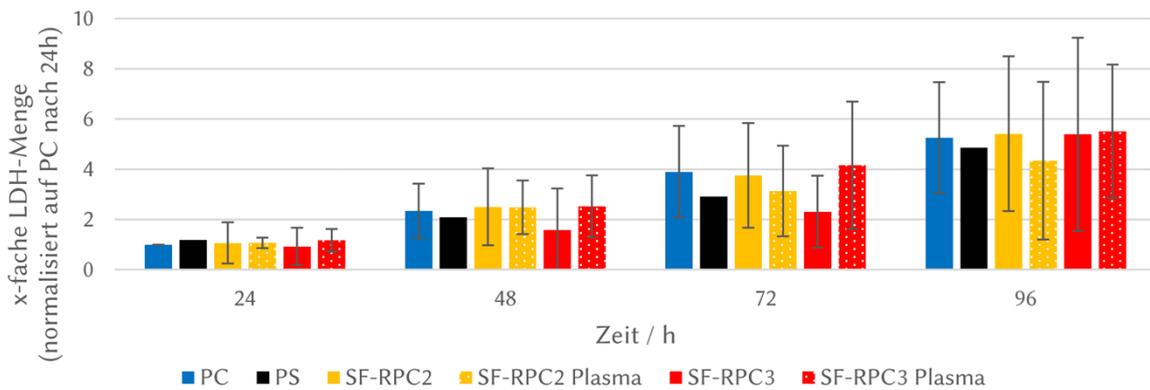
Abbildung 34: Ergebnisse des LDH-Assays mit HepG2-Zellen. Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests wurde keine signifikante Abweichung zwischen den Folientypen nach 24 bzw. 96 Stunden festgestellt. Auch der paarweise Vergleich der PC-Referenzfolie mit den Sensorfolien ergab keine signifikante Abweichung (siehe Klammern in A, n=4).

Bei der Verwendung von HepG2-Zellen zeigte sich, dass die Unterschiede der Sensorfolien im Vergleich zur PC-Kontrolle nur minimal waren (Abbildung 34). Die Stichprobengröße von n=4 ermöglichte eine erste statistische Bewertung der Ergebnisse. Zunächst wurden die Werte nach 24 bzw. 96 Stunden mit dem Kruskal-Wallis-Test verglichen, hierbei zeigte sich innerhalb der Zeitpunkte keine signifikante Abweichung der Messwerte untereinander. Der Vergleich der Messwerte der Sensorfolie mit der PC-Folie ergab auch mit dem Mann-Whitney-U-Test keine signifikante Abweichung. Aufgrund der Sensorantwort wurden in Hinblick auf die Biokompatibilität für weitere Versuche die SF-RPC3-Folien verwendet.

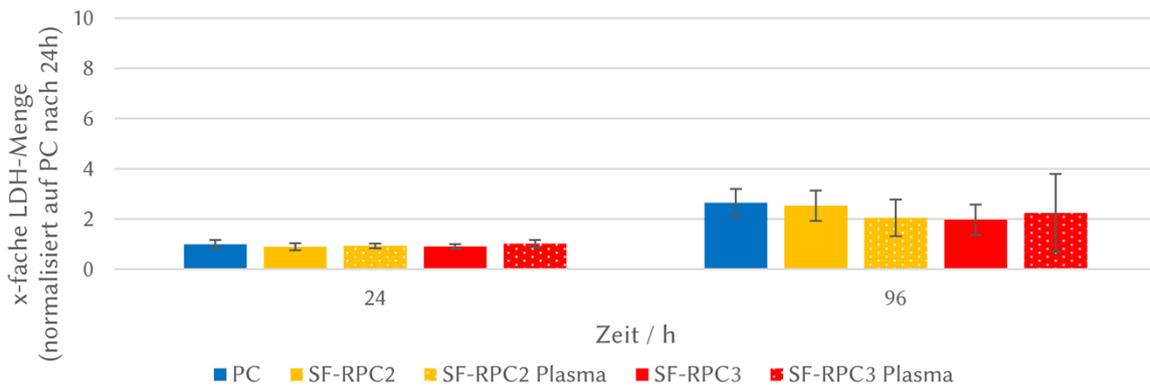
6.2.1.3 Vergleich des Gesamt-LDHs

Zusätzlich zur Betrachtung der freigesetzten LDH-Mengen, wurden die jeweiligen Gesamt-LDH-Mengen, aus den am Versuchsende lysierten Zellen, verglichen, was eine erste Abschätzung der Zellmenge darstellen kann. Diese Werte wurden auf den Referenzwert der LDH-Menge der lysierten Zellen auf PC-Folien nach 24-Stunden normiert.

A) LDH-Menge der HepG2-Zellen in CellCrown™



B) LDH-Mengen der HepG2-Zellen in sticky slides (ibidi®)



C) LDH-Mengen der Hela-Zellen in sticky slides (ibidi®)

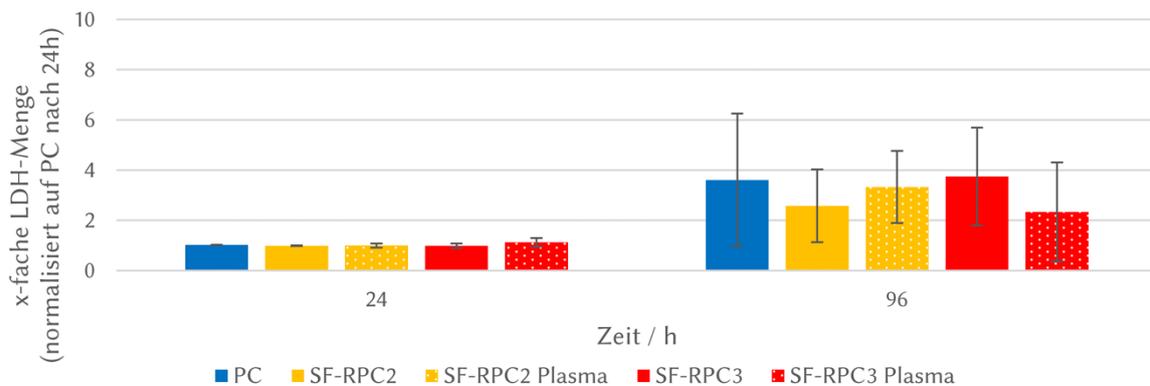


Abbildung 35: LDH-Mengen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung auf unterschiedlichen Folientypen.

Aus Abbildung 35 kann entnommen werden, dass die LDH-Menge der Zellen auf den Sensorfolien vergleichbar zu den Werten auf PC-Folien war.

6.2.1.4 LDH-Assay in 3D

Neben den 2D-LDH-Assays wurden auch LDH-Assays in den Sensorarrays, also in 3D durchgeführt. Hierbei war lediglich das Absterben der Zellen in SF-RPC2-Sensorarrays vergleichbar zu Mikrokavitätenarrays aus PC-Folien. Die anderen Folientypen, insbesondere die Plasma-behandelten, zeigten eine deutlich geringere Toxizität.

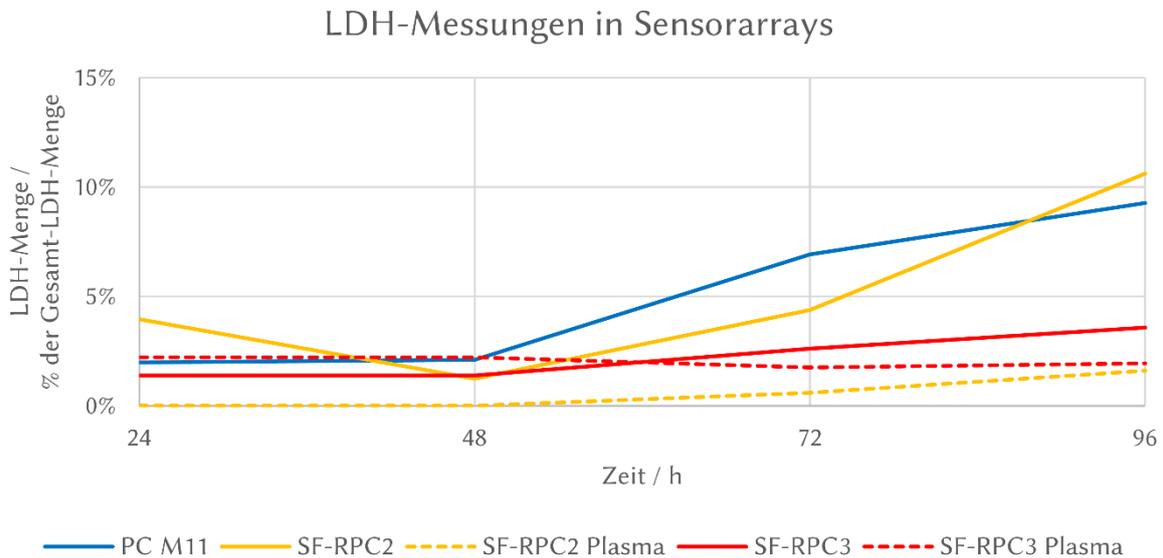


Abbildung 36: LDH-Assay in 3D in Sensorarrays. PC: n=4, SF-RPC2: n=3, andere: n=2.

6.2.2 Zellproliferation sowie Lebend-Tot-Färbungen

Zur Untersuchung des Zellwachstums wurde die Proliferation der Zellen auf verschiedenen (Sensor-)Folien konfokalmikroskopisch beobachtet. Hierfür wurden auch Lebend-Tot-Färbungen durchgeführt, um die LDH-Messungen zu validieren. Für die Lebend-Tot-Färbungen wurde SYTOTM 16 und Propidiumiodid verwendet. Beides sind Fluorophore, deren Fluoreszenz durch die Bindung an Nukleinsäuren erhöht wird. Da Propidiumiodid jedoch nur färbt, wenn die Zellmembran beschädigt wurde, dient es zum Färben toter Zellen. Zur Zellzählung wurde die Open Source Software CellProfilerTM verwendet. Diese erstellte zunächst aus den Farbbildern Bilder in Graustufen, auf denen die Zellen im jeweiligen Kanal als Objekte identifiziert wurden.

Insgesamt wurde, im Vergleich zur PC-Kontrolle, bei allen Sensorfolien kein erhöhter Anteil abgestorbener Zellen detektiert (Abbildung 37 und Abbildung 38). Jedoch konnte, insbesondere bei den SF-RPC2+Plasma-Folien, eine deutlich höhere Zellproliferation als bei den SF-RPC2-Folien beobachtet werden (Abbildung 37).

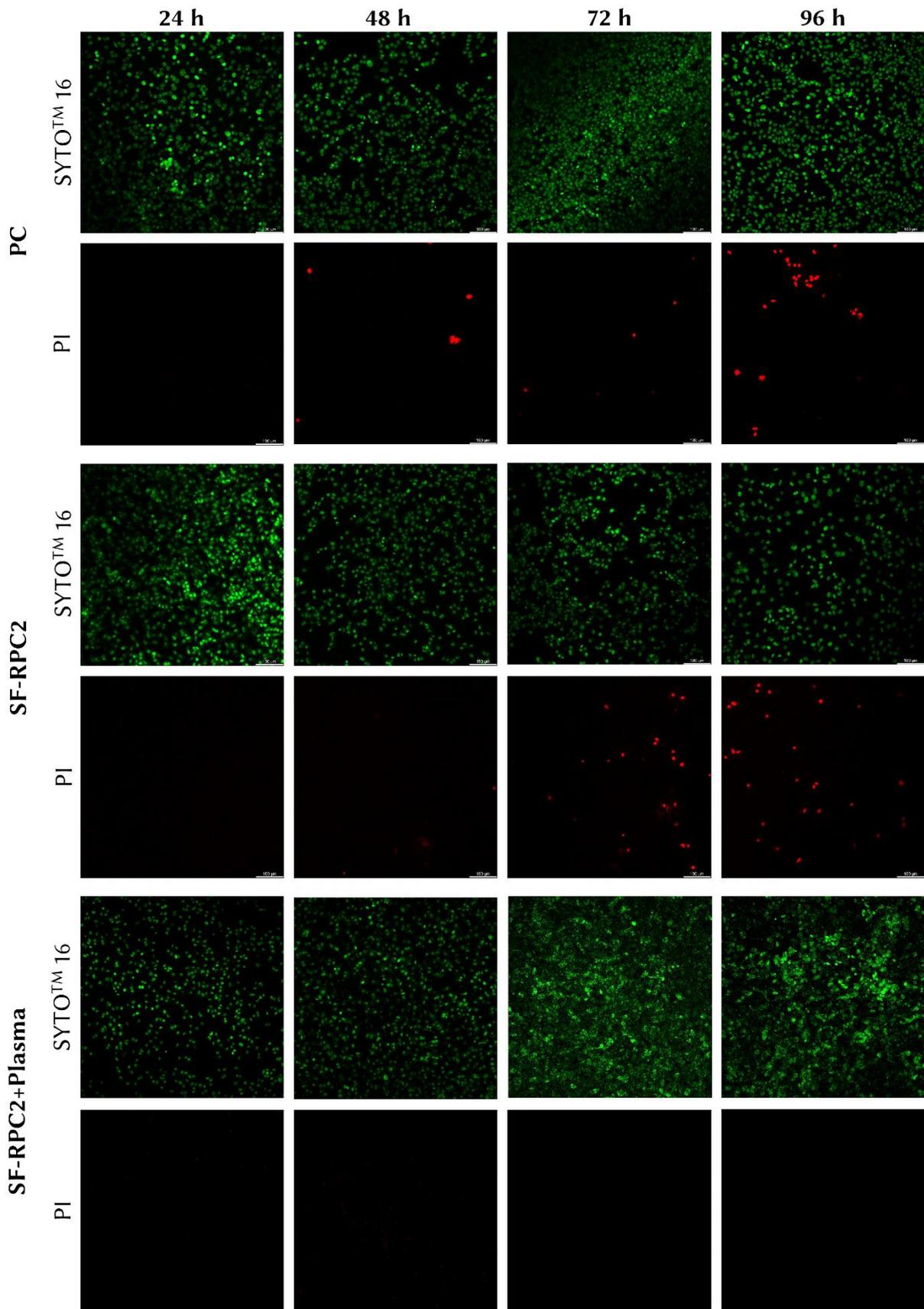


Abbildung 37: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von HepG2-Zellen auf Polycarbonat-Folien (Versuch 5), SF-RPC2 (Versuch 5) sowie SF-RPC2+Plasma (Versuch 6). Es wurden jeweils 50.000 HepG2-Zellen ausgesät und zum jeweiligen Zeitpunkt mit 1 μ M PI und 5 μ M SYTO™ 16 gefärbt. Gesamtvergrößerung 100x, Maßstabsbalken = 100 μ m.

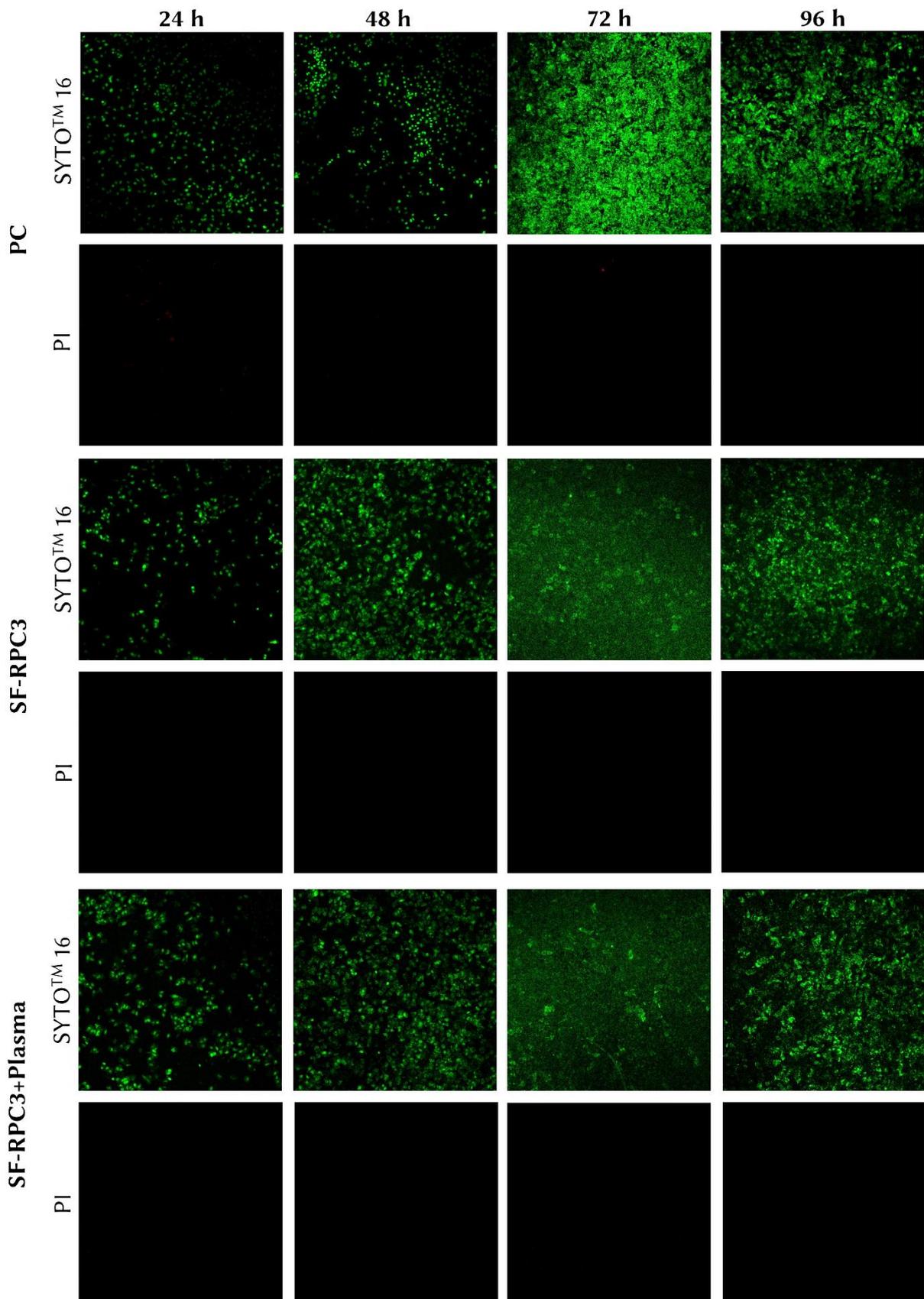
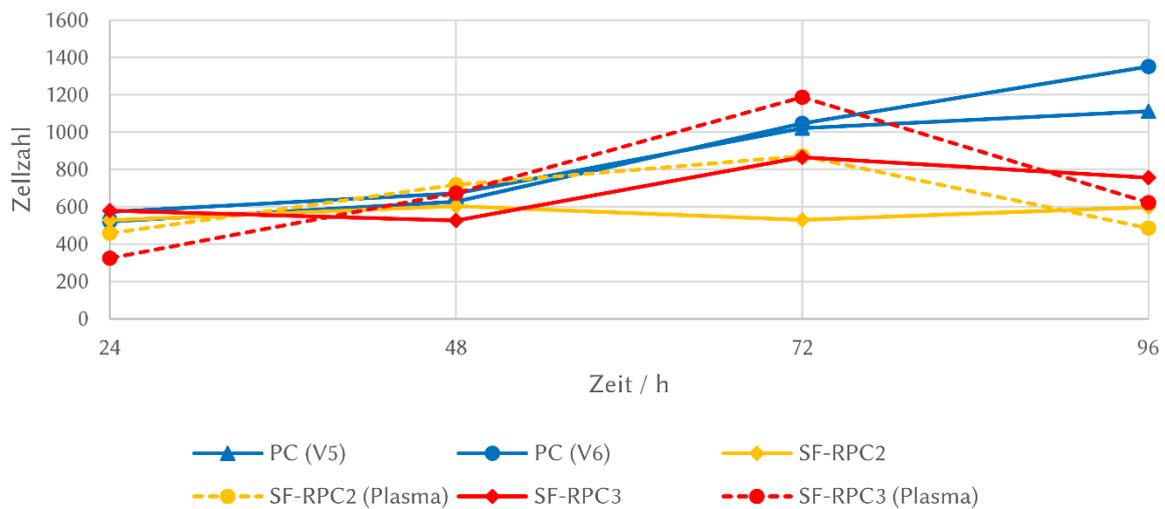


Abbildung 38: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von HepG2 Zellen auf Polycarbonat-Folien (Versuch 6), SF-RPC3 (Versuch 6) sowie SF-RPC2+Plasma (Versuch 6). Es wurden jeweils 50.000 HepG2-Zellen ausgesät und zum jeweiligen Zeitpunkt mit 1 μ M PI und 5 μ M SYTOTM 16 gefärbt. Gesamtvergrößerung 100x, Maßstabsbalken = 100 μ m.

A) Proliferation



B) Lebend-Tot-Färbung (V5 & 6)

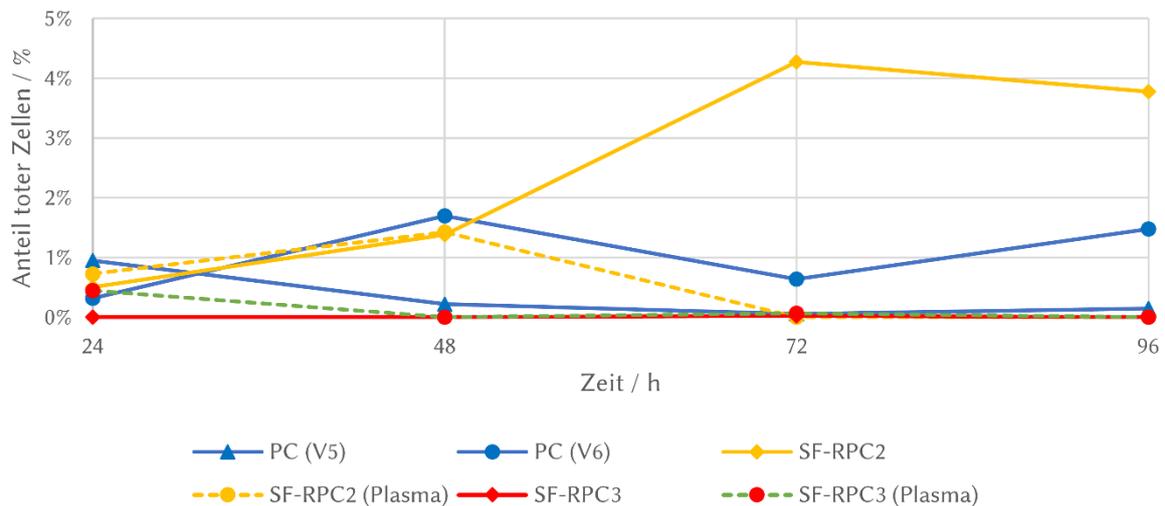


Abbildung 39: Auswertung der A) Proliferation und B) dem Anteil toter Zellen. Für die Auswertung wurden je Zeitpunkt mindestens 3 Mikroskopbilder der SYTOTM16 bzw. der PI-Färbung mittels CellProfilerTM analysiert.

Erwartungsgemäß kam es zu einer Zunahme der Zellzahl während der Versuchsdauer (Abbildung 39 A). Insbesondere auf den PC-Folien war dies gut zu sehen. Bei den Plasma-behandelten Sensorfolien war die Proliferation zunächst bis zu 72 Stunden vergleichbar mit der auf den PC-Folien, dann nahm die Zellzahl jedoch deutlich ab. Aus der Betrachtung der Gesamt-LDH-Mengen (Abbildung 35) konnte jedoch tendenziell eine Zunahme der LDH-Menge auch auf den Plasma-behandelten Sensorfolien beobachtet werden. Daher wurde in diesem Zusammenhang die Auswertemethode mittels CellProfilerTM genauer untersucht (Anhang 1). Hierbei konnten gerade bei dichter wachsenden Zellen Abweichungen in der Detektion der einzelnen Zellen durch CellProfilerTM beobachtet werden.

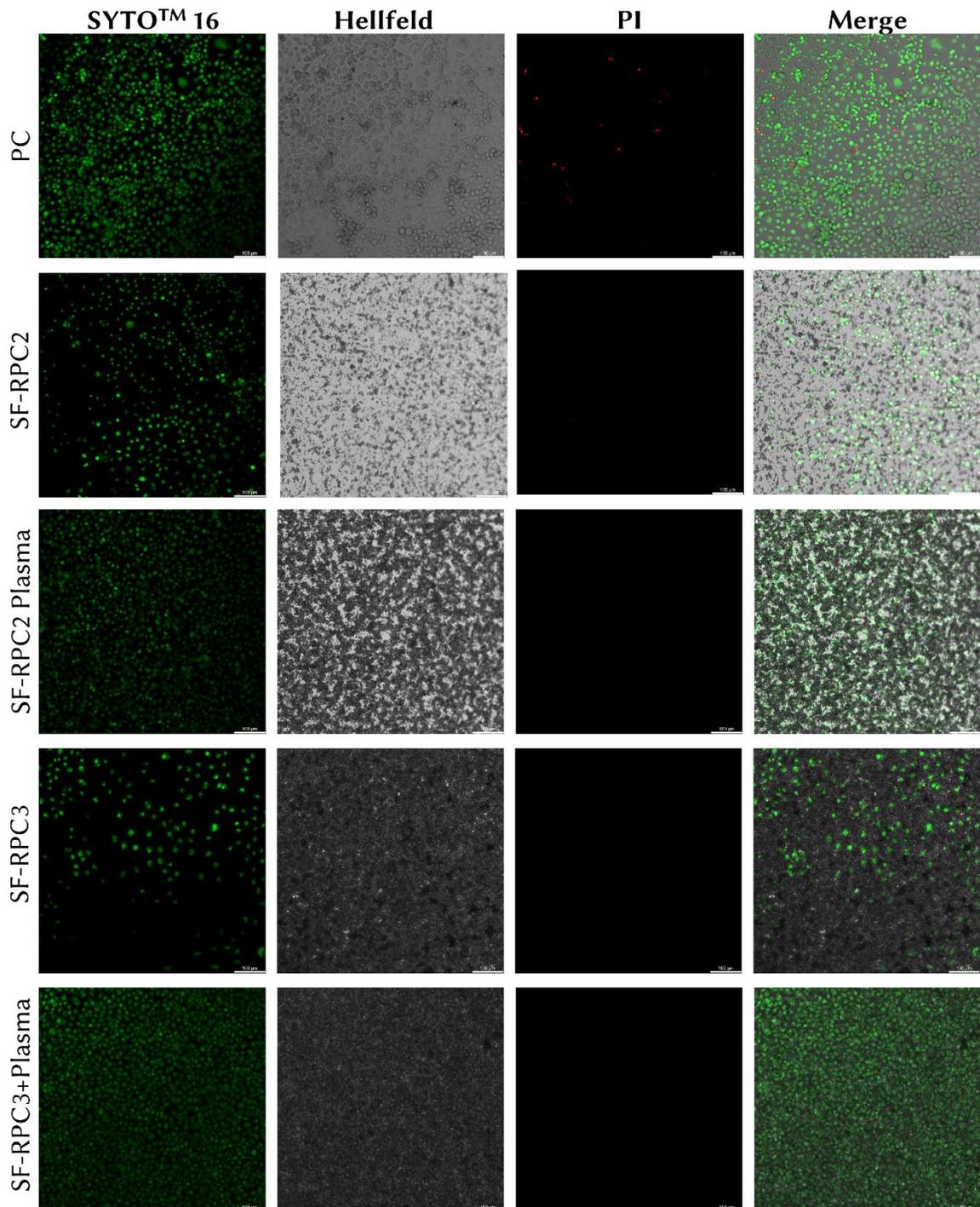


Abbildung 40: HeLa-Zellen nach 96 h Kultur auf PC bzw. Sensorfolien. Es wurden jeweils 50.000 HeLa-Zellen ausgesät und nach 96 h mit 1 μM PI und 5 μM SYTO™ 16 gefärbt. Gesamtvergrößerung 100x, Maßstabsbalken = 100 μm .

Auch die Kultivierungsversuche mit HeLa-Zellen (Abbildung 40) zeigten, dass sich für die 2D-Kultur adhärenter Zellen die Plasma-Behandlung der Sensorfolien positiv auswirkte und das Zellwachstum hier vergleichbar mit dem auf Polycarbonat-Folien war. Für die adhärente Zellkultur wurden daher SF-RPC3+Plasma-Folien bevorzugt. Für neue Chargen der Folien wurden zur Bestätigung der Biokompatibilität Wachstumsversuche (Abbildung 41) und auch LDH-Assays durchgeführt (Tabelle 22).

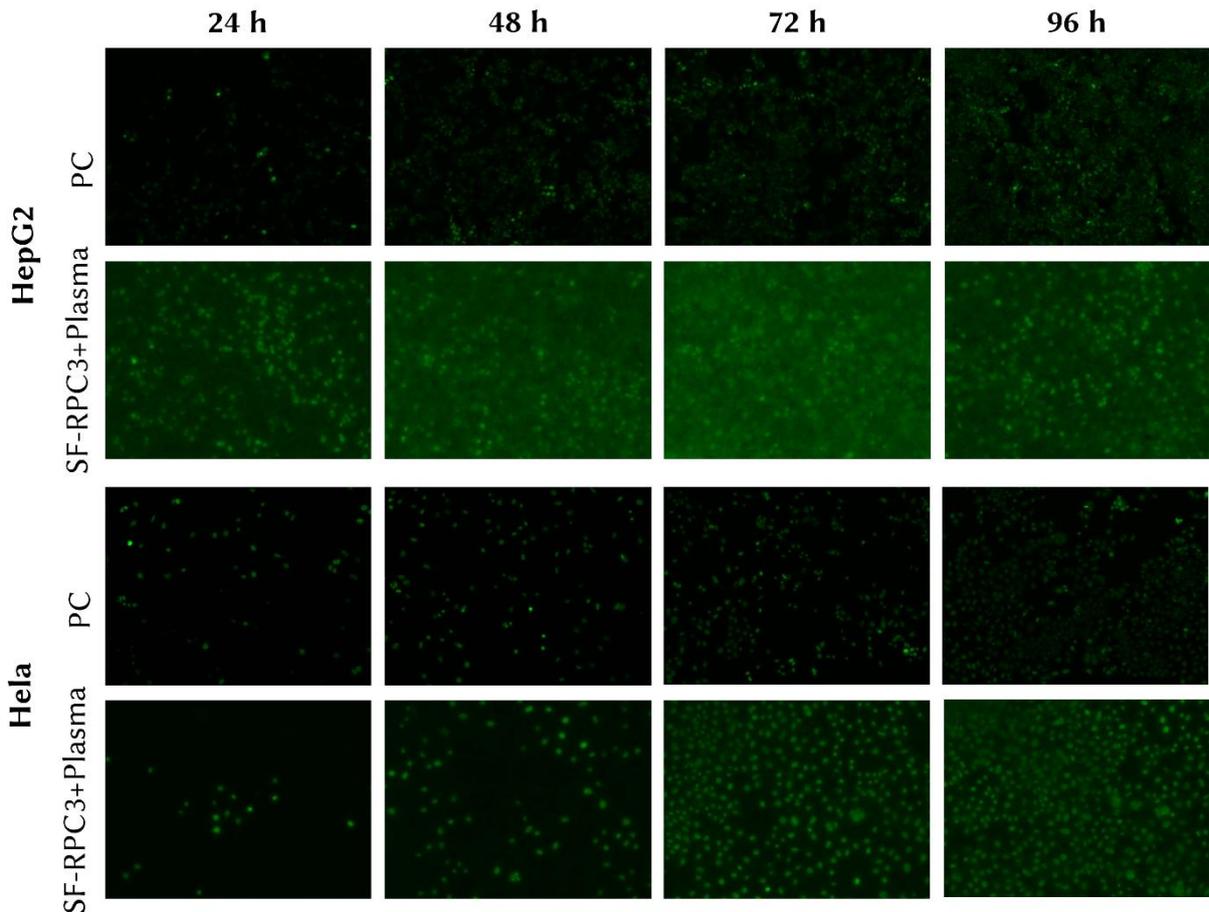


Abbildung 41: Wachstum der HepG2 bzw. HeLa-Zellen auf PC bzw. SF-RPC3+Plasma-Folien. Es wurden jeweils 40.000 HepG2-Zellen bzw. 5.000 HeLa-Zellen in sticky slides ausgesät und zum jeweiligen Zeitpunkt mit 5 μM SYTOTM 16 gefärbt. Gesamtvergrößerung 100x.

6.2.3 Vergleich der Beschichtungen

Ziel der Arbeit war jedoch nicht die Kultivierung von Zellen auf planaren Folien, sondern die Generierung von Zellaggregaten in Mikrokavitäten, also in den Sensorarrays. Während für die Toxizitäts- und Proliferationstests der einzelnen Sensorfolien planare, Kollagen-beschichtete Folien verwendet wurden, ist diese Beschichtung möglicherweise für die Generierung von Sphäroiden nicht die optimale. Kollagen fördert im Allgemeinen die Adhäsion der Zellen an einer Oberfläche. Für die Aggregation zu Sphäroiden kann die Adhäsion an die Oberfläche jedoch hinderlich sein. Daher wurden verschiedene Beschichtungen der Plasma- bzw. der nicht-behandelten Sensorfolien getestet. Neben den unbeschichteten (Sensor-)Arrays wurden (Sensor-)Arrays mit Kollagen bzw. mit BIOFLOATTM beschichtet. Während Kollagen, wie beschrieben, die Adhäsion der Zellen begünstigt, bewirkt BIOFLOATTM, dass Zellen nicht an der Oberfläche adhären können. Beim Befüllen der Mikrokavitäten konnte es dazu kommen, dass Luftblasen in diesen eingeschlossen blieben. Das in der Arbeitsgruppe Gottwald etablierte Standardprotokoll sah daher eine Behandlung der Mikrokavitätenarrays mit einer Isopropanolreihe mit absteigender Isopropanolkonzentration vor. Neben dem Entfernen der Luftblasen,

diente dieses auch zur Desinfektion der Mikrokavitätenarrays. Für die Sensorarrays war dies generell auch möglich, jedoch ist die Isopropanolreihe nicht anwendbar, wenn eine BIOFLOAT™-Beschichtung durchgeführt werden soll, da dieses Beschichtungsreagenz auch in einem alkoholischen Lösungsmittel vorliegt und die Beschichtung schlechter funktionierte, wenn die Folien mit Wasser/Isopropanol befeuchtet waren. Aus diesem Grund wurden andere Methoden getestet, um die Luftblasen zu entfernen. Die erste Überlegung war Luftblasen durch Anlegen eines Unterdrucks aus den Mikrokavitäten zu entfernen. Hierfür wurde ein Adapter (Abbildung 42) entwickelt, der an eine Vakuumpumpe zur Absaugung von Medium angeschlossen werden kann und auf die Wells einer 12-Well-Platte passt. Der Unterdruck wurde nach Aufbringen der BIOFLOAT™-Lösung angelegt. Das Beschichtungsprotokoll sieht vor dem Aussäen der Zellen ein vollständiges Trocknen vor, sodass unmittelbar vor dem Aussäen der Zellen PBS^{+/+} auf die Sensorarrays gegeben und nochmals Unterdruck angelegt wurde. Mit dieser Methode konnten zuverlässig Luftblasen entfernt werden. Dies wurde lichtmikroskopisch überprüft. Ein Nachteil zeigte sich jedoch bei diesem Verfahren darin, dass die Methode stark abhängig von der Leistung der Absaugpumpe ist und nicht unbedingt so in anderen Laboren reproduziert werden kann. Daher wurde im Laufe der Experimente eine zweite Methode etabliert, bei der die Sensorarrays in den 12-Well-Platten bei 300 g für 1 min zentrifugiert wurden. Beide Methoden entfernten zuverlässig die Luftblasen aus den Sensorarrays und konnten daher, abhängig von der Laborausstattung, eingesetzt werden.

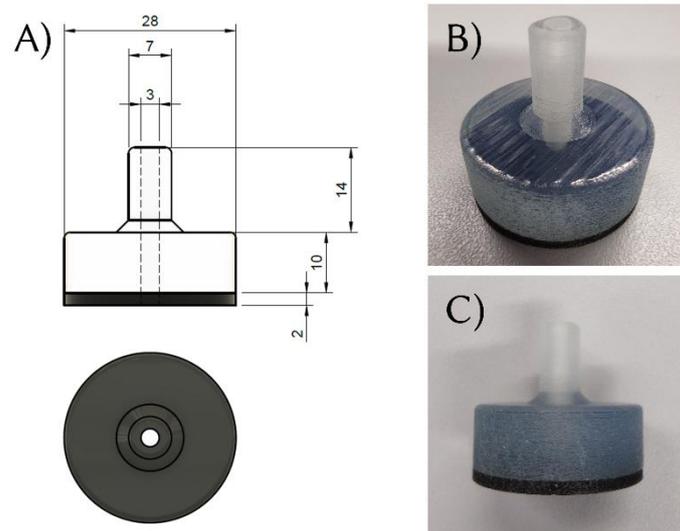


Abbildung 42: Vakuump-Adapter für 12-Well-Platte. A) Technische Zeichnung. B) & C) Fotos des gedruckten Prototypen.

Der Vergleich der Beschichtungen erfolgte mit HepG2-Zellen als Modellsystem, da diese vergleichsweise einfach und kostengünstig in der Handhabung sind. Erste Beschichtungsversuche zeigten, dass in Kollagen-beschichteten Folien das Zellwachstum gleichmäßig über die

gesamte Oberfläche erfolgte (Abbildung 43 A und B). Die BIOFLOAT™-Beschichtung hingegen bewirkte eine Aggregation der Zellen in der Mitte der Kavität. In den PC-Arrays war diese deutlicher zu erkennen und auch die Sphäroide waren hier im Vergleich zu den Sensorarrays (SF-RPC1) größer und gleichmäßiger. Die gleichmäßigere Aggregation in BIOFLOAT™-beschichteten Sensorarrays konnte auch mit 500 bzw. 800 µm Sensorarrays beobachtet werden (Abbildung 43 C und D).

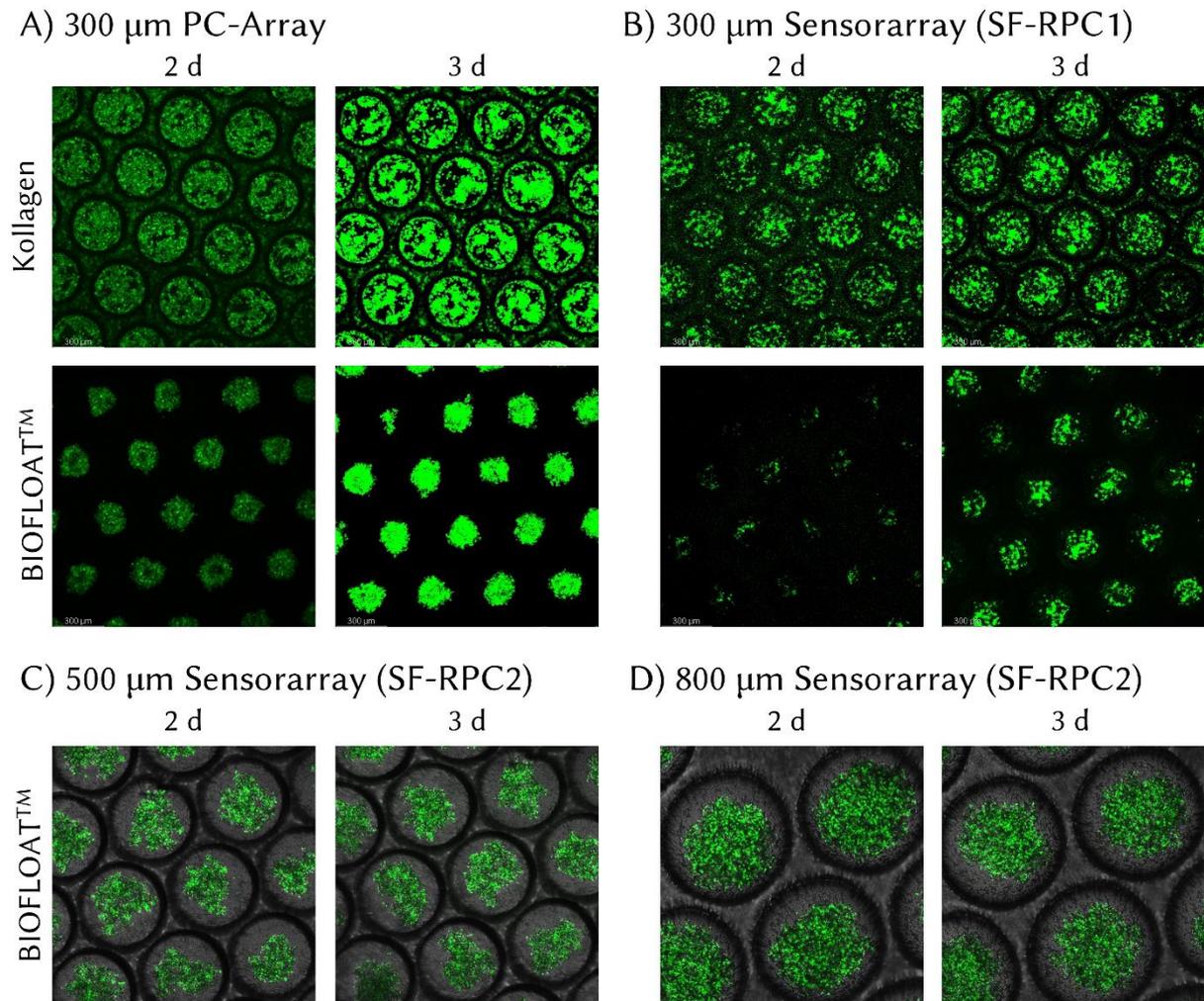


Abbildung 43: Erste 3D-Kultivierungsversuche von HepG2-Zellen in (Sensor-)Arrays. A) 300 µm PC-Arrays mit Kollagen- bzw. BIOFLOAT™-Beschichtung. B) 300 µm Sensorarrays (SF-RPC1) C) 500 µm Sensorarrays (SF-RPC2) und C) 800 µm Sensorarrays (SF-RPC2). Es wurden jeweils 1×10^6 HepG2-Zellen, gefärbt mit $1 \mu\text{M}$ CellTracker™ Green, ausgesät. Gesamtvergrößerung: 100 x, Maßstabsbalken: 100 µm.

Es wurde jedoch gerade bei längeren Experimenten beobachtet, dass die Zellen sehr dicht waren. Dies zeigte sich auch in den parallel dazu durchgeführten Sauerstoffmessungen (6.4.2). Daher wurde die Zellzahl zu Versuchsbeginn verringert. Optimale Ergebnisse konnten mit 5×10^4 Zellen pro (Sensor-)Array erzielt werden. Die Beschichtungsversuche wurden mit den neuen Folienmaterialien (SF-RPC2) fortgesetzt. Hierfür wurden die optimierten Formmasken (siehe 6.1.4) verwendet.

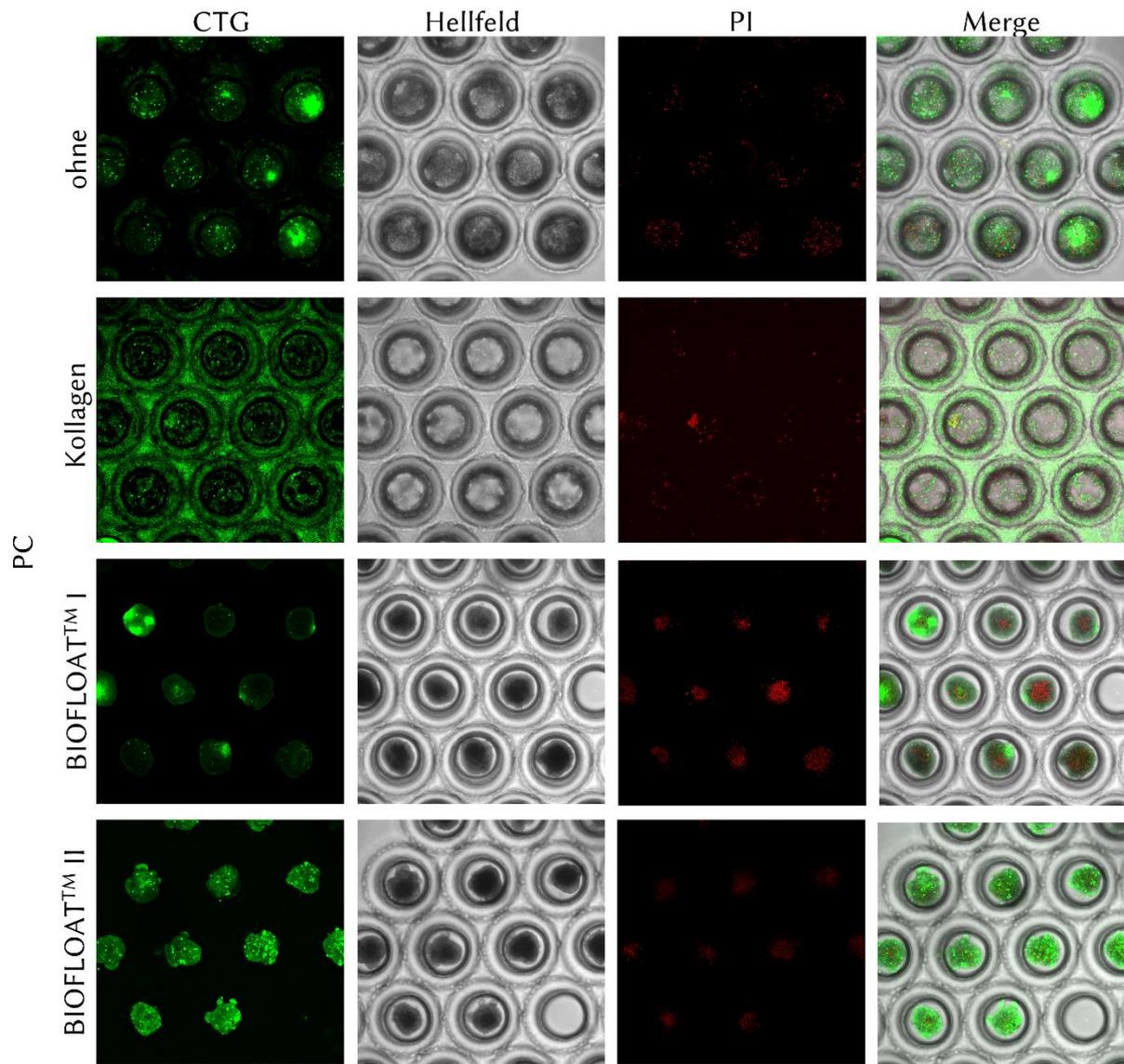


Abbildung 44: Mikrokapitänarrays aus PC-Folien mit unterschiedlichen Beschichtungen. Es wurden 5×10^4 Zellen pro Array ausgesät. Die Färbung erfolgte vor dem Aussäen mit CellTracker™ Green (CTG). Mikroskopie erfolgte alle 24 Stunden, dargestellt sind hier die Ergebnisse nach 10 Tagen, zudem gefärbt mit PI. Gesamtvergrößerung: 100 x.

Als Vergleich zur Untersuchung des Einflusses der Beschichtung auf das Zellwachstum dienten Mikrokapitänarrays (Arrays) aus PC-Folien (Abbildung 44). In den unbeschichteten PC-Arrays konnte ein Zellwachstum und eine Aggregation im Bereich der Mikrokapitänarrays beobachtet werden, während bei der Kollagenbeschichtung ein gleichmäßiges Wachstum auch im Bereich der Fase und der nicht-verstreckten Bereiche zu sehen war. In den Sensorarrays (SF-RPC2, Abbildung 45) adhärten die Zellen auch ohne Beschichtung im Bereich der Fase und der nicht-verstreckten Folie. Das Zellwachstum bzw. die Aggregation der beiden BIOFLOAT™-Beschichtungen war sowohl in den PC-Arrays als auch in den Sensorarrays erfolgreich und vergleichbar. In den Sensorarrays wurden etwas weniger tote Zellen beobachtet als in den PC-Arrays. Die beiden Beschichtungsvarianten BIOFLOAT™ I und BIOFLOAT™ II unterschieden

sich dahingehend, dass bei I nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen wurde, bei II wurde unmittelbar nach der Beschichtung PBS^{+/+} auf die Arrays gegeben, ohne eine Trocknung, um das Protokoll zu vereinfachen. Die Ergebnisse der Zellaggregation waren jedoch vergleichbar.

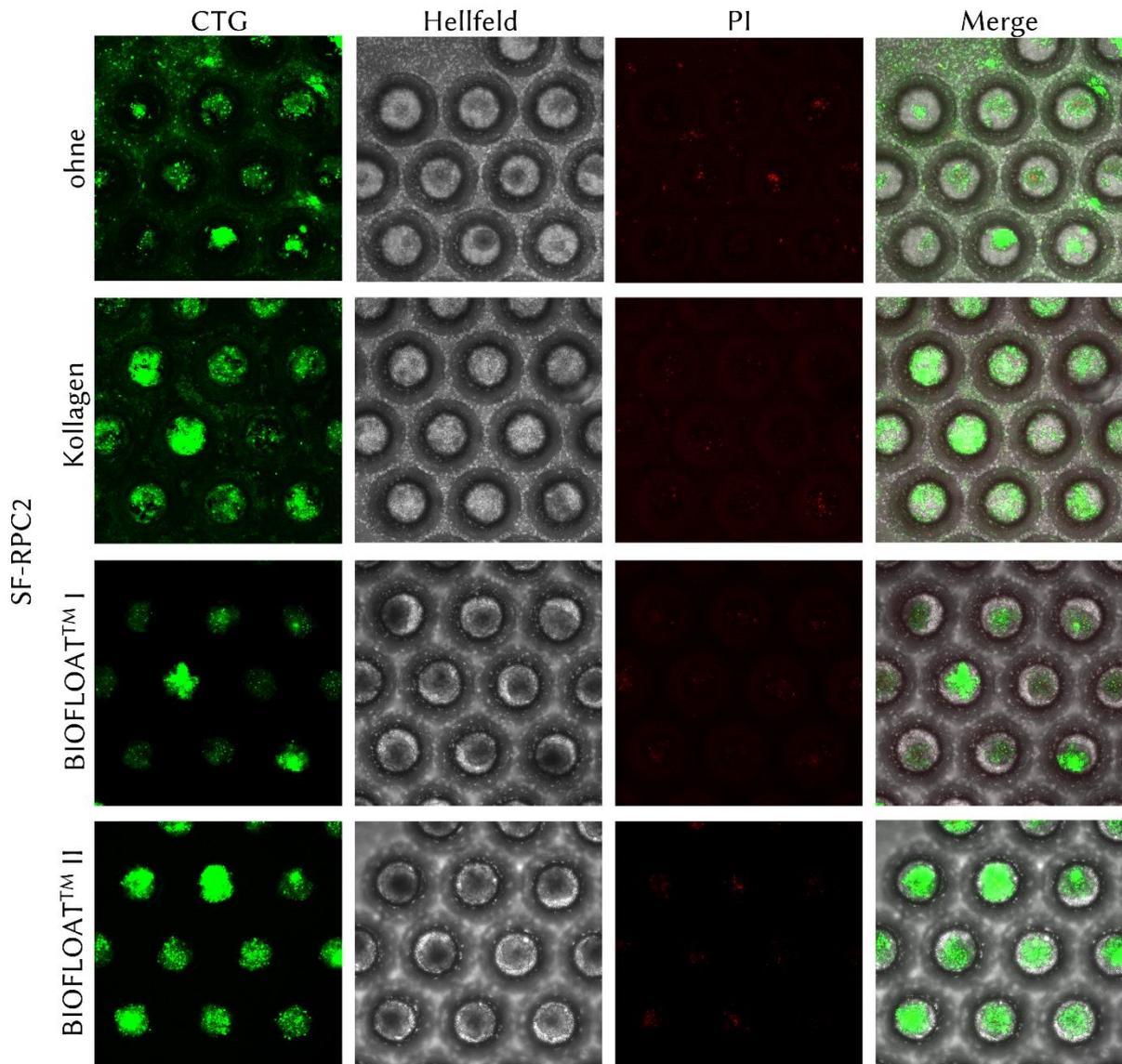


Abbildung 45: Sensorarrays aus der SF-RPC2-Folie mit unterschiedlichen Beschichtungen. Die Färbung erfolgte vor dem Aussäen mit CellTracker™ Green (CTG). Mikroskopie erfolgte alle 24 Stunden, dargestellt sind hier die Ergebnisse nach 10 Tagen zudem gefärbt mit PI. Gesamtvergrößerung: 100 x

Neben der Beschichtung der Folien mit BIOFLOAT™ bzw. Kollagen wurde auch der Einfluss der Plasmabehandlung der Sensorfolien vor dem Thermoformen untersucht. Abbildung 46 zeigt Sensorarrays der Folie SF-RPC3 bzw. SF-RPC3+Plasma, in denen ohne Beschichtung und mit Kollagen- bzw. BIOFLAT™-Beschichtung jeweils 50.000 HepG2-Zellen über 96 Stunden kultiviert wurden. Auf unbeschichteten Plasma-behandelten Sensorarrays adhärten die Zellen besser als auf den nicht Plasma-behandelten. Auch bei der BIOFLOAT™- bzw. der Kollagenbeschichtung konnte der Unterschied in der Plasmabehandlung beobachtet werden.

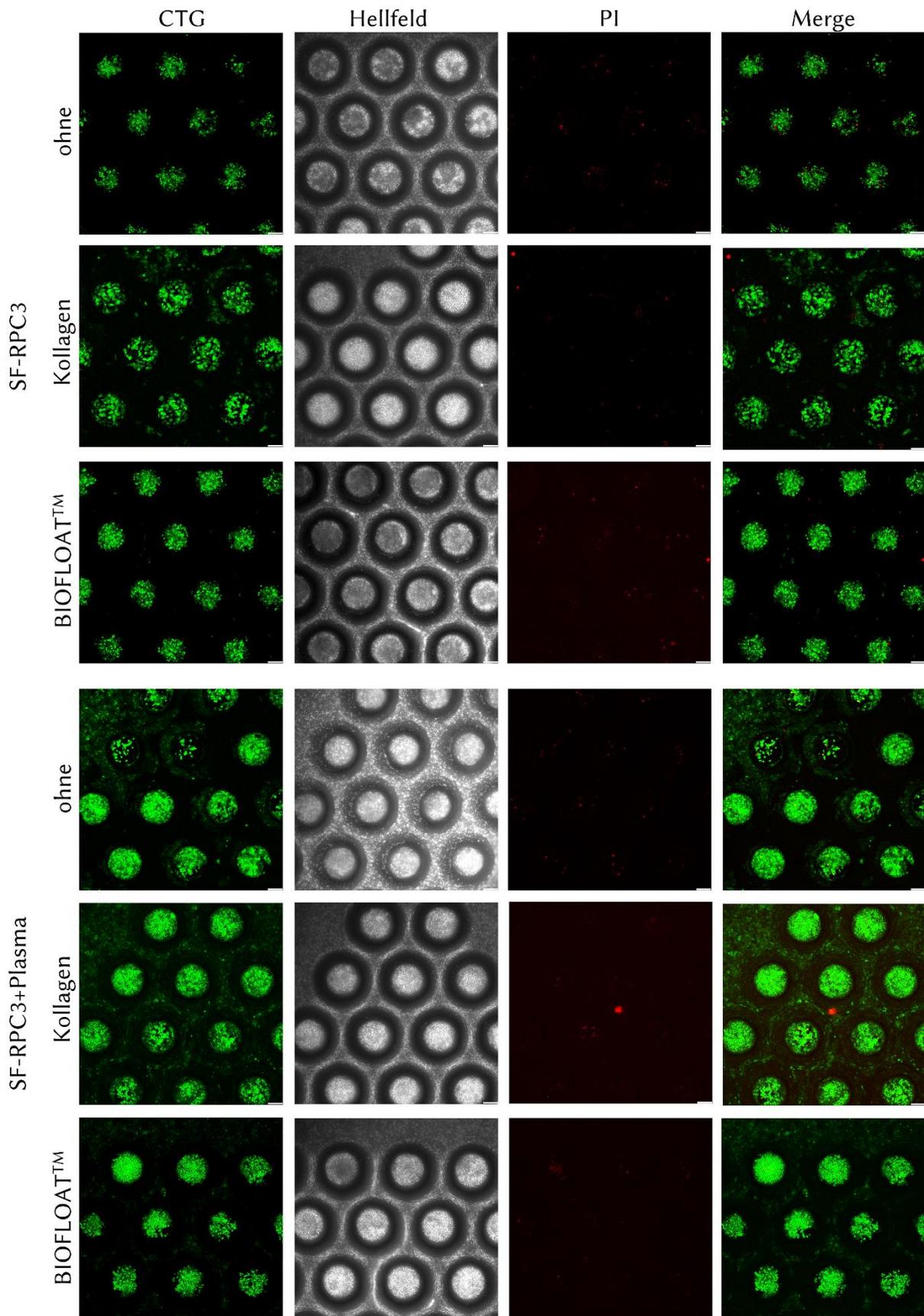


Abbildung 46: Unterschiedliche Beschichtungen der SF-RPC3-Folien mit und ohne Plasmabehandlung, 96 h nach Aussäen der Zellen. Gesamtvergrößerung: 100 x, Maßstabsbalken: 100 µm.

Über 96 Stunden wurde alle 24 Stunden mikroskopiert (Abbildung 47). Bereits nach 24 Stunden bildeten sich erste Zellaggregate. Bei den Plasma-behandelten Sensorarrays konnte beobachtet werden, dass Zellen sich auch außerhalb der Mikrokavitäten anhefteten.

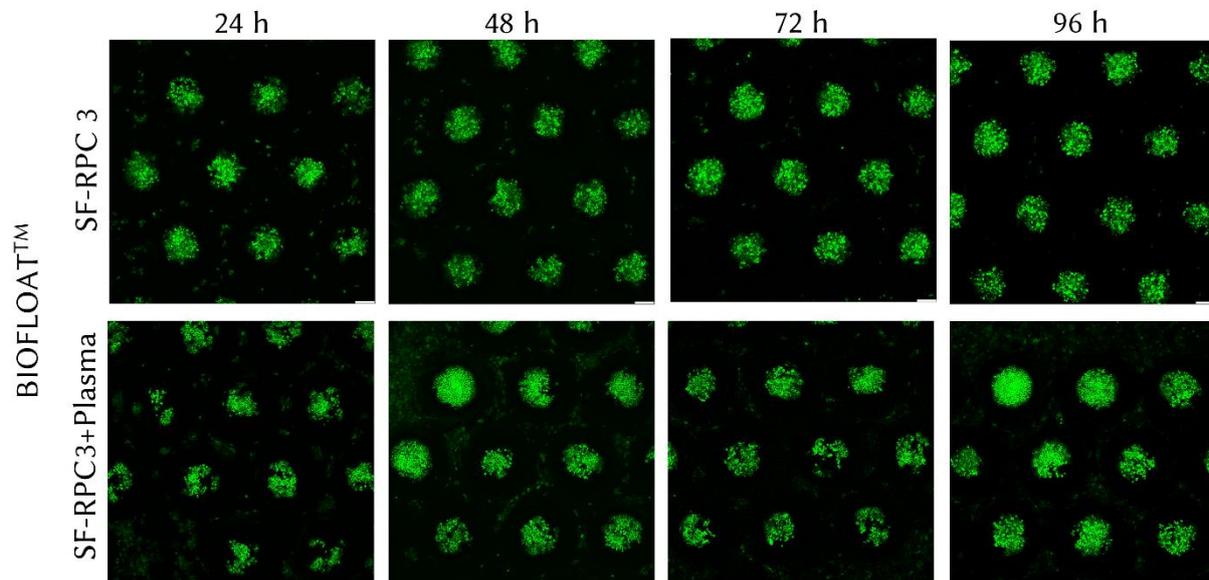


Abbildung 47: CTG Färbung der HepG2-Zellen über einen Zeitraum von 96 Stunden. Gesamtvergrößerung: 100 x, Maßstabsbalken: 100 μm .

Durch den Vergleich der Plasmabehandlung sowie der unterschiedlichen Beschichtungsreagenzien konnten je nach Anwendungsgebiet unterschiedliche Kombinationen als sinnvoll definiert werden. Für die weiteren Versuche wurden Sphäroide benötigt. Für deren Generierung eigneten sich die nicht Plasma-behandelten Sensorarrays mit einer BIOFLOAT™-Beschichtung am besten. Aus sensorischer Sicht wurden die SF-RPC3-Folien den SF-RPC2-Folien vorgezogen. Für andere Anwendungsgebiete ist möglicherweise das Anwachsen der Zellen notwendig, hierfür würden sich dann Plasma-behandelte Folien mit einer Kollagenbeschichtung eher eignen.

6.3 Entwicklung statischer und mikrofluidischer Kultivierungssysteme

Für bisherige Anwendungen der Mikrokavitätenarrays in der Arbeitsgruppe Gottwald wurden diese meist in Mikrobioreaktoren (MBR) (siehe 3.3) unter fluidischen Bedingungen verwendet. Gerade für das Testen verschiedener Folien- und Beschichtungsvarianten war jedoch ein höherer Durchsatz an Folien notwendig, wofür die MBR im Aufbau und in der Handhabung zu komplex waren. Erste Versuche wurden daher in statischen Systemen durchgeführt. Auch für die Sauerstoffmessungen waren statische Systeme zunächst bevorzugt. Durch die fehlende Fluidik erfolgte hier die Sauerstoff-Diffusion nur entlang der Z-Achse, was die Betrachtungen eines neuen Systems vereinfachte. Zunächst wurden geeignete statische Systeme dafür definiert.

Da aber für komplexere biologische Modelle fluidische Anwendungen von großem Interesse sind, wurde in einem weiteren Teilprojekt der Mikrobioreaktor auf die Sensorarrays angepasst. In diesem Zusammenhang wurden dann auch weitere Module, wie bspw. eine Blasenfalle und ein Gasaustauschmodul konstruiert und gefertigt.

6.3.1 Statische Systeme

Die Anforderungen an statische Systeme waren, dass sie möglichst kostengünstig sein sollten und es flexibel möglich sein muss verschiedene Folientypen zu testen. In einem ersten Schritt wurden daher die kommerziell erhältlichen Zellkulturinserts „CellCrown™“ verwendet, in die die Sensorarrays eingelegt werden konnten.

Für weitergehende Anwendungen wurden zudem eigene Insertvarianten für 12-Well-Platten entwickelt. Die Sensorarrays konnten mit diesen verschweißt werden, was die Bereitstellung etwas unflexibler als bei den CellCrown™ machte, aber dafür die Reproduzierbarkeit erhöhte.

6.3.1.1 CellCrown™

Die CellCrown™-Zellkulturinserts wurden bereits in 6.2.1.1 vorgestellt, da hier mit planaren, nicht-geformten Folien die LDH-Assays in diesen Inserts durchgeführt wurden. Diese sollten auch für die Versuche mit Sensorarrays (z.B. in 6.2.3) verwendet werden (Abbildung 48). Neben der Flexibilität bzgl. der Art der Sensorarrays, lag ein weiterer Vorteil darin, dass sie mehrfach verwendet werden konnten und damit vergleichsweise kostengünstig waren.



Abbildung 48: CellCrown™ 12NX mit eingesetztem 800 µm Sensorarray.

Ein Nachteil wurde in 6.2.1.1 bereits beschrieben: Dadurch, dass die Sensorarrays nur in das Insert eingelegt wurden, konnte es vorkommen, dass der Bereich innerhalb des Inserts nicht komplett zum darunterliegenden Well abgegrenzt war. Dennoch überwogen die Vorteile, sodass dieses System für die Etablierung der Sensorarrays sowie erster biologischer Modelle eingesetzt wurde.

6.3.1.2 Verschweißte Zellkultureinsätze

Um den Nachteil der Undichtigkeit der CellCrowns™ zu umgehen, wurde ein Ansatz gewählt die Sensorarrays direkt mit den Zellkulturinserts zu verschweißen. Das Verbinden der Teile wurde durch einen Kooperationspartner (Telproecta EOOD, Bulgarien) realisiert, indem eine biokompatible, haftvermittelnde Schicht auf die Bauteile aufgetragen und die Bauteile dann durch Laserschweißen verbunden wurden.

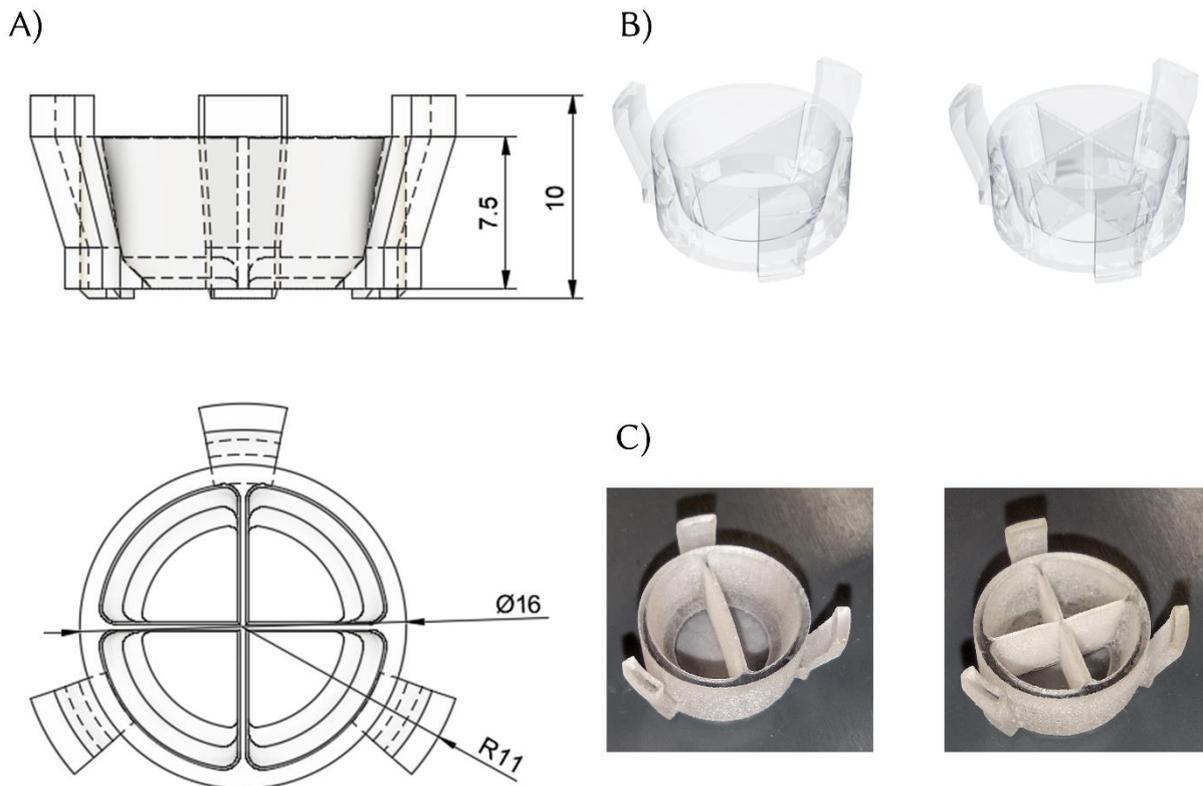


Abbildung 49: Neuentwicklung eines Inserts mit mehreren Wells. A) Skizze des konstruierten Zellkulturinserts mit vier unabhängigen Wells zur Verwendung von Sensorarrays mit vier Arrayfeldern (siehe Abbildung 23). B) Gerenderte Darstellung der Inserts mit zwei und vier Kammern. C) Abbildungen der gedruckten Prototypen mit verschweißten planaren Sensorfolien.

In ersten Tests wurde die Verbindungstechnik hinsichtlich Dichtigkeit getestet. Hierfür wurden 3D-gedruckte Zellkulturinserts (Abbildung 49 C) mit planaren Sensorfolien (SF-RPC2) verschweißt. Es zeigte sich, dass diese Technik funktionierte. Auch die schmale Stegbreite der Unterteilungen der einzelnen Wells gewährleistete eine ausreichende Dichtigkeit.

Getestet wurde die Dichtigkeit, indem in zwei Wells (1 und 4) 10 mg/ml Natriumsulfit und in ein Well (2) Wasser gegeben wurde. Dies war möglich, da das Natriumsulfit gelösten Sauerstoff umsetzt. Wären Undichtigkeiten vorhanden, würde die Sauerstoffkonzentration im mit Wasser gefüllten Well abnehmen. Das Well 3 blieb leer. Anschließend wurden alle 10 min Bilder aufgenommen und daraus die relative Sauerstoffkonzentration gemessen (Abbildung 50).

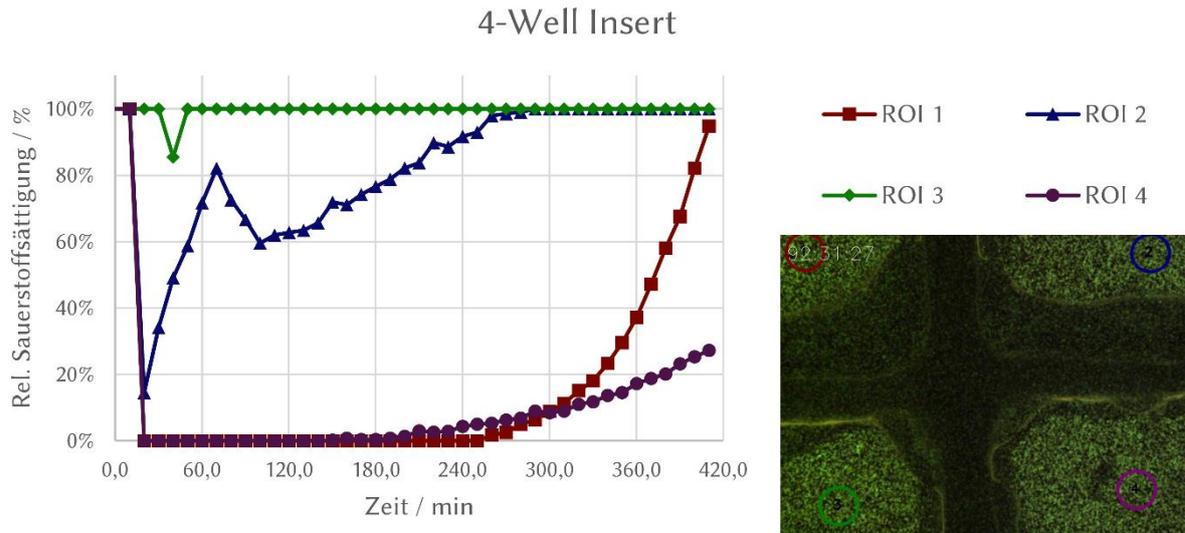


Abbildung 50: Kontrolle der Verschweißung im 4-Well-Insert, indem in zwei Wells (ROI1 und 4) Natriumsulfit gegeben wurde.

Zu erkennen war, dass der Wert des Luft-gefüllten Wells (ROI 1) nahezu konstant blieb. Dieser Wert wurde als 100 % Sauerstoffsättigung angenommen. Der Ausreißer zu Beginn lag am Öffnen der Inkubatortür und somit einer kurzzeitigen Sauerstoffänderung. Die Sauerstoffsättigung der beiden Wells, die mit Natriumsulfitlösung gefüllt waren, blieb zunächst für ca. drei Stunden bei 0 % und stieg dann an. Wäre die Verschweißung undicht, wäre es hier zum Austausch mit den umgebenden Wells gekommen und es wären ungleichmäßige Änderungen der Sauerstoffsättigungen zu sehen.

Es war zudem möglich Hela- bzw. HepG2-Zellen in den 4-Well-Inserts zu kultivieren. Ein Nachteil des verwendeten Druckmaterials (VeroClear) war jedoch, dass das Entfernen des Stützmaterials viel Zeit in Anspruch nahm. Die Druckteile mussten mehrere Tage mit Wasser gewaschen werden, da sich sonst überschüssiges Material negativ auf das Zellwachstum auswirkte. Da jedoch ein Paket mit weiteren Prototypen für diese Versuche während des Versands abhanden kam, konnten keine weiteren Tests durchgeführt werden. Dies wird in einem Folgeprojekt nachgeholt.

Um ein kompakteres System zu ermöglichen, wurde zudem ein Halterahmen für die neuentwickelten Inserts konstruiert (Abbildung 51). Dieser ermöglicht die Aufnahme von bis zu drei Inserts für Sensorarrays und hat die Abmessungen eines Objektträgers (76 x 26 mm). Vorteile waren hier in erster Linie die Kompatibilität zu anderen Laborgeräten, wie bspw. Mikroskopen.

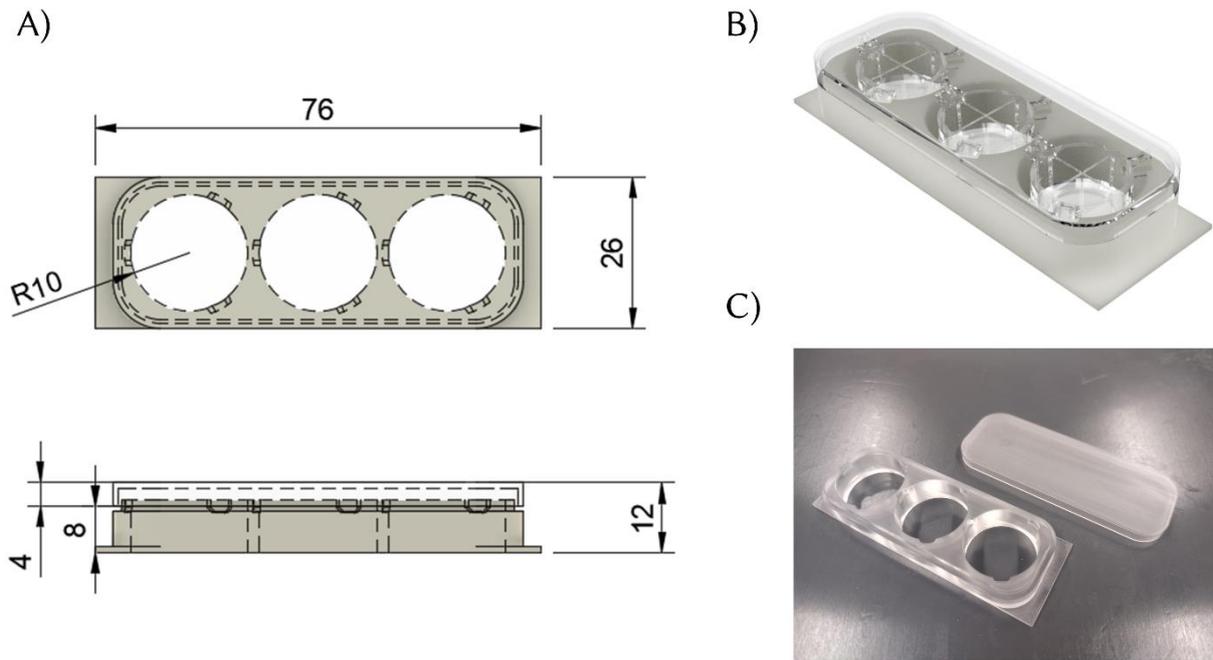


Abbildung 51: Halterahmen im Objektträgerformat für Zellkulturinserts mit Sensorarrays. A) Technische Zeichnung, B) Computermodell mit Inserts und C) geprägter Prototyp.

6.3.2 Mikrofluidische Systeme

Mikrofluidische Systeme sind deutlich komplexer als statische, bieten aber einige Vorteile. Aus diesem Grund sollte im Rahmen der Arbeit der bereits etablierte Mikrobioreaktor auf die Sensorarrays angepasst werden. Da die Sensorarrays im Gegensatz zu den bisher in der Arbeitsgruppe verwendeten Mikrokavitätenarrays nicht porös sind, ist ein vereinfachter Aufbau möglich. Immer wieder zeigte sich in der mikrofluidischen Zellkultivierung, dass Luftblasen im System auftreten können, die das Experiment negativ beeinflussen. Aus diesem Grund wurden auch verschiedene Konzepte für eine Blasenfalle erarbeitet. Die Umsetzung und Testung der ersten Konzepte erfolgte im Rahmen der Co-Betreuung der Projektarbeit von Dominik Moosmann (DHBW-Student, KIT).

Daneben wurden noch mögliche Realisierungsformen von Begasungsmodulen getestet, um in einer späteren Ausbauvariante mikrofluidischer Systeme eine Regelung der Sauerstoffkonzentration zu ermöglichen.

6.3.2.1 Blasenfallen

Es wurden verschiedene Blasenfallen konstruiert und getestet. Gemeinsam hatten sie jedoch ePTFE-Membranen, die zwar gasdurchlässig, aber undurchlässig für wässrige Lösungen sind. Zum Testen der Funktionsweise wurde ein einfacher Versuchsaufbau realisiert, mit dem gezielt Blasen in das System eingebracht werden konnten (Abbildung 52).

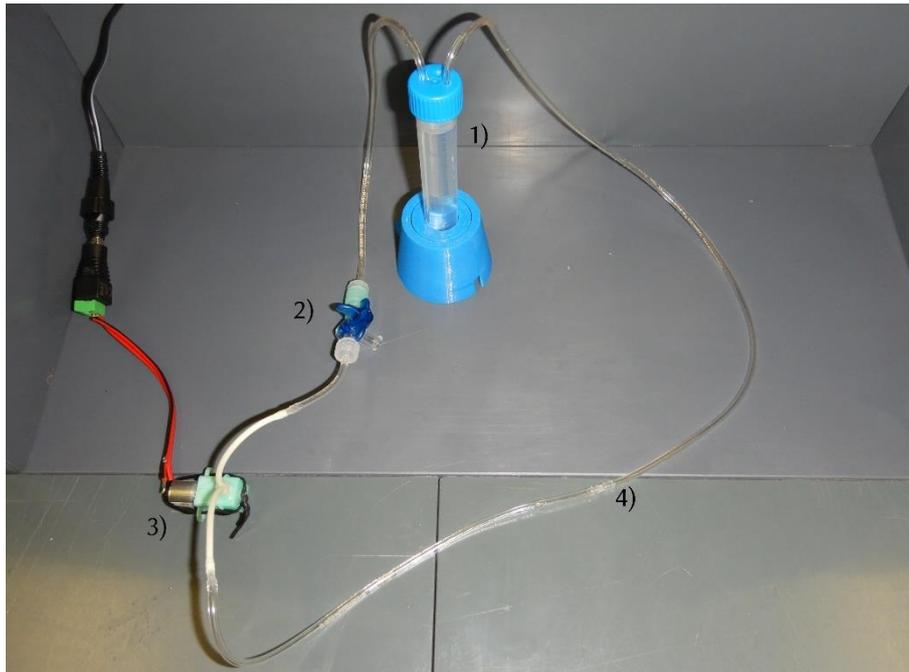


Abbildung 52: Testaufbau für Funktionstests der Blasenfallen. 1) Flüssigkeitsreservoir, 2) Drei-Wege-Ventil zum gezielten Einbringen der Luftblasen, 3) Miniaturschlauchpumpe und 4) Anschluss für Blasenfallen.

Erste Konzepte

Zunächst wurden drei Konzepte der Blasenfalle konstruiert, 3D-gedruckt und getestet (Abbildung 53).

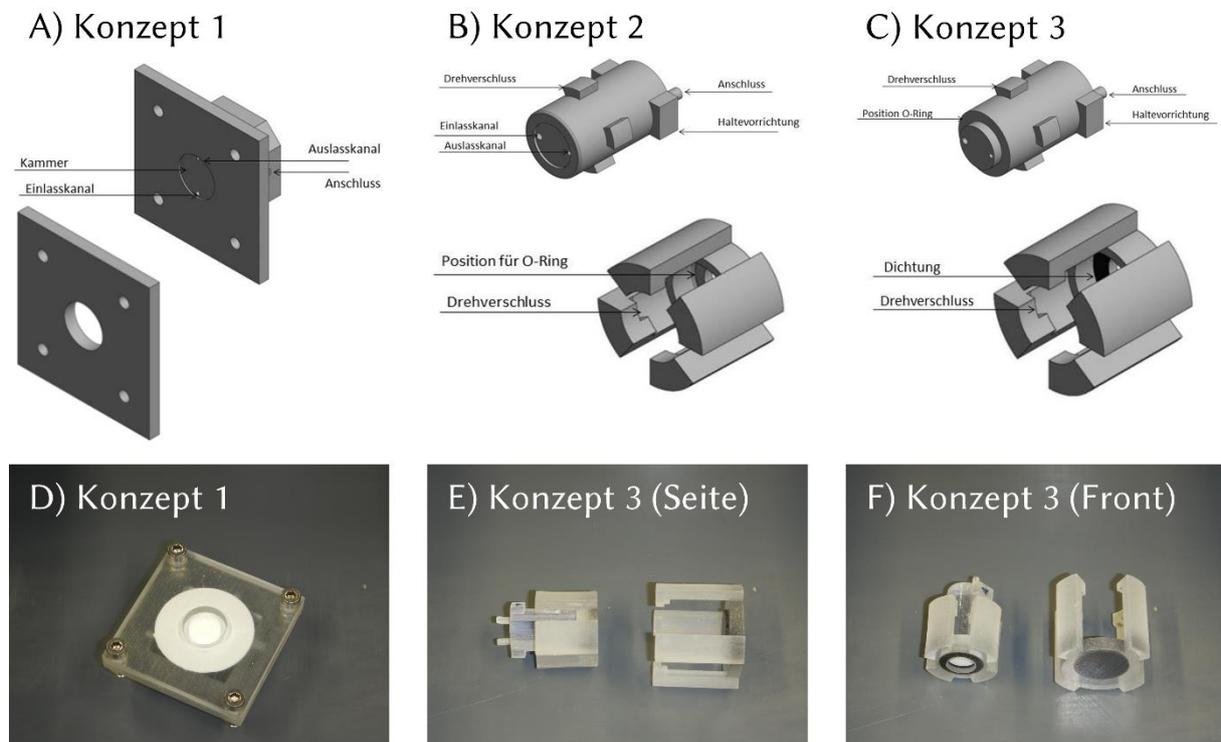


Abbildung 53: Erste Konzepte der Blasenfalle. A) Konzept 1: Die ePTFE-Membran wird mit Schrauben zwischen zwei Platten gespannt. B) Konzept 2: Einspannen der ePTFE-Membran in eine gedruckte Halterung. Die Abdichtung erfolgte durch Einlegen eines O-Rings oder C) Konzept 3 durch eine gedruckte Dichtung. D) Bild der gedruckten und funktionsbereiten Blasenfalle nach Konzept 1. E) und F) Bilder des Konzepts 3, erweitert um einen Verschlussmechanismus zum Spülen der Blasenfalle.

Bei der ersten Variante wurde eine ePTFE-Membran (Dicke: 0,5 mm) zwischen zwei gedruckte Rahmen durch vier Schrauben eingespannt. Die Kanäle im Inneren wurden strömungsoptimiert gebogen, was jedoch eine längere Drucknachbearbeitung notwendig machte, um Restmaterial zu entfernen. Bei der zweiten und dritten Variante erfolgte die Fixierung durch einen Drehmechanismus. Abdichtet wurden diese durch einen O-Ring (Konzept 2) oder eine integrierte, gedruckte Dichtung (Konzept 3). In allen drei Varianten betrug der Innendurchmesser des Einlasskanals 1,5 mm und der des Auslasskanals 1,0 mm, um einen Überdruck und eine zuverlässigere Blasenentfernung zu gewährleisten.

In ersten Funktionstests dieser drei Modelle konnte die Dichtigkeit bestätigt werden. Zudem konnten mit allen drei Varianten zuverlässig die erzeugten Blasen entfernt werden. Von Konzept 1 wurden Varianten mit geringerem internem Volumen (39 bzw. 8 µl) angefertigt. Diese konnten Blasen jedoch nicht mehr ausreichend entfernen.

Tabelle 23: Eigenschaften der ersten drei Blasenfallen-Konzepte.

<i>Parameter</i>	<i>Konzept 1</i>	<i>Konzept 2</i>	<i>Konzept 3</i>
<i>Material</i>	VeroClear (RGD810)	VeroClear (RGD810) und O-Ringe	VeroClear (RGD810) und Agilus30-Black
<i>Fixierung der ePTFE-Membran</i>	Durch vier Schrauben	Drehverschluss	Drehverschluss
<i>Internes Volumen (berechnet)</i>	86 µl	101 µl	128 µl
<i>Weitere Merkmale</i>	Selbstabdichtend durch ePTFE-Membran, Nachbearbeitung nach 3D-Druck aufwendig durch gebogene Kanäle	Verwendung dünnerer Membranen möglich	Verwendung dünnerer Membranen möglich

Zur Funktionstestung wurden nacheinander Wasser, PBS^{-/-} sowie HepG2-Medium mit 400 µl/min durch die Blasenfallen gepumpt. Mit Hilfe des 3-Wege-Hahns wurden Blasen einer definierten Länge generiert. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei Konzepte Luftblasen zuverlässig aus Wasser und PBS^{-/-} entfernten. Luftblasen in HepG2-Medium konnten lediglich mit Konzept 1 zuverlässig entfernt werden (Abbildung 54). Bei Konzept 2 und 3 war dies nur bei größeren Luftblasen möglich (Abbildung 55).

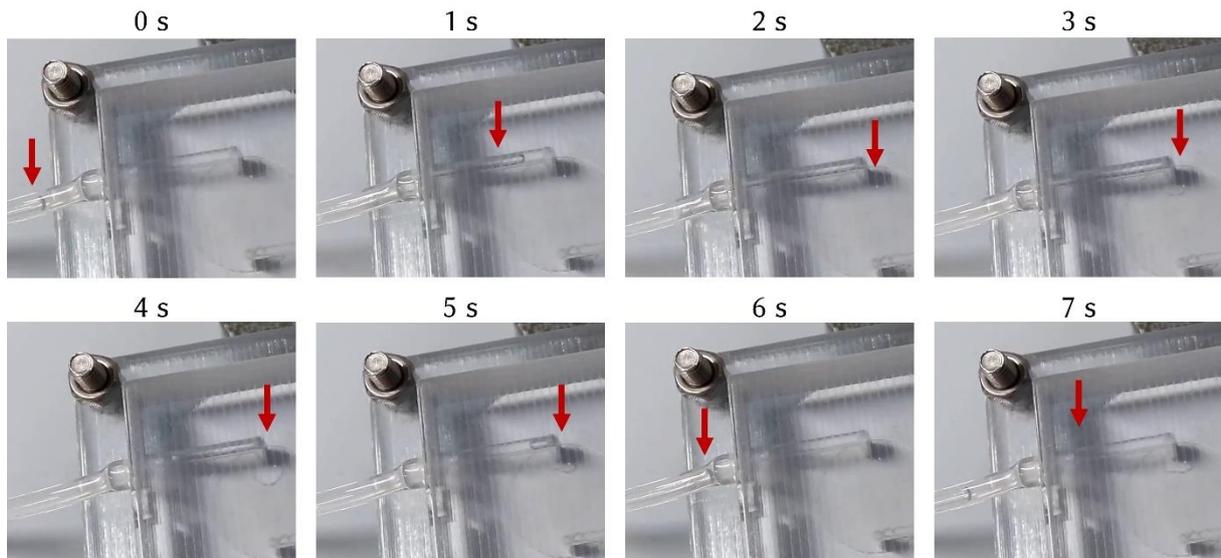
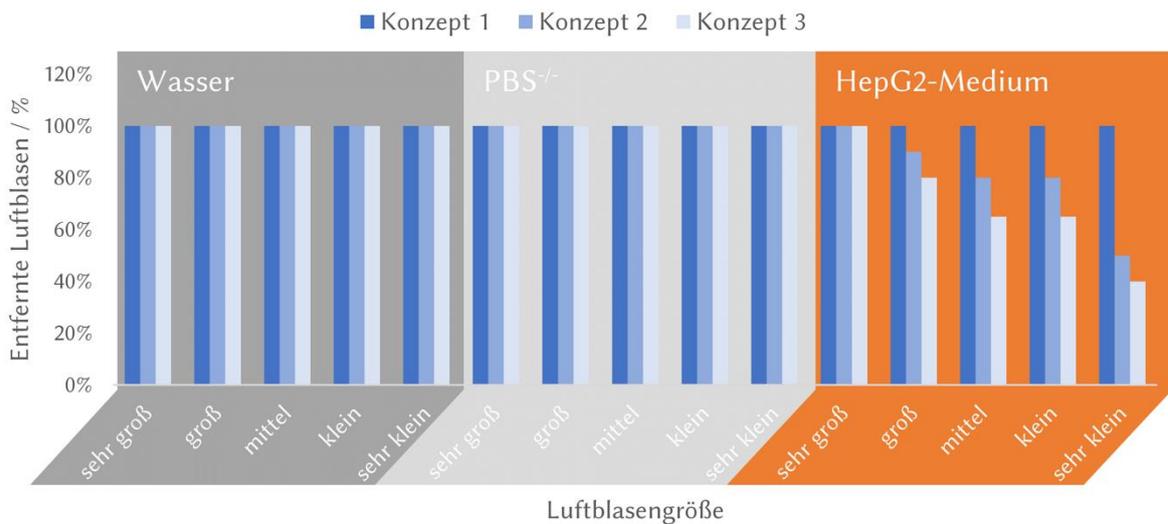


Abbildung 54: Entfernen der Luftblasen in der Blasenfalle nach Konzept 1. Der rote Pfeil markiert jeweils die Luftblase. Die erste erreicht nach ca. 3 s die Membran und wird hier entfernt (4-5 s).

A) Luftblasenentfernung durch die Blasenfallen



B) Blasenbezeichnungen und Größen

Bezeichnung	Länge / mm	Volumen / μl
sehr groß	15	30,16
groß	10	20,11
mittel	5	10,05
klein	2	4,01
sehr klein	1	2,01

Abbildung 55: Fähigkeit der Blasenfallen zur Luftblasenentfernung. A) Luftblasenentfernung durch die Blasenfalle bei verschiedenen Fluiden. B) Größenbezeichnung der getesteten Luftblasen, die gemessene Länge im Schlauch des Testsystems und das berechnete Volumen der Luftblase.

Zudem wurden unterschiedliche Flussgeschwindigkeiten getestet. Für alle drei Konzepte hatten, bei Verwendung von Wasser oder PBS^{-/-}, Flussgeschwindigkeiten von 200 bis 800 $\mu\text{l}/\text{min}$ keinen

Einfluss auf die Funktionsfähigkeit. Bei HepG2-Medium ließ die Funktionsfähigkeit bei 800 $\mu\text{l}/\text{min}$ leicht nach, hier wurden in allen drei Konzepten lediglich 95 % der größeren Luftblasen entfernt. Für den Einsatz mit biologischen Modellen müssen die Blasenfallen entsprechend desinfiziert/sterilisiert werden. Da Autoklavieren aufgrund des Druckmaterials nicht möglich ist, wurde das Spülen mit 80 % Isopropanol getestet. ePTFE-Membranen sind jedoch permeabel für Isopropanol. Nach dem Spülen bewirkte dies, dass auch Wasser die Membran passieren konnte. Aus diesem Grund wurde für Konzept 3 ein Verschlussystem (Abbildung 53 E und F) konstruiert. Dies verhinderte ein Austreten von Isopropanol während des Spülers. Anschließend wurde der Verschluss entfernt und die Blasenfalle und das System mussten vor weiterer Verwendung getrocknet werden. Im Vergleich zur Variante 1 mit vier Schrauben, waren die beiden Varianten mit gedrucktem Schraubmechanismus einfacher in der Handhabung. Durch Abrieb könnte die Dichtigkeit im Langzeitbetrieb jedoch nachlassen. Auf Grundlage dieser Experimente konnten weitere Blasenfallen konstruiert werden.

Magnetische Blasenfallen

Um die Handhabung zu vereinfachen, wurden Blasenfallen entwickelt, die auf einem magnetischen Verschluss beruhen.

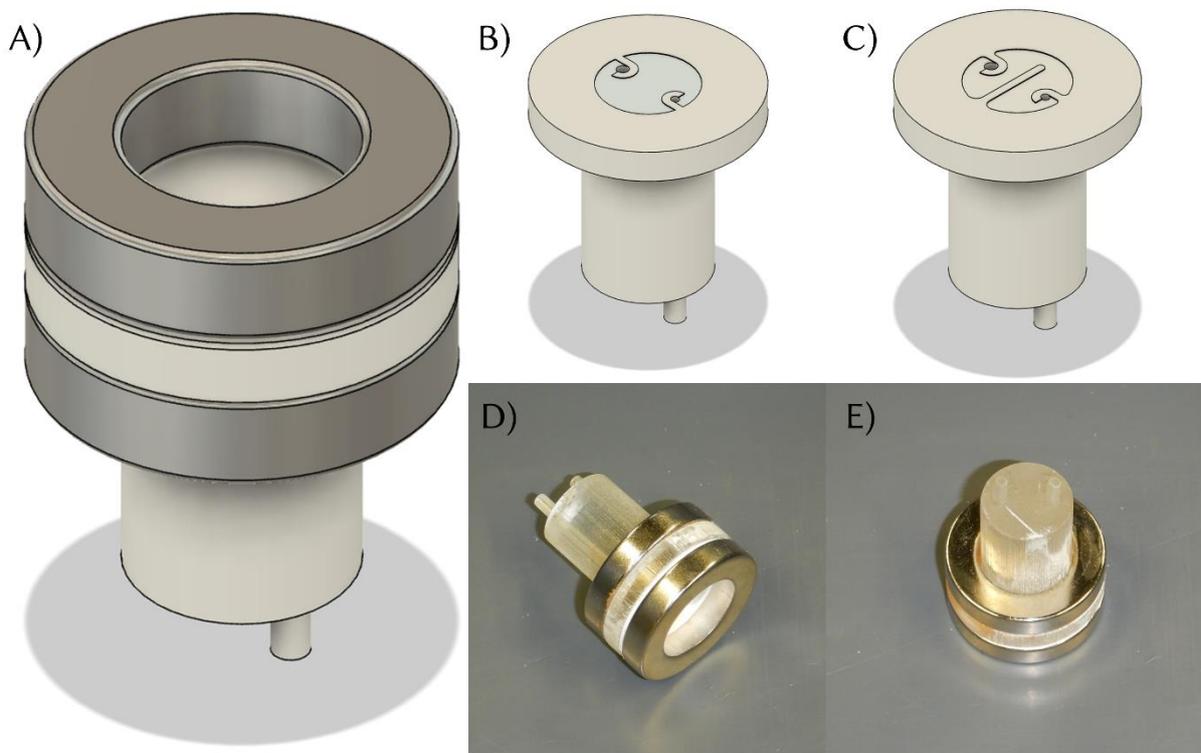


Abbildung 56: Magnetische Blasenfalle basierend auf den Dimensionen von Konzept 3. A) Modell der Blasenfalle. Die ePTFE-Membran wird durch zwei Ringmagnete fixiert. B) Einfaches Design der mikrofluidischen Kammer zur Blasenentfernung. C) Einfügen einer Barriere in die mikrofluidische Kammer, um die Funktion zu verbessern. D) und E) Gedruckter Prototyp.

Abbildung 56 zeigt die Konzeptionierung und den ersten Prototyp einer Blasenfalle, bei der die ePTFE-Membran durch Ringmagnete fixiert wurde. Hierbei wurden zwei Varianten realisiert. Im ersten Fall (Abbildung 56 B) war die mikrofluidische Kammer vergleichbar mit den vorherigen verschraubten Modellen. Um die Blasenentfernung effektiver zu gestalten, wurde eine Barriere (Abbildung 56 C) eingefügt, um den Medienweg und damit den Kontakt des Mediums zur Membran zu vergrößern. Dies sollte eine bessere Entfernung der Blasen gewährleisten. In ersten Versuchen wurde dies auch bestätigt. Allerdings war diese Variante über längere Zeit im Inkubator (37 °C) nicht flüssigkeitsdicht. Dies lag vermutlich daran, dass bei der Inkubatortemperatur von 37°C das Druckmaterial etwas weicher wurde und die großen Auflageflächen der Ringmagnete nicht ganz eben waren. Eine Weiterentwicklung verfügte über Eckmagnete und eine kleinere Auflagefläche der Membran (Abbildung 57). Dieses Modell verfügte über bessere Eigenschaften hinsichtlich Dichtigkeit. Die Blasenentfernung funktionierte auch. Es wurden zudem auf der Umgebungsluft zugewandten Seite (Abbildung 57 D) zwei Schlauchanschlüsse eingefügt. Eine Option wäre hier einen Unterdruck anzulegen, um Blasen noch besser zu entfernen, was auch in der Literatur (vgl. 3.3.3) beschrieben wurde. Eine andere Idee war die gezielte Begasung zu ermöglichen, um bspw. die Sauerstoffkonzentration im Medium regulieren zu können. Erste Versuche mit diesem Modell als Variante zur Begasung wurden durchgeführt und zeigten tendenziell die Möglichkeit der Begasung.

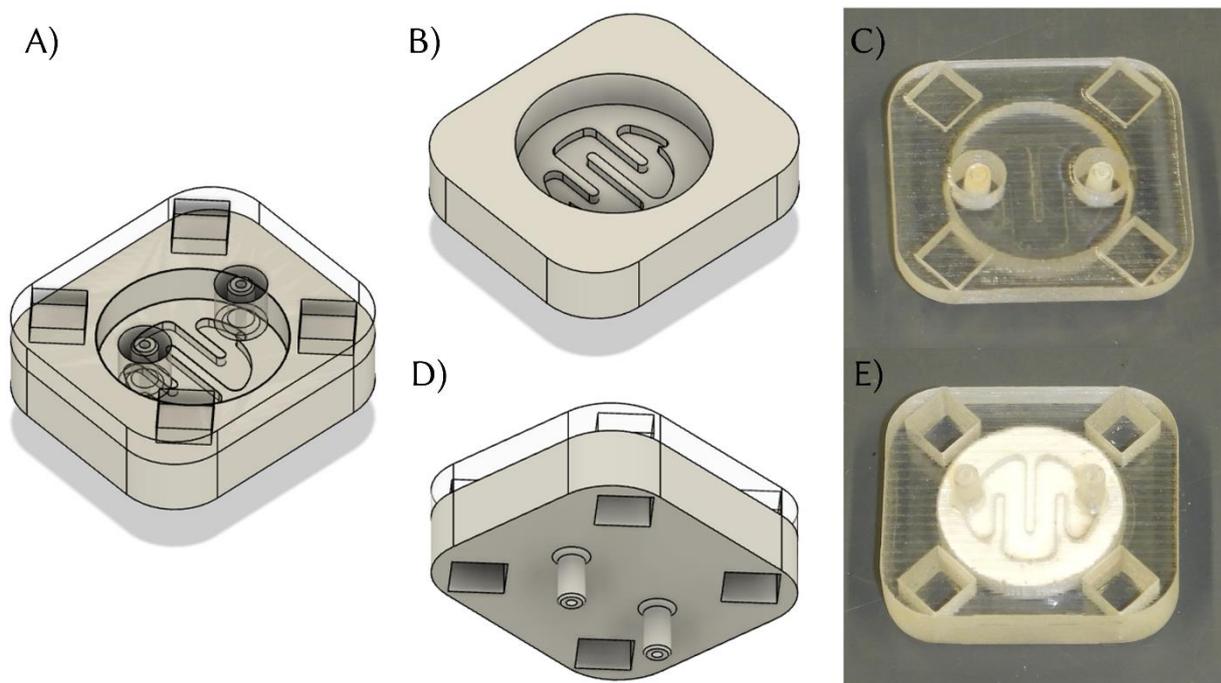


Abbildung 57: Magnetische Blasenfalle, die über acht Würfelmagnete, jeweils vier in den Ecken von Ober- und Unterteil, verbunden wird. A) Gesamtdarstellung B) Darstellung der Kanalstruktur C) Prototyp des Oberteils D) Ansicht von unten und E) Prototyp des Unterteils mit eingelegter ePTFE-Membran.

6.3.2.2 Mikrobioreaktor

Erste Versuche mit Sensorarrays unter fluidischen Bedingungen wurden mit dem in der Arbeitsgruppe etablierten MBR durchgeführt. Da er jedoch für zwei poröse Mikrokavitätenarrays und auch für verschiedene Operationsmodi (Perfusion bzw. Superfusion) konzipiert wurde, ist er für die Anwendung mit nicht-porösen Sensorarrays mit Superfusion zu komplex und die Fehleranfälligkeit wird dadurch erhöht. Aus diesem Grund wurden verschiedene kleinere MBRs konzipiert. Hierfür wurde auf die Erfahrungen aus der Konzeption der Blasenfallen zurückgegriffen und ebenso ein Magnet-basierter Ansatz gewählt. Um das interne Volumen des Systems gering zu halten, wurde zudem direkt die Integration der Blasenfalle berücksichtigt. Die Prototypenerstellung erfolgte mittels 3D-Druck (Polyjet). Dieses additive Fertigungsverfahren hatte den Vorteil, dass auch Mikrokanäle im Inneren realisierbar waren. Zudem war es möglich Dichtungen direkt auf die Bauteile zu drucken. Dennoch wurde darauf geachtet, dass die Prototypen leicht auf andere Fertigungsverfahren, wie bspw. CNC-Fräsen oder Spritzgussverfahren, anpassbar sind. So wurde, wenn möglich, auf innenliegende Kanäle oder größere Hinterschneidungen verzichtet und gegebenenfalls das Design in einzelne Elemente zerlegt.

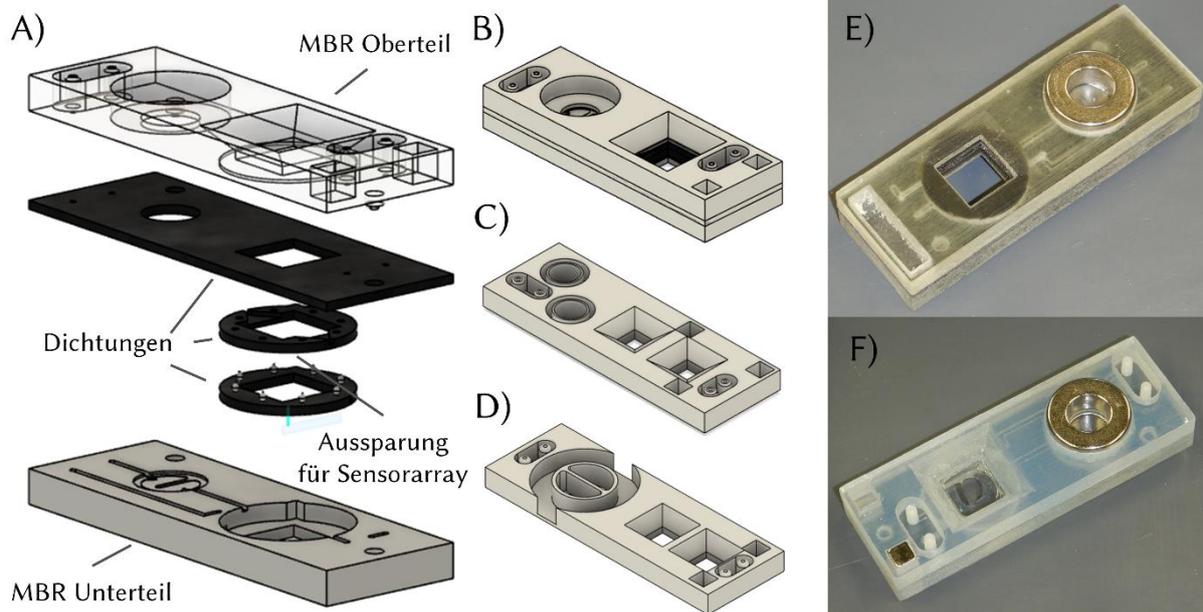


Abbildung 58: MBR im Objektträgerformat. A) Explosionszeichnung einer Variante mit Ring- und Eckmagnet. Dargestellt sind das Chipober- und -unterteil sowie die Dichtungen. B) Kompletter Chip für einen Sensorarray bzw. Mikrokavitätenarray. C) Variante für zwei Sensor-/Mikrokavitätenarrays in einer Reihenkonfiguration, d.h. der Medienfluss würde vom ersten Array zum zweiten erfolgen. Es wurden zwei Blasenfallen integriert, um das Medium, das die Arrays überspült und das, das die Arrays unterspült luftblasenfrei zu halten. D) Vergleichbare Anordnung zu C, jedoch mit nur einem Ringmagnet zur Fixierung der Blasenfalle. E) Prototyp eines MBR nach A) mit Quadermagnet und F) mit Würfelmagneten.

Die ersten Mikrobioreaktoren wurden im Objektträgerformat (76 x 26 mm) konstruiert (Abbildung 58). Die Zielsetzung war, den MBR so zu gestalten, dass neben den Sensorarrays auch poröse Mikrokavitätenarrays im Perfusionsmodus gehandhabt werden können. Es wurden verschiedene Varianten mit unterschiedlicher Anordnung der Magnete getestet (Abbildung 58 E und F). Zudem wurden Varianten (Abbildung 58 C und D) für zwei Arrays entworfen. Der Verschlussmechanismus über magnetische Kräfte funktionierte, die MBRs zeigten hier zunächst keinen Flüssigkeitsaustritt. Nach längerer Kultivierung wurde jedoch ein leichter Flüssigkeitsaustritt im Bereich der Dichtung festgestellt. Als Lösungsansatz wurde in einem zweiten Druck die Druckrichtung der Dichtung um 90° gedreht, also quer zur Druckrichtung des MBR-Gehäuses. Dies führte dazu, dass die Dichtung danach funktionierte. Durch die Anforderung der Mikroskopierbarkeit konnten jedoch nicht die Bereiche über/unter den Arrays gedruckt werden, sondern wurden durch das Einlegen von Deckgläsern verschlossen. An dieser Stelle zeigte sich eine Undichtigkeit. Eine generelle Lösung wäre hier das feste Verkleben oder Verschweißen der Deckgläser, was den Aufwand jedoch enorm erhöhen würde. Der Gesamtaufbau war vielversprechend, insbesondere in Hinsicht auf unterschiedlich realisierbare Perfusionsmodi, jedoch für die Anwendung der Sensorarrays noch zu komplex.

Der weiterentwickelte MBR hatte weiterhin die Dimensionen eines Objektträgers, bestand jedoch aus zwei unabhängigen Modulen, was die Konfiguration flexibler gestaltete. Da für diese die nicht-porösen Sensorarrays verwendet wurden, konnte auf ein Deckglas im Unterteil verzichtet werden, da die Sensorarrays selbst die Grenze zwischen den medienführenden Bereichen und der Umgebung darstellten. Bei der Variante nach Abbildung 59 A erfolgt der Medienfluss innerhalb des fluidischen Chips, was den Chip etwas komplexer in der Fertigung machte, bei der Variante nach Abbildung 59 B waren die beiden Module unabhängig und konnten über Schläuche verbunden werden. Die Membran der Blasenfalle wurde in beiden Fällen durch vier Würfelmagnete fixiert. Beide Varianten waren im Betrieb dicht und auch die Funktion der Blasenfalle war gewährleistet. Für weitere Entwicklungen von großem Interesse war vor allem die Funktionsfähigkeit der Schraubverbindung (Abbildung 59 B-D).

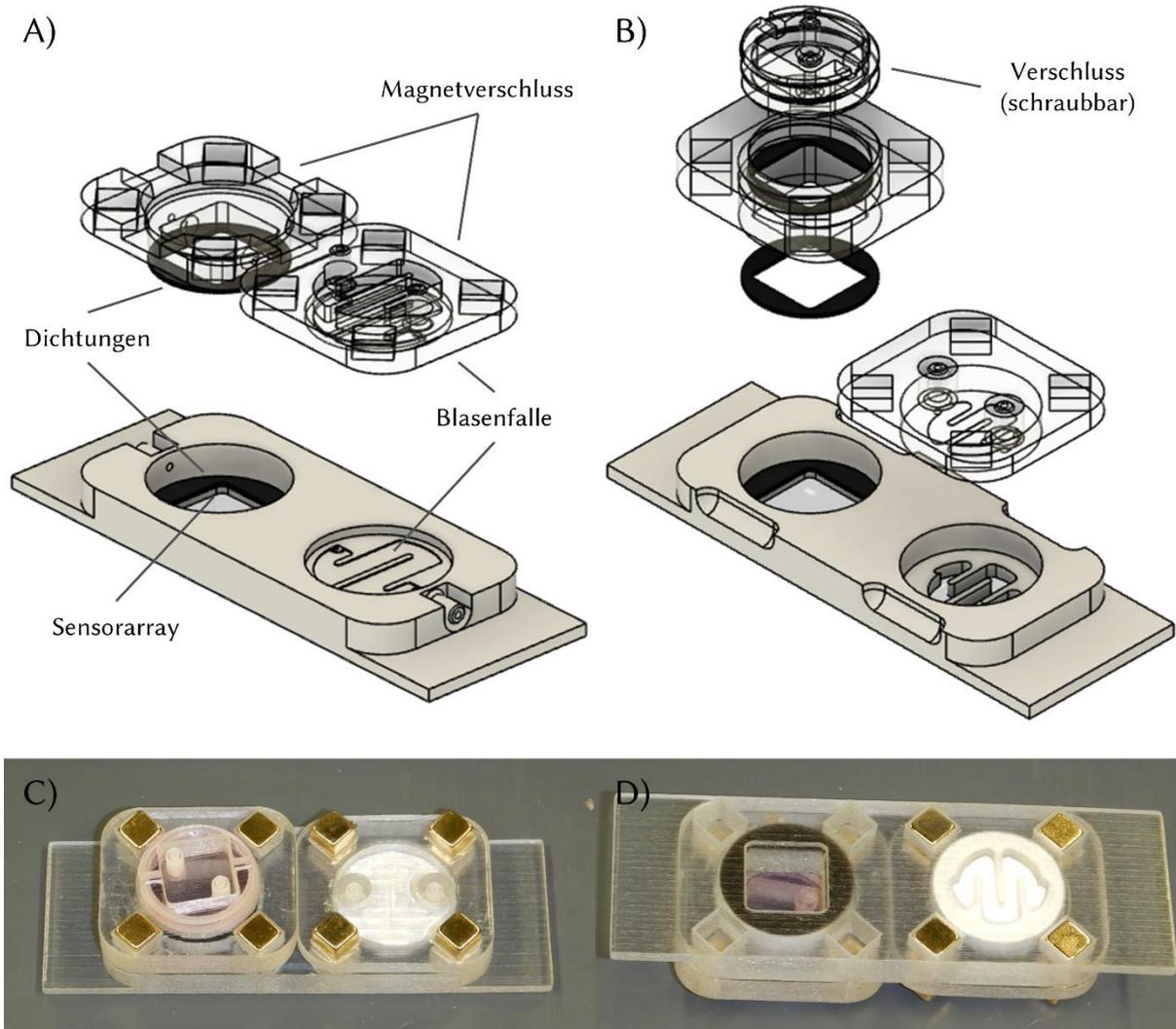


Abbildung 59: Fluidischer Chip mit austauschbaren Modulen. A) Explosionszeichnung für einen Chip mit einem Modul, das zur Aufnahme der Sensorarrays dient und einer Blasenfalle. Beide sind hier verbunden durch einen integrierten mikrofluidischen Kanal. Das Sensorarraymodul wird verschlossen durch einen aufgelegten Deckel. B) Explosionszeichnung einer Variante mit zwei unabhängigen Modulen, die durch Schläuche verbunden werden können. Hier wurde der Verschluss durch einen Schraubmechanismus realisiert. C) und D) Prototyp des fluidischen Chips nach B).

Durch die Idee der modularen Lösung konnten für diese Variante weitere Module entwickelt werden (Abbildung 60). Als problematisch gestaltete sich hierbei, dass der Steg, der die beiden Wells trennte, sehr schmal und daher nicht zuverlässig dicht war. Gerade bei der Verwendung im Inkubator (37 °C) war das Material zu weich und diese Variante wurde undicht. Eine Lösung wäre hierfür auf alternative Fertigungsverfahren und somit auf andere Materialien zu wechseln oder die Sensorarrays direkt mit dem Halter zu verkleben/verschweißen.

In einer dritten Variante wurden die Erkenntnisse der vorherigen Prototypen vereint. Der MBR war kompakter, hatte aber noch die Breite eines Objektträgers (26 mm) und integrierte Sensorarray sowie Blasenfalle. Wie in Abbildung 61 A dargestellt wird das Sensorarray durch Magnete eingespannt. Ein schraubbarer Deckel ermöglichte das Aussäen von Zellen mittels Pipette auch

nach dem Einsetzen des Arrays. Die Membran der Blasenfalle wurde verschraubt und verfügte über einen zusätzlichen Deckel, um den gesamten MBR mit Isopropanol spülbar zu machen.

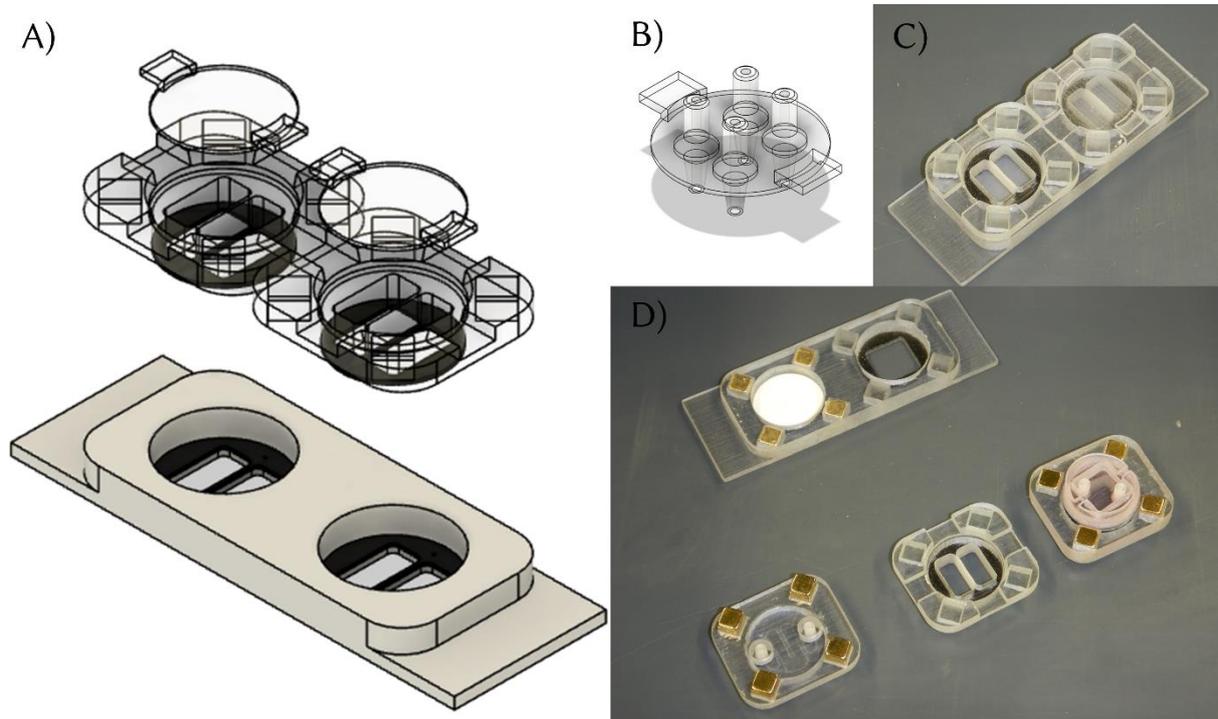


Abbildung 60: Modulare Varianten magnetischer MBR. A) Beispiel einer Konfiguration mit zwei Modulen mit je zwei Wells für unabhängige Messungen der Sensorarrays, verschlossen durch einen aufliegenden Deckel. B) Variante des Deckels mit Schlauchanschlüssen, um einen Medienfluss anzulegen. C) Prototyp des Chips mit mehreren Sensorarrays nach A). D) Fluidischer Chip mit einer Auswahl möglicher Module.

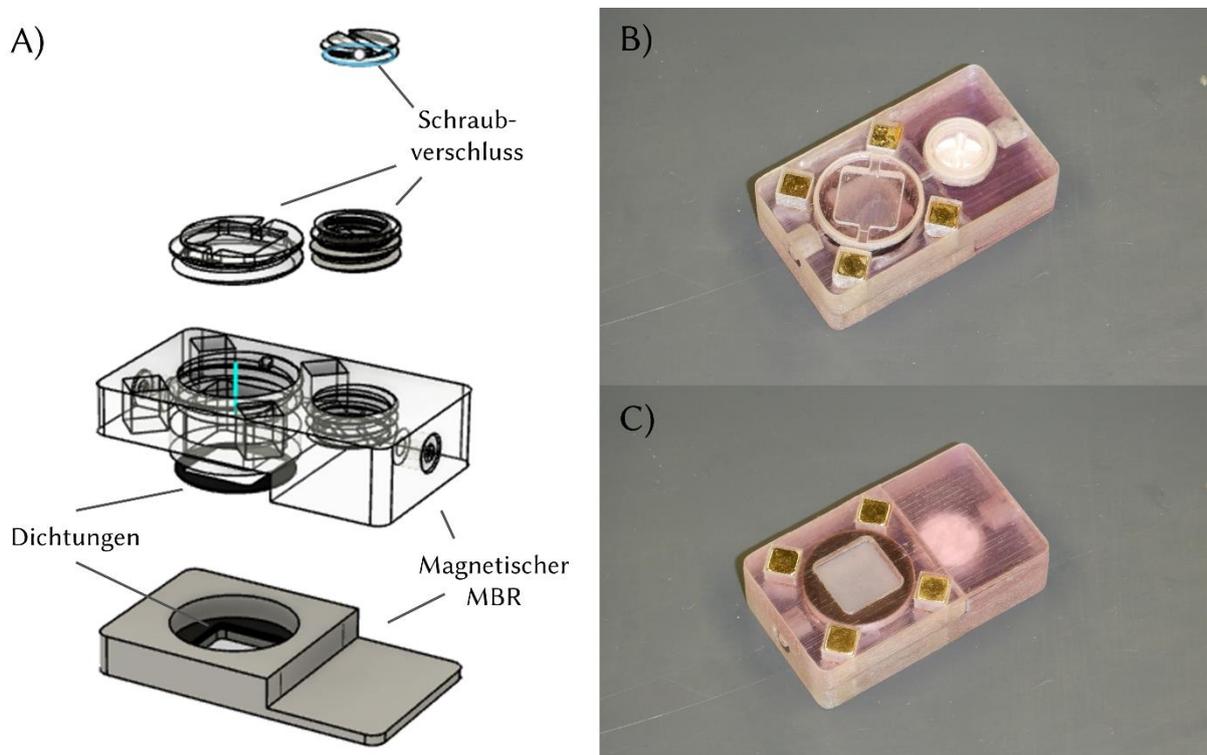


Abbildung 61: Kompakter MBR mit integrierter Blasenfalle. A) Explosionszeichnung eines MBRs mit integrierter Blasenfalle. B und C) Prototypen dieses MBRs.

Unter Kultivierungsbedingungen war auch diese Variante für mehrere Tage dicht. Es stellte sich jedoch heraus, dass durch die Dauer des Trocknungsvorgang nach dem Spülen mit Isopropanol (siehe 6.3.2.1) dies in der Praxis nicht umsetzbar war. Zudem war ein nachträgliches Öffnen des Bereichs über dem Sensorarray nicht unbedingt notwendig, sodass dieser MBR weiter vereinfacht wurde. Es wurden daher zwei finale Versionen des Mikrobioreaktors konstruiert (Abbildung 62). Zum einen eine Variante mit integrierter Blasenfalle (Abbildung 62 A) und zum anderen eine ohne Blasenfalle, optimiert für subtraktive Fertigung (Abbildung 62 B) bzw. additive Fertigung (Abbildung 62 C).

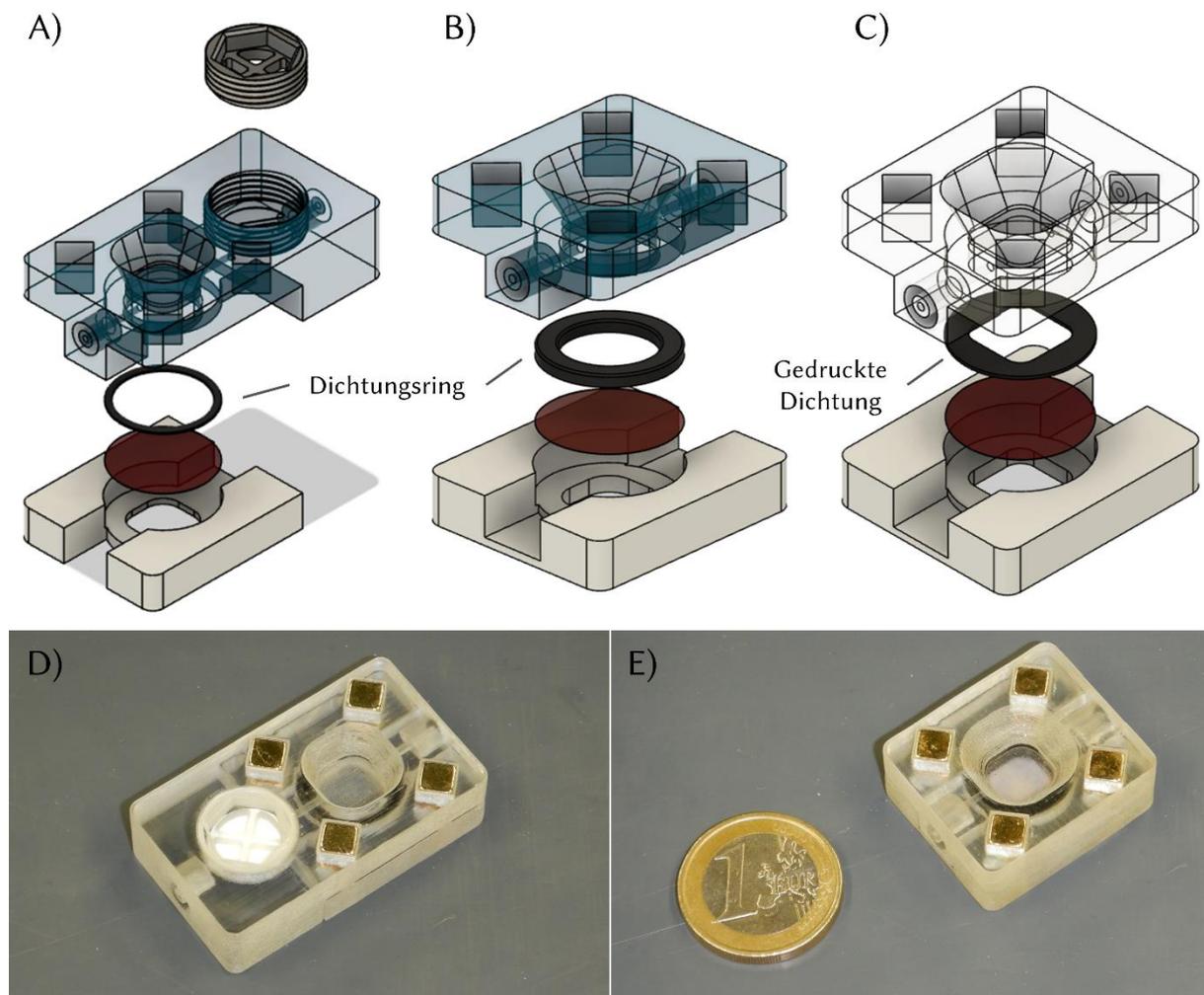


Abbildung 62: Finale Versionen der Bioreaktoren. A) MBR mit integrierter Blasenfalle. B) MBR ohne Blasenfalle mit O-Ring als Dichtung, optimiert für CNC-Fräsen. C) MBR ohne Blasenfalle mit gedruckter Dichtung, optimiert für 3D-Druck. D) Gedruckter Prototyp des MBR mit Blasenfalle. E) Gedruckter Prototyp des MBR ohne Blasenfalle.

Die Funktion der Blasenfalle wurde entsprechend der Vorgehensweise in 6.3.2.1 getestet. Die Verschraubung der Blasenfalle wurde als Innensechskantschraube ausgelegt. Dadurch ließ sich der Anpressdruck und die Funktion der Blasenfalle regulieren. Mit der entwickelten Blasenfalle war es möglich Luftblasen unterschiedlicher Größe aus dem Medium zu entfernen (Abbildung 63).

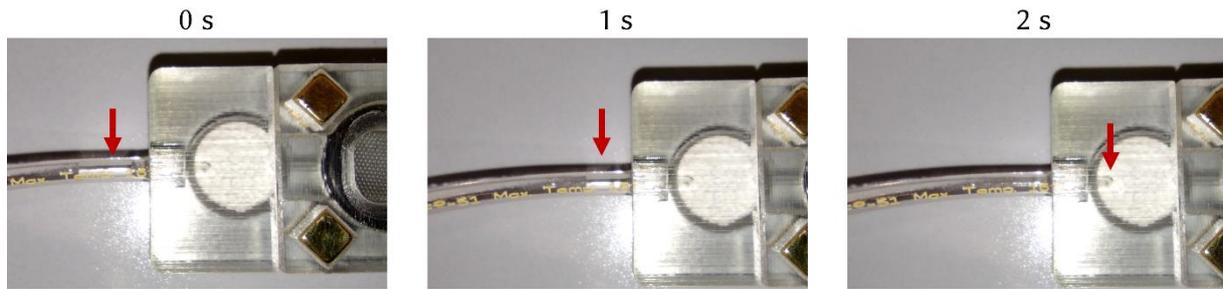


Abbildung 63: Darstellung eines Versuchsaufbaus zur kontrollierten Entfernung einer Luftblase (roter Pfeil) durch die Blasenfalle.

Der Mikrobioreaktor ohne Blasenfalle wurde zudem mit Sensorarrays und HepG2-Zellen unter Versuchsbedingungen für mehrere Tage mit einem Medienstrom von $400 \mu\text{l}/\text{min}$ getestet. Die Dichtungen sowie Anschlüsse waren dicht. Abbildung 64 zeigt beispielhaft den Verlauf einer statischen sowie einer fluidischen Zellkultivierung.

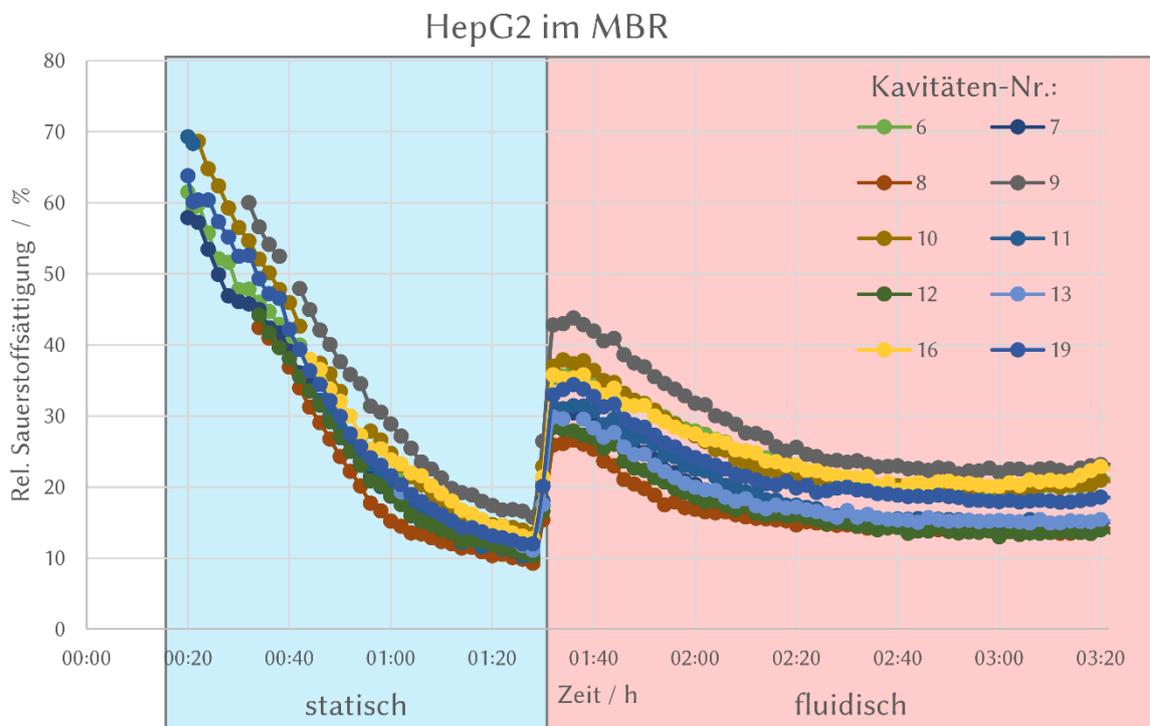


Abbildung 64: Statische Kultivierung für 1 h und danach mikrofluidische Kultivierung.

Durch die kompakten Dimensionen ist es möglich diesen Bioreaktor auch in eigenständige, regelbare Systeme im Mikrotiterplattenformat zu integrieren. Die Wahl der Miniaturschlauchpumpe würde auch einen autarken Batteriebetrieb ermöglichen, was bereits getestet wurde. Gerade in Hinblick auf regelbare Systeme (Abbildung 65) ist dies von Vorteil.

Konzept einer regelbaren Plattform

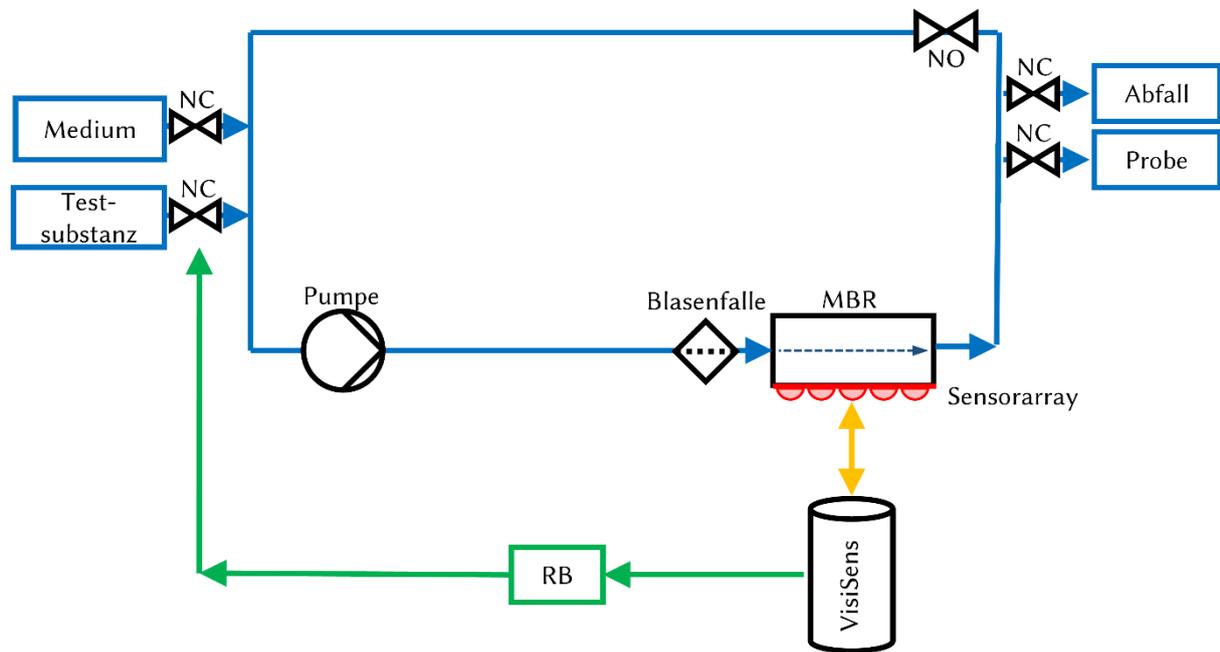


Abbildung 65: Konzept einer regelbaren Plattform. Die Plattform verfügt über fünf Ventile (normally open NO und normally closed NC), die den Medienstrom als Kreislauf auslegen können bzw. frisches Medium hinzufügen, Testsubstanzen applizieren und Proben sammeln können. Durch einen Einplatinencomputer, wie z.B. einen Raspberry Pi (RB), wäre es möglich aus den Sauerstoffdaten des Messsystems den Medienfluss zu regeln.

6.4 Anwendung am Funktionsmodell & Biologische Modelle

Durch die in 0 bis 6.3 gewonnenen Erkenntnisse konnten verschiedene biologische Funktionsmodelle geschaffen werden, um die Eignung der Sensorfolien und der Methode im Kontext der 3D-Zellkultur zu zeigen. Hierfür wurden zunächst einfache Experimente mit HepG2-Sphäroiden durchgeführt, bei denen die Sauerstoffkonzentration während der Kultivierung gemessen wurde. Dies führte zur Charakterisierung des Einflusses von Zellatmungsinhibitoren und schließlich zur Etablierung des Mito Stress Tests. Neben HepG2-Sphäroiden wurden auch Kardiomyozyten-Sphäroide als Funktionsmodell verwendet. Die Sensorarrays erhielten beim Formen eine fortlaufende Nummer, sodass die Experimente eindeutig den Sensorarrays zuzuordnen waren und dadurch auch verschiedene Folientypen verglichen werden konnten. Durch die Erfahrungen aus den Beschichtungsversuchen wurde für statische Modelle zunächst auf die CellCrownTM-Inserts zurückgegriffen.

Im Rahmen der Auswertung der biologischen Versuche wurde zudem eine neue Auswertemethode, die auf einer Auswertung durch die Open Source Software CellProfilerTM basiert, entwickelt.

6.4.1 Optimierung der Auswertung

Zunächst wurde die Auswertemethode über die Software „VisiSens ScientifiCal 1“ verwendet. Hierfür mussten, wie z.B. in Abbildung 70 gezeigt, die einzelnen Regions of Interest (ROI) manuell markiert werden. Danach berechnete das Programm zu jedem Bild dieser Zeitserie die Sauerstoffwerte in der entsprechenden ROI. Nachteilig war hier, dass die Auswahl manuell erfolgen musste und es in der Software kein Tool zum Erzeugen von Kreisen gibt. Daher waren die ROIs unterschiedlich groß und nicht immer komplett rund, was die Vergleichbarkeit der einzelnen ROIs beeinträchtigte. Für größere Kavitäten (800 bzw. 500 μm Durchmesser) war die Anzahl der ROIs pro Bild noch auswertbar. Je mehr Kavitäten jedoch im Bild waren, umso komplizierter wurde die Auswertung. PreSens hatte ein Plug-In (Live MITOS) zur Verfügung gestellt, das die ROIs automatisch erkennt und durch Kreise markiert.

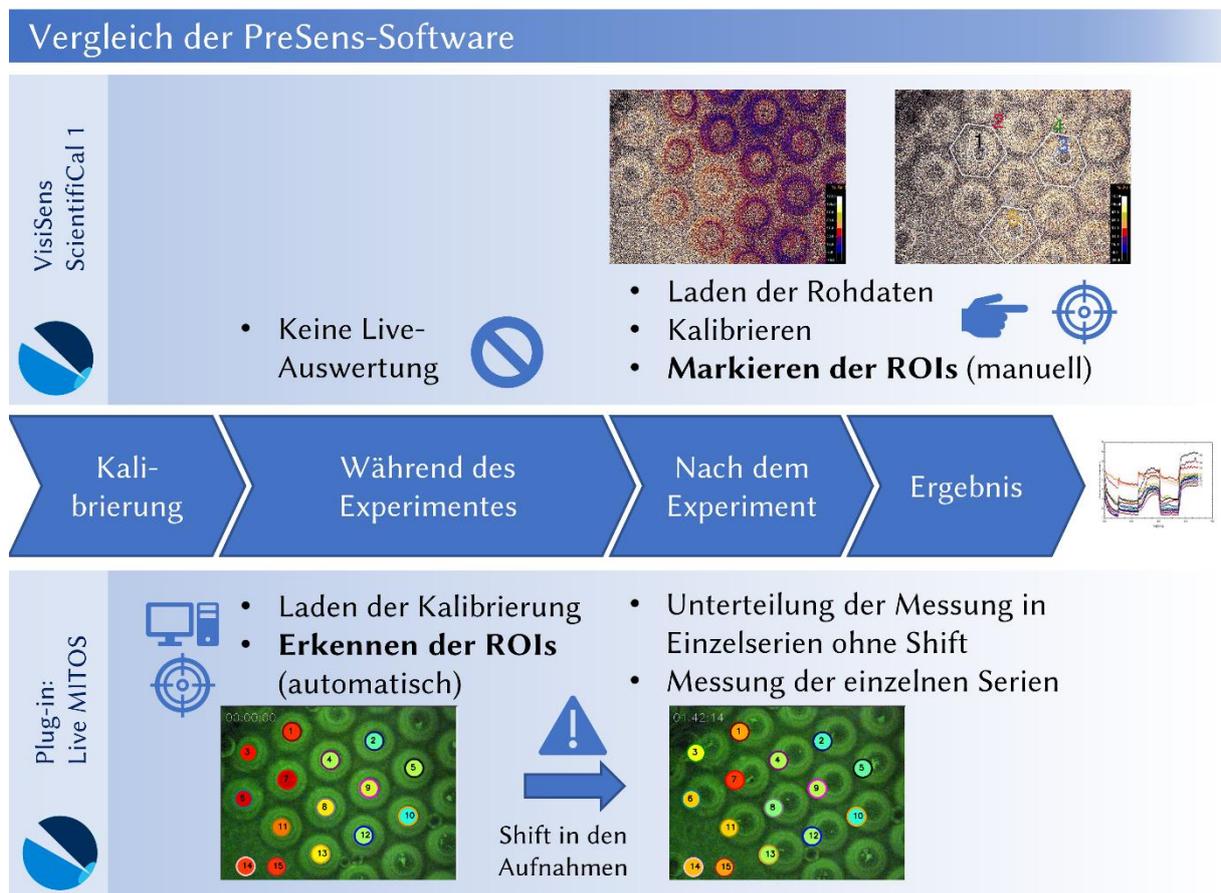


Abbildung 66: Vorgehen bei der Datenauswertung mit VisiSens ScientifiCal bzw. mit zusätzlichem Live MITOS-Plug-in. ScientifiCal ermöglichte keine Live-Betrachtung der Sauerstoffsättigung, durch manuelles Auswählen der ROIs konnten jedoch verschiedene Bereiche vermessen werden. Das Plug-in ermöglichte Live-Betrachtungen, erkannte auch ROIs automatisch, konnte jedoch keine unterschiedlichen Bereiche getrennt voneinander betrachten.

Abbildung 66 stellt die beiden Auswertemethoden mit der PreSens Software VisiSens ScientifiCal 1 bzw. dem hierfür erhältlichen Plug-in Live MITOS dar. ScientifiCal bietet den Vorteil, dass mehrere unterschiedliche Bereiche einer Mikrokavität gemessen werden können,

also bspw. der Bereich in dem ein Zellaggregat vermutet wird und den Bereich der Fase. Allerdings muss die Markierung manuell erfolgen, was sehr zeitaufwendig und wenig reproduzierbar war. Live MITOS erkennt selbstständig die ROIs, also hier die Mikrokavitäten, legt aber diese in nur einer Geometrie (kreisförmig) fest. Lediglich der Durchmesser konnte hier verändert werden. Ein Auswerten einzelner Bereiche einer Mikrokavität war nicht möglich. Beide dargestellten Methoden hatten den Nachteil, dass die Markierung der ROIs nur zu einem Zeitpunkt der Serie erfolgte. Während der Messung, insbesondere während des etablierten Mito Stress Tests, konnte es jedoch zu einem Shift der Proben, also zu einem Verschieben bspw. durch Türöffnungen oder durch Pipettierschritte, kommen (siehe Abbildung 66). Diese konnten nicht automatisch ausgeglichen werden. Daher mussten hier die Zeitserien in kleinere Einzelserien ohne Shift zerlegt, in einzelne Unterordner verschoben und jeweils unabhängig gemessen werden.

Eine Alternative stellte das automatische Erkennen der Mikrokavitäten, also der ROIs dar. Hierfür wurde die Open Source Software CellProfilerTM verwendet. Diese Software dient eigentlich der automatischen Erkennung, Zählung und Charakterisierung von Zellen in mikroskopischen Aufnahmen. CellProfilerTM führt die Auswertung anhand sogenannter Pipelines durch. Dabei handelt es sich um eine Abfolge verschiedener Module, die verschiedene Aktionen ausführen. Diese Pipeline wurde für die Auswertung von Sauerstoffkonzentrationen entsprechend entwickelt. In Abbildung 67 ist der grundlegende Ablauf dieser Auswertemethode dargestellt. In CellProfilerTM wird zunächst das Bild, das mit dem VisiSens-System aufgenommen wurde, importiert (Rohdaten). Dieses wird anschließend in den Rot- und Grünkanal, die Signale des Sensor- bzw. Referenzfluorophors, zerlegt. Der Grünkanal beinhaltet die Fluoreszenzen des Referenzfluorophors, sollte daher über die Zeit hinweg annähernd konstant bleiben. Daher wurde dieses Bild für die Erkennung der ROIs zunächst optimiert und anschließend wurden automatisch die ROIs, also die Mikrokavitäten, erkannt. Da dieser Schritt für jedes Bild einer Zeitserie durchgeführt wurde, konnten Shifts in den Aufnahmen ausgeglichen werden. Aus den definierten ROIs wurden Masken generiert, mit Hilfe derer in den ursprünglichen Rot- und Grünkanalbildern die Fluoreszenzsignale gemessen werden konnten. Diese Werte wurden dann weiter prozessiert, um die Sauerstoffkonzentrationen in den einzelnen Bereichen ermitteln zu können.

Automatisierte Auswertung mit CellProfiler™

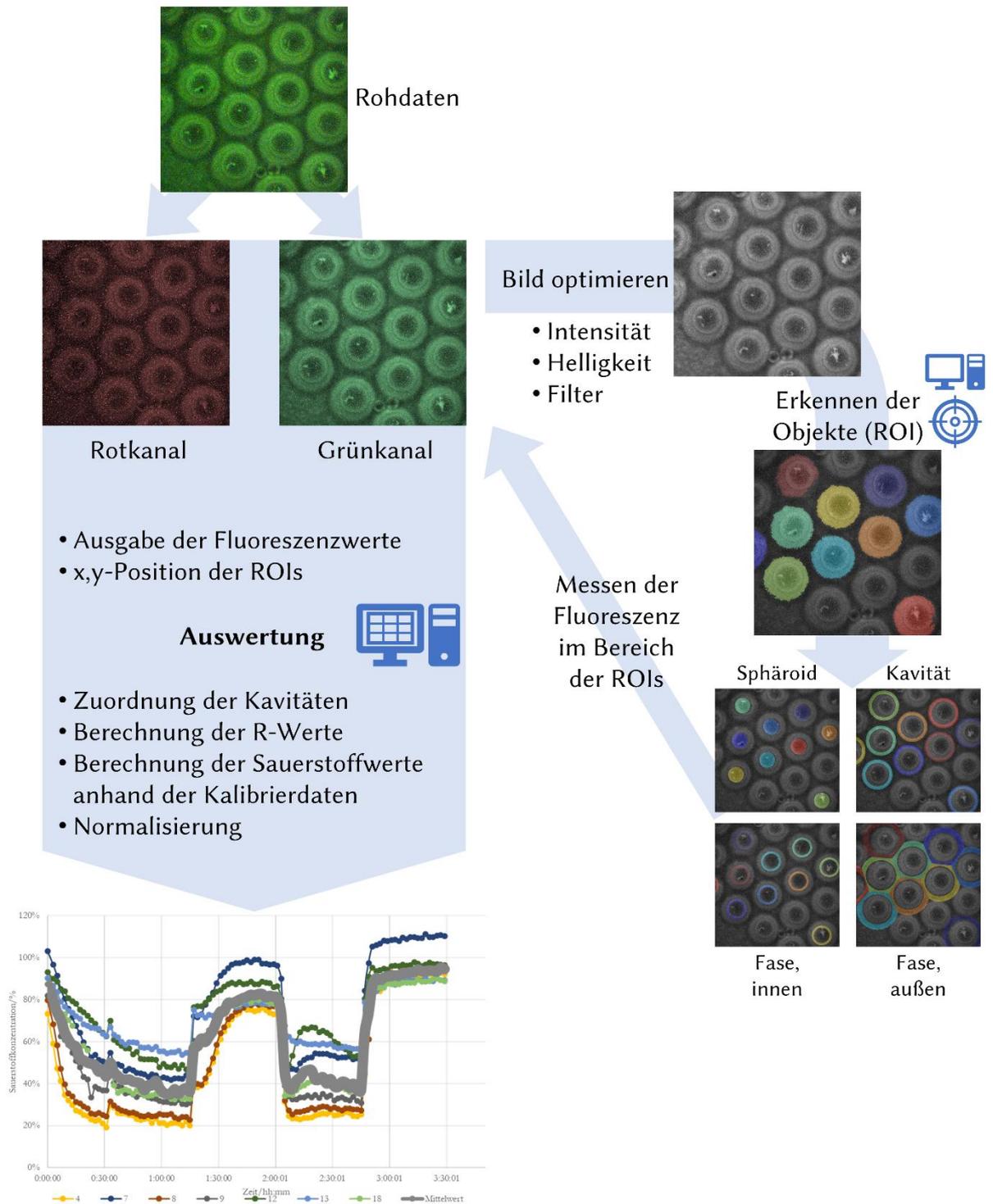


Abbildung 67: Auswertung mit CellProfiler™. Nach Trennen der Farbkanäle wurde das Bild zum automatisierten Erkennen der ROIs zunächst optimiert. Nach dem Erkennen der ROIs und dem Berechnen der verschiedenen Bereiche, wurde die Fluoreszenzintensität in den Rohdaten gemessen, als Datei ausgegeben und konnte weiter verarbeitet werden.

Da CellProfiler™ die ROI-Erkennung für jedes Bild durchführte, konnte es dazu kommen, dass nicht immer die identischen Mikrokavitäten erkannt wurden. Gerade nach Pipettierschritten konnte es zu leichten Belichtungsunterschieden kommen, die dazu führten, dass einzelne

Kavitäten nicht mehr erkannt wurden. Es wurden zunächst verschiedene Bildoptimierungen getestet, um möglichst gleichmäßige Detektionen zu erhalten. Jedoch konnte nicht gewährleistet werden, dass immer alle Mikrokavitäten erkannt wurden, was generell durch die große Anzahl erkannter Kavitäten für die Datenauswertung unproblematisch wäre. Jedoch führte ein Nicht-Erkennen von Kavitäten dazu, dass in den ausgegebenen Wertetabellen die Nummerierung der Kavitäten variieren konnte. Um jedoch eindeutig über eine ganze Zeitserie einzelne Mikrokavitäten genauer beobachten zu können, wurden neben den Fluoreszenzsignalen auch die x,y-Koordinaten der ROIs ausgegeben. Diese wurden in EXCEL mit einer Matrix abgeglichen und so eindeutig nummeriert. Aus den Fluoreszenzsignalen der beiden Kanäle wurde das Verhältnis zueinander bestimmt. Die Module der optimierten Pipeline sind in Abbildung 68 dargestellt.

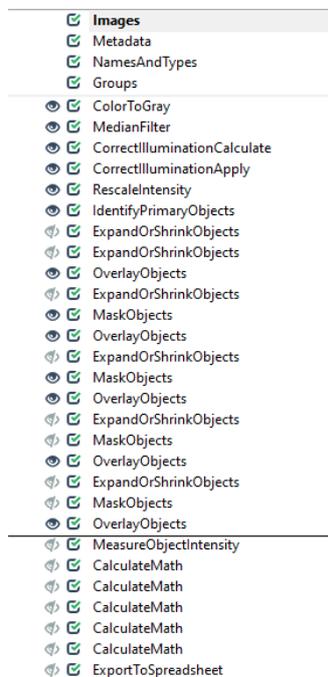
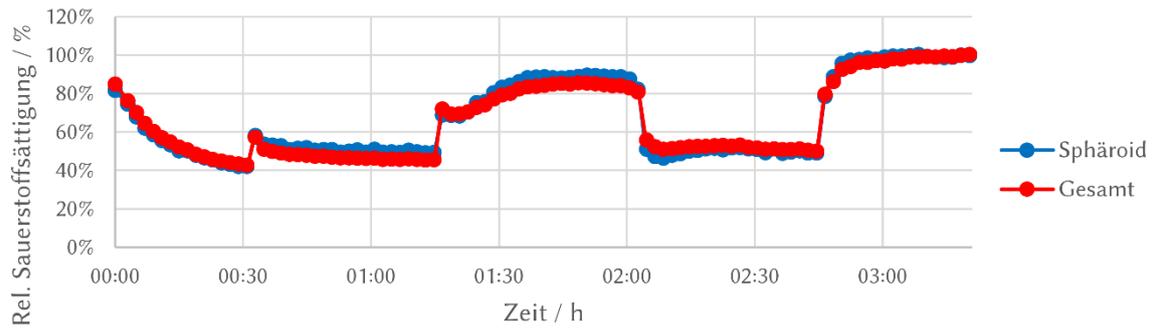


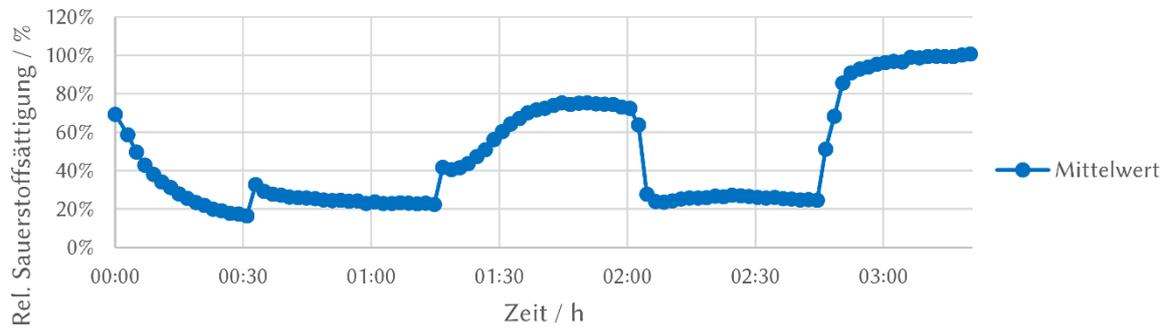
Abbildung 68: Optimierte CellProfiler™-Pipeline.

Obwohl teilweise einzelne Mikrokavitäten nicht erkannt wurden, konnten mit CellProfiler™ deutlich differenziertere Daten generiert werden (Abbildung 69). So konnten die einzelnen Bereiche um eine Mikrokavität herum, also die Fase, gemessen werden, als auch mehrere Mikrokavitäten in einem Bild.

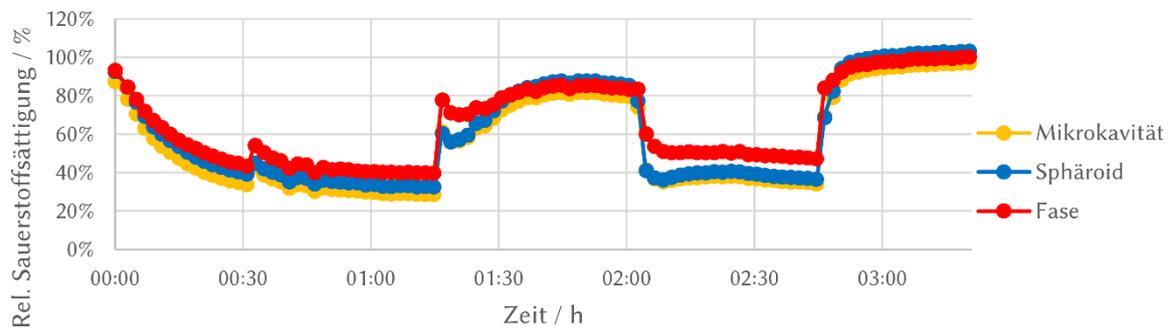
A) VisiSens ScientifiCal1



B) Live MITOS



C) CellProfiler™, altes Protokoll



D) CellProfiler™, neues Protokoll

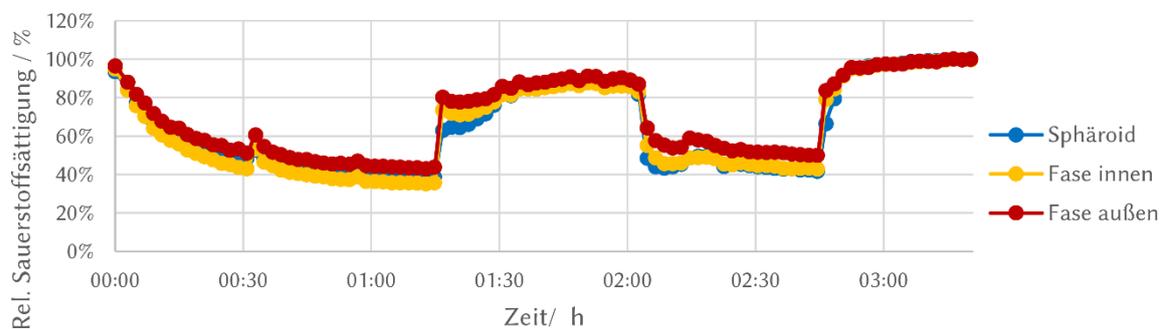


Abbildung 69: Vergleich verschiedener Auswertemethoden am Beispiel von Versuch 1186.

Die Eigenschaften bzw. Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Insgesamt konnten mit CellProfiler™ die zuverlässigsten Ergebnisse erzielt werden. Ergänzt wurde diese Auswertung dadurch, dass für eine Echtzeitbetrachtung das Live MITOS Plug-in verwendet wurde.

Tabelle 24: Die drei Auswertemethoden und deren Vor- und Nachteile.

	<i>VisiSens Scientific1</i>	<i>VisiSens Live MITOS</i>	<i>CellProfiler™</i>
<i>Erkennung der ROIs</i>	Manuell	Automatisch	Automatisch
<i>Echtzeit Auswertung</i>	Nein	Ja	Nein
<i>Mehrere Bereiche pro Mikrokavität</i>	Ja	Nein	Ja
<i>Hochdurchsatz</i>	Nein	Ja	Ja
<i>Ausgleich von Shifts in einer Zeitserie</i>	Nein	Nein	Ja

6.4.2 Kultivierung von HepG2-Zellen in Sensorarrays

Die eigentliche Kultivierung von HepG2-Zellen in Sensorarrays wurde bereits in 6.2.3 im Zusammenhang mit den Beschichtungsversuchen beschrieben. Der ersten Sauerstoffmessungen an HepG2-Zellen in Sensorarrays erfolgten in RPSu76-C-Sensorarrays mit einem Mikrokavitätendurchmesser von 500 µm. In diesem Fall wurden $2,5 \times 10^6$ HepG2-Zellen in einem Sensorarray für 24 Stunden kultiviert, bevor die Sauerstoffmessung startete. Durch den Folientyp gab es Schwierigkeiten mit der Kalibrierung, sodass Werte über 100 % Sauerstoffsättigung berechnet wurden (Abbildung 70). Jedoch konnte hier eindeutig eine Sauerstoffabnahme in den ersten Stunden der Kultivierung nach dem Medienwechsel ermittelt werden. Es konnte sogar in den nicht-beschichteten Folien mit einem relativ großen Kavitätendurchmesser die Bildung von Aggregaten beobachtet werden.

RPSu76C – 500 µm Sensorarray

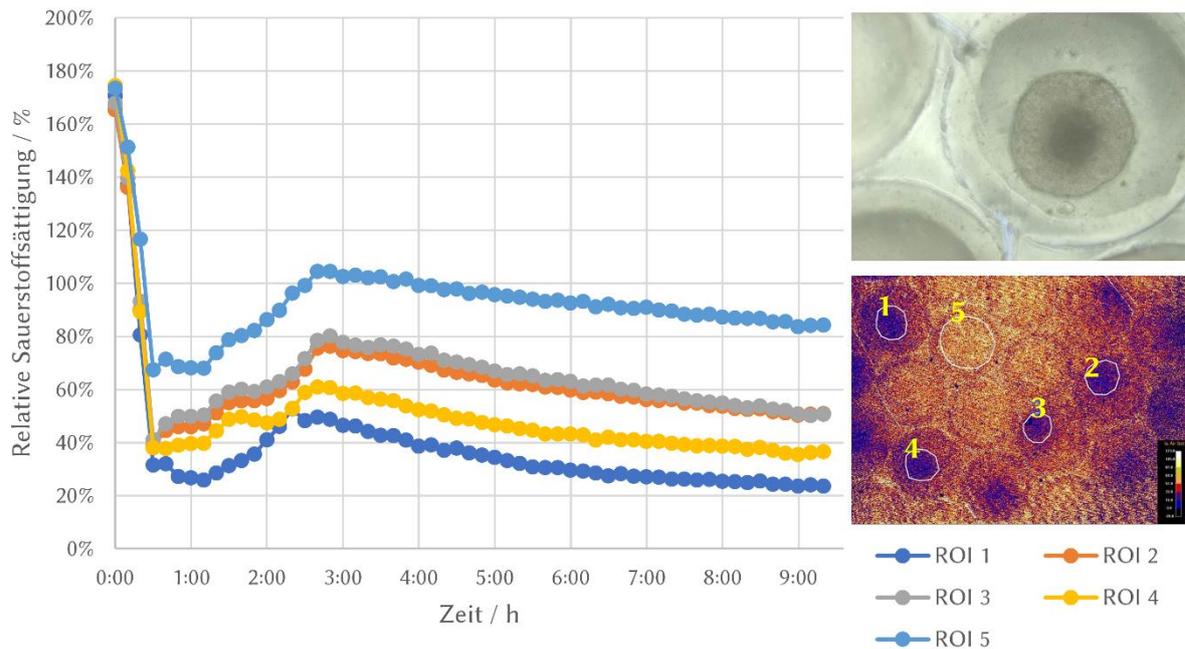


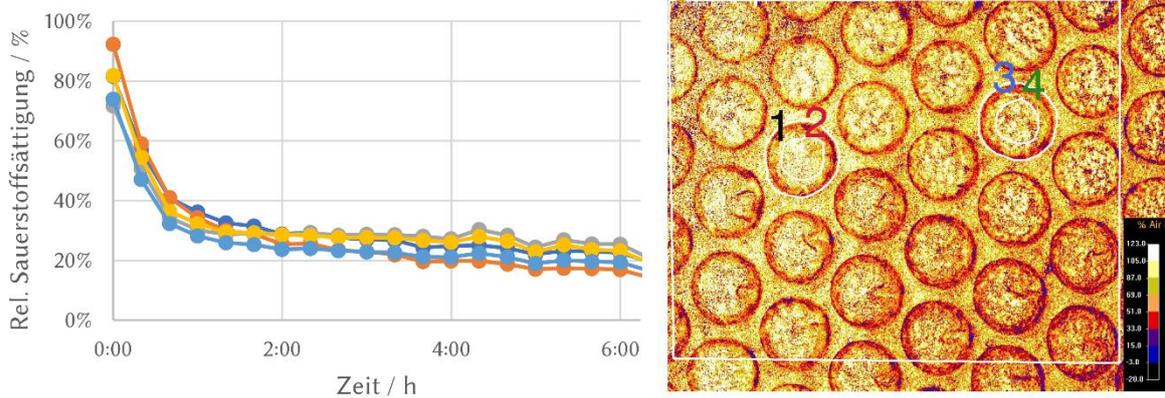
Abbildung 70: Sauerstoffmessung in 500 µm Sensorarrays (ohne Beschichtung) direkt nach einem Mediumwechsel nach 24 stündiger Kultivierung von $2,5 \times 10^6$ HepG2-Zellen (Sensorarray 894).

Ebenso wurden Mikrokavitäten mit 800 µm Durchmesser getestet. Auch hier zeigte sich eine generelle Eignung des Systems. Während der Versuche wurde jedoch beobachtet, dass gerade in den größeren Mikrokavitäten Zellaggregate bei Waschschriffen im Zuge der Zellfärbungen oft ausgeschwemmt wurden und der weiteren Auswertung daher nicht mehr zur Verfügung standen. Andere Bereiche, insbesondere bei zu flachen Mikrokavitäten, hingegen waren mit Monolayern der Zellen, also 2D-Kulturen, besiedelt. Für 3D-Kulturen wurde das Beschichtungsreagenz BIOFLOAT™ getestet, was, wie in 6.2.3 gezeigt, zur Bildung von Zellaggregaten führte.

In größeren Zellaggregaten ist die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen nicht gleichmäßig gewährleistet, wodurch nekrotische Bereiche auftreten können. Aus diesen Gründen wurden mit angepassten Sensorfolien auch Sensorarrays mit 300 µm Kavitätendurchmesser entwickelt, die für die weiteren Versuche verwendet wurden.

In ersten Versuchen mit 300 µm-Kavitäten wurden Sensorarrays der Folie SF-RPC1 verwendet. Abbildung 71 zeigt den Verlauf der Sauerstoffsättigung während der Kultivierung von $1,5 \times 10^6$ HepG2-Zellen in einem 300 µm-Sensorarray nach dem Aussäen. Zu erkennen war eine deutliche Abnahme der Sauerstoffkonzentration unmittelbar nach dem Aussäen auf nur noch 20-30 % Sauerstoff (Abbildung 71 A). Drei Tage nach dem Aussäen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und erneut die Sauerstoffkonzentration bestimmt. Danach sank die Sauerstoffkonzentration noch schneller auf unter 10 % (Abbildung 71 B), was auf die hohe Zellzahl sowie die Proliferation innerhalb der dreitägigen Kultivierung zurückgeführt werden kann.

A) Tag 1 – nach dem Aussäen



B) Tag 3 – nach einem Mediumwechsel

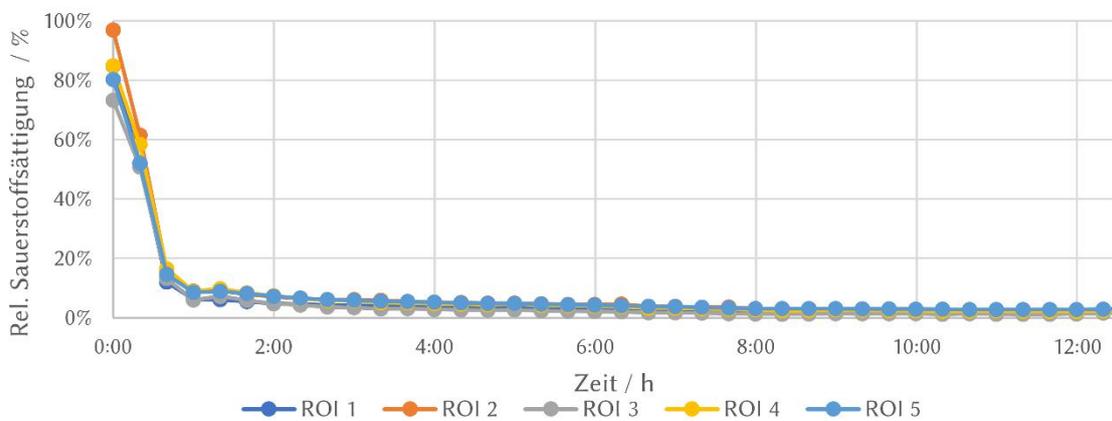


Abbildung 71: Exemplarische Daten von $1,5 \times 10^6$ HepG2-Zellen in Sensorarrays (BIOFLOAT™). Auswertung der Daten erfolgte über die Software „VisiSens Scientifical 1“. A) Unmittelbar nach dem Aussäen und B) unmittelbar nach dem Mediumwechsel an Tag 3.

Das schnelle Absinken der Sauerstoffkonzentration ließ auf eine hohe Zellzahl schließen. Daher wurde die Zellzahl optimiert, sodass für längere Experimente lediglich $0,5 - 1,5 \times 10^5$ HepG2-Zellen pro Sensorarray verwendet wurden (Abbildung 72).

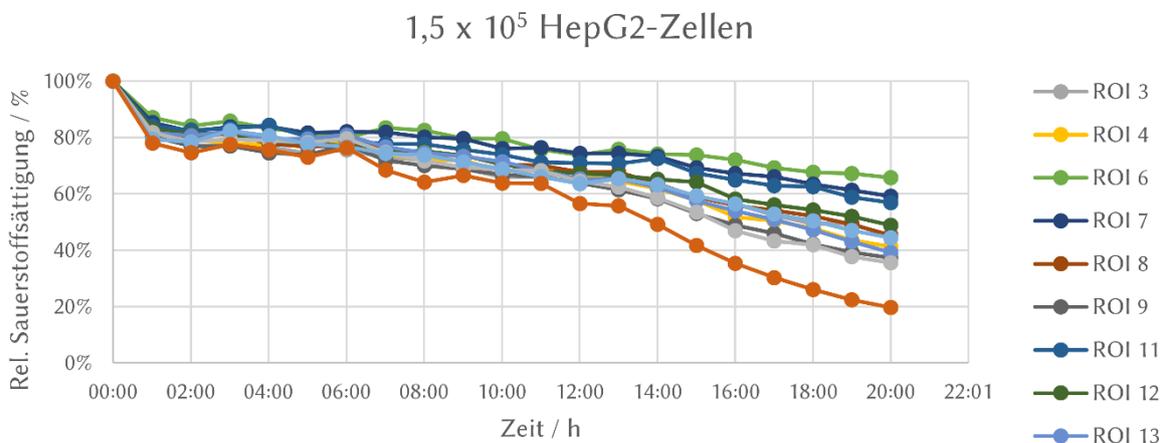


Abbildung 72: Langsameres Sinken der Sauerstoffkonzentration mit geringerer Zellzahl. Die ROIs bezeichnen dabei unterschiedliche Mikrokavitäten.

6.4.3 P19-Zellen in Sensorarrays

HepG2-Zellen dienen zunächst dazu, das System für biologische Fragestellungen zu etablieren, da sie in der Handhabung vergleichsweise robust sind. Jedoch sollte das System auch für anspruchsvollere Zellen, wie Teratom-Stammzell-abgeleitete Kardiomyozyten getestet werden. Aus diesem Grund wurden zunächst Kardiomyozyten verwendet, die aus P19-Zellen, einer Teratomstammzelllinie aus C3H/HEHA-Mäusen, differenziert wurden. In der Arbeitsgruppe wurde dies bisher in Embryoid Bodies aus Hanging Drop-Kulturen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in Hanging Drops in Differenzierungsmedium mit 1 % DMSO für drei Tage kultiviert, danach wurde auf Differenzierungsmedium ohne DMSO gewechselt und die entstandenen Embryoid Bodies wurden in 24-Well-Platten für bis zu sieben Tage kultiviert. Dieses Protokoll wurde in den folgenden Versuchen auf die BIOFLOAT™-beschichteten (Sensor-)Arrays übertragen.

Zunächst wurde die Zellzahl in PC-Mikrokavitätenarrays optimiert. Im etablierten Standardprotokoll wurden 500 Zellen pro Hanging Drop kultiviert, um Zellaggregate zu generieren. Übertragen auf die Mikrokavitätenarrays mit 634 Mikrokavitäten, hätte eine Zellzahl von $3,17 \times 10^5$ Zellen verwendet werden müssen, da aber beim Besiedeln der CellCrowns erfahrungsgemäß einige Zellen durch die Lücken im CellCrown in das untere Well gelangen, wurden auch höhere und niedrigere Zellzahlen verwendet.

In Abbildung 73 ist die Bildung der Zellaggregate zu erkennen. Zum Zeitpunkt d0 (Wechsel auf Differenzierungsmedium ohne DMSO) sind diese in den einzelnen Ansätzen sehr gleichmäßig, es können aber schon unterschiedliche Größen aufgrund der Zellzahl erkannt werden.

Insgesamt werden die Zellaggregate deutlich größer, was darauf schließen lässt, dass nicht alle Zellen differenzieren. Einzelne leere Kavitäten (z.B. in 1041, 1042, 1042 bei Zeitpunkt d2 in Abbildung 73) entstehen dadurch, dass beim Mediumwechsel einzelne Aggregate in andere Kavitäten gespült werden. Insgesamt konnte beobachtet werden, dass eine Zellzahl von 10^5 Zellen/Array ausreichend war, um gleichmäßige Aggregate zu erhalten. Um neben der rein mikroskopischen Betrachtung des Zellwachstums auch den Sauerstoffverbrauch bestimmen zu können, wurden anschließend verschiedene Sensorarrays (SF-RPC2) mit der normalen PC-Folie verglichen (Abbildung 74).

6 Ergebnisse

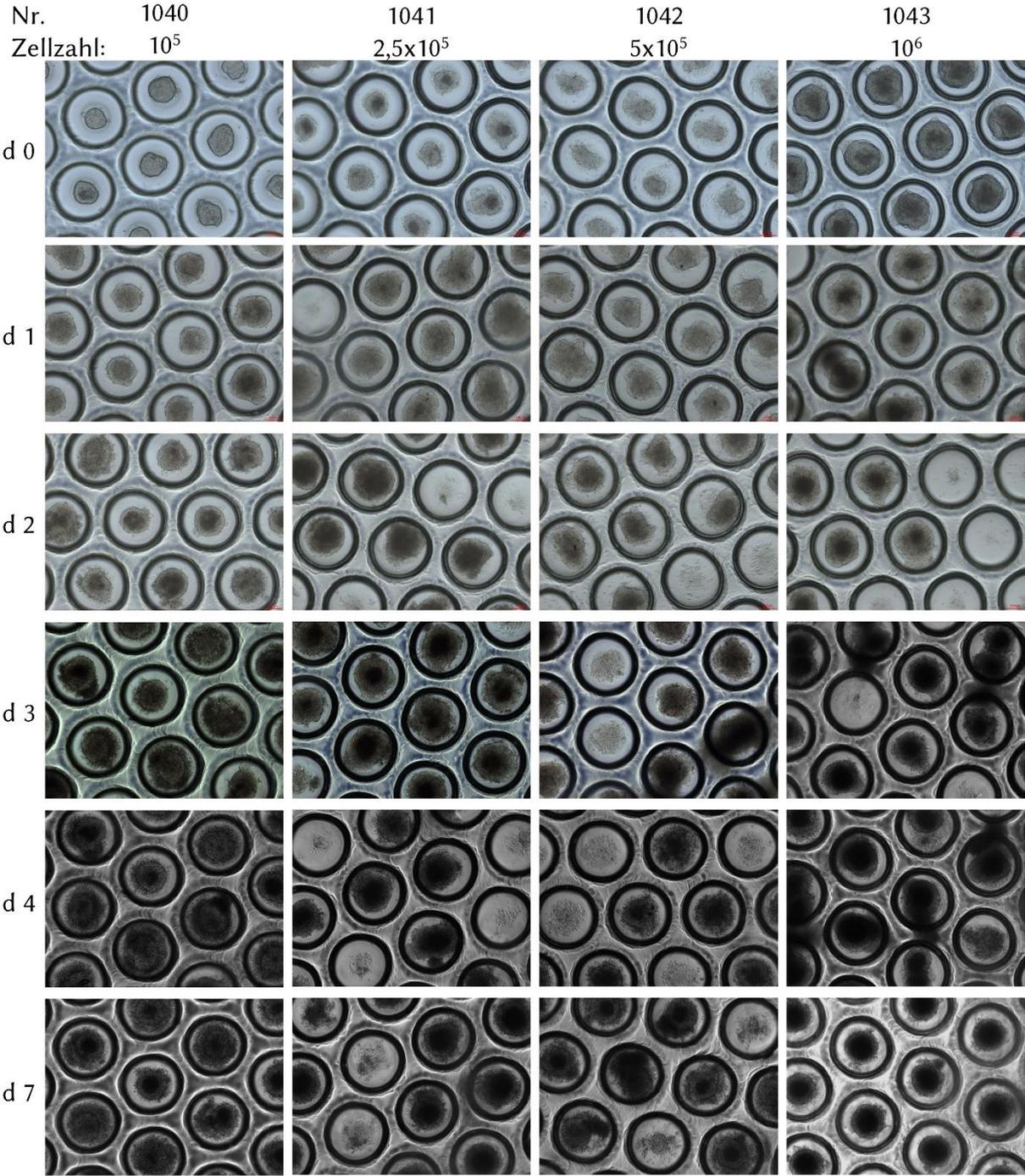


Abbildung 73: Verschiedene Zellzahlen der P19-Zellen in PC-Mikrokavitäten. Gesamtvergrößerung: 100 x.

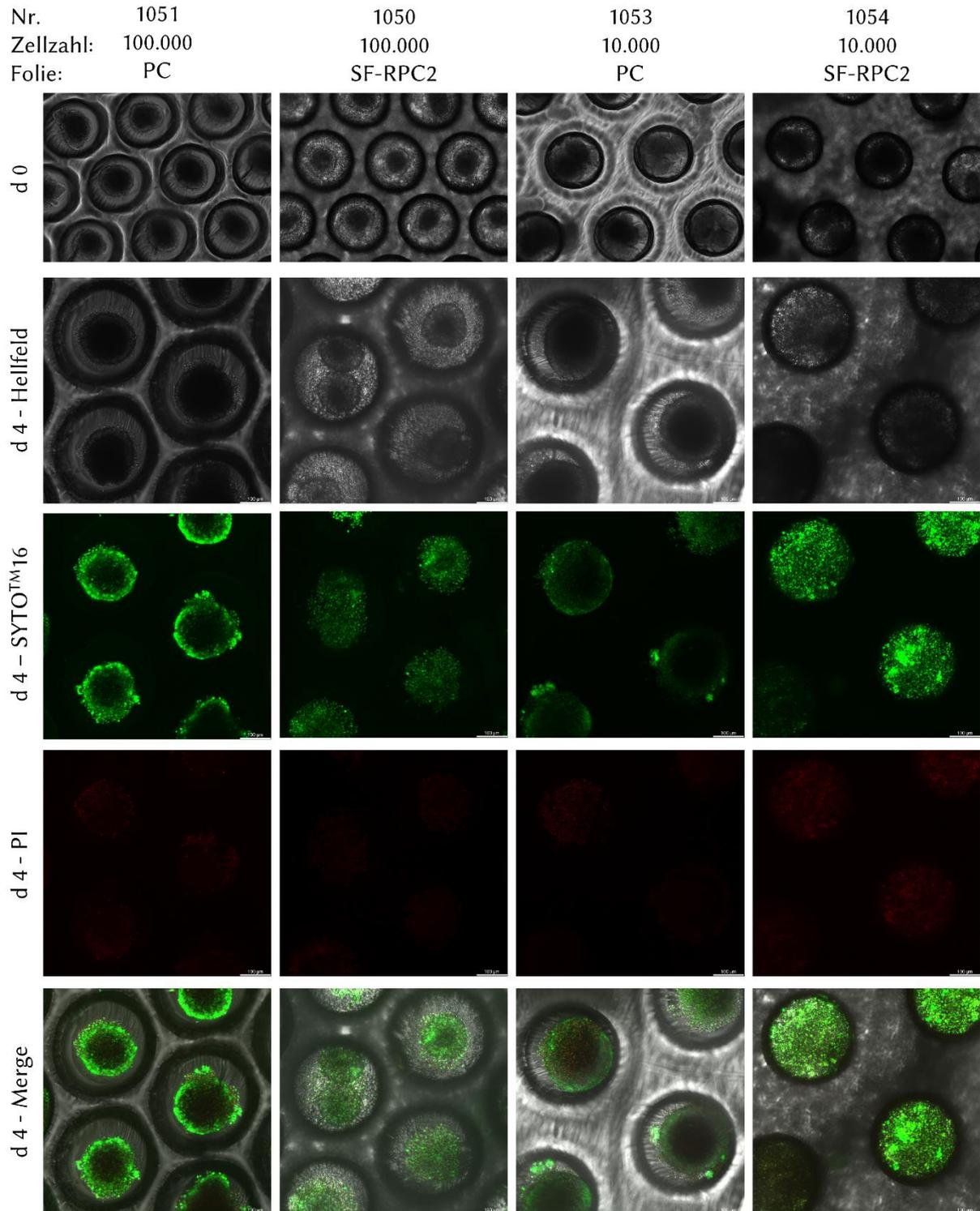


Abbildung 74: Lichtmikroskopie der P19-Zellen in verschiedenen (Sensor-)Arrays zu Beginn der Differenzierung und nach vier Tagen, gefärbt mit PI und SYTOTM16. Gesamtvergrößerung: 100 x (d0) bzw. 200 x (d4).

Es wurde die geringste Zellzahl aus dem vorangegangenen Versuch verwendet, dennoch zeigten die P19-Zellen ein starkes Wachstum. Bereits nach vier Tagen konnte durch die Lebend-Tot-Färbung beobachtet werden, dass die Zellen vor allem in den kleineren Sensorarrays die Kavitäten schon komplett ausfüllten (Abbildung 74). In den Arrays 1051 und 1050 (jeweils 634 Mikrokavitäten mit 300 µm Durchmesser) waren noch eindeutig Zellaggregate erkennbar.

Ebenso in 1053 (PC, 64 Kavitäten, mit 500 auf 300 μm Durchmesser). Bei 1054 (Sensorfolie, 64 Kavitäten, mit 500 auf 300 μm Durchmesser) waren keine richtigen Aggregate mehr sichtbar. Stattdessen waren scheinbar die gesamten Kavitäten mit Zellen gefüllt. Hier war auch der Anteil der toten Zellen (rot gefärbt) deutlich höher.

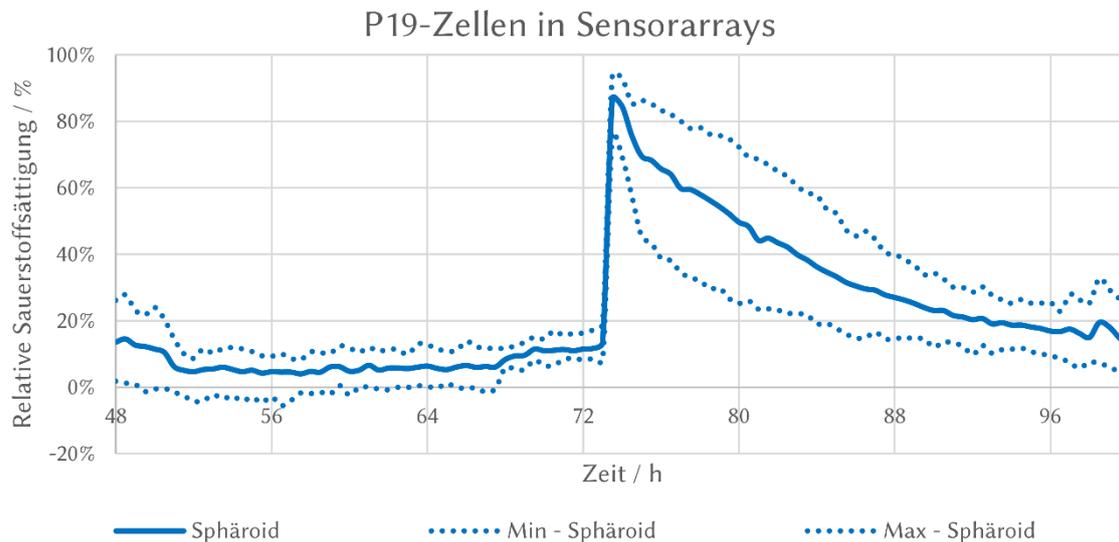


Abbildung 75: Sauerstoffmessung im Sensorarray 1054 im Zeitraum von 48 bis 96 Stunden, ausgewertet mit CellProfiler™. Dargestellt ist der Mittelwert im Bereich der Sphäroide sowie die Kavitäten mit den niedrigsten bzw. höchsten Sauerstoffkonzentrationen.

Die Sauerstoffmessung wurde 24 Stunden vor und nach dem Mediumwechsel durchgeführt. Zwischen 48 und 72 Stunden lag die Sauerstoffkonzentration bei unter 10 %, in einigen Kavitäten sogar bei 0 % (Abbildung 75). Der Mediumwechsel nach 72 Stunden führte erwartungsgemäß zu einem deutlichen Anstieg der Sauerstoffkonzentration, gefolgt von einer Abnahme.

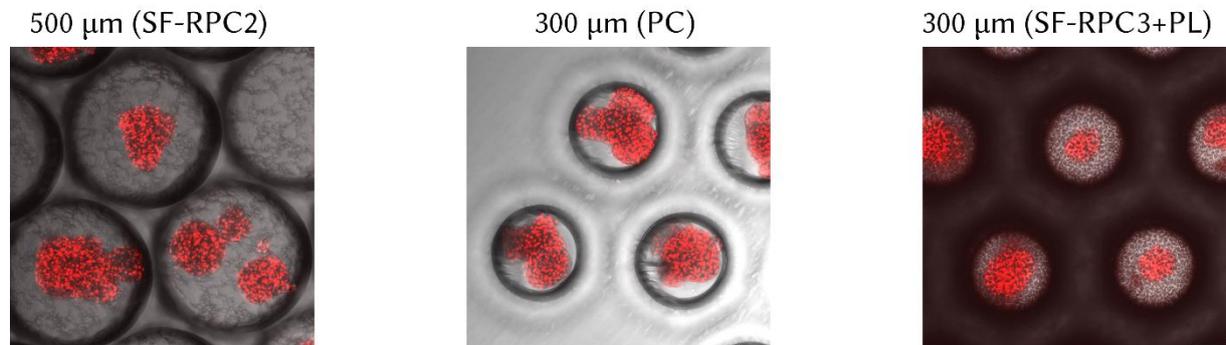
6.4.4 Kardiomyozyten in Sensorarrays

Um die Vergleichbarkeit zur *in vivo*-Situation und die Komplexität des Testsystems zu erhöhen, wurden aus induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten, die von einem Kooperationspartner (AG Zweigerdt, Medizinische Hochschule Hannover (MHH)) zur Verfügung gestellt wurden, im System getestet.

Die Kardiomyozyten wurden in einem Bioreaktor an der MHH differenziert und dann in Form von Zellaggregaten an das KIT geschickt. In einem ersten Versuch sollte überprüft werden, ob sich diese Kardiomyozyten in den (Sensor-)Arrays kultivieren lassen. Die gelieferten Zellaggregate hatten eine Größe von 100 bis ca. 300 μm . Daher wurden neben den 300 μm -Kavitäten auch die größeren mit 500 μm verwendet. Zum einen wurden die Zellaggregate, wie erhalten, auf die (Sensor-)Arrays gegeben (Abbildung 76 A). Zum anderen wurden die

Kardiomyozyten-Aggregate zunächst dissoziiert und als Einzelzellsuspension auf die (Sensor-) Arrays gegeben, wo sie reaggregierten (Abbildung 76 B).

A) Aggregate der MHH



B) Vereinzelt und in den Sensorarrays reagregriert

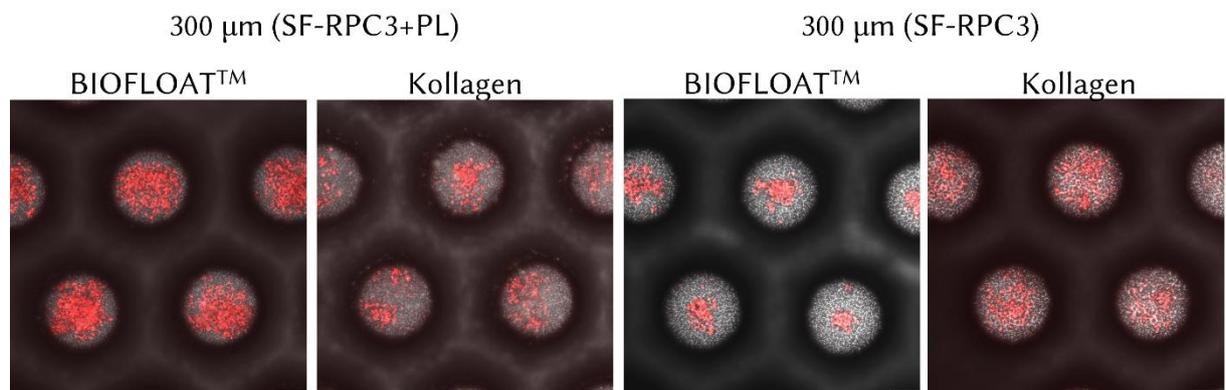


Abbildung 76: Kardiomyozyten in (Sensor-)Arrays. A) Kardiomyozyten-Aggregate auf (Sensor-)Arrays. B) Dissoziierte Kardiomyozyten-Aggregate als Einzelzellsuspension auf den Sensorarrays mit verschiedenen Beschichtungen nach 24 Stunden. Gesamtvergrößerung: 100 x, Maßstabsbalken: 100 µm.

Bereits einen Tag nach dem Aussäen der Zellen formten sich in den mit BIOFLOAT™-beschichteten Sensorarrays gleichmäßige Zellaggregate, während in den Kollagen-beschichteten eine ungleichmäßige Aggregation zu sehen war.

Auch über einen Zeitraum von bis zu 16 Tagen konnte in den BIOFLOAT™-beschichteten Sensorarrays ein gleichmäßigeres Wachstum beobachtet werden (Abbildung 77).

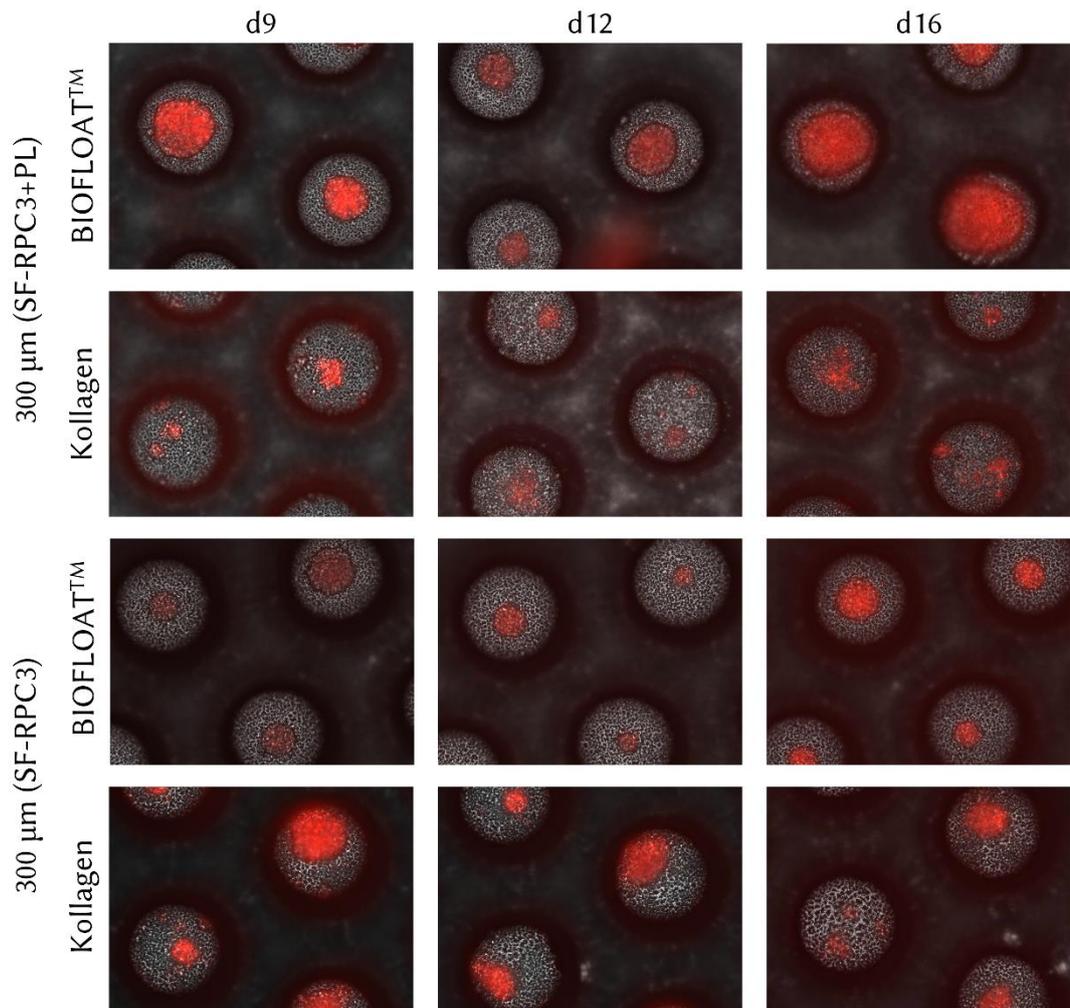


Abbildung 77: Reaggregierte Kardiomyozyten in Sensorarrays nach 9, 12 und 16 Tagen. Gesamtvergrößerung: 100 x.

In den Sensorarrays aus SF-RPC3+Plasma-Folien mit einer Kollagenbeschichtung zeigten sich nur sehr kleine, unregelmäßige Aggregate, teilweise mehrere pro Kavität. Hingegen in den Kollagen beschichteten SF-RPC3-Sensorarrays war die Aggregatbildung gleichmäßiger als in den SF-RPC3+Plasma-Sensorarrays. Für weitere Experimente mit Kardiomyozyten wurde die BIOFLOAT™-Beschichtung gewählt, bevorzugt mit SF-RPC3-Sensorarrays, da hier die Aggregation am gleichmäßigsten zu beobachten war. Neben der Morphologie der Zellaggregate war die Messung des genetisch codierten Calciumindikators wichtig. In Abbildung 78 sind exemplarisch die Signale der Aggregate aus Hannover in PC-Arrays, der reaggregierten Zellen in SF-RPC3+Plasma (Kollagen) und SF-RPC3 (BIOFLOAT™) in einem Zeitraum von zwei Sekunden dargestellt.

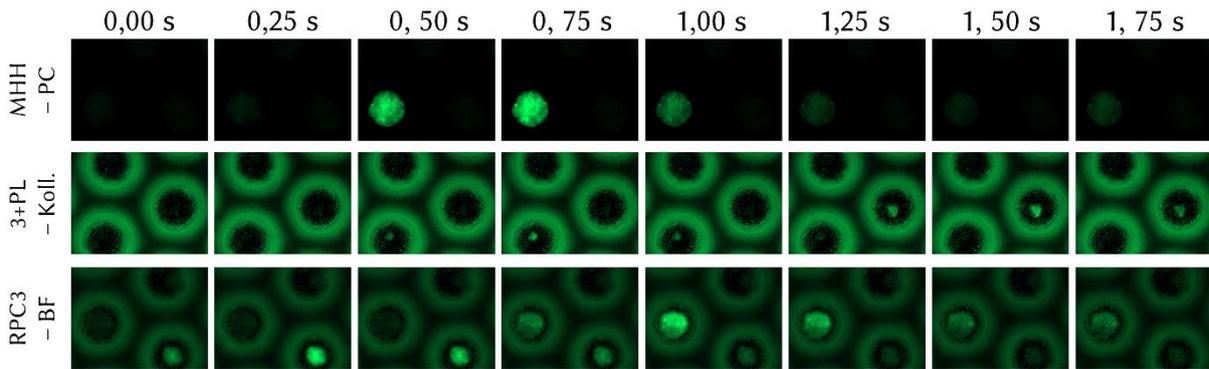


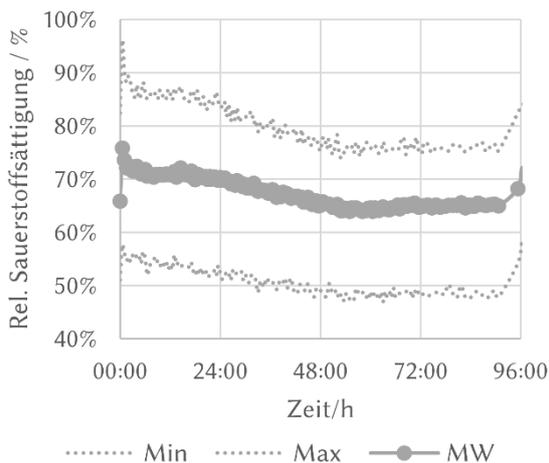
Abbildung 78: Zeitserie des intrazellulären Calciumsignals, gemessen mit einem GFP-Filterset. Gesamtvergrößerung: 100 x.

Deutlich zu sehen war, dass auch die kleineren Aggregate das Calciumsignal aufwiesen. Bei den größeren (BIOFLOAT™) war die Frequenz jedoch gleichmäßiger. Bei den Kollagenbeschichteten Sensorarrays gab es teilweise sehr kleine Aggregate bis hin zu Einzelzellen, die adhärirten. Diese zeigten eine deutlich höhere Frequenz des Calciumsignals.

Die Sauerstoffkonzentration (Abbildung 79 A) zeigte eine leichte Abnahme während der Kultivierung. Jedoch ist eine deutliche Differenz zwischen dem Bereich der Fase und des Sphäroids zu sehen (Abbildung 79 B). Dies lässt darauf schließen, dass die Zellzahlen zu gering waren, dadurch ist die Diffusion von Sauerstoff schneller als der Verbrauch und Änderungen sind wenig sichtbar. Eine Anpassung der Zellzahl war daher notwendig.

Kardiomyozyten in Sensorarrays (SF-RPC3 Plasma, BIOFLOAT™)

A) Auswertung mit Live MITOS



B) Auswertung mit CellProfiler™

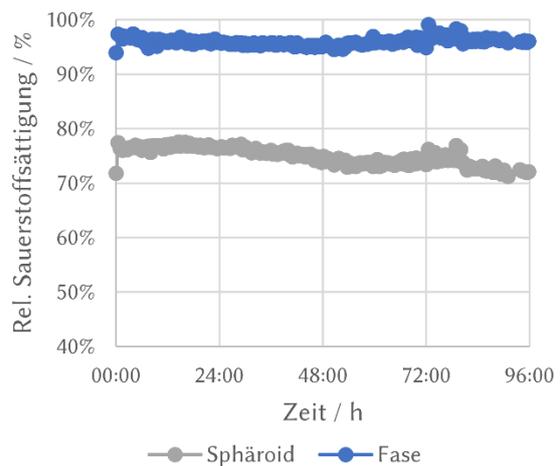


Abbildung 79: Sauerstoffmessung der Kardiomyozyten in Sensorarrays. A) Ausgewertet mit Live MITOS, dargestellt ist der Mittelwert sowie die Minimal- bzw. Maximalwerte. B) Ausgewertet mit CellProfiler™

Ausgehend von den ersten Ergebnissen, wurden 1×10^5 , 2×10^5 und 4×10^5 Kardiomyozyten in Sensorarrays kultiviert. Als Vergleich dienten durch einen Bioreaktor generierte Kardiomyozyten-Aggregate (Abbildung 80). Selbst 16 Tage nach Aussäen der Zellen waren die

Aggregate aus 4×10^5 Zellen noch in einer akzeptablen Größe, sodass diese Zellzahl auch für die Charakterisierung verschiedener Testsubstanzen verwendet wurde.

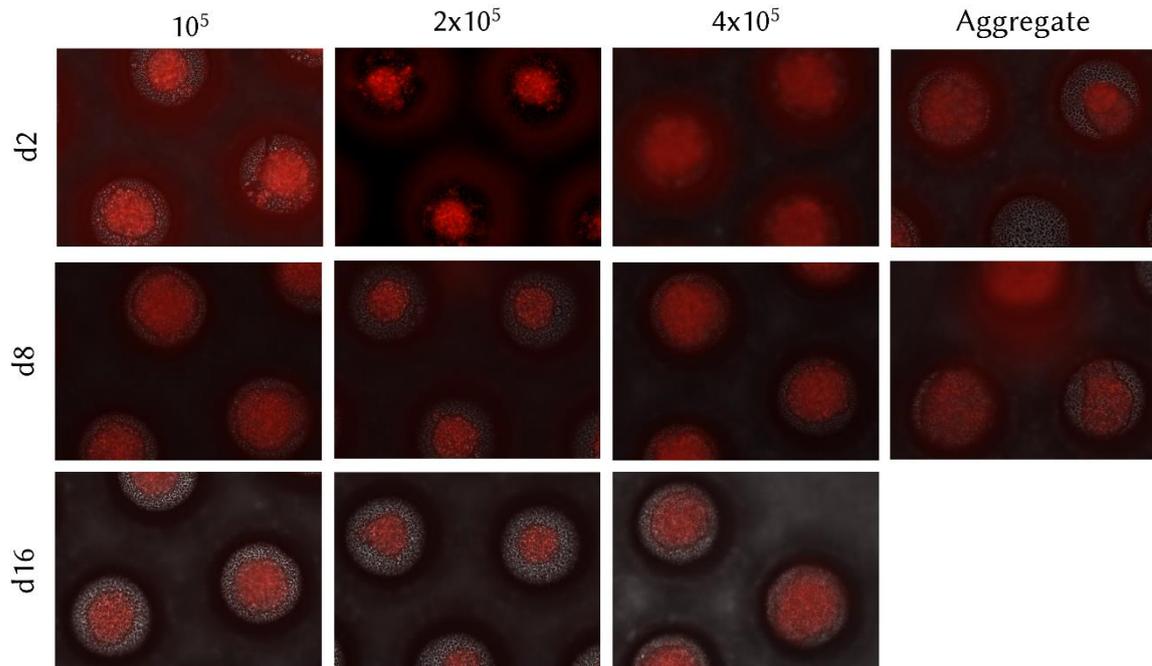


Abbildung 80: Unterschiedliche Zellzahlen im Vergleich zu den vorhandenen Zellaggregaten. Gesamtvergrößerung: 100 x.

Die Kardiomyozyten wurden durch den Kooperationspartner für jede Versuchsreihe einzeln bereitgestellt. Die erhaltenen Aggregate unterschieden sich geringfügig in ihrer Größe. Daher wurden die Zelllieferungen zunächst mikroskopisch charakterisiert.

6.4.5 Einfluss von Isoprenalin

Um die physiologischen Reaktionen der Zellen auf äußere Reize zu charakterisieren und damit mit *in vivo*-Gewebe vergleichen zu können, wurde dem Testsystem Isoprenalin, das als Sympathomimetikum zu einer erhöhten Schlagfrequenz des Herzens führt, zugegeben. Dies führt zu einem Calciumeinstrom in die Herzmuskelzellen, der durch den Calciumreporter in Form eines Fluoreszenzsignals in den Kardiomyozyten angezeigt wird. Die Kontraktion konnte auch lichtmikroskopisch beobachtet werden, für die Auswertung war jedoch die Messung des Calciumsignals eindeutiger.

Bereits im Zusammenhang mit der Untersuchung verschiedener Beschichtungen für die Kultivierung von Kardiomyozyten (Abbildung 77 und Abbildung 78) wurde beobachtet, dass kleinere Aggregate deutlich schneller und vor allem unregelmäßige Calciumsignale zeigten. Aus diesem Grund wurden kleinere Aggregate bei der Auswirkung von Isoprenalin auf die Schlagfrequenz nicht berücksichtigt.

Einfluss von Isoprenalin auf Kardiomyozyten-Aggregate

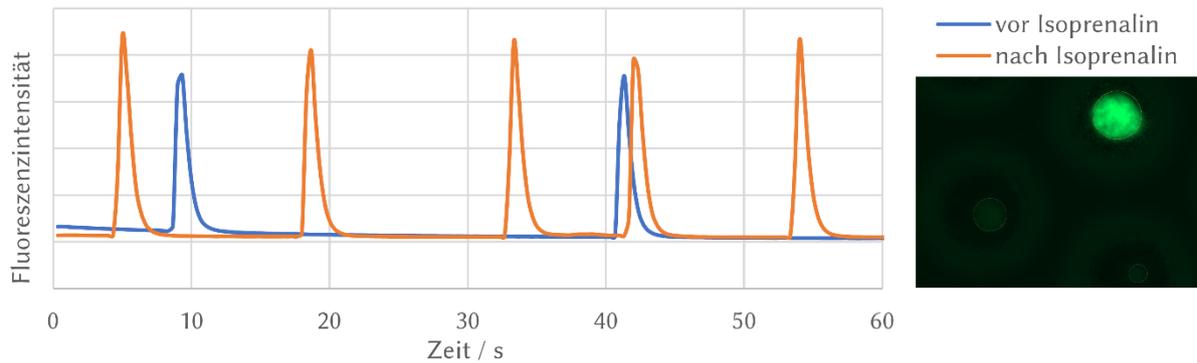


Abbildung 81: Einfluss von Isoprenalin auf Kardiomyozyten-Aggregate. Beispiel der Daten aus 1119 vor und nach Applikation von Isoprenalin.

Für die Messung wurden die Aggregate mikroskopisch für einen definierten Zeitraum betrachtet und jeweils die Fluoreszenz detektiert. Abbildung 81 zeigt beispielhaft die unmittelbare Auswirkung von $1 \mu\text{M}$ Isoprenalin. Die Sphäroide wurden in mittelgroße (100 bis ca. $200 \mu\text{m}$ Durchmesser) und größere (ab $200 \mu\text{m}$ Durchmesser) klassifiziert (Abbildung 82). Als Referenz dienten jeweils die unbehandelten Sphäroide. Nach der Behandlung mit $0,01 \mu\text{M}$ Isoprenalin kam es zu einem signifikanten Anstieg (Mann-Whitney-U-Test) der Kontraktionen. Höhere Konzentrationen von Isoprenalin (ab $0,1 \mu\text{M}$) führten jedoch zu keinem signifikanten Ergebnis. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass bei höheren Isoprenalin-Konzentrationen die Kontraktionsfrequenz zunächst gegen 0 ging. Bei $0,1$ bzw. $1 \mu\text{M}$ Isoprenalin war unmittelbar nach der Zugabe ein Ergebnis wie in Abbildung 81 oder Abbildung 82 zu sehen, nach 10 Minuten ging auch hier die Kontraktionsfrequenz auf 0 zurück.

Einfluss von Isoprenalin auf die Kontraktionsfrequenz

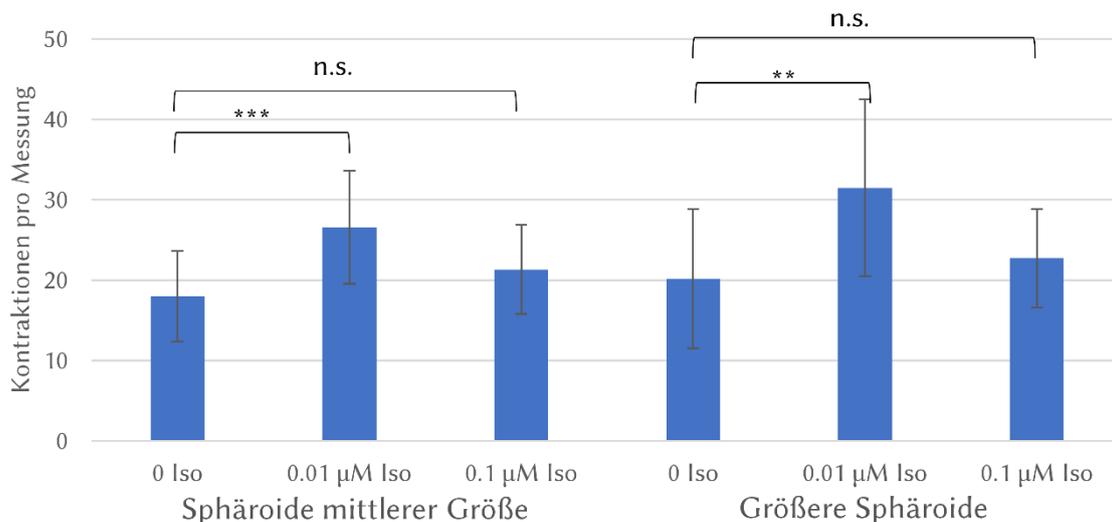
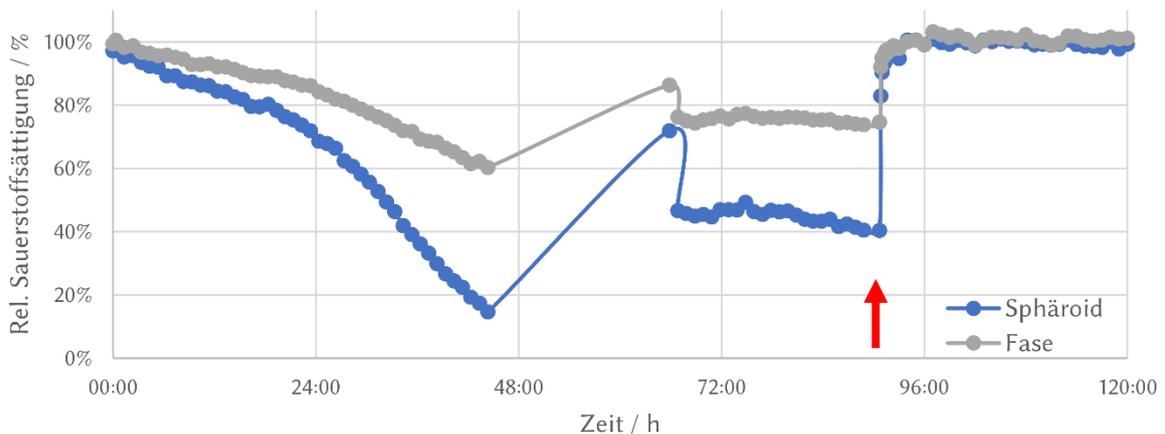


Abbildung 82: Kontraktionen vor und nach der Behandlung mit Isoprenalin. Die Kontraktionen wurden durch die Messung des Calciumsignals bestimmt. Die Signifikanz wurde mithilfe eines zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests berechnet. n.s.: nicht signifikant, **: signifikant (Konfidenzintervall 97,5 %), ***: signifikant (Konfidenzintervall: 99 %), Iso: Isoprenalin.

6.4.6 Zellatmungsgifte

Nachdem für die Kultivierung der Zellen bereits eine abnehmende Sauerstoffkonzentration beobachtet werden konnte, sollte in einem weiteren Versuch geprüft werden, ob auch Auswirkungen von Zellatmungsinhibitoren auf die Sauerstoffkonzentration in diesem System gemessen werden können. Hierfür wurden HepG2- bzw. Hela-Zellen in Sensorarrays kultiviert und mit dem Zellatmungsinhibitor Antimycin A behandelt. Unmittelbar nach der Zugabe von 1 μM Antimycin A stieg die Sauerstoffkonzentration sprunghaft auf das Niveau des Experimentbeginns an (Abbildung 83). Wurde nur vorübergehend mit Antimycin A behandelt, so konnte nach ca. 20 Stunden wieder ein Absinken der Sauerstoffkonzentration beobachtet werden.

A) Hela-Zellen



B) HepG2-Zellen

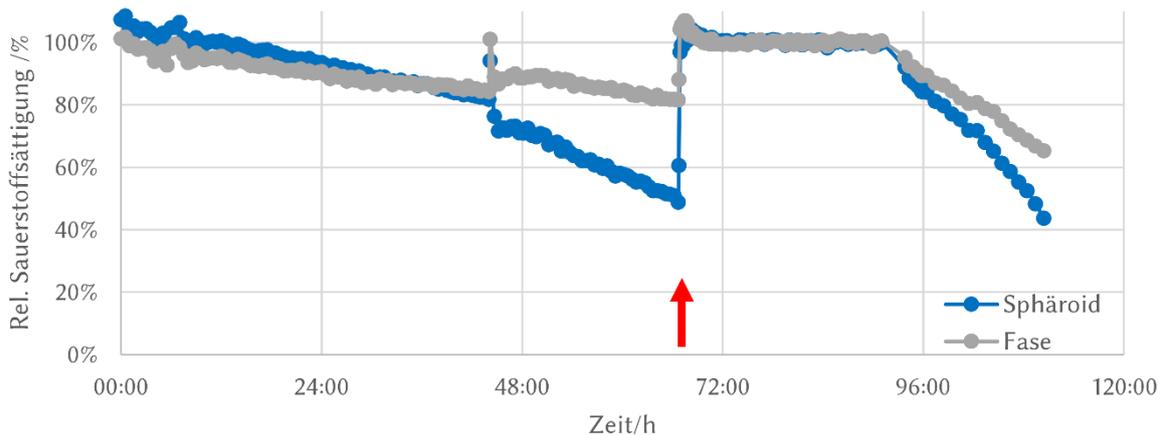


Abbildung 83: Exemplarische Daten von Hela- bzw. HepG2-Zellen. Zugabe von 1 μM Antimycin A nach 90 bzw. 70 Stunden (roter Pfeil).

6.4.7 3D Mito Stress Test

Aufgrund der einfacheren Verfügbarkeit der HepG2-Zellen wurde der Mito Stress Test zunächst mit diesen etabliert und anschließend auf Stammzell-abgeleitete Kardiomyozyten übertragen.

6.4.7.1 Mito Stress Test an HepG2-Sphäroiden

Der herkömmliche Mito Stress Test wurde für die Verwendung in Kombination mit den Sensorarrays entsprechend angepasst (Abbildung 84).

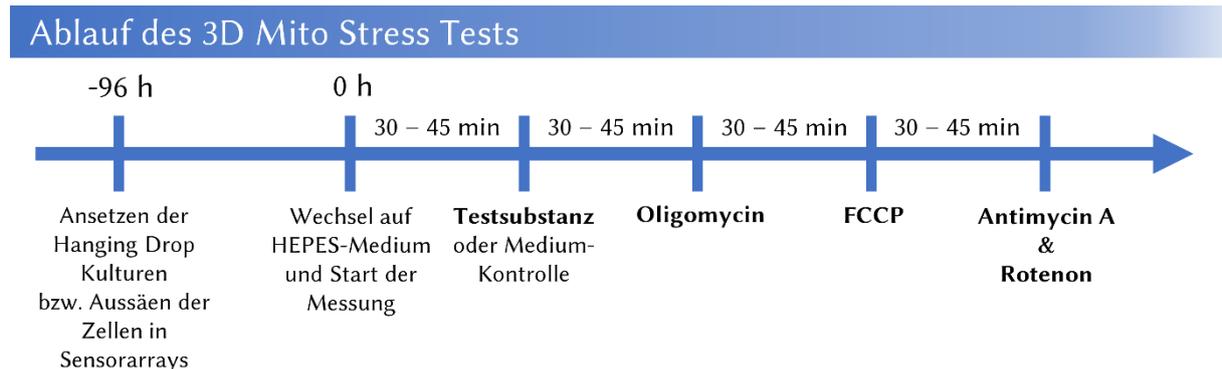


Abbildung 84: Grundsätzlicher Ablauf des angepassten 3D Mito Stress Tests. Der Mito Stress Assay wurde ohne Zusatz von CO₂ bei 37 °C durchgeführt, daher war ein HEPES-gepuffertes Assay-Medium notwendig.

Für die Messung der Sauerstoffkonzentrationen mussten die Sphäroide eine ausreichende Größe haben, sonst war die Nachdiffusion im Vergleich zum Verbrauch zu groß, sodass keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden konnten. Da, im Gegensatz zu den ersten Kultivierungsversuchen, für den Mito Stress Test kürzere Vorkultivierungen vorgesehen waren, wurde die Zellzahl nochmals optimiert. Zudem wurde neben der Aggregation in den Kavitäten der Sensorarrays die Generierung von Sphäroiden mit der Hanging Drop-Methode getestet (Abbildung 85). Hierbei wurde beobachtet, dass HepG2-Zellen höherer Passagen (ab ca. 30, Abbildung 85, $1,5 \times 10^5$ Zellen) deutlich schlechter aggregierten. Die Sphäroide, die mit der Hanging Drop Methode generiert wurden, hatten einen Durchmesser von rund 200 µm, unabhängig von der Passagenzahl.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die Mito Stress Tests sowohl mit der Hanging Drop-Methode generierte Sphäroide (hier als „hanging drop spheroids“, HDS bezeichnet) als auch in den Mikrokavitäten generierte Sphäroide (hier als „microcavity spheroids“, MCS bezeichnet) verwendet.

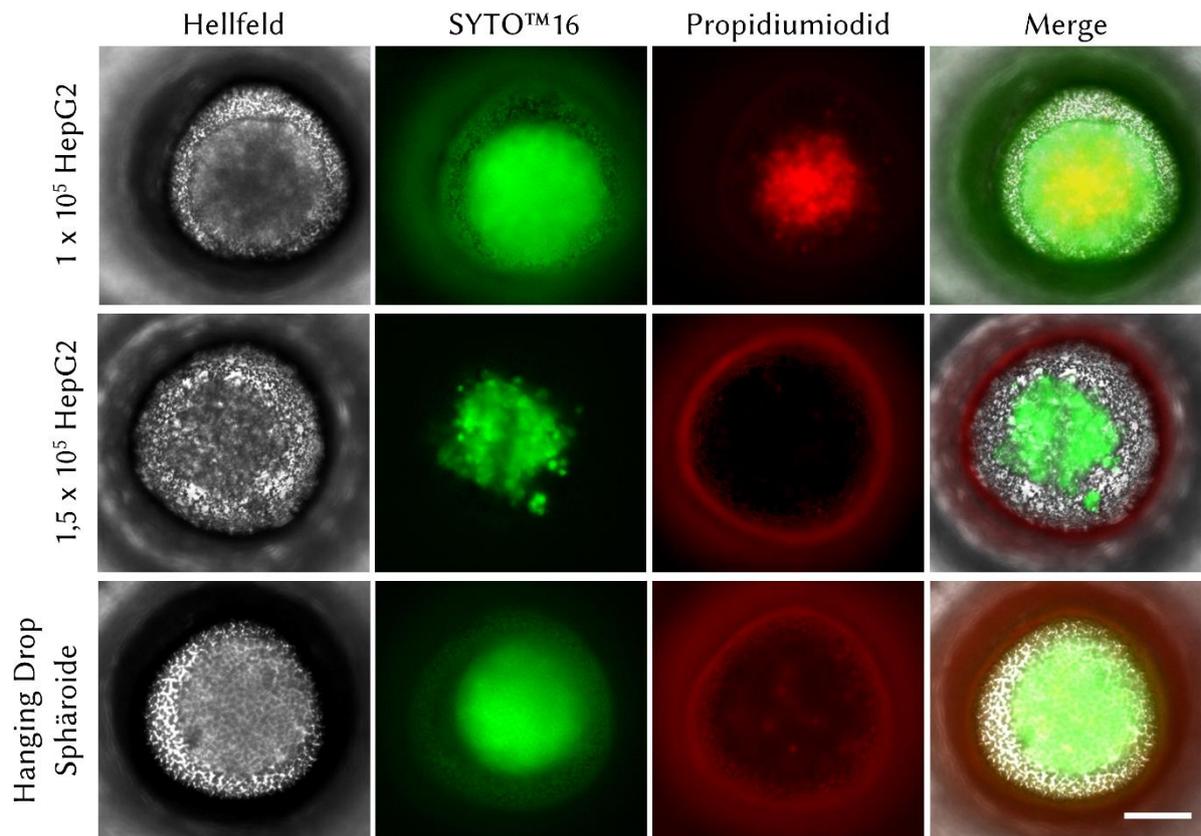


Abbildung 85: Darstellung der verschiedenen Zellzahlen und Kultivierungsmethoden. Gesamtvergrößerung: 100 x, Maßstabsbalken: 100 μm

Etablierung des 3D Mito Stress Tests und Kontrollversuche

Um den Mito Stress Test in 3D zu etablieren und als Referenz für verschiedene Testsubstanzen, wurde dieser zunächst mit Medium (HepG2-Medium mit 10 mM HEPES) als Kontrolle durchgeführt. Die Versuche wurden mehrfach durchgeführt. Dabei wurden Experimente, die nicht funktionierten bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Ein Beispiel für so ein Experiment ist in Abbildung 86 dargestellt. Hierbei war bei jeder Substanzapplikation ein ähnliches Muster erkennbar. Da zumindest die FCCCP- bzw. Antimycin A & Rotenon-Zugabe eindeutige Muster zeigten, konnte hier von einem fehlerhaften Ansatz ausgegangen werden.

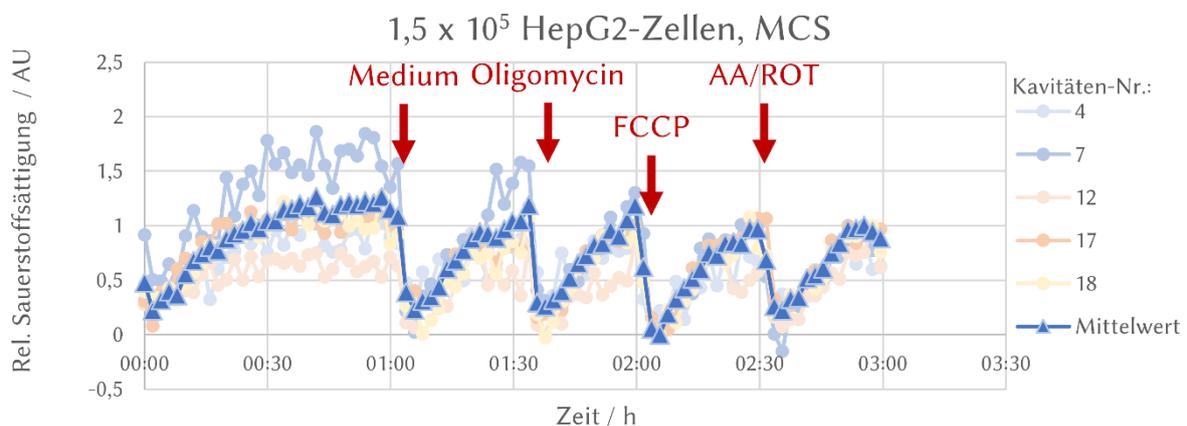


Abbildung 86: Kontrollversuch mit HepG2-Zellen mit einem nicht aussagekräftigen Ergebnis.

Da während einer Messung bis zu 20 Mikrokavitäten eines Sensorarrays gleichzeitig gemessen werden konnten, konnten diese auch unabhängig ausgewertet werden. Wie bereits beschrieben war es möglich, dass während des Mediumwechsels einzelne Sphäroide aus den Kavitäten gespült wurden. Diese leeren Mikrokavitäten sollten dann auch keine Änderung der Sauerstoffsättigung nach Hinzufügen der Referenzsubstanzen anzeigen. Daher wurden diese bei der Auswertung auch nicht berücksichtigt. Außerdem wurden Datenreihen nicht berücksichtigt, bei denen aufgrund von Auswertefehlern bei mehr als 30 % der Zeitpunkte kein Messwert vorlag. Dies konnte vorkommen, da CellProfiler™ nicht immer jede Kavität erkannte.

Durch Unterschiede in der Belichtung über das Field of View, war eine Normalisierung der Daten notwendig. Hierfür wurde der Wert nach Zugabe von FCCP auf 0 % und der nach Zugabe von Rotenon/Antimycin A auf 100 % normiert.

Der Verlauf der Sauerstoffsättigungen während der Mito Stress Tests ist in Abbildung 87 exemplarisch dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden Δ AU-Werte bestimmt (Abbildung 88 und Tabelle 25). Die Zugabe von Medium als Kontrollsubstanz führte unmittelbar danach zu einem leichten Anstieg der Sauerstoffkonzentration. Bei den MCS (aus $1,5 \times 10^5$ HepG2-Zellen) um durchschnittlich 0,15 AU, bei den HDS um durchschnittlich 0,09 AU. Wurde jedoch Δ AU 30 min nach der Zugabe des Mediums berechnet, so war hier fast keine Änderung der Sauerstoffsättigung im Vergleich zu vor der Mediumzugabe zu sehen. Oligomycin führte ebenfalls zu einem Anstieg der relativen Sauerstoffsättigung um 0,13 bis 0,22 AU (MCS) bzw. 0,22 AU (HDS) direkt nach der Messung. Bei den HDS wurde eine maximale Änderung von 0,58 AU gemessen. Durch den Entkoppler FCCP sank die Sauerstoffsättigung um -0,59 bis -0,8 AU (MCS) bzw. 0,78 AU (HDS). Hier konnten über 30 min leichte Schwankungen beobachtet werden, sodass Δ AU 30 min nach der Zugabe von FCCP bei den MCS mit 5×10^4 und 1×10^5 Zellen zunahm, während dieser Wert bei den MCS mit $1,5 \times 10^5$ Zellen und den HDS geringfügig kleiner wurde. Die vollständige Inhibition der mitochondrialen Atmung im letzten Schritt führte zu einem Anstieg um 0,80 bis 0,93 AU (MCS) bzw. 0,80 AU (HDS). Neben diesen Zellzahlen wurden auch weitere Zellzahlen und Oligomycin-Konzentrationen getestet. Diese wurden in Tabelle 25 zusammengefasst und in Abbildung 88 grafisch ausgewertet.

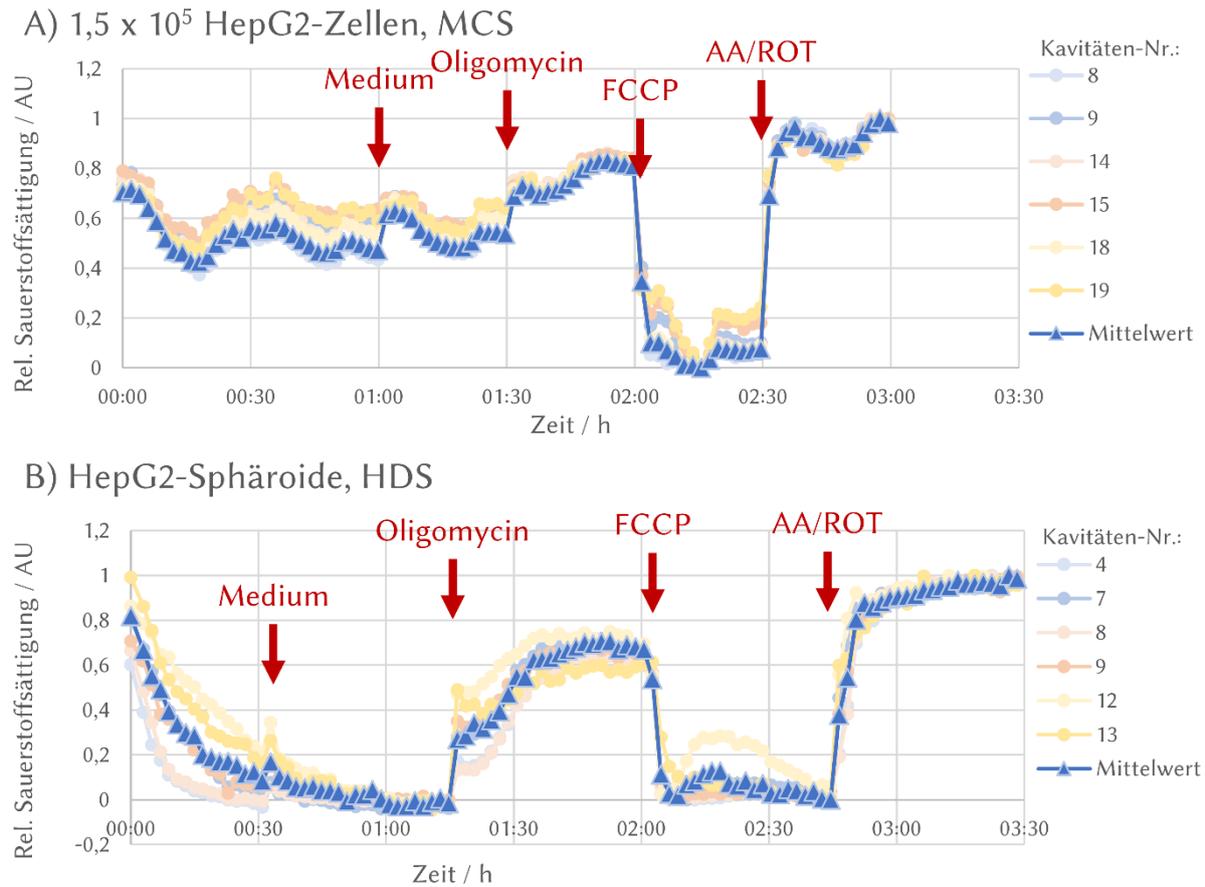
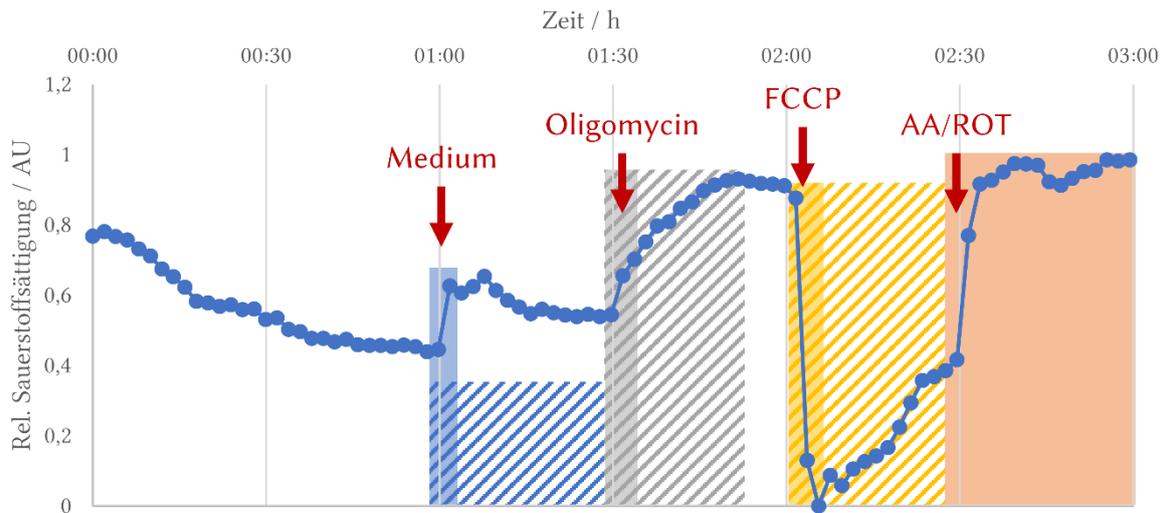


Abbildung 87: Exemplarische Darstellung eines Mitochondrien Stress Tests mit HepG2-Medium als Kontrolle. A) Sphäroide direkt in den Mikrokanälen generiert aus $1,5 \times 10^5$ HepG2-Zellen und B) mit der Hanging Drop Methode generierte Sphäroide.

Tabelle 25: Auflistung der Kontrollversuche mit unterschiedlichen Parametern sowie der Werte zu Abbildung 88.

Sphäroide / Zellzahl	n	Inkubation vor Versuch	Oligomycin [μ M]	Δ AU Medium 1 min	Δ AU Medium 30 min	Δ AU Oligomycin 1 min	Δ AU Oligomycin Max.	Δ AU FCCP 1 min	Δ AU FCCP 30 min	Δ AU AA/ROT Max.
MCS 5×10^4	1	5 d	4	0,10	0,03	0,13	0,22	-0,75	-0,89	0,93
MCS 1×10^5	2	3-4 d	12-16	0,09	-0,01	0,21	0,28	-0,59	-0,72	0,87
MCS $1,5 \times 10^5$	3	3 d	16	0,15	0,08	0,22	0,25	-0,80	-0,64	0,80
HDS	4	4 d	4	0,09	-0,02	0,22	0,58	-0,78	-0,61	0,80

A) Darstellung der Zeitbereiche zur Berechnung der Δ -Werte

B) Änderung der rel. Sauerstoffkonzentration nach Substanzapplikation

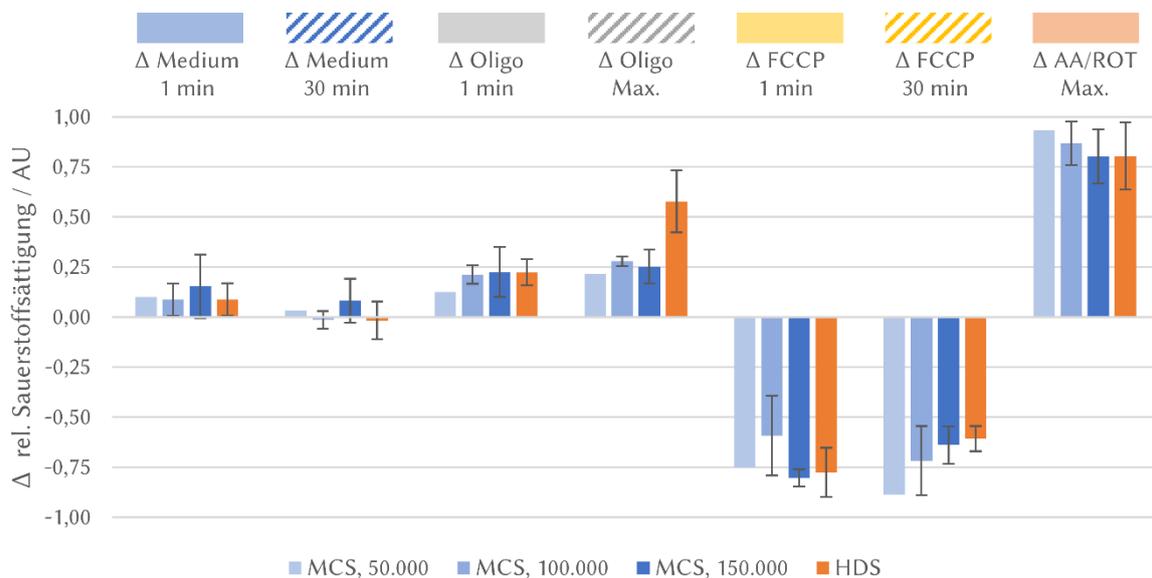


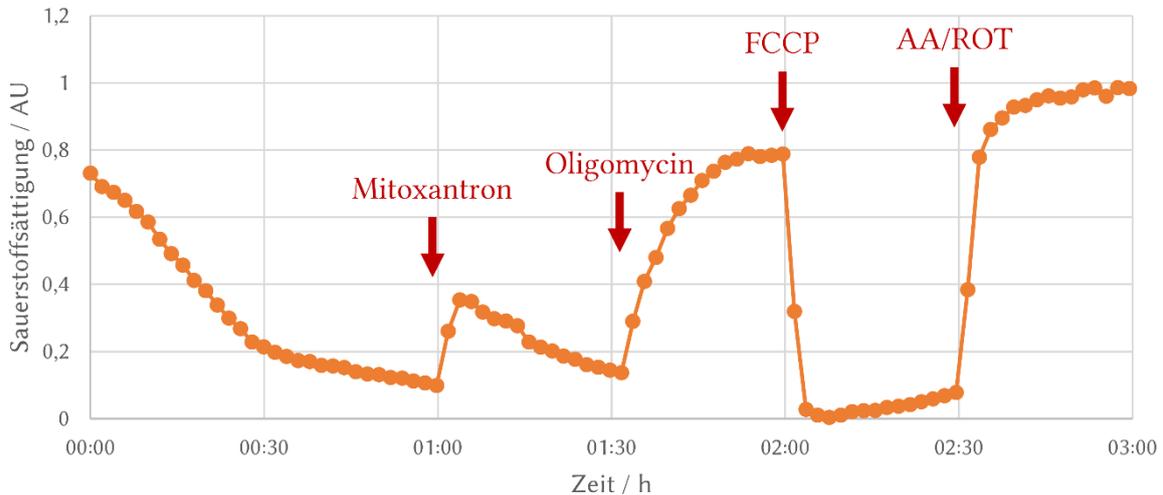
Abbildung 88: Änderung der Sauerstoffsättigung während eines Kontroll-Mito Stress Tests. A) Beispiel einer Verlaufskurve der Sauerstoffsättigung mit eingezeichneten Bereichen zur Berechnung der Δ -AU Werte. Die Minuten-Angaben beziehen sich auf den Wert, der 1 bzw. 30 min nach Substanzapplikation gemessen wurde. Als „Max.“ wurde der Maximalwert nach der jeweiligen Substanzapplikation, aber vor der nächsten Substanzapplikation verwendet. B) Darstellung der Änderung der relativen Sauerstoffsättigung nach der Applikation verschiedener Substanzen.

Nach Mediumzugabe (Abbildung 88) konnte zwischen den beiden Methoden – MCS und HDS – kein signifikanter Unterschied in der Sauerstoffsättigung festgestellt werden. Die Zugabe von Oligomycin führte in den Hanging Drop-Sphäroiden jedoch zu einem deutlicheren Anstieg.

Mitoxantron

Als erste Testsubstanz wurde Mitoxantron, ein antikanzerogener Wirkstoff, im Sauerstoff-Assay verwendet. Das Protokoll für den Mito Stress Test umfasste die Applikation von $0,2 \mu\text{M}$ Mitoxantron als Testsubstanz gefolgt von den Referenzsubstanzen $4 \mu\text{M}$ Oligomycin, $2 \mu\text{M}$ FCCP sowie je $1 \mu\text{M}$ Antimycin A und Rotenon.

A) Mito Stress Test an Hanging Drop Sphäroiden mit Mitoxantron



B) Änderung der Sauerstoffsättigung nach Zugabe der (Test-)Substanzen

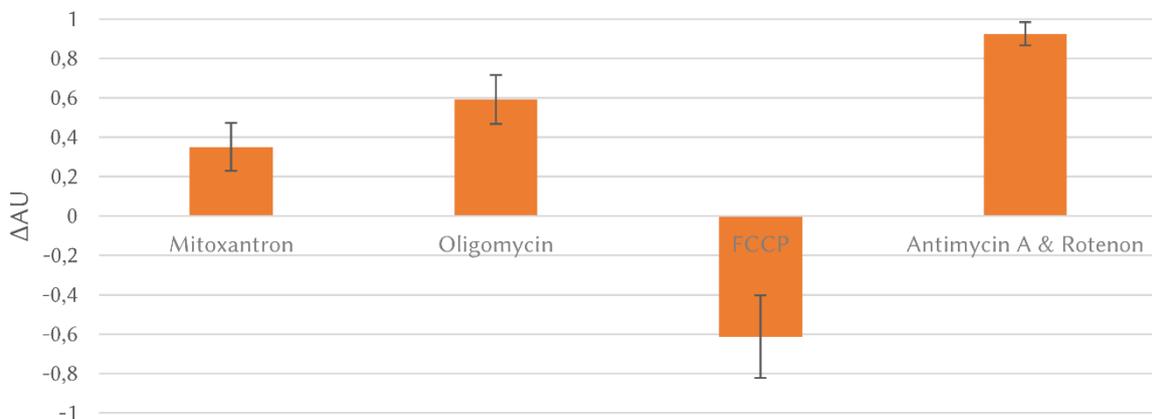


Abbildung 89: Mito Stress Test mit Mitoxantron. A) Exemplarischer Verlauf der Sauerstoffsättigung während des Mito Stress Tests mit der Testsubstanz Mitoxantron. Dargestellt ist der Mittelwert aus 11 Mikrokavitäten eines Experimentes. B) Änderung der Sauerstoffsättigung nach Zugabe von Mitoxantron sowie der Testsubstanzen. (n=4)

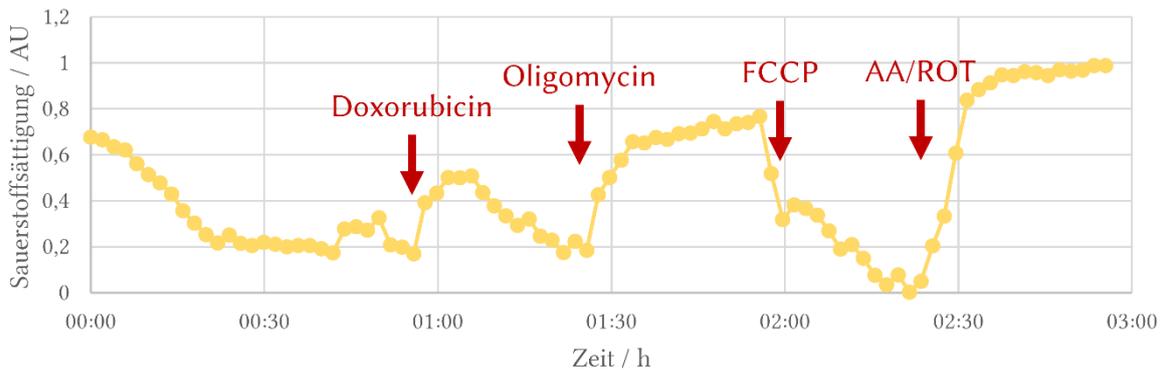
Nach Zugabe von $0,2 \mu\text{M}$ stieg die Sauerstoffkonzentration um durchschnittlich $0,35 \text{ AU}$ an (Abbildung 89).

Doxorubicin

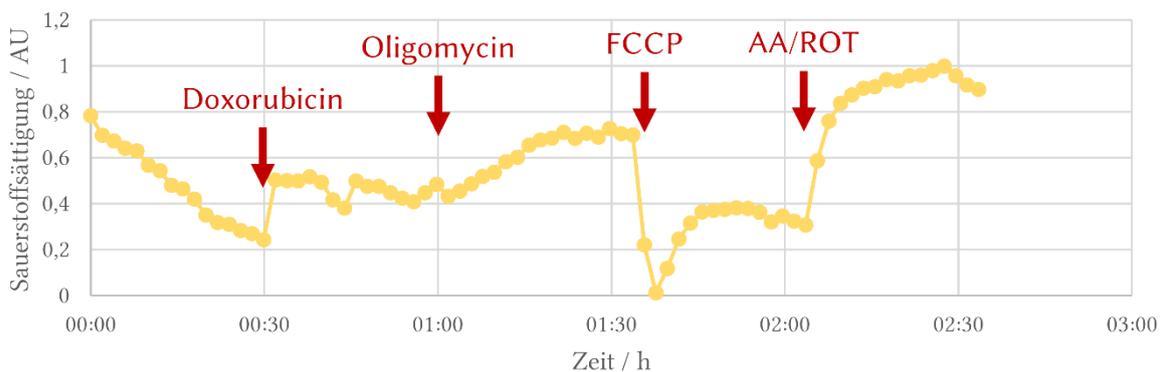
Als weitere Testsubstanz wurde $0,2 \mu\text{M}$ Doxorubicin verwendet. Doxorubicin ist ein zytostatisches Chemotherapeutikum, das jedoch kardiotoxisch ist [200]. Die Durchführung des Mito Stress Tests entsprach dem Ablauf der Testung von Mitoxantron.

Mito Stress Tests mit Doxorubicin

A) Weiteres Sinken der Sauerstoffsättigung nach FCCP-Applikation



B) Wiederanstieg der Sauerstoffsättigung nach FCCP-Applikation



C) Änderung der Sauerstoffsättigung nach Zugabe der (Test-)Substanzen

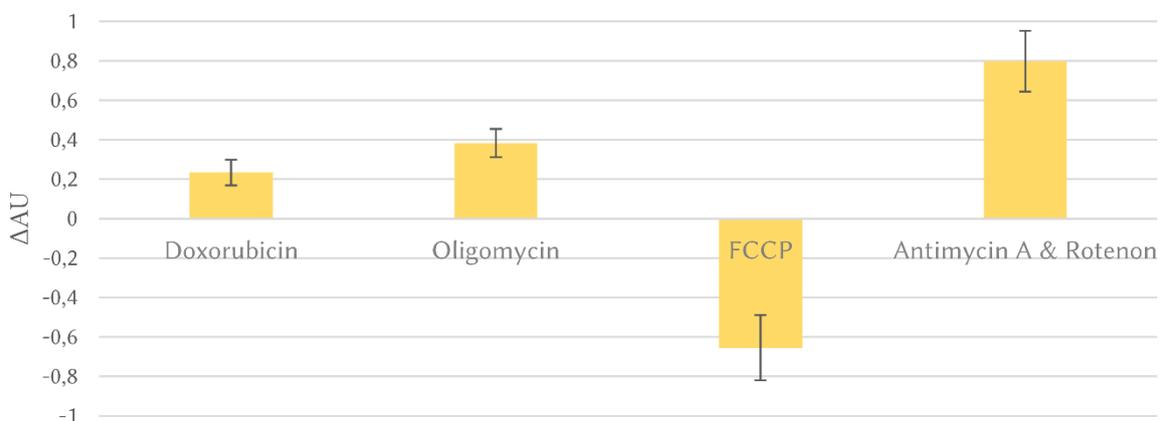


Abbildung 90: Mito Stress Test mit Doxorubicin. A) und B) Exemplarische Darstellung von zwei Mito Stress Tests mit der Testsubstanz Doxorubicin. C) Änderungen der Sauerstoffsättigung nach Zugabe von $0,2 \mu\text{M}$ Doxorubicin sowie der Referenzsubstanzen. (n=4)

Bei den Versuchen konnte jeweils ein Anstieg der Sauerstoffsättigung nach Zugabe von 0,2 μM Doxorubicin gesehen werden (Abbildung 90). Auch die Änderungen nach der Zugabe der Referenzsubstanzen waren zu erwarten. Im Vergleich zu Mitoxantron bzw. den Kontroll-experimenten war der Anstieg nach der Oligomycin-Applikation hier geringer (Abbildung 90). Die Differenzen nach FCCP bzw. Antimycin A und Rotenon waren wieder vergleichbar.

Generell war zu erkennen, dass nach der Doxorubicin-Applikation zunächst ein sprunghafter Anstieg der Sauerstoffsättigung zu sehen war, gefolgt von einem leichten Abfall. Bei Oligomycin war der Anstieg langsam (Abbildung 90). FCCP bewirkte zunächst ein extremes Absinken der Sauerstoffsättigung. Jedoch konnten hier zwei unterschiedliche weitere Verläufe gemessen werden. Zum einen war ein weiteres Absinken der relativen Sauerstoffsättigung nach der FCCP-Zugabe zu sehen (Abbildung 90 A), zum anderen ein leichter Anstieg (Abbildung 90 B).

Vergleich der Testsubstanzen

Insgesamt konnte ein deutlicher Anstieg der Sauerstoffsättigung nach Zugabe von Mitoxantron sowie Doxorubicin gemessen werden (Abbildung 91). Der Anstieg war im Vergleich zur Kontrolle mit Medium deutlich größer. Betrachtete man die ersten Versuche, die mit einer niedrigeren Passage der HepG2-Zellen durchgeführt wurden, unabhängig von den späteren Versuchen, so konnte der Unterschied noch deutlicher beobachtet werden.

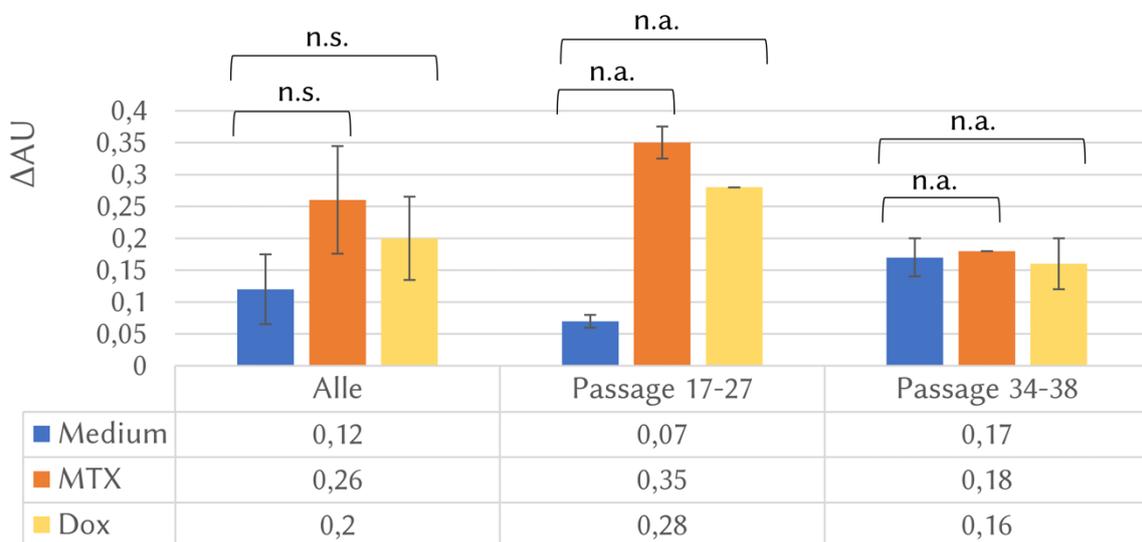


Abbildung 91: Änderung der relativen Sauerstoffsättigung nach Zugabe der Testsubstanzen. Dabei zu sehen waren tendenzielle Unterschiede bei Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Passage. Die Auswertung aller Experimente zeigte keine Signifikanz (Mann-Whitney-U-Test). Für die einzelnen Passagen konnte der Mann-Whitney-U-Test aufgrund zu weniger Datensätze nicht angewendet werden.

6.4.7.2 Mito Stress Test an Kardiomyozyten-Aggregaten

Vom Kooperationspartner wurden für die Mito Stress Tests zwei Arten von Kardiomyozyten bereitgestellt, die aus Stammzellen differenziert wurden. Diese unterschieden sich darin, dass die einen über einen genetisch codierten Calcium-Indikator verfügten, die anderen nicht. Die Differenzierung erfolgte beim Kooperationspartner in Aggregaten in geschüttelten bzw. gerührten Bioreaktoren. Neben der direkten Verwendung dieser Zellaggregate konnten diese auch zunächst dissoziiert und in den Sensorarrays reaggregiert werden, wodurch eine gleichmäßigere Größenverteilung der Aggregate erwartet wurde. Für die Mito Stress Tests wurden verschiedene Zellzahlen in den Sensorarrays getestet (Abbildung 92).

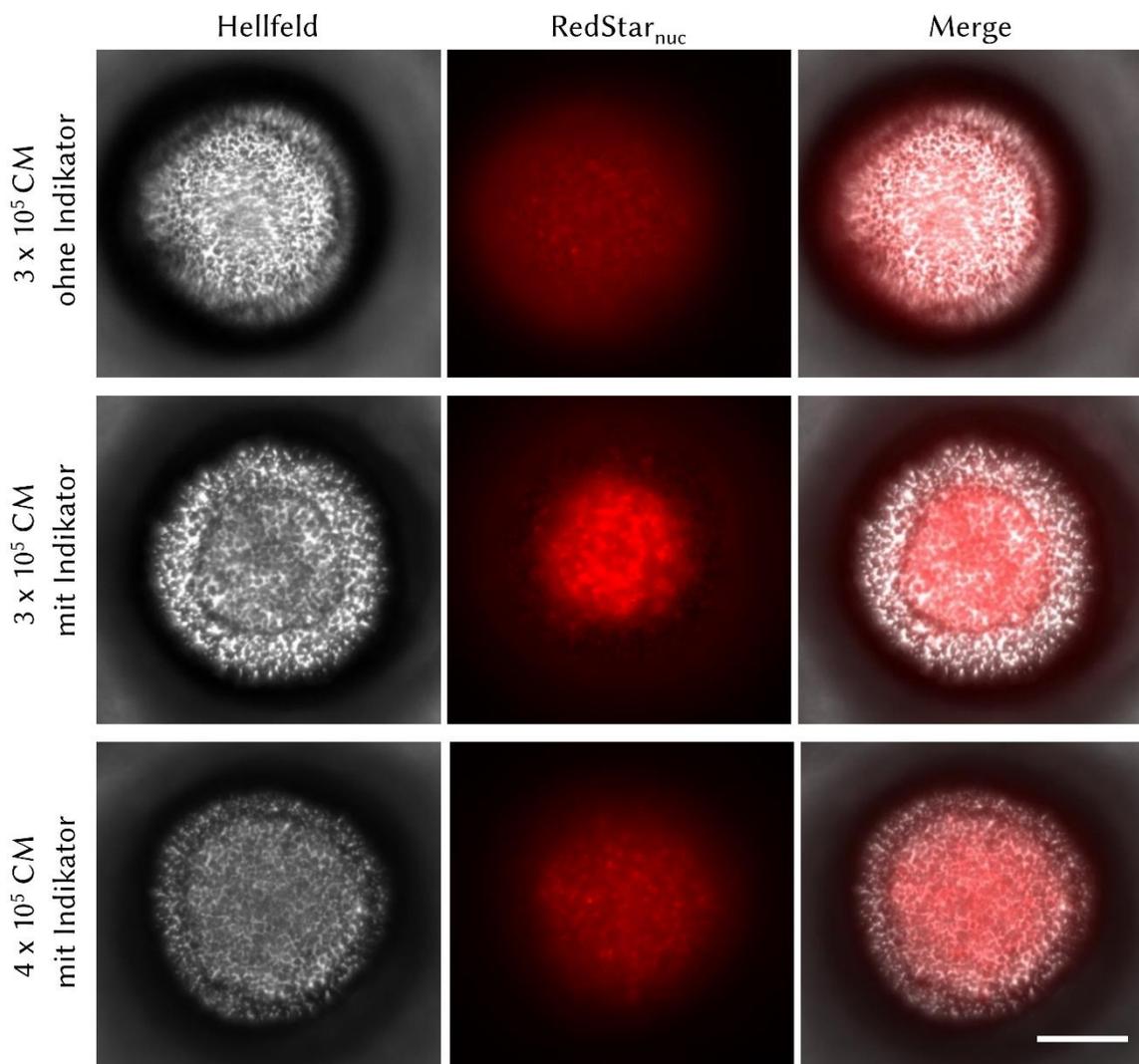


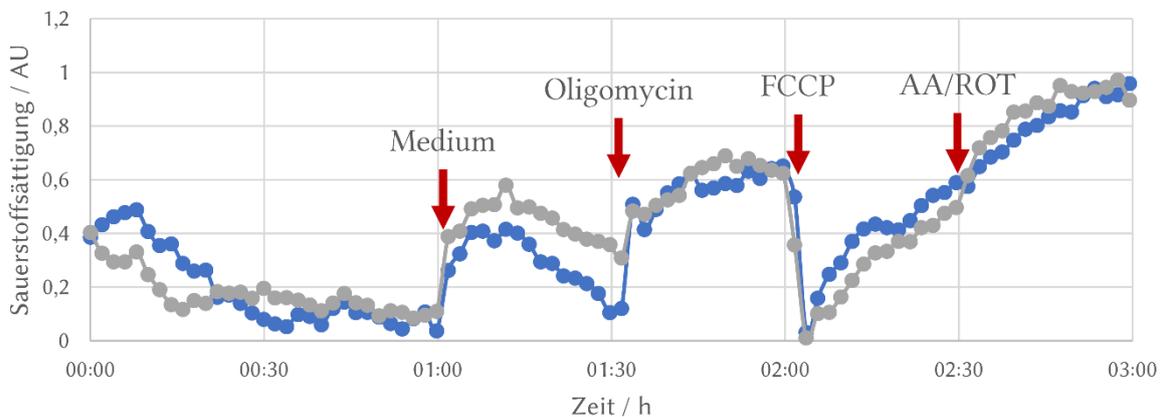
Abbildung 92: Für Mito Stress Tests verwendete Kardiomyozyten-Aggregate. Gezeigt sind die Hellfeldaufnahmen sowie die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Reporterproteins RedStar_{nuc}. Gesamtvergrößerung: 100 x, Maßstabsbalken: 100 μ m.

Aufgrund der geringen Zellzahl, die bereitgestellt wurde, konnte nur eine begrenzte Anzahl an Versuchen durchgeführt werden. Ergebnisse, bei denen tendenziell keine Unterschiede bei der FCCP bzw. Antimycin A- und Rotenon-Zugabe zu sehen war, wurden, wie auch schon bei den

Mito Stress Tests mit HepG2-Sphäroiden, für die Auswertung nicht berücksichtigt, da hier davon ausgegangen wurde, dass die Versuche aufgrund zu geringer Zellzahlen in den Mikrokavitäten nicht funktionierten.

Da in der Literatur verschiedene Konzentrationen der Referenzsubstanzen zu finden sind und es keine Erfahrungswerte für 3D-Zellkulturen gab, wurden zwei verschiedene Protokolle getestet (Abbildung 93). Hierfür wurden die Kardiomyozyten-Aggregate aus dem Bioreaktor ohne Calcium-Indikator verwendet. Die Unterschiede im Verlauf der relativen Sauerstoffsättigung nach dem Hinzufügen von Medium lassen sich durch eine unterschiedliche Zellaggregatgröße erklären. Mit beiden Varianten konnten Ergebnisse erzielt werden, für die weiteren Versuche wurden 6 μM Oligomycin und 10 μM FCCP verwendet.

A) Anpassung der Konzentrationen der Referenzsubstanzen



B) Änderung der Sauerstoffsättigung nach Substanzapplikation

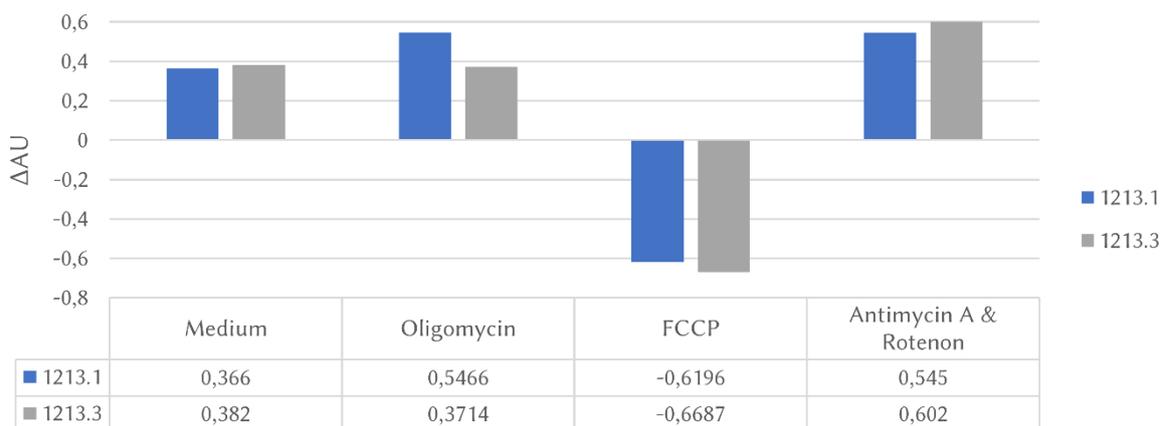
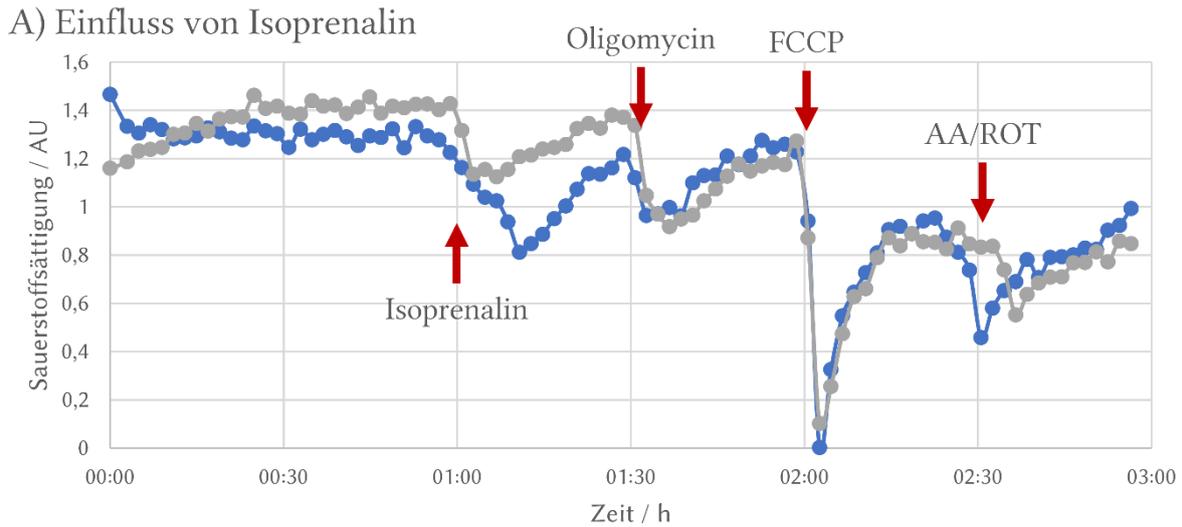


Abbildung 93: Vergleich verschiedener Konzentrationen der Referenzsubstanzen : 1213.1 mit 9 μM Oligomycin, 5 μM FCCP und jeweils 1 μM Antimycin A und Rotenon. 1213.3 mit 6 μM Oligomycin, 10 μM FCCP sowie jeweils 2 μM Antimycin A und Rotenon. A) Darstellung der Sauerstoffsättigung während des Mito Stress Tests. B) Darstellung der Änderung der Sauerstoffsättigung nach Substanzapplikation.

Auswirkung von Isoprenalin

Die Vorversuche zeigten, dass Kardiomyozyten-Aggregate auf die Applikation von $0,01 \mu\text{M}$ Isoprenalin reagieren (siehe 6.4.5). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Isoprenalin auf die Sauerstoffsättigung mit Hilfe des Mito Stress Tests untersucht. Hierfür wurden 3×10^5 dissoziierte Kardiomyozyten auf die Sensorarrays gegeben und dort reaggregiert. Hierbei konnte bei jeder Substanz zunächst ein Absinken der Sauerstoffsättigung gemessen werden, die jedoch dann wieder anstieg (Abbildung 94).



B) Änderung der Sauerstoffsättigung nach Isoprenalinapplikation

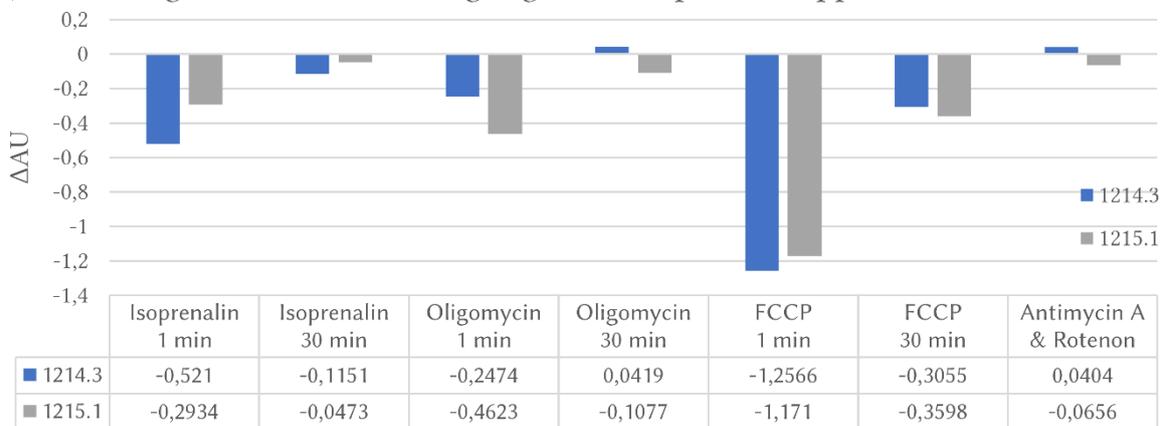


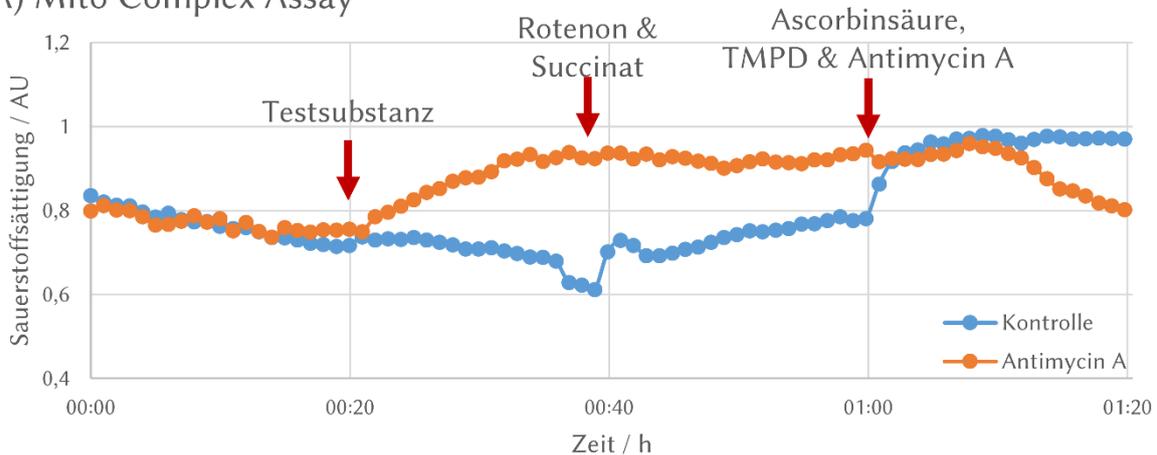
Abbildung 94 Einfluss von $0,01 \mu\text{M}$ (Versuch 1215.1) bzw. $0,04 \mu\text{M}$ (Versuch 1214.3) Isoprenalin auf Kardiomyozyten-Aggregate. A) Darstellung der Sauerstoffsättigung während des Mito Stress Tests. B) Darstellung der Änderung der Sauerstoffsättigung nach Substanzapplikation.

6.4.8 Mito Complex Assay

Der Mito Complex Assay ist ein für 2D-Zellkulturen optimierter Assay, mit dem untersucht werden kann welche Komplexe der Atmungskette durch eine Testsubstanz beeinflusst werden. Die Eignung dieses Assays für 3D-Methoden sollte in einem Proof-of-Concept-Experiment gezeigt werden. Hierfür wurden Sphäroide aus Hanging Drop Kulturen (HDS) verwendet und für ein Kontrollexperiment auch Sphäroide (MCS), die in den Sensorarrays generiert wurden.

Da die meisten Substanzen des Mito Complex Assays in Wasser gelöst wurden, wurde als Kontrolle statt der Testsubstanz Wasser verwendet. Während des Kontrollassays waren keine Änderungen zu erwarten, da jeweils Komplex-Inhibitor – Rotenon im ersten Schritt und Antimycin A im zweiten – und das jeweilige Substrat – Succinat bzw. Ascorbinsäure – hinzugegeben wurden. Dennoch war auch in der Kontrolle ein leichter Anstieg der Sauerstoffsättigung nach der Zugabe von Antimycin A zu sehen (Abbildung 95). Die HDS- und MCS-Kontrollen zeigten ähnliche Tendenzen, mit statistischen Abweichungen. Wurde statt Wasser Antimycin A hinzugegeben, so wurde in allen drei Ansätzen unmittelbar nach der Zugabe ein leichter Anstieg der Sauerstoffsättigung beobachtet, die in den 20 Minuten danach noch weiter anstieg (Abbildung 95 A). Deutlich wurde dieser Unterschied, wenn man sich die ΔAU Werte über 20 Minuten im Vergleich der Antimycin A-Behandlung zur Kontrolle (Abbildung 95 B) betrachtet.

A) Mito Complex Assay



B) Änderung der Sauerstoffsättigungen

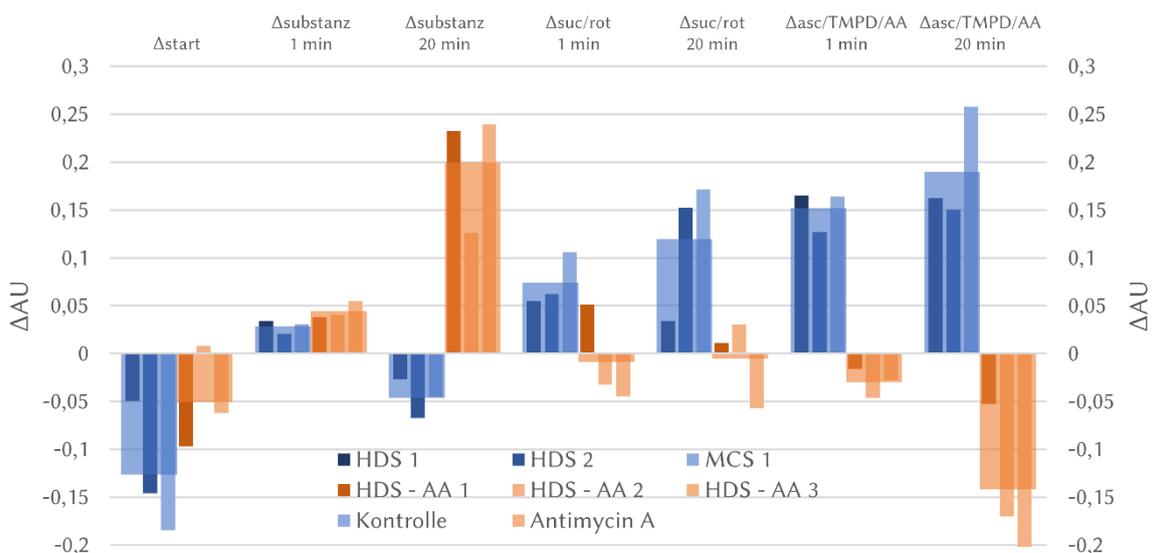


Abbildung 95: Mito Complex Assay mit Wasser als Kontrolle bzw. Antimycin A als Testsubstanz. A) Darstellung der Sauerstoffsättigung (Mittelwert) während des Assays. B) Darstellung der Änderungen der Sauerstoffsättigung (ΔAU) unmittelbar nach der Substanzapplikation und 20 Minuten danach. Substanz = Wasser bzw. Antimycin A, suc/rot = 10 mM Succinat und 2 μ M Rotenon, asc/TMPD/AA = 10 mM Ascorbinsäure, 0,5 μ M TMPD und 2 μ M Antimycin A.

6.4.9 Variation des Fasenwinkels

Einen Vorteil der neuentwickelten Mikrokavitäten mit Fase stellte die Möglichkeit dar Sauerstoff nicht nur in unmittelbarer Umgebung der Zellen messen zu können, sondern auch sich ausbildende Gradienten zu charakterisieren. Aus diesem Grund wurden die in verschiedenen Versuchen gewonnen Daten hinsichtlich der Unterschiede im Bereich der Fase über CellProfiler™ analysiert.

6.4.9.1 Auswertung der Sensorarrays mit einer 60°-Fase

Unterschiedlicher Verlauf der Sauerstoffsättigung in den einzelnen ROIs

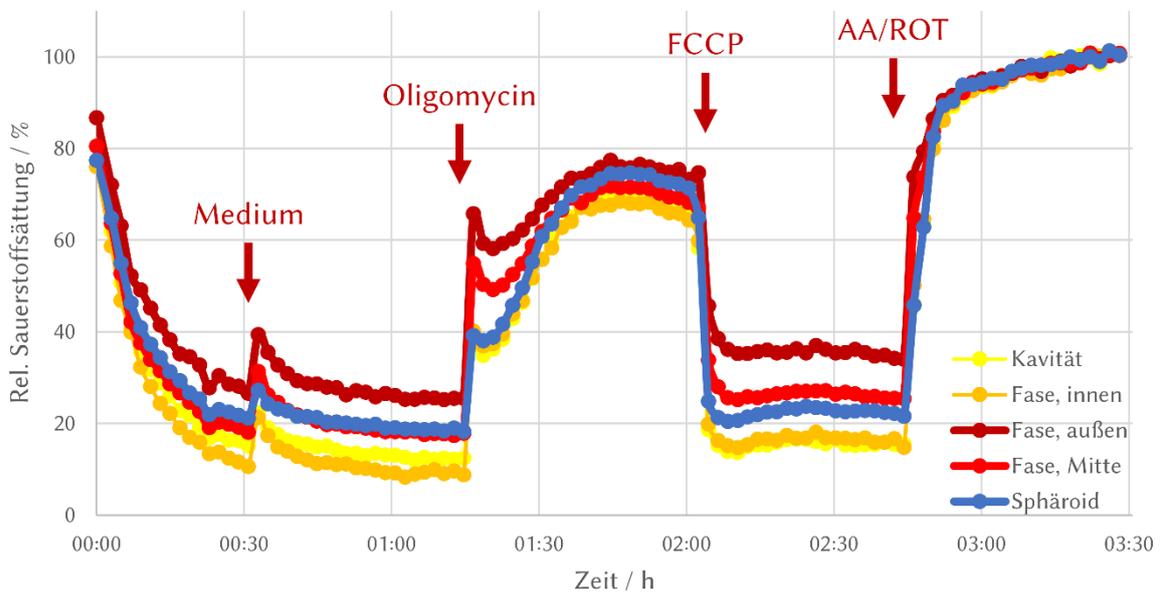


Abbildung 96: Darstellung eines Mito Stress Tests mit den Mittelwerten mehrerer Datenpunkte, aufgeteilt in den Bereich der Sphäroide, den Rand der Kavität sowie der Fase (innen, Mitte und außen).

Exemplarisch ist in Abbildung 96 ein Mito Stress Test an HepG2-Sphäroiden mit Medium als Kontrollsubstanz dargestellt. Differenziert betrachtet wurden der Bereich der Sphäroide, der Kavitätenwand sowie die Fase innen, in der Mitte und außen. Deutlich zu sehen war, dass generell die Sauerstoffsättigung der äußeren Bereiche der Fase deutlich über den anderen Bereichen liegt. Unerwartet war, dass die innere Fase sowie die Kavitätenwand eine geringere Sauerstoffsättigung als im Bereich der Sphäroide zeigten. Beim genaueren Betrachten der CellProfiler™-Auswertung, insbesondere durch Überlagerung der definierten ROIs mit den Mikroskopiebildern, zeigte sich, dass eine eindeutige Unterscheidung dieser Bereiche nicht immer möglich war, da der Bereich der Kavitätenwand relativ breit war. In diesem Bereich steht die Folie senkrecht zum Detektor, es kommt also hier zu nicht messbaren Bereichen. Da die Aussagekraft dieser Ergebnisse mit den aktuell verfügbaren Methoden nicht eindeutig ist, wurde für weitere Auswertung der in den ersten Versuchen bezeichneten Bereiche „Kavität“ und „Fase,

innen“ nicht mehr berücksichtigt. Stattdessen wurde die eindeutig mit CellProfiler™ identifizierbare Fase in drei Segmente unterteilt.

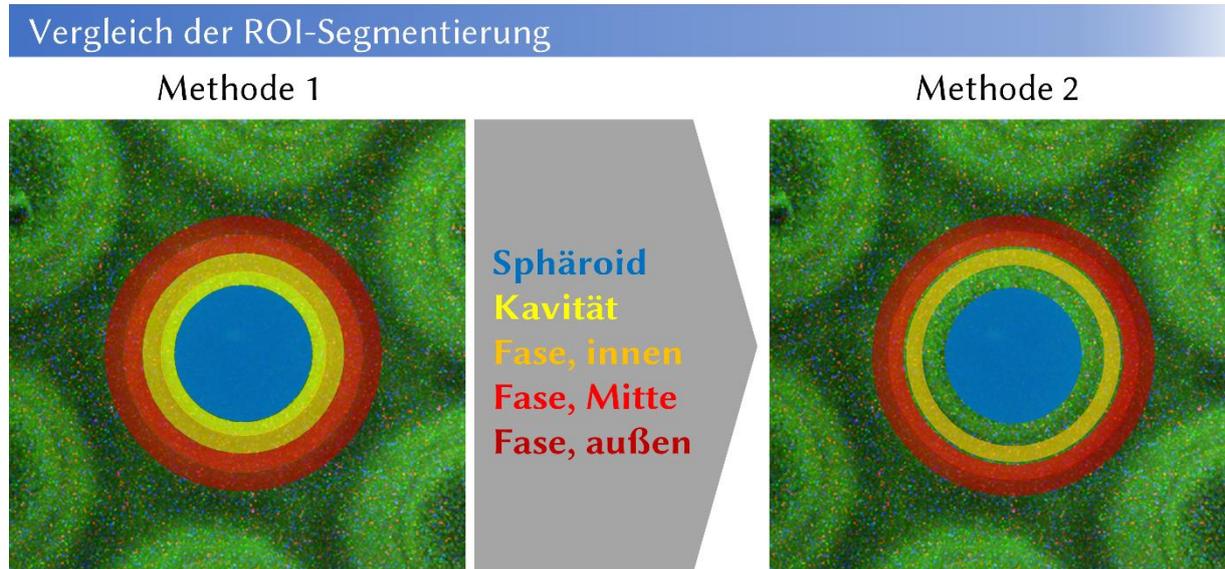


Abbildung 97: Optimierung der Auswertung durch Neueinteilung der Bereiche.

Ebenso wurden auch Sensorarrays aus fluidischen Versuchen hinsichtlich Gradientenbildung untersucht (Abbildung 98). Insbesondere während der fluidischen Kultivierung nahm die Sauerstoffsättigung mit der Entfernung zu den Sphäroiden deutlich zu. Über die Zeit hinweg stellte sich ein Gleichgewichtszustand ein.

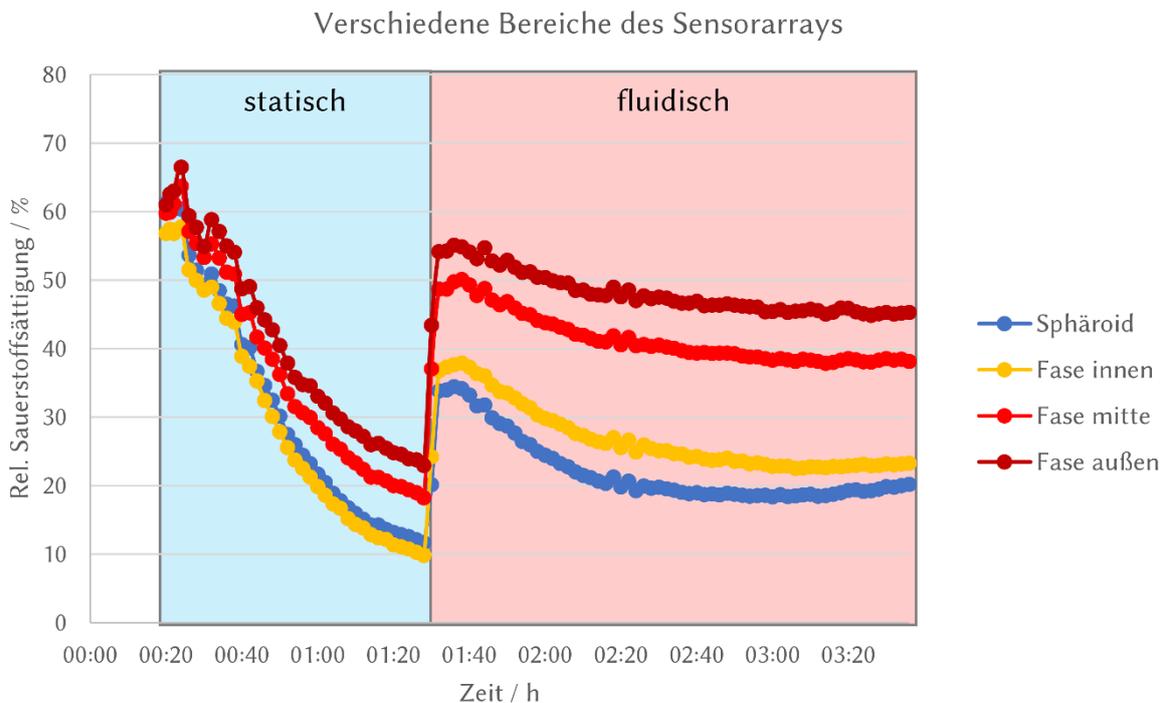
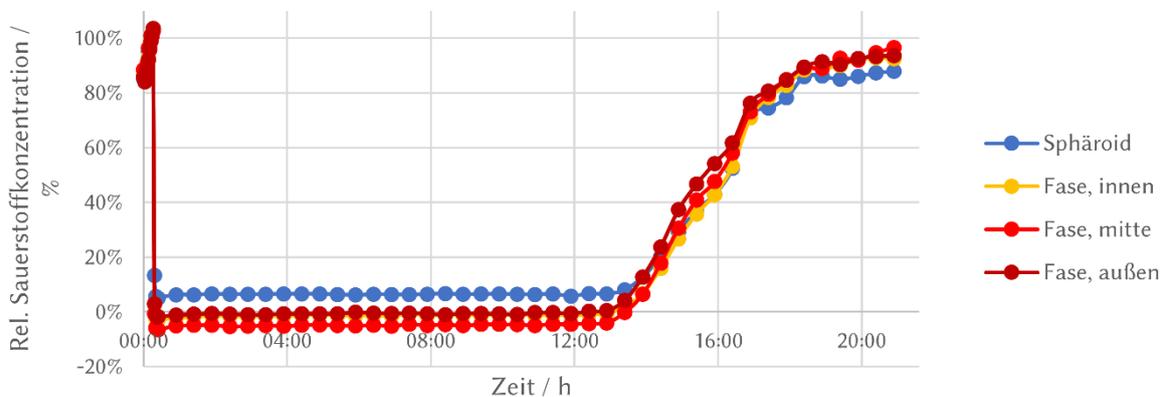


Abbildung 98: Statische und fluidische Zellkultur in Sensorarrays. Zunächst statische Kultivierung von HepG2-Sphäroiden in Sensorarrays. Nach 90 Minuten wurden die Sensorarrays mit 400 µl/min überspült.

6.4.9.2 Auswertung der Daten von Sensorarrays mit einer 30°-Fase

Der Öffnungswinkel der Mikrokapazitäten der Sensorarrays mit 30° war entsprechend kleiner, als der der 60°-Fase. Dadurch konnte über eine größere Tiefe entlang der Z-Achse gemessen werden (Abbildung 27). Mit diesen Mikrokapazitäten wurden zunächst eine Messreihe mit Natriumsulfitlösung durchgeführt (Abbildung 99 A). Dabei konnte mit der Standardkalibrierung (5.2.10.1) beobachtet werden, dass nach Zugabe von 10 mg/ml Natriumsulfit nicht in jeder ROI die Werte der relativen Sauerstoffsättigung bei 0 % lagen, was eigentlich erwartet wurde. Daher wurde eine optimierte Kalibrierung durchgeführt (Abbildung 99 B). Hierfür wurden für jede ROI einzelne Kalibrierwerte erzeugt.

A) Natriumsulfitlösung im Sensorarray – Standardkalibrierung



B) Natriumsulfitlösung im Sensorarray – Neue Kalibrierung

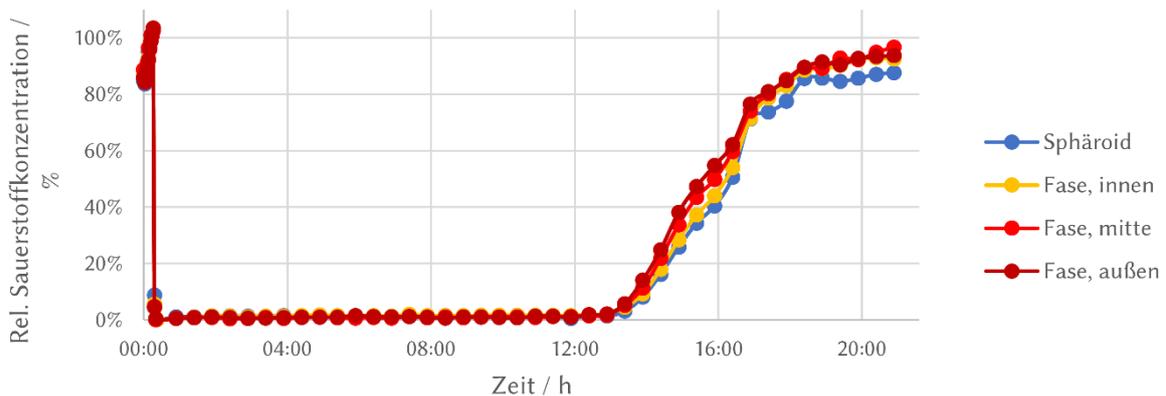
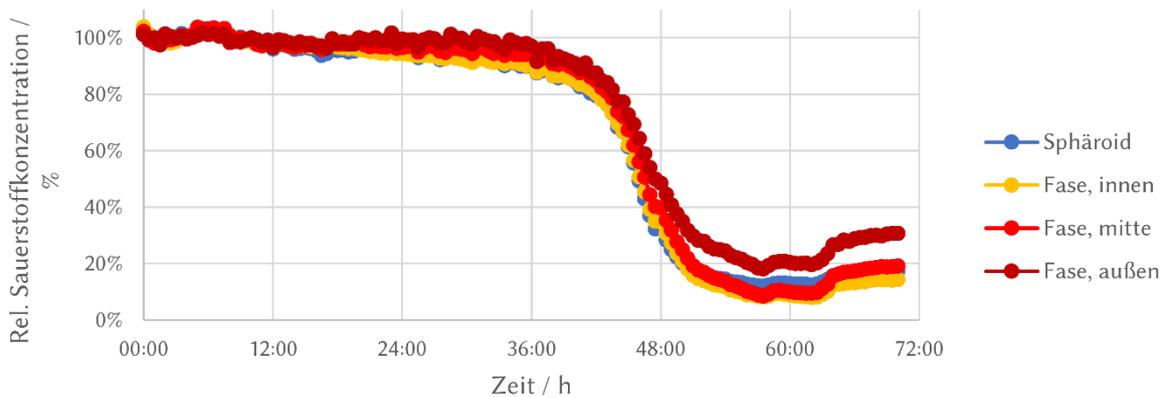


Abbildung 99: Messung der relativen Sauerstoffkonzentration nach Zugabe von 10 mg/ml Natriumsulfit. Die ersten 12 Aufnahmen entstanden im Abstand von 2 min, danach wurde das Messintervall auf 30 min erhöht. A) Auswertung mit Hilfe einer Standardkalibrierung. Es wurden für diesen Folientyp gemittelte Kalibrierwerte verwendet. B) Kalibrierung jeder einzelnen ROI anhand spezifischer Kalibrierwerte, die für diesen Bereich ermittelt wurden. Für die Berechnung des 0 %-Sauerstoffwertes wurden die R-Werte der Messpunkte 11 und 12, unmittelbar nach der Natriumsulfitzugabe und für die 100 %-Werte die R-Werte der Messpunkte 8 und 9, unmittelbar vor der Natriumsulfitzugabe, verwendet.

Zudem wurden in die Sensorarrays (beschichtet mit BIOFLOAT™) mit einer 30°-Fase auch 50.000 HepG2-Zellen ausgesät und für 72 Stunden kultiviert. Mit der Standardkalibrierung zeigte sich nach ca. 36 h ein Absinken der relativen Sauerstoffsättigung (Abbildung 100 A). Hier konnten Unterschiede zwischen den ROIs im Bereich der Sphäroide sowie der segmentierten Fase beobachtet werden. Vor allem die äußere Fase zeigte eine höhere Sauerstoffkonzentration während des Zeitraums von 48 bis 72 Stunden. Durch die Beobachtungen der Natriumsulfitversuche (Abbildung 99) wurde auch hier die optimierte Kalibrierung angewandt. Damit konnte ein schnelleres Absinken der Sauerstoffsättigung im Bereich der Sphäroide im Vergleich zur Fase beobachtet werden (Abbildung 100 B). In den Bereichen der Fasen zeigte sich zwischen 48 und 72 h auch die Tendenz, dass die Sauerstoffsättigung von der äußeren hin zur inneren Fase abnahm.

A) HepG2-Kultivierung – Standardkalibrierung



B) HepG2-Kultivierung – Neue Kalibrierung

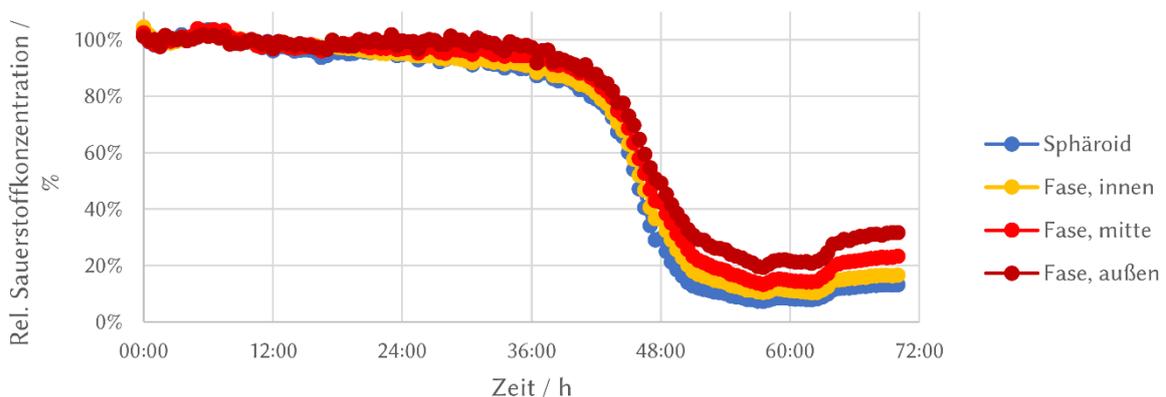


Abbildung 100: Kultivierung von HepG2-Zellen in 30°-Sensorarrays über 72 Stunden. A) Auswertung über die Standardkalibrierung (5.2.10.1) und B) Optimierte Kalibrierung mit den Kalibrierwerten aus Abbildung 99 B.

7 Diskussion

Optimieren des Mikrothermoformens

Zentraler Teil der Arbeit war die Etablierung des Mikrothermoformprozesses Sauerstoffsensitiver Folien. Zunächst wurden dafür die kommerziell erhältlichen Sensorfolien SF-RPSu4 der Fa. PreSens getestet, mit denen, wie beschrieben, die erforderlichen Formtiefen nicht erreicht werden konnten. Die für diese Folien verwendete Trägerfolie ist eine Mylar®-Folie. Hierbei handelt es sich um eine biaxial-orientierte Polyester (BO-PET) Folie, die durch längs und quer verstrecken (biaxial) im Vergleich zur normalen PET-Folie verbesserte Eigenschaften aufweist. Dieser bereits in den 1950er Jahren entwickelte Folientyp zeichnet sich insbesondere durch eine hohe Temperaturstabilität und erhöhte Zugfestigkeit sowie eine geringe Gasdurchlässigkeit aus [201]. Die Glasübergangstemperatur von (BO-)PET-Folien liegt bei ungefähr 70 °C [202, 203], dieser Parameter spricht eigentlich dafür, dass das Thermoformen möglich sein sollte. Allerdings weisen gerade BO-PET-Folien eine erhöhte Zugfestigkeit auf. So werden laut Hersteller bei einer Temperatur von 150 °C bereits rund 500 bar Druck benötigt, um eine Verstreckung um nur 20 % zu ermöglichen [204]. Da höhere Temperaturen aufgrund der Sensorstabilität nicht möglich waren und die am KIT entwickelte Thermoformanlage nur für Drücke bis max. 25 bar ausgelegt ist, war es nicht möglich Mylar®-basierte Sensorfolien zu formen. Auch die Verwendung einer dünneren Sensorfolie basierend auf der Mylar®308-Folie reichte nicht aus, um die gewünschten Formtiefen zu erzielen. Da für andere Anwendungen im Bereich der Zellkultur bereits in der Arbeitsgruppe Mikrokavitäten geformt aus Polycarbonat-Folien (PC-Folien) verwendet wurden, wurde der Fokus auf dieses Material gelegt. Für PC-Folien liegt der Bereich der Glasübergangstemperatur zwischen 149,85 °C [101, 205] und 159 °C [99]. Die Fa. PreSens optimierte den Beschichtungsprozess und konnte so auch Sensorfolien basierend auf PC-Folien mit einer Stärke von 50 µm herstellen. Die ersten Beschichtungsversuche hiermit zeigten jedoch eine starke Wellung der Folien. Durch Tempern (SF-RPC1, Abbildung 16) bei 90 °C für 20 h konnte die Folie für die weitere Prozessierung ausreichend geglättet werden. Eine höhere Temperatur im Bereich der Glasübergangstemperatur wurde nicht verwendet, da keine Daten zur Langzeittemperaturstabilität der Sensorfolien vorlagen. Da zudem das Beschichtungsprotokoll seitens PreSens weiter optimiert wurde, war ein Tempern ab den Sensorprototypen SF-RPC2 nicht mehr notwendig. Insgesamt konnte bei den Versuchen zur Optimierung der Formtemperaturen beobachtet werden, dass größere Mikrokavitätendurchmesser geringere Formtemperaturen benötigten (Abbildung 17).

Die Untersuchung der Temperaturstabilität der Fluorophore sollte zeigen, dass der Thermoformvorgang die Sensorantwort nicht signifikant reduziert. Die Versuche mit unterschiedlichen Temperaturbehandlungen (Abbildung 19) zeigten tendenziell, dass eine Abnahme der Fluoreszenz erst ab 170 °C erfolgte und somit das Thermoformen möglich war.

Während der Optimierung des Formprozesses Sauerstoff-sensitiver Folien wurden Limitierungen vor allem hinsichtlich der Formtemperatur festgestellt. Eine weitere Limitierung besteht darin, dass sich mit dieser Methode keine porösen Sensorarrays herstellen lassen würden, wie es für manche Anwendungen von Interesse sein kann. Zudem ist das Beschichtungsverfahren darauf ausgelegt die Folien vollflächig zu beschichten. Je nach Anwendung wäre es interessant, bspw. an definierten Punkten eines Sensorarrays, auch CO₂-sensitive Fluorophore einzubringen. Aus diesem Grund wäre es eine Option mikrostrukturierte Folien nach dem Formprozess erst mit entsprechenden Sensorfarbstoffen zu beschichten. Dies würde auch poröse Strukturen durch Track Etching ermöglichen. Hierfür wurde ein Konzept ausgearbeitet, um Sensorfluorophore kovalent an die Folienoberfläche zu binden.

Exkurs: Kovalente Bindung von Sensorfluorophoren an mikrostrukturierte Oberflächen

Ein im Rahmen dieser Arbeit erarbeiteter Lösungsansatz umfasste die kovalente Bindung der Fluorophore an der (funktionalisierten) Folienoberfläche. Dies könnte bspw. mit Reaktionen aus dem Bereich der „Click“-Chemie erfolgen und daher in Kombination mit der Photochemie auch lokal begrenzte Funktionalisierungen ermöglichen. Da dadurch die Beschichtung bereits strukturierter und auch poröser Mikrokavitätenarrays möglich ist, ergeben sich neue Anwendungsfelder. Es wurden einige Reaktionswege theoretisch erarbeitet und skizziert, jedoch nicht weiter umgesetzt, da für die bisherigen Anforderungen das Mikrothermoformen ausreichend war.

Funktionalisierung der Mikrokavitätenoberfläche

Zunächst ist eine Mikrostrukturierung der Folien möglich. Dazu zählt zum einen das Thermoformen. Zum anderen können auch Poren in den Mikrokavitäten über Ion Track Etching generiert werden. Die Oberflächen der Mikrokavitätenarrays werden dann durch UV-Ozon oder Plasma-Behandlung hydroxyliert (Abbildung 101). Die Hydroxylgruppen können durch Silan-Kupplung in andere funktionelle Gruppen überführt werden. Für Thiole kann (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilan, für Amine 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTMS) [206], für Epoxide 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GPTMS) [206] und für Alkine o-Propargyl-N-(Triethoxysilylpropyl)-carbammat (OTPC) [207] verwendet werden.

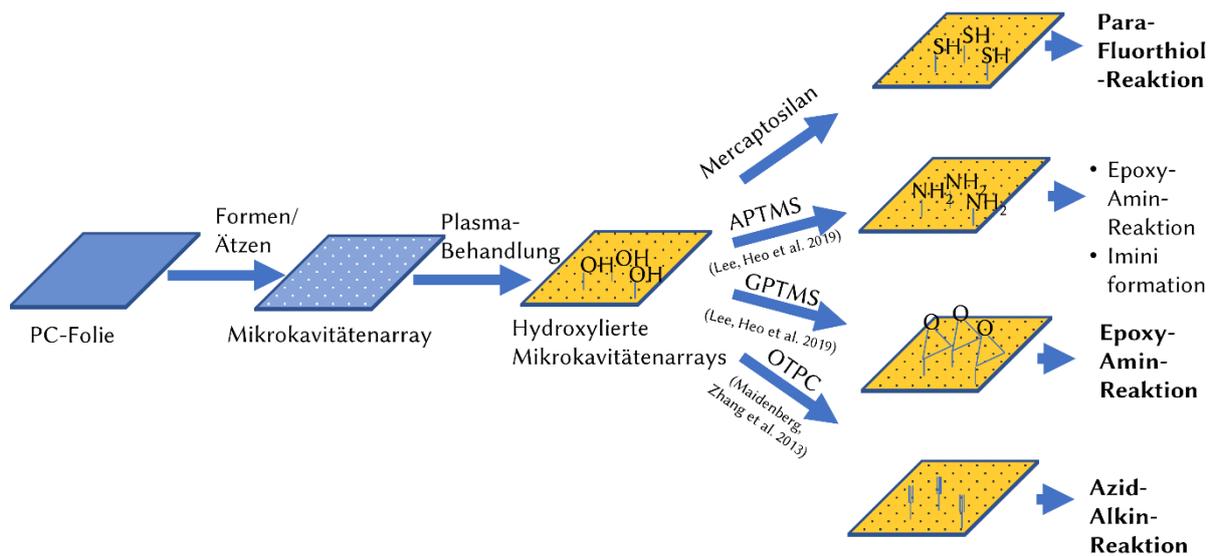


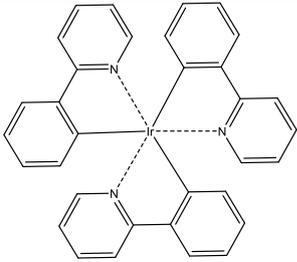
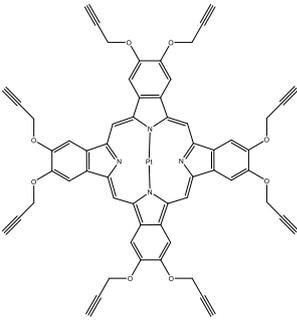
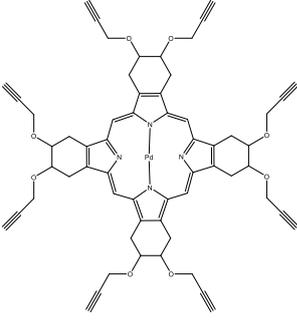
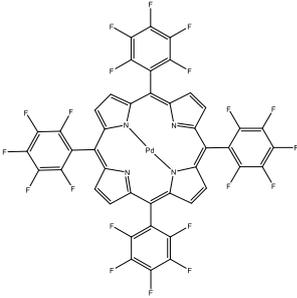
Abbildung 101: Übersicht möglicher Oberflächenmodifikationen ausgehend von einer Hydroxylierung der Mikrokavitäten.

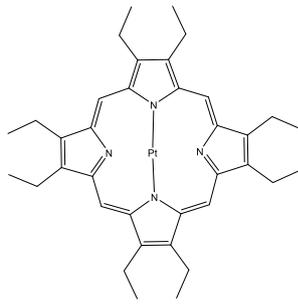
Funktionalisierung der Fluorophore

Über Reaktionen aus dem Bereich der „Click-Chemie“ können dann entsprechend modifizierte, Sauerstoff-sensitive Fluorophore (oder andere Fluorophore für weitere Analyten) an die Oberfläche gebunden werden. Hierfür müssen die Fluorophore zunächst entsprechend funktionalisiert werden. Beispiele für die Funktionalisierung Sauerstoff-sensitiver Folien sind nachfolgend aufgeführt.

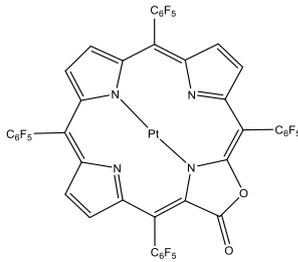
Ruthenium(II)-Komplexe können das Grundgerüst für zahlreiche Sauerstoff-sensitive Fluorophore darstellen (Tabelle 26). Eine einfache Möglichkeit der Modifikation besteht in dem Austausch einer der drei Liganden, wobei der Ausgetauschte selbst entweder über eine funktionelle Gruppe für eine spätere „Click“ Reaktion verfügt oder bereits kovalent an die Oberfläche des Polymers gebunden ist. Beschrieben wurde eine ähnliche Reaktion von Zhou et al. [208]. Hier wurden Ruthenium-Komplexe an eine PBPYA-funktionalisierte Polystyrol-oberfläche gebunden. Durch Verwendung von 5,5-Bis(mercaptopomethyl)-2,2-bipyridins anstelle des PBPYA ist die Bindung an eine Epoxy-funktionalisierte Oberfläche möglich. Ähnlich, jedoch über einen Amin-funktionalisierten Liganden, wäre der Ansatz auf Basis der Arbeiten von Wang et al.[209]. Weitere Modifikationen sind möglich. Dieser Ansatz bietet viele Möglichkeiten, da die Liganden (z.B. Bipyridin-Derivate) getrennt vom Fluorophor funktionalisiert und an die Oberfläche gebunden werden können und anschließend unter vergleichsweise milden Bedingungen die Komplexierung stattfindet.

Tabelle 26: Übersicht über Sauerstoff-sensitive Komplexe.

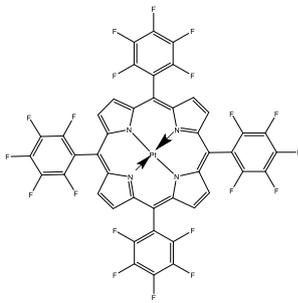
<i>Struktur</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Absorption [nm]</i>	<i>Emission [nm]</i>	<i>Lifetime [μs] (Matrix)</i>	<i>Details</i>	<i>Literatur</i>
	[Ir(ppy) ₃]	375	512	1 (PS)		[210]
	Clickaphor Blue				Geeignet für Azid-Alkin-Cycloaddition, aufwendige Synthese	[211]
	Clickaphor Red				Geeignet für Azid-Alkin-Cycloaddition, aufwendige Synthese	[211]
	PdEOP	393,	663	770		[212,
	Paladium(II)-octaethylporphyrin	512,		(Toluene)		213]
	PdTFPP	406,	660	910	Kommerziell	[212,
	Palladium(II)-5, 10, 15, 20-meso-tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-porphyrin	519,		(PS-PVP)	erhältlich, photostabil	214]



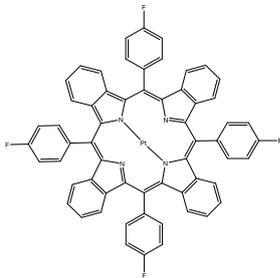
PtOEP	380,	647	90 (PS)	[176,
Platinum(II)- octaethyl- porphyrin	535			179, 215]



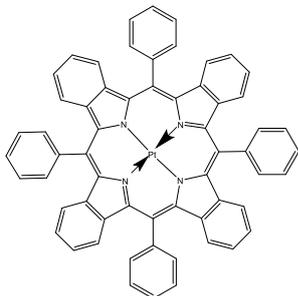
PtTFPL				[216]
Meso-tetra- (pentafluoro- phenyl)propho lactone- platinum(II)				



PtTFPP	392,	650	55 (PS- Kommerziell	[214,
Platinum(II)- 5,10,15,20- tetrakis- (2,3,4,5,6- pentafluorphe nyl)-porphyrin	507,	650	PVP) erhältlich, photostabil	217, 218]
	auch:			
	395,			
	508,			
	541			



PtTPBPF				[219,
meso-tetra-(4- Fluorophenyl)- tetrabenzopor phyrin				220]



PtTPTBP	430,	770	47	
meso-tetra- phenyltetra- benzopor- phyrin platinum(II)	564,		(Tolue ne)	
	614			

Eine weitere Möglichkeit bieten Palladium(II)- bzw. Platin(II)-Porphyrine. Eine einfache Modifikation dieser Derivate ist z.B. über die para-Fluor-Thiol-„Click“-Reaktion, beschrieben von Delaitre und Barner [221], möglich. Hierbei handelt es sich um eine nukleophile aromatische Substitution mit Nucleophilen (Alkohole, Amine oder Thiole) an der para-Position. Am Beispiel eines Thiols wird dieses zunächst durch eine nicht-nukleophile Base (z.B. Triethylamin (TEA),

NaOH, KOH) deprotoniert. Das Thiol-Anion greift an der *para*-Position nukleophil an, wodurch es zur Substitution kommt. Die Reaktion findet i.d.R. in aprotischen Lösungsmittel (Dimethylacetamid (DMAc), Dimethylformamid (DMF) oder Tetrahydrofuran (THF)) statt, kann jedoch auch in Wasser erfolgen. Koren et al. [214] nutzten diese Reaktion, um eine kovalente Verbindung zwischen Fluorophor und Sensor-Matrix (hier ein Copolymer von Styrol und Pentafluorstyrol) zu schaffen. Eine ähnliche Reaktion wurde von Välimäki et al. beschrieben [217]. Hier wurde durch die kovalente Bindung eine reduzierte Cytotoxizität gezeigt. Grundsätzlich ist auch eine Funktionalisierung mit Aminen denkbar [222], da erste Experimente ein Quenching durch die Thiol-Substitution zeigten, was sich in aktuelleren Publikationen nicht bestätigte. Die Modifikation von Porphyrinen mit terminalen Alkinen [211] würde die Möglichkeit zur 1,3-dipolaren Cycloaddition nach Huisgen (Azid-Alkin Click-Reaktion) ergeben. Alternativ wäre auch eine Vorgehensweise über eine kovalente Bindung an Nitrolotriesssäure-Lysin (NTA-Lysin) denkbar mit anschließender Metallchelate-Komplex-Bildung mit einem Polyhistidin-Tag (His-Tag) [223]. Hierfür müsste die Oberfläche jedoch über His-Tags verfügen. Geeigneter wäre diese Methode, falls anstelle der kovalenten Bindung zur Oberfläche eine Bindung zu „Anker-Molekülen“, wie bspw. die BIOFLOAT™-Produkte von FaCellitate gewünscht wären. Funktionalisierungen andere Fluorophore, wie beispielsweise von Iridium(III)-Pyridin-Derivate [224] oder Fluorophore für andere Analyten sind analog zu oben aufgeführten Methoden möglich.

Bindung der funktionalisierten Fluorophore an die modifizierten Mikrokavitätenoberfläche

Je nach Funktionalisierung der Oberfläche bzw. der Fluorophore ergeben sich verschiedene mögliche Reaktionen. Abbildung 102 zeigt den einfachsten Fall. Die Folie wurde mit Thiolen funktionalisiert. Durch die *para*-Fluor-Thiol-Reaktion wird direkt das Fluorophor gebunden. Nachteil könnte hier eine sterische Hinderung sein. Zudem ist die Reaktion nicht so schnell. Für den Fall, dass milde Lösungsmittel, wie Wasser, verwendet werden, um später weniger Probleme hinsichtlich Biokompatibilität zu bekommen, wird vermutlich die Reaktionsgeschwindigkeit nochmals herabgesetzt. In diesem Fall wäre zudem eine Michael-Addition/Thiol-en-Reaktion möglich. Hierzu müsste das Fluorophor Maleimid-funktionalisiert sein, was zu einem Thioether führt.

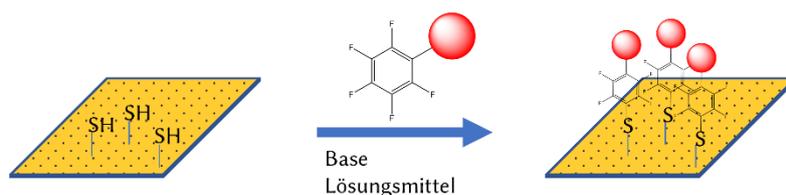


Abbildung 102: Bindung von fluorierten Metall-Porphyrinen an Thiol-funktionalisierte Polymeroberflächen über die *para*-Fluor-Thiol-Reaktion.

Abbildung 103 zeigt die Möglichkeiten mit Epoxid-funktionalisierten Oberflächen. So können, wie beschrieben, Amin- oder Thiol-funktionalisierte Liganden kovalent gebunden werden, was die Komplexbildung mit Ru(II)-Komplexen ermöglicht. Durch Epoxy-Thiol-Click-Chemie können funktionalisierte Fluorophore kovalent gebunden werden [225]. Die Epoxy-Amin- bzw. Epoxy-Thiol-Reaktion benötigt keine toxischen Katalysatoren, die Reaktion läuft annähernd quantitativ ab.

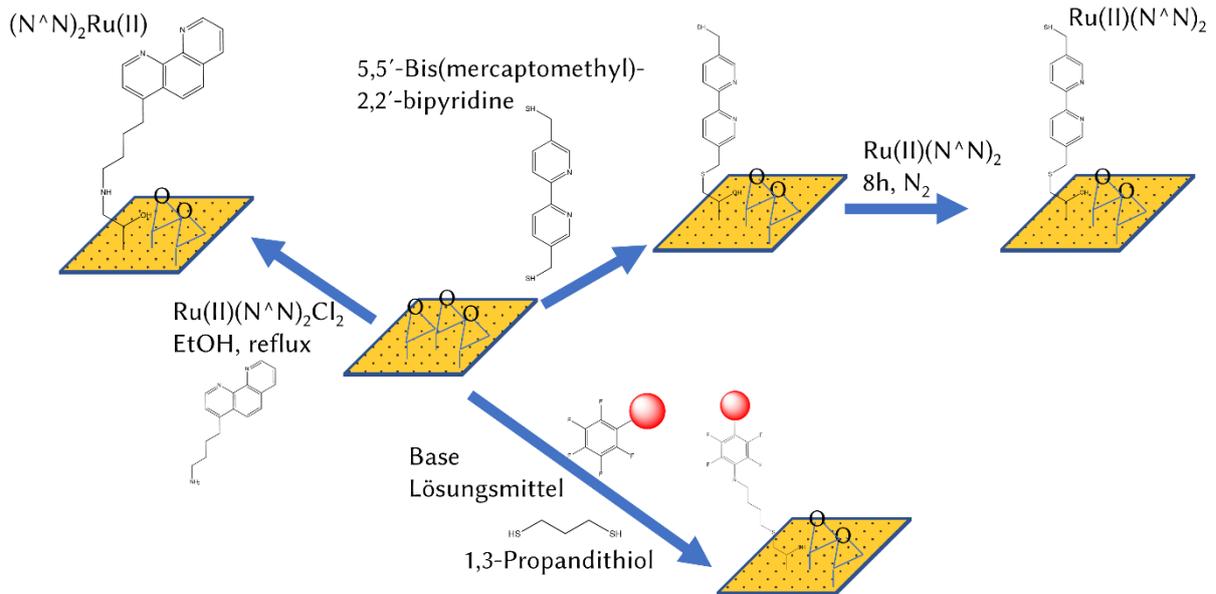


Abbildung 103: Epoxy-funktionalisierte Oberflächen und Möglichkeit der Bindung von Thiol- oder Amin-funktionalisierten Fluorophoren.

Eine weitere Alternative stellt die Azid-Alkin-Reaktion dar (Abbildung 104), die zwar toxische Katalysatoren voraussetzt, dafür aber entsprechend hohe Ausbeuten bietet.

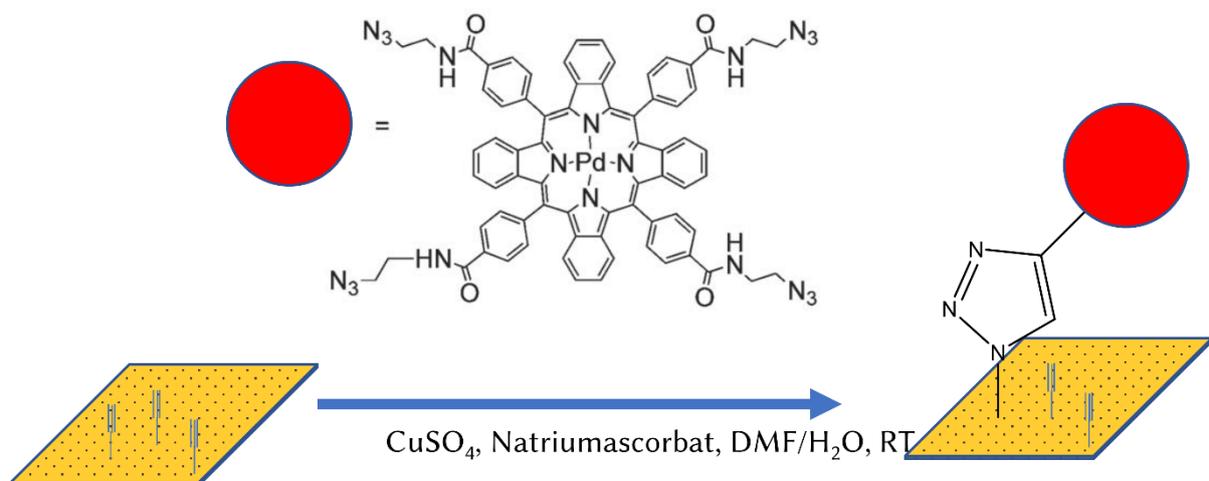


Abbildung 104: Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Reaktion. Für Fluorophore wurde diese Reaktion bereits beschrieben [226].

Technische Entwicklung und Charakterisierung der Sensorarrays

Neben den in der Arbeitsgruppe etablierten Mikrokavitätenarrays mit Mikrokavitätendurchmessern von 300, 500 bzw. 800 μm wurden auch neue Mikrokavitätengeometrien und unterschiedliche Anzahlen der Mikrokavitäten innerhalb des Arrays getestet. Um diese einfacher in die Formanlage integrieren zu können und auch, um in Zukunft die Herstellung der Sensorarrays für einen höheren Durchsatz skalieren zu können, wurde eine Adapter-Lösung entwickelt. In einem ersten Versuch wurde ein runder Formmasken-Einsatz (nicht dargestellt) hergestellt. Dieser verursachte Schwierigkeiten in der Handhabung, da die Orientierung durch mögliche Rotationen nicht definierbar war. Es wurde daher die in Abbildung 21 dargestellte Lösung bevorzugt, bei der der Formmasken-Einsatz quadratisch war und über eine abgeschrägte Ecke (siehe auch Abbildung 22 A) verfügte, sodass eine eindeutige Orientierung innerhalb des Einfach- bzw. Mehrfachrahmens gegeben war. Durch diese Lösung wurde zum einen während der Herstellung verschiedener Formmasken geringfügig Material gespart, der große Vorteil lag jedoch darin, dass bei Verwendung eines Mehrfachrahmens eine höhere Flexibilität hinsichtlich verschiedener Geometrien der Mikrokavitäten bzw. Arrayformen gegeben ist. Dadurch könnten in einem Formvorgang verschiedene Sensorarrays geformt werden. Mit Hilfe dieses Systems konnten verschiedene Formmasken getestet werden. Als besonders relevant, auch in biologischer bzw. sensorischer Hinsicht, zeigten sich Mikrokavitäten, die über eine Fase im oberen Bereich verfügten (Abbildung 20). Für diese Art wurde dann eine Formmaske für drei gleichzeitige Abformungen (Abbildung 26) entwickelt. Die Bedeutung der Fase wird später noch dargelegt. Zur Charakterisierung der Formtiefen der (Sensor-)Arrays wurde sowohl ein einfaches Lichtmikroskop sowie stichprobenweise ein Digitalmikroskop verwendet (6.1.5). Die einfacher durchzuführende Lichtmikroskopie zeigte hier eine so geringe Abweichung von der genaueren Digitalmikroskopie, dass sie für die Routinekontrolle verwendet werden konnten.

Für die Auswahl geeigneter Farbstoffe für biologische Experimente, wurden zudem die Sensorarrays bzw. die Sensorfolien hinsichtlich ihrer Fluoreszenz untersucht. Eine Anregung im blauen Spektrum, insb. bei 405 nm, führte zur Emission im roten bzw. grünen Bereich. Häufig verwendete Zellkernfarbstoffe, wie bspw. Hoechst oder DAPI werden im langwelligen UV-Bereich bis ca. 405 nm angeregt. Hier würden sich die Emissionen der Farbstoffe mit der der Sensorfolie überlagern, wodurch sich diese Farbstoffe in dem hier vorgestellten System nicht eignen. Die Färbung mit Farbstoffen wie CellTrackerTM Green oder SYTOTM16 war möglich, da diese bei 488 nm angeregt werden können und im Bereich 500-600 nm emittieren. SYTOTM16 ist ebenfalls ein Farbstoff, der die Zellkerne durch Färben der DNA markieren kann und somit auch als Ersatz für Hoechst oder DAPI dient. Auch Farbstoffe wie Propidiumiodid oder CellTrackerTM Red

waren aufgrund unterschiedlicher Anregungs-/Emissionswellenlängen für Färbungen in den Sensorarrays geeignet.

Zur Untersuchung der Biokompatibilität wurde ein Laktat-Dehydrogenase-Assay (LDH-Assay) eingesetzt. Hierfür wurde das Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche) verwendet. Die von abgestorbenen Zellen freigesetzte Laktat-Dehydrogenase oxidiert, durch Reduktion des Koenzyms NAD^+ zu NADH/H^+ , Laktat zu Pyruvat. NADH/H^+ reagiert als Koenzym und ermöglicht durch den Katalysator Diaphorase die Umsetzung des Tetrazolium-Salzes INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium-chlorid) zum roten Formazan-Salz (siehe 5.2.8 und Abbildung 10). Da im Zusammenhang mit dem Absterben der Zellen die Plasmamembran geschädigt wird, wird hierbei LDH, das in allen Zelltypen vorkommt, freigesetzt. Das Kit basiert dabei auf der Annahme, dass die freigesetzte LDH-Menge proportional zur Anzahl abgestorbener Zellen ist [194]. Durch die Messung der Absorption des roten Formazan-Salzes kann dadurch auf die Menge abgestorbener Zellen geschlossen werden. Dieser Assay ist grundsätzlich einfach und robust in der Durchführung, jedoch gibt es Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen können. Hierzu zählen bspw. Pyruvat, das die LDH-Aktivität inhibieren kann da es selbst als Substrat für LDH dienen kann und dadurch das Reaktionsgleichgewicht verschiebt [227], aber für die HepG2-Kultur unerlässlich ist oder auch andere Substanzen im Medium, die die LDH-Aktivität beeinflussen. Aus diesem Grund wurden Medien-Kontrollen mitgemessen, die als Hintergrundsignal abgezogen wurden. Für die Bestimmung des Gesamt-LDHs in einem Ansatz wurden die Zellen mit 2 % Triton X-100 in Zellkulturmedium behandelt. Für diesen Ansatz wurde daher auch 2 % Triton X-100 für die Bestimmung des Hintergrundsignals verwendet. Dieser Assay ist vom Hersteller eigentlich für die Messung von LDH im Überstand von Zellkulturen in 96-Well-Platten vorgesehen und wurde daher für die Verwendung von CellCrownTM-Inserts zum Testen der Sensorfolien/-arrays adaptiert.

In einem ersten Ansatz wurden Folien/Arrays in die Inserts eingelegt und alle 24 Stunden das Medium zur Probennahme entfernt und durch neues ersetzt. Der Gesamt-LDH-Gehalt wurde durch Lyse der Zellen nach 96 Stunden berechnet, indem zu diesem Wert die Messwerte der Zellkulturüberstände addiert wurden. Wie bereits in 6.2.1.1 dargestellt gab es dabei aber vergleichsweise hohe Abweichungen. Zudem beziehen sich die Messwerte der 24, 48, 72 und 96 Stunden Probennahmen jeweils auf den Gesamt-LDH-Wert nach 96 Stunden. Da die Zellen während des Assays aber weiter proliferieren, ist dieses Ergebnis nicht aussagekräftig. In einem weiteren Ansatz wurde daher für jeden Zeitpunkt ein separates Insert verwendet. Hier wurde ein relativ hoher LDH-Wert nach 24 Stunden gemessen, der auf einen erhöhten Anteil toter

Zellen zu diesem Zeitpunkt schließen ließ. Durch parallele lichtmikroskopische Betrachtung der Zellen konnte dies nicht bestätigt werden.

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die Verwendung der CellCrownTM-Inserts für diesen Versuch nur bedingt möglich war, da es beim Aussäen der Zellen dazu kommen konnte, dass diese in das darunterliegende Well gelangten und somit nicht mehr unmittelbar der Folie ausgesetzt waren, sondern unter besseren Bedingungen auf PS-Oberflächen wuchsen. Dies konnte die hohen Abweichungen zwischen den einzelnen Versuchen erklären. Daher wurde ein neues System getestet, indem die (Sensor-)Folien auf 8-Well sticky slides (ibidi®) geklebt wurden. Diese Methode eignete sich daher nur für die Biokompatibilitätsversuche planarer Folien. Mit Hela-Zellen wurden hierfür Versuche mit 2×10^4 und 5×10^3 Zellen durchgeführt. Mikroskopisch konnte beobachtet werden, dass 2×10^4 Zellen bereits nach einem Tag zu einem konfluenten Wachstum führten, wodurch diese Zellzahl für längere Versuche zu hoch war. Die freigesetzte LDH-Menge nach 24 Stunden lag hier bei den Sensorfolien leicht unter der PC-Kontrolle. Daraus kann man tendenziell auf eine geringere Zahl abgestorbener Zellen schließen. Nach 96 Stunden zeigten die SF-RPC2-, SF-RPC2+Plasma- und SF-RPC3+Plasma-Folien eine leicht höhere freigesetzte LDH-Menge, während die SF-RPC3-Folien etwas unter der PC-Kontrolle lagen. Insgesamt waren hier jedoch große Fehlerbalken zu erkennen, was zum einen an der geringen Anzahl an Versuchen ($n=2$) und zum anderen vermutlich an der zu hohen Zellzahl lag. Mit 5×10^3 Zellen konnte nach 24 Stunden lediglich bei den SF-RPC3+Plasma-Folien eine geringe LDH-Menge gemessen werden. Nach 96 Stunden lag die freigesetzte LDH-Menge der SF-RPC2-, SF-RPC2+Plasma- und SF-RPC3-Folien in einer ähnlichen Größenordnung wie die der PC-Kontrolle, die der SF-RPC3+Plasma-Folien lag darüber. Da nur Duplikate angesetzt wurden, kann dieses Ergebnis jedoch nur eine Tendenz aufzeigen. Während aber insgesamt die Tendenz der Versuche mit Hela-Zellen eine freigesetzte LDH-Menge nach 24 Stunden von unter 5 % und einen größeren Anteil der freigesetzten LDH-Menge von bis zu 20 % nach 96 Stunden zeigte, war bei den HepG2-Zellen ein gegenteiliger Effekt zu sehen, hier wurde nach 24 Stunden ein höherer freigesetzter LDH-Anteil im Gegensatz zu dem nach 96 Stunden gemessen. Für die LDH-Messungen der HepG2-Zellen lagen Werte aus vier unabhängigen Versuchen vor, was eine statistische Betrachtung ermöglichte. Insgesamt konnte zwischen den fünf Folien (PC, SF-RPC2, SF-RPC2+Plasma, SF-RPC3 und SF-RPC3+Plasma) mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests keine signifikante Abweichung bei den 24 bzw. 96 Stunden-Werten festgestellt werden. Auch der paarweise Vergleich der Sensorfolien mit der PC-Folie mit dem Mann-Whitney-U-Test zeigte keine signifikante Abweichung. Die Tendenz der LDH-Assays, dass der Anteil toter HepG2-Zellen im Vergleich zu den Hela-Zellen etwas höher ist,

zeigte sich auch bei den Lebend-Tot-Färbungen. Jedoch war hier insgesamt der Anteil toter Zellen geringer. So konnten bei den HepG2-Zellen unter 5 % tote Zellen ermittelt werden, bei den Hela-Zellen ging dieser Anteil gegen Null. Der deutlich geringere Anteil toter Zellen durch Mikroskopie bestimmt, lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass die betrachtete Fläche im Vergleich zur Gesamtfläche recht gering war. Zudem kommt es beim Absterben der Zellen zu einem Ablösen von der Zellkulturoberfläche [228]. Gerade in 2D-Zellkulturen kann es daher vorkommen, dass tote Zellen während des Färbeprozesses beim Waschen entfernt werden. Dadurch können weniger tote Zellen gezählt werden. Beim LDH-Assay hingegen wurde der komplette Überstand verwendet, der somit auch die von diesen abgelösten Zellen freigesetzte LDH enthielt und somit einen höheren Anteil abgestorbener Zellen anzeigte. Obwohl also LDH-Assay und Lebend-Tot-Färbung daher nur bedingt vergleichbar waren, konnten durch die Tendenzen insgesamt gezeigt werden, dass die Sensorfolien hinsichtlich Biokompatibilität vergleichbar mit den PC-Folien waren.

Laut Herstellerprotokoll des verwendeten Assays – und auch in verschiedenen Publikationen beschrieben – ist die Menge freigesetzten LDHs proportional zur Anzahl toter Zellen [194, 229, 230]. Auch wenn es zu Abweichungen des LDH-Gehaltes zwischen verschiedenen Zelltypen kommen kann [231], konnte diese Korrelation hier dennoch angenommen werden, da sich jeweils auf einen Gesamt-LDH-Wert des gleichen Versuchs bezogen wurde. Unter dieser Annahme kann auch die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die LDH-Menge der lysierten Zellen proportional zur Anzahl der zu diesem Zeitpunkt in Kultur befindlicher Zellen ist. Dies ermöglicht es auch Tendenzen zur Proliferation zu beobachten. In Abbildung 35 sind diese LDH-Mengen gegenübergestellt und wurden auf den Wert nach 24 Stunden normalisiert, um Aussagen zur Entwicklung der LDH-Mengen und somit auch unter oben getroffener Annahme zur Proliferation treffen zu können. Bei den Versuchen mit HepG2-Zellen in CellCrown™-Inserts konnte über 96 Stunden eine verfünffachte LDH-Menge gemessen werden. Hierbei waren nur geringfügige Unterschiede zwischen den Folien erkennbar. In den sticky slides war diese Zunahme noch zu erkennen, jedoch deutlich geringer. Bei den HepG2-Zellen rund 2,5-fach, bei den Hela-Zellen ca. 3,5-fach. Aufgrund geringer Versuchszahl waren dies jedoch nur Tendenzen, die sich jedoch mit den mikroskopischen Beobachtungen deckten. Bei der Auszählung der Zellen mit Hilfe von CellProfiler™ konnte jedoch bei den Plasma-behandelten Sensorfolien nach 96 Stunden eine Abnahme der Zellzahl gemessen werden (Abbildung 39 A). Dies deckte sich nicht mit den Mikroskopbildern (Abbildung 37 und Abbildung 38). Daher wurde die Auswertung des CellProfilers™ genauer untersucht, indem die identifizierten Objekte als Bilder exportiert wurden (Anhang 1). Hieraus war erkennbar, dass die Software fehlerhafte

Zellzahlen ausgab, wenn die Zellen zu dicht bzw. das Hintergrundsignal zu hoch waren. Zudem wuchsen die Zellen auf den Plasma-behandelten Sensorfolien vergleichsweise dicht, sodass dies zu Fehlern in der Zellzählung führen konnte. Es wäre daher möglich die Proliferationsuntersuchungen mit einer geringeren Zellzahl durchzuführen. Tendenziell scheinen auch die Zellen auf den Plasma-behandelten Sensorfolien besser zu wachsen. Zusätzlich zu den LDH-Assays auf planaren Folien wurden einige Tests in Sensorarrays, also in 3D durchgeführt. Hier zeigte sich eine geringere prozentuale LDH-Menge in den Plasma-behandelten Sensorarrays, was darauf schließen lässt, dass hier die Biokompatibilität höher war. Auch hier konnte nur eine Tendenz beobachtet werden, da die Stichprobengröße eine statistische Betrachtung nicht ermöglichte.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden Beschichtungsmethoden der (Sensor-)Arrays getestet und verglichen. Ein großes Problem bei der Besiedlung von (Sensor-)Arrays stellen Luftblasen in den Mikrokavitäten dar. In vorangehenden Arbeiten wurden diese mit Hilfe einer Isopropanolreihe entfernt [96]. Dabei wird der Effekt ausgenutzt, dass Isopropanol eine geringere Oberflächenspannung als Wasser hat und somit die Oberfläche besser benetzen kann. Durch die absteigende Isopropanolkonzentration ist der Austausch des Isopropanols zu Wasser möglich, welches später durch Zellkulturmedium ersetzt wird. Durch die Beschichtung mit BIOFLOAT™, war eine Isopropanolreihe nicht möglich. Daher wurde zunächst ein Vakuum-Adapter zum Entfernen der Luftblasen entwickelt. Da die Effektivität der Luftblasenentfernung von der Stärke der Absaugpumpe abhing, war das Ergebnis nicht an jedem Arbeitsplatz reproduzierbar. Daher wurde eine weitere Möglichkeit durch Zentrifugation entwickelt. Im Vergleich mit den etablierten Mikrokavitäten ohne Fase zeigte sich bei den Mikrokavitäten mit Fase eine vereinfachte Luftblasenentfernung durch den größeren Öffnungsdurchmesser.

Beschichtungsversuche mit Kollagen zeigten durchgängig, dass die Zellen die Polymeroberfläche komplett bedeckten, während die BIOFLOAT™-Beschichtung ein Anhaften verhinderte, daher sammelten sich die Zellen am tiefsten Punkt der Mikrokavitäten und aggregierten dort, vergleichbar mit der Hanging Drop Methode, zu Sphäroiden. Eine Plasmabehandlung schien das Anwachsen der Zellen zu begünstigen, daher konnten gleichmäßigere Sphäroide in den nicht Plasma-behandelten Sensorarrays erreicht werden.

Entwicklung von Systemen zur statischen und fluidischen Zellkultur in (Sensor-)Arrays

Die Verwendung der CellCrown™-Inserts bot einige Vorteile, da so flexibel verschiedene Folien bzw. Arrays getestet werden konnten. Da sie gespült, desinfiziert und wiederverwendet werden

konnten, waren sie auch vergleichsweise günstig. Ein entscheidender Nachteil lag jedoch darin, dass die Inserts nicht dicht den Bereich innerhalb des Inserts vom darunterliegenden Well abtrennten, wodurch Zellen nicht nur auf den Bereich des Inserts beschränkt blieben. Dies führte insbesondere bei der Durchführung der LDH-Assays zu Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit mit diesem Modell. Ein neu entwickeltes Insert, auf das die Folien/Arrays verschweißt werden konnten, ermöglichte es diesen Fehler zu umgehen. Durch die extern durchgeführten Arbeiten war jedoch eine Abhängigkeit bei der Bereitstellung der Systeme gegeben. Ein großer Vorteil lag zudem darin, dass diese Inserts deutlich weniger Medium notwendig machten. Außerdem wurden Inserts mit bis zu vier unabhängigen Kompartimenten möglich, was die Durchführung von bis zu vier Versuchen parallel ermöglichte. Laut Herstellerangaben wird Stützmaterial durch Waschen in Natronlauge entfernt. Hierbei zeigte sich, dass das überschüssige Material nicht komplett entfernt werden konnte. Längeres Waschen in Natronlauge greift aber das gedruckte Material zu sehr an, daher musste hier mehrere Tage noch in Wasser gewaschen werden, was die Verwendung des 3D-Drucks auf Dauer, abgesehen vom Preis für das Druckmaterial, nicht nahelegte. Die Inserts wurden daher auch testweise durch Fräsen aus Vollmaterial hergestellt. Aufgrund der Geometrien, insbesondere des Aspektverhältnisses und der Wandstärken, ist aber auch Spritzguss eine geeignete Herstellungsmethode für die Inserts.

Die Möglichkeit in statischen Sensorarrays Sauerstoff zu messen, stellt an sich schon einen enormen Mehrwert im Vergleich zu herkömmlichen Systemen dar. Jedoch sind, gerade bspw. im Bereich der Organ-on-Chip-Technologien, fluidische Systeme für komplexere biologische Modelle von Bedeutung. Daher wurden neben den im Arbeitskreis etablierten Mikrobioreaktoren (MBR) auch andere, für Sensorarrays optimierte, MBRs entwickelt und getestet. Ein großes Problem in mikrofluidischen Systemen sind Luftblasen. Während in manchen Modellen, wie Lung-on-Chips, eine Medium-Luft-Grenzfläche gewünscht ist [232, 233], können Luftblasen in anderen biologischen Modellen bspw. durch erhöhte Scherkräfte zu einer Beeinträchtigung des Zellwachstums und einem negativen Einfluss auf das biologische Modell führen [113, 234]. In der Einleitung wurden bereits verschiedene Formen der Blasenentfernung in mikrofluidischen Systemen dargestellt. Eine Anforderung war es, dass die Blasenfalle in den MBR integrierbar, mit entsprechend geringen äußeren Dimensionen und auch einem geringen internen Volumen sein sollte. Daher wurde auf Systeme fokussiert, bei denen Luftblasen durch eine ePTFE-Membran entfernt wurden. Dieses Konzept wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben, bspw. durch Integration in ein Schlauchsystem [118] oder indem der mikrofluidische Kanal direkt an einer Membran endete, durch die die Luftblasen gedrückt

wurden [119]. In den ersten Konzepten (Abbildung 53) wurde eine ePTFE-Membran über eine mikrofluidische Kammer gespannt, durch die das Medium mit Luftblasen gepumpt wurde. Es wurde gezeigt, dass das grundlegende Konzept geeignet war, um Luftblasen zu entfernen, je nach Medium und Verschlussmechanismus mit unterschiedlicher Effektivität. Die Konzepte wurden dann weiterentwickelt, um eine Miniaturisierung zu ermöglichen. Eine Variante mit Ringmagneten (Abbildung 56) entfernte Blasen, war jedoch über längere Versuchszeiten nicht dicht. Der Prototyp wurde aus VeroClear gedruckt. Laut Hersteller hat dieses Material eine Formbeständigkeit bis ca. 45 °C. Es wurde vermutet, dass die Temperatur im Inkubator (37 °C) jedoch das Material etwas weicher werden ließ, wodurch es im Bereich der Auflageflächen der Ringmagnete zu Verformungen kam, da genau dort der Flüssigkeitsaustritt beobachtet wurde. Daraufhin wurden die Auflageflächen und das Kammervolumen nochmals reduziert. So konnte ein Prototyp einer Blasenfalle, die über einen magnetischen Verschluss verfügte, realisiert werden (Abbildung 57). Zudem war hier die Option gegeben, um bspw. über Unterdruck Blasenfallen effektiver zu entfernen oder über Begasung bspw. die Sauerstoffkonzentration im Medium zu regulieren. Dieser Ansatz wurde dann auch in den verschiedenen Prototypen der MBR eingesetzt.

Die Entwicklung der MBR basierte auf den Erfahrungen mit magnetischen Verschlussmechanismen aus der Entwicklung der Blasenfalle. Die ersten Konzepte waren vergleichsweise komplex und daher fehleranfällig. Im Laufe der Entwicklung wurde sich auf die wesentlichen Bestandteile – die Kammer für die Sensorarrays sowie die Blasenfalle – konzentriert. So konnte dann ein für Sensorarrays optimierter MBR mit und ohne Blasenfalle realisiert werden (Abbildung 62). In dieser Variante wurde die mikrofluidische Kultivierung von HepG2-Zellen sowie die Blasenentfernung erfolgreich getestet. Aufgrund des einfachen Aufbaus ist eine Fertigung durch Fräsen oder sogar Spritzguss möglich, was auch den Einsatz stabilerer Materialien wie PC oder PS ermöglicht.

Validieren der Sensorarrays am biologischen Funktionsmodell

In den in der Arbeitsgruppe verwendeten Mikrokavitätenarrays ohne Sensoreigenschaften wurden bisher schon verschiedene biologische Modelle, wie die hämatopoetische Stammzellnische [96] oder auch Aggregate der Leberkarzinomzelllinie HepG2 [30] kultiviert. Da in der Leber ein Großteil des Metabolismus stattfindet und somit Leberzellen über einen erhöhten Sauerstoffwechsel verfügen, macht sie dies besonders interessant für Untersuchungen zur Sauerstoffkonzentrationen. Zudem sind HepG2-Zellen in der Handhabung vergleichsweise günstig, sodass diese sich als erstes Modellsystem eigneten. Hinzu kommt ihre Relevanz im Bereich der Medikamentenentwicklung. 60 % der vom Markt genommenen Medikamente

werden aufgrund von Leber-, Kardio- oder Neurotoxizität zurückgerufen [235]. Daher wurden Kardiomyozyten als weiteres biologisches Funktionsmodell identifiziert. Ein erster Ansatz war hierfür der Einsatz von Kardiomyozyten, die aus P19-Zellen differenziert wurden. Danach wurde ein Modell basierend auf Stammzell-abgeleiteten Kardiomyozyten des Kooperationspartners an der Medizinischen Hochschule Hannover verwendet.

Die Optimierung der Auswertung stellte, unabhängig von den biologischen Funktionsmodellen, eine Herausforderung dieses Teilprojektes dar. Für die Messung der Fluoreszenzen der Sensor- bzw. Referenzfarbstoffe in der Folie wurde das VisiSens TD System der PreSens GmbH verwendet. Von PreSens wurde auch die Software VisiSens ScientifiCal 1 entwickelt, die für die Messaufnahmen sowie die Kalibrierung verwendet wurden, und das Plug-In Live MITOS bereitgestellt. Wie in Abbildung 66 dargestellt, war es mit der VisiSens ScientifiCal 1 Software zwar möglich Kalibrierungen auszuwerten und nachträglich einzelne ROIs zu analysieren, eine Live-Betrachtung war jedoch nicht machbar. Das Plug-in ermöglichte dann zwar Live-Auswertungen, erkannte aber keine Shifts, also Verschiebungen der Mikrokavitäten, im Bild. Diese waren aber gerade bei der Substanzapplikation unvermeidbar. Eine Lösung wurde hier mit der Software CellProfiler™ gefunden [236]. Diese Open Source-Lösung dient bspw. der Zellzählung, wie es auch im Rahmen dieser Arbeit bei der Zählung der Lebend-Tot-Färbungen gemacht wurde oder bspw. der Auswertung von histologischen Gewebeschnitten [237]. Dadurch, dass sich aber mit diesem Tool unterschiedliche Objekte automatisiert identifizieren lassen, wurde die Verwendung für die Erkennung der Mikrokavitäten optimiert. Hierfür wurde die CellProfiler™ (CP) Pipeline, also das in der Software verwendete Protokoll, iterativ angepasst. Zunächst sollte CP die einzelnen Mikrokavitäten als Objekte identifizieren. In den Rohdaten war dies nicht möglich. Da für die spätere Auswertung die Rot- und Grün-Kanäle getrennt werden mussten, um die jeweiligen Intensitäten des roten Sensor- bzw. des grünen Referenzfluorophors zu messen, wurde dies im ersten Schritt durchgeführt. Der Rot-Kanal liefert abhängig von der Sauerstoffkonzentration unterschiedliche Intensitäten, der Grün-Kanal sollte gleichmäßigere Intensitäten enthalten, da hier das Referenzfluorophor dargestellt wurde. Für eine reproduzierbarere Objekterkennung wurden Helligkeit und Kontrast angepasst. Zudem kam es vor, dass einzelne Bereiche der Bilder dunkler waren, daher wurde die Intensität über das gesamte Bild angepasst. Für die Erkennung der Objekte wurden verschiedene Modulparameter von CP getestet. CP erkannte dann zuverlässig 8-16 Mikrokavitäten pro Aufnahme. Hierfür wurden verschiedene Pipelines getestet (Anhang 2 A). Neben den Methoden zur Objekterkennung wurden ausgehend von den Objekten verschiedene ROIs definiert. Da die erkannten Objekte unregelmäßige Ränder hatten, wurden diese zunächst auf einen Punkt im Zentrum

reduziert und von diesem ausgehend wurde eine kreisförmige ROI für den Bereich des Sphäroids berechnet. Dies wurde in allen Pipeline-Varianten durchgeführt. Ausgehend von dieser als „Sphäroid“ bezeichneten ROI wurden dann ringförmige ROIs für bspw. den Bereich der Mikrokavitätenwand und verschiedene Bereiche der Fase (Innen, Mitte, Außen) definiert. Hierbei wurde festgestellt, dass im Bereich der Mikrokavitätenwand das Signal keine reproduzierbaren Werte ausgab, sodass dieser Bereich in der optimierten CP Pipeline nicht gemessen wurde. Stattdessen wurde ein innerer und ein äußerer Bereich der Fase gemessen. Mit diesem Ansatz war es möglich, erste Aussagen über mögliche Gradienten treffen zu können. Generell erlaubt diese Auswertemethode auch eine weitere Segmentierung in mehrere Bereiche der Fase.

Die eigentliche Kultivierung von HepG2-Aggregaten/Sphäroiden in Sensorarrays wurde bereits im Rahmen der Beschichtungsversuche gezeigt. In Kombination mit der Sauerstoffmessung, konnte wie erwartet eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration während der Kultivierung gezeigt werden. Dabei wurde ermittelt, dass das Aussäen von $0,5 - 1,5 \times 10^5$ HepG2-Zellen/Sensorarray auch für längere Versuchszeiten optimale Ergebnisse lieferte. Zum Test des Messsystems wurden HepG2- und auch Hela-Sphäroide in Sensorarrays kultiviert und dann mit $1 \mu\text{M}$ Antimycin A, einem Komplex-III-Inhibitor, behandelt. Es zeigte sich unmittelbar nach Zugabe ein sprunghafter Anstieg der Sauerstoffkonzentration.

Auch für das Modell mit P19-Zellen zeigte sich eine generelle Eignung der Sensorarrays. Hierfür wurden auch die Zellzahlen optimiert. Die P19-Zellen wurden vor dem Aussäen in die Sensorarrays einem Differenzierungsprotokoll unterworfen, um sie in Kardiomyozyten zu differenzieren. Da sie jedoch auch während der Kultivierung in den Sensorarrays noch Proliferation zeigten, ist zumindest davon auszugehen, dass die Differenzierung nicht komplett funktionierte. Sofern der Ansatz der P19-abgeleiteten Kardiomyozyten weiterverfolgt werden sollte, müsste die Differenzierung mittels PCR nachgewiesen und das Differenzierungsprotokoll gegebenenfalls optimiert werden. Da jedoch im weiteren Verlauf des Projektes humane Stammzell-abgeleitete Kardiomyozyten der MHH verwendet wurden, wurde das auf P19-Zellen basierende Modellsystem zunächst nicht weiterverfolgt.

Die Kardiomyozyten der MHH wurden mit und ohne genetisch-codiertem Calcium-Indikator bereitgestellt. Während der Differenzierung wurden die CM in geschüttelten/gerührten Bioreaktoren in Hannover kultiviert, wodurch die CM aggregierten. Die Aggregatgröße lag im Bereich von $100 - 300 \mu\text{m}$, so dass es möglich war diese direkt auf die Sensorarrays zu geben. Parallel dazu wurden auch Ansätze getestet die Aggregate zunächst zu dissoziieren, als

Einzelzellsuspension auszusäen, um Sphäroide direkt in den Mikrokavitäten zu bilden. Für BIOFLOAT™-beschichtete Sensorarrays konnte damit eine gleichmäßige Sphäroidgröße erreicht werden. Die Kultivierung wurde bis zu 16 Tage getestet. Hierbei konnte sowohl über Durchlichtmikroskopie als auch durch Fluoreszenzmikroskopie der genetisch-codierten Calciumindikatoren ein Schlagen bzw. die Kontraktion der Aggregate nachgewiesen werden. SF-RPC3-Sensorarrays in Kombination mit einer BIOFLOAT™-Beschichtung eigneten sich am besten für die Generierung von CM-Sphäroiden, während bspw. die Plasmabehandlung zum Anhaften der Zellen und einer ungleichmäßigen Aggregatbildung führte. Auch bei den CM zeigte sich zu Beginn der Kultivierung eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration, wobei sich ein Gleichgewichtszustand einstellte. Auch hier war ein Konzentrationsgefälle von der Fase zum Sphäroiden hin zu erkennen. Die Bedeutung der Fase wird später noch behandelt.

Neben der reinen Betrachtung der Sauerstoffkonzentrationen während der Kultivierung wurden auch Versuche durchgeführt, um die Auswirkungen von Isoprenalin auf die CM-Sphäroide gezeigt. Hierfür wurden die Sphäroide unterschiedlichen Konzentrationen von Isoprenalin ausgesetzt und unmittelbar danach die Schlagfrequenz anhand des Calciumindikatorsignals mikroskopisch gemessen. In ersten Experimenten zeigte die Behandlung mit 1 μM Isoprenalin eine kurzzeitige Erhöhung der Schlagfrequenz, die jedoch nach einigen Minuten wieder auf die Ausgangsfrequenz zurückging. In der Literatur wurden meist deutlich geringere Isoprenalin-konzentrationen zur Stimulation verwendet. Turnbull et al. verwendeten bspw. Konzentrationen von 1 nM bis 10 μM an einem humanen Myokardmodell [238]. Daher wurden 0,01 μM und 0,1 μM Isoprenalin getestet. Bei der Applikation von 0,01 μM zeigte sich ein signifikanter Anstieg von 18 auf 26,6 bpm bei Sphäroiden mittlerer Größe sowie ein signifikanter Anstieg von 20,2 auf 31,5 bpm bei größeren Sphäroiden. In beiden Fällen bewirkte die Behandlung eine ca. 1,5-fache Erhöhung der Schlagfrequenz. Bei der Behandlung mit 0,1 μM Isoprenalin war für beide Größen der Anstieg nicht signifikant. Generell konnte bei größeren Sphäroiden eine leicht höhere Schlagfrequenz gesehen werden. Kleinere Sphäroide mit Durchmessern unter 100 μm wurden nicht ausgewertet, da diese unregelmäßige Schlagfrequenzen zeigten. In einem von Abulaiti et al. entwickelten System wurde durch die Behandlung mit 0,01 μM Isoprenalin eine ca. 1,4-fache Erhöhung der Schlagfrequenz, von 92 auf 126 bpm gezeigt [239]. Auch der Vergleich von humanen und murinen Stammzell-abgeleiteten CM-Modellen zeigte eine Zunahme der Schlagfrequenz nach Behandlung mit 0,08 μM Isoprenalin [240]. Generell wird die Schlagfrequenz durch Isoprenalin bis zu 1 μM Dosis-abhängig erhöht [241, 242]. Diese Literaturwerte konnten im vorliegenden System für 0,01 μM so auch gemessen werden. Grundsätzlich ist daher eine Eignung des Systems für die Dosis-Wirkung-Untersuchung

gegeben. Parallel zu der Auswertung der Calciumindikatoren über Fluoreszenzmikroskopie ist jedoch erstmalig nun auch die Beobachtung der Sauerstoffkonzentration möglich. Für Assays, die diese Prinzipien nutzen, wurde bereits eine Erfindungsmeldung am KIT eingereicht, und wird voraussichtlich im Rahmen einer Nachanmeldung zur grundlegenden Patentanmeldung (Erfindung bzgl. der Sauerstoff-sensitiven Mikrokavitäten mit FASE zur Gradientenbestimmung, Anmeldedatum 22.06.2022) berücksichtigt.

Für zweidimensionale Anwendungen wurde der Mito Stress Test in der Literatur ausreichend beschrieben und wird bspw. für das Seahorse XF der Fa. Agilent kommerziell angeboten [25, 187]. Es gibt auch Ansätze, um mit diesem System diesen Test an Sphäroiden durchzuführen [190]. Systembedingt war hier jedoch bisher nur die globale Messung in einem Well, also im gesamten Medium möglich. Die Anpassung des Mito Stress Tests auf die Sensorarrays ermöglichte hingegen die gleichzeitige Betrachtung mehrerer Sphäroide und konnte zudem Sauerstoff nicht nur global, sondern in der Mikroumgebung der Sphäroide messen. Für die Entwicklung wurden zunächst HepG2-Sphäroide eingesetzt, da diese in der Handhabung im Vergleich zu den Kardiomyozyten einfacher sind. Zudem waren in der Literatur mehr Vergleichswerte zu Untersuchungen mit HepG2-Zellen in 2D zu finden [25].

Bei der Durchführung der Mito Stress Tests mit HepG2-Zellen, die in den Mikrokavitäten der Sensorarrays zu Sphäroiden aggregierten (MCS), zeigte sich während der Versuchsreihe, dass die Sphäroide sich nur noch ungleichmäßig bildeten (Abbildung 85), wodurch die Zellzahl erhöht werden musste. Dieser Effekt stand im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen mit MCS. Im Vergleich dazu bildeten sich in Hanging Drops reproduzierbar Sphäroide, die für die Mito Stress Tests verwendet werden konnten. Im Vergleich zu vorherigen Versuchen, zeigten die MCS aus 1×10^5 Zellen einen vergleichsweise großen nekrotischen Kern, was auf zu große Aggregate hindeuten kann. Dieser Effekt wurde so auch in der Literatur beschrieben [243]. Eine Begründung für die ungleichmäßige Sphäroidbildung könnte in der langen Kultivierungszeit der Zellen liegen. Die für die späteren Mito Stress Tests verwendeten Zellen waren gegen Ende in Passage-Nr. 25 (gezählt ab dem Auftauen der Zellen). Für HepG2-Zellen wurde beschrieben, dass sich nach mehreren Passagen auch das Expressionsprofil leberspezifischer Proteine änderte und die Albuminsekretion abnahm [244]. Aus diesen Gründen kam es vor, dass einzelne Experimente keine aussagekräftigen Daten lieferten (Abbildung 86). Dies lag bspw. dann vor, wenn, wie in der Abbildung dargestellt, jede Substanzgabe zu einem gleichen Sauerstoffprofil führte. Diese Versuche wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Ein weiterer Effekt, der bei höheren Passagen beobachtet werden konnte war, dass die Zellen in der Standardkultur langsamer proliferierten. Die Sphäroide aus der Hanging Drop Kultur zeigten auch in höheren

Passagen ein besseres Ergebnis im Mito Stress Test sowie einen geringeren Teil abgestorbener Zellen. Dies kann an einer besseren Sauerstoffversorgung über die Nachdiffusion in den Hanging Drops über die gesamte Tropfenoberfläche liegen, während in den Mikrokavitäten die Nachdiffusion nur über die Mikrokavitätenöffnung erfolgte.

Neben dem Ausschluss kompletter, nicht auswertbarer Experimente, wurden auch einzelne Kavitäten ausgeschlossen, wenn davon auszugehen war, dass in diesen keine Sphäroide (mehr) vorlagen. Erkennbar war dies an fehlenden Änderungen im Sauerstoffverbrauch nach Substanzgabe, wenn in anderen Mikrokavitäten deutliche Änderungen erkennbar waren. Dadurch, dass bis zu 20 Mikrokavitäten gleichzeitig ausgewertet werden konnten, wurden durch den Ausschluss einzelner Messpunkte dennoch ausreichend Daten generiert. Aufgrund von Belichtungsunterschieden über das gesamte Field of View war eine Normalisierung der Daten notwendig. Hierfür wurden die Annahmen getroffen, dass nach der FCCP-Zugabe die maximale Respiration erreicht wurde, der Sauerstoffwert in unmittelbarer Nähe der Zelle auf ein Minimum fiel und, dass nach der Zugabe von Antimycin A und Rotenon die mitochondriale Atmung vollständig inhibiert wurde, wodurch die Sauerstoffsättigung auf ein Maximum anstieg. Zur Normalisierung wurde der Wert nach FCCP-Zugabe daher auf 0 % gesetzt, der nach Zugabe von Antimycin A und Rotenon auf 100 %.

Die grundsätzliche Durchführbarkeit des Mito Stress Tests in 3D in den Sensorarrays wurde zunächst in Kontrollversuchen mit Medium anstelle der Testsubstanzen durchgeführt. Die Medienzugabe führte lediglich zu einem geringen Anstieg der Sauerstoffsättigung, was zum einen durch das Öffnen des Inkubators und der damit einhergehenden Temperaturänderung zu erklären war und zum anderen an der Medienzugabe an sich lag. Die Änderung der Sauerstoffsättigung nach Zugabe von Oligomycin war in den MCS höher als nach der Medienzugabe, was auf einen Effekt des Oligomycins schließen lässt. Hierbei zeigten sich auch geringfügige Unterschiede zwischen den Sphäroidgrößen. In den HDS war diese Änderung noch deutlicher zu sehen. Tendenziell waren aber die Verläufe, unabhängig von der Sphäroidart, vergleichbar.

Durch die Testung von Mitoxantron und Doxorubicin sollte die Eignung des Assays auch für die Untersuchung pharmakologisch interessanter Substanzen gezeigt werden, da diese bspw. Kardiotoxizität zeigten [200]. Der Vergleich dieser Substanzapplikation bewirkte eine deutliche Änderung der Sauerstoffsättigung im Vergleich zu einer Medienzugabe (Abbildung 91). Da auch hier festgestellt wurde, dass ein deutlicher Unterschied zwischen den niedrigeren und höheren Passagen bestand, sank die Stichprobengröße, sodass eine statistische Betrachtung nicht mehr

möglich war. Für die Darmkrebszelllinie HCT116 wurden bspw. deutliche Unterschiede nach einer Behandlung mit FCCP oder Oligomycin in Sphäroiden und Monolayern beobachtet. Hier wurden Sphäroide in einem ruhenden und einem proliferierenden Zustand durch Proteomanalyse verglichen [245]. Der proliferierende Zustand wurde hier durch einen regelmäßigen Medienwechsel aufrecht erhalten. Eine Erklärung für die großen Unterschiede der Mito Stress Tests zwischen HDS und MCS könnte auch dadurch erklärt werden, dass die Zellen möglicherweise in den HDS in einem proliferierenden Zustand bleiben, da hier vor dem Überführen in die Sensorarrays ein kompletter Medienwechsel erfolgte, während die MCS in ihrer Mikroumgebung keinen direkten Medienwechsel ausgesetzt waren. Dies könnte bspw. durch eine Proteomanalyse weiter untersucht werden. Chemosensitive HepG2-Zellen können durch Anpassung in Doxorubicin-resistente Zellen überführt werden [246]. Es wäre demnach auch möglich, dass durch die höhere Passagen Zellen durch krebstypische Mutationen auch entsprechende Resistenzen entwickeln, die zu dem geringeren Einfluss von Doxorubicin in den höheren Passagen führte.

Die Kardiomyozyten der MHH standen nur in begrenzter Anzahl zur Verfügung. Es war damit möglich Sphäroide in den Mikrokavitäten zu generieren, die verwendeten Zellzahlen ergaben aber in den ersten Experimenten keine auswertbaren Ergebnisse. Daher wurden die im Bioreaktor erstellten Kardiomyozyten-Aggregate verwendet. Die Kontrollversuche zeigten hier den erwarteten und auch in den HepG2-Versuchen beobachteten Verlauf der Sauerstoffsättigung. Jedoch stieg die Sauerstoffsättigung nach Zugabe von FCCP schnell wieder an. Ein ähnlicher Effekt wurde in der Literatur bei Kardiomyozyten aus Ratten bzw. Mäusen beschrieben [247, 248]. Während in den vorliegenden Daten tendenziell ein langsames Ansteigen der Sauerstoffkonzentration nach der Zugabe von Antimycin A und Rotenon beobachtet wurde, wurde für zweidimensional kultivierte Stammzell-abgeleitete Kardiomyozyten in der Literatur ein sprunghafter Anstieg beobachtet [249]. Nach Isoprenalinapplikation zeigte sich tendenziell ein Absinken der Sauerstoffkonzentration, während die Zugabe von Medium in der Kontrolle zu einem Anstieg führte. In den vorangegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Isoprenalin die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten-Aggregate erhöhte, was durch einen erhöhten Metabolismus das Absinken der Sauerstoffkonzentration erklären kann.

Im Vergleich zu den 2D-Mito Stress Tests im Seahorse XF wurde in den hier vorgestellten 3D-Mito Stress Tests die relative Sauerstoffsättigung und nicht die Oxygen Consumption Rate (OCR) betrachtet. Grundsätzlich ist die Berechnung der OCR auch in diesem Ansatz möglich, da hier jedoch noch nicht genügend verifizierte Daten vorlagen, wurde zunächst die relative

Sauerstoffsättigung zur Auswertung herangezogen. Die OCR – teilweise auch als Oxygen Uptake Rate (OUR) bezeichnet – beschreibt den Sauerstoffumsatz in einem definierten Zeitabschnitt. Der Sauerstoffgehalt im Medium ergibt sich also aus dem Sauerstoffverbrauch und der Diffusion von Sauerstoff in das Medium. Die Berechnung erfolgt mit der Formel 7.

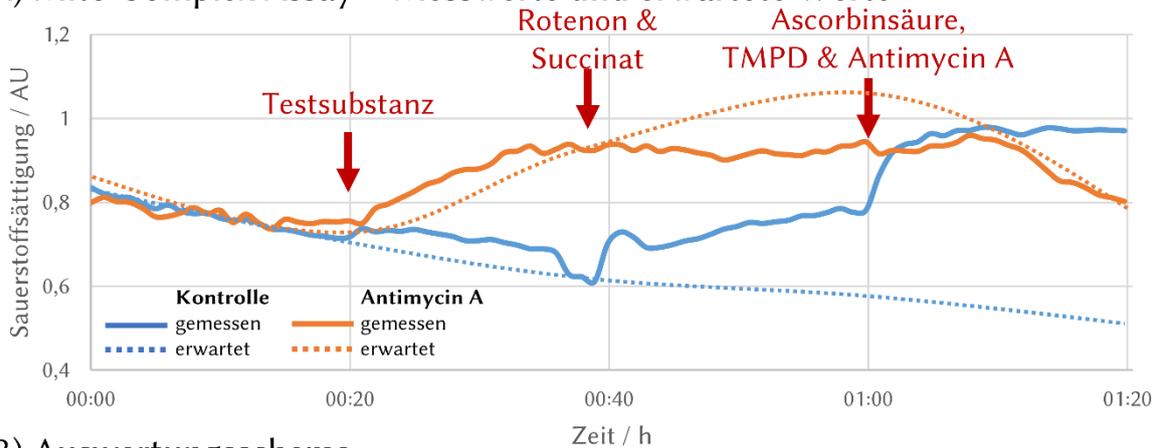
Formel 7: Berechnung der Oxygen Consumption Rate.

$$OCR = k_L a ([O_2]^* - [O_2]) - \frac{d[O_2]}{dt}$$

Wobei $[O_2]^*$ die Sauerstoffkonzentration, also die Sättigung, zum jeweiligen Zeitpunkt ist und $d[O_2]/dt$ die Sauerstofftransferrate beschreibt [250]. $k_L a$ gibt die Belüftungskapazität eines Systems an, beschreibt somit die Diffusion von Sauerstoff in das Medium und kann experimentell bestimmt werden [251].

Ziel des Mito Complex Assays ist es zu bestimmen welche Komplexe der Atmungskette durch eine Testsubstanz beeinflusst werden [252]. Dieser Assay wurde als Kontrolle mit Wasser an MCS- und HDS-Sphäroiden durchgeführt. Zudem wurde als Testsubstanz Antimycin A als bekannter Komplex-III-Inhibitor verwendet [25]. Während des Assays wurden Inhibitoren und Substrate immer parallel gegeben, sodass im Kontroll-Ansatz die OCR konstant bleiben sollte, wodurch eine sinkende Sauerstoffkonzentration erwartet worden wäre (Abbildung 105). Nach Zugabe von Wasser als Kontrollsubstanz nahm die Sauerstoffkonzentration auch geringfügig ab, was durch den durch Wasser unbeeinflusst weiterlaufenden Metabolismus zu erklären war. Nach der Zugabe von Rotenon bzw. Antimycin A stieg der Sauerstoffgehalt langsam, aber kontinuierlich an. Da zu den gleichen Zeitpunkten auch jeweils Substrate hinzugegeben wurden, sollte die OCR konstant bleiben, also die Sauerstoffkonzentration eher sinken. Die Abweichung lässt sich über einen Überschuss der Inhibitoren erklären. Während des Versuchs, bei dem als Testsubstanz Antimycin A hinzugegeben wurde, zeigte sich direkt ein erwartetes, deutliches Ansteigen der Sauerstoffkonzentration. Durch den weiteren Verlauf der Sauerstoffsättigung konnte Antimycin A als Komplex-III-Inhibitor bestätigt werden (5.2.13.3). Somit ist es prinzipiell möglich einen solchen Assay in den Sensorarrays durchzuführen. Auch wenn für 3D-Anwendungen die Konzentrationen der Substrate und Inhibitoren noch optimiert werden müssen.

A) Mito Complex Assay – Messwerte und erwartete Werte



B) Auswertungsschema

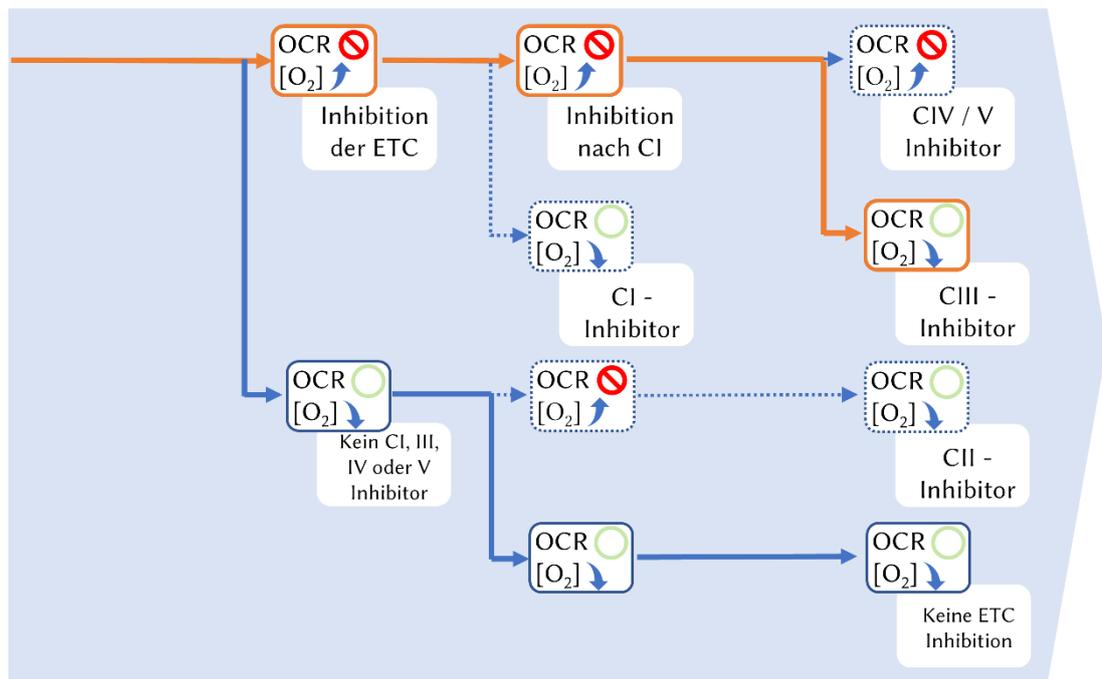


Abbildung 105: Interpretation des Mito Complex Assays. A) Erwartete und gemessene Verläufe der Sauerstoffsättigung des Kontrollversuchs und der Antimycin A Inhibition. B) Markierung des erwarteten Verlaufs der Kontroll- und Antimycin A-Versuche im Auswertungsschema.

Ein entscheidendes Element der hier vorgestellten Sensorarrays ist die Fase im oberen Bereich der Mikrokavitäten (Abbildung 20). Hierdurch sollte die Möglichkeit geschaffen werden nicht nur Sauerstoff im Bereich der Sphäroide, also in unmittelbarer Mikroumgebung, sondern auch Gradienten, die sich oberhalb der Sphäroide ausbilden, zu messen und zu charakterisieren. Hierfür wurden verschiedene Segmentierungsmethoden (Abbildung 97) getestet. Es zeigte sich, dass der Bereich der Wände der Mikrokavitäten, die senkrecht zum Detektor stehen, keine aussagekräftigen Werte lieferten und daher bei der Messung ausgenommen wurden. Dieser Bereich könnte alternativ über Konfokalmikroskopie ausgewertet werden. Hierbei würde die Fluoreszenz der beiden Fluorophore mit einem Konfokalmikroskop bestimmt und darüber die Sauerstoffkonzentration in jeder einzelnen Z-Ebene berechnet werden können [185, 186]. Die

Fasensegmentierung an sich zeigt jedoch in den ersten Ergebnissen bereits eine Gradientenbildung in den Versuchen an. Dies war daran zu erkennen, dass bspw. nach der Zugabe eines Atmungsketteninhibitors (Abbildung 96) die Sauerstoffsättigung in den Bereichen der Fase schneller anstieg als im Inneren der Mikrokavität, also im Bereich der Sphäroide. Außerdem konnte während der Kultivierung beobachtet werden, dass die Sauerstoffsättigung im Bereich der Fase höher war als im Inneren der Mikrokavität. Besonders im Fall der fluidischen Kultivierung war dieser Unterschied stark zu sehen (Abbildung 98), was auf eine Gradientenbildung hinweist. Die ersten Sensorarrays verfügten über Fasen mit einem Öffnungswinkel von 60°. Daneben wurden anfangs solche mit einem Winkel von 90° hergestellt (Abbildung 23). Die Wahl fiel zunächst auf diese Winkel, da bei einer zu starken Steigung eine möglicherweise schlecht auswertbare Sensorantwort zu erwarten gewesen wäre, wie dies bspw. im Bereich der senkrecht zur Optik stehenden Wände der Mikrokavitäten zu beobachten war. Da jedoch die Messungen mit 60°-Fasen ausreichende Sensorantworten zeigten, wurden gegen Ende des Projektes auch Sensorarrays mit 30°-Fase getestet. Der bei einer Messreihe mit Natriumsulfitlösung beobachtete Effekt, dass die Bereiche nicht alle nach Zugabe von Natriumsulfit 0 % Sauerstoff anzeigten, machte eine verbesserte Kalibrierung notwendig. Eine mögliche Ursache hierfür kann darin liegen, dass zum einen durch den Winkel der Folie zur Optik oder auch durch das Verstrecken während des Mikrothermoformens die Sensorantwort abnimmt, was durch ein schwächeres Fluoreszenzsignal zur Berechnung eines leicht erhöhten Sauerstoffwertes führen kann. Die Einzelkalibrierung jeder ROI – also der inneren, mittleren und äußeren Fase sowie dem Bereich der Sphäroide – behob dieses Problem und konnte so noch präzisere Werte generieren. Für zukünftige Versuchsreihen ist es daher möglich zunächst ein Kalibrierdatenset für jeden Folientyp für jede ROI zu erstellen und auf die Messwerte anzuwenden. Für die Kultivierung von HepG2-Zellen in Sensorarrays mit 30°-Fase wurde diese Kalibrierung so angewandt (Abbildung 100 B). Zu sehen war ein deutliches Absinken der Sauerstoffsättigung nach ca. 36 Stunden. Dies deutet daraufhin, dass die Zellen zu dieser Zeit aggregierten und so Sphäroide mit organotypischen Funktionen bildeten, was sich auch mit den Beobachtungen in anderen Systemen zur Sphäroidaggregation deckte [253, 254]. Müller et al. beschrieben bei vergleichbaren Zellzahlen, dass sich nach zwei Tagen kompakte Sphäroide bildeten [255]. In den gemessenen Sauerstoffsättigungen in den einzelnen ROIs zeigte sich, dass die Sauerstoffsättigung im Bereich der Sphäroide, also am tiefsten Punkt der Mikrokavität zuerst anfang abzusinken und auch den niedrigsten Punkt erreichte. Die Bereiche der Fase sanken, von innen nach außen, etwas langsamer. Nach ungefähr 54 Stunden stellte sich zunächst ein Gleichgewichtszustand ein. Da die Sauerstoffsättigung von oben (äußere Fase) nach unten (Sphäroid) abnahm, kann diese Tendenz auf die Ausbildung eines Sauerstoffgradienten

hinweisen (Abbildung 106). Ein leichter Anstieg gegen Ende der Versuchszeit, zwischen 64 und 72 Stunden, ließ auf eine geringere metabolische Aktivität schließen. In der Literatur wurde bei HepG2-Sphäroiden über längere Kultivierungszeiträume eine Kontaktinhibition beschrieben, die sich bspw. durch eine verringerte Albuminexpression nach sieben Tagen [256], einem Maximum der metabolischen Aktivität an Tag 3 [74], eine reduzierte CYP1A1-Expression vom vierten bis siebten Tag [257] oder eine Verringerung des Sphäroiddurchmessers [255] zeigt.

Sauerstoffgradienten-Messung durch Einfügen einer Fase

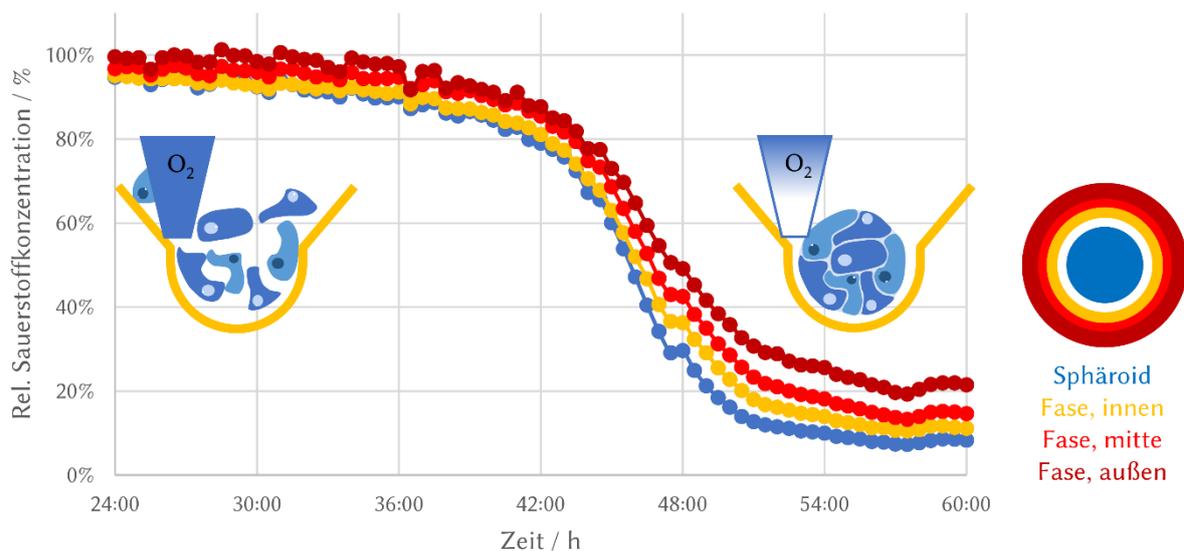


Abbildung 106: Zusammenfassung der Sauerstoffgradienten-Messung während der Aggregation von HepG2-Zellen in Sensorarray.

Durch diese Möglichkeit der Sauerstoffmessung in der Mikroumgebung sowie der Gradientenmessung sind vollkommen neue Einblicke in die Gewebephysiologie möglich. Bisherige Methoden konnten Sauerstoff meist nur an einem Punkt, bspw. durch Einbringen sogenannter Sensorspots in 96-Well-Platten (OxoPlate, PreSens) [258] gemessen werden. Alternativen zur Messung von Sauerstoffgradienten in 3D-Zellkulturen integrieren eine Sauerstoff-sensitive Folie in ein mit Zellen besiedeltes Gel (GelMA) [259] oder verwenden mehrere einzelne Sensorspots in einem Scaffold [260]. Diese Aufbauten sind vergleichsweise komplex und ermöglichen auch nur die Messung von Gradienten in einer Ebene. Sauerstoff-sensitive Beads [261] oder Lösungen mit Sauerstoff-sensitiven Fluorophoren [262] ermöglichen zwar die Messung von 3D-Gradienten. Sie können aber zum einen einen direkten Einfluss auf die Zellen haben und setzen zum anderen aufwendigere Auslesemethoden, wie bspw. konfokale PLIM-Mikroskopie [263], voraus. Im Gegensatz dazu ist die Gradientenbestimmung in den Sensorarrays mit einer normalen Kamera möglich, da die Zuordnung der einzelnen Punkte entlang der Z-Achse durch die festgelegte Position entlang der Fase erfolgte (Abbildung 106).

8 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst erfolgreich das Mikrothermoformen für Sauerstoffsensitive Folien etabliert. Dadurch ließen sich verschiedene Formen sogenannter Sensorarrays herstellen, die auch die Messung von Sauerstoffgradienten über eine integrierte Fase ermöglichten, hierfür wurde ein Patent angemeldet. Die Biokompatibilität der final verwendeten Folientypen wurde nachgewiesen. Dabei wurden verschiedene Folientypen identifiziert, die sich eher für die Kultivierung adhärenter Zellen (SF-RPC3+Plasma) bzw. für die Generierung von Sphäroiden in Verbindung mit einer BIOFLOATTM-Beschichtung (SF-RPC3) eigneten.

Für diese Sensorarrays wurde ein geeignetes statisches Testsystem definiert (CellCrownTM-Inserts) sowie erste Ansätze für optimierte statische Testsysteme geschaffen. Die hierbei entwickelten Zellkulturinserts können in Zukunft bis zu vier unabhängige Messungen gleichzeitig ermöglichen. Der entwickelte Mikrobioreaktor mit integrierter Blasenfalle kann als erstes Modul zur Entwicklung komplexer, geregelter Systeme dienen.

Ziel des Projektes war es anhand biologischer Funktionsmodelle die Eignung der Sensorarrays für Assays zur Untersuchung von Testsubstanzen zu zeigen. Aufgrund der Bedeutung der Leber- bzw. Kardiotoxizitätsuntersuchungen im Rahmen der Wirkstofftestung wurde sich für ein HepG2-basiertes Lebermodell sowie ein Stammzell-abgeleitetes Kardiomyozytenmodell entschieden. Zum einen konnte in diesen Modellen die Sauerstoffkonzentration während der Kultivierung über mehrere Tage untersucht werden, zum anderen wurden auch zwei Assays in diesen Modellen getestet.

Der Mito Stress Test ist für 2D-Zellkulturen durch das Seahorse XF der Fa. Agilent weit verbreitet. Jedoch wurde auch gezeigt, dass hier ein Sauerstoffmapping zur Untersuchung räumlicher und zeitlicher Muster von großer Bedeutung sein kann [191]. Zudem wurde im Seahorse XF gezeigt, dass 3D-Zellkulturen andere OCR-Profile im Vergleich zu 2D-Zellkulturen zeigten [264]. Die Verwendung der Sensorarrays für den Mito Stress Test ermöglichte erstmals sowohl räumliche Unterschiede durch 2D-Darstellung der Kavitäten, als auch Gradientenbildung durch Berechnung der Sauerstoffkonzentrationen in den Bereichen der Fase während des Mito Stress Tests in 3D-Zellkulturen zu untersuchen [265]. Dazu ist es möglich auch längere Experimente durchzuführen, da im Gegensatz zu etablierten Verfahren, die Sensorarrays nicht abgeschlossen sind. Zudem konnten gleichzeitig mehrere Sphäroide betrachtet werden.

9 Abkürzungsverzeichnis

AA	Antimycin A
ASC	Adipose tissue-derived stem cells (dt. aus Fettgewebe stammende Stammzellen)
CAD	Computer-Aided Design (dt. rechnerunterstütztes Konstruieren)
cLSM	Confocal Laser Scanning Microscope (dt. Konfokalmikroskop)
CNC	Computerized Numerical Control (dt. rechnergestützte numerische Steuerung)
CP	CellProfiler™
CTG	CellTracker™ Green
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Dox	Doxorubicin
ePTFE	Expandiertes Polytetrafluorethylen
ETC	Electron Transport Chain (dt. Elektronentransportkette)
EZM	Extrazellulärmatrix
FCCP	Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FDM	Fused Deposition Modeling (dt. Schmelzschichtung)
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging (dt. Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie)
GeIMA	Gelatine-Methacrylat
HDS	Mit der Hanging Drop Methode generierte Sphäroide (engl. hanging drop generated spheroids)
HFO	Heart-forming Organoids (dt. Herz-ähnliche Organoiden)
INT	2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium-chlorid
Iso	Isoprenalin
KOH	Kaliumhydroxid
LDH	Laktatdehydrogenase
MBR	Mikrobioreaktor
MCS	In Mikrokavitäten generierte Sphäroide (engl. microcavity generated spheroids)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Mtx	Mitoxantron
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
OCR	Oxygen consumption rate (dt. Sauerstoffverbrauchsrate)
PC	Polycarbonat
PDMS	Polydimethylsiloxan
PI	Propidiumiodid
PLA	Polycaprolakton
PLIM	Phosphorescence Lifetime Imaging (dt. Phosphoreszenzlebensdauer-mikroskopie)
PS	Polystyrol
PTFE	Polytetrafluorethylen
R	Ratio, Verhältniswert zwischen roter und grüner Fluoreszenzintensität
RGD	Aminosäuresequenz der L-Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure
ROT	Rotenon
SMART	Substrate Modification And Replication by Thermoforming
TMPD	Tetramethylphenylendiamin

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stufen der Sphäroidbildung.....	15
Abbildung 2: Übersicht über verschiedene Methoden der Scaffold-freien 3D-Zellkultur.....	17
Abbildung 3: Darstellung des SMART-Prozesses.....	18
Abbildung 4: Am KIT entwickelter MBR.....	20
Abbildung 5: Oxidative Phosphorylierung an der inneren Mitochondrienmembran.....	22
Abbildung 6: Prinzip der dynamischen Fluoreszenzlöschung.....	30
Abbildung 7: Darstellung des Arbeitsablaufs.....	42
Abbildung 8: Darstellung der Mikrothermoformanlage.....	43
Abbildung 9: Aussäen der Zellen auf die Testfolien.....	47
Abbildung 10: Reaktionen des LDH-Assays.....	52
Abbildung 11: Darstellung der einzelnen Schritte des Mito Complex Assays zur Identifikation des Zielkomplexes der Testsubstanz.....	60
Abbildung 12: Von planaren Folien hin zu Sauerstoff-sensitiven Mikrokavitätenarrays (Sensorarrays).....	65
Abbildung 13: Sensorantwort der kommerziell erhältlichen Sensorfolie SF-RPSu4.....	66
Abbildung 14: Erste Formversuche der Sensorfolie SF-RPSu4.....	66
Abbildung 15: Darstellung der Formmasken für Mikrokavitäten mit 300, 500 bzw. 800 µm Durchmesser.....	67
Abbildung 16: Tempern der Folienprototypen.....	68
Abbildung 17: Übersicht über die Formversuche mit den drei verschiedenen Standard-Formmasken.....	70
Abbildung 18 Auswertung des Formdrucks auf die Formtiefe bei verschiedenen Temperaturen.....	70
Abbildung 19: Temperaturstabilität der Folie SF-RPC2.....	71
Abbildung 20: Optische Sauerstoffmessung in Zellkulturen.....	72
Abbildung 21: Verschiedene Rahmen für die Formmasken.....	73
Abbildung 22: Skizze der Formmasken-Einsätze.....	73
Abbildung 23: Darstellung der Formmasken mit einer 60° bzw. 90° Fase und dem Design mit vier Kavitätentfeldern.....	74
Abbildung 24: Charakterisierung der Formmasken (A) und der Folien (B) mittels Digitalmikroskop.....	75
Abbildung 25: Formtiefen für die vier neu entwickelten Formmasken.....	76
Abbildung 26: Formmaske zur Herstellung von drei Sensorarrays in einem Formprozess.....	77

Abbildung 27: Formmaske mit einer 30°-Fase.	77
Abbildung 28 Formtiefen ausgewählter Sensorarrays bestimmt mit einem Lichtmikroskop in Verbindung mit einer Mikrometerschraube bzw. einem Digitalmikroskop.	78
Abbildung 29: Lambda-Scan mit verschiedenen Anregungswellenlängen.	79
Abbildung 30: Erste LDH-Assays in CellCrown TM -Inserts.	81
Abbildung 31: Darstellung der Ergebnisse von V2, V3 sowie V4.	82
Abbildung 32: Darstellung der LDH-Versuche 5, 6, 8, 11 (HepG2) bzw. 10 und 12 (Hela).	83
Abbildung 33 Ergebnisse der LDH-Assays in sticky slides mit Hela-Zellen.	84
Abbildung 34: Ergebnisse des LDH-Assays mit HepG2-Zellen.	85
Abbildung 35: LDH-Mengen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung auf unterschiedlichen Folientypen.	86
Abbildung 36: LDH-Assay in 3D in Sensorarrays.	87
Abbildung 37: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von HepG2-Zellen auf Polycarbonat-Folien (Versuch 5), SF-RPC2 (Versuch 5) sowie SF-RPC2+Plasma (Versuch 6).	88
Abbildung 38: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von HepG2 Zellen auf Polycarbonat-Folien (Versuch 6), SF-RPC3 (Versuch 6) sowie SF-RPC2+Plasma (Versuch 6).	89
Abbildung 39: Auswertung der A) Proliferation und B) dem Anteil toter Zellen.	90
Abbildung 40: Hela-Zellen nach 96 h Kultur auf PC bzw. Sensorfolien.	91
Abbildung 41: Wachstum der HepG2 bzw. Hela-Zellen auf PC bzw. SF-RPC3+Plasma-Folien.	92
Abbildung 42: Vakuum-Adapter für 12-Well-Platte.	93
Abbildung 43: Erste 3D-Kultivierungsversuche von HepG2-Zellen in (Sensor-)Arrays.	94
Abbildung 44: Mikrokavitätenarrays aus PC-Folien mit unterschiedlichen Beschichtungen. ...	95
Abbildung 45: Sensorarrays aus der SF-RPC2-Folie mit unterschiedlichen Beschichtungen. ...	96
Abbildung 46: Unterschiedliche Beschichtungen der SF-RPC3-Folien mit und ohne Plasmabehandlung.	97
Abbildung 47: CTG Färbung der HepG2-Zellen über einen Zeitraum von 96 Stunden.	98
Abbildung 48: CellCrown TM 12NX mit eingesetztem 800 µm Sensorarray.	99
Abbildung 49: Neuentwicklung eines Inserts mit mehreren Wells.	100
Abbildung 50: Kontrolle der Verschweißung im 4-Well-Insert.	101
Abbildung 51: Halterahmen im Objektträgerformat für Zellkulturinserts mit Sensorarrays. ...	102
Abbildung 52: Testaufbau für Funktionstests der Blasenfallen.	103
Abbildung 53: Erste Konzepte der Blasenfalle.	103
Abbildung 54: Entfernen der Luftblasen in der Blasenfalle nach Konzept 1.	105
Abbildung 55: Fähigkeit der Blasenfallen zur Luftblasenentfernung.	105

Abbildung 56: Magnetische Blasenfalle basierend auf den Dimensionen von Konzept 3.....	106
Abbildung 57: Magnetische Blasenfalle, die über acht Würfelmagnete, jeweils vier in den Ecken von Ober- und Unterteil, verbunden wird.	107
Abbildung 58: MBR im Objektträgerformat.....	108
Abbildung 59: Fluidischer Chip mit austauschbaren Modulen.....	110
Abbildung 60: Modulare Varianten magnetischer MBR.....	111
Abbildung 61: Kompakter MBR mit integrierter Blasenfalle.....	111
Abbildung 62: Finale Versionen der Bioreaktoren.....	112
Abbildung 63: Darstellung eines Versuchsaufbaus zur kontrollierten Entfernung einer Luftblase (roter Pfeil) durch die Blasenfalle.....	113
Abbildung 64: Statische Kultivierung für 1 h und danach mikrofluidische Kultivierung.	113
Abbildung 65: Konzept einer regelbaren Plattform.	114
Abbildung 66: Vorgehen bei der Datenauswertung mit VisiSens ScientificCal bzw. mit zusätzlichem Live MITOS-Plug-in.	115
Abbildung 67: Auswertung mit CellProfiler™.....	117
Abbildung 68: Optimierte CellProfiler™-Pipeline.....	118
Abbildung 69: Vergleich verschiedener Auswertemethoden am Beispiel von Versuch 1186.	119
Abbildung 70: Sauerstoffmessung in 500 µm Sensorarrays	121
Abbildung 71: Exemplarische Daten von 1,5 x 10 ⁶ HepG2-Zellen in Sensorarrays.....	122
Abbildung 72: Langsameres Sinken der Sauerstoffkonzentration mit geringerer Zellzahl.....	122
Abbildung 73: Verschiedene Zellzahlen der P19-Zellen in PC-Mikrokavitäten.	124
Abbildung 74: Lichtmikroskopie der P19-Zellen in verschiedenen (Sensor-)Arrays zu Beginn der Differenzierung und nach vier Tagen	125
Abbildung 75: Sauerstoffmessung im Sensorarray 1054 im Zeitraum von 48 bis 96 Stunden .	126
Abbildung 76: Kardiomyozyten in (Sensor-)Arrays.	127
Abbildung 77: Reaggregierte Kardiomyozyten in Sensorarrays	128
Abbildung 78: Zeitserie des intrazellulären Calciumsignals	129
Abbildung 79: Sauerstoffmessung der Kardiomyozyten in Sensorarrays.	129
Abbildung 80: Unterschiedliche Zellzahlen im Vergleich zu den vorhandenen Zellaggregaten.	130
Abbildung 81: Einfluss von Isoprenalin auf Kardiomyozyten-Aggregate.....	131
Abbildung 82: Kontraktionen vor und nach der Behandlung mit Isoprenalin.	131
Abbildung 83: Exemplarische Daten von Hela- bzw. HepG2-Zellen.	132
Abbildung 84: Grundsätzlicher Ablauf des angepassten 3D Mito Stress Tests.	133
Abbildung 85: Darstellung der verschiedenen Zellzahlen und Kultivierungsmethoden.	134

Abbildung 86: Kontrollversuch mit HepG2-Zellen mit einem nicht aussagekräftigen Ergebnis.	134
Abbildung 87: Exemplarische Darstellung eines Mito Stress Tests mit HepG2-Medium als Kontrolle.....	136
Abbildung 88: Änderung der Sauerstoffsättigung während eines Kontroll-Mito Stress Tests.	137
Abbildung 89: Mito Stress Test mit Mitoxantron.....	138
Abbildung 90: Mito Stress Test mit Doxorubicin.....	139
Abbildung 91: Änderung der relativen Sauerstoffsättigung nach Zugabe der Testsubstanzen.	140
Abbildung 92: Für Mito Stress Tests verwendete Kardiomyozyten-Aggregate.	141
Abbildung 93: Vergleich verschiedener Konzentrationen der Referenzsubstanzen.....	142
Abbildung 94 Einfluss von 0,01 μM (Versuch 1215.1) bzw. 0,04 μM (Versuch 1214.3) Isoprenalin auf Kardiomyozyten-Aggregate.	143
Abbildung 95: Mito Complex Assay mit Wasser als Kontrolle bzw. Antimycin A als Testsubstanz.	144
Abbildung 96: Darstellung eines Mito Stress Tests mit den Mittelwerten mehrerer Datenpunkte	145
Abbildung 97: Optimierung der Auswertung durch Neueinteilung der Bereiche.	146
Abbildung 98: Statische und fluidische Zellkultur in Sensorarrays.....	146
Abbildung 99: Messung der relativen Sauerstoffkonzentration nach Zugabe von 10 mg/ml Natriumsulfit.	147
Abbildung 100: Kultivierung von HepG2-Zellen in 30°-Sensorarrays über 72 Stunden.....	148
Abbildung 101: Übersicht möglicher Oberflächenmodifikationen ausgehend von einer Hydroxylierung der Mikrokavitäten.....	151
Abbildung 102: Bindung von fluorierten Metall-Porphyrinen an Thiol-funktionalisierte Polymeroberflächen über die <i>para</i> -Fluor-Thiol-Reaktion.	154
Abbildung 103: Epoxy-funktionalisierte Oberflächen und Möglichkeit der Bindung von Thiol- oder Amin-funktionalisierten Fluorophoren.....	155
Abbildung 104: Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Reaktion.....	155
Abbildung 105: Interpretation des Mito Complex Assays.....	170
Abbildung 106: Zusammenfassung der Sauerstoffgradienten-Messung während der Aggregation von HepG2-Zellen in Sensorarray.	172

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich ausgewählter Parameter in 2D- und 3D-Zellkulturen	12
Tabelle 2: Übersicht über verschiedene Gerüststrukturen für die 3D-Zellkultur.....	13
Tabelle 3: Genäherte Faktoren zum Umrechnen der gegebenen Einheit	24
Tabelle 4: Sauerstoffkonzentrationen in verschiedenen Geweben <i>in vivo</i>	25
Tabelle 5: Verbrauchsmaterial	35
Tabelle 6: Chemikalien für allgemeine Zellkulturarbeiten sowie Medien/Medienzusätze	36
Tabelle 7: Allgemeine Chemikalien	37
Tabelle 8: Chemikalien für die Tests/Assays (Mito Stress und Mito Complex) sowie Kits.	37
Tabelle 9: Zusammensetzung des HepG2-Mediums.....	38
Tabelle 10: Zusammensetzung des Hela-Mediums.....	38
Tabelle 11: Kardiomyozyten-Medium: RB ⁺ -Medium.	38
Tabelle 12: Zusammensetzung des P19-Expansionsmediums.	38
Tabelle 13: Zusammensetzung des P19-Differenzierungsmediums.	39
Tabelle 14: 1x MAS-Medium.....	39
Tabelle 15: 1x MAS ⁺ -Medium.....	39
Tabelle 16: Übersicht über die verwendeten Zellen/Zelllinien.	40
Tabelle 17: Geräteliste	40
Tabelle 18: Verwendete Software.....	41
Tabelle 19: Verwendete Parameter für die einzelnen Farbstoffe.	50
Tabelle 20: Übersicht über die Leuchtmittel, Anregungswellenlängen, Emissionsbereiche sowie eingesetzten Filter.	51
Tabelle 21: Verwendete Endkonzentrationen der Referenzsubstanzen.....	58
Tabelle 22: Übersicht über die Biokompatibilitätsexperimente.	80
Tabelle 23: Eigenschaften der ersten drei Blasenfallen-Konzepte.	104
Tabelle 24: Die drei Auswertemethoden und deren Vor- und Nachteile.	120
Tabelle 25: Auflistung der Kontrollexperimente mit unterschiedlichen Parametern	136
Tabelle 26: Übersicht über Sauerstoff-sensitive Komplexe.	152

12 Literatur

1. Kojima, A., et al., *Species differences in oxidative metabolism of regorafenib*. Xenobiotica, 2021. **51**(12): p. 1400-1407.
2. Yuan, Y., et al., *Study on In Vitro Metabolism and In Vivo Pharmacokinetics of Beauvericin*. Toxins, 2022. **14**(7): p. 477.
3. Hu, J., et al., *Species Difference in the Metabolism of Mulberrin *in Vitro* and Its Inhibitory Effect on Cytochrome P450 and UDP-Glucuronosyltransferase Enzymes*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2022. **70**(10): p. 669-678.
4. Amunom, I., et al., *Cytochromes P450 catalyze oxidation of α,β -unsaturated aldehydes*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007. **464**(2): p. 187-196.
5. Onakpoya, I.J., C.J. Heneghan, and J.K. Aronson, *Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature*. BMC Med, 2016. **14**(1): p. 10.
6. Waring, M.J., et al., *An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies*. Nat Rev Drug Discov, 2015. **14**(7): p. 475-86.
7. Atienzar, F., et al., *Investigative safety strategies to improve success in drug development*. Journal of Medicines Development Sciences, 2018. **3**(1): p. 2.
8. Shyam, R., L.V.K. Reddy, and A. Palaniappan, *Fabrication and Characterization Techniques of In Vitro 3D Tissue Models*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(3): p. 1912.
9. Edmondson, R., et al., *Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors*. Assay Drug Dev Technol, 2014. **12**(4): p. 207-18.
10. Huh, D., G.A. Hamilton, and D.E. Ingber, *From 3D cell culture to organs-on-chips*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(12): p. 745-54.
11. Tang, H., et al., *Human Organs-on-Chips for Virology*. Trends Microbiol, 2020. **28**(11): p. 934-946.
12. Peniche Silva, C.J., et al., *A New Non-invasive Technique for Measuring 3D-Oxygen Gradients in Wells During Mammalian Cell Culture*. Front Bioeng Biotechnol, 2020. **8**: p. 595.
13. Alva, R., et al., *Supraphysiological Oxygen Levels in Mammalian Cell Culture: Current State and Future Perspectives*. Cells, 2022. **11**(19): p. 3123.
14. Alva, R., et al., *Oxygen toxicity: cellular mechanisms in normobaric hyperoxia*. Cell Biol Toxicol, 2022: p. 1-33.
15. Altmann, B., et al., *The famous versus the inconvenient - or the dawn and the rise of 3D-culture systems*. World J Stem Cells, 2009. **1**(1): p. 43-8.
16. Jensen, C. and Y. Teng, *Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?* Front Mol Biosci, 2020. **7**: p. 33.
17. Duval, K., et al., *Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture*. Physiology (Bethesda), 2017. **32**(4): p. 266-277.
18. Ravi, M., et al., *3D cell culture systems: advantages and applications*. J Cell Physiol, 2015. **230**(1): p. 16-26.
19. Baker, B.M. and C.S. Chen, *Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 13): p. 3015-24.
20. Lv, D., et al., *Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery*. Oncol Lett, 2017. **14**(6): p. 6999-7010.
21. Badr-Eldin, S.M., et al., *Three-Dimensional In Vitro Cell Culture Models for Efficient Drug Discovery: Progress So Far and Future Prospects*. Pharmaceuticals (Basel), 2022. **15**(8): p. 926.
22. Raitanen, J., et al., *Comparison of Radiation Response between 2D and 3D Cell Culture Models of Different Human Cancer Cell Lines*. Cells, 2023. **12**(3): p. 360.
23. Bell, C.C., et al., *Comparison of Hepatic 2D Sandwich Cultures and 3D Spheroids for Long-term Toxicity Applications: A Multicenter Study*. Toxicol Sci, 2018. **162**(2): p. 655-666.
24. Imamura, Y., et al., *Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer*. Oncology Reports, 2015. **33**(4): p. 1837-1843.

25. van der Stel, W., et al., *Multiparametric assessment of mitochondrial respiratory inhibition in HepG2 and RPTEC/TERT1 cells using a panel of mitochondrial targeting agrochemicals*. Arch Toxicol, 2020. **94**(8): p. 2707-2729.
26. Yun, C., S.H. Kim, and Y.-S. Jung, *Current Research Trends in the Application of In Vitro Three-Dimensional Models of Liver Cells*. Pharmaceutics, 2022. **15**(1): p. 54.
27. Yamada, K.M., A.D. Doyle, and J. Lu, *Cell–3D matrix interactions: recent advances and opportunities*. Trends in Cell Biology, 2022. **32**(10): p. 883-895.
28. Kapalczyńska, M., et al., *2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures*. Archives of Medical Science, 2016.
29. Habanjar, O., et al., *3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(22): p. 12200.
30. Altmann, B., et al., *The three-dimensional cultivation of the carcinoma cell line HepG2 in a perfused chip system leads to a more differentiated phenotype of the cells compared to monolayer culture*. Biomedical Materials, 2008. **3**(3): p. 034120.
31. Du, M., et al., *Regulation of human mesenchymal stem cells differentiation into chondrocytes in extracellular matrix-based hydrogel scaffolds*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014. **114**: p. 316-23.
32. Geraili, A., et al., *Controlling Differentiation of Stem Cells for Developing Personalized Organ-on-Chip Platforms*. Adv Healthc Mater, 2018. **7**(2).
33. Olmer, R., et al., *Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Functional Endothelial Cells in Scalable Suspension Culture*. Stem Cell Reports, 2018. **10**(5): p. 1657-1672.
34. Enomoto, J., et al., *Development of a 3D Cell Culture System Using Amphiphilic Polydepsipeptides and Its Application to Hepatic Differentiation*. ACS Applied Bio Materials, 2021. **4**(9): p. 7290-7299.
35. Langhans, S.A., *Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning*. Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 6.
36. Agarwal, T., G.H. Narayana, and I. Banerjee, *Keratinocytes are mechanoresponsive to the microflow-induced shear stress*. Cytoskeleton (Hoboken), 2019. **76**(2): p. 209-218.
37. Ahmed, S., et al., *New generation of bioreactors that advance extracellular matrix modelling and tissue engineering*. Biotechnol Lett, 2019. **41**(1): p. 1-25.
38. Theocharis, A.D., et al., *Extracellular matrix structure*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. **97**: p. 4-27.
39. Huang, X., et al., *Current Advances in 3D Dynamic Cell Culture Systems*. Gels, 2022. **8**(12): p. 829.
40. Ginestra, P., S. Pandini, and E. Ceretti, *Hybrid multi-layered scaffolds produced via grain extrusion and electrospinning for 3D cell culture tests*. Rapid Prototyping Journal, 2019. **26**(3): p. 593-602.
41. Terrell, J.A., et al., *From cells-on-a-chip to organs-on-a-chip: scaffolding materials for 3D cell culture in microfluidics*. J Mater Chem B, 2020. **8**(31): p. 6667-6685.
42. Anthon, S.G. and K.P. Valente, *Vascularization Strategies in 3D Cell Culture Models: From Scaffold-Free Models to 3D Bioprinting*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(23): p. 14582.
43. Xin, S., et al., *Clickable PEG hydrogel microspheres as building blocks for 3D bioprinting*. Biomater Sci, 2019. **7**(3): p. 1179-1187.
44. Ze, Y., et al., *Biodegradable Inks in Indirect Three-Dimensional Bioprinting for Tissue Vascularization*. Front Bioeng Biotechnol, 2022. **10**: p. 856398.
45. Zhang, Y.S., et al., *Bioprinting 3D microfibrinous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip*. Biomaterials, 2016. **110**: p. 45-59.
46. Chen, X.K. and T.J. Walters, *Muscle-derived decellularised extracellular matrix improves functional recovery in a rat latissimus dorsi muscle defect model*. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2013. **66**(12): p. 1750-8.
47. Xing, H., et al., *Extracellular matrix-derived biomaterials in engineering cell function*. Biotechnol Adv, 2020. **42**: p. 107421.

48. Rameshbabu, A.P., et al., *Silk Sponges Ornamented with a Placenta-Derived Extracellular Matrix Augment Full-Thickness Cutaneous Wound Healing by Stimulating Neovascularization and Cellular Migration*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018. **10**(20): p. 16977-16991.
49. Choi, J.S., et al., *Full-Thickness Skin Wound Healing Using Human Placenta-Derived Extracellular Matrix Containing Bioactive Molecules*. Tissue Engineering Part A, 2013. **19**(3-4): p. 329-339.
50. Wang, N., et al., *In Vitro Evaluation of Essential Mechanical Properties and Cell Behaviors of a Novel Poly(lactic-co-Glycolic Acid) (PLGA)-Based Tubular Scaffold for Small-Diameter Vascular Tissue Engineering*. Polymers, 2017. **9**(12): p. 318.
51. Milovac, D., et al., *PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: morphology, mechanical properties and bioactivity*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014. **34**: p. 437-45.
52. Bhise, N.S., et al., *A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids*. Biofabrication, 2016. **8**(1): p. 014101.
53. Cui, J., et al., *Multicellular Co-Culture in Three-Dimensional Gelatin Methacryloyl Hydrogels for Liver Tissue Engineering*. Molecules, 2019. **24**(9).
54. Ghiaseddin, A., et al., *Cell laden hydrogel construct on-a-chip for mimicry of cardiac tissue in-vitro study*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **484**(2): p. 225-230.
55. Gerecht, S., et al., *Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(27): p. 11298-11303.
56. Burdick, A., Jason, L. Mauck, Robert, and S. Gerecht, *To Serve and Protect: Hydrogels to Improve Stem Cell-Based Therapies*. Cell Stem Cell, 2016. **18**(1): p. 13-15.
57. Yin, Q., et al., *Comparison of senescence-related changes between three- and two-dimensional cultured adipose-derived mesenchymal stem cells*. Stem Cell Research & Therapy, 2020. **11**(1).
58. Aizawa, M., T. Matsuura, and Z. Zhuang, *Syntheses of single-crystal apatite particles with preferred orientation to the a- and c-axes as models of hard tissue and their applications*. Biol Pharm Bull, 2013. **36**(11): p. 1654-61.
59. Allenby, M.C., et al., *Ceramic Hollow Fibre Constructs for Continuous Perfusion and Cell Harvest from 3D Hematopoietic Organoids*. Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 6230214.
60. Kenar, H., et al., *A 3D aligned microfibrinous myocardial tissue construct cultured under transient perfusion*. Biomaterials, 2011. **32**(23): p. 5320-9.
61. Kim, J.H., et al., *A Microfluidic Chip Embracing a Nanofiber Scaffold for 3D Cell Culture and Real-Time Monitoring*. Nanomaterials (Basel), 2019. **9**(4).
62. Shen, H., et al., *Recent Advances in Three-Dimensional Multicellular Spheroid Culture and Future Development*. Micromachines (Basel), 2021. **12**(1): p. 96.
63. Robinson, E.E., et al., *$\alpha 5 \beta 1$ integrin mediates strong tissue cohesion*. Journal of Cell Science, 2003. **116**(2): p. 377-386.
64. Casey, R.C., et al., *$\beta 1$ -Integrins Regulate the Formation and Adhesion of Ovarian Carcinoma Multicellular Spheroids*. The American Journal of Pathology, 2001. **159**(6): p. 2071-2080.
65. Lin, R.-Z., et al., *Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and $\beta 1$ -integrin*. Cell and Tissue Research, 2006. **324**(3): p. 411-422.
66. Harrison, R.G., *The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement*. Journal of Experimental Zoology, 1910. **9**(4): p. 787-846.
67. Kelm, J.M., et al., *Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types*. Biotechnology and Bioengineering, 2003. **83**(2): p. 173-180.
68. Kurosawa, H., *Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells*. J Biosci Bioeng, 2007. **103**(5): p. 389-98.
69. Breslin, S. and L. O'Driscoll, *Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery*. Drug Discovery Today, 2013. **18**(5-6): p. 240-249.
70. Tung, Y.-C., et al., *High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array*. The Analyst, 2011. **136**(3): p. 473-478.
71. Gheytauchi, E., et al., *Morphological and molecular characteristics of spheroid formation in HT-29 and Caco-2 colorectal cancer cell lines*. Cancer Cell International, 2021. **21**(1).

72. Amaral, R.L.F., et al., *Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening*. *Front Physiol*, 2017. **8**: p. 605.
73. Štampar, M., et al., *Development of in vitro 3D cell model from hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line and its application for genotoxicity testing*. *Archives of Toxicology*, 2019. **93**(11): p. 3321-3333.
74. Gronert, A., et al., *Effect of HepG2 cell 3D cultivation on the metabolism of the anabolic androgenic steroid metandienone*. *Drug Testing and Analysis*, 2023.
75. Ruland, A., et al., *Amphiphilic Copolymers for Versatile, Facile, and In Situ Tunable Surface Biofunctionalization*. *Adv Mater*, 2021. **33**(42): p. e2102489.
76. Park, C.G., et al., *Integration of Bioinspired Fibrous Strands with 3D Spheroids for Environmental Hazard Monitoring*. *Small*, 2022. **18**(22): p. 2200757.
77. Cox, B., et al., *Setup of human liver-chips integrating 3D models, microwells and a standardized microfluidic platform as proof-of-concept study to support drug evaluation*. *Biomater Biosyst*, 2022. **7**: p. 100054.
78. Souza, G.R., et al., *Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation*. *Nature Nanotechnology*, 2010. **5**(4): p. 291-296.
79. Ho, V.H.B., et al., *Manipulating Magnetic 3D Spheroids in Hanging Drops for Applications in Tissue Engineering and Drug Screening*. *Advanced Healthcare Materials*, 2013. **2**(11): p. 1430-1434.
80. Grün, C., B. Altmann, and E. Gottwald, *Advanced 3D Cell Culture Techniques in Micro-Bioreactors, Part I: A Systematic Analysis of the Literature Published between 2000 and 2020*. *Processes*, 2020. **8**(12): p. 1656.
81. Eicke, D., et al., *Large-scale production of megakaryocytes in microcarrier-supported stirred suspension bioreactors*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 10146.
82. Rebelo, S.P., et al., *Three-dimensional co-culture of human hepatocytes and mesenchymal stem cells: improved functionality in long-term bioreactor cultures*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017. **11**(7): p. 2034-2045.
83. Malhotra, N., *Bioreactors Design, Types, Influencing Factors and Potential Application in Dentistry. A Literature Review*. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2019. **14**(4): p. 351-366.
84. Barrila, J., et al., *Modeling Host-Pathogen Interactions in the Context of the Microenvironment: Three-Dimensional Cell Culture Comes of Age*. *Infect Immun*, 2018. **86**(11).
85. Crabbe, A., et al., *Alveolar epithelium protects macrophages from quorum sensing-induced cytotoxicity in a three-dimensional co-culture model*. *Cell Microbiol*, 2011. **13**(3): p. 469-81.
86. Tevlek, A., et al., *Spheroid Engineering in Microfluidic Devices*. *ACS Omega*, 2023. **8**(4): p. 3630-3649.
87. Moshksayan, K., et al., *Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018. **263**: p. 151-176.
88. Lee, S.H., et al., *Microphysiological Analysis Platform of Pancreatic Islet beta-Cell Spheroids*. *Adv Healthc Mater*, 2018. **7**(2).
89. De Pieri, A., Y. Rochev, and D.I. Zeugolis, *Scaffold-free cell-based tissue engineering therapies: advances, shortfalls and forecast*. *npj Regenerative Medicine*, 2021. **6**(1).
90. Kobayashi, J., et al., *Design of Temperature-Responsive Cell Culture Surfaces for Cell Sheet-Based Regenerative Therapy and 3D Tissue Fabrication*, in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018, Springer Singapore. p. 371-393.
91. Augustyniak, J., et al., *Organoids are promising tools for species-specific in vitro toxicological studies*. *Journal of Applied Toxicology*, 2019. **39**(12): p. 1610-1622.
92. Drakhlis, L., et al., *Human heart-forming organoids recapitulate early heart and foregut development*. *Nature Biotechnology*, 2021. **39**(6): p. 737-746.
93. Drakhlis, L., S.B. Devadas, and R. Zweigerdt, *Generation of heart-forming organoids from human pluripotent stem cells*. *Nat Protoc*, 2021. **16**(12): p. 5652-5672.
94. Gottwald, E., et al., *Chip-based Three-dimensional Cell Culture in Perfused Micro-bioreactors*. *Journal of Visualized Experiments*, 2008(15).

95. Gottwald, E., et al., *A Microcavity Array-Based 3D Model System of the Hematopoietic Stem Cell Niche*. *Methods Mol Biol*, 2019. **2017**: p. 85-95.
96. Nies, C., et al., *A Microcavity Array-Based 4D Cell Culture Platform*. *Bioengineering (Basel)*, 2019. **6**(2): p. 50.
97. Giselsbrecht, S., Gietzelt, T., Gottwald, E., Guber, A., Trautmann, C., Truckenmüller, R., Weibezahn, K.-F., *Microthermoforming as a novel technique for manufacturing scaffolds in tissue engineering*. *IEE Proc. Nanobiotechnol.*, 2004. **151**(4): p. 151-157.
98. Truckenmüller, R., et al., *Thermoforming of film-based biomedical microdevices*. *Adv Mater*, 2011. **23**(11): p. 1311-29.
99. Giselsbrecht, S., et al., *3D tissue culture substrates produced by microthermoforming of pre-processed polymer films*. *Biomedical Microdevices*, 2006. **8**(3): p. 191-199.
100. Giselsbrecht, S., et al., *Microfabrication of Chip-sized Scaffolds for Three-dimensional Cell cultivation*. *Journal of Visualized Experiments*, 2008(15).
101. Narijauskaitė, B., et al., *Polycarbonate as an Elasto-Plastic Material Model for Simulation of the Microstructure Hot Imprint Process*. *Sensors*, 2013. **13**(9): p. 11229-11242.
102. Spohr, R., et al., *Stroke Asymmetry of Tilted Superhydrophobic Ion Track Textures*. *Langmuir*, 2010. **26**(9): p. 6790-6796.
103. Spohr, R., et al., *Controlled fabrication of ion track nanowires and channels*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2010. **268**(6): p. 676-686.
104. Altmann, B., et al., *Advanced 3D Cell Culture Techniques in Micro-Bioreactors, Part II: Systems and Applications*. *Processes*, 2020. **9**(1): p. 21.
105. Leal, F., et al., *A comprehensive overview of advanced dynamic *in vitro* intestinal and hepatic cell culture models*. *Tissue Barriers*, 2023.
106. Mandenius, C.-F., *Conceptual Design of Micro-Bioreactors and Organ-on-Chips for Studies of Cell Cultures*. *Bioengineering*, 2018. **5**(3): p. 56.
107. Cimetta, E., et al., *Micro-bioreactor arrays for controlling cellular environments: design principles for human embryonic stem cell applications*. *Methods*, 2009. **47**(2): p. 81-9.
108. Wen, Y., X. Zhang, and S.T. Yang, *Microplate-reader compatible perfusion microbio reactor array for modular tissue culture and cytotoxicity assays*. *Biotechnol Prog*, 2010. **26**(4): p. 1135-44.
109. Wuchter, P., et al., *Microcavity arrays as an in vitro model system of the bone marrow niche for hematopoietic stem cells*. *Cell Tissue Res*, 2016. **364**(3): p. 573-584.
110. Gruber, P., et al., *Integration and application of optical chemical sensors in microbio reactors*. *Lab Chip*, 2017. **17**(16): p. 2693-2712.
111. Zhang, Y.S., et al., *Multisensor-integrated organs-on-chips platform for automated and continual in situ monitoring of organoid behaviors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017. **114**(12): p. E2293-E2302.
112. Yu, F., et al., *A perfusion incubator liver chip for 3D cell culture with application on chronic hepatotoxicity testing*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1).
113. Huh, D., et al., *Acoustically detectable cellular-level lung injury induced by fluid mechanical stresses in microfluidic airway systems*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. **104**(48): p. 18886-18891.
114. Bekard, I.B., et al., *The effects of shear flow on protein structure and function*. *Biopolymers*, 2011: p. n/a-n/a.
115. Musgrove, H.B., et al., *A Scalable, Modular Degasser for Passive In-Line Removal of Bubbles from Biomicrofluidic Devices*. *Micromachines*, 2023. **14**(2): p. 435.
116. Saalfrank, D., et al., *Incubator-independent cell-culture perfusion platform for continuous long-term microelectrode array electrophysiology and time-lapse imaging*. *Royal Society Open Science*, 2015. **2**(6): p. 150031.
117. Habibey, R., *Incubator-independent perfusion system integrated with microfluidic device for continuous electrophysiology and microscopy readouts*. *Biofabrication*, 2023. **15**(2): p. 024102.

118. van Lintel, H., G. Mernier, and P. Renaud, *High-Throughput Micro-Debubblers for Bubble Removal with Sub-Microliter Dead Volume*. *Micromachines*, 2012. **3**(2): p. 218-224.
119. Liu, C., J.A. Thompson, and H.H. Bau, *A membrane-based, high-efficiency, microfluidic debubbler*. *Lab Chip*, 2011. **11**(9): p. 1688-93.
120. Williams, M.J., et al., *A Low-Cost, Rapidly Integrated Debubbler (RID) Module for Microfluidic Cell Culture Applications*. *Micromachines (Basel)*, 2019. **10**(6).
121. Meng, D.D., J. Kim, and C.-J. Kim, *A degassing plate with hydrophobic bubble capture and distributed venting for microfluidic devices*. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2006. **16**(2): p. 419-424.
122. Dabaghi, M., et al., *Microfluidic blood oxygenators with integrated hollow chambers for enhanced air exchange from all four sides*. *Journal of Membrane Science*, 2020. **596**.
123. Lachaux, J., et al., *A compact integrated microfluidic oxygenator with high gas exchange efficiency and compatibility for long-lasting endothelialization*. *Lab Chip*, 2021. **21**(24): p. 4791-4804.
124. Abbas, M., et al., *Vertebrate cell culture as an experimental approach - limitations and solutions*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 2021. **254**.
125. Keeley, T.P. and G.E. Mann, *Defining Physiological Normoxia for Improved Translation of Cell Physiology to Animal Models and Humans*. *Physiol Rev*, 2019. **99**(1): p. 161-234.
126. Müller-Esterl, W., *Biochemie : Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger*. 3. Aufl. 2018 ed. Springer eBook Collection. 2018, Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
127. Morciano, G., et al., *Comprehensive Analysis of Mitochondrial Dynamics Alterations in Heart Diseases*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023. **24**(4): p. 3414.
128. Qu, K., et al., *Mitochondrial dysfunction in vascular endothelial cells and its role in atherosclerosis*. *Front Physiol*, 2022. **13**: p. 1084604.
129. Sivagurunathan, N., P. Gnanasekaran, and L. Calivarathan, *Mitochondrial Toxicant-Induced Neuronal Apoptosis in Parkinson's Disease: What We Know so Far*. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*, 2023. **Volume 13**: p. 1-13.
130. Zhang, Z., et al., *The impact of oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction on diabetic microvascular complications*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023. **14**: p. 1112363.
131. Liu, Y., et al., *Mitochondrial Dysfunction and Therapeutic Perspectives in Cardiovascular Diseases*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. **23**(24): p. 16053.
132. Tse, H.M., et al., *The Importance of Proper Oxygenation in 3D Culture*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021. **9**: p. 634403.
133. Ganten, D.R., K.; Bichmeier, W.; Epplen, J. T.; Genser, K.; Gossen, M.; Kersten, B.; Lehrach, H.; Oschkinat, H.; Ruiz, P.; Schmieder, P.; Wanker, E.; Nolte, C., *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*. 1 ed, ed. K.R. Detlev Ganten, Walter Birchmeier, Jörg T. Epplen, Klaus Genser, Manfred Gossen, Birgit Kersten, Hans Lehrach, Hartmut Oschkinat, Patrizia Ruiz, Peter Schmieder, Erich Wanker, Christiane Nolte. 2006, Berlin, Heidelberg: Springer.
134. Timpano, S., et al., *Physioxic human cell culture improves viability, metabolism, and mitochondrial morphology while reducing DNA damage*. *The FASEB Journal*, 2019. **33**(4): p. 5716-5728.
135. Carreau, A., et al., *Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia*. *J Cell Mol Med*, 2011. **15**(6): p. 1239-53.
136. Deninger, A.J., et al., *Quantification of regional intrapulmonary oxygen partial pressure evolution during apnea by He-3 MRI*. *Journal of Magnetic Resonance*, 1999. **141**(2): p. 207-216.
137. Morosin, M., et al., *The alveolar to arterial oxygen partial pressure difference is associated with pulmonary diffusing capacity in heart failure patients*. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2016. **233**: p. 1-6.
138. Hamedani, H., et al., *A variability study of regional alveolar oxygen tension measurement in humans using hyperpolarized ³He MRI*. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2013. **70**(6): p. 1557-1566.

139. Hamedani, H., et al., *Vertical gradients in regional alveolar oxygen tension in supine human lung imaged by hyperpolarized ^3He MRI*. NMR in Biomedicine, 2014. **27**(12): p. 1439-1450.
140. Leary, T.S., et al., *Measurement of liver tissue oxygenation after orthotopic liver transplantation using a multiparameter sensor*. Anaesthesia, 2002. **57**(11): p. 1128-1133.
141. Brooks, A.J., et al., *Liver tissue partial pressure of oxygen and carbon dioxide during partial hepatectomy*. British Journal of Anaesthesia, 2004. **92**(5): p. 735-737.
142. Brooks, A.J., et al., *The effect of hepatic vascular inflow occlusion on liver tissue pH, carbon dioxide, and oxygen partial pressures: Defining the optimal clamp/release regime for intermittent portal clamping*. Journal of Surgical Research, 2007. **141**(2): p. 247-251.
143. Fiegl, M., et al., *CXCR4 expression and biologic activity in acute myeloid leukemia are dependent on oxygen partial pressure*. Blood, 2009. **113**(7): p. 1504-1512.
144. Harrison, J.S., et al., *Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers*. Blood, 2002. **99**(1): p. 394-394.
145. Ishikawa, Y. and T. Ito, *Kinetics of hemopoietic stem cells in a hypoxic culture*. Eur J Haematol, 1988. **40**(2): p. 126-9.
146. D'Ippolito, G., et al., *Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MLAMI cells*. Bone, 2006. **39**(3): p. 513-22.
147. Ivanovic, Z., *Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm*. Journal of Cellular Physiology, 2009. **219**(2): p. 271-275.
148. Zauner, A., et al., *Brain Oxygen, CO_2 , pH , and Temperature Monitoring - Evaluation in the Feline Brain*. Neurosurgery, 1995. **37**(6): p. 1168-1176.
149. Niinikoski, J., C. Heughan, and T.K. Hunt, *Oxygen tensions in the aortic wall of normal rabbits*. Atherosclerosis, 1973. **17**(3): p. 353-359.
150. Rivera, B.K., et al., *Real-Time, In Vivo Determination of Dynamic Changes in Lung and Heart Tissue Oxygenation Using EPR Oximetry*, in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2014, Springer New York. p. 81-86.
151. Bjerrum, J.T., M.J. Perko, and B. Beck, *Myocardial oxygen tension during surgical revascularization. A clinical comparison between blood cardioplegia and crystalloid cardioplegia*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2006. **29**(2): p. 181-185.
152. Richardson, R.S., et al., *Human skeletal muscle intracellular oxygenation: the impact of ambient oxygen availability*. Journal of Physiology-London, 2006. **571**(2): p. 415-424.
153. Ikossi, D.G., et al., *Continuous muscle tissue oxygenation in critically injured patients: A prospective observational study*. Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care, 2006. **61**(4): p. 780-788.
154. Bylundfellenius, A.C., et al., *Energy-Metabolism in Relation to Oxygen Partial-Pressure in Human Skeletal-Muscle during Exercise*. Biochemical Journal, 1981. **200**(2): p. 247-255.
155. Wang, W., C.P. Winlove, and C.C. Michel, *Oxygen Partial Pressure in Outer Layers of Skin of Human Finger Nail Folds*. The Journal of Physiology, 2003. **549**(3): p. 855-863.
156. Lin, Y., et al., *Cardioprotective effects of rat adipose-derived stem cells differ under normoxic/physioxic conditions and are associated with paracrine factor secretion*. International Journal of Molecular Medicine, 2020.
157. Metzen, E., et al., *Pericellular PO_2 and O_2 consumption in monolayer cell cultures*. Respiration Physiology, 1995. **100**(2): p. 101-106.
158. Winkler, L.W., *Die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffes*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1888. **21**(2): p. 2843-2854.
159. *Massanalyse: Titrations mit chemischen und physikalischen Indikationen*. Massanalyse. 2017, Berlin, Boston: De Gruyter.
160. Carpenter, J.H., *The Accuracy of the Winkler Method for Dissolved Oxygen Analysis*. Limnology and Oceanography, 1965. **10**(1): p. 135-140.
161. Stetter, J.R. and J. Li, *Amperometric Gas Sensors: A Review*. Chemical Reviews, 2008. **108**(2): p. 352-366.

162. Leland C. Clark, J., et al., *Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography*. Journal of Applied Physiology, 1953. **6**(3): p. 189-193.
163. Wang, X.D. and O.S. Wolfbeis, *Optical methods for sensing and imaging oxygen: materials, spectroscopies and applications*. Chem Soc Rev, 2014. **43**(10): p. 3666-761.
164. Arnoudse, P.B., et al., *Instrumentation for the breath-by-breath determination of oxygen and carbon dioxide based on nondispersive absorption measurements*. Analytical Chemistry, 1992. **64**(2): p. 200-204.
165. Lou, X., et al., *Oxygen measurement by multimode diode lasers employing gas correlation spectroscopy*. Applied Optics, 2009. **48**(5): p. 990-997.
166. Baldini, F., et al., *Absorption-based optical-fibre oxygen sensor*. Sensors and Actuators B: Chemical, 1992. **7**(1): p. 752-757.
167. Wilhelm, S. and O.S. Wolfbeis, *Irreversible sensing of oxygen ingress*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2011. **153**(1): p. 199-204.
168. Wolfbeis, O.S., *Luminescent sensing and imaging of oxygen: fierce competition to the Clark electrode*. Bioessays, 2015. **37**(8): p. 921-8.
169. Wolfbeis, O.S., *Editorial: Probes, Sensors, and Labels: Why is Real Progress Slow?* Angewandte Chemie International Edition, 2013. **52**(38): p. 9864-9865.
170. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3 ed. 2007: Springer New York, NY. XXVI, 954.
171. Klimant, I., V. Meyer, and M. Kühn, *Fiber-optic oxygen microsensors, a new tool in aquatic biology*. Limnology and Oceanography, 1995. **40**(6): p. 1159-1165.
172. Tschiersch, H., et al., *An imaging method for oxygen distribution, respiration and photosynthesis at a microscopic level of resolution*. New Phytol, 2012. **196**(3): p. 926-936.
173. Quaranta, M., S.M. Borisov, and I. Klimant, *Indicators for optical oxygen sensors*. Bioanalytical Reviews, 2012. **4**(2-4): p. 115-157.
174. Zhang, R. and J. Yuan, *Responsive Metal Complex Probes for Time-Gated Luminescence Biosensing and Imaging*. Accounts of Chemical Research, 2020. **53**(7): p. 1316-1329.
175. Amao, Y. and I. Okura, *Optical oxygen sensor devices using metalloporphyrins*. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2009. **13**(11): p. 1111-1122.
176. Papkovsky, D.B., *New Oxygen Sensors and Their Application to Biosensing*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1995. **29**(1-3): p. 213-218.
177. Liebsch, G., et al., *Luminescence Lifetime Imaging of Oxygen, pH, and Carbon Dioxide Distribution Using Optical Sensors*. Applied Spectroscopy, 2000. **54**: p. 548 - 559.
178. PreSens. *Wie funktioniert ein Sauerstoffsensoren?* 2023 [cited 2023 13.03.2023].
179. Kellner, K., et al., *Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor*. Biotechnol Bioeng, 2002. **80**(1): p. 73-83.
180. Babilas, P., et al., *In vivo phosphorescence imaging of pO₂ using planar oxygen sensors*. Microcirculation, 2005. **12**(6): p. 477-87.
181. Tschiersch, H., et al., *Planar Oxygen Sensors for Non Invasive Imaging in Experimental Biology*, in *Microsensors*. 2011, InTech.
182. Westphal, I., et al., *Oxygen mapping: Probing a novel seeding strategy for bone tissue engineering*. Biotechnol Bioeng, 2017. **114**(4): p. 894-902.
183. Eggert, S., et al., *Automated 3D Microphysiometry Facilitates High-Content and Highly Reproducible Oxygen Measurements within 3D Cell Culture Models*. ACS Sens, 2021. **6**(3): p. 1248-1260.
184. Ashokkumar, P., N. Adarsh, and A.S. Klymchenko, *Ratiometric Nanoparticle Probe Based on FRET-Amplified Phosphorescence for Oxygen Sensing with Minimal Phototoxicity*. Small, 2020. **16**(32): p. e2002494.
185. Petrasek, Z., J.M. Bolivar, and B. Nidetzky, *Optimal parameters in variable-velocity scanning luminescence lifetime microscopy*. Microsc Res Tech, 2021. **84**(1): p. 71-78.
186. Petrasek, Z., J.M. Bolivar, and B. Nidetzky, *Confocal Luminescence Lifetime Imaging with Variable Scan Velocity and Its Application to Oxygen Sensing*. Anal Chem, 2016. **88**(21): p. 10736-10743.
187. Agilent *Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit - User Guide*. 2019.

188. Agilent *Using PMP to Measure Mitochondrial ETC Complex Activity in Limited Biomaterials*. 2017.
189. Agilent *Assessing Mitochondrial Respiratory Complexes Using Cells Permeabilized with XF Plasma Membrane Permeabilizer (PMP)*. 2016.
190. Campioni, G., et al., *An Optimized Workflow for the Analysis of Metabolic Fluxes in Cancer Spheroids Using Seahorse Technology*. *Cells*, 2022. **11**(5): p. 866.
191. Blancke Soares, A., et al., *High-resolution spatiotemporal pHe and pO₂ imaging in head and neck and oesophageal carcinoma cells*. *Cancer & Metabolism*, 2021. **9**(1).
192. Haase, A., et al., *Establishment of MHHi001-A-5, a GCaMP6f and RedStar dual reporter human iPSC line for in vitro and in vivo characterization and in situ tracing of iPSC derivatives*. *Stem Cell Res*, 2021. **52**: p. 102206.
193. Ricci Signorini, M.E., et al., *Generation of human induced pluripotent stem cell lines encoding for genetically encoded calcium indicators RCaMP1b and GCaMP6f*. *Stem Cell Res*, 2022. **60**: p. 102697.
194. Roche *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)*. 2020. **Version 12**.
195. Divakaruni, A.S., G.W. Rogers, and A.N. Murphy, *Measuring Mitochondrial Function in Permeabilized Cells Using the Seahorse XF Analyzer or a Clark-Type Oxygen Electrode*. *Curr Protoc Toxicol*, 2014. **60**(1): p. 25 2 1-16.
196. Brunner, E.M., Ullrich, *Nichtparametrische Datenanalyse - Unverbundene Stichproben*. 2 ed. Statistik und ihre Anwendungen. 2013, Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum. XVII, 285.
197. DATAtab. *Online Statistics Calculator: Mann-Whitney U-Test*. 2023 14.03.2023]; Available from: <https://datatab.de/tutorial/mann-whitney-u-test>.
198. DATAtab. *Online Statistics Calculator: Kruskal-Wallis-Test*. 2023 14.03.2023]; Available from: <https://datatab.de/tutorial/kruskal-wallis-test>.
199. Heckel, J., *Entwicklung und Evaluierung mikrothermogeformter, sauerstoffsensitiver Mikrokanalarrays*, in *Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG)*. 2019, Karlsruher Institut für Technologie. p. 67.
200. Pai, V.B. and M.C. Nahata, *Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention*. *Drug Saf*, 2000. **22**(4): p. 263-302.
201. Adams, J.F.E.G., Kenneth George; Holmes-Walker, William Anthony, *Process for the production of biaxially oriented polyethylene terephthalate film*. 1957.
202. Sangkhawasi, M., et al., *Prediction of the Glass Transition Temperature in Polyethylene Terephthalate/Polyethylene Vanillate (PET/PEV) Blends: A Molecular Dynamics Study*. *Polymers*, 2022. **14**(14): p. 2858.
203. Zhang, Y., et al., *Glass Transition Temperature Determination of Poly(ethylene terephthalate) Thin Films Using Reflection–Absorption FTIR*. *Macromolecules*, 2004. **37**(7): p. 2532-2537.
204. DuPont Mylar(R). 2003.
205. Han, Y. and C.B. Roth, *Temperature dependent perylene fluorescence as a probe of local polymer glass transition dynamics*. *Soft Matter*, 2022. **18**(32): p. 6094-6104.
206. Lee, J.W., et al., *Enhancement in the adhesion properties of polycarbonate surfaces through chemical functionalization with organosilicon coupling agents*. *Journal of Materials Science-Materials in Electronics*, 2019. **30**(19): p. 17773-17779.
207. Maidenberg, Y., et al., *Mixed silane monolayers for controlling the surface areal density of click-reactive alkyne groups: a method to assess preferential surface adsorption on flat substrates and a method to verify compositional homogeneity on nanoparticles*. *Langmuir*, 2013. **29**(38): p. 11959-65.
208. Zhou, C., et al., *Luminescent ruthenium(II)-containing metallopolymers with different ligands: synthesis and application as oxygen nanosensor for hypoxia imaging*. *Anal Bioanal Chem*, 2020. **412**(11): p. 2579-2587.
209. Wang, Z., et al., *Covalent attachment of Ru-II phenanthroline complexes to polythionylphosphazenes: The development and evaluation of single-component polymeric oxygen sensors*. *Advanced Functional Materials*, 2002. **12**(6-7): p. 415-419.

210. Tian, N., et al., *Structure-Property Relationship of Red- and Green-Emitting Iridium(III) Complexes with Respect to Their Temperature and Oxygen Sensitivity*. European Journal of Inorganic Chemistry, 2010(30): p. 4875-4885.
211. Roussakis, E., et al., *Bright, "Clickable" Porphyrins for the Visualization of Oxygenation under Ambient Light*. Angew Chem Int Ed Engl, 2015. **54**(49): p. 14728-31.
212. Schaferling, M., *The art of fluorescence imaging with chemical sensors*. Angew Chem Int Ed Engl, 2012. **51**(15): p. 3532-54.
213. Amao, Y., *Probes and polymers for optical sensing of oxygen*. Microchimica Acta, 2003. **143**(1): p. 1-12.
214. Koren, K., S.M. Borisov, and I. Klimant, *Stable optical oxygen sensing materials based on click-coupling of fluorinated platinum(II) and palladium(II) porphyrins-A convenient way to eliminate dye migration and leaching*. Sens Actuators B Chem, 2012. **169**(5): p. 173-181.
215. Klimant, I., et al., *Optical measurement of oxygen and temperature in microscale: strategies and biological applications*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1997. **38**(1-3): p. 29-37.
216. Zelelow, B., et al., *Dual luminophor pressure sensitive paint - II. Lifetime based measurement of pressure and temperature*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2003. **96**(1-2): p. 304-314.
217. Valimaki, H., et al., *Covalent immobilization of luminescent oxygen indicators reduces cytotoxicity*. Biomed Microdevices, 2020. **22**(2): p. 41.
218. Dmitriev, R.I., et al., *Small molecule phosphorescent probes for O(2) imaging in 3D tissue models*. Biomater Sci, 2014. **2**(6): p. 853-866.
219. Koren, K., et al., *Tuning the dynamic range and sensitivity of optical oxygen-sensors by employing differently substituted polystyrene-derivatives*. Sens Actuators B Chem, 2013. **176**(100): p. 344-350.
220. Zirath, H., et al., *Every Breath You Take: Non-invasive Real-Time Oxygen Biosensing in Two- and Three-Dimensional Microfluidic Cell Models*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 815.
221. Delaittre, G. and L. Barner, *The para-fluoro-thiol reaction as an efficient tool in polymer chemistry*. Polymer Chemistry, 2018. **9**(20): p. 2679-2684.
222. Borisov, S.M., P. Lehner, and I. Klimant, *Novel optical trace oxygen sensors based on platinum(II) and palladium(II) complexes with 5,10,15,20-meso-tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-porphyrin covalently immobilized on silica-gel particles*. Anal Chim Acta, 2011. **690**(1): p. 108-15.
223. Dmitriev, R.I., N. O'Donnell, and D.B. Papkovsky, *Metallochelate Coupling of Phosphorescent Pt-Porphyrins to Peptides, Proteins, and Self-Assembling Protein Nanoparticles*. Bioconjug Chem, 2016. **27**(2): p. 439-45.
224. Lo, K.K.W., S.P.Y. Li, and K.Y. Zhang, *Development of luminescent iridium(III) polypyridine complexes as chemical and biological probes*. New Journal of Chemistry, 2011. **35**(2): p. 265-287.
225. Dai, Y., X. Zhang, and F. Xia, *Click Chemistry in Functional Aliphatic Polycarbonates*. Macromol Rapid Commun, 2017. **38**(19): p. 1700357.
226. Nichols, A.J., et al., *Click-assembled, oxygen-sensing nanoconjugates for depth-resolved, near-infrared imaging in a 3D cancer model*. Angew Chem Int Ed Engl, 2014. **53**(14): p. 3671-4.
227. Comandatore, A., et al., *Lactate Dehydrogenase and its clinical significance in pancreatic and thoracic cancers*. Semin Cancer Biol, 2022. **86**(Pt 2): p. 93-100.
228. Chandrasekaran, K., et al., *Apoptosis in HepG2 cells exposed to high glucose*. Toxicology in Vitro, 2010. **24**(2): p. 387-396.
229. Legrand, C., et al., *Lactate-Dehydrogenase (Ldh) Activity of the Number of Dead Cells in the Medium of Cultured Eukaryotic Cells as Marker*. Journal of Biotechnology, 1992. **25**(3): p. 231-243.
230. Allen, M., et al., *Lactate dehydrogenase activity as a rapid and sensitive test for the quantification of cell numbers in vitro*. Clin Mater, 1994. **16**(4): p. 189-94.
231. Kaja, S., et al., *Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes*. Current Protocols in Toxicology, 2017. **72**(1).
232. Baptista, D., et al., *3D Lung-on-Chip Model Based on Biomimetically Microcurved Culture Membranes*. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2022. **8**(6): p. 2684-2699.
233. Huh, D., et al., *Reconstituting organ-level lung functions on a chip*. Science, 2010. **328**(5986): p. 1662-8.

234. Lochovsky, C., S. Yasotharan, and A. Günther, *Bubbles no more: in-plane trapping and removal of bubbles in microfluidic devices*. Lab Chip, 2012. **12**(3): p. 595-601.
235. Onakpoya, I.J., C.J. Heneghan, and J.K. Aronson, *Worldwide withdrawal of medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review and analysis*. Critical Reviews in Toxicology, 2016. **46**(6): p. 477-489.
236. Lamprecht, M.R., D.M. Sabatini, and A.E. Carpenter, *CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis*. Biotechniques, 2007. **42**(1): p. 71-5.
237. Sánchez-Jaramillo, E.A., et al., *Automated Computer-Assisted Image Analysis for the Fast Quantification of Kidney Fibrosis*. Biology, 2022. **11**(8): p. 1227.
238. Turnbull, I.C., et al., *Advancing functional engineered cardiac tissues toward a preclinical model of human myocardium*. The FASEB Journal, 2014. **28**(2): p. 644-654.
239. Abulaiti, M., et al., *Establishment of a heart-on-a-chip microdevice based on human iPS cells for the evaluation of human heart tissue function*. Scientific Reports, 2020. **10**(1).
240. Jonsson, M.K.B., Q.-D. Wang, and B. Becker, *Impedance-Based Detection of Beating Rhythm and Proarrhythmic Effects of Compounds on Stem Cell-Derived Cardiomyocytes*. ASSAY and Drug Development Technologies, 2011. **9**(6): p. 589-599.
241. Marsano, A., et al., *Beating heart on a chip: a novel microfluidic platform to generate functional 3D cardiac microtissues*. Lab on a Chip, 2016. **16**(3): p. 599-610.
242. Fleischer, S., et al., *Comprehensive human stem cell differentiation in a 2D and 3D mode to cardiomyocytes for long-term cultivation and multiparametric monitoring on a multimodal microelectrode array setup*. Biosens Bioelectron, 2019. **126**: p. 624-631.
243. Glicklis, R., J.C. Merchuk, and S. Cohen, *Modeling mass transfer in hepatocyte spheroids via cell viability, spheroid size, and hepatocellular functions*. Biotechnol Bioeng, 2004. **86**(6): p. 672-80.
244. Török, G., et al., *The importance of transporters and cell polarization for the evaluation of human stem cell-derived hepatic cells*. PLOS ONE, 2020. **15**(1): p. e0227751.
245. Steinmetz, J., et al., *Descriptive Proteome Analysis to Investigate Context-Dependent Treatment Responses to OXPHOS Inhibition in Colon Carcinoma Cells Grown as Monolayer and Multicellular Tumor Spheroids*. ACS Omega, 2020. **5**(28): p. 17242-17254.
246. Lee, A.C.K., et al., *Mitochondrial Fuel Dependence on Glutamine Drives Chemo-Resistance in the Cancer Stem Cells of Hepatocellular Carcinoma*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(7): p. 3315.
247. Mdaki, K.S., et al., *Age Related Bioenergetics Profiles in Isolated Rat Cardiomyocytes Using Extracellular Flux Analyses*. PLOS ONE, 2016. **11**(2): p. e0149002.
248. Scott, S.R., et al., *Sex as Biological Variable in Cardiac Mitochondrial Bioenergetic Responses to Acute Stress*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(16): p. 9312.
249. Hoes, M.F., et al., *Iron deficiency impairs contractility of human cardiomyocytes through decreased mitochondrial function*. European Journal of Heart Failure, 2018. **20**(5): p. 910-919.
250. PreSens. *Berechnung der Sauerstoffaufnahme (Oxygen Uptake Rate OUR)*. 2023 [cited 2023 27.02.2023].
251. Pappenreiter, M., et al., *Oxygen Uptake Rate Soft-Sensing via Dynamic $k(L)$ a Computation: Cell Volume and Metabolic Transition Prediction in Mammalian Bioprocesses*. Front Bioeng Biotechnol, 2019. **7**: p. 195.
252. Salabei, J.K., A.A. Gibb, and B.G. Hill, *Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis*. Nature Protocols, 2014. **9**(2): p. 421-438.
253. Ramaiahgari, S.C., et al., *A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies*. Arch Toxicol, 2014. **88**(5): p. 1083-95.
254. Eilenberger, C., et al., *Effect of Spheroidal Age on Sorafenib Diffusivity and Toxicity in a 3D HepG2 Spheroid Model*. Scientific Reports, 2019. **9**(1).
255. Mueller, D., A. Koetemann, and F. Noor, *Organotypic Cultures of Hepg2 Cells for In Vitro Toxicity Studies*. Journal of Bioengineering and Biomedical Sciences, 2011. **01**(S2).

256. Luckert, C., et al., *Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells*. Archives of Toxicology, 2017. **91**(1): p. 393-406.
257. Shah, U.-K., et al., *A three-dimensional in vitro HepG2 cells liver spheroid model for genotoxicity studies*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2018. **825**: p. 51-58.
258. Huang, Y., et al., *Mimicking the Endometrial Cancer Tumor Microenvironment to Reprogram Tumor-Associated Macrophages in Disintegrable Supramolecular Gelatin Hydrogel*. International Journal of Nanomedicine, 2020. **Volume 15**: p. 4625-4637.
259. Schmitz, C., et al., *Studies on oxygen availability and the creation of natural and artificial oxygen gradients in gelatin-methacryloyl hydrogel 3D cell culture*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2022. **16**(11): p. 977-986.
260. Tabesh, H., et al., *Elimination of Induced Hypoxic Regions in Depth of 3D Porous Silk Scaffolds by the Introduction of Channel Configuration*. BioMed Research International, 2022. **2022**: p. 1-12.
261. Schmitz, C., et al., *Corrigendum: Hypoxia Onset in Mesenchymal Stem Cell Spheroids: Monitoring With Hypoxia Reporter Cells*. Front Bioeng Biotechnol, 2022. **10**: p. 954422.
262. Liu, P., et al., *Dissolved oxygen gradient on three dimensionally printed microfluidic platform for studying its effect on fish at three levels: cell, embryo, and larva*. Environmental Science and Pollution Research, 2022. **30**(8): p. 21978-21989.
263. Wesseler, M.F., et al., *Optical 4D oxygen mapping of microperfused tissue models with tunable *in vivo*-like 3D oxygen microenvironments*. Lab on a Chip, 2022. **22**(21): p. 4167-4179.
264. Russell, S., et al., *Metabolic Profiling of healthy and cancerous tissues in 2D and 3D*. Scientific Reports, 2017. **7**(1).
265. Grün, C., et al., *O₂-sensitive microcavity arrays: A new platform for oxygen measurements in 3D cell cultures*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023. **11**: p. 1111316.

13 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Zeit in der ich an dieser Dissertation gearbeitet habe, direkt oder indirekt, unterstützt haben.

Prof. Dr. Eric Gottwald danke ich für die hervorragende Betreuung während meiner Arbeit und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Danke auch für die konstruktiven Gespräche, Diskussionen und das entgegengebrachte Vertrauen. Cordula Nies danke ich für die Hilfe und Unterstützung im Labor und den (wissenschaftlichen) Austausch. Ein weiterer Dank gilt Jana Pfeifer. Insgesamt möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für das gute Arbeitsumfeld bedanken.

Bei der Abteilung Bioprozesstechnik und Biosysteme von Prof. Dr. Matthias Franzreb möchte ich mich für den kollegialen Austausch, das wissenschaftliche Feedback und die gemeinsamen Aktivitäten, insbesondere bei den Palmspring-Abteilungsseminaren, bedanken. Ein besonderer Dank geht an dieser Stelle auch an Jonas Wohlgemuth und Dominik Moosmann für die Unterstützung und die Ratschläge rund um das Thema des 3D-Drucks.

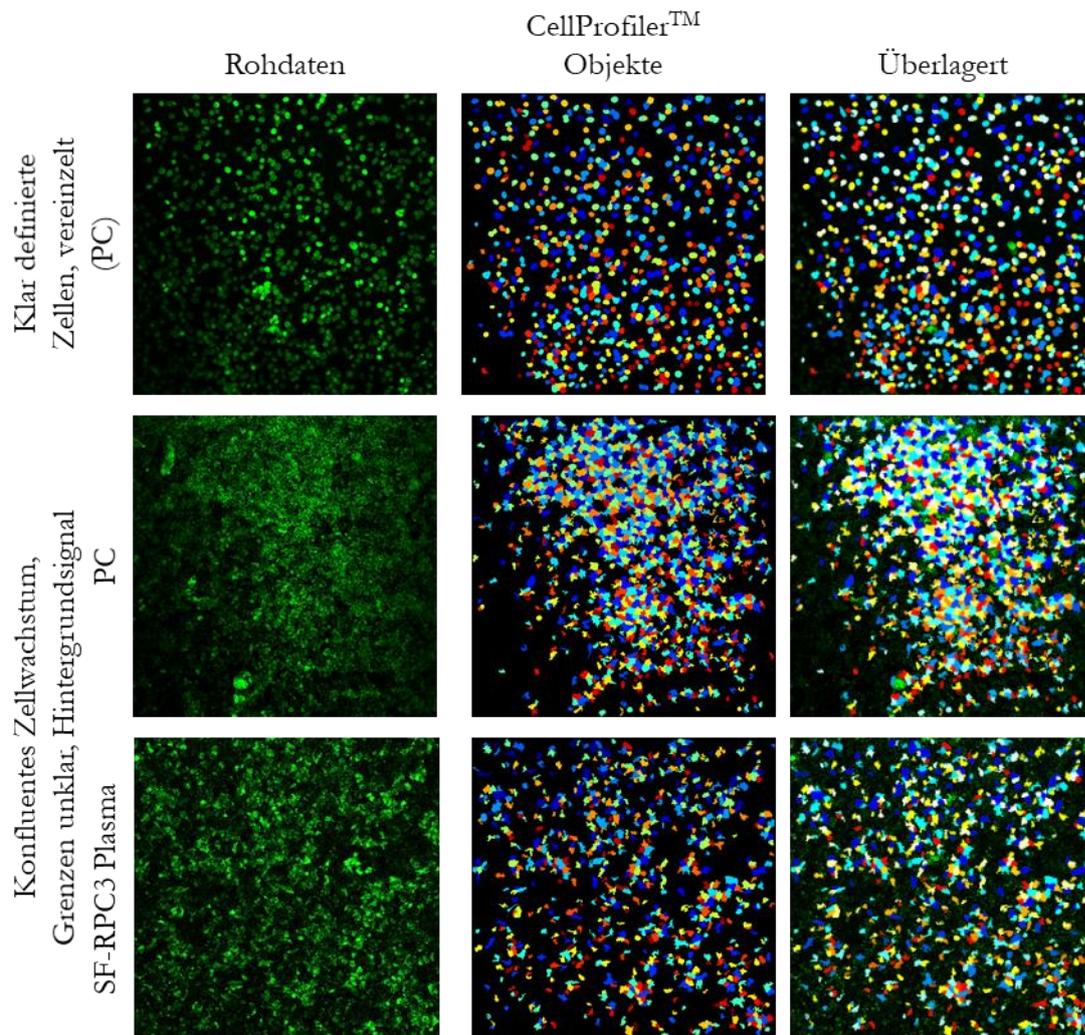
Prof. Dr.-Ing. Alexander Grünberger danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Gregor Liebsch und der PreSens Precision Sensing GmbH danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Prototypen, die für das Projekt unerlässlich waren.

Bei Dr. Robert Zweigerdt und seiner Arbeitsgruppe an der Medizinischen Hochschule Hannover bedanke ich mich für das Bereitstellen der Kardiomyozyten und für die gute Zusammenarbeit.

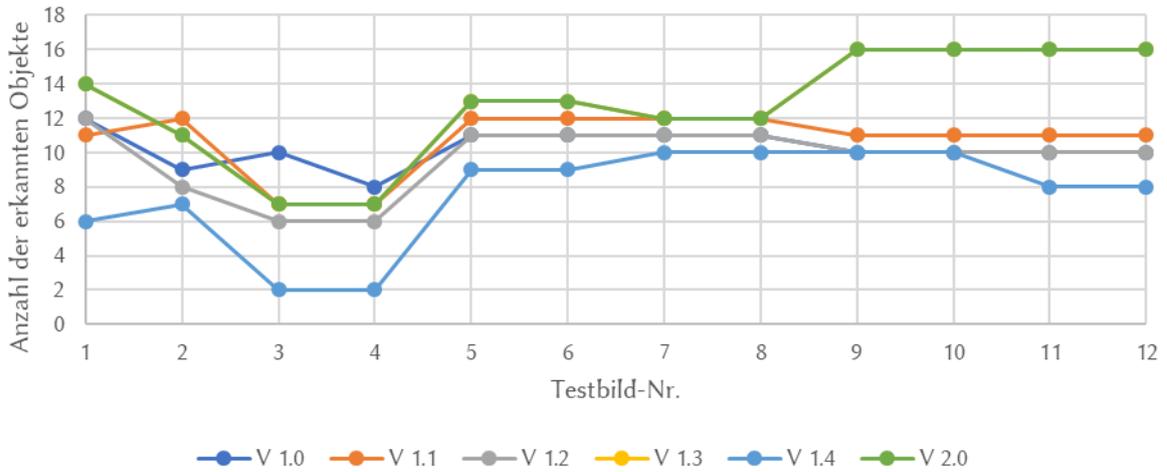
Mein größter Dank geht an meine Familie, insbesondere meine Eltern und Großeltern, die mich stets bei meinen Entscheidungen und meinem Werdegang unterstützt haben. Ganz besonders bedanke ich mich auch bei meiner Frau Jana Grün und meinen beiden Söhnen Johannes und Daniel.

Anhang

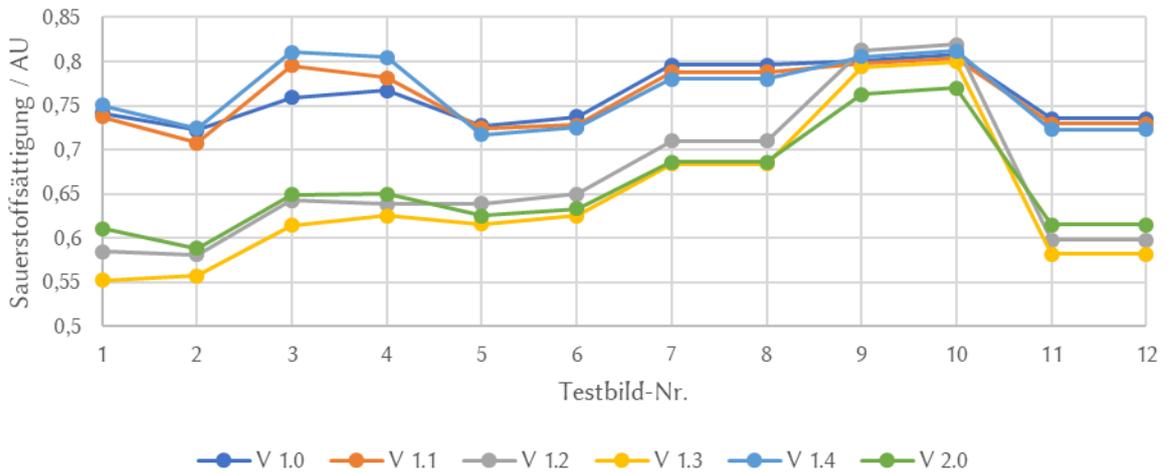


Anhang 1: Darstellung der Auswertung mittels CellProfiler™. Bei geringer Zelldichte und eindeutiger Färbung erkennt die Software die Zellen zuverlässig. Bei konfluent wachsenden Zellen oder mit zu hohem Hintergrundsignal werden nicht alle Zellen als Objekte erkannt.

A) Vergleich verschiedener CellProfiler™ Pipelines



B) Darstellung der Messwerte im Bereich der mittleren Fase



Anhang 2: A) Vergleich der Anzahl von verschiedenen CellProfiler™-Pipelines erkannten Objekte. B) Darstellung der Sauerstoffsättigungen im Bereich der Fase, ermittelt mit verschiedenen Pipelines.