

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie

**Entwicklung eines Lab-on-a-Chip Systems zur zerstörungsfreien Einzelzell-
profilierung potentieller Tumorzellen anhand affinitätsbasierter Wechselwir-
kungen zellspezifischer Oberflächenmarker**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften in der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Solveig Elisabeth Konings, geb. Schmidt

aus Lüdenscheid

2021

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/74580

URN: urn:nbn:de:hbz:464-20210826-104459-6

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. G. Gerken
2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. A. C. Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juni 2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 3

1. Einleitung..... 5

 1.1 Krebs und Metastasierung..... 5

 1.2 Zirkulierende Tumorzellen und Möglichkeiten der Isolation..... 8

 1.3 Das Phänomen des Zell-Rollens 10

 1.4 Grundlagen der Mikrofluidik..... 12

 1.5 Eigenschaften mikrofluidischer Systeme 12

 1.6 Gängige Materialien und Methoden in der Mikrofluidik..... 14

2. Vorarbeiten und Ziel des Promotionsprojektes 16

3. Materialien und Methoden 19

 3.1 Materialien 19

 3.2 Geräte 19

 3.3 Chemikalien und Lösungen 20

 3.4 Reagenzien und Zubehör 20

 3.5 Antikörper 21

 3.6 Verwendete Pufferlösungen 21

 3.7 Software 22

 3.8 Methoden 22

4. Ergebnisse 37

 4.1 Methodenetablierung zur Funktionalisierung und Beschichtung von PMMA 37

 4.2 Überprüfung der Antikörperfunktionalität nach dem Spotting in Abhängigkeit vom Spotting-Puffer 51

 4.3 Methodenetablierung zur Isolierung und Charakterisierung von Zellen anhand zellspezifischer Oberflächenmarker..... 55

 4.4 Analyse des Zell-Rollens auf Antikörper-funktionalisierten Bereichen innerhalb des Lab-on-a-Chip Systems 68

5. Diskussion 74

 5.1 Funktionalisierung von PMMA und zielgenaue Immobilisierung von Proteinen innerhalb des mikrofluidischen Kanals 74

 5.2 Methodenetablierung zur Isolierung und Charakterisierung von Zellen anhand zellspezifischer Oberflächenmarker..... 81

6. Zusammenfassung 90

7. Literaturverzeichnis 91

8. Anhang 97

 8.1 Abkürzungsverzeichnis..... 97

8.2 Danksagung	99
8.3 Lebenslauf	100

1. Einleitung

1.1 Krebs und Metastasierung

Unter dem Begriff Krebs werden alle Erkrankungen zusammengefasst, welche mit einem malignen (bösartigen) Zellwachstum einhergehen. Allen gemeinsam ist das unkontrollierte Wachstum von abnormalen Zellen, welche invasiv in gesundes Gewebe eindringen und es zerstören (pmhdev, 2012; "NCI Dictionary of Cancer Terms," 2017). Im Jahr 2013 erkrankten etwa 482500 Menschen in Deutschland an Krebs, was nahezu einer Verdopplung der Inzidenz seit den 1970er Jahren entspricht. Dabei liegt die Ursache der gestiegenen Neuerkrankungsraten hauptsächlich im veränderten Altersaufbau der Bevölkerung (demografischer Wandel), da bei den meisten Krebsarten die Erkrankungswahrscheinlichkeit mit erhöhtem Alter ansteigt (Robert Koch-Institut, 2016). Aufgrund der demografischen Entwicklung in Deutschland ist für das Jahr 2020 mit 275000 Neuerkrankungen bei Männern und 244000 bei Frauen zu rechnen (Robert Koch-Institut, 2016). Obwohl die auf Krebs zurückzuführenden Sterbefälle aufgrund besserer Präventionsmaßnahmen und neuartiger Therapien immer weiter zurückgehen, ist Krebs nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen immer noch die zweithäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt, 2015). Mit 220 Euro pro Einwohner liegen die Gesundheitsausgaben für Krebs im mittleren Bereich. Wird allerdings die Belastung der Gesellschaft durch den Ausfall von Erwerbstätigen aufgrund von Krebserkrankungen betrachtet, ist der Anteil von 16,7 % enorm (Neubauer & Neubauer, 2012). Diese Zahlen belegen die Nachfrage nach neuen, kostengünstigen Diagnose- und Therapieverfahren. Besonders in den Bereichen der Frühdiagnostik und Prävention besteht großes Forschungspotential, da viele Mechanismen der Krebsentstehung und –verbreitung (Metastasierung) aufgrund ihrer Komplexität bis heute nicht vollständig aufgeklärt sind.

Der Beginn dieses komplexen Prozesses der Kanzerogenese, bei dem genetische Änderungen zu permanenten Veränderungen des Zellzyklus und der Proliferation führen, wird als Initiation bezeichnet. In diesem Stadium kann durchaus noch normale Funktionalität der Zellen vorliegen. Manifestieren sich weitere genetische Veränderungen, welche die normalen Wachstumsprozesse der Zelle außer Kraft setzen und zu unkontrolliertem Zellwachstum führen, wird von dem Stadium der Promotion gesprochen (Hanahan & Weinberg, 2011). Die präneoplastische Läsion

entwickelt sich so über weitere Mutationen zu einem malignen Tumor, welcher durch Invasion des umliegenden Gewebes und Ausbildung einer eigenen Blutversorgung (Angiogenese) gekennzeichnet ist. Dieses Stadium wird Progression (Steigerung) genannt (Varricchio, op. 2004). Eine Darstellung der verschiedenen Stadien und einem Teil der daran beteiligten Prozesse und Faktoren ist in Abbildung 1 zu finden.

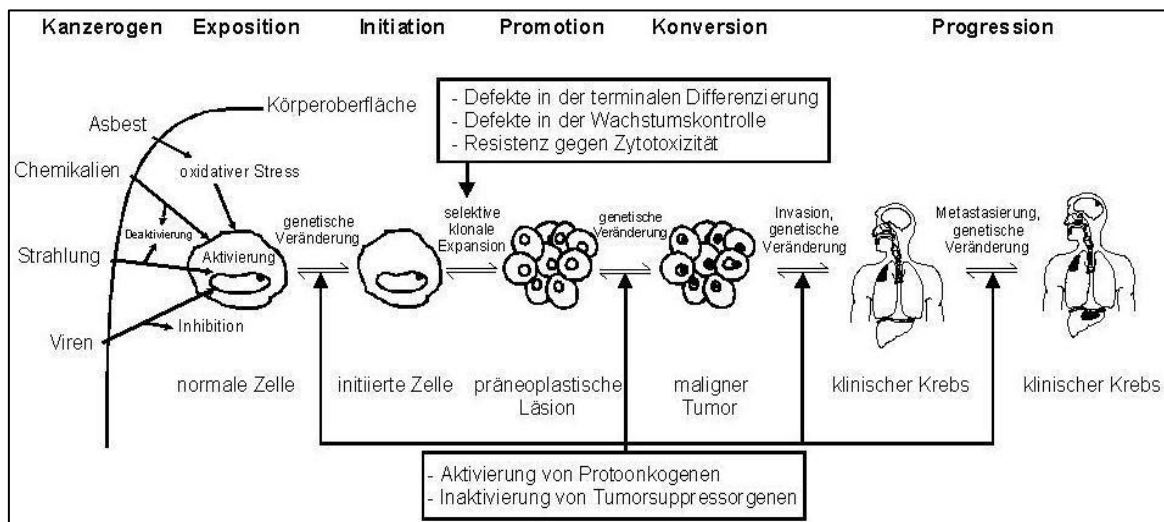


Abbildung 1: Mehrstufenmodell der Kanzerogenese am Beispiel des Bronchialkarzinoms nach (Harris et al., 1990)

Aus dem im Stadium der Progression befindlichen Tumor können sich nachfolgend einzelne Zellen lösen und über Blut- und Lymphgefäße in andere Gewebe eindringen. Dieser Vorgang nennt sich Metastasierung.

In 90% der krebsbedingten Todesfälle ist die Ursache auf Metastasen zurückzuführen (Weigelt, Peterse, & van 't Veer, 2005) und auch die Malignitätsbestimmung eines Tumors erfolgt hauptsächlich durch sein Metastasierungspotential (Krebsinformationsdienst & Krebsforschungszentrum, 2017). Dabei unterteilt sich der Metastasierungsprozess in zwei grundsätzliche Schritte: Zunächst erfolgt die physikalische Streuung der Krebszellen vom Primärtumor weg zu distanten Geweben, gefolgt von der Adaption dieser Zellen an die Umgebung des fremden Gewebes mit erfolgreicher Kolonialisierung, was zur Ausbildung von makroskopischen Tumoren führen kann (Hanahan & Weinberg, 2011). Eine schematische Darstellung des Prozesses zeigt Abbildung 2.

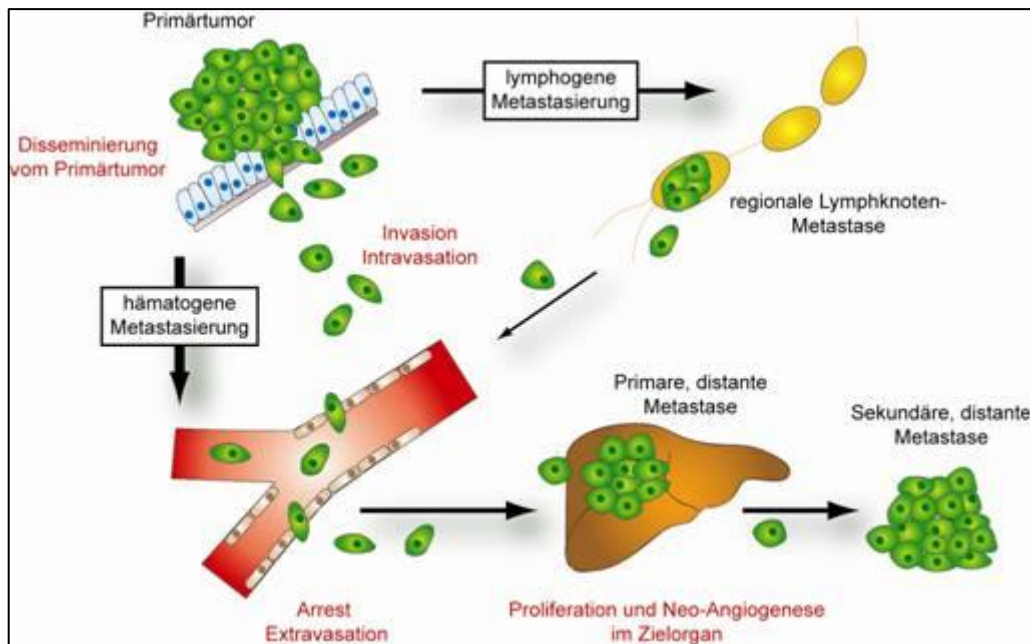


Abbildung 2: Ablauf des Metastasierungsprozesses (Arlt, 2008)

In Abbildung 2 ist zu erkennen, wie der Prozess mit einer lokalen Invasion des Primärtumors in das umliegende Gewebe startet. Im weiteren Verlauf erfolgt eine Intravasation der Krebszellen in die umliegenden Blut- und Lymphgefäße und somit die Verteilung dieser Zellen über das vaskuläre System. Arretieren die Krebszellen in den Kapillaren lokaler und distanter Organe, können sie durch die Gefäßwände in das Parenchym dieser Gewebe einwandern (Extravasation). Daraus resultiert die Bildung von Mikrometastasen, welche sich über Proliferation und Neo-Angiogenese zu einem makroskopischen Tumor entwickeln. Dieser Schritt wird als „Kolonialisierung“ betitelt (Hanahan & Weinberg, 2011; Mehlen & Puisieux, 2006). Dabei ist das Ergebnis des Prozesses von den intrinsischen Eigenschaften der Tumorzelle und der Antwort des Zielgewebes abhängig, wodurch es bei jedem Patienten zu individuellen Reaktionen kommt (Talmadge & Fidler, 2010). Es wurden jedoch bei vielen malignen Tumoren organspezifische Metastasierungsmuster festgestellt (Ribatti, op. 2010). Das bedeutet, dass Primärtumore bevorzugt in bestimmte Organe metastasieren, während andere Organe so gut wie nie von ihnen befallen werden. Diese Beobachtung beschrieb Stephen Paget schon im Jahre 1889 unter dem Titel des „Seed and Soil“ Konzeptes (Paget, 1989). Seiner Hypothese nach kommt es zu einer Metastase, wenn die Tumorzelle („Seed“) eine besonders hohe Affinität zu der Umgebung des betroffenen Organs („Soil“) aufweist. Dabei sind nur einige wenige Zellen, welche es schaffen alle Schritte des Metastasierungsprozesses abzuschließen ohne durch das Immunsystem eliminiert zu

werden, überhaupt zur erfolgreichen Bildung einer Metastase fähig. Dabei wird die Metastase zunächst durch eine einzige proliferierende Zelle gebildet (Talmadge & Fidler, 2010). Diese Eigenschaft erlangen einige Zellen durch eine erhöhte genetische Instabilität, welche in Kombination mit der Darwin'schen Selektion, zu einer Resistenz gegen physiologische Wachstumskontrollen, Kontrollen des Immunsystems, chemotherapeutischer Intervention und umweltbedingten Beschränkungen führt. Somit handelt es sich bei einem Tumor nicht um eine homogene Population von Zellen, sondern er beinhaltet verschiedene Populationen phänotypisch unterschiedlicher Zellen (Welch & Tomasovic, 1985). Zieht man diese Erkenntnisse in Betracht, erklären sich die Schwierigkeiten während einer therapeutischen Intervention, da verschiedene Subpopulationen von Zellen angegriffen werden müssen, welche sich aufgrund ihrer genetischen Instabilität schnell an geänderte Umgebungsvoraussetzungen anpassen können.

1.2 Zirkulierende Tumorzellen und Möglichkeiten der Isolation

Da die Disseminierung von Tumorzellen vom Primärtumor oft über die Blutgefäße erfolgt, sind diese im Blut zirkulierenden Krebszellen (*Circulating Tumor Cells* - CTC) in den Fokus der Wissenschaft geraten. Besonders durch die wenig invasive und kostengünstige Probenentnahme einer Blutprobe („liquid biopsy“) haben sie als potentieller Marker für Diagnose und Verlauf von Erkrankung und Therapie an Interesse gewonnen. Bei metastasierendem Brustkrebs wurde beispielsweise nachgewiesen, dass die Anwesenheit zirkulierender Krebszellen im Blut mit Metastasen, einer schlechten Prognose sowie einem schlechten Ansprechen auf die Therapie korreliert (Alunni-Fabbroni & Sandri, 2010). Dabei können die CTCs nicht als homogene Population angesehen werden, da bei denselben Patienten unterschiedliche Populationen von zirkulierenden Krebszellen gefunden wurden (Nel et al., 2013; Powell et al., 2012). Es sollten also Einzelzelluntersuchungen (*Single-Cell-Profiling*) zur Detektion von organspezifischen Unterschieden durchgeführt werden, um eine Lokalisation des Ursprungsgewebes zu ermöglichen und eventuelle Veränderungen der Zellen während der Therapie zu beobachten (Plaks, Kopman, & Werb, 2013). Die Herausforderung der Analyse der CTC in der Isolation von den anderen Blutzellen besteht in der Heterogenität der Zellen sowie ihrer Seltenheit. Es finden sich Angaben von 1 CTC pro 10^5 - 10^7 mononukleare Zellen des peripheren Blutes (Mints & Souchelnytskyi, 2011) bzw. 1-100 CTC pro mL

Blut (Li, Stratton, Dao, Ritz, & Huang, 2013). Eine häufig angewendete, antigenbasierte Isolationsmethode beruht auf Oberflächenmarkern, welche auf Krebszellen über exprimiert werden und auf den anderen Blutzellen nicht vorkommen. Dazu zählt bei den zirkulierenden Krebszellen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) und intrazelluläre Zytokeratine. Die einzigen bislang von der FDA (U.S. Food and Drug Administration) zugelassenen Systeme zur Isolierung und Analyse von CTCs beruhen auf dieser Methode. Das halb-automatisierte CellSearch® System (Veridex, Warren, NJ, USA) sowie der *in-vivo* Zellkollektor GILUPI® beruhen beide auf der Isolierung der zirkulierenden Tumorzellen von anderen Blutzellen über Oberflächenantigene, der Differenzierung über intrazelluläre Zytokeratine (CellSearch®: CD45-, EpCAM+, und CK 8+, 18+, und/oder 19+; GILUPI®: EpCAM+) und der anschließenden Fluoreszenzfärbung und Zählung dieser Zellen ("CELLSEARCH® | Product and Systems Overview,"; Gasirowski, Dyszkiewicz, & Zielinski, 2017). Die Schwierigkeiten bei der Antikörper-basierten Anreicherung ergeben sich, da gezeigt wurde, dass nicht alle zirkulierenden Krebszellen diese Marker exprimieren. Dies kann zu falsch negativen Ergebnissen in der Detektion führen (Mints & Souchelnytskyi, 2011). Weitere Nachteile dieser Methoden sind, dass die Viabilität der Zellen beeinflusst werden kann, die gefundenen CTCs häufig als homogene Population angesehen werden und durch die Färbung nur eine begrenzte Anzahl an immunologischen Markern getestet werden kann (Pantel & Alix-Panabières, 2012). Andere Separationsmethoden beruhen auf physikalischen Eigenschaften wie der Größe (ISET- *isolation by size of epithelial tumour cells*) oder Dichte (Dichtegradientenzentrifugation). Obwohl zirkulierende Krebszellen meist von epithelialen Geweben abstammen und somit größer als andere Blutzellen sein sollten (Vona et al., 2000), wurden doch starke Variationen in ihrer Größe festgestellt (Marrinucci et al., 2007). Somit ergibt sich die Gefahr einer Überschneidung in den Größenverhältnissen von CTCs und Leukozyten. Vergleichsstudien von CellSearch® mit größenbasierten Isolationsmethoden haben ebenfalls schon Diskrepanzen zwischen den gefundenen Mengen an CTC aufgezeigt. Diese Diskrepanzen waren hauptsächlich auf die unterschiedlichen Tumorarten der Patienten zurückzuführen (Farace et al., 2011). Dies bestätigt die Hypothese, dass es sich bei zirkulierenden Tumorzellen um eine heterogene Gruppe von Zellen handelt (Pantel & Alix-Panabières, 2012), welche auch möglichst einzeln untersucht

werden sollten, um genauere Informationen zu ihrem Verhalten während einer Therapie, ihrer genauen Komposition und Heterogenität zu erhalten (Yu, Stott, Toner, Maheswaran, & Haber, 2011).

1.3 Das Phänomen des Zell-Rollens

Der Mechanismus des Zell-Rollens an den Gefäßwänden ist ein physiologischer Vorgang von Blutzellen während Inflammation, Lymphozyten-Homing und Metastasierung. Vermittelt über Adhäsionsproteine des Endothels wie Selektine und Integrine binden die Blutzellen zunächst ans Endothel (*initial tethering*), um dann nach einer Phase des Rollens über das Endothel (*transient rolling adhesion*) dort fest zu binden (*firm adhesion*). Anschließend gelangen die Zellen per transendothelialer Migration zu ihrem Zielgewebe (Chang, Tees, & Hammer, 2000).

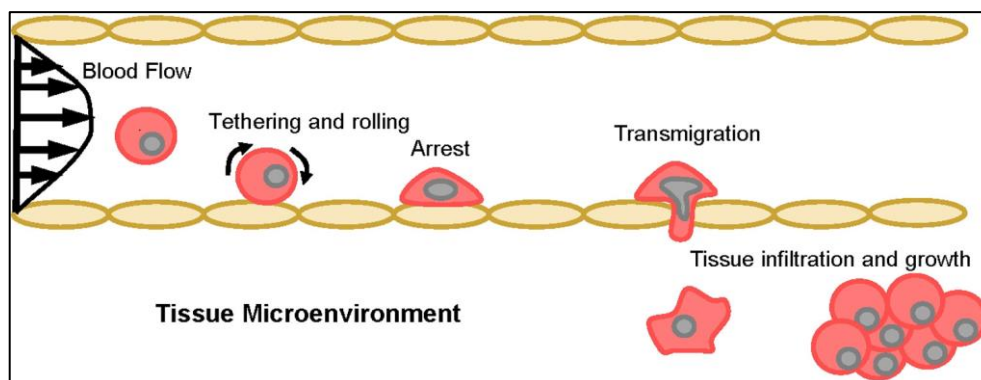


Abbildung 3: Stadien des Zell-Rollens (Burdick et al., 2012)

Zell-Rollen wird dabei in der Literatur oft als 50 %ige Reduktion der Geschwindigkeit im Vergleich zum freien Fluss definiert (Tees, Chang, Rodgers, & Hammer, 2002). Für ein stabiles Rollverhalten muss ein Gleichgewicht zwischen den Adhäsionsbindungen an der Anströmkante und dem Lösen der abschließenden Bindungen der Zellen vorliegen (McEver & Zhu, 2010). Dabei spielt der Scherstress (*shear stress*) [dyn/cm^2], dem die Zelle ausgesetzt ist, eine große Rolle. Dieser ergibt sich aus dem Produkt von Scherrate (*shear rate*) und Viskosität, wobei die Scherrate die Veränderung der Geschwindigkeit in Abhängigkeit vom Abstand zur Gefäßwand innerhalb einer laminaren Strömung beschreibt [s^{-1}] (McEver & Zhu, 2010). Eine schematische Darstellung des zellulären Rollverhaltens auf Antikörper-beschichteten Oberflächen zeigt Abb. 4.

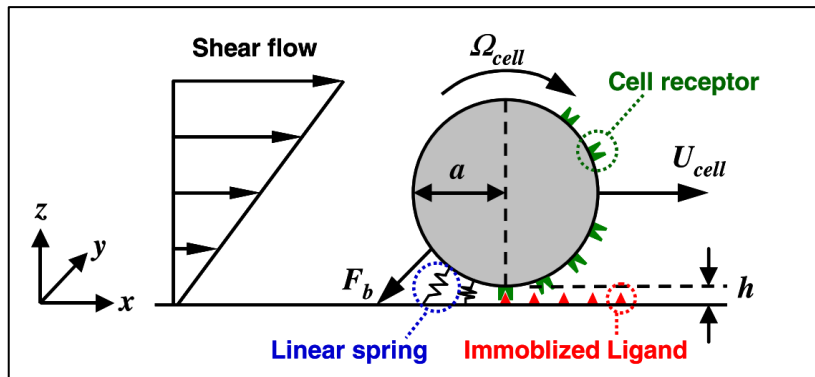


Abbildung 4: Schematische Darstellung des zellulären Rollverhaltens unter hydrodynamischem Scherstress in einem Antikörper-beschichteten mikrofluidischen Kanal. a beschreibt den Zellradius und h die Distanz zwischen Zelle und Kanaloberfläche. Die Rezeptor-Liganden Bindungen bewirken eine Bindungskraft F_b auf die rollende Zelle, welche der translationalen Geschwindigkeit U_{cell} und der Winkelgeschwindigkeit Ω_{cell} ausgesetzt ist. (Cheung et al., 2011).

Somit müssen die Stadien des Zell-Rollens immer im Zusammenhang mit dem beaufschlagten Scherstress betrachtet werden, da nicht bei jeder Fließgeschwindigkeit eine Liganden-Rezeptor Bindung möglich ist (Cheung et al., 2011). Bei der Betrachtung verschiedener Stadiendiagramme fällt auf, dass die Bereiche, in denen *rolling adhesion* beobachtet wurde, relativ schmal sind (Abb. 5).

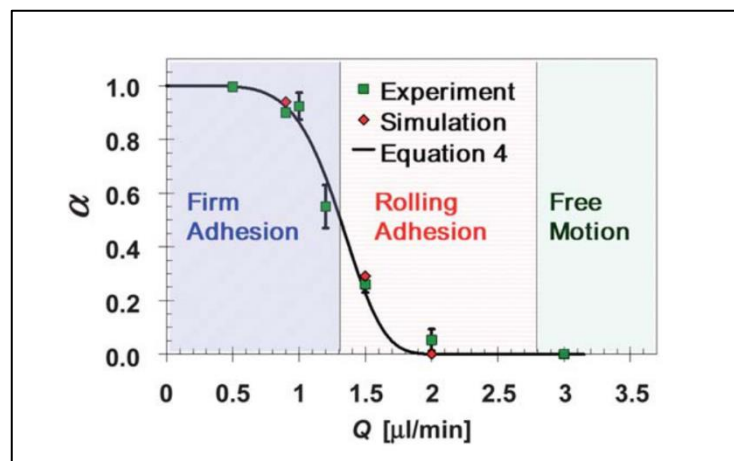


Abbildung 5: Gemessene und kalkulierte Fangrate EpCAM-exprimierender MDA-MB-231 Zellen in einem anti-EpCAM beschichteten mikrofluidischen Kanal als eine Funktion der Scherrate (Zheng, Cheung, Schroeder, Jiang, & Zohar, 2011)

Des Weiteren fanden Chang et al. bei der Untersuchung unterschiedlicher Antigen/Antikörper-Paare heraus, dass nur einige Kombinationen ein Rollen hervorriefen. Andere Paare führten zu einer festen Adhäsion und wieder andere zu gar keiner Interaktion (Chang et al., 2000), was eine generelle Aussage zum Rollverhalten unterschiedlicher Zellen schwierig macht. Und obwohl die Metastasierung durch zirkulierende Tumorzellen nicht gänzlich verstanden ist, besteht die Hypothese, dass diese bestimmte Eigenschaften von Leukozyten imitieren, um zunächst im Blut nicht als „fremde“ Zellen erkannt zu werden und dann via Extrava-

sion in das umliegende Gewebe gelangen. Verschiedene Studien unterschiedlicher Entitäten wiesen CTCs nach, welche die Eigenschaften zum Rollen und der Adhäsion an Endothelgewebe besaßen (Barthel, Gavino, Descheny, & Dimitroff, 2007).

1.4 Grundlagen der Mikrofluidik

Die Mikrofluidik beschreibt eine Technologie, bei der kleinste Mengen an Flüssigkeiten (10^{-9} - 10^{-18} L) in Kanälen im Mikrometerbereich analysiert, prozessiert oder manipuliert werden (Whitesides, 2006). Dabei bieten mikrofluidische Systeme durch die Verwendung sehr kleiner Probevolumina, welche mit hoher Auflösung und Sensitivität untersucht werden können, einige Vorteile. Dazu gehören, unter anderem, kurze Analysezeiten, geringe Kosten in der Herstellung des Analysesystems sowie für Reagenzien und Analyten sowie eine erhöhte Separationseffizienz. Dadurch haben mikrofluidische Systeme besonders in den Bereichen von molekularen Analysen, Bioabwehr, Molekularbiologie, klinischer Diagnostik und Mikroelektronik an Bedeutung gewonnen (Dixit & Kaushik, 2016; Whitesides, 2006). Viele Studien beschreiben mikrofluidische Methoden, die als *Proof of concept* (Überprüfung des Konzeptes) Experimente zum Nachweis der Durchführbarkeit einer neuen Technologie angewandt werden, um bestehende makroskalierte Methoden zu ersetzen (Sackmann, Fulton, & Beebe, 2014). Auch im Forschungsbereich der zirkulierenden Tumorzellen, werden aufgrund der genannten Vorteile bereits mikrofluidische Systeme zur Isolierung und Analyse verwendet. Eine Limitierung stellt dabei allerdings die Prozessierung großer Probevolumina zur Isolierung der seltenen CTCs dar (Adams et al., 2008). Andererseits sind die kleinen Abmessungen der mikrofluidischen Kanäle optimal, um eine Interaktion von Krebsmarkern auf den Tumorzellen mit Molekülen auf den Oberflächen der Kanäle zu beobachten.

1.5 Eigenschaften mikrofluidischer Systeme

Durch die geringen Größenverhältnisse in mikrofluidischen Systemen verändern sich einige Eigenschaften der Flüssigkeiten im Gegensatz zu makroskalierten Experimenten. So spielt die Gravitationskraft in mikrofluidischen Systemen kaum mehr eine Rolle, während sich der Einfluss der Oberflächenspannung und Kapillarkräfte im Vergleich zu größeren Dimensionen erhöht (Sackmann et al., 2014). Die Reynolds Zahl (Re) wird in der Strömungslehre verwendet, um das Strö-

mungsverhalten, genauer das Verhältnis von Trägheits- zu Zähigkeitskraft, in fluidischen Systemen zu bestimmen. Dabei ist Re proportional zur Geschwindigkeit der Flüssigkeit und zur Länge des Systems und antiproportional zur Viskosität der Flüssigkeit (Sackmann et al., 2014). Die Reynolds Zahl wird durch folgende Formel beschrieben.

$$Re = \frac{\rho U_0 L_0}{\eta} \quad (1)$$

Bei dieser Formel beschreibt ρ die Dichte, U_0 die charakteristische Fließgeschwindigkeit, L_0 die charakteristische Länge des Kanals und η die kinematische Viskosität. Die charakteristische Länge des Kanals wird folgendermaßen bestimmt:

$$L_0 = 4 \cdot \frac{A}{P} \quad (2)$$

Dabei entspricht A der Querschnittsfläche des Kanals und P dem benetzbaren Umfang. Durch die minimalen Abmessungen in mikrofluidischen Systemen dominiert meist die Reibungs- über die Trägheitskraft und es resultiert ein linearer Fluss (Squires & Quake, 2005). In mikrofluidischen Systemen sind deshalb meist Reynolds-Zahlen unter 100, meist sogar unter 1, anzutreffen, was zu einem komplett laminaren Fluss ohne Turbulenzen führt (Abbildung 6) (Radenovic).

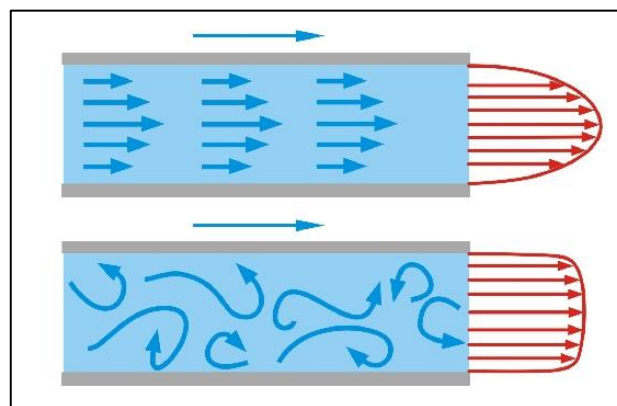


Abbildung 6: Darstellung laminarer und turbulenter Strömungsprofile in einem mikrofluidischen Kanal. Oben: Laminare Strömung, Unten: Turbulente Strömung ("Rohrreibung bei laminarer / turbulenter Strömung," 2017)

Die fehlenden Turbulenzen führen dazu, dass sich mehrere Flüssigkeiten in einem mikrofluidischen System nicht vermischen, sondern parallel nebeneinander fließen. Ohne eingebrachte Mixer oder Turbulenzen erfolgt eine Vermischung nur durch Diffusion einiger Moleküle zwischen den Flüssigkeiten (Dixit & Kaushik, 2016; Whitesides, 2006). Abbildung 7 zeigt ein solches mikrofluidisches System mit laminarer Strömung und parallelem Fluss mehrerer Flüssigkeiten.

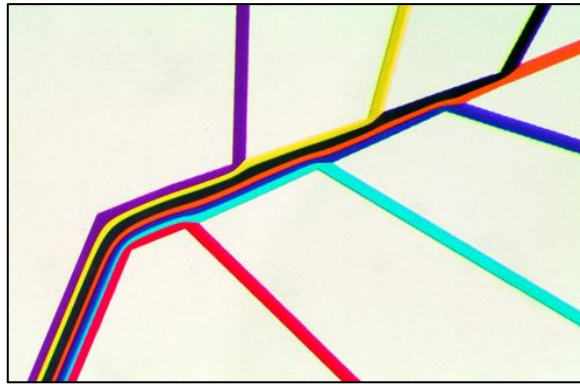


Abbildung 7: Mikrofuidisches System im laminaren Strömungsbereich (Kenis, 1999)

Des Weiteren wird in der Mikrofluidik zwischen druckgetriebenem und elektrokinetischem Fluss unterschieden. Oft werden Pumpen, wie peristaltische oder Spritzenpumpen, verwendet, um die Flüssigkeit aktiv, mit einer bestimmten Geschwindigkeit durch den Kanal zu transportieren. Eine Grundregel dieses druckgetriebenen Flusses ist die Haftbedingung, welche besagt, dass die Strömungsgeschwindigkeit an den Wänden bzw. einer festen Oberfläche gleich null sein muss. Durch diese Voraussetzung bilden sich wand-nahe Grenzschichten und somit das parabolische Strömungsprofil aus. Beim elektrokinetischen Fluss wird ein elektrisches Feld an den Kanal angelegt, was dazu führt dass sich die Ionen, welche sich an der Grenze zwischen Kanalwand und Flüssigkeit durch Ladungsunterschiede angereichert haben, zur Elektrode mit entgegengesetzter Polarität bewegen. Das führt zur Bewegung der Flüssigkeit im Kanal (Radenovic; Schilling, 2013) Die meisten Systeme arbeiten jedoch mit druckgetriebenem Fluss bzw. Sog der durch eine Pumpe erzeugt wird, um einen kontrollier- und steuerbaren Fluss zu erhalten.

1.6 Gängige Materialien und Methoden in der Mikrofluidik

Durch den Einfluss der Mikroelektronik wurden die frühen mikrofluidischen Systeme in Glas oder Silikon geätzt. Der Vorteil dieser Materialien ist die chemische Inertheit, welche jedoch bei den wenigsten Anwendungen benötigt wird und im Gegensatz zu den hohen Material- und Fertigungskosten sowie dem hohen Zeitbedarf für die Herstellung steht (Dixit & Kaushik, 2016). Deshalb hat sich die Verwendung von Polymeren in der Mikrofluidik durchgesetzt. Diese sind einfacher zu verarbeiten, flexibler und günstiger. Des Weiteren ermöglichen sie den Einbau verschiedener Komponenten wie pneumatischer Ventile, was in festen Materialien nicht möglich ist. Die meistgenutzten Polymere in Soft-Lithografie-Prozessen sind Polymethylmethacrylat (PMMA), Polycarbonat (PC), zyklische Olefine, SU-8 und

Polydimethylsiloxan (PDMS). Weitere Vorteile von Polymeren sind die der optische Transparenz und somit die guten optischen Eigenschaften, die guten elektrischen und mechanischen Eigenschaften, die Möglichkeit die meist hydrophoben Oberflächen hydrophiler zu machen, die geringe Toxizität sowie die Möglichkeit, das Polymer reversibel oder irreversibel an andere Materialien wie Glas oder Plastik zu binden (Dixit & Kaushik, 2016; Kitsara & Ducrée, 2013; Sackmann et al., 2014; Whitesides, 2006). Einige Beispiele für mikrofluidische Chipsysteme zeigt Abbildung 8.



Abbildung 8: Beispiele für mikrofluidische Chips. Auf der linken Seite befindet sich ein „Pillar“-Chip, der zur Filterung bestimmter Bestandteile oder Füllung per Kapillarkräften verwendet werden kann, in der Mitte ein Chip für einen kompletten SELEX-Prozess und rechts ein Chip zur Durchfluss-PCR mit parallelem Immunoassay (microfluidic ChipShop GmbH, 2016).

2. Vorarbeiten und Ziel des Promotionsprojektes

Die Grundidee des Promotionsprojektes soll eine zerstörungsfreie Identifizierung der sich auf den Krebszellen befindlichen spezifischen Oberflächenmarker mittels eines Lab-on-a-Chip System ermöglichen. Dafür sollen, die aus dem Blut angereicherten, Krebszellen möglichst vereinzelt in einen Mikrofluidkanal geleitet werden. Dieser Kanal ist abschnittsweise mit Molekülen (Antikörpern) beschichtet, die gegen unterschiedliche krebsspezifische Zelloberflächenmarker gerichtet sind (Abb.9 A). Sind die entsprechenden Marker auf den Krebszellen vorhanden, kommt es zu direkten Wechselwirkungen mit diesen Molekülen, wodurch die Fließgeschwindigkeit der Krebszellen beeinflusst bzw. verlangsamt wird. Die Zeit, die eine Zelle benötigt, um einzelne Abschnitte zu durchqueren, ist direkt proportional zu der Konzentration der Marker an der Zelloberfläche. Auf Basis der Retentionszeit lassen sich so individuelle und spezifische Profile erstellen, die direkt mit den CTC-Populationen korrelieren sollen. Des Weiteren können dadurch Populationsuntersuchungen innerhalb der CTC vorgenommen werden, ein Therapiemonitoring erfolgen, sowie deren Einfluss auf Metastasenbildung erforscht werden. Abschließend sind die Zellen für weitere Analysen wie z.B. „Single Cell Proteomic“ uneingeschränkt verfügbar.

Diese Doktorarbeit basiert auf Vorarbeiten, welche der Masterarbeit von Solveig Schmidt mit dem Titel „Entwicklung eines nicht-invasiven mikrofluidischen Systems zur Profilierung von zirkulierenden Krebszellen“ entnommen werden können. Dabei konnte die konzentrationsabhängige Verlangsamung von Jurkat-T-Lymphozyten in zur Hälfte mit Jurkat-spezifischen Markern beschichteten 20x20 µm Kanälen nachgewiesen werden (Abb.9 B). Die Ergebnisse beruhen dabei auf manueller Geschwindigkeitsmessung und Druckkontrolle sowie der Verwendung eines Polystreptavidin Beschichtungs-Kits (Polystreptavidin R Coating Kit, Fa. Biotex, Berlin) und biotinylierten Aptameren.

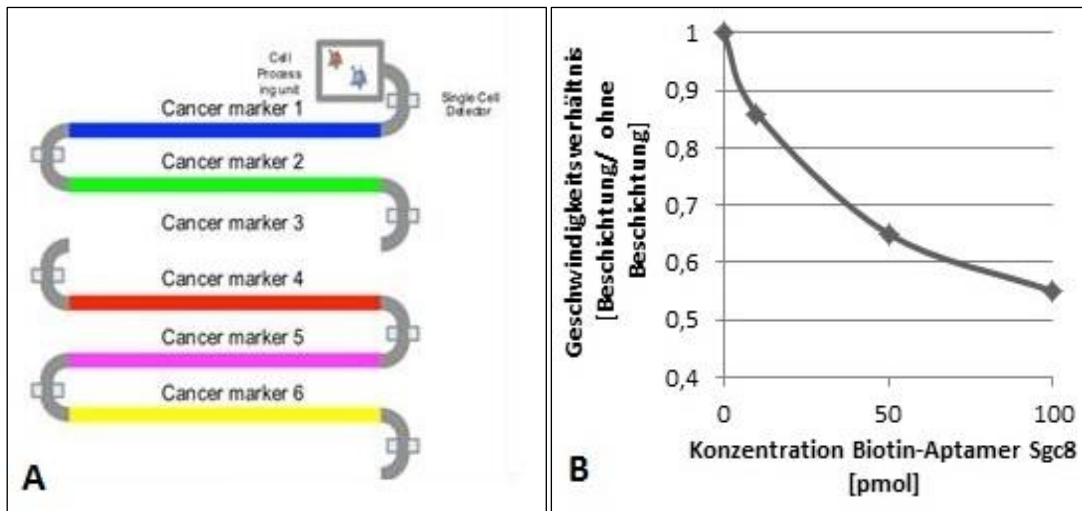


Abbildung 9: A) Beispielhafte Darstellung der Verteilung verschiedener Krebsmarker innerhalb des mikrofluidischen Systems; B) Geschwindigkeitsverhältnisse von Jurkat-T-Lymphozyten (akute T-Zell Leukämie) als Reaktion auf verschiedene Konzentrationen des Jurkat-spezifischen sgc8-Aptamers in beschichteten Bereichen eines 20 x 20 µm Kanals

Ziel dieses Promotionsprojektes ist zum einen die Etablierung einer Methode zur genauen, ortsspezifischen Immobilisierung der Antikörper sowie die Maßstabsvergrößerung und Semiautomatisierung dieses Lab-on-a-Chip Systems zur Profilierung von Einzelzellen speziell von zirkulierenden Tumorzellen. Dafür wurde zunächst auf eine halbautomatische Detektion und Messung der Zellen mittels eigens für die Anwendung angepasster MedeaLab Tracking Software (medea AV Multimedia und Software GmbH) in Kombination mit der Basler acA2040-90um USB 3.0-Kamera mit CMOSIS CMV4000 CMOS-Sensor (90 Bilder pro Sekunde (fps-frames per second); 4 MP (Megapixel); monochromatischen Auflösung von 2048 x 2048 Pixeln (px) (Pixelgröße: 5,5 µm x 5,5 µm)) umgestellt. Die Druckkontrolle erfolgte über das MFCS™-EZ Mikrofluidische Flusskontrollsystem der Firma Fluigent mit einer 25 mbar und einer 69 mbar Pumpeneinheit. Bevor im späteren Verlauf angepasste mikrofluidische Chips im Meander-Design hergestellt werden sollten, wurde mit straight channel Chips (800x20 µm, PMMA, Interface: trough-hole) der Firma microfluidic ChipShop (Jena) gearbeitet. Die abschnittsweise Beschichtung der mikrofluidischen Kanäle erfolgte mittels eines Microarray-Spotters (SciFlexArrayer S3, Scienion). Da diese technischen Rahmenbedingungen aufgrund etablierter Strukturen innerhalb des Forschungsprojektes fest standen, werden diese Entscheidungen in dieser Arbeit nicht weiter erläutert.

Ziel der Arbeit war somit:

1. Überarbeitung der Beschichtungsstrategie zur ortsspezifischen Immobilisierung von Antikörpern innerhalb eines PMMA mikrofluidischen Kanals aufgrund reproduktiver Schwierigkeiten mit dem Beschichtungs-Kit.
 - a. Etablierung einer stabilen Funktionalisierung der Oberfläche mit hoher Antikörperbindekapazität
 - b. Etablierung eines geeigneten Verfahrens zur exakten Immobilisierung von Antikörpern in definierten Bereichen
 - c. Sicherstellung der Funktionalität der Antikörper nach der Immobilisierung
2. Optimierung der Anreicherung zirkulierender Tumorzellen aus Vollblutproben
3. Reproduktion der Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit fließender Kulturzellen als Reaktion auf affinitätsbasierte Wechselwirkungen mit der Oberfläche in vergrößertem und halb-automatisiertem Maßstab des Lab-on-a-Chip Systems

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Sofern nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Medien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von den Firmen Lonza Group Ltd (Basel, Schweiz), VWR International (Radnor, USA), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG (Bremen, Deutschland) und Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich) verwendet.

3.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Sterilbank	Herasafe HSP, Heraeus
CO ₂ Inkubator	HERA Cell, Thermo Fisher Scientific
Tischzentrifuge	Centra GP8R IEC, Thermo Fisher Scientific
Fluoreszenzmikroskop	BX51, Olympus
Bakterienbrutschrank	SI19, Stuart
Entgaser: SciPurator/Vakuumpumpe	Scienion
ELISA Reader	Sunrise™, TECAN
Spectrophotometer	UviLine 9400, Schott
Thermocycler	Biometra T Gradient
Microarrayspotter	SciFlexarrayer S3, Scienion
Mikrofluidpumpe	MFCS™-EZ, Fluigent
Pipetten	Transferpette® S, Carl Roth
Vortexer	Vornado, Biozym Scientific GmbH
Pipettierhilfe	Accurpette, VWR
Zyto-Zentrifuge	Cellspin II; Tharmac
Feinwaage	Toledo XS205, Mettler
Plasmaanlage	Nano RF, Diener electronic
MACS™-Spearator	MidiMACS™ Separator, Miltenyi
Kamera	Ace acA2040-90um USB 3.0 Kamera, Basler
Thermo Cycler	Thermo Fisher Scientific PR0961401950

3.3 Chemikalien und Lösungen

Name	Hersteller/Vertrieb
PBS (Phosphate buffered saline)	Biozym Scientific GmbH
Ficoll Paque Plus	GE-Healthcare
BSA (Albumin Fraktion V)	Carl Roth
FBS (fetal bovine serum)	Pan Biotech
Penicillin Streptomycin 10K	Biozym Scientific GmbH
Natrium-Pyruvat 100 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypsin 0.25 %/EDTA 0.02 %	Pan Biotech
RPMI	Biozym Scientific GmbH
DMEM	Pan Biotech
CellTracker™ Green CMFDA Dye	Life technologies
Bisbenzimid Hoechst No 33342 Trihydrochlorid	VWR
TRIZOL® Reagenz	Life technologies
EDC: N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid	VWR
NHS: N- Hydroxysuccinimid	VWR
Avidin (aus Hühnereiweiß)	VWR
NeutrAvidin	Thermo Fisher Scientific
Polystreptavidin R	BioTez
Poly(ethylene glycol) 2-aminoethyl ether biotin (Mn 2,300)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Toluidinblau	VWR
Essigsäure (60 % Methancarbonsäure)	Carl Roth
Biotin-HRP	Thermo Fisher Scientific
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	Carl Roth

3.4 Reagenzien und Zubehör

Name	Hersteller/Vertrieb
Leukosep-Röhrchen	Greiner Bio-One
Monovetten (Citrat)	S-Monovette, Sarstedt
Immunomagnetische Beads CD45	CD45 MicroBeads, human, Miltenyi Biotec GmbH
MACS-Säulen	LD-Säulen (130-042-901), Miltenyi Biotec GmbH
Zählkammer	Neubauer, VWR

Objekträger	Objekträger geschliffen, mit Mattrand; VWR
Mikrofluidische Chips	Straight channel Chips, Interface: Trough-holes (01-0203-0180-01); microfluidic ChipShop GmbH
qPCR-Folie	ThermalSeal RTS™ Verschlussfolie, VWR
cDNA Synthese Kit	qScript™, Quantabio
SYBR Green Kit für qrt-PCR	PerfeCTa SYBR Green FastMix, Quanta Biosciences

3.5 Antikörper Typ

Bezug

Maus-anti-CD45: Protein tyrosine Phosphatase, Receptor Type, C (PTPRC) Antikörper (Biotin)	Antibodies-online: ABIN94128
Anti-EpCAM Antikörper [VU-1D9](Biotin)	Abcam: ab79079
Anti-EGFR Antikörper (Biotin)	Antibodies-online: ABIN5076471ABIN 410781
Cy™3 AffiniPure Fab Fragment Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson Immuno-Research: 115-007-003

3.6 Verwendete Pufferlösungen

Puffer	Zusammensetzung
PBS	<ul style="list-style-type: none"> • 137mM NaCl • 2,7mM KCl • 4,3mM Na₂HPO₄ • 1,4mM KHPO₄ • pH 7
MACS-Puffer:	<ul style="list-style-type: none"> • PBS, • 0,5mM EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure), • 0,5% BSA
Messpuffer Mikrofluidik	<ul style="list-style-type: none"> • 2 % BSA in PBS
Spotting Puffer:	
PVA-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 250mM KH₂PO₄ • 0,005% Tween20 • 2% Glycerol • 0,5% PVA10000
NEXTERION® Spot PB	<ul style="list-style-type: none"> • 400mM PBS • 10% Glycerol

- 0,02% SDS (statt Sarkosyl)
 - pH 7,2
- NEXTERION® Spot
- Firma Schott

3.7 Software

Name	Hersteller
In house-MedeaLab Tracking	medea AV Multimedia und Software GmbH
ImageJ (Bildanalyse- und bearbeitung)	

3.8 Methoden

3.8.1 Zellkulturen

In dieser Arbeit wurden sowohl die in Suspension wachsenden humanen Karzinomzelllinien Jurkat (T-Zell Leukämie) und K562 (Leukämie) verwendet sowie adhären-wachsende A549 (Lunge) und HCT116 (Colon) Karzinomzellen. Alle Zelllinien wurden unter Standardbedingungen in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und unter sterilen Bedingungen einer Sicherheitswerkbank passagiert.

Für Suspensionskulturen wurde RPMI1640 (mit L-Glutamin[200 mM], HEPES [25 mM] und Penicillin-Streptomycin[100 U/ml]) verwendet, welches zusätzlich mit 10 % FBS (fetales Kälberserum) und 2 % Natrium-Pyruvat versetzt wurde. Die Passagierung erfolgte alle 3-4 Tage durch Überführung von 0,5 – 1,5 x 10⁶ Zellen in 20 ml frisches Medium.

Bei der Kultivierung der adhären Zellen wurde DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium) mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutamin sowie dem Zusatz von 10 % FBS, 2 % Penicillin-Streptomycin und 2 % Natrium-Pyruvat verwendet. Zur Passagierung erfolgte alle 3-4 Tage zunächst ein Waschschrift mit PBS (Phosphat-gepufferte Saline), gefolgt von der Ablösung der Zellen vom Untergrund durch Trypsin/EDTA-Lösung, Pelletierung durch Zentrifugation und Neuaussaat im Verhältnis 1:5 in frischem Medium.

3.8.2 Fluoreszenzfärbung von Zellen mittels Hoechst® 33342 und CellTracker™ Green

Die Detektion der Zellen im Lab-on-a-Chip System erfolgte über eine Kamera mit angeschlossener Detektionssoftware (MedeaLab), welche mit schwarz-weiß

Schwellenwerten (Threshold) arbeitete. Im Laufe der Methodenoptimierung wurde festgestellt, dass eine optimale und lückenlose Detektion nur mittels Fluoreszenzfärbung der Zellen zu gewährleisten war, da die entstehenden Signale wesentlich stärker sind als bei der Hellfeldmikroskopie. Es wurden die zwei Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst® 33342 und CellTracker™ Green verwendet.

Hoechst® 33342 ist ein zellpermeabler, blau-fluoreszierender Farbstoff, der an dsDNS (doppelsträngige DNA) bindet und mittels UV-Laser [350 nm] angeregt wird. Für die Färbung wurden die Zellen in Suspension im Verhältnis 1:1 mit Hoechst® 33342 [15 µg/ml] gemischt und für ca. 40 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie bei 350 x g für 3,5 min abzentrifugiert und in der benötigten Menge Messpuffer für Mikrofluidik (2 % BSA) resuspendiert.

CellTracker™ Green CMFDA ist ein nicht-toxischer, grün fluoreszierender Farbstoff (FITC-Laser [Ex.: 492 nm]), welcher frei in die Zellen diffundiert, dort aber zu Zellmembran-impermeablen Reaktionsprodukten umgewandelt wird. Dies ermöglicht eine stabile, starke Fluoreszenz über 72 Stunden, welche über mehrere Generationen erhalten bleibt. Die Färbung erfolgte mittels einer 2 µM CellTracker™-Lösung, welche initial auf 37 °C vorgewärmt wurde. Die Zellen (1x10⁶ Zellen/ml) wurden durch Zentrifugation (350 x g; 3,5 min) geerntet, der Überstand verworfen und die Zellen in der vorgewärmten CellTracker™-Lösung resuspendiert. Nach der Inkubation für 20 min bei 37 °C, wurde die CellTracker™-Lösung durch Zentrifugation (350 x g; 3,5 min) entfernt und die Zellen in Messpuffer (2 % BSA) resuspendiert.

Vor der Verwendung der Zellen im Lab-on-a-Chip System wurde den Zellen mindestens 30 min Zeit zur Regenerierung gegeben.

3.8.3 Blutproben

Zur Methodenoptimierung der Depletion von zirkulierenden Tumorzellen (CTC) aus Vollblut wurden Patientenproben von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC - non small cell lung cancer) aus der Inneren Klinik des Westdeuschentumorzentrum, Direktor Univ.-Prof. Dr. med. M. Schuler, verwendet, für welche die Patienteneinwilligung und ein Ethikantrag (12-5047-BO, Uniklinikum Essen; AEKNO 2012304, Ärztekammer Nordrhein) vorlag.

Für Spikinguntersuchungen, bei denen Zellen aus Karzinomzelllinien als Modell in Blut von gesunden Spendern untersucht wurden, und als Negativkontrollen wurden 20 ml Blut von freiwilligen Spendern ohne bekannte Karzinome verwendet.

Bei allen Blutproben wurden 2 x 10 ml Blut peripher-venös in Citrat-Monovetten entnommen, bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet.

3.8.4 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMNC) durch Dichtegradientenzentrifugation

Zur Isolierung der PBMNC wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Paque™ durchgeführt. Dafür wurden zunächst 15 ml Ficoll als Separationsmedium in ein Leucosep™-Röhrchen überführt und mit 300 x g für 3 min unter die poröse Trennscheibe zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Befüllung des Leucosep™-Röhrchens mit 20 ml der anti-koagulierten Blutprobe (Citrat-Monovetten), welche zur Verbesserung der Separationseffizienz mit 10 ml PBS verdünnt wurde. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 1600 x g über 20 min ohne Bremse erfolgte die dichteabhängige Trennung der einzelnen Blutbestandteile (siehe Abb. 10).

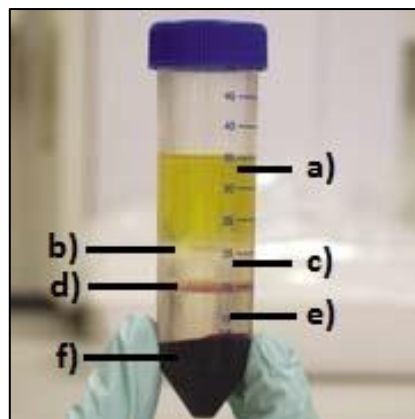


Abbildung 10: Leucosep™-Röhrchen nach der Zentrifugation. a) Plasma – b) angereicherte Zellfraktion (Interphase aus Lymphozyten / PBMCs) – c) Separationsmedium Ficoll – d) Trennscheibe – e) Separationsmedium Ficoll – f) Pellet (Erythrozyten und Granulozyten) [entnommen von http://www.greinerbioone.com/UserFiles/File/Catalogue%202010_11/D/kapitel_9_D.pdf 21.07.2017]

Die CTCs waren nun zusammen mit den PBMNC innerhalb der Interphase (*Buffy Coat*, Fraktion b Abb. 10) angereichert. Diese wurde mittels Pipette entnommen, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit Waschpuffer (0,5 % BSA in PBS) gewaschen. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 300 x g für 3 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml Waschpuffer resuspendiert.

3.8.5 Anreicherung potentieller Krebszellen mithilfe der MACS® Microbeads-Technologie

Die Anreicherung potentieller Krebszellen erfolgte auf der Proteinebene durch die magnetische Separation mithilfe von MACS®-Microbeads (Magnetic-activated cell sorting, Miltenyi). Bei dieser Technologie werden Zellen anhand ihrer auf der Zelloberfläche exprimierten Proteine (CD-Cluster of differentiation) magnetisch markiert (*magnetic labeling*) und anschließend über einen Magneten separiert (*magnetic separation*, siehe Abb. 11). In dieser Arbeit wurden die hämatopoetischen Zellen mittels CD45-Microbeads (CD45+) markiert, wodurch eine Depletion der CD45-positiven Zellen und somit eine Anreicherung der CD45-negativen Tumorzellen resultiert. Es handelt sich dabei um eine Negativ-Selektion.

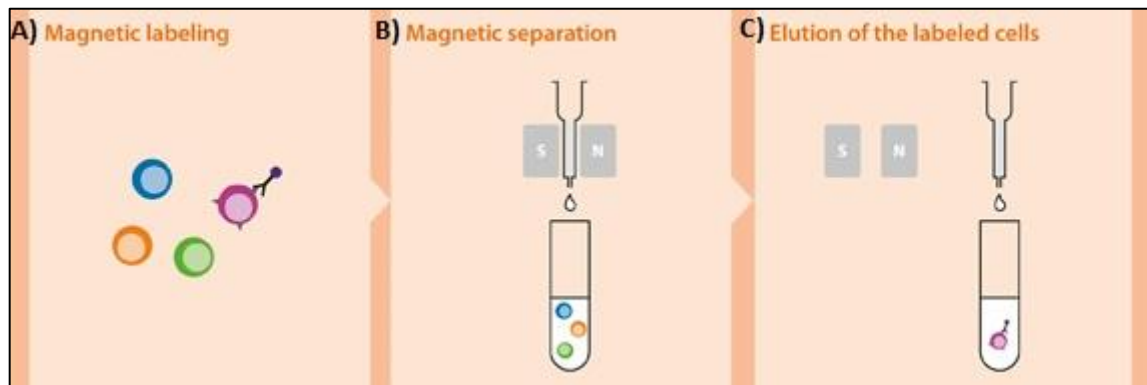


Abbildung 11: Anreicherung bestimmter Zelltypen durch immunomagnetische Separation über MACS®-Microbeads. A) Magnetische Markierung über Oberflächenmarker, B) Magnetische Separation, C) Elution der markierten Zellen. [entnommen von: http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Navigation/Products-and-Services/MACS-Cell-Separation/MACS-Technology/neu/flowchart_basic_principle_positive_selection_570.ashx, 21.07.17]

Die Negativ-Selektion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst erfolgte die Bestimmung der Zellzahl der isolierten PBMNC mittels Neubauer-Zählkammer (Kapitel 3.8.6) und die Einstellung auf 1×10^6 Zellen/ml. Anschließend wurden die Zellen bei $300 \times g$ für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in $80 \mu\text{l}$ MACS-Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert. Nach der Zugabe von $20 \mu\text{l}$ CD45-MACS® Beads pro 10^7 Zellen wurden diese vorsichtig per Pipette gemischt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Im Rahmen der Methodenoptimierung wurden, abweichend von den Herstellerangaben, unterschiedliche Mengen an Beads verwendet und die resultierende Depletionseffizienz bestimmt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 2 ml MACS-Puffer pro 10^7 Zellen gewaschen, bei $300 \times g$ für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in $500 \mu\text{l}$ MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die magnetische Separation unter Verwendung des MidiMACS™-Separators und LD-Säulen (speziell-

le Säulen zur Depletion im MACS™-System). Dafür wurden die Säulen in das magnetische Feld des MACS™-Separators eingesetzt und mit 2 ml MACS-Puffer befeuchtet. Nachfolgend wurde die Zellsuspension appliziert. Während diese durch die Säule passierte, wurden die magnetisch markierten CD45+-Zellen innerhalb des Magnetfeldes zurückgehalten und nur die unmarkierten CD45-negativen Zellen unterhalb in einem Gefäß aufgefangen (Durchflussfraktion). Um diesen Vorgang zu optimieren, wurde die Säule zweimal mit je 1 ml MACS-Puffer gewaschen. Zur Elution der CD45-positiven Zellen wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt, auf ein 15 ml Falcon-Tube aufgesetzt, 3 ml MACS-Puffer aufpipettiert und die Zellen unter Zuhilfenahme des beiliegenden Stößel eluiert (Eluatsfraktion). Abschließend wurden die Zellen bei 300 x g für 3,5 min abzentrifugiert und in der benötigten Menge Messpuffer resuspendiert.

3.8.6 Quantifizierung der Depletionseffizienz mittels Zellzahl (Neubauer-Zählkammer) und Immunfluoreszenz (Cellspin)

Die Depletionseffizienz wurde mittels Zellzahlbestimmung und über die Immunfluoreszenz bestimmt. Für die Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Resuspendierung der CD45-positiven und –negativen Fraktionen nach Passieren der Separationssäulen in jeweils 100 µl MACS-Puffer. Die Fraktionen wurden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und mit dem 10-fach Objektiv des Fluoreszenzmikroskops mindestens 4 Großquadrate ausgezählt. Die Bestimmung der Zellzahl pro ml erfolgte dann nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert Großquadrate} * \text{Verdünnungsfaktor (2)} * 10^4 \quad (3)$$

Zusätzlich wurden die Zellsuspensionen mittels Cellspin (Cytocentrifuge zur Herstellung von Zellpräparaten) oder Pipette auf Objektträger aufgebracht und Luftgetrocknet. Nach Fixierung mit 96 %-igem Ethanol können die Proben bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert werden.

Die Bestimmung der Zellzahlen der fixierten Zellen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51, Basler Ace USB 3.0 Kamera sowie der Software MedeaLab, welche eine Funktion zu Zählung von Objekten aufweist. Mittels der Software konnten jeweils 5 definierte Ausschnitte (1000 µm²) jedes Objektträgers ausgezählt werden. Die Unterscheidung der verschiedenen Zellentitäten war durch vorherige Immunfluoreszenzfärbung mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (siehe Abschnitt 3.8.2) möglich.

3.8.7 RNA-Extraktion aus Kulturzellen mittels Trizol und cDNA-Synthese mittels qScript cDNA-Synthese Kit (Quantbio)

Um das Verhalten verschiedener Zelllinien im Lab-on-a-chip System genauer untersuchen und vergleichen zu können, wurden die Expressionsmuster der Zellen in Bezug zu den verwendeten Oberflächenmarkern durch quantitative real-time PCR (qRT-PCR) bestimmt. Dies diente zum Nachweis der relevanten Oberflächenmarker auf molekularbiologischer Ebene, da es sich bei den sonstigen verwendeten Methoden, wie der Immunfluoreszenzfärbung oder der Markierung mit Beads, um Reaktionen auf Proteinebene handelt. Dazu erfolgte zunächst die Extraktion der mRNA der Kulturzelllinien Jurkat, K562, HCT116 und A549 durch Trizol-Reagenz unter RNase-freien Bedingungen. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben wurde das qScript cDNA-Synthese Kit (Quantbio) zur Umschreibung in cDNA verwendet. Folgende Tabelle zeigt die Bedingungen der Synthesereaktion.

Tabelle 1: Zyklusbedingungen für cDNA-Synthese

Zeit [min]	Temperatur [°C]
5	22
30	42
5	85

3.8.8 Quantitative real-time PCR zum Nachweis (qRT-PCR) von Zellexpressionsmustern

Für die Durchführung der qRT-PCR wurde der PerfeCTa SYBR Green FastMix (Quanta BioScience) verwendet. Als Haushaltsgen (*housekeeping gene*) diente β -Actin mit der Sequenz Fw: 5'-TCCTTCCTGGGCATGGAGTC-3' und rev: 5'-CGTACAGGTCTTTGCGGATGT-3'. Die relative Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte durch einen Vergleich mit Housekeeping-Genen, welche nicht reguliert werden, mittels Δ ct-Methode. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte unter der Mitführung von ddH₂O als Negativkontrolle in Triplikaten mit folgenden Zyklusbedingungen:

Tabelle 2: Zyklusbedingungen der qRT-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95 °C	10 min

2	95 °C	15 s
3	60 °C	30 s
4	72 °C	30 s
5	Wiederholung Schritt 2-4 40x	
6	60 °C	30 s
7	Schmelzkurve 60-95 °C	0,2 °C/s
8	20 °C	10 s

Der ct-Wert gibt den Anfang des exponentiellen Wachstums jeder Kurve an, an dem die Fluoreszenz erstmals den Hintergrund (Schwellenwert) übersteigt. Je eher der Schwellenwert überschritten wird, desto kleiner ist der ct-Wert und desto höher ist die Expression des Zielgens. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) erfolgt im Anschluss nach folgender Formel:

$$\Delta ct = ct_{\text{Zielgen}} - ct_{\text{Referenzgen}} \quad (4)$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta ct} \quad (5)$$

3.8.9 Oberflächenaktivierung des PMMA mikrofluidischen Chips mittels Sauerstoffplasma und Funktionalisierung mit Proteinen

Aufgrund der zugrundeliegenden Vorarbeiten wurde festgestellt, dass die Höhe des mikrofluidischen Kanals, indem die Zellen fließen, ausschlaggebend für eine Interaktion der Zelloberflächenmarker mit den Antikörpern auf der Kanaloberfläche ist. Das bedeutet, dass die Kanalhöhe nur minimal größer als der Zelldurchmesser sein durfte. Deshalb fiel für die experimentelle Phase die Wahl zunächst auf kommerziell erhältliche mikrofluidische Chips der Firma microfluidic ChipShop GmbH aus Kunststoff, in welche vier parallele Kanäle mit je 800 µm Breite und 20 µm Höhe eingefügt waren. Basierend auf den benötigten physikalisch-chemischen Eigenschaften, wurde Polymethylmethacrylat (PMMA) als Material ausgewählt.

Um auf der Kanaloberfläche aus PMMA abschnittsweise verschiedene Antikörper zu immobilisieren, mit denen die Zelloberflächenmarker interagieren können, erfolgte zunächst die Oberflächenaktivierung mittels Sauerstoffplasma, da PMMA im nativen Zustand eine schwache Benetzungsfähigkeit aufweist (Chen, Zhang, & Chen, 2008). Die Behandlung mit Sauerstoffplasma resultiert in einer deutlichen Steigerung der Hydrophilie durch Oxidation von Oberflächenmolekülen des

PMMA. Die entstehenden Carboxylgruppen (O-C=O) erlauben die chemische Vernetzung zu Amingruppen von beispielsweise Proteinen via Carbodiimiden wie 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC). Bei dieser Reaktion wurde zusätzlich N-Hydroxysuccinimid (NHS) zur Steigerung der Kupplungseffizienz und zur Herstellung trocknungs-unempfindlicher Intermediate verwendet (Thermo Fisher Scientific, 2012). Mithilfe dieser Reaktion wurden zunächst, vergleichbar zu dem in den Vorarbeiten verwendeten Polystreptavidin-Beschichtungs Kit, Biotinbindende Proteine (Avidin, Neutraavidin, Polystreptavidin) direkt auf die PMMA-Oberfläche aufgebracht (Funktionalisierung), sodass biotinylierte Ligandenmoleküle (Antikörper/Aptamere) binden konnten (Beschichtung). Im Folgenden werden die Schritte bis zur Aufbringung der Antikörper als „Funktionalisierung“ der Oberfläche bezeichnet und die Immobilisierung der Antikörper als „Beschichtung“. Im Zuge der Methodenoptimierung wurde mit derselben Reaktion auch Polyethylenglykol (PEG), modifiziert mit einer Amingruppe und Biotin (Poly(ethylene glycol) 2-aminoethyl ether biotin), als *Spacer* (Platzhalter) zwischen der PMMA-Oberfläche und dem Streptavidin-Derivat aufgebracht. Auf diese Weise sollte eine Art Hydrogel erzeugt werden, durch das die Antikörper für eine verbesserte Interaktion mit den Zielzellen weiter in den Kanal hineinragen. Abb. 12 zeigt ein Schema der entwickelten Oberflächenfunktionalisierung mit direkter Immobilisierung von Neutraavidin.

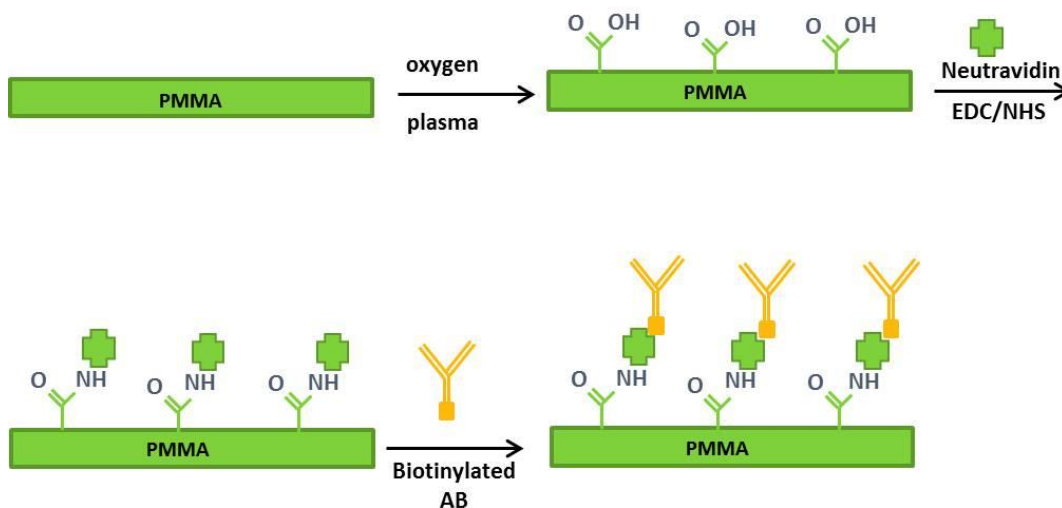


Abbildung 12: Oberflächenfunktionalisierung von PMMA mittels Sauerstoffplasma und Neutraavidin zur Bindung biotinylierter Antikörper. Die durch das Sauerstoffplasma entstehenden Carboxylgruppen auf der PMMA-Oberfläche erlauben die Vernetzung mit Amingruppen von Proteinen wie Neutraavidin durch Carbodiimide (EDC). An diesen Proteinen können dann biotinylierte Antikörper stabil auf der Kanaloberfläche gebunden werden.

Für die Oberflächenaktivierung wurden die mikrofluidischen Chips mit den offenen Kanälen nach oben mittig in der Diener Plasmaanlage platziert. Nach Herstellung des Vakuums erfolgte die Plasmaexposition unter Zuführung von Sauerstoff für 90 s. Im Zuge der Methodenoptimierung wurden verschiedene Expositionszeiten und Kontrollen evaluiert. Die Funktionalisierung mit Neutraavidin erfolgt direkt im Anschluss. Dafür wurden 0,1 M EDC und NHS in PBS gelöst und in gleichen Teilen mit 1 mg/ml Neutraavidin vermischt. Nachdem die Chips der Plasmaanlage entnommen wurden, erfolgten der Verschluss der Kanäle mittels qRT-PCR-Verschlussfolie und das Einbringen der Neutraavidin-EDC/NHS-Lösung durch Erzeugung eines Unterdrucks und Einsaugen mit einer Pipette. Nach der Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde die Folie rückstandslos entfernt, der Chip mit ddH₂O gespült und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Aufgrund des, durch die Plasmabehandlung entstandenen, reversiblen Hydrophilieeffektes sollte bis zur Verwendung mind. 24 h gewartet werden, da aufgebrachte Flüssigkeiten verlaufen und Zellen unspezifisch haften. Anschließend können biotinylierte Antikörper direkt an der Oberfläche binden.

3.8.10 Nachweis der Plasmaeffizienz über Quantifizierung der oberflächlichen Carboxylgruppen durch Toluidinblau

Eine erfolgreich durchgeführte Sauerstoffplasmaexposition resultiert in einer Steigerung der Anzahl an Carboxylgruppen (-COOH) auf der PMMA-Oberfläche. Toluidinblau (TB) erlaubt die UV-Vis spektroskopische Quantifizierung der -COOH Gruppen durch pH-abhängige Adsorption/Desorption der positiv geladenen TB-Moleküle auf der negativ geladenen PMMA-Oberfläche (Tiraferri & Elimelech, 2012). Dafür wurden die Proben direkt nach der Plasmaexposition für 2 h in TB-Lösung (500 µM TB in dH₂O pH 10) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit dH₂O pH 10 gewaschen, um überschüssige TB-Moleküle zu entfernen. Die pH-abhängige Desorption der gebundenen TB-Moleküle erfolgte für 15 min in 50 wt% Essigsäure. Nach Aufnahme einer Standardkalibrationsreihe (5-125 µM TB) erfolgte die Vermessung der gelösten TB-Moleküle durch einen ELISA Reader (ELISA Reader TECAN sunrise) bei 633 nm. Dabei entspricht die Stoffmenge (Mol) von TB der Anzahl an Mol der funktionellen Carboxylgruppen (Sano, Kato, & Ikada, 1993).

3.8.11 Nachweis der Plasmaeffizienz über fluoreszenzbasierten ELISA

Als weitere Methode zur Quantifizierung der Plasmaeffizienz wurde ein ELISA-ähnliches Vorgehen (*Enzyme-linked-immunosorbent-assay*) unter Verwendung von Primär- und Sekundärantikörper gewählt.

Dabei erfolgte die Funktionalisierung der PMMA Oberfläche analog zu Abschnitt 3.8.9. Der Nachweis erfolgte zunächst durch Immobilisierung von drei 1 μ l Tropfen eines 10 μ g/ml biotinylierten Primärantikörpers (anti-human CD45, ABIN94128) über 10 min. Nach Waschen des PMMAs in ddH₂O und Trocknung mit N₂-Gas, wurden die drei Antikörperspots mit je 5 μ l Sekundärantikörper (1:100, CyTM3 Affi-niPure Fab Fragment IgG (H+L)) überdeckt und in einer Luftfeuchtigkeitskammer bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach wiederholtem Waschen erfolgte die mikroskopische Detektion der Fluoreszenz mit einem Cy3-Fluoreszenzlasers bei 550 nm und die abschließende Beurteilung der Fluoreszenzintensität und Gleichmäßigkeit mithilfe der Software ImageJ.

3.8.12 Ortsspezifische Immobilisierung der Zielmoleküle innerhalb des mikrofluidischen Kanals mithilfe eines Microarray Spotters

Für die Erzeugung von Retentionszeiten mussten innerhalb des mikrofluidischen Kanals abwechselnd möglichst viele beschichtete und unbeschichtete Abschnitte realisiert werden. Mittelfristiges Ziel war es, 30 verschiedene Marker zu untersuchen. Dazu war es erforderlich, unterschiedliche Antikörper zielgenau, über eine definierte Fläche mit einer klaren Abgrenzung zum unbeschichteten Bereich innerhalb des Kanals zu immobilisieren. Problematisch waren in diesem Fall die minimalen Abmessungen des Kanalsystems, die eine Nutzung minimalster Beschichtungsvolumina erforderlich machten. Bei den geplanten Maßen des mikrofluidischen Kanals von 150 μ m Breite, 30 μ m Höhe und der Länge des beschichteten Bereichs von 1000 μ m, ergab sich ein Volumen von 4500000 μ m³ bzw. 4,5 nl Antikörperlösung pro Abschnitt. Nach Evaluation unterschiedlichster Methoden zur zielgerichteten Immobilisierung von Antikörpern auf PMMA, fiel die Entscheidung auf einen Microarray Spotter, der im pL-Format arbeitet (SciFlex Arrayer S3, Sci-enion). Mittels der SciDROP PICO Technologie wurde eine Abgabe von 50-800 pl pro Tropfen realisiert und erlaubte somit eine weitere Reduktion der Maße der beschichteten Abschnitte (Felder) in der Zukunft. Innerhalb der Software konnten die Positionen in x- und y-Richtung, der Abstand zwischen den gespotteten Feldern,

die Anzahl der Felder, die Spots pro Feld und der Abstand der Spots voneinander reguliert werden. Zusätzlich bot der Spotter die Möglichkeit, durch Variation der Luftfeuchtigkeit und Kühlung der Proben eine optimale Beschichtungsumgebung unter reinraumähnlichen Bedingungen zu gewährleisten. Somit konnte das System optimal an geänderte Kanalabmessungen oder Geometrien angepasst werden.

Für das Spotting wurden die funktionalisierten mikrofluidischen Chips mit den offenen Kanälen nach oben auf der Probenplatte platziert. Mittels der eingebauten Kamera wurden die geplanten Positionen der Antikörper-Beschichtung innerhalb des Kanals bestimmt und in die Software eingegeben. Das Einfüllen der Proben (mind. 1 µl) erfolgte in die tauschbare 384-Well-Probenplatte (sciSOURCEPLATE), welche ebenfalls kühlbar war. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Arbeitsablauf des Spotters so programmiert werden, dass die nachfolgenden Schritte und somit der gesamte Spotting-Prozess automatisch gesteuert und überwacht wurde. Folgende Grafik zeigt den Ablauf des Spotting-Prozesses.



Abbildung 13: Darstellung des Spotting-Prozesses mit automatisierter Abfolge. Nach einem Waschschrift und der Probenaufnahme in die Nozzle des Spotters aus der SciSourcePlate erfolgt ein Probespot mit gleichzeitiger Qualitätskontrolle der Tropfenform vor der Kamera, gefolgt vom Spotting der Probe in den Kanal und anschließendem Kontrollspot vor der Kamera. Nach einem Waschschrift wird die nächste Probe aufgenommen und der Ablauf wiederholt sich.

Gleichzeitig wurden alle Parameter automatisch durch das System gespeichert, was eine lückenlose Qualitätskontrolle des Spottings ermöglichte. Innerhalb der Versuchsreihen wurde meist in die 800 µm breiten und 20 µm hohen Kanäle ein

1000 μm langes Quadrat pro Ligandenmolekül bzw. Konzentration gespottet. Nachdem die letzte Probe gespottet wurde, erfolgte die Inkubation für 10 min innerhalb des Spotters bei einer Luftfeuchtigkeit von 69 %, welche eine Verdunstung der Proben minimierte. Anschließend wurde der beschichtete Chip in ddH₂O gewaschen und mit Stickstoff getrocknet.

Der Verschluss des Chips erfolgte mit qRT-PCR-Folie. Da die in den Kanal eingeleiteten Zellen aufgrund von Gravitations- und Trägheitskräften eher nach unten sinken, sollte der mikrofluidische Kanal mit der Antikörper-Beschichtung auf der Unterseite liegen. Das bedeutet, dass die Folie mit jeweils einem Ein- und Ausgangsloch versehen werden musste. Dies wurde über eine Schablone und die Verwendung einer 1,5 mm Biopsiestanze verwirklicht. Anschließend wurde die Folie passgenau auf den Chip aufgebracht. Durch ihre druckempfindlichen 50 μm Klebestellen, klebte diese nur dort, wo sie mit Druck aufgebracht wurde und nicht innerhalb des Kanals. Folgende Abbildung zeigt ein schematisches Modell des Chips mit 6 antikörper-beschichteten Abschnitten.

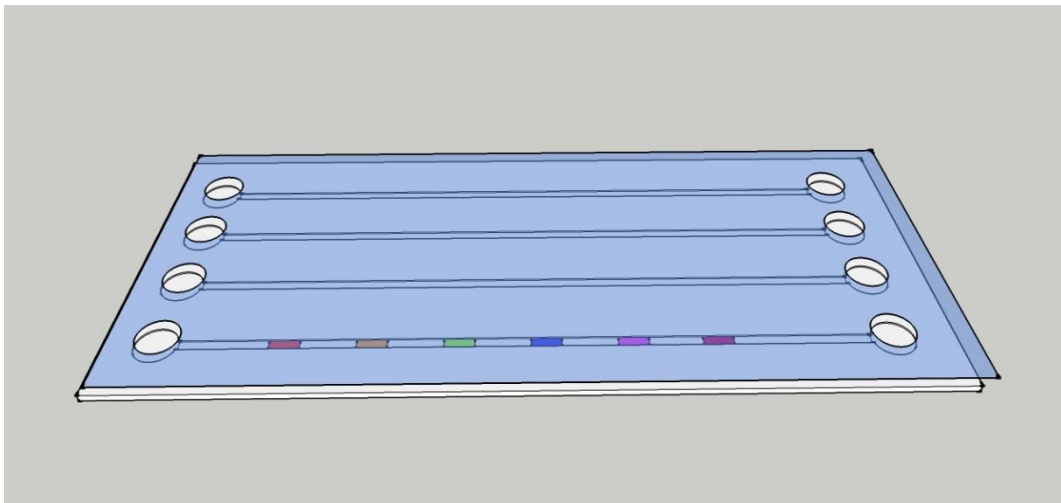


Abbildung 14: Schematische Darstellung der verwendeten Chips mit 6 antikörper-beschichteten Bereichen im untersten Kanal und dem Verschluss durch qPCR-Folie

3.8.13 Nachweis der ortsspezifischen Immobilisierung der Zielmoleküle

Im Allgemeinen wurde in dieser Arbeit ein fluoreszenzbasiertes System aus Primär- und Sekundärantikörper verwendet, um die Performance der immobilisierten Moleküle nachzuweisen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Fluoreszenz die Anwesenheit der Zielmoleküle repräsentiert. Somit kann vergleichend die Menge bzw. Aktivität an immobilisierten Molekülen bestimmt werden und die

Gleichmäßigkeit (Homogenität) der Beschichtung, die Spotmorphologie sowie unspezifische Bindungen beurteilt werden.

Nachdem die biotinylierten Antikörper auf der Neutravidin-funktionalisierten Oberfläche immobilisiert und Messungen mit Zellen durchgeführt wurden, erfolgte der Nachweis dieser Antikörper über ausgewählte Sekundärantikörper. Diese boten aufgrund ihrer Signalverstärkung eine erhöhte Empfindlichkeit. Der in dieser Arbeit meistverwendete Primärantikörper war biotinyliertes Maus-CD45, welcher über einen Anti-Maus Cy3 markierten Sekundärantikörper im Verhältnis 1:100 nachgewiesen wurde. Dafür wurden mittels Pipette 5 µl der Sekundärantikörperlösung in den mikrofluidischen Kanal eingesogen und 30 min bei 37 °C in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Reinstwasser erfolgte die Detektion der Beschichtungsperformance mittels Olympus Fluoreszenzmikroskop unter Cy3-Laser (550 nm) und die Auswertung der Intensität bzw. Homogenität mit der Software ImageJ.

3.8.14 Überprüfung der Funktionalität der Antikörper nach dem Spotten durch Biotin-HRP ELISA

Um sicher zu gehen, dass die Antikörper nach dem Aufbringen auf die funktionalisierte Kanaloberfläche mittels Spotter noch intakt waren, wurde zur besseren Vergleichbarkeit ein ELISA mit Biotin-HRP durchgeführt. HRP (Meerrettichperoxidase) simuliert dabei als Modell den Antikörper, wobei Enzyme im Allgemeinen empfindlicher sind als Antikörper. Sofern das Enzym das Spotting und die Trocknung unbeschadet übersteht, war davon auszugehen, dass dies auch auf den Antikörper zutrifft.

Es wurde eine vorbehandelte ELISA-Platte verwendet, welche mit 1 mg/ml Avidin beschichtet und mit 1 mg/ml BSA-Lösung geblockt wurde. Dann wurde HRP in unterschiedlichen Spotting Puffern gelöst und in einzelne Wells gespottet. Nach Inkubation wurden alle Wells 3 x mit PBS gewaschen und TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) als Substrat zugefügt. TMB wird oxidiert während der enzymatischen Degradation von H₂O₂ durch HRP, was in einer blauen Farbreaktion resultiert. Sobald eine Blaufärbung der Wells erkennbar war, wurde die Reaktion durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet und das Ergebnis mittels ELISA-Reader bei 655 nm ausgelesen.

3.8.15 Berechnung des Scherstress

Der Scherstress beschreibt Stress, der durch Einwirkung von Tangentialkräften auf eine Oberfläche entsteht. Diese Kräfte wirken auf die fließenden Zellen ein und könnten sie in ihrem Verhalten beeinträchtigen. Die theoretische Berechnung des Wand-Scherstress T erfolgt in Bezug zum Poiseuille Modell nach folgender Formel:

$$\tau = \frac{6Q\mu}{h^2w} \quad (6)$$

Dabei entspricht Q der volumetrischen Flussrate, μ der Viskosität der verwendeten Flüssigkeit und h und w der Höhe und Breite des mikrofluidischen Kanals (Christophis et al., 2011).

3.8.16 Analyse des Zellverhaltens im Lab-on-a-Chip System

Zur Analyse des Zellverhaltens wurden die Zellen, nach der Fluoreszenzfärbung, in den Messpuffer für Mikrofluidik gegeben und per druckgesteuerter Pumpe in den Kanal eingeleitet. Dort passierten sie mit Antikörpern beschichtete und unbeschichtete Bereiche. Die Analyse des Zellverhaltens auf die antikörperbeschichteten Bereiche innerhalb des Kanals konnte mit der verwendeten Software nur halbautomatisch erfolgen. Die Geschwindigkeit, deren Abweichung sowie ein Flussdiagramm wurde automatisch von der *in-house* Software MedeaLab Tracking erzeugt. Abbildung 15 zeigt einen Screenshot von der Darstellung der Daten in der Software, die jede Zelle einzeln erfasst hat.

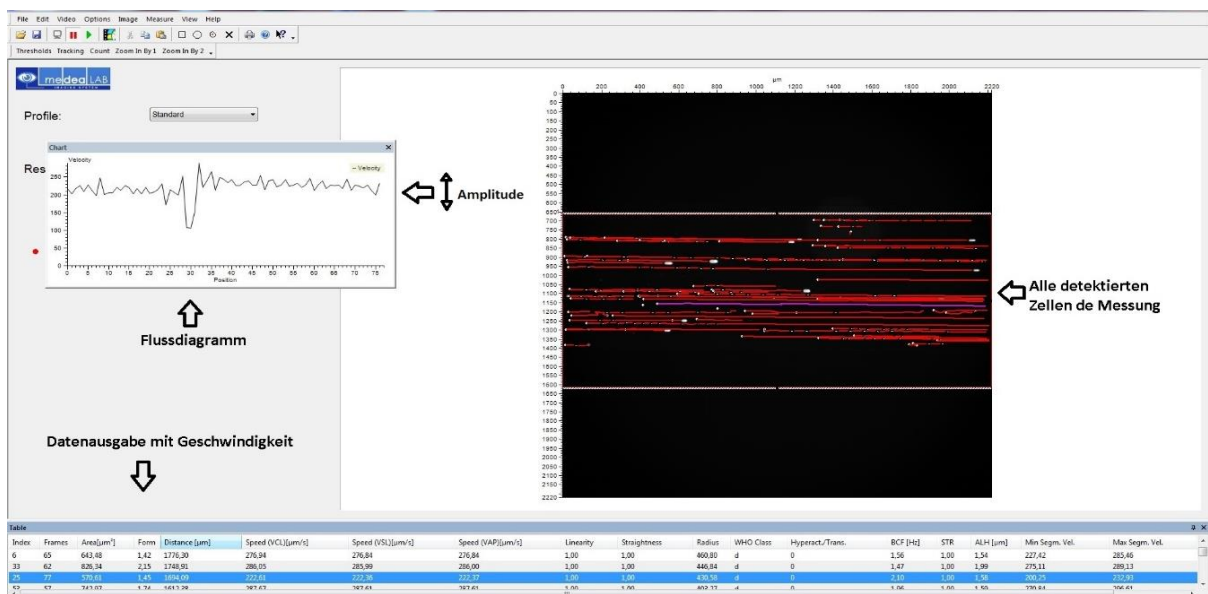


Abbildung 15: Ausgabe der Daten in MedeaLab Tracking Software. Links das Flussdiagramm der Geschwindigkeitsmessung mit Amplitude (Schwankung) der Kurve, rechts Übersicht aller gemessenen Zellen und unten die Geschwindigkeitsdaten aller Zellen als Tabelle

In der Datenausgabe wurden folgende Daten pro detektierter Zelle erfasst: fortlaufende (ftl.) Nummerierung (Index), Frames, Area [cm²], Form, zurückgelegte Distanz (Distance), Geschwindigkeit (curvilinear velocity VCL, straight line velocity VSL und average path velocity VAP [$\mu\text{m/s}$]), Linearität, Geradheit (Straightness), Radius, minimale und maximale Geschwindigkeit.

Da eine Exportierung einzelner Daten mit Flussdiagramm und Bildübersicht in dieser Softwareversion nicht möglich war, mussten diese einzeln per Screenshot exportiert und analysiert werden. Um das Zellverhalten auf Antikörper-beschichteten Bereichen evaluieren zu können, wurden aus mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen stichprobenartig 10 Zellen pro Antikörperkonzentration auf ihr Verhalten im beschichteten Bereich im Vergleich zu unbeschichteten Bereichen hin untersucht. Dabei wurde dokumentiert, ob die Zellen im Vergleich zum unbeschichteten Bereich verlangsamt wurden, ob und wie oft sie kurz haften bleiben (Stop-and-Go Verhalten) oder sich der Ausschlag der Kurve (Amplitude) erhöhte. Dies erfolgte anhand der Betrachtung des Flussdiagramms unter Zuhilfenahme der Geschwindigkeit. Als positiv bewertet wurde zunächst das Verhalten bei mehr als 10 % Abweichung von der Durchschnittsgeschwindigkeit (VCL). Für eine aussagekräftige Messung wurde allerdings eine 50 %ige Verlangsamung der Geschwindigkeit angestrebt. Es wurden nur Zellen untersucht, die mind. 2/3 der beobachteten Distanz (2170 μm) zurückgelegt hatten.

4. Ergebnisse

4.1 Methodenetablierung zur Funktionalisierung und Beschichtung von PMMA

4.1.1 Nachweis und Optimierung des Plasmaprozesses

4.1.1.1 UV-Vis Spektroskopie zum Nachweis von –COOH Gruppen durch Toluidinblau

Toluidinblau wird verwendet, um die durch das Sauerstoffplasma erzeugten Carboxylgruppen auf der PMMA-Oberfläche und somit im mikrofluidischen Kanal in einer 1:1 Reaktion nachzuweisen und die optimale Plasmaexpositionsdauer zu evaluieren. Anhand einer Standardkalibrationsreihe wurde die Menge an erzeugten Carboxylgruppen in $\mu\text{M}/\text{mm}^2$ quantifiziert. Als Negativkontrolle diente eine PMMA-Probe, die nicht dem Plasma ausgesetzt war, ansonsten aber die gleiche Behandlung durchlaufen hat (Blank). Getestet wurden Expositionszeiten von 15-180 s ($n=3$).

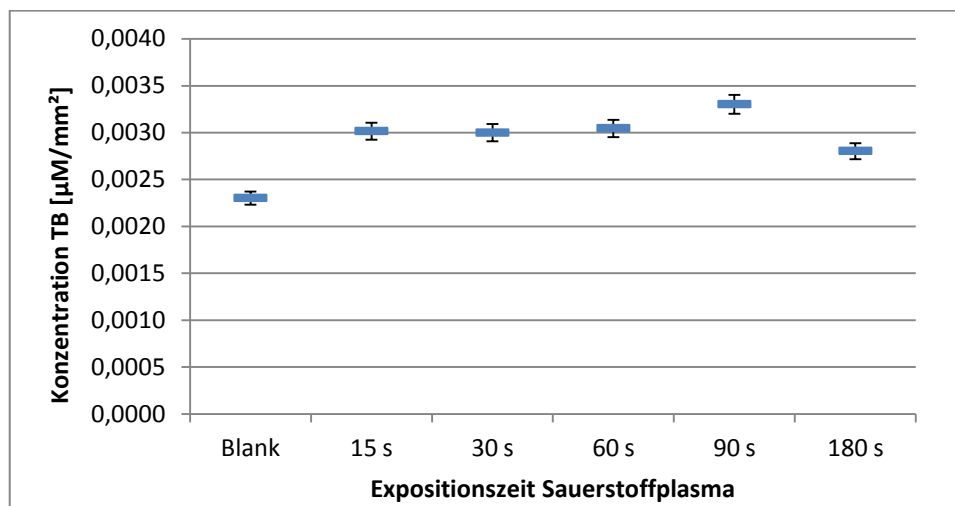


Abbildung 16: Oberflächenkonzentration von Carboxylgruppen auf der PMMA-Oberfläche nach unterschiedlichen Expositionszeiten von Sauerstoffplasma kalkuliert anhand UV-Vis spektroskopischer Detektion mit TB

In Abb. 16 ist zu erkennen, dass die Menge an funktionellen Carboxylgruppen auf der PMMA Oberfläche zwischen 15 und 60 s stabil bleibt und nach einem Maximum bei 90 s Expositionszeit wieder abfällt. Der Blank zeigt im Vergleich zu den behandelten Proben ebenfalls eine recht hohe Dichte an Carboxylgruppen, obwohl natives PMMA kaum Carboxylgruppen enthält (Darain, Wahab, & Tjin, 2012), unterscheidet sich aber signifikant von der 15 s Probe.

4.1.1.2 Nachweis der Plasmaeffizienz durch fluoreszenzbasierten ELISA

Zur weiteren Qualitätskontrolle der Plasmaeffizienz wurde eine Art fluoreszenzbasierter ELISA durchgeführt, bei dem die Plasmaeffizienz über die Fluoreszenzintensität bewertet wurde. Diese Kontrolle könnte auch schnell und unkompliziert im Rahmen der Probenexpansion mit vielen Chips gleichzeitig durchgeführt werden und somit als Qualitätskontrolle dienen.

Die 0-Probe wurde ohne Plasmaexposition auf dieselbe Weise mitfunktionalisiert wie die plasmaexponierten Proben. Abb. 17 zeigt, dass sowohl im Grauwert-Plot als auch beim Vergleich der Intensitäts-Mittelwerte alle Proben von 0-60 s Expositionszeit im gleichen Bereich liegen. Erst nach 90 s ist eine Steigerung der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen, welche bei längerer Expositionsdauer wieder abfällt. Bei der Betrachtung des Plots fällt auf, dass auch innerhalb der einzelnen Spots eine gewisse Variabilität der Grauwerte vorliegt.

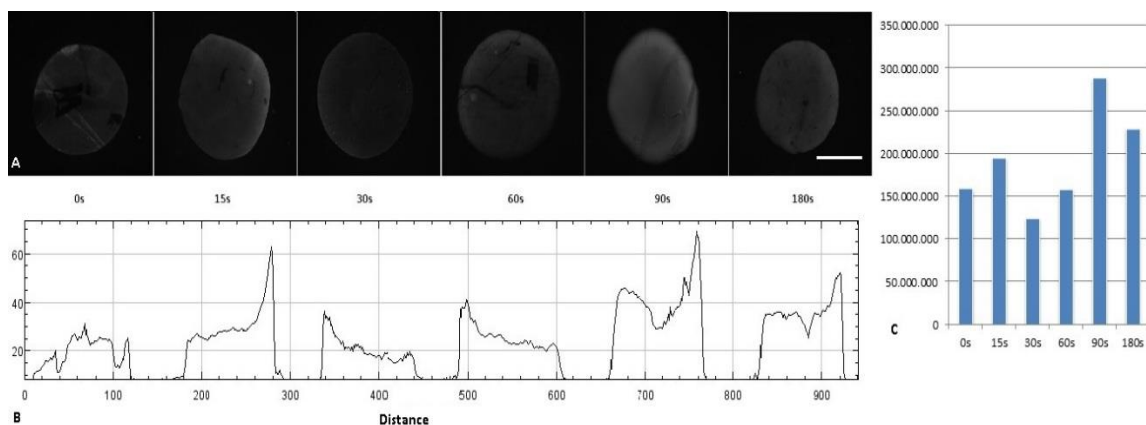


Abbildung 17: A: Vergleich der Fluoreszenzintensität von 1 µl Spots der Primärantikörper [10µg/ml] nach verschiedener Plasmaexpositionszeiten (15-180 s) und Färbung mit Cy3-markiertem Sekundärantikörper[1:100]. B: Plots der Grauwerte bezogen auf die Fluoreszenzintensität der Fotos. C: Vergleichende Darstellung der Mittelwerte der Fluoreszenzintensität einer definierten Fläche. Alle Darstellungen zeigen die höchste Intensität (Höhe der Kurve) bei 90 s Plasmaexpositionszeit, wobei die Varianz innerhalb der Spots häufig recht hoch ist (Schwankung der Kurven über die Breite der Spots). Skala: 500 µm

4.1.1.3 Überprüfung der Plasmaeffizienz über Plasmaindikatoren (Diener) und Kontaktwinkel

Die Firma Diener stellt Plasmaindikatorennetketten zur Überprüfung eines erfolgreich durchgeführten Plasmaprozesses zur Verfügung. Dabei verschwindet ein aufgebracht Indikatorpunkt (braun) nach erfolgreicher Behandlung. Die Indikatoren werden auf das behandelte Bauteil bzw. eine mitgeführte Kontrolle aufgeklebt. Die Indikatoren sind je nach Behandlungsdauer in 6 verschiedenen Stärken erhältlich. Folgende Tabelle stellt die vom Hersteller angegebenen Stärken dar.

Tabelle 3: Stärken der Plasmaindikatoren nach Behandlungsdauer (gilt für eine Anlage des Typs Pico UHP 200 W Generator 100% Leistung mit O₂ Plasma)

Indikator	Behandlungsdauer
Stärke 1	2 min
Stärke 2	4 min
Stärke 3	10 min
Stärke 4	15 min
Stärke 5	30 min
Stärke 6	60 min

Die Plasmaindikatoretiketten wurden ebenfalls bei den bisher verwendeten Expositionenzeiten von 15-180 s mitgeführt. Abbildung 18 zeigt das Resultat. Da Indikatorpunkt 1 eine recht schwache Färbung aufweist, sind Unterschiede zwischen den durchgeführten Zeiten kaum zu detektieren. Stärke 1 ist für eine Expositionszeit von 2 min (180 s) vorgesehen. Einzig bei dieser Expositionszeit ist der Punkt der Stärke 1 blasser und belegt somit den erfolgreich verlaufenden Plasmaprozess. Bei allen anderen Zeiten kann keiner Veränderung festgestellt werden.

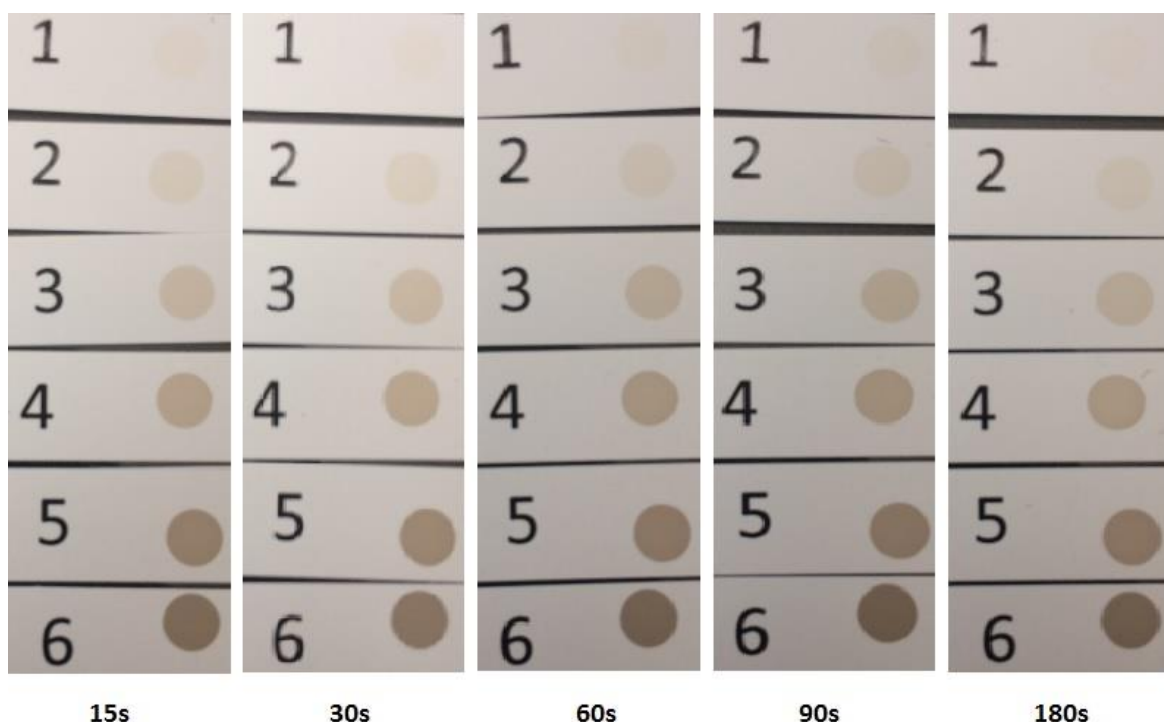


Abbildung 18: Überprüfung der Plasmaexposition mittels Plasmaindikatoretiketten der Firma Diener.

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der Plasmaeffizienz besteht aus einem Kontaktwinkeltest, welcher eine Änderung der Oberflächenspannung nachweist. Dabei wird ein auf die Oberfläche aufgebrachtener Tropfen seitlich im 90° Winkel fotografiert und die Tropfenkonturlinie bzw. ihr Winkel bestimmt (siehe Abb. 19).

Nach Definition gilt ein Winkel kleiner 90° als hydrophil und darüber als hydrophob.

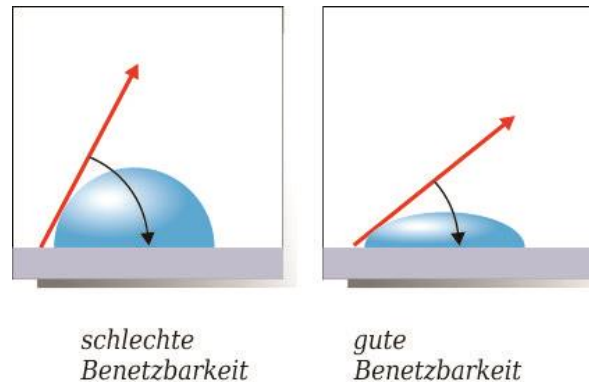


Abbildung 19: Prinzip der Bestimmung des Kontaktwinkels (Tantec GmbH)

Im Laufe der Methodenoptimierung wurde versucht, die Plasmaeffizienz über Kontaktwinkelbestimmung zu beurteilen. Da die Tropfen händisch pipettiert und mittels handelsüblicher Digitalkamera aufgenommen wurden, konnten aufgrund zu hoher Variationen keine reproduzierbaren Daten erzeugt werden. Schon nach kurzen Expositionszeiten war die Oberfläche des PMMA entsprechend hydrophil, dass keine Unterschiede im Kontaktwinkel erhoben werden konnten.

4.1.2 Kopplung von Proteinen an die PMMA Oberfläche über Carbodiimid-Chemie

Für die spezifische Kopplung der Proteine, die mit den CTCs interagieren sollen, an eine PMMA-Oberfläche wurde Carbodiimid-Chemie angewendet. Nachdem die PMMA-Oberfläche durch Sauerstoffplasma aktiviert und Carboxylgruppen generiert wurden, diente der Crosslinker EDC dazu, primäre Amingruppen von beispielsweise Proteinen im Rahmen einer nukleophilen Attacke an die Carboxylgruppen zu binden (Conde et al., 2014). Um ein stabileres Intermediat bei dieser Reaktion zu erhalten, wurde außerdem NHS zugegeben. Zunächst wurde getestet, welche Reaktionsbedingungen mit welchen Zielmolekülen die optimalsten Ergebnisse auf dem plasmabehandelten PMMA liefern. Getestet wurden die direkte Kopplung von Antikörpern sowie zunächst die Funktionalisierung der Oberfläche mit Avidin und nachträglicher Aufbringung des biotinylierten Antikörpers jeweils in verschiedenen Kopplungspuffern.

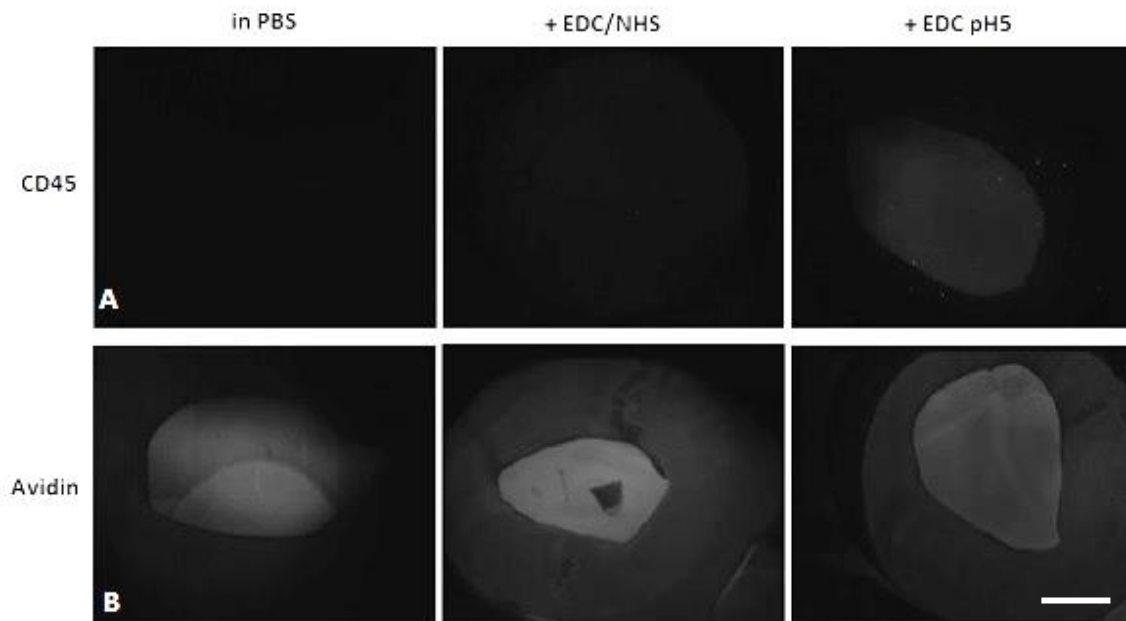


Abbildung 20: Funktionalisierung der plasmabehandelten PMMA-Oberfläche über Carbodiimide in verschiedenen Kopplungspuffern. A: Direkte Kopplung von CD45-Antikörper [10 µg/ml] in PBS, EDC/NHS pH7 und EDC bei pH5. B: Kopplung von Avidin gelöst in PBS, EDC/NHS pH7 und EDC pH5, gefolgt von biotinyliertem CD45-Antikörper [10 µg/ml]. Bei allen Proben Fluoreszenzfärbung mit Anti-Maus Cy3 Sekundärantikörper [1:100]. Skala: 500 µm

In der oberen Reihe (Abb. 20, A) wurde CD45-Antikörper gelöst in PBS, EDC/NHS bei pH 7 oder EDC bei pH 5 direkt an die PMMA-Oberfläche gebunden. Einzig die wässrige Lösung in EDC bei pH 5 zeigte ein schwaches Fluoreszenzsignal. Die Verwendung von 1 mg/ml Avidin, auf welches im zweiten und dritten Reaktionsschritt biotinyliertes CD45 bzw. Anti-Maus Cy3 aufgebracht wurde, erzeugte im Vergleich in allen Lösungsmitteln ein höheres Signal. Hier zeigt die Lösung in 0,1 M EDC und NHS bei pH 7 die höchste Fluoreszenzintensität, gefolgt von der Mischung in PBS. Es erscheint ungewöhnlich, dass das Avidin ohne Kupplungschemie an der plasmabehandelten PMMA-Oberfläche haftet und eine höhere Fluoreszenz als die Kupplung mit EDC bei pH 5 aufweist. Dies könnte auf eine unspezifische Bindung hinweisen.

4.1.3 Auswahl des geeigneten Biotin-bindenden Proteins (Avidin, Polystreptavidin, Neutravidin)

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden zwei Ansätze der Funktionalisierung verfolgt. Zunächst die Funktionalisierung mit einem Biotin-PEG-Amin (Poly(ethylene glycol) 2-aminoethyl ether biotin) per Carbodiimid-Chemie, auf welche zunächst abschnittsweise Biotin-bindende Proteine (wie Avidin, Neutravidin) immobilisiert und darauf dann biotinylierte Antikörper aufgebracht wurden. Bei dieser Methode wurde eine geringere unspezifische Bindung der fließenden Zellen auf-

grund der Passivierung der Oberfläche mit PEG erwartet sowie eine erhöhte Interaktion der Zellen mit den Liganden, dadurch dass innerhalb des Kanals der Abstand zwischen dem Rezeptor auf der Zelle und Liganden auf der Kanaloberfläche reduziert wird (Patel, Thakar, Wong, McLeod, & Li, 2006). Des Weiteren wurde die direkte Funktionalisierung mit Biotin-bindendem Protein via Carbodiimid-Chemie und anschließender Immobilisierung mit biotinylierten Antikörpern untersucht. Diese Methode zeichnet sich durch die Reduzierung um einen Beschichtungsschritt und somit geringererem Zeit und Materialbedarf aus.

Da bei der Verwendung von Avidin eine recht hohe unspezifische Bindekapazität aufgefallen war, wurden verschiedene Biotin-bindende Proteine untersucht. Verglichen wurden Avidin, Polystreptavidin und Neutraavidin. Avidin ist ein Glykoprotein aus Hühnereiweiß und besitzt 4 bindende Untereinheiten für Biotin. Der Vorteil von Neutraavidin gegenüber Avidin sind die synthetisch entfernten Glykosilierungen, was in einem reduzierten pI (6,3; isoelektrischer Punkt) und somit höherer Spezifität resultiert (Polyscience). Polystreptavidin ist ein von der Firma BioTeZ (Berlin) entwickeltes polymerisiertes Streptavidin mit besonders hoher Biotin-Bindekapazität (BioTeZ Berlin Buch GmbH, 2014) mit dem während der Vorversuche gearbeitet wurde.

Bei einer vergleichenden Betrachtung der Grauwerteplots der Funktionalisierung mit Avidin, Polystreptavidin und Neutraavidin auf Biotin-PEG-Amin wurde die höchste Fluoreszenzintensität bei der Verwendung von Polystreptavidin erreicht (Abb. 21). Bei Neutraavidin gelöst in PBS wurden unspezifische Bindungen außerhalb des Neutraavidin Spots festgestellt sowie Inhomogenität in der Fluoreszenzintensität.

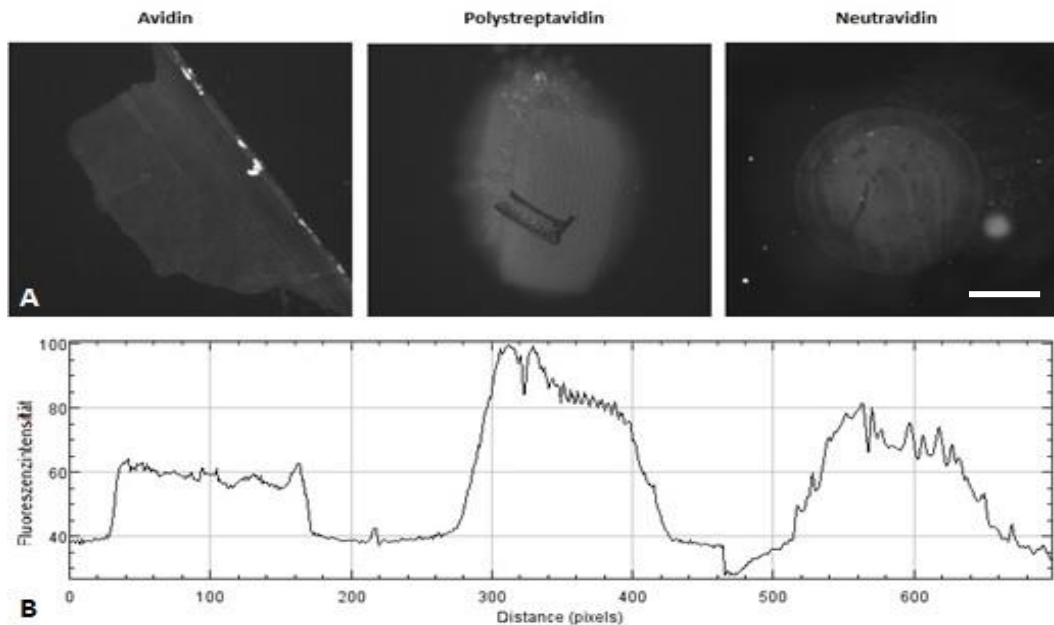


Abbildung 21: A: Fluoreszenzintensität von Avidin, Polystreptavidin und Neutravidin auf einer Biotin-PEG-Amin funktionalisierten Oberfläche mit anschließender Immobilisierung von CD45-Antikörper und Färbung mit Anti-Maus Cy3. Aufgebracht wurde jeweils ein 1 μ l Spot des biotinylierten Primärantikörpers. B: Fluoreszenzintensität als Grauwertplot. Skala: 500 μ m

Für die direkte Funktionalisierung via Carbodiimid-Chemie wurde das in den Vorversuchen verwendete Polystreptavidin Coating Kit (BioTeZ) mit einbezogen, um einen Vergleich der Beschichtungseffizienz zu erhalten. Dieses liefert das Ergebnis mit der schwächsten Fluoreszenzintensität (Abb. 22). Die Fluoreszenzfärbungen von Polystreptavidin und Avidin sind vergleichbar in der Intensität und in der Gleichmäßigkeit der Beschichtung. Bei Polystreptavidin zeigten sich bei der Betrachtung des Grauwertplots unspezifische Bindungen rund um den Antikörper-Spot, was in einer erhöhten Hintergrundfluoreszenz resultiert. Mit der Verwendung von Neutravidin wird eine im Mittel um 66 % höhere Intensität erreicht im Vergleich mit Avidin/Polystreptavidin, mit einer ebenfalls sehr homogenen Schicht. Im Vergleich zu der Beschichtung auf PEG (Abb. 21) zeigten Polystreptavidin und Avidin ähnliche Fluoreszenzintensität, waren dabei aber wesentlich homogener.

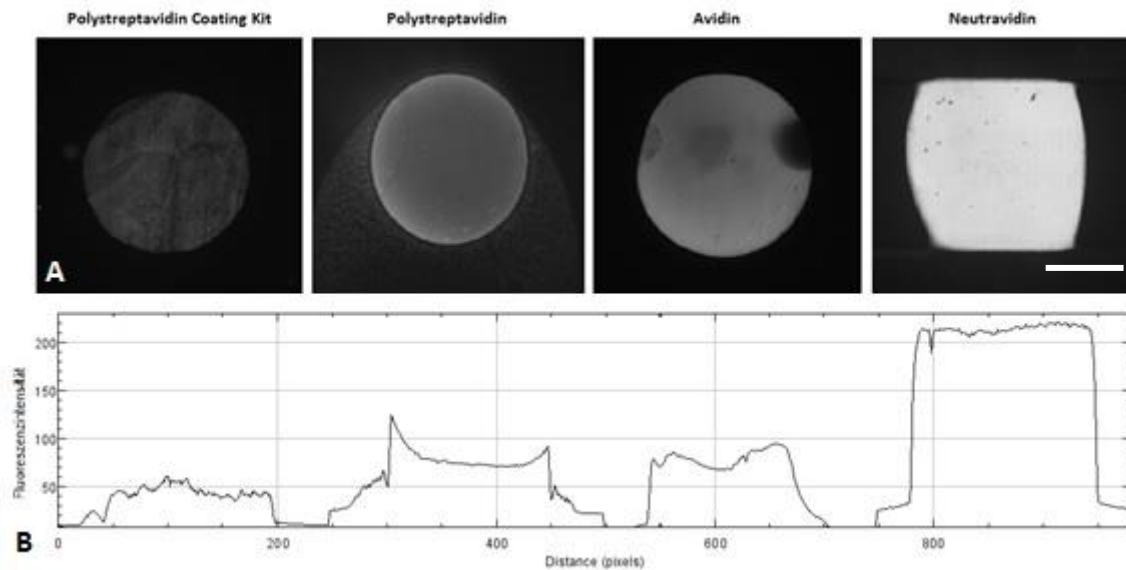


Abbildung 22: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten nach direkter Funktionalisierung via Carbodiimid-Chemie mit anschließender Immobilisierung von CD45-Antikörper und Färbung mit Anti-Maus Cy3 des Polystreptavidin Coating Kits, von Avidin, Polystreptavidin und Neutraavidin. B: Fluoreszenzintensität als Grauwertplot. Skala: 500 μm

4.1.4 Auswahl des geeigneten Puffers für das Spotten von Neutraavidin auf einer Biotin-PEG-Amin funktionalisierten Oberfläche mittels fluoreszenzmikroskopischem Nachweis

Da in den Vorversuchen Unregelmäßigkeiten innerhalb der Funktionalisierung sowie unspezifische Bindungen der Antikörper neben den eigentlichen Spots aufgefallen waren, wurden unterschiedliche Spotting-Puffer für die Verwendung von Neutraavidin auf einer Biotin-PEG-Amin funktionalisierten Oberfläche getestet und mit Biotin-4-Fluorescein [0,15 mg/ml] nachgewiesen. Getestet wurden PBS, 2 % Glycerol in PBS, 10 mM NaHCO_3 , 10 mM NaHCO_3 + 2 % Glycerin sowie PVA als Spotting-Puffer des Neutraavidins als 1000 μm^2 Spots. Abbildung 23 stellt die Ergebnisse vergleichend dar. Die Verwendung von Glycerin resultierte in einer schwachen Bindekapazität des Antikörpers sowie starken unspezifischen Bindungen neben dem Neutraavidin-Spot. Bei Lösung des Neutraavidins in NaHCO_3 + 2 % Glycerin führten die unspezifischen Bindungen neben dem Spot zu höheren Fluoreszenzintensitäten als innerhalb des Spots selbst. PBS, 10 mM NaHCO_3 sowie PVA-Puffer führten jeweils zu sehr gleichmäßigen Ergebnissen in der Spotmorphologie. Einzig bei 10 mM NaHCO_3 erschienen die Ränder des Spots unregelmäßig. Versuche mit 100 mM NaHCO_3 -Puffer zeigten keine wesentlichen Unterschiede in der Spotmorphologie und Intensität (Daten nicht gezeigt). PVA-Puffer zeigte eine minimal geringere Fluoreszenzintensität in der Mitte des Spots, ansonsten aber eine um 25 % höherer Intensität im Vergleich zu 10 mM NaHCO_3 .

Insgesamt zeigte die Verwendung von PVA-Puffer für Neutraavidin die reproduzierbar gleichmäßigste Spotmorphologie mit höchster Fluoreszenzintensität der getesteten Puffer. Bei Verwendung von PBS und NaHCO_3 auf Biotin-PEG-Amin Oberflächen kam es innerhalb der Versuchsreihen zu erheblichen Unterschieden in der Funktionalisierungseffizienz und der Spotmorphologie.

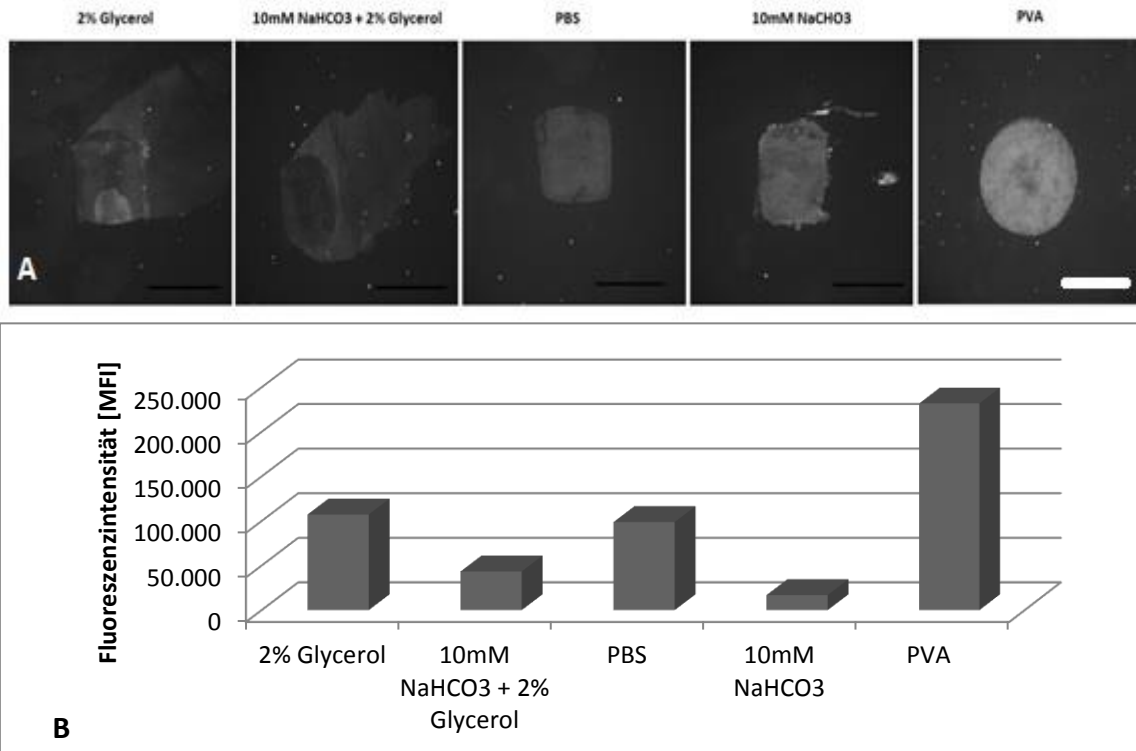


Abbildung 23: Fluoreszenzintensitäten von Neutraavidin [1mg/ml] gelöst in 5 verschiedenen Puffern auf einer Biotin-PEG-Amin funktionalisierten PMMA-Oberfläche. Nach dem Spotten getrocknet und gewaschen mit 500mM NaCl, Fluoreszenznachweis über 0,15 mg/ml Biotin-4-Fluorescein. A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, B: Intensitäten. Skala: 1000 μm

Während der Methodenoptimierung fiel auf, dass die Neutraavidin-Spots vor der weiteren Verwendung getrocknet sein mussten. Noch feuchte Spots resultierten in hohen unspezifischen Bindungen der Antikörper um die Spots herum (siehe Abb. 24)

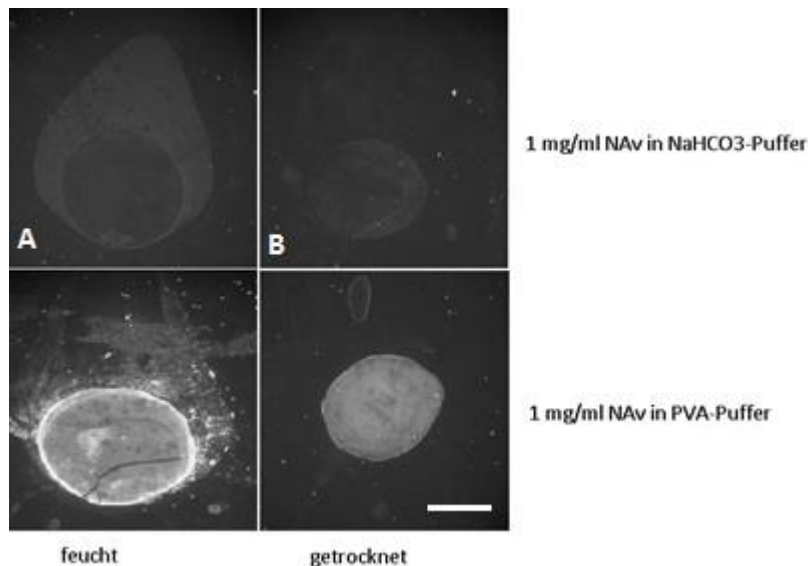


Abbildung 24: Neutravidin in NaHCO₃- sowie PVA-Puffer fluoreszenzmarkiert mit 0,15 mg/ml Biotin-4-Fluorescein. A: Waschschrift bevor Neutravidin auf der Oberfläche getrocknet war, führt zu Verwaschen und Verbreiterung der Spots. B: Neutravidin war getrocknet vor dem Waschschrift mit 500 mM NaCl, was zu gleichmäßigeren Spots und weniger Verwaschungen führt. Skala: 500 µm

Der Waschschrift nach dem Trocknen des Neutravidins wurde mit 500 mM NaCl durchgeführt, da dies in der gleichmäßigsten Spotmorphologie resultierte (Daten nicht gezeigt). Bei der weiteren Verarbeitung erfolgten die Waschschrift in Reinstwasser, da Salzbestandteile in den Waschlösungen Rückstände auf der funktionalisierten Oberfläche hervorriefen.

4.1.5 Bestimmung der Konzentration von Neutravidin bei Spotting auf eine Biotin-PEG-Amin funktionalisierte Oberfläche

Da die Verwendung von 1 mg/ml Neutravidin auch in PVA-Puffer zum Teil in unspezifischen Bindungen der Antikörper um den Spot herum führte, wurde die Konzentration reduziert [0,0125-0,75 mg/ml]. Abbildung 25 zeigt, dass es bis zu einer Konzentration von 0,025 mg/ml Neutravidin in PVA-Puffer zu unspezifischen Bindungen neben den Spots kommt. Allerdings verringert sich auch die Fluoreszenzintensität ab 0,1 mg/ml Neutravidin. Auch fallen weiterhin Unterschiede in der Qualität der Funktionalisierung auf. Einige der Spots zeigen mittig einen Streifen mit reduzierter Fluoreszenz. Bei 0,75 mg/ml Neutravidin ist die Oberfläche des Kunststoffes zerkratzt.

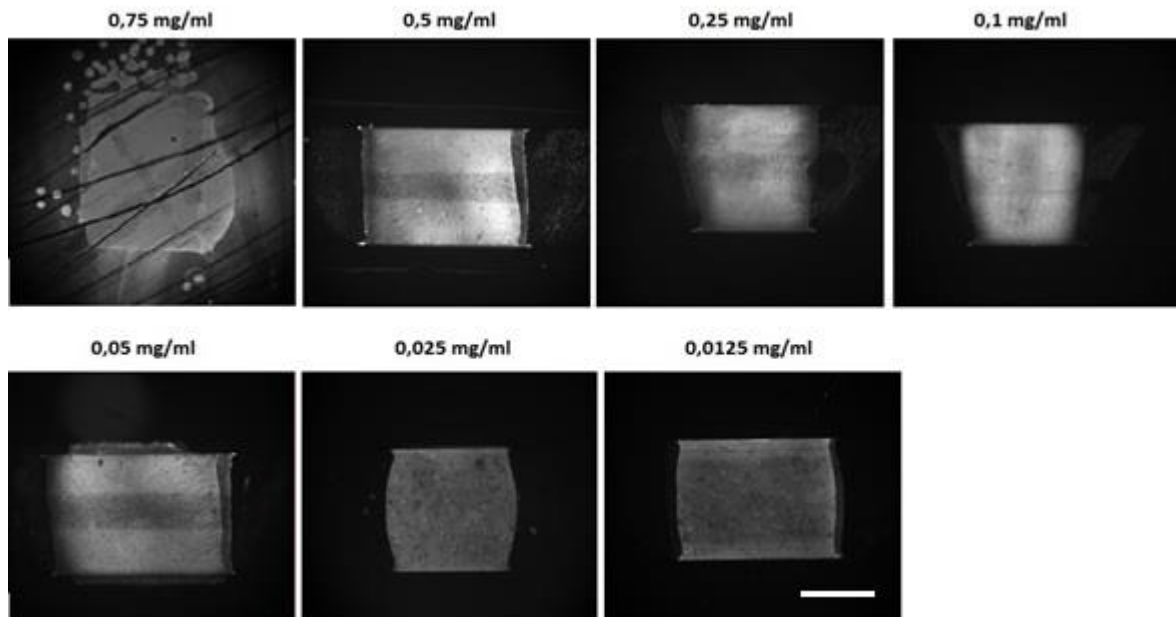


Abbildung 25: Nachweis unspezifischer Bindungen und der Bindekapazität von biotinylierten Antikörpern auf verschiedenen Konzentrationen Neutravidin [0,0125 - 0,75 mg/ml] auf einer Biotin-PEG-Amin funktionalisierten PMMA-Oberfläche. Fluoreszenznachweis über 10 µg/ml biotinyliertes CD45 sowie Anti-Maus-Cy3 [1:100] in PVA-Puffer. Skala: 500 µm

Des Weiteren fielen bei der Methodenoptimierung der Neutravidin-Funktionalisierung auf Biotin-PEG-Amin Schichten trotz protokollierter Versuchsdurchführung immer wieder enorme Differenzen in der Funktionalisierungseffizienz (= Fluoreszenzintensität, Abb. 27) sowie der Homogenität der Beschichtung auf (Abbildung 26).

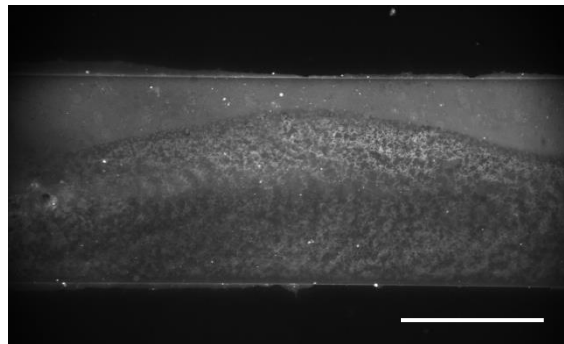


Abbildung 26: Inhomogenität der Funktionalisierung eines mikrofluidischen Kanals mit Biotin-PEG-Amin sowie Neutravidin. Nachweis mit 10 µg/ml biotinyliertem CD45 und Anti-Maus-Cy3 [1:100]. Skala: 500 µm

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde entweder mit glatten PMMA-Stücken oder PMMA mit mikrofluidischen Kanälen gearbeitet. Besonders im Bereich der mikrofluidischen Kanäle kam es häufig zu Inhomogenitäten der Funktionalisierung, woraus eine ungleichmäßige Antikörperverteilung resultierte.

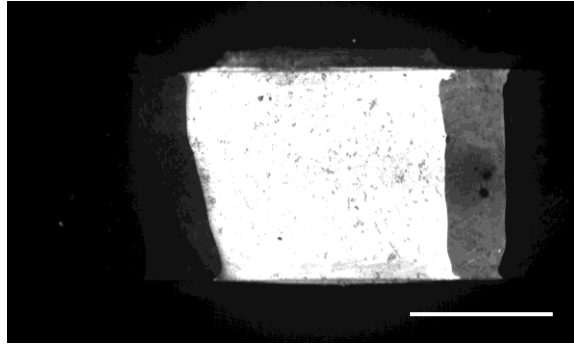


Abbildung 27: Deutlich höhere Fluoreszenzintensität bei 0,025 mg/ml Neutravidin auf Biotin-PEG-Amin und Nachweis mit gleichen Konzentrationen Primär- und Sekundärantikörper und identischen Belichtungsparametern wie in Abb. 25. Skala: 500 μm

Der Nachweis von Neutravidin erfolgte aufgrund des Bindungsprinzips von Avidin und Biotin entweder mit Biotin-4-Fluorescein oder einem biotinyliertem Primärantikörper (meist humanes CD45) und einem dagegen gerichteten Sekundärantikörper mit Cy3. Während der Methodenoptimierung zur Immobilisierung von Neutravidin auf Biotin-PEG-Amin Schichten wurde festgestellt, dass das zunächst zum Nachweis verwendete Biotin-4-Fluorescein eine viel höhere Nachweisgrenze als die Verwendung von Primär- und Sekundärantikörper zeigte.

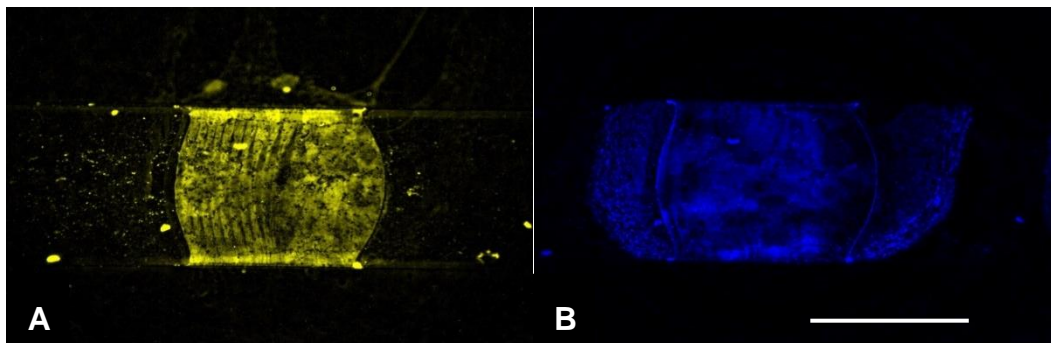


Abbildung 28: Vergleichende Fluoreszenzfärbung des gespotteten Neutravidins mit Biotin-4-Fluorescein (A) sowie biotinyliertem Primär- und Sekundärantikörper (B). Die Verwendung von Antikörper führt zu einer Steigerung der Sensitivität. Skala: 1000 μm

Wurde Biotin-4-Fluorescein zum Nachweis der Neutravidinbindung verwendet, waren visuell kaum unspezifische Bindungen zu erkennen bzw. war die gesamte Hintergrundfluoreszenz sehr hoch. In Abb. 28 ist die Verteilung des Neutravidins seitlich neben den Spots und auch außerhalb der Kanäle erkennbar (A). Bei der Verwendung von Primär- und Sekundärantikörper (B) konnten die unspezifischen Bindungen klarer differenziert werden. Dabei zeigte sich allerdings, dass der Primärantikörper auch ohne Neutravidin-Untergrund auf der Biotin-PEG-Amin Oberfläche immobilisiert wurde und nicht die unspezifische Bindung des Neutravidins dafür verantwortlich war. Abb. 28.B zeigt, dass ursprünglich nur der Bereich in der Mitte mit biotinyliertem Antikörper gespottet wurde. Rechts und links davon hat der

Antikörper unspezifisch gebunden. Dies könnte während des anschließenden Waschschrilles erfolgt sein. Ob der Antikörper allerdings für eine Interaktion mit den Zelloberflächenmarkern zugänglich, oder aber unzugänglich in die PEG-Schicht eingelagert wurde, kann durch Fluoreszenzfärbung allein nicht überprüft werden. Abb. 29 zeigt einen direkten Vergleich der Fluoreszenzintensität von biotinyliertem Primär- und Cy3-markiertem Sekundärantikörper mit und ohne vorherige Immobilisierung von Neutravidin.

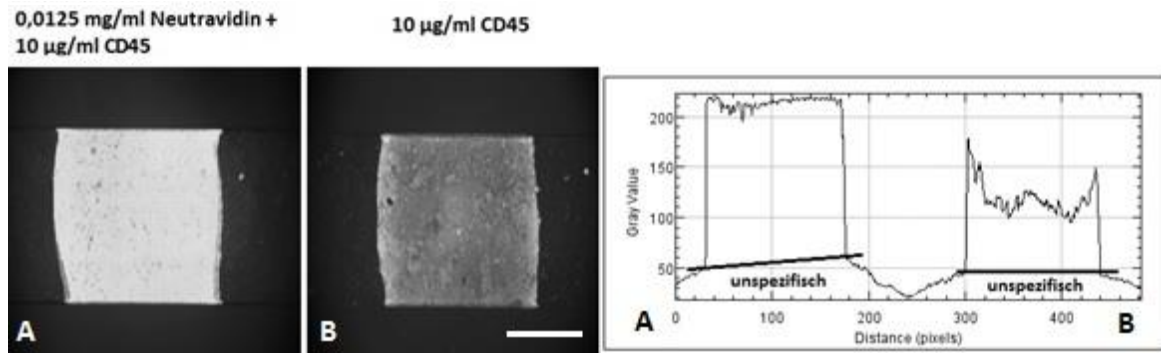


Abbildung 29: Vergleich der Fluoreszenzintensität mit (A) und ohne (B) Neutravidin bei ansonsten identischen Parametern zeigt, dass der Primärantikörper auch ohne vorherige Immobilisierung von Neutravidin an der PEG-Schicht bindet (B) allerdings mit verminderter Effizienz im Fluoreszenzvergleich zu A. Skala: 500 µm

Die Fluoreszenzintensität ohne Neutravidin liegt bei 50 % der Intensität mit Neutravidin. Trotz der geringen Konzentration an Neutravidin sind dennoch unspezifische Bindungen neben dem Spot im Plot zu erkennen.

4.1.6 Charakterisierung der direkten Funktionalisierung der PMMA-Oberfläche mit Neutravidin über Carbodiimide per Fluoreszenzmikroskopie

Da die Verwendung der Biotin-PEG-Amin Schicht zunächst nicht die erwarteten Vorteile u.a. der zielgenauen Immobilisierung des Antikörpers auf vorher mit Neutravidin funktionalisierte Bereiche mit reduzierten unspezifischen Bindungen lieferte, wurde in einem weiteren Ansatz die direkte Funktionalisierung des PMMAs mit Neutravidin über Carbodiimid-Chemie untersucht. Abb. 30 zeigt die Reproduzierbarkeit der Beschichtung mit biotinyliertem Primär- und Cy3-markiertem Sekundärantikörper bei 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen bei gleichen Aufnahmeparametern.

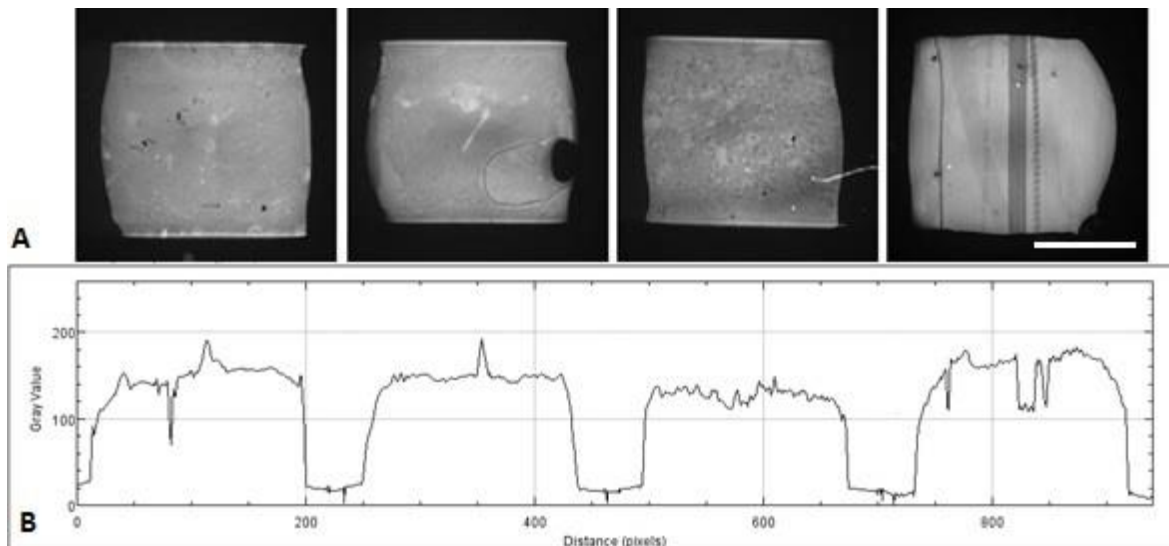


Abbildung 30: Reproduzierbarkeit der Funktionalisierung mit 1 mg/ml Neutravidin sowie 0,1 M EDC/NHS nach Sauerstoffplasma bei 4 unabhängigen Proben. Beschichtung mit 10 $\mu\text{g/ml}$ biotinyliertem CD45 und Cy3-markiertem Anti-Maus Antikörper [1:100]. A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. B: Grauwerteplot, Skala: 500 μm

Der Plot und die Bilder zeigen eine homogene Beschichtung mit annähernd gleichbleibender Intensität. Um die Spots herum waren kaum unspezifische Bindungen der Antikörper auszumachen und die Hintergrundfluoreszenz des Kanals war ebenfalls sehr gering. Es bestanden wesentlich weniger Variationen in Homogenität und Spotmorphologie als bei der Verwendung einer Biotin-PEG-Amin Schicht. Ob und in wie weit die Interaktionen der Zellen mit den Antikörpern durch die verschiedenen Beschichtungen beeinflusst werden, wird in späteren Versuchen geklärt.

4.1.7 Stabilität der gespotteten Antikörper innerhalb der Kanäle bei Durchfluss

Da die immobilisierten Antikörper innerhalb der mikrofluidischen Kanäle während der Messung einer Scherbeanspruchung durch das durchgeleitete Transportmedium der Zellen ausgesetzt waren, erfolgte eine Begutachtung der Stabilität der Antikörper über einen Zeitraum von 90 min auf einer Neutravidin funktionalisierten Oberfläche nach Fluoreszenzfärbung (Abb. 31).

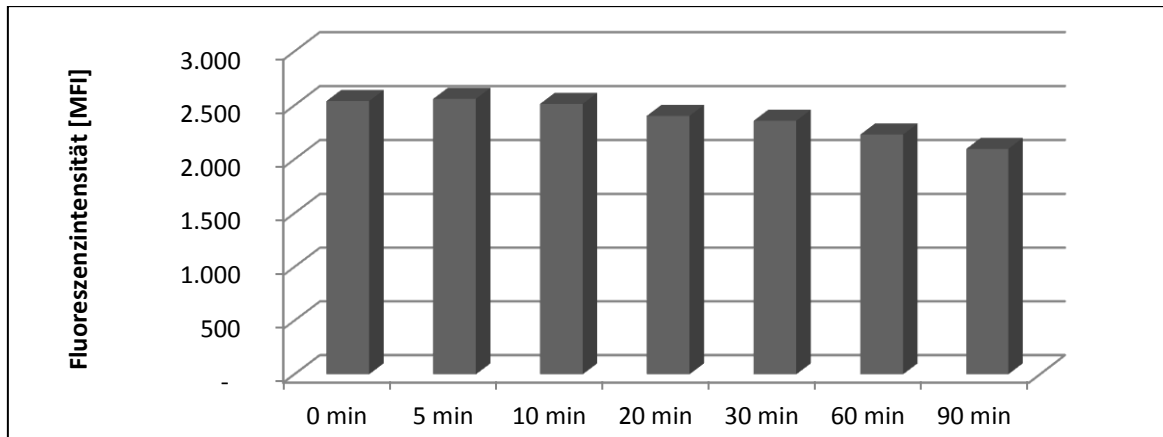


Abbildung 31: Abnahme der Fluoreszenzintensität der Antikörperspots zur Kontrolle der Stabilität der Beschichtung unter Durchfluss des Zellträgermediums über 90min

Der Grafik ist zu entnehmen, dass die Fluoreszenzintensität als Zeichen der Stabilität der Beschichtung innerhalb von 90 min leicht abnimmt. Bei dem Versuch wurde PBS mit einer Geschwindigkeit von ca. 300 $\mu\text{m/s}$ durch den Kanal geleitet und derselbe Spot nach 0, 5, 10, 20, 30, 60 und 90 min fotografiert. Es scheint zu einem minimalen, aber recht gleichmäßigen Verlust an Fluoreszenzintensität unter Fluss zu kommen. Versuche mit Biotin-PEG-Amin funktionalisierten Kanälen führten zu identischen Ergebnissen.

4.2 Überprüfung der Antikörperfunktionalität nach dem Spotting in Abhängigkeit vom Spotting-Puffer

Wie schon in Abschnitt 3.8.14 beschrieben, ist die Auswahl eines geeigneten Puffers für das *non-contact* Spotting der Antikörper ebenfalls obligat. Um eine Denaturierung der Antikörper durch Verdunstung zu vermeiden, wurden verschiedene Spotting Puffer getestet. Darunter zwei kommerziell erhältliche Puffer der Firma Schott (NEXTERION® Spot und Spot PB) sowie den schon beim Neutravidin Spotting verwendeten PVA-Puffer. Zunächst erfolgte eine Vorauswahl über einen Biotin-HRP ELISA, wobei das Biotin-HRP als Antikörper-Analogon in drei unterschiedlichen Puffern gelöst, in eine Avidin-funktionalisierte ELISA-Platte gespottet wurde. Bei der Positivkontrolle wurde das Biotin-HRP gelöst in PBS vorsichtig in das Well hineinpipettiert und das Well zur Vermeidung der Verdunstung mit qPCR-Folie abgeklebt.

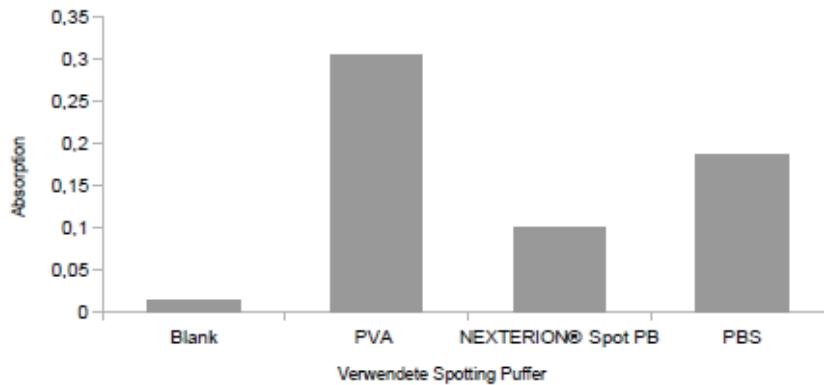


Abbildung 32: Antikörperaktivität nach dem Spotting in 3 unterschiedlichen Spotting Puffern mittels Biotin-HRP ELISA. Je höher die Absorption [nm] des Biotin-HRP bei 655 nm im ELISA-Reader, desto mehr funktionelles Enzym befand sich nach dem Spotten auf den Platten und konnte durch TMB gelöst werden.

In diesem Vergleich erzielte der PVA-Puffer, mit einer 1/3 höheren Absorption als bei der Verwendung von PBS, das beste Ergebnis. Das schwächste Ergebnis lieferte der NEXTERION® Spot PB-Puffer, der von der Firma Schott für das Spotting von Proteinen entwickelt wurde.

Die fluoreszenzbasierte Überprüfung mittels Primär- und Sekundärantikörper zeigte weitestgehend übereinstimmende Ergebnisse mit dem Biotin-HRP ELISA (Abb. 32). Als Negativkontrolle diente durch Hitze (95 °C, 10 min) denaturierter CD45-Primärantikörper, welcher in PBS verdünnt und analog zu den anderen Proben gespottet wurde. Die höchste Fluoreszenzintensität wurde hier bei der Verwendung des NEXTERION® Spot PB-Puffers erzielt. Die Verwendung von PBS oder PVA-Puffer liefert vergleichbare Fluoreszenzintensitäten. Der NEXTERION® Spot Puffer war ähnlich der Negativkontrolle. Im Rahmen der Methodenoptimierung wurden weitere Puffer getestet, die zum Großteil hohe Anteile Glycerin [10-20 %] sowie Triton-X 100 oder Tween 20 enthielten. Da diese Versuche keine verwertbaren Informationen hervorbrachten, sind die Ergebnisse hier nicht vorgestellt.

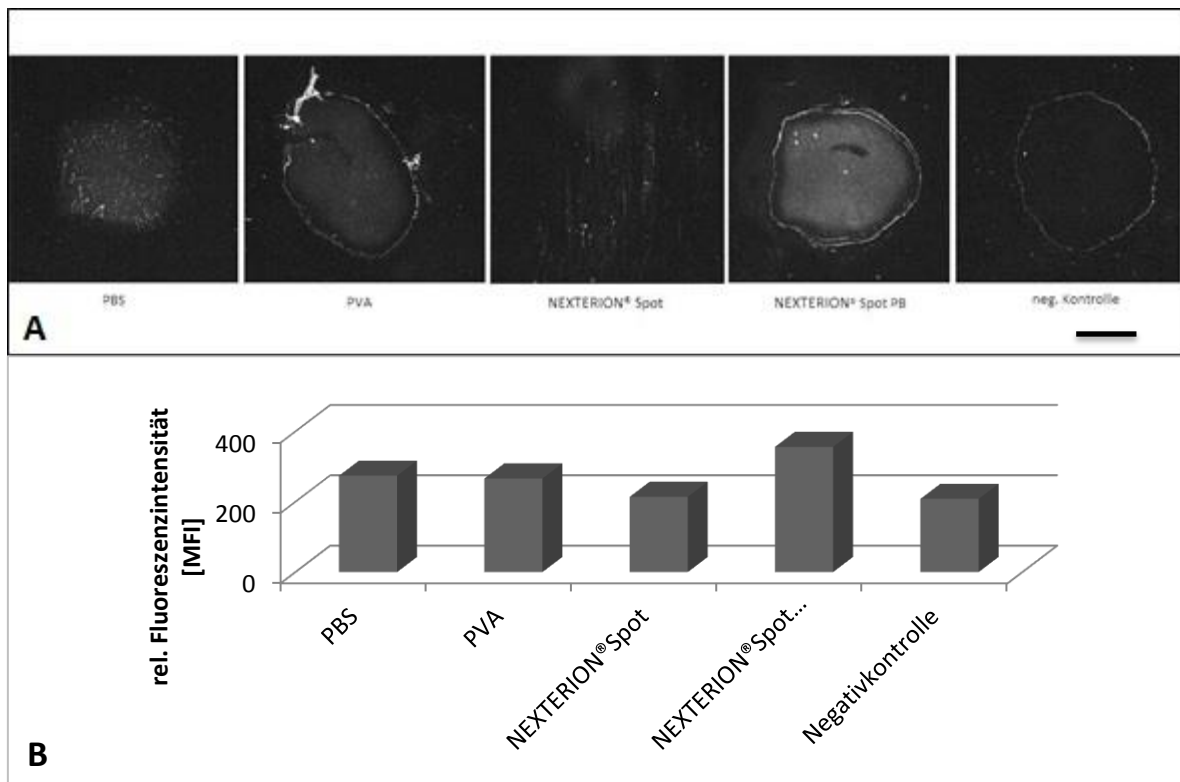


Abbildung 33: Fluoreszenzintensität als Kontrolle der Antikörperfunktionalität nach dem Spotting von Primärantikörper in 4 unterschiedlichen Puffern und anschließender Färbung mit Sekundärantikörper. Negativkontrolle: Durch Hitze denaturierter Primärantikörper in PBS. A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, B: Messwerte, Skala: 500 μm

Nachdem diese Vorauswahl getroffen wurde, erfolgte eine Evaluation des Zellverhaltens auf die Puffer PVA und NEXTERION® Spot PB. Dafür wurde ein mit Biotin-PEG-Amin funktionalisierter Chip mit 800 x 20 μm geradem Kanal zunächst per Microarray Spotter abschnittsweise mit Neutravidin funktionalisiert und anschließend auf den Neutravidin-Spots biotinylierter Maus-CD45 Antikörper [66 $\mu\text{g}/\text{ml}$], in den verschiedenen Puffern gelöst, immobilisiert. Nach Waschschritten und Verschluss des offenen Kanalsystems wurden CD45-positive Jurkat-Zellen bei 200 $\mu\text{m}/\text{s}$ über 30 min durch den Kanal geleitet und ihre Reaktion auf die Antikörper-Spots mittels MedeaLab-Software und Kamera untersucht. Als Negativkontrollen dienten jeweils Spots der Puffer ohne Antikörper und zur Positivkontrolle ein Neutravidin-Spot, welcher mit Biotin-4-Fluorescein angefärbt wurde. Es wurde festgestellt, dass die Zellen besonders spezifisch an den Spots mit CD45 in PVA-Puffer hafteten (Abb.34). Innerhalb dieser Kanalabschnitte zeigten sich ansonsten wenig unspezifische Anhaftungen der Zellen. Anschließend wurde die Verteilung des Maus-CD45 Antikörpers durch einen Cy3-Markierten Sekundärantikörper per Fluoreszenz sichtbar gemacht (Abb. 34 + 35, Panel B, gelbe Bereiche).

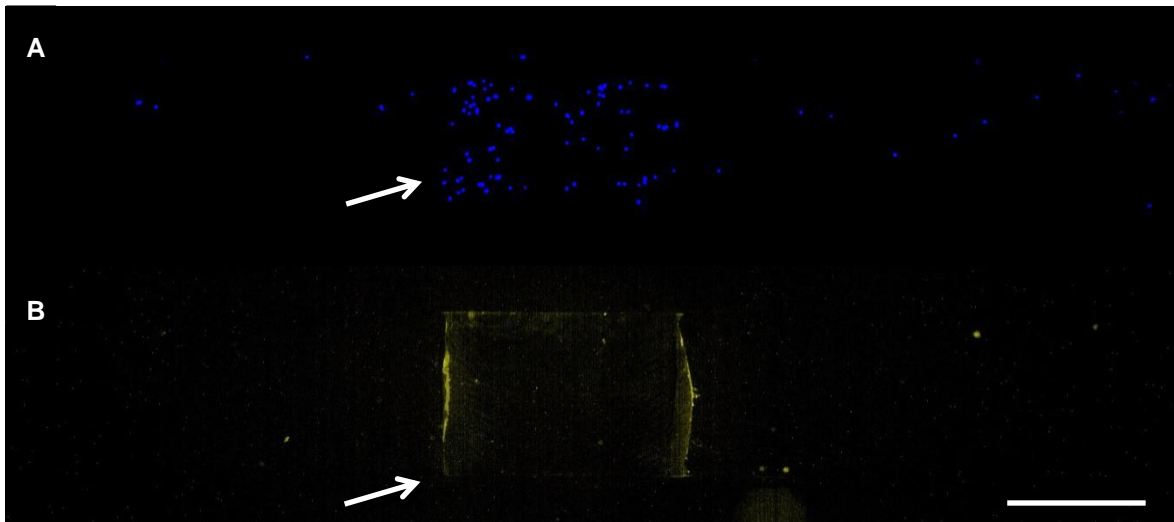


Abbildung 34: A: Spezifische Haftung von Hoechst33342-gefärbten Jurkat-Zellen an CD45-beschichtete Bereiche bei Verwendung von PVA-Puffer unter UV-Laser innerhalb eines $800 \times 20 \mu\text{m}$ straight channel Chips. B: Visualisierung des mit Maus-CD45-Antikörper beschichteten Bereichs über Anti-Maus Cy3 Sekundärantikörper [1:100]. Skala: $500 \mu\text{m}$

In den Abschnitten des Kanals, welche die Antikörper-Spots gelöst in NEXTERION® Spot PB aufwiesen, waren deutlich mehr unspezifische Haftungen der Zellen bei reduzierter Zellzahl in den beschichteten Bereichen zu verzeichnen (Abb.35). Die Negativkontrollen zeigten keine Bindung der Zellen.

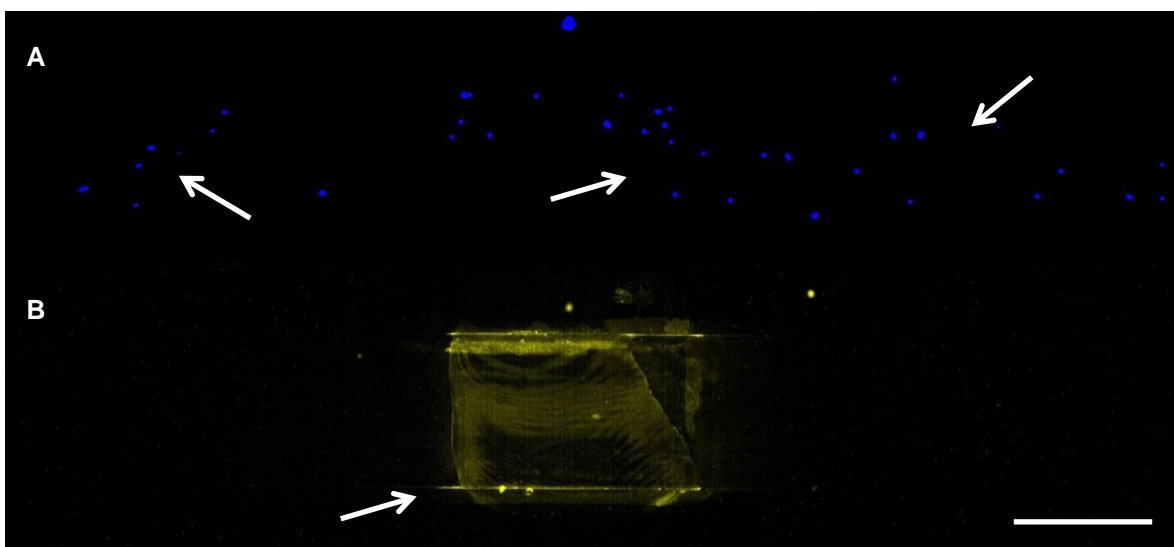


Abbildung 35: A: Unspezifische Haftung von Hoechst33342-gefärbten Jurkat-Zellen über den gesamten Kanalbereich bei Verwendung von NEXTERION® Spot PB-Puffer unter UV-Laser innerhalb eines $800 \times 20 \mu\text{m}$ straight channel Chips. B: Visualisierung des mit Maus-CD45-Antikörpers beschichteten Bereichs über Anti-Maus Cy3 Sekundärantikörper [1:100]. Skala: $500 \mu\text{m}$

4.3 Methodenetablierung zur Isolierung und Charakterisierung von Zellen anhand zellspezifischer Oberflächenmarker

4.3.1 Anreicherung potentieller Tumorzellen über Depletion der PBMC mithilfe der MACS®-Microbeads Technologie

Die angestrebte Analyse von Einzelzellen innerhalb des Lab-on-a-Chip Systems macht eine Depletion der anderen Blutzellen (PBMC) und somit eine Anreicherung der Zielzellen obligat. Aufgrund diverser Vorarbeiten aus der Inneren Klinik (Tumorforschung) Universitätsklinikum Essen (Nel, 2013; Nel et al., 2013) sowie etablierten Isolierungsmethoden in der CTC-Forschung (Raimondi, Nicolazzo, & Gradi-lone, 2015; Shin et al., 2011) wurde die Depletion der PBMC über den hämato-poetischen Marker CD45 mithilfe von magnetischen Microbeads angestrebt. Dafür wurde zunächst evaluiert, welche Menge an Beads für eine möglichst hohe Deple-tion von 1×10^6 PBMC verwendet werden muss. Für die Versuchsreihen wurde Ge-sundblut freiwilliger Spender verwendet, welches mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert wurde (siehe Kapitel 3.8.4). Diese Me-thode lieferte Wiederfindungsraten von 100% (Nel, 2013). Weiterführend wurde die Wiederfindungsrate von kanzerogenen Kulturzellen (HCT116) in peripheren Blutproben in Form von Spiking-Experimenten bestimmt, welche als Surrogat für zirkulierende Tumorzellen fungierten. Nach der Depletion mit anti-CD45 beschich-teten Beads wurden beide Fraktionen auf Objektträger aufgebracht und die Zellen per Immunfluoreszenz gegen CD45, EpCAM sowie DAPI gefärbt. Anschließend erfolgte die halbautomatisierte Detektion der Zellzahlen beider Fraktionen mittels Olympus BX51 Fluoreszenzmikroskop und MedeaLab Count Software an 5 aus-gewählten Stellen der Proben. Abbildung 36 stellt den prozentualen Anteil an CD45-positiven PBMC dar, welche in der Durchfluss-Fraktion (CD45-) wiederge-funden wurden. Diese Fraktion stellt den Anteil dar, der die angereicherten, CD45-negativen Tumorzellen enthalten sollte, welche unbeeinflusst durch die Säule pas-sieren. Für die Depletion von 1×10^7 Zellen wird vom Hersteller die Verwendung von 20 μ l Beads empfohlen. Jedoch zeigt Grafik 36, dass eine deutliche Reduzie-rung der Beadmenge ohne Verlust der Depletionseffizienz möglich ist. Bei der Verwendung von 1×10^6 Zellen waren schon 2 μ l Beads ausreichend, um keine CD45-positiven Zellen in der Durchfluss-Fraktion detektieren zu können, was einer Depletion von 99-100 % entsprechen würde. Eine weitere Reduktion der Bead-menge resultierte allerdings in einer langsamen Steigerung der Anzahl CD45-

positiver Zellen in der Durchflussfraktion. Die Reduzierung der Beadmenge von 20 auf 2 μl würde allerdings schon eine Verbesserung der Kosten- bei ausreichender Depletionseffizienz bedeuten.

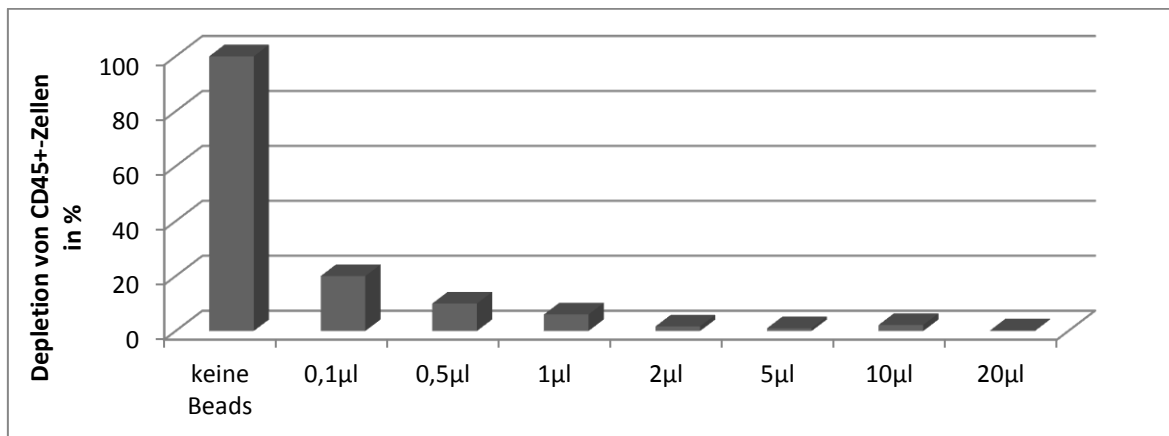
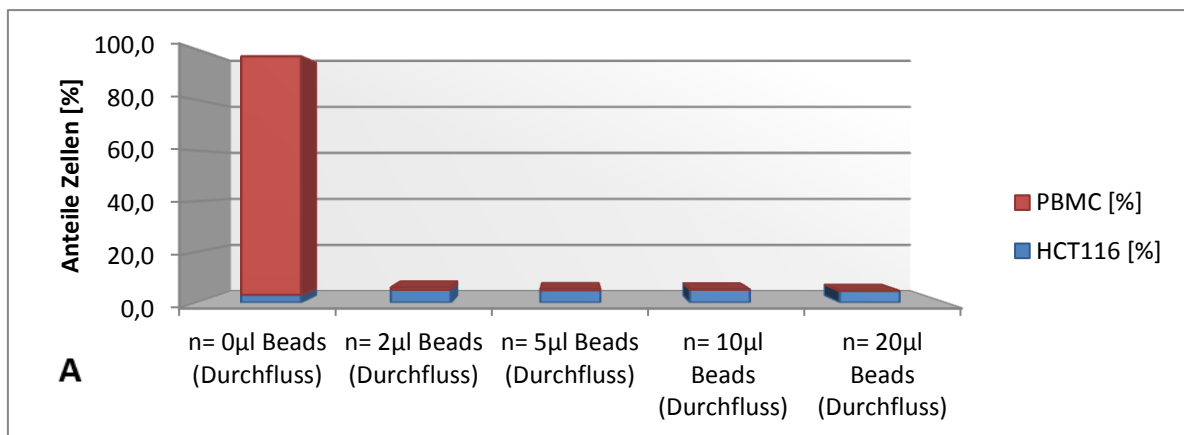


Abbildung 36: Die Prozentuale Depletion von CD45-positiven Zellen (PBMC) in Abhängigkeit von der MACS®-Beadmenge [0,1-20 μl] zeigte eine steigende Depletionseffizienz mit steigender Beadeinsatzmenge bei konstanter Ausgangszellzahl [1×10^6].

In weiteren Versuchen wurde die Anreicherung von Tumorzellen aus dem Buffy Coat (=PBMC) durch Zugabe von karzinogenen Kulturzellen unter Verwendung unterschiedlicher MACS®-Beadmengen bestimmt. Dabei wurden vor der Depletion HCT116-Kulturzellen im Verhältnis 1:50 mit den PBMC des Buffy Coats gemischt und später die jeweiligen Anteile innerhalb der depletierten Fraktionen bestimmt (Abb. 37).



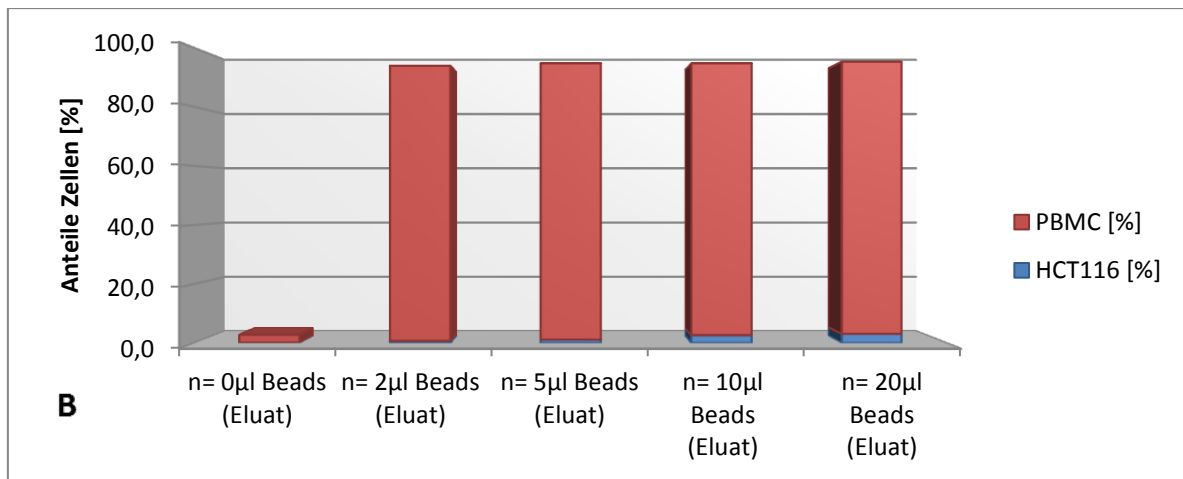


Abbildung 37: Prozentuale Anteile von PBMC und HCT116 nach Depletion in Abhängigkeit von der CD45 MACS®-Beadmenge. Ursprüngliches Mischungsverhältnis 1:50 (HCT116:PBMC). A: Durchflussfraktion, B: Eluatfraktion

Zunächst wurde festgestellt, dass die Ergebnisse der Depletion von PBMC ohne Spiking bestätigt werden konnten. Die Verwendung von 2 µl MACS®-Beads resultierte in einer 96 %igen Depletion der PBMC. Nach der Verwendung von ≥ 5 µl CD45 MACS®-Beads konnten in der Durchflussfraktion (CD45 negativ) nur noch sehr vereinzelt CD45-positive PBMC nachgewiesen werden (0 - 0,4 %, siehe Tabelle 4). In Bezug auf die Gesamtzellzahl lagen in der angereicherten Durchflussfraktion von der Beadmenge unabhängig ca. 5 % Tumorzellen vor (4,6 – 5,1 %). Auffällig war die Reduktion der Gesamtzahl der wiedergefundenen Zellen beider Fraktionen auf bis zu 30 % der Anfangszellzahl bei steigender Beadmenge. Ebenfalls erhöhte sich der Anteil an Tumorzellen in der beadgebundenen Eluatfraktion mit steigender Beadmenge. Ohne Beadmarkierung verblieben rund 2,6 % der PBMC innerhalb der Säule.

Tabelle 4: Durchschnittliche prozentuale Anteile der Wiederfindung von ursprünglich 1×10^6 HCT116-Kulturzellen und PBMC nach Depletion mit unterschiedlichen Mengen anti-CD45 MACS®-Beads nach Spiking im Verhältnis 1:50 (n=10)

	HCT116 [%]	PBMC [%]	Anteil an Gesamtzellzahl [%]
keine Beads (Durchfluss)	3,1	94,1	97,2
2µl Beads (Durchfluss)	5,1	0,9	6
5µl Beads (Durchfluss)	4,9	0,4	5,3
10µl Beads (Durchfluss)	5,1	0,1	5,2
20µl Beads (Durchfluss)	4,6	0,0	4,6
keine Beads (Eluat)	0,2	2,6	2,8
2µl Beads (Eluat)	0,7	93,2	93,9
5µl Beads (Eluat)	1,2	93,6	94,8
10µl Beads (Eluat)	2,7	92,1	94,8
20µl Beads (Eluat)	3,1	92,2	95,3

Diese Versuche boten eine gute Orientierung, dass eine Reduzierung der anti-CD45-Beadmenge zur Depletion durchaus möglich ist, sollten aber bei der Anreicherung von CTC aus Buffy Coat nochmals überprüft werden, da sich die Eigenschaften von Kultur- und Primärzellen durchaus unterscheiden können. Des Weiteren zeigten die verwendeten LD-Säulen eine recht hohe Abweichungsquote durch im MACS-Puffer enthaltene Luftblasen. Vor der Durchführung sollte der Puffer entgast und währenddessen auf eine vorsichtige Resuspendierung der Proben und luftblasenfreie Beschickung der Säulen geachtet werden.

4.3.2 Untersuchung zellspezifischer Oberflächenmarker mittels des Lab-on-a-Chip Systems im Vergleich zu Ergebnissen von Immunfluoreszenzfärbung und Genexpressionsanalysen

Im Laufe der Methodenoptimierung wurde, beispielsweise bei der Auswahl des Antikörper-Spotting-Puffers, festgestellt, dass durch den Kanal fließende Jurkat-Zellen spezifisch an den Anti-CD45-beschichteten Bereichen hafteten. Des Weiteren konnte auch eine steigende Anzahl haftender Jurkat-Zellen bei einer Erhöhung der Antikörperkonzentration beobachtet werden.

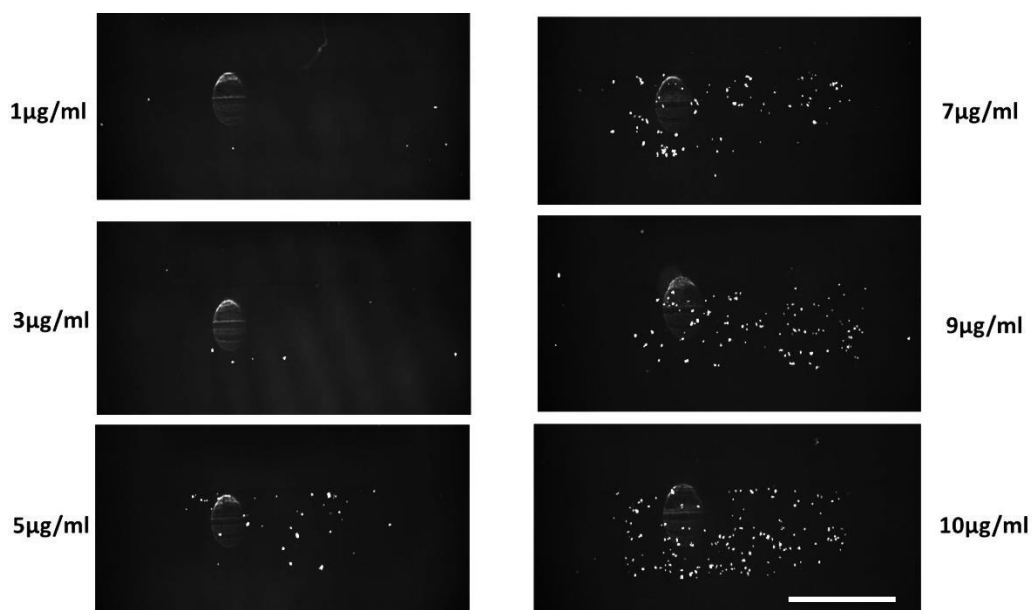


Abbildung 38: Mikroskopische Darstellung der steigenden Anzahl haftender fluoreszenzmarkierter Jurkat-Zellen an steigende Konzentrationen CD45-Antikörper [1-10 µg/ml] innerhalb eines 800 x 20 µm mikrofluidischen Kanals. Skala: 500 µm

Im nächsten Schritt erfolgte die weitergehende Untersuchung des Verhaltens vier verschiedener karzinogener Zelllinien (Jurkat, K562, A549, HCT116) auf drei ausgewählte Oberflächenantigene (CD45, EGFR, EpCAM) innerhalb des Lab-on-a-Chip Systems. Der Fokus lag aufgrund der vorherigen Beobachtungen zunächst auf der spezifischen, konzentrationsabhängigen Anhaftung der Zellen an antikör-

per-beschichteten Bereichen. Diese Ergebnisse wurden mittels Immunfluoreszenzfärbungen (IF) derselben Antikörper sowie Genexpressionsanalysen mit quantitativer RT-PCR auf ihre Plausibilität hin überprüft. Dabei entsprechen die Lab-on-a-Chip Versuche und Immunfluoreszenzfärbungen einen Nachweis der Proteinexpression auf der Zelloberfläche, die mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden und die qRT-PCR Versuche einem Nachweis der Genexpression auf mRNA-Ebene.

Verwendet wurden zwei Leukämie-Zelllinien (Jurkat, K562), welche als Suspensionskulturen kultiviert wurden sowie zwei adhärent wachsende karzinogene Zelllinien (A549, HCT116), um eventuelle Unterschiede zwischen den Kultivierungsbedingungen und Karzinomarten evaluieren zu können. Als Antikörper wurde CD45 (Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor Typ C) zum Nachweis hämatopoetischer Zellen ausgewählt, da es eine Reihe zellulärer Prozesse reguliert und auch in der Onkogenese mitwirkt (Nakano, Harada, Morikawa, & Kato, 1990). Der EGF-Rezeptor (*Epidermal Growth Factor Receptor*) kommt physiologisch in den Zellmembranen aller humanen Zellen vor, wird aber bei vielen Krebsarten hochreguliert und resultiert dann in einem unkontrollierten Tumorwachstum (Wieduwilt & Moasser, 2008). Als EpCAM werden epitheliale Zelladhäsionsproteine bezeichnet, welche unter anderem Zell-Zell-Kontakte vermitteln und als diagnostische Marker verschiedener Krebsarten dienen (Lin et al., 2012). Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung der Protein-Expressionsmuster der verwendeten Zelllinien nach Literaturrecherche, nach welcher Jurkat- und K562-Zellen CD45-positiv, EGFR- und EpCAM-negativ sein sollten, A549 sollten CD45- und EpCAM-negativ und EGFR-positiv sein sowie HCT116 EGFR- und EpCAM-positiv und CD45-negativ.

Tabelle 5: Expression der Oberflächenmarker nach Literaturrecherche

Zelllinie	CD45	Quelle	EGFR	Quelle	EpCAM	Quelle
Jurkat	+	(Koretzky, Picus, Schultz, & Weiss, 1991)	-	(Kumai et al., 2013)	-	(Meng et al., 2015)
K562	+	(Shin et al., 2011)	-	(Naruse et al., 2002)	-	(Cheng et al., 2014)

A549	-	(Thomas, 1989)	+	(Diaz et al., 2010)	-	(Kim et al., 2009)
HCT116	-	(Thomas, 1989)	+	(Matsuo et al., 2011)	+	(Cheng et al., 2014)

Die Zelllinien wurden als Einzelzellsuspension mit 1000 Zellen/ μl mit einer Geschwindigkeit zwischen 200-300 $\mu\text{m/s}$ über 20 min durch den 800 x 20 μm mikrofluidischen Kanal geleitet. Der Kanal wurde mit 7 unterschiedlichen Konzentrationen [2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 $\mu\text{g/ml}$] des jeweiligen Antikörpers in 1000 μm langen Abschnitten beschichtet. Anschließend wurde die Zellzahl auf allen Antikörper-Spots mittels MedeaLab Count bestimmt und auf 1000 Zellen normiert. Die Methoden-etablierung zur Immunfluoreszenzfärbung und qRT-PCR erfolgte in früheren Arbeiten an der Inneren Klinik (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen (Nel, 2013).

Wie Abb. 39 zeigt, konnten Jurkat-Zellen spezifisch an CD45-beschichteten Bereichen immobilisiert werden. An EGFR und EpCAM-Spots hafteten keine Jurkat-Zellen, in Übereinstimmung mit der theoretischen Annahme.

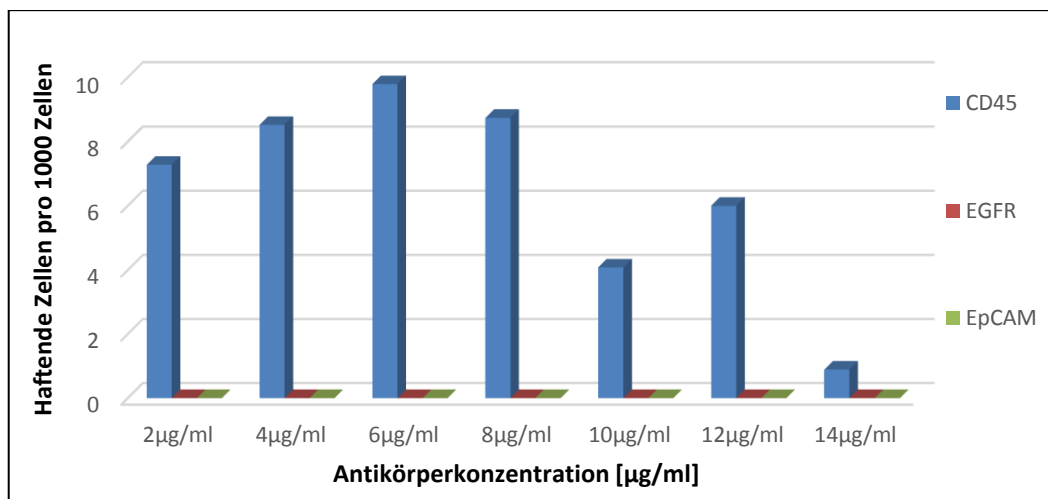


Abbildung 39: Haftung von Jurkat-Zellen an CD45 beschichtete 1000 μm lange Bereiche [2-14 $\mu\text{g/ml}$] innerhalb des 800 x 20 μm mikrofluidischen Kanals nach 20 min Durchflusszeit. Keine Zellhaftung an EGFR und EpCAM beschichtete Bereiche steigender Konzentrationen [2-14 $\mu\text{g/ml}$]. Normiert auf 1000 durchfließende Zellen. n=4

Bei den Konzentrationen 2, 4 und 6 $\mu\text{g/ml}$ konnte eine Abhängigkeit zwischen der Anzahl der haftenden Jurkat-Zellen und der CD45-Konzentration beobachtet werden. Bei den höheren Antikörperkonzentrationen war die Anzahl an haften Zellen sehr unterschiedlich und nicht mit der Konzentration korrelierbar. Der Abgleich der Genexpression per quantitativer RT-PCR und Immunfluoreszenzfärbung bestätig-

te die Ergebnisse des Lab-on-a-Chip Versuches. Bei der RT-PCR erfolgte eine relative Quantifizierung anhand des nicht-regulierten, dauerhaft exprimierten *housekeeping*-Gens β -Actin. Der durchschnittliche ct-Wert von Jurkat-cDNA mit CD45 lag mit 22,7 nur knapp über dem vom β -Actin (18,9) und Bestätigt somit die Expression. Die Expression der EGFR- und EpCAM-Gene liegen mit ct-Werten von 38,9 und 31,3 eher auf dem Niveau der Negativkontrolle (36,1). Auch bei der Immunfluoreszenzfärbung zeigen die Jurkat-Zellen ein eindeutig positives Signal auf CD45, während sich EGFR und EpCAM Proben nicht wesentlich von der Hintergrundfluoreszenz des Sekundärantikörpers unterscheiden (Abb. 40). Diese Ergebnisse bestätigen, dass Jurkat-Zellen CD45-Gene exprimieren, Oberflächenproteine produzieren und deshalb an den CD45-beschichteten Bereichen haften.

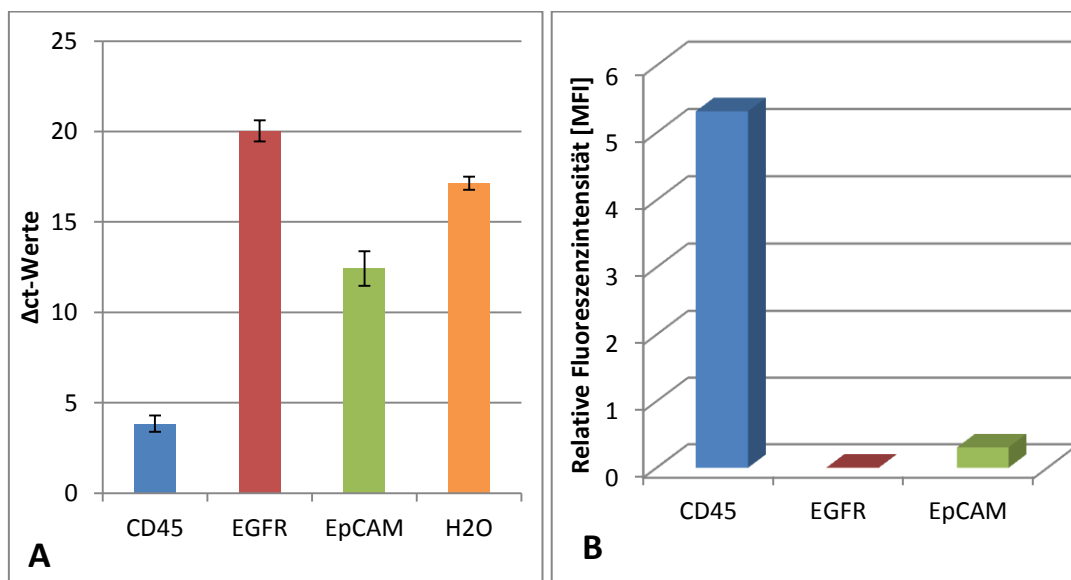


Abbildung 40: A) Δ ct-Werte der Expression von CD45, EGFR und EpCAM auf Jurkat-Suspensionszellen unter Verwendung des Housekeeping-Gens β -Actin sowie dH₂O als Negativkontrolle. n=3. B) Relative Fluoreszenz nach Immunfluoreszenzfärbung von Jurkat-Zellen mit den Primärantikörpern CD45, EGFR und EpCAM nach Abzug des Signals des anti-Maus Cy3 Sekundärantikörpers (Cy3 Ms).

Die Ergebnisse der K562-Zellen fielen mit dem Lab-on-a-Chip System nicht so eindeutig aus wie bei den Jurkat-Zellen. Abb. 41 zeigt, dass insgesamt wesentlich weniger Zellen an den Spots gehaftet haben und somit die Unterscheidung der Spezifität der Anhaftung im Vergleich zu unspezifischen Haftungen in unbeschichteten Bereichen schwieriger wird. Abweichend von den theoretischen Annahmen (CD45+, EGFR/EpCAM -) wurde hier eine Reaktion der Zellen auf EpCAM-Antikörper festgestellt.

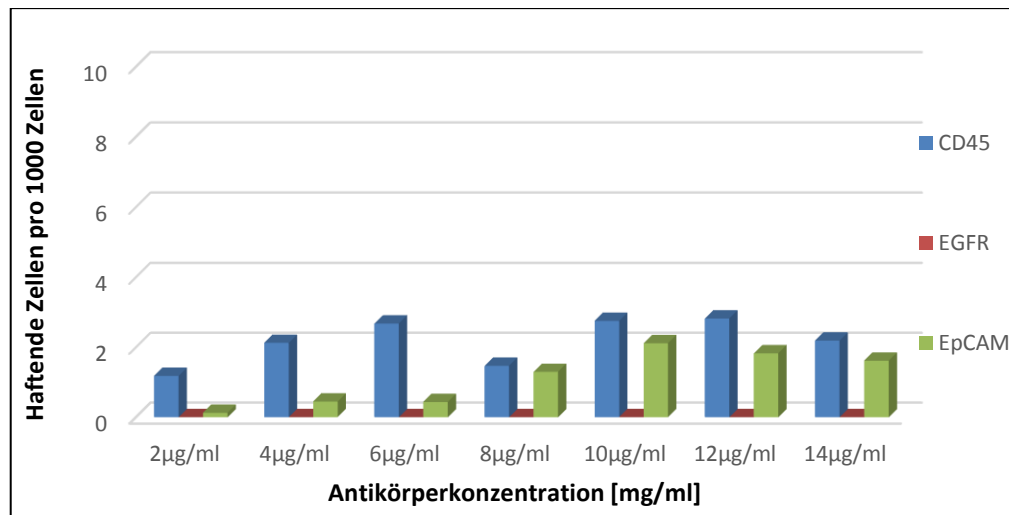


Abbildung 41: Haftung von K562 Leukämiezellen an CD45, EGFR und EpCAM beschichtete 1000 µm lange Bereiche [2-14 µg/ml] innerhalb des 800 x 20 µm mikrofluidischen Kanals nach 20 min Durchflusszeit. Keine Haftung an EGFR beschichtete Bereiche. Normiert auf 1000 durchfließende Zellen. n=4

Auch bei der zweiten Suspensionszelllinie wurden die Anhaftungs-Ergebnisse des Chips mittels RT-PCR und IF bestätigt. Dort konnten nur geringe Unterschiede der Expressionsmuster festgestellt werden. Sowohl PCR als auch IF zeigen eine höhere Expression des EpCAM-Antigens im Vergleich zu CD45 und auf keiner Ebene die Expression von EGFR. In der qRT-PCR fällt eine hohe Standardabweichung der EpCAM-Ergebnisse auf. Nach Wiederholung des Versuchs konnte der Wert mit geringerer Abweichung bestätigt werden. Übereinstimmend mit den Chip-Ergebnissen zeigte auch die Immunfluoreszenz geringe Intensitäten, was allgemein auf eine niedrige Expressionsrate der getesteten Proteine hinwies (Abb.42).

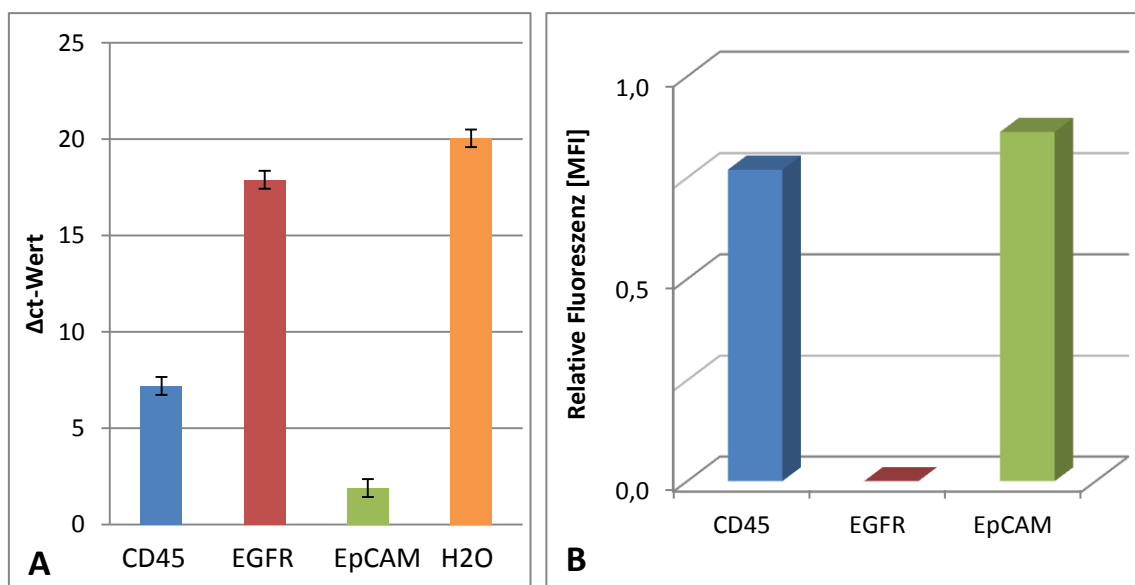


Abbildung 42: A) Δ ct-Werte der Expression von CD45, EGFR und EpCAM auf K562-Suspensionszellen unter Verwendung des Housekeeping-Gens β -Actin sowie dH₂O als Negativkontrolle. n=3. B) Relative Fluoreszenz nach Immunfluoreszenzfärbung von Jurkat-Zellen mit den Primärantikörpern CD45, EGFR und EpCAM nach Abzug des Signals des anti-Maus Cy3 Sekundärantikörpers (Cy3 Ms)

Abbildung 43 stellt die Anhaftung von A549-Zellsuspensionen im Lab-on-a-Chip System dar. Der Literatur entsprechend, verhält sich diese Zelllinie CD45 negativ und es haften keine Zellen in diesen Bereichen. Konträr zu den Rechercheergebnissen in der Literatur zeigte sich allerdings eine Haftung an EpCAM-beschichteten Bereichen. Ebenfalls positive Signale konnten in Bezug auf die Expression von EGFR verzeichnet werden, da an allen Antikörperkonzentrationen Zellen hafteten. Auffällig war allerdings, dass diese Zelllinie einige Zellcluster gebildet hatte sowie erhöhte unspezifische Bindungen in unbeschichteten Kanalbereichen vorwies. Im Gegensatz zu den anderen Zelllinien, welche in unbeschichteten Bereichen so gut wie nicht hafteten, zeigte sich dadurch nicht so ein klares Bild, mit welchen Antikörpern die Zellen spezifische Interaktionen zeigten und mit welchen nicht.

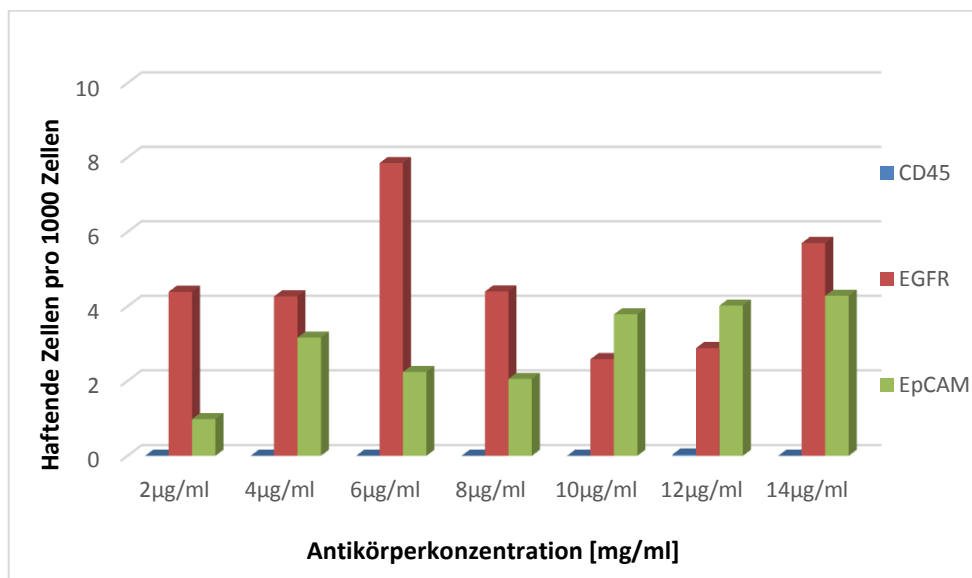


Abbildung 43: Haftung von A549 Adenokarzinomzellen an EGFR und EpCAM beschichtete 1000 µm lange Bereiche [2-14 µg/ml] innerhalb des 800 x 20 µm mikrofluidischen Kanals nach 20 min Durchflusszeit. Keine Anhaftung an CD45 beschichtete Bereiche. Normiert auf 1000 durchfließende Zellen. n=4

Bei der Durchführung der Genexpressionsanalyse via RT-PCR der A549-Zellen zeigten sich hohe Standardabweichungen beim *housekeeping*-Gen, welches im Normalfall konstant bei einem ct-Wert zwischen 17-20 liegen sollte. Auch lag der ct-Wert des *housekeeping*-Gens mit einem Durchschnitt von 32 sehr hoch und damit im Bereich der Negativkontrollen, welche kein Template beinhalten und deshalb einen hohen ct-Wert erwarten lassen. Die ct-Werte der Testgene ließen durchgehend auf keine Expression der Proteine schließen, da sie ebenfalls im Bereich der Negativkontrolle lagen. Auch durch mehrmaliges Wiederholen des Versuchs ließen sich keine anderen Ergebnisse erzeugen. Aufgrund dieser implausib-

len Ergebnisse, die auf ein Problem mit der Genexpression der Zelllinie an sich hindeuteten, wurde auf die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung verzichtet.

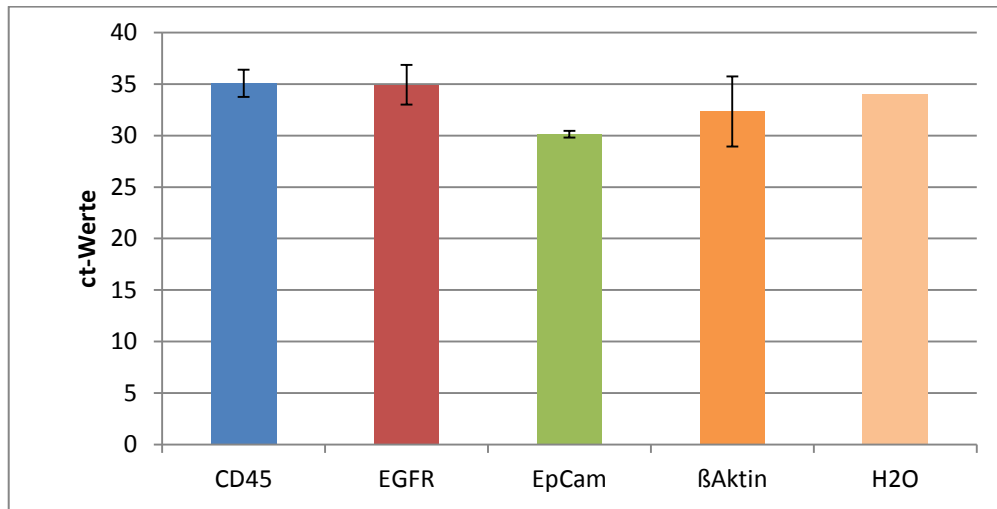


Abbildung 44: ct-Werte der Expression von CD45, EGFR und EpCAM auf A549 Adenokarzinomzellen unter Verwendung des Housekeeping-Gens β-Actin sowie dH₂O als Negativkontrolle. n=3.

Bei der Proteinexpressionsbestimmung der HCT116 Kolonkarzinomzellen innerhalb des mikrofluidischen Chips zeigte sich eine massive Haftung an EpCAM-beschichteten Bereichen. Die durchschnittliche Anzahl von haftenden pro 1000 Zellen stieg hier auf das 5-6 fache der Zellzahl der anderen als positiv interpretierten Zelllinien. Die Proteinexpression von EGFR konnte anhand der Anhaftungs-Ergebnisse ebenfalls als positiv angesehen werden, die Expression von CD45 als negativ.

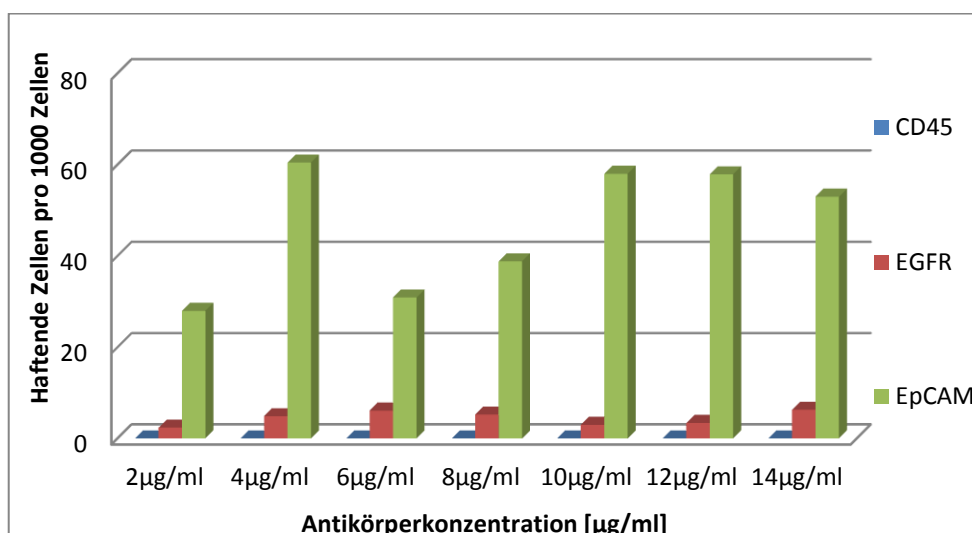


Abbildung 45: Haftung von HCT116 Kolonkarzinomzellen an EpCAM beschichtete 1000 µm lange Bereiche [2-14 µg/ml] innerhalb des 800 x 20 µm mikrofluidischen Kanals nach 20 min Durchflusszeit. Keine Anhaftung an CD45 und minimale Anhaftung an EGFR-beschichtete Bereiche derselben Konzentrationsreihe. Normiert auf 1000 durchfließende Zellen. n=4

Die Ergebnisse der RT-PCR bestätigten bei EpCAM auf Genexpressionsebene die Resultate der, innerhalb des Chips und durch Immunfluoreszenz erhaltenen, Proteinexpression von HCT116. Von der Literatur und Lab-on-a-Chip Experimenten abweichend ließen sowohl RT-PCR als auch IF auf keine Expression von EGFR auf HCT116-Zellen schließen. Bei der RT-PCR zeigte sich aufgrund des niedrigeren ct-Wertes eher eine Expression von CD45 als von EGFR, allerdings lagen beide Werte über dem der Negativkontrolle (Abb. 46). Bei der Immunfluoreszenz lagen die Signale von EGFR und CD45 im Bereich der Negativkontrolle. Die Negativkontrolle der PCR war in diesem Fall mit einem ct-Wert von 25 und einer hohen Standardabweichung zu niedrig, was auf eine Kontamination hindeuten könnte.

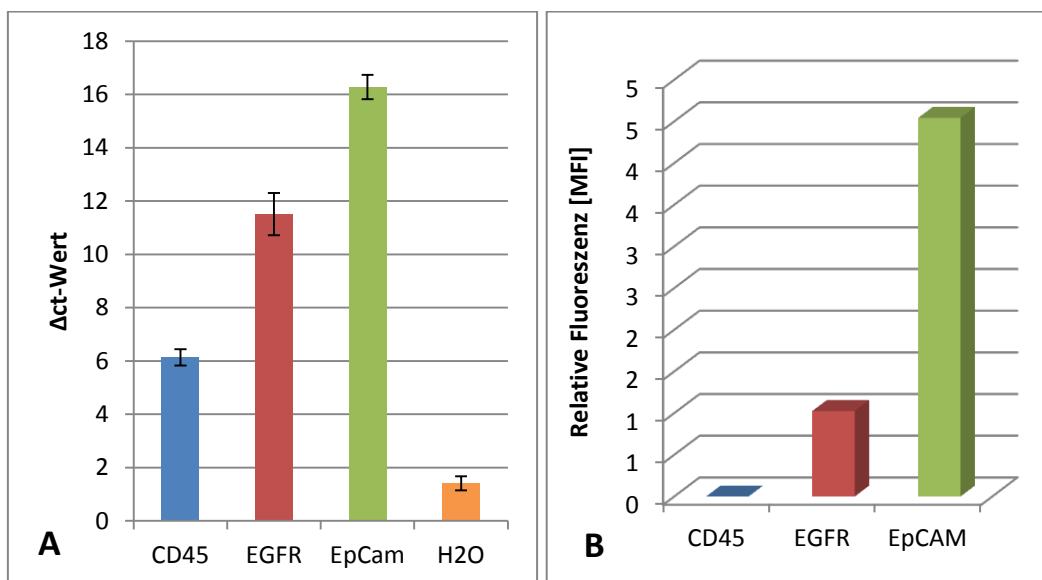


Abbildung 46: A) Δ ct-Werte der Expression von CD45, EGFR und EpCAM auf HCT116-Kolonkarzinomzellen unter Verwendung des Housekeeping-Gens β -Actin sowie dH₂O als Negativkontrolle. n=3. B) Relative Fluoreszenz nach Immunfluoreszenzfärbung von Jurkat-Zellen mit den Primärantikörpern CD45, EGFR und EpCAM und anti-Maus Cy3 Sekundärantikörper (Cy3 Ms).

Bei allen Lab-on-a-Chip Experimenten zeigten sich zwischen den einzelnen Versuchen hohe Abweichungen bei der Anzahl der haftenden Zellen. Aufgrund dessen wurde auch auf die Einführung von Fehlerindikatoren verzichtet. Die Konzentrationsabhängigkeit der Anhaftung konnte nur teilweise bestätigt werden. Bei den meisten Versuchsreihen stieg zunächst zwar die Anzahl haftender Zellen mit steigender Konzentration, bei den höheren Antikörperkonzentrationen kam es aber oft wieder zu reduzierter Anhaftung.

4.3.3 Isolierung von potentiellen Tumorzellen über zellspezifische Oberflächenmarker anhand des Lab-on-a-Chip Systems unter Verwendung von CTC-Surrogaten

Die Haftungsversuche deuteten auf eine spezifische Anhaftung von Zellen innerhalb des Lab-on-a-Chip Systems hin. Im nächsten Schritt der Methodenoptimierung wurde die Isolierung potentieller Tumorzellen aus Buffy Coat-Zellen (PBMC, CD45+, EpCAM-) getestet. Dafür wurde Blut gesunder Spender mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und die PBMC isoliert. Diese Zellsuspension wurde im Anschluss mit HCT116-Kolonkarzinomzellen (EpCAM+, CD45-) im Verhältnis 50:1 gespikt, welche als CTC-Surrogat dienten. Der mikrofluidische Kanal wurde mit jeweils drei Konzentrationen EpCAM und CD45 [2, 6, 10 µg/ml] in 1000 µm langen Abschnitten gespottet und die Zellen über 20 min durch den Kanal geleitet. Im Anschluss wurde die Zellzahl beider Fraktionen, durch unterschiedliche Fluoreszenzfärbung der Populationen differenzierbar, auf den Spots bestimmt und auf 1000 Zellen normalisiert.

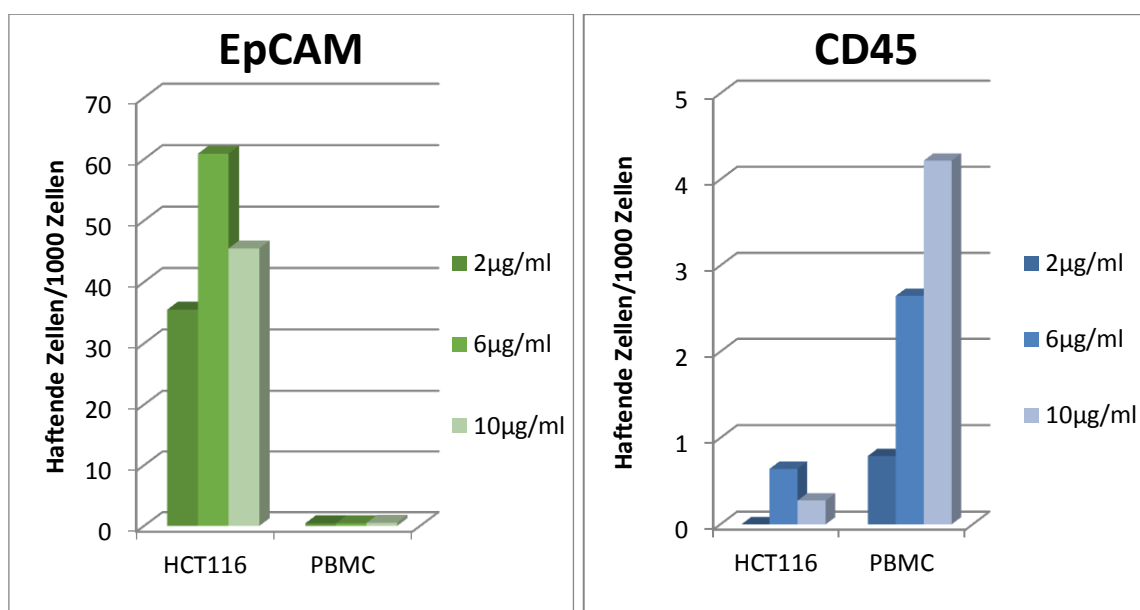


Abbildung 47: Isolation von HCT116-Kolonkarzinomzellen aus PBMC nach 1:50 Spiking. Links: Haftende HCT116 und PBMC (pro 1000) Zellen an 3 Konzentrationen EpCAM-Antikörper. Rechts: Haftende HCT116 und PBMC (pro 1000) Zellen an 3 Konzentrationen CD45-Antikörper.

Wie die Abbildungen zeigen, konnte durchaus eine Separation der Zellen erreicht werden. Allerdings war die Wiederfindungsrate von haftenden Zellen in Bezug auf die eingeleitete Gesamtzellzahl sehr gering. Auch das Verhältnis von HCT116 zu PBMC stimmte auf den Spots nicht mit dem 1:50 Spiking überein. Die unterschiedlichen Konzentrationen betrachtet, wurden die HCT116 in den Verhältnissen 1:35 [2 µg/ml], 1:20 [6 µg/ml] und 1:11 [10 µg/ml] angereichert. Durch die hohe Anzahl

an PBMC und die Normalisierung war nicht zu erkennen, dass die PBMC im Gegensatz zu den HCT116 im kompletten Kanalbereich unspezifisch hafteten (Abb. 48 + 49). Dies deutete auf unterschiedliches Adhärenzverhalten zwischen Primär- und Kulturzellen hin. Auch war das Spikingverhältnis mit 1:50 recht hoch gewählt für die Simulation einer CTC-Isolierung.

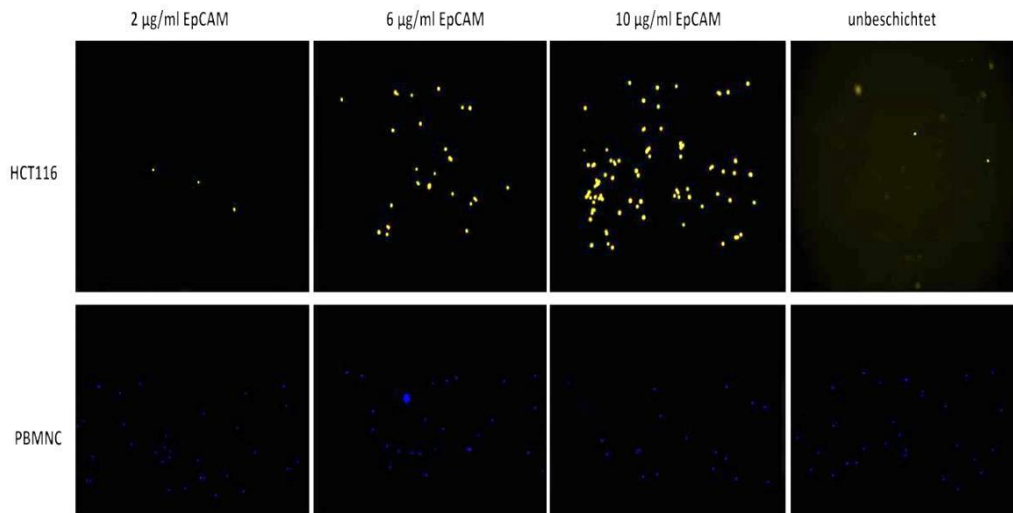


Abbildung 48: Anhaftung von HCT116- und PBMC Zellen an 3 Konzentrationen EpCAM-Antikörper [2, 6, 10 µg/ml]

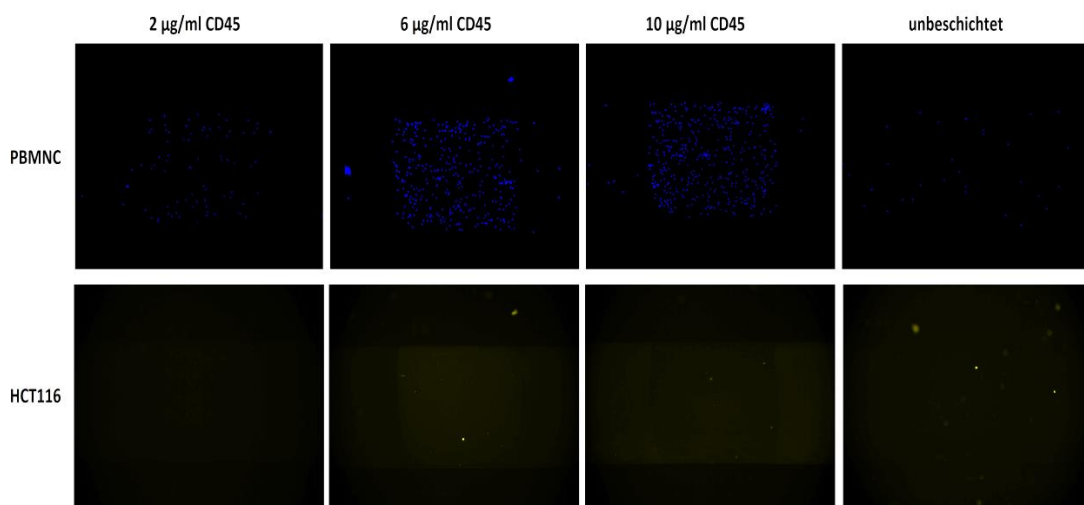


Abbildung 49: Anhaftung von HCT116- und PBMC Zellen an 3 Konzentrationen CD45-Antikörper [2, 6, 10 µg/ml]

4.4 Analyse des Zell-Rollens auf Antikörper-funktionalisierten Bereichen innerhalb des Lab-on-a-Chip Systems

4.4.1 Kalkulation des Scherstresses im laminaren System

Die theoretische Berechnung des Shear Stress für eine parallele Durchflusskammer (flow chamber) erfolgte nach Formel (6) (siehe Kapitel 3.8.15).

Tabelle 6: Theoretische Kalkulation des Scherstresses bei Fließgeschwindigkeiten zwischen 0,05 und 0,4 mm/s.

v =Fließgeschwindigkeit [mm/s]	T Shear stress [dyn/cm²]
0,05	0,18
0,075	0,27
0,1	0,35
0,125	0,44
0,15	0,53
0,175	0,62
0,2	0,71
0,225	0,80
0,25	0,89
0,275	0,97
0,3	1,06
0,325	1,15
0,35	1,24
0,375	1,33
0,4	1,42

Somit sollte der Shear stress in dem verwendeten Kanalsystem bei Fließgeschwindigkeiten von 50 bis 400 $\mu\text{m/s}$ zwischen 0,18 und 1,42 dyn/cm^2 liegen.

4.4.2 Analyse des Zell-Rollens von Jurkat-Zellen auf CD45-beschichteten Bereichen innerhalb des Lab-on-a-Chip Systems

Das Ziel dieses Promotionsprojektes war unter anderem Reproduktion der Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit fließender Kulturzellen als Reaktion auf affinitätsbasierte Wechselwirkungen mit der Oberfläche in vergrößertem und halb-automatisiertem Maßstab eines Lab-on-a-Chip Systems. Da das Grundprinzip auf einer Verlangsamung einzelner Zellen durch Ligand-Rezeptor-Interaktionen innerhalb Antikörper-beschichteter Bereiche basierte, wurde dieses nach Maßstabsver-

größerung und Überarbeitung mithilfe von Jurkat-Zellen und Anti-CD45 Antikörper in verschiedenen Konzentrationsbereichen systematisch untersucht. Nach vorherigen Beobachtungen wurden dabei insbesondere 3 Parameter betrachtet: 1. die Geschwindigkeitsänderung von beschichteten zu unbeschichteten Bereichen, 2. in wie weit es in den beobachteten Bereichen zu Kollisionen mit schon haftenden Zellen gekommen war und 3. die Auswirkungen dessen auf die Geschwindigkeit/Haftung von Einzelzellen. Außerdem erfolgte eine Analyse der von der Software ausgegebenen Schwankungen (Amplitude) innerhalb der Messung ebenfalls in Bezug zu Kollisionen und der Geschwindigkeit. Zunächst wurde der Konzentrationsbereich zwischen 1 µg/ml und 4 µg/ml CD45-Antikörper untersucht, da in höheren Konzentrationsbereichen schon eine verstärkte Anhaftung zu beobachten war und dadurch eine Beeinflussung der Geschwindigkeit erwartet wurde.

Abb. 50 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der Geschwindigkeit von 40-50 Einzelzellen pro Konzentration [1-4 µg/ml]. Der Abbildung ist deutlich zu entnehmen, dass eine Verlangsamung von Zellen kaum (unter 10 %) beobachtet werden konnte. Der Großteil der Zellen zeigte gar keine Reaktion auf die Antikörperbeschichteten Bereiche in Bezug auf die Geschwindigkeit unabhängig von der Antikörperkonzentration.

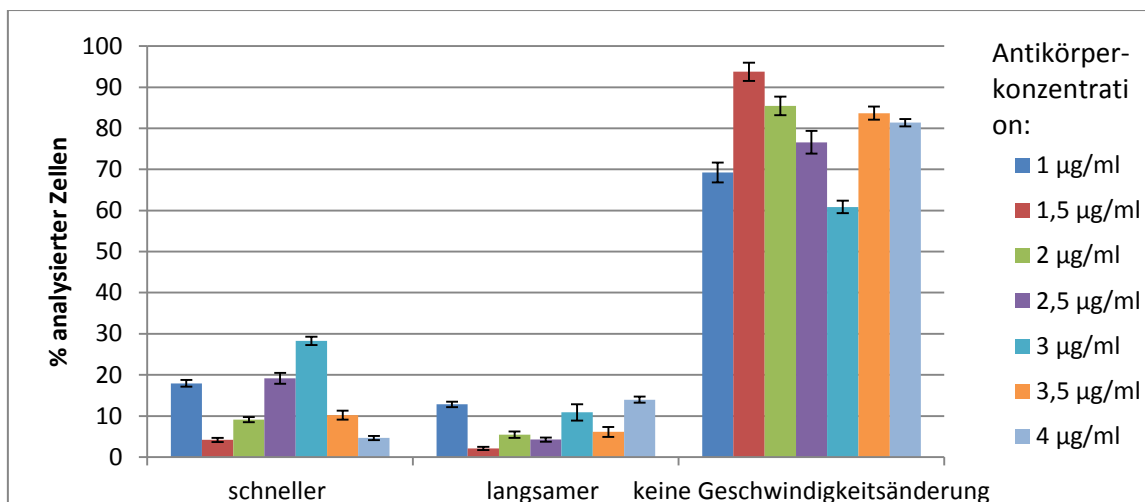


Abbildung 50: Veränderung der Fließgeschwindigkeit von Jurkat Zellen auf CD45-beschichteten Bereiche [1-4 µg/ml] im Vergleich zu unbeschichteten Bereichen mit Berechnung der prozentualen Anteile der Gesamtzellzahl. n=45

Im Vergleich war bei den meisten Konzentrationen eher eine Erhöhung der Geschwindigkeit zu verzeichnen als eine Verlangsamung. Die CD45-Antikörperkonzentration von 3 µg/ml führte insgesamt zur höchsten Reaktionsquote der Zellen, wobei diese sich hauptsächlich in einer Beschleunigung der Zellen

äußerte. Bei Betrachtung der Ergebnisse der Kollisionsanalyse (Abb. 52A) zeigte sich, dass rund 25 % der Zellen innerhalb der beschichteten Bereiche in irgendeiner Weise kollidierten, was zu einem meist negativen Ausschlag im Flussdiagramm führte (Abb. 51).

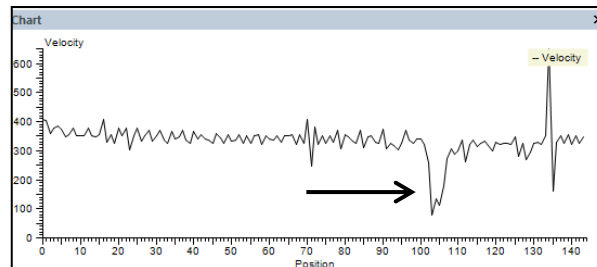


Abbildung 51: Beispiel eines Flussdiagramms mit kurzfristiger Verringerung der Geschwindigkeit

Diese Ausschläge der Kurve können durch Zusammenstöße mit schon haftenden Zellen sowie Verunreinigungen auftreten oder durch kurzes Anhaften der Zelle selbst. Allerdings zeigt Abb. 52A, dass es auch in unbeschichteten Bereichen zu solchen Ausschlägen kam, weswegen dies nicht als Zeichen der Spezifität der Reaktion und somit als Affinitätsbasiert zu werten ist. Oft war der Grund des Ausschlags im Nachhinein kaum mehr zu evaluieren.

Auf Grundlage einiger Beobachtungen wurden auch die Schwankungen (Amplitude) innerhalb des Flussdiagramms auf einen Zusammenhang mit der Beschichtung untersucht (Abb. 52B). Hier zeigte sich eine gewisse Erhöhung in den beschichteten Bereichen, welche aber in Durchschnitt ($n=45$) nur bei 17 % lag im Gegensatz zu knapp 77 %, bei denen keine Veränderung zu erkennen war. Erwartet worden war eher eine Erhöhung der Schwankung aufgrund der affinitätsbasierten Interaktionen der Jurkat-Zellen mit dem CD45-Antikörper, die ein Stop-and-Go Verhalten der Zellen auslösen könnten.

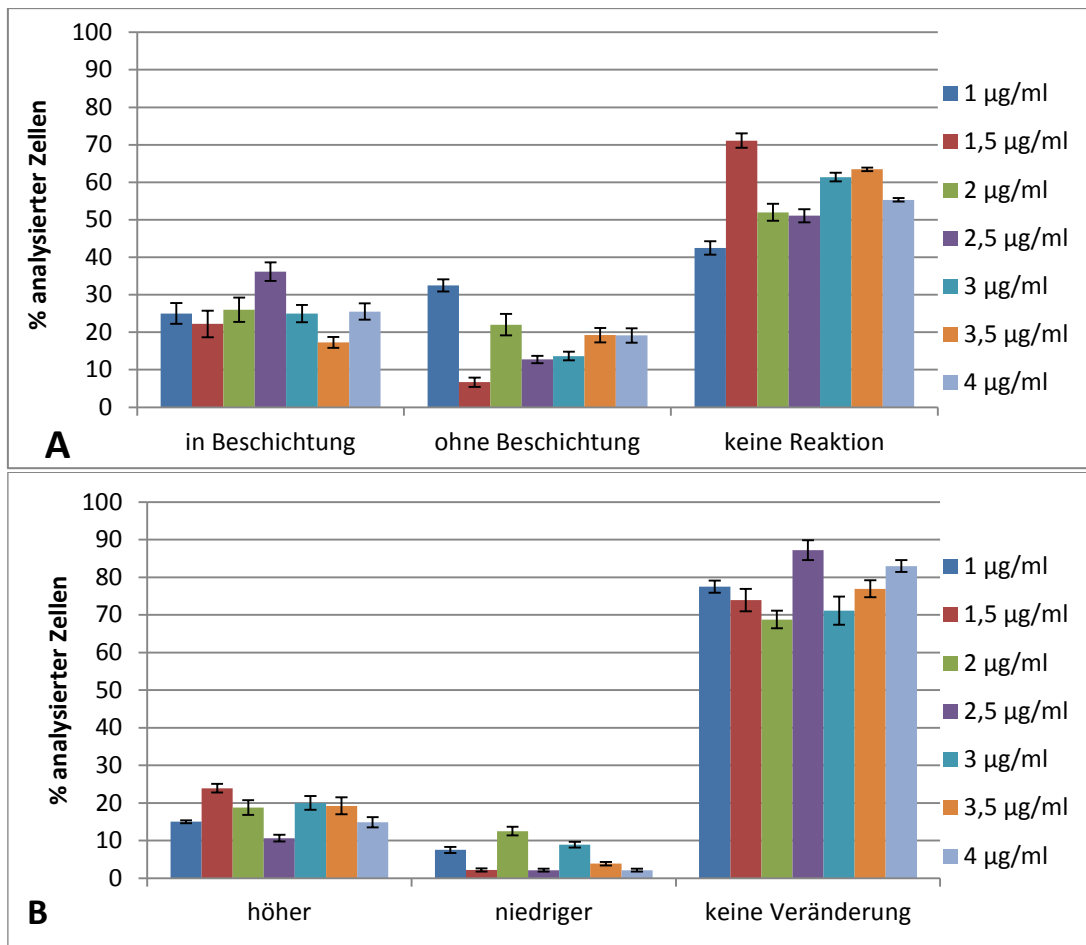


Abbildung 52: A) Kollisionen von fließenden Jurkat-Zellen in beschichteten und unbeschichteten Bereichen und verschiedenen CD45-Antikörperkonzentrationen [1-4 µg/ml]. B) Analyse der Höhe der Amplitude im Flussdiagramm in Bezug auf CD45-Antikörper beschichtete Bereiche [1-4 µg/ml].

Eine gleiche Untersuchung wurde zusätzlich in einem höheren Konzentrationsbereich sowie mit einem PEG-funktionalisierten Kanal durchgeführt. Im Konzentrationsbereich von 3-6 µg/ml CD45 war der Anteil geschwindigkeitsreduzierter Zellen zwar gleichmäßiger als im geringeren Konzentrationsbereich, lag aber im Durchschnitt nur bei 15 % (Abb. 53). Bei der Negativkontrolle lag ebenfalls eine prozentuale Verlangsamung von 10 % vor. Der Großteil (65 %) der Zellen zeigte wiederum keine Veränderung der Geschwindigkeit in beschichteten im Vergleich zu unbeschichteten Abschnitten.

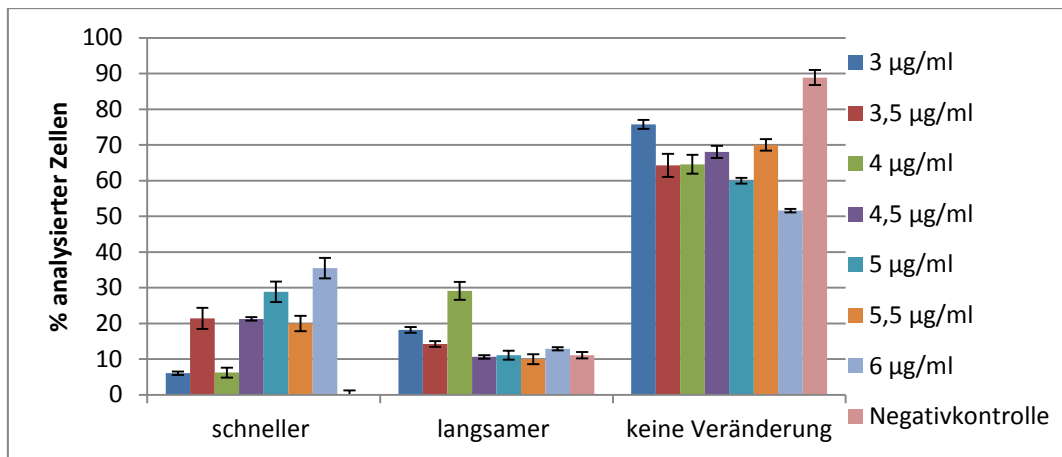


Abbildung 53: Veränderung der Fließgeschwindigkeit von Jurkat Zellen auf CD45-beschichteten Bereichen [3-6 µg/ml] im Vergleich zu unbeschichteten Bereichen mit Berechnung der prozentualen Anteile der Gesamtzellzahl. n=45

Die Betrachtung der Kollisionsrate (Abb. 54A) resultierte bei höheren Konzentrationen in einer gesteigerten Anzahl an Kollisionen innerhalb der Beschichtung, was auf eine steigende Anzahl haftender Zellen zurückzuführen sein könnte. Die Abweichungen dabei waren allerdings höher als bei den anderen Versuchen.

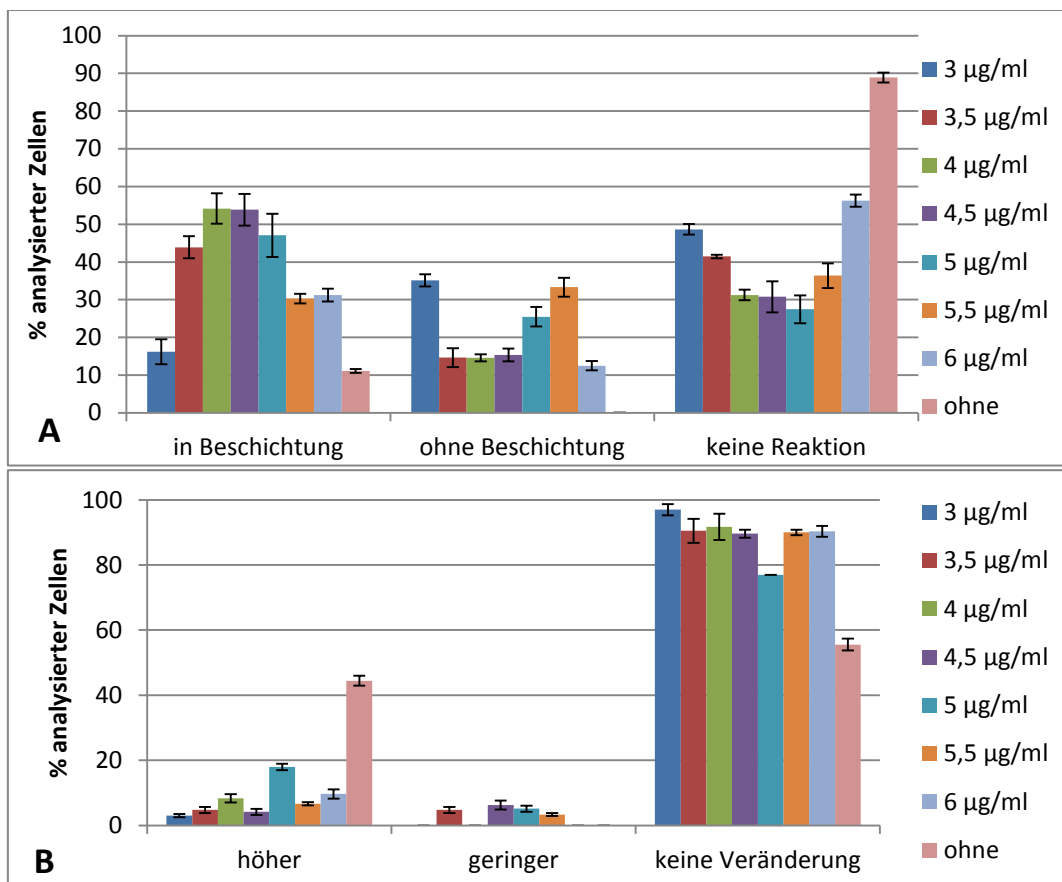


Abbildung 54: A) Kollisionen von fließenden Jurkat-Zellen in beschichteten und unbeschichteten Bereichen und verschiedenen CD45-Antikörperkonzentrationen [3-6 µg/ml]. B) Analyse der Höhe der Amplitude im Flussdiagramm in Bezug auf CD45-Antikörper beschichtete Bereiche [3-6 µg/ml].

Die Analyse des Amplitudenausschlags (Abb. 54B) zeigte wenige Reaktionen in beschichteten und unbeschichteten Bereichen. Die Negativkontrolle fiel durch einen hohen Wert bei der Erhöhung der Amplitude auf.

Die Ergebnisse unter Verwendung eines PEG-funktionalisierten Kanals zeigten im Grunde ähnliche Ergebnisse wie bei der Verwendung der Neutravidin-funktionalisierten Kanäle, weswegen auf eine Darstellung der Werte verzichtet wurde.

5. Diskussion

5.1 Funktionalisierung von PMMA und zielgenaue Immobilisierung von Proteinen innerhalb des mikrofluidischen Kanals

Ziel des Promotionsprojektes war die Automatisierung und Maßstabsvergrößerung eines Lab-on-a-Chip Systems zur Einzelzellprofilierung auf Basis zellspezifischer Oberflächenmarker. Innerhalb von mikrofluidischen Kanälen werden dabei abschnittsweise verschiedene Oberflächenmarker zielgenau immobilisiert. Werden Zellen in den Kanal eingeleitet, interagieren exprimierte Oberflächenmarker mit den immobilisierten Zielproteinen und die Zellen werden in einen „rollenden“ Zustand versetzt, durch den sie in ihrer Fließgeschwindigkeit verlangsamt werden. Über eine lückenlose Detektion jeder einzelnen Zelle innerhalb des gesamten Systems können so Interaktionen mit unterschiedlichen Oberflächenmarker nachgewiesen werden. Bei dieser semi-quantitativen Messung soll anschließend eine Aussage darüber möglich sein, welche Marker die Zelle exprimiert und in welcher Ausprägung. Somit kann ein Profil der exprimierten Oberflächenmarker jeder Einzelzelle erzeugt werden.

Im Rahmen von Vorarbeiten konnte mittels manueller Durchführung das Proof of Concept erbracht werden (Siehe Kapitel 2). Um die Messungen zumindest partiell zu automatisieren wurde eine Messstation entwickelt, die eine lückenlose Detektion der Zellen und ihrer Fließgeschwindigkeit innerhalb des Kanalsystems mithilfe einer hochauflösenden Kamera und einer *in-house* Software (MedeaLab) ermöglicht. Für eine sinnvolle Anwendbarkeit klinischer Proben in der Praxis war es notwendig, die Dimensionen der mikrofluidischen Kanäle zugunsten eines höheren Probendurchsatzes zu vergrößern. Des Weiteren zeigten sich während des Proof of Concepts reproduktive Schwierigkeiten bei der Funktionalisierung der PMMA-Oberfläche mittels des Polystreptavidin R Coating Kits (BioTeZ), was eine Überarbeitung dieser erforderlich machte. Um möglichst nah an den experimentellen Bedingungen der Vorversuche anzuknüpfen, sollten gewisse Parameter wie das Material der Chips (PMMA) und die Beschichtung mit biotinylierten Rezeptormolekülen (Antikörper, Aptamere) beibehalten werden. PMMA bietet sich aufgrund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften wie optische Transparenz, Modifizierbarkeit und günstige Herstellungskosten für eine Verwendung als Einweg-Artikel für medizinische Analysen an (Becker & Locascio, 2002; Steven A. Soper et al., 2000). Der Einsatz des Avidin-Biotin Systems zeichnet sich durch seine hohe Bin-

dungskonstante ($K_d = 10^{-15} \text{ M}$) zwischen Ligand und Protein aus und ermöglicht eine sehr schnelle, spezifische und kaum trennbare Ligand-Rezeptor-Bindung (Green, 1963; Livnah, Bayer, Wilchek, & Sussman, 1993).

Trotz der guten physikalisch-chemischen Eigenschaften von PMMA, erfordern seine Hydrophobität und geringe Anzahl an funktionellen Gruppen auf der Oberfläche eine Modifizierung (Kitsara & Ducreé, 2013). Diese erfolgt in Form einer Aktivierung der PMMA-Oberfläche durch Sauerstoffplasma. Im Rahmen der Methodenoptimierung wurden verschiedene Vorgehensweisen getestet, um den erfolgreich verlaufenen Plasmaprozess zu dokumentieren und möglichst auch zu quantifizieren. Eine Qualitätskontrolle jedes Fabrikationsschritts wäre auch für die spätere Großproduktion erforderlich. Die Mitführung von Plasmaindikatoretiketten der Firma Diener stellt eine sehr einfache und unproblematische Dokumentation des Plasmaprozesses dar. Die Etiketten werden auf einen Dummy aufgeklebt, während der Plasmaexposition mitgeführt und ein erfolgreicher Prozess direkt durch Verblässen des Indikatorpunktes angezeigt. Allerdings sind die Indikatoren erst ab einer Expositionszeit von 2 min erhältlich, was die in diesem System angestrebte und ausreichende Dauer von 90 s überschreitet. Sie sind damit zu ungenau für die geplante Anwendung. Die Messung des Kontaktwinkels zur Quantifizierung der Plasmaeffizienz stellte sich ebenfalls als ungeeignet heraus, da kein professionelles Gerät zur Verfügung stand und eine händische Überprüfung zu große Abweichungen in der Tropfengeometrie hervorgerufen hat. Die PMMA-Oberfläche war schon nach kurzer Plasmaexpositionszeit so hydrophil, dass keine Unterschiede im Winkel bestimmt werden konnten.

Mithilfe von Toluidinblau konnte der Nachweis generierter Carboxylgruppen abhängig von der Expositionsdauer erreicht werden. Auffällig dabei war die hohe Grundadsorption von nativem PMMA, welches, im Vergleich zu den mit Plasma behandelten Proben, kaum $-\text{COOH}$ Gruppen vorweisen sollte (Darain et al., 2012). Da das Toluidinblau nicht spezifisch an die Carboxyl-, sondern an alle negativen Ladungen bindet, sollte diese Methode nur zum semi-quantitativen Vergleich zwischen den Proben verwendet werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Hosseini et al., die mit dieser Methode Carboxylgruppen auf polymethylmethacrylat-co-methacrylsäure Oberflächen (PMMA-co-MAA) nachweisen wollten (Hosseini, Ibrahim, Djordjevic, & Koole, 2014). Durch den Vergleich konnte bestä-

tigt werden, dass für die geplante Anwendung 90 s Sauerstoffplasmaexposition ausreichend sind. Bei höheren Expositionszeiten besteht das Risiko des Materialabtrags (Dorranian, Abedini, Hojabri, & Ghoranneviss, 2009) und der Steigerung der Oberflächenrauigkeit (Darain et al., 2012), was konträr zur geplanten Anwendung wäre, da das Risiko unspezifischer Zellanhaftung gesteigert würde. Aufgrund des hohen Materialbedarfs an PMMA und der recht langwierigen Durchführung sollte diese Methode allerdings nicht zu Qualitätskontrolle, sondern nur zur Evaluation der Parameter genutzt werden.

Als reproduzier- und anwendbarste Methode zur Kontrolle der Plasmaexposition stellte sich der fluoreszenzbasierte ELISA über Primär- und Sekundärantikörper heraus. Dieser eignet sich zum einen für die vergleichende Parameterbestimmung der Plasmaexposition sowie für eine zügige Überprüfung der erfolgreichen Plasmaexposition generell. Zu beachten ist allerdings, dass die Carbodiimid-Reaktion zur Funktionalisierung der Oberfläche mit Neutravidin auch ohne Plasma stattfindet und Proben ohne vorherige Plasmaexposition ebenfalls Signale erzeugten. Um diese Qualitätskontrolle auf einen Reaktionsschritt zu reduzieren und somit zu beschleunigen, wäre es möglich, statt Primär- und Sekundärantikörper ein Biotinkonjugat mit Fluorophor (wie beispielsweise Biotin-4-Fluorescein) zu verwenden. Generell ist zu erwähnen, dass die Plasmaqualität aufgrund des Alters des zur Verfügung stehenden Gerätes starken Schwankungen unterlag. Abbildung 55 zeigt den Unterschied in der Beschichtungseffizienz bei einem gut und einem schlecht verlaufendem Plasmaprozess im direkten Vergleich bei ansonsten gleicher Weiterbehandlung.

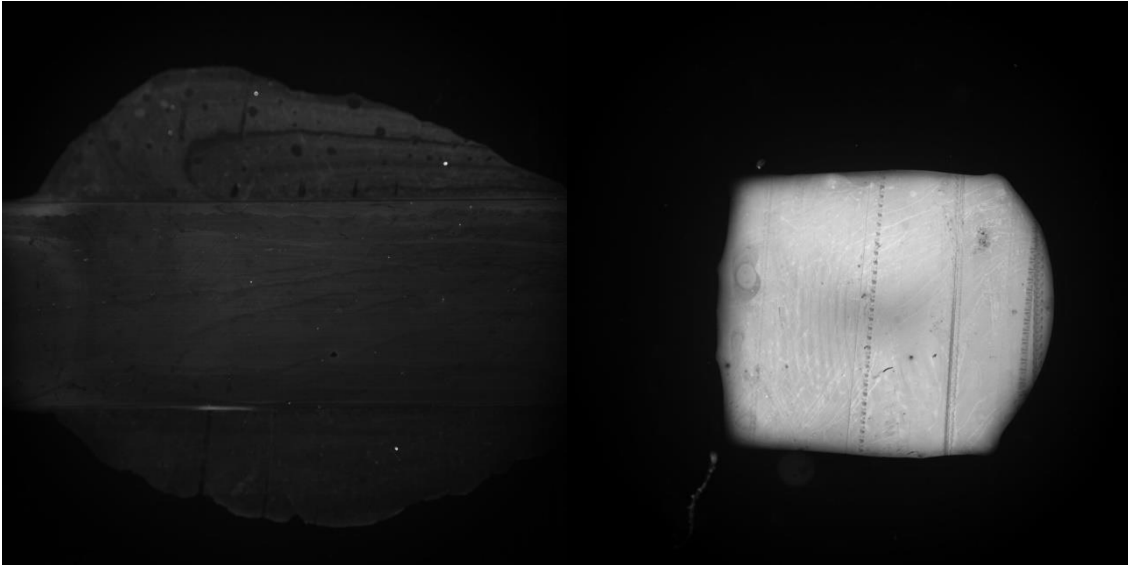


Abbildung 55: Vergleich der Beschichtungseffizienz nach gut (rechts) und schlecht (links) verlaufendem Sauerstoffplasmaprozess. Nach dem Plasmaprozess wurden beide Proben gleich behandelt und die Fotos mit den gleichen Einstellungen gemacht.

Mit einem technisch einwandfreien Gerät sollten die Schwankungen in der Plasmaeffizienz deutlich geringer ausfallen und die Aktivierung der Oberfläche noch gesteigert werden können.

Im Rahmen der Methodenentwicklung konnte festgestellt werden, dass eine direkte Kopplung von Antikörpern an die plasmabehandelte PMMA-Oberfläche über eine Carbodiimid-Reaktion nicht möglich ist und nur bei Lösung in EDC pH 5 eine schwache Fluoreszenz erkennbar ist. Obwohl die Kupplungseffizienz von EDC bei saurem pH erhöht sein sollte (Conde et al., 2014), liefert die Verwendung von EDC und NHS bei physiologischem pH höhere Fluoreszenzintensitäten. Die Verwendung von Avidin ist somit obligat für die geplante Anwendung. Hier wurden mit der Lösung in 0,1 M EDC/NHS die stärksten und gleichmäßigsten Ergebnisse erlangt. Interessant ist die hohe Bindekapazität bei der Verwendung von PBS als Lösemittel des Avidins. Es könnte sich um unspezifische Bindung handeln, da Avidin aufgrund vieler Glykosilierungen einen recht hohen pI (10,5) und eine somit stark positive Ladung besitzt (Huopalahti, López-Fandiño, Anton, & Schade, 2007). Es kann somit leicht an die generierten negativen Ladungen der PMMA-Oberfläche binden.

Für die Auswahl des geeigneten biotinbindenden Proteins wurden Avidin, Polystreptavidin und Neutraavidin bei direkter Funktionalisierung über Carbodiimid-Chemie sowie bei Immobilisierung auf einer Biotin-PEG-Amin Schicht verglichen. Zunächst wurde festgestellt, dass das in den Vorversuchen verwendete Polystrep-

tavidin Coating Kit (BioTeZ) die schwächste Fluoreszenzintensität liefert. Die Funktionalisierung mit Polystreptavidin und Avidin resultierte mit und ohne PEG in ähnlichen Fluoreszenzintensitäten, wobei die Proben auf PEG wesentlich inhomogener waren. Dies ist nachteilig für die geplante Anwendung, da innerhalb der beschichteten Bereiche überall dieselbe Konzentration an Ligandenmolekülen vorherrschen muss, um eine gleichmäßige Reaktion der Zellen hervorzurufen. Ebenfalls müssen zwischen unbeschichteten und beschichteten Bereichen klare Grenzen gezogen sein, damit die Spezifität der Reaktion gewährleistet wird. Bei Neutravidin auf PEG und Polystreptavidin mit EDC/NHS konnten allerdings unspezifische Antikörperbindungen außerhalb der originären Spots festgestellt werden. Durch die hohe und schnelle Bindekapazität von Biotin zu Avidin scheint es zu unspezifischen Bindungen gekommen zu sein, die durch das Waschen des Chips nach der Beschichtung entstanden sind. Durch Verwendung anderer Puffer bzw. Beschichtungsstrategien könnte hier aber noch Verbesserung geschaffen werden. Obwohl die direkte Funktionalisierung mit Neutravidin über EDC und NHS mit Abstand die stärkste und homogenste Beschichtungseffizienz aufwies, wurde zunächst auch mit der PEG-Funktionalisierung weitergearbeitet, da diese den Vorteil der Passivierung der Oberfläche gegen unspezifische Bindungen der Zellen und eine erhöhte Interaktionsmöglichkeit von Antigen und Antikörper bot (Patel et al., 2006).

Durch die geringen Flüssigkeitsvolumina beim Spotten, besteht die Komplikation der Proteindenaturierung durch schnelle Verdunstung der Proteinverdünnung. Selbst bei regulierter Luftfeuchtigkeit im Spotter von 69 % verdunsten die Spots von außen nach innen und es kommt zu einer massiven Konzentrationserhöhung sowie Änderung der Ionenstärke und des pHs, was sich negativ auf die native 3D-Konformation der Proteine auswirkt und zu Aktivitätsverlusten führen kann (Wu & Grainger, 2006). Im Laufe der weiteren Methodenoptimierung konnte durch die Verdünnung des Neutravidins in PVA-Puffer die reproduzierbar homogenste und fluoreszenzstärkste Funktionalisierung erreicht werden. Wu und Grainger begründen die gute Performance des PVA-Puffers durch die Tensid-Eigenschaft, die durch eine verminderte Oberflächenspannung eine gleichmäßigere Benetzung der Oberfläche sowie Trocknung der Proteinlösung ermöglicht. Durch die Reduzierung der Neutravidin-Konzentration auf 0,05 - 0,1 mg/ml in PVA-Puffer sowie Trocknung

der Neutravidin-Spots und anschließendem Waschen mit 500 mM NaCl, konnten die unspezifischen Bindungen auf Biotin-PEG-Amin Oberflächen neben den Spots ohne Verlust an Fluoreszenzintensität minimiert werden. Die Verwendung von Glycerol als Print-Additiv zur Vermeidung von Verdunstung führte (in Übereinstimmung mit anderen Publikationen) eher zu einer Behinderung der Proteinbindung und zu hoher Variabilität der Spotmorphologie (Bergeron, Laforte, Lo, Li, & Juncker, 2015; Kusnezow, Jacob, Walijew, Diehl, & Hoheisel, 2003). Die beobachtete erhöhte Variation der Spotting Performance auf der PEG-Hydrogel Schicht deckt sich zum einen mit Beobachtungen von Angenendt et al, zum anderen wird diese auf die variierende Plasmaqualität sowie der erhöhten Anzahl an Versuchsschritten zurückzuführen sein (Angenendt, Glökler, Murphy, Lehrach, & Cahill, 2002). Als weiterer Nachteil der Biotin-PEG-Amin Funktionalisierung stellte sich die hohe unspezifische Bindekapazität des biotinylierten Maus-CD45 Antikörpers heraus, der auch ohne vorherige Neutravidin-Immobilisierung eine Fluoreszenzintensität von 50 % der mit Neutravidin hervorrief. Die direkte Funktionalisierung der plasmabehandelten PMMA-Oberfläche mit Neutravidin über Carbodiimide resultierte im Gegensatz dazu in sehr homogenen Spotmorphologien mit hoher Fluoreszenz. Die bei der Verwendung von PEG aufgetretenen unspezifischen Bindungen neben den Spots waren nicht zu beobachten bzw. erst bei sehr hohen Antikörperkonzentrationen. Falls diese für eine Messung benötigt würden, wäre eine Möglichkeit, die Antikörper-Spots rechts und links mit Biotin zu blocken, um unspezifische Bindungen auf dem Neutravidin zu vermeiden. Beide Beschichtungsstrategien zeigten einen geringen Intensitätsverlust über 90 min bei einem Durchfluss von 300 $\mu\text{m/s}$. Dieser Verlust muss aber nicht unbedingt einen Verlust an Ligandenmolekülen bedeuten, die über kovalente Bindungen eine starke Verbindung zu den Oberflächenmolekülen aufweisen, sondern kann auch durch Ausbleichen der Fluorophore bei der Anfertigung der Fotos entstanden sein. Dies müsste in weiterführenden Versuchen geklärt werden.

Die Immobilisierung von Proteinen auf Biotin-PEG-Amin Schichten konnte u.a. durch die Verwendung von PVA-Puffer und Reduzierung der Neutravidin-Konzentration wesentlich verbessert und spezifischer gemacht werden. Allerdings liefert insgesamt die direkte Funktionalisierung des PMMAs mit Neutravidin über Carbodiimid-Chemie höhere Fluoreszenzintensitäten bei reproduzierbar homoge-

nerer Beschichtung. Versuche mit Kulturzellen müssen im späteren Verlauf zeigen, ob aufgrund der passivierenden und hydrogel Eigenschaften des PEG die beschriebenen Nachteile in Kauf genommen bzw. noch einmal überarbeitet werden müssen.

Nachdem das Neutravidin ortsspezifisch innerhalb des mikrofluidischen Kanals immobilisiert werden konnte, folgt das Spotting der Antikörper auf diese Bereiche. Es besteht dieselbe Problematik der Denaturierung durch zu schnelle Verdunstung der Antikörperlösung wie schon beim Neutravidin. Deshalb wurden hier ebenfalls unterschiedliche Spotting Puffer auf ihre funktionserhaltenden Eigenschaften beim Antikörper getestet. Darunter der schon für das Neutravidin sehr vorteilhafte PVA-Puffer sowie zwei kommerziell erhältliche Spotting Puffer der Firma Schott (NEXTERION® Spot und Spot PB), welche extra für das Spotting von Protein-Microarrays entwickelt wurden. Diverse andere Puffer wurden während der Methodenoptimierung getestet, aber aufgrund mangelnder Ergebnisse direkt verworfen. Diese enthielten meist hohe Anteile [10-20 %] Glycerin sowie Tween 20 oder Triton-X100, was sich mit den mangelhaften Ergebnissen solcher Puffer beim Neutravidin deckt. Bei der Überprüfung der Funktionalität des Antikörpers über einen Biotin-HRP ELISA erzielte ebenfalls der PVA-Puffer die höchste Signalintensität. Da die fluoreszenzbasierte Kontrolle der Antikörperfunktionalität konträre Ergebnisse lieferte, wurde die Entscheidung für einen Antikörper-Spotting-Puffer vom Zellverhalten abhängig gemacht. Die Ergebnisse zeigten eine deutlich gesteigerte Interaktion der Jurkat-Zellen auf CD45-beschichtete Bereiche bei der Verwendung des PVA-Puffers im Vergleich zu allen anderen Puffern. Im Gegensatz zum NEXTERION® Spot PB-Puffer zeigte sich eine spezifische Anhaftung der Zellen in den beschichteten Bereichen bei ansonsten wenig unspezifischen Bindungen in den übrigen Kanalbereichen. Da der Spot PB-Puffer 10 % Glycerin enthielt, lag, unter Beachtung von Abschnitt 4.1.4, die Vermutung nahe, dass sich dort während des Waschvorgangs Antikörpermoleküle unspezifisch weiter im Kanal verbreiten und gebunden haben, was die Zellen unspezifisch haften und den Unterschied zu den beschichteten Bereichen verschwimmen ließ (Abb. 56).

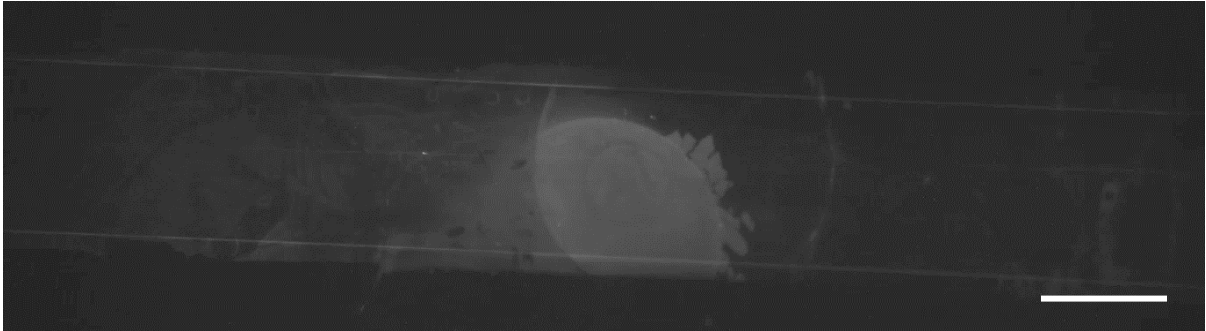


Abbildung 56: Verteilung des Maus-CD45 Antikörpers innerhalb des 800 x 20 µm Kanals bei der Verwendung von NEXTERION® Spot PB-Puffer. Skala: 500 µm

Allerdings hafteten auch in den beschichteten Bereichen wesentlich weniger Zellen als bei der Verwendung von PVA-Puffer (\emptyset 24 vs. 67 Zellen pro 0,8 mm² CD45). Für das weitere Vorgehen wurde somit der PVA-Puffer sowohl für das Spotting des Neutravidins als auch der Antikörper verwendet, da es unspezifische Bindungen der Liganden reduzierte und gleichzeitig spezifische Antigenbindungen der Zellen förderte.

5.2 Methodenetablierung zur Isolierung und Charakterisierung von Zellen anhand zellspezifischer Oberflächenmarker

Die angestrebte Charakterisierung von Einzelzellen mit dem Fokus auf zirkulierende Tumorzellen innerhalb des Lab-on-a-Chip Systems machte eine Anreicherung der potentiellen Tumorzellen erforderlich. Basierend auf Vorarbeiten innerhalb der Inneren Klinik (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen erfolgte die Methodenoptimierung der magnetischen Depletion hämatopoetischer Zellen über anti-CD45 MACS®-Beads bei Verwendung von LD-Säulen. Dabei verbleiben die Zielzellen in der beadfreien Durchflussfraktion und bleiben somit unbeeinflusst für die weiterführende Analyse verfügbar. Um die Datenmengen durch analysierte Einzelzellen möglichst gering zu halten und somit aussagekräftigere Ergebnisse zu erlangen, wurde eine möglichst hohe Depletion der hämatopoetischen Zellen (PBMC) ohne Verlust potentieller Tumorzellen angestrebt.

Bei der Verwendung von 1×10^6 Zellen der reinen Buffy Coat Suspension von gesunden Spendern konnte durch eine Reduzierung der anti-CD45 MACS®-Beadmenge von 20 auf 2 µl eine Depletion von 99 % der PBMC erreicht werden. Diese Ergebnisse konnten mittels Spiking-Experimenten bestätigt werden. Es zeigte sich eine deutliche Anreicherung der gespikten HCT116-Kulturzellen in der CD45-negativen Durchflussfraktion bei 2 µl Beads im Verhältnis 5:1 zu den PBMC. Allerdings konnten auch in der depletierten, CD45-positiven Fraktion HCT116-

Zellen nachgewiesen werden, was auf einen gewissen Verlust der Zielzellen durch die gewählte Isolierungsmethode hindeutet. Ebenfalls ist zu betrachten, dass das verwendete Spikingverhältnis von 1:50 im Vergleich zum in vivo-Vorkommen von CTCs recht hoch gewählt war. Wang et al. bestätigten die klinische Relevanz von >5 CTCs aus 7,5 ml Vollblut bei Prostatakarzinom (Fu-Bin Wang et al., 2011) für eine signifikant schlechtere Überlebensrate. Nach der Depletion von Blut von Brustkrebspatienten mit EpCAM-paramagnetischen Beads, welche in einer 99,9 %igen Depletion der Buffy Coat Zellen resultierte, sprechen Sieuwerts et al. weiterhin von einer Kontamination von 800 PBMC auf eine zirkulierende Tumorzelle (Sieuwerts et al., 2009). In Betrachtung dieser Größenordnungen und dem potentiell differenten Verhalten von Kultur- zu Primärzellen, müsste die Isolierungsmethode für die Verwendung von CTC aus Vollblut im weiteren Verlauf noch weiter optimiert werden, um sie in diesem Setting effektiv nutzen zu können. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bieten aber einen ersten Ansatz mit dem zunächst gearbeitet werden kann. Bei der visuellen Betrachtung der Durchflussfraktionen unter dem Mikroskop konnten bei der verwendeten Zelldichte zumindest nur noch sehr vereinzelt PBMC nachgewiesen werden. In wieweit die Kontamination mit hämatopoetischen Zellen die Analyse der CTCs im Lab-on-a-Chip System beeinflusst, muss in späteren Versuchen unter der Verwendung von Patientenproben mit CTCs geklärt werden. Durch die Heterogenität der CTCs gibt es die verschiedensten Ansätze zur Isolierung (Oberflächenmarker, Dichte, Größe), die alle gewisse Vor- und Nachteile besonders in Bezug auf einen potentiellen Verlust oder auch falsch positive Signale der CTCs aufweisen (Karabacak et al., 2014; Lustberg, Jatana, Zborowski, & Chalmers, 2012; Mavroudis, 2010). Auch verschiedenste Ansätze zur Aufreinigung und Isolierung direkt innerhalb von Lab-on-a-Chip Systemen wurden erforscht und bieten einen guten Ansatz zur weiteren Entwicklung des vorliegenden Systems (Karabacak et al., 2014; Xu et al., 2009; Xu et al., 2009).

Im Hinblick auf das angestrebte Analyseverfahren, welches auf einer Verlangsamung fließender Zellen durch spezifische Antigen-Antikörper-Interaktionen beruht, wurden immer wieder Jurkat-Zellen in den teilbeschichteten Kanal eingeleitet und deren Geschwindigkeit in beschichteten und unbeschichteten Bereichen untersucht. Dabei wurde zunächst zwar keine reproduzierbare Geschwindigkeitsverän-

derung festgestellt, allerdings hafteten die Zellen spezifisch in den Antikörperbeschichteten Bereichen. Mit Erhöhung der Antikörperkonzentration stieg auch die Zahl haftender Zellen. Um die Spezifität dieser Reaktion weiter zu evaluieren, sowie den Konzentrationsbereich in dem ein Zell-Rollen möglich ist, weiter einzugrenzen, wurde das Verhalten 4 verschiedener Zelllinien auf drei Antikörper in je 7 unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Diese Ergebnisse wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung (Proteinebene) und quantitativer rtPCR (Genexpressionebene) auf ihre Plausibilität hin überprüft und verglichen. Wie die unten aufgeführten zusammenfassenden Tabellen darstellen, konnte das Lab-on-a-Chip System in den meisten Fällen dieselben Ergebnisse liefern, wie die IF oder die rtPCR. Auch die vergleichende Betrachtung der Stärke der Markerexpression stimmte meist überein. Somit könnte das Lab-on-a-Chip System ebenfalls zur Proteinexpressionsanalyse von Zellpopulationen genutzt werden.

Tabelle 7: Expression von CD45, EGFR und EpCAM auf Jurkat und K562-Zellen. Vergleich verschiedener Testsysteme sowie von Literaturangaben

Jurkat	CD45	EGFR	EpCAM	K562	CD45	EGFR	EpCAM
Lab-on-a-Chip	positiv	negativ	negativ		Gering positiv	Negativ	gering positiv
IF	positiv	negativ	minimalst positiv		Gering positiv	Negativ	positiv
rtPCR	positiv	negativ	minimalst positiv		Gering positiv	Negativ	positiv
Literatur	positiv	negativ	negativ		positiv	Negativ	Negativ

Tabelle 8: Expression von CD45, EGFR und EpCAM auf A549 und HCT116-Zellen. Vergleich verschiedener Testsysteme sowie von Literaturangaben

A549	CD45	EGFR	EpCAM	HCT116	CD45	EGFR	EpCAM
Lab-on-a-Chip	Negativ	positiv	gering positiv		negativ	positiv	hochpositiv
IF	-	-	-		negativ	negativ	hochpositiv
rtPCR	negativ	negativ	minimal positiv		minimalst positiv	negativ	positiv
Literatur	Negativ	positiv	Negativ		negativ	positiv	positiv

Die Ergebnisse bestätigen zwar die grundsätzliche Eignung der Lab-on-a-Chip Methode zur Proteinexpressionsanalyse, allerdings wurden hier große Abweichungen bei der Anzahl der haftenden Zellen zwischen den einzelnen Versuchen

festgestellt. Obwohl prinzipiell die Prozessionsparameter gleich gehalten wurden, scheinen minimale Unterschiede große Auswirkungen auf die Performance der Zellen zu haben. Die hohe Zahl an Einflussfaktoren, von der Qualität der Funktionalisierung über das Spotting der Antikörper bis hin zur Vitalität der Zellen nach der Ernte und dem Analysepuffer, machte eine Reproduktion der einzelnen Werte schwierig. Zu beachten ist außerdem, dass diese Art der Analyse zwar für Zellpopulationsuntersuchungen anwendbar ist, aufgrund der geringen Anzahl an haftenden Zellen bezogen auf die eingeleitete Gesamtzellzahl für Einzelzelluntersuchungen aber schwer anwendbar sein wird. Gerade bei einer geringen Expressionsrate ist die Differenzierung zwischen spezifisch und unspezifisch haftenden Zellen schwierig. Dabei fielen zwei technische Probleme auf, die zum Großteil während einer Weiterentwicklung verbessert werden könnten. Zum einen zeigte sich eine deutliche Differenz der Zellzahl in der Ausgangslösung zu der Anzahl an Zellen die innerhalb des mikrofluidischen Kanals detektiert werden konnten, in Kombination mit einer Reduzierung der Zellzahl über den Analysezeitraum hinweg. Eine Analyse dieses Phänomens brachte die Erkenntnis, dass schon nach 10 min Analysezeitdauer keine Zellen mehr in den Kanal hineinströmten (Abb. 57).

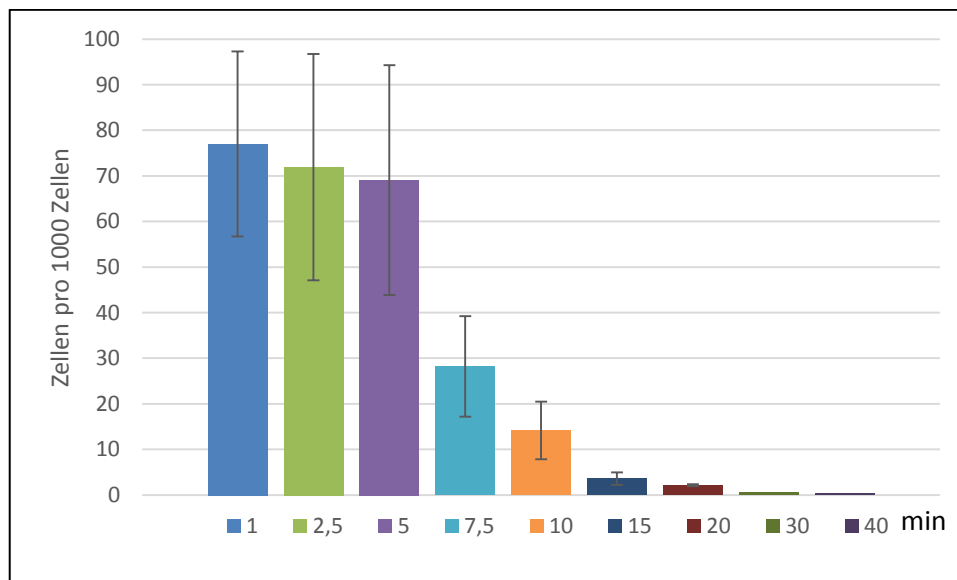


Abbildung 57: Nach definierten Zeitpunkten durch den 800 x 20 µm Kanal fließende Zellen [pro 1000 eingeleitete Zellen] bei einer Messung über 20 s.

Zu vermuten war, dass die Zellen aufgrund der vertikalen Eingangsgeometrie des Chips dort hängen blieben und im Laufe der Zeit so immer mehr Zellen abgefangen wurden. Diese Problematik ist bekannt bei der Verwendung von Lab-on-a-Chip Systemen (Sun, 2016) und wurde durch die geringen verwendeten Durch-

flussraten noch verstärkt. Abb. 58 zeigt ein Foto des Anschlusses nach Durchleitung von Zellen.

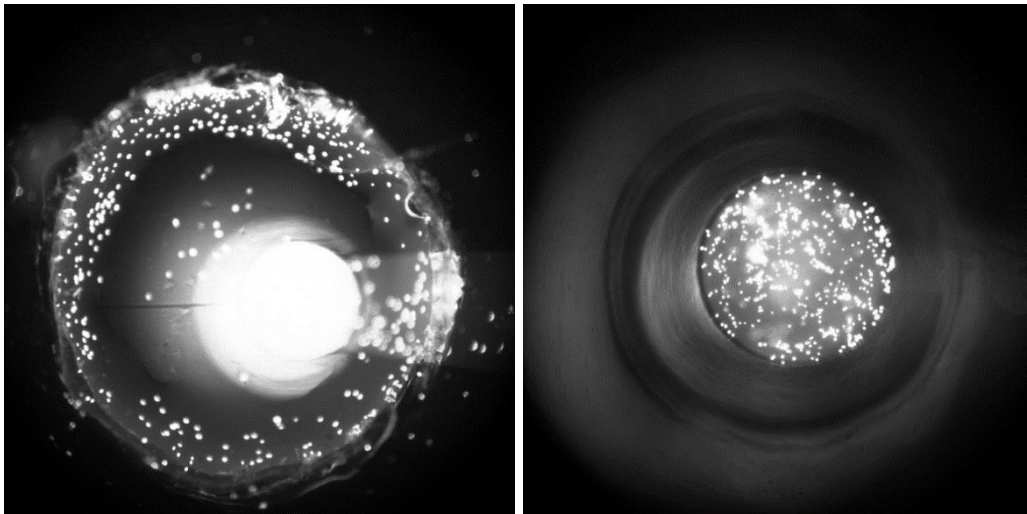


Abbildung 58: Trough hole Anschluss des Chips nach Durchleitung von Zellen mit gelochter qPCR-Folie als Verschluss. Links: Fokus oben, Rechts: Fokus unten

Problematisch war hierbei, dass die verwendeten Chips als Katalogware nur mit „trough-hole“-Anschluss erhältlich waren und durch die verwendete Beschichtungswiese „falsch-herum“ (Kanäle an der Oberseite des Chips) genutzt wurden. Das bedeutet, dass der Chip im Bereich des Anschlusses von beiden Seiten durchbohrt war (Abb. 59), was dazu führte, dass die Zellen im Laufe der Zeit nach unten absinken und nicht in den Kanal hineinfließen. Ein Verschluss des Loches an der Unterseite mittels UV-Kleber brachte keine wesentliche Verbesserung dieses Phänomens.

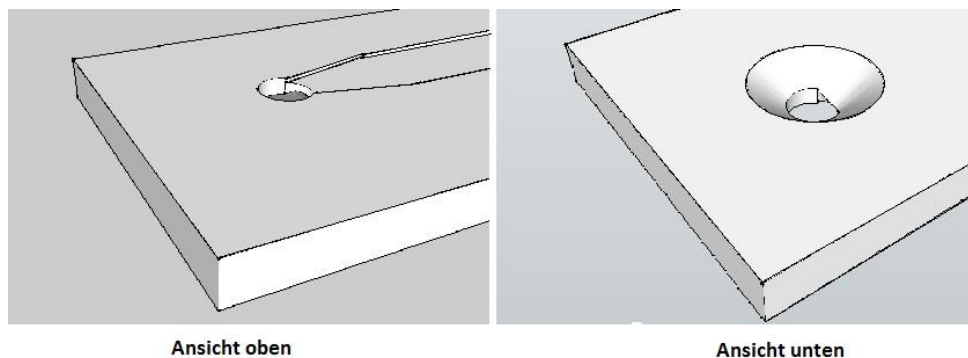


Abbildung 59: Schematische Zeichnung des trough-hole Anschlusses von oben (links) und unten (rechts)

Ein anderer Teil der Zellen haftete an der noch händisch gelochten und geklebten Folie. Diese Problematiken würden sich aber durch die Herstellung eines individuellen Chips ohne *through-hole* Anschlüsse und mit maschineller Verarbeitung der Folie weitestgehend reduzieren lassen, ebenso wie die Qualität der Funktionalisierung homogener werden würde.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Anhaftung zeigte sich bei den meisten Versuchen nur bei den ersten 3-4 Konzentrationen. Dies wird darauf zurückzuführen sein, dass es sich um einen geraden Kanal handelte und die Zellen von der Seite mit der geringsten Konzentration eingefüllt wurden. In Zusammenhang mit dem oben dargestellten Zellverlust ist anzunehmen, dass bei den höheren Konzentrationen die Zelldichte im Verlauf des Kanals schon deutlich ausgedünnter war als am Anfang. Somit standen weniger Zellen zur Verfügung, die hätten binden können. Wurde der Eingang auf die Seite der höchsten Konzentration verlegt, zeigte sich die Konzentrationsabhängigkeit, was auf dasselbe Phänomen zurückzuführen sein wird. Diese Beobachtung ist Übereinstimmend mit der Analyse von Cheng et al., die feststellten, dass die vermehrte Haftung zu Beginn des Kanals unter anderem auch von der Geschwindigkeit bzw. dem resultierenden Shear Stress abhängig ist (Cheng Dong & Xiao X. Lei, 2000).

Spiking Versuche zur Imitierung der Analyse von mit PBMC-Kontaminierten zirkulierender Tumorzellen resultierten in ähnlichen Ergebnissen. Grundsätzlich konnte die spezifische Anhaftung von HCT116-Zellen an EpCAM-beschichteten Bereichen auch aus einer Zellmischung mit PBMC (Verhältnis 1:50) heraus bestätigt werden. Allerdings lagen auch hier aufgrund der oben beschriebenen Problematik sehr niedrige Wiederfindungsraten vor. Bei der Verwendung von PBMC-Primärzellen fiel im Vergleich zu den Kulturzellen eine vermehrte unspezifische Bindung über den ganzen Kanalbereich auf. Dies deutet auf ein differentes Verhalten von Kultur- zu Primärzellen hin, was im weiteren Entwicklungsverlauf weitere Überarbeitungsschritte beispielsweise der Passivierung der Oberfläche zur Folge haben könnte. Da schon die Kulturzellen in ihrem Anhaftungsverhalten recht sensibel auf kleine Unterschiede (Zelldichte beim Ernten, Zeit der Fluoreszenzfärbung, Zeit zwischen Ernte und Analyse, etc.) in der Prozesskette zu reagieren schienen, sollten bei Primärzellen mindestens dieselben Effekte erwartet werden. Wie in den vorherigen Versuchen, war die Streubreite der Zellzahlen so hoch, dass keine Fehlerbalken eingeführt werden konnten. Zu betrachten ist außerdem, dass mit Auswahl der HCT116-Zellen und dem EpCAM-Antikörper, die Kombination mit der besten Haftungstendenz aufgrund höchster Proteinexpression verwendet wurde. Bei schwächer exprimierenden Zellen wäre eine Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Haftung recht schwer möglich. Dies könnte

eventuell durch höhere Antikörper-Konzentrationen bzw. Vergrößerung der beschichteten Bereiche ausgeglichen werden.

Allgemein ist zu sagen, dass diese Art der Isolierung/Differenzierung auch im Bezug zu CTCs schon erforscht wird. Stott et al. konnten in einem EpCAM-beschichteten Herrigbone-Chip eine Effizienz von 91 % bei der Isolation von CTC aus Prostata- und Lungenkrebspatienten im fortgeschrittenen Stadien erreichen (Stott et al., 2010). Xu et al. verwenden ein recht ähnliches System wie das dieses Promotionsprojektes, um verschiedene Krebszellen mittels abschnittsweiser aufgebrachter Aptamere anzureichern und zu detektieren (Xu et al., 2009). In einem Review beschreiben Gao et al. allein 15 verschiedene affinitätsbasierte Separationsmethoden in der Mikrofluidik (Gao, Li, & Pappas, 2013). Deshalb soll das zugrunde liegende Projekt auch nicht auf affinitätsbasierte Zellhaftung ausgelegt sein, sondern auf das Zell-Rollen. Allerdings konnte durch die Haftungsversuche die neuartige Beschichtungsmethode etabliert werden, wodurch es möglich war, kleinste Bereiche eines mikrofluidischen Kanals mit unterschiedlichen Markern spezifisch zu beschichten. Die Haftung der Zellen beschränkte sich auf diese μ m-langen Bereiche ohne Streuung und zumindest bei Kulturzellen mit minimalen unspezifischen Bindungen. Selbst diese könnten durch Fabrikation im Reinraum wohl unterbunden werden.

Die theoretische Berechnung der Scherrate (Shear Stress) ergab, dass sich diese mit Werten bis $1,42 \text{ dyn/cm}^2$ im physiologischen Bereich der Zellen lag (Cheng et al., 2007) in der auch Zell-Rollen möglich sein sollte.

Die abschließende Analyse beinhaltete eine strukturierte Auswertung des Geschwindigkeitsverhaltens von Jurkat-Zellen im Kontakt mit CD45-beschichteten Bereichen anhand der von der Software MedeaLab ausgegebenen Daten. Nach Betrachtung eines recht breiten Konzentrationsbereichs von $1\text{-}6 \mu\text{g/ml}$ CD45 auf Neutravidin und PEG-Neutravidin funktionalisiertem PMMA, konnte bei keiner Konzentration, Funktionalisierung und Geschwindigkeit (Shear Stress) eine reproduzierbare Verlangsamung der Zellen nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Verlangsamungsrate von ca. 10 % wird auf zufällige Geschwindigkeitsänderungen nach Kollisionen mit anderen Zellen bzw. Kontaminationen zurückzuführen sein. In höheren Konzentrationsbereichen zeigte sich eine erhöhte Kollisionsgefahr durch vermehrt haftenden Zellen (Vgl. Abschnitt 4.3.2), wonach sich häufig

auch die Geschwindigkeit bzw. der Ausschlag (Amplitude) des Flussdiagramms änderte. Dies wird eher darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen nach einem Zusammenstoß oder einer kurzen Anhaftung zunächst unruhiger fließen. In vielen Fällen nahmen sie direkt wieder ihre Ausgangsgeschwindigkeit auf. Die Betrachtung der Amplitude lässt ebenfalls keine reproduzierbaren Schlüsse auf eine Reaktion mit der Antikörperbeschichtung zu. In einigen Fällen konnte eine Erhöhung der Amplitude in den beschichteten Bereichen verzeichnet werden, wobei dieser Effekt bei geringeren Fließgeschwindigkeiten eher auftrat als bei höheren. Vermutet worden war, dass vielleicht keine komplette Veränderung der Geschwindigkeit zu beobachten ist, sondern ein „Stop-and-Go“ Verhalten der Zellen. Dies ist bedingt dadurch, dass sich die Ligand-Rezeptor Bindungen, durch den Einfluss von Druck- und Adhäsionskräften, immer wieder lösen und neu formen was ein eher ruckartiges Bewegungsmuster der Zellen hervorbringen würde (McEver & Zhu, 2010).

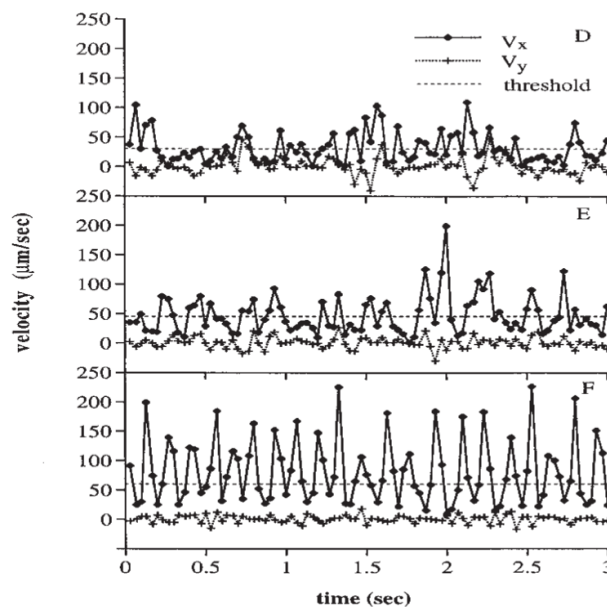


Abbildung 60: Geschwindigkeiten repräsentativer Neutrophile auf einer PNAd-Funktionalisierung (1:10) bei einem Scherstress von 2, 8 und 32 dyn/cm². V_x : Flussrichtung, V_y : senkrecht zur Flussrichtung (Chen & Springer, 1999)

So zeigten Chen et al., dass auch bei physiologisch rollenden neutrophilen Granulozyten eine recht hohe Schwankung in der Durchschnittsgeschwindigkeit vorliegt, da die Zellen zwischen dem Rollen immer wieder zu pausieren scheinen (Vgl. Abb 60) (Chen & Springer, 1999). Wäre dieses Bewegungsmuster signifikant von den anderen Schwankungen im Flussdiagramm zu unterscheiden, ließe sich

eine Einzelzellprofilierung auch mit diesem Parameter statt der Geschwindigkeit realisieren. Es zeigte sich, dass zunächst die Software überarbeitet werden sollte, um eine akkuratere Messung zu gewährleisten und die Daten einfacher exportieren und analysieren zu können. Die Schwankungen der Kurve (Abb. 51) könnten momentan eine schwache Zellreaktion überlagern. Des Weiteren sollte auf Reinraumfabrikation umgestellt werden, um fehlerhafte Signale durch im Kanal haftende Kontaminationen auszuschließen und die Qualität der Beschichtung zu sichern. Insgesamt betrachtet könnte es sein, dass der Bereich zwischen freiem Fluss, Rollen und Adhäsion so minimal ist (Cheung et al., 2011), dass in Betrachtung der multiplen Einflussparameter wie Scherrate, Heterogenität der Zelloberflächenmarkerexpression, gleichbleibende Beschichtungsqualität, Abstand der Zelle zum Rand, Länge der beschichteten Bereiche usw., der Bereich des Zell-Rollens kaum getroffen werden kann. Da Zell-Rollen in der aktuellen Literatur hauptsächlich auf Selektin- bzw. Integrin-funktionalisierten Oberflächen beobachtet und untersucht wurde (Choi, Karp, & Karnik, 2012; Kim, Koo, Moon, & Lee, 2016), wäre ein weiterer Lösungsansatz, die Antikörperlösungen mit einem kleinen Anteil an Selektinen zu mischen. Durch die Selektine, die in gleichen Anteilen in allen Antikörper-Spots vorliegen müssten, würde ein Rollen der Zellen impliziert und die Zellen näher an die Oberfläche gebracht. Über affinitätsbasierte Interaktionen mit den beigemischten Antikörpern könnten evtl. Unterschiede im Rollverhalten detektiert werden.

6. Zusammenfassung

Grundlage dieses Promotionsprojektes war die Weiterentwicklung eines Lab-on-a-Chip Systems zur Einzelzelluntersuchung mit dem Fokus auf die Profilierung zirkulierender Tumorzellen (*circulating tumor cells- CTC*). Durch Vorarbeiten bestand ein Proof of concept, welches die Verlangsamung von Kulturzellen in Reaktion auf affinitätsbasierte Wechselwirkungen mit Aptameren innerhalb eines mikrofluidischen Kanals nachwies. Die Durchführung beruhte dabei allerdings auf einer manuellen Vermessung der Zellgeschwindigkeit sowie Druckkontrolle in einem sehr kleinen Kanal von 20 x 20 µm (B x H), wobei der Kanal zur Hälfte mit nur einem Aptamer/einer Konzentration beschichtet werden konnte. Ziel des Projektes war somit die Maßstabvergrößerung und Halb-automatisierung des Systems, die zielgenaue Immobilisierung verschiedener Antikörper bzw. Antikörperkonzentrationen innerhalb eines Kanals sowie die Reproduzierung der Zellverlangsamung mit unterschiedlichen Zelllinien und Translation zu der Verwendung von Patientenproben. Zunächst konnte mit der Behandlung mit Sauerstoffplasma und anschließender Funktionalisierung des Polymethylmethacrylats (PMMA) mit Neutravidin über Carbodiimid-Chemie eine stabile Funktionalisierung mit hoher Proteinbindekapazität geschaffen werden. Durch Anwendung eines Microarray Spotters und Lösung der Antikörper in Polyvinylalkohol-Puffer (PVA) gelang eine exakte Immobilisierung der Antikörper innerhalb des Kanals, die eine spezifische Anhaftung von Zellen an den beschichteten Bereichen hervorrief. Dabei bleibt die Beschichtung anpassungsfähig an geänderte Chip-/Kanalgeometrien. Die affinitätsbasierte, spezifische Haftung der Zellen an den Antikörper-beschichteten Bereichen konnte durch den Vergleich der Genexpressionsmuster per quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qrt-PCR) und Immunfluoreszenz bestätigt werden. Recht niedrige Wiederfindungsraten bei allen Zellversuchen im Chip sind auf die Chipgeometrie zurückzuführen, die durch einen eigenen Chip vermeidbar wären. Unter anderem auch auf technische Schwierigkeiten mit dem Detektionssystem ist zurückzuführen, dass das Zell-Rollen nicht reproduziert werden konnte. Verbesserung der Software, Verwendung anderer Antikörper und Zelllinien sowie eine eventuelle Mischung der Antikörper mit Selektinen, könnten in zukünftigen Versuchen Ansatzpunkte für eine Lösung sein.

7. Literaturverzeichnis

1. Adams, A. A., Okagbare, P. I., Feng, J., et al Soper, S. A. (2008): Highly efficient circulating tumor cell isolation from whole blood and label-free enumeration using polymer-based microfluidics with an integrated conductivity sensor. *J. Am. Chem. Soc.* 130. (27), 8633–8641. doi:10.1021/ja8015022.
2. Alunni-Fabbroni, M., Sandri, M. T. (2010): Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization. *Methods (San Diego, Calif.)* 50. (4), 289–297. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.027
3. Angenendt, P., Glökler, J., Murphy, D., et al Cahill, D. J. (2002): Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials. *Analytical Biochemistry*, (309), 253–260.
4. Arlt, F.: Das neu identifizierte Gen MACC1 ist ein Regulator des HGF/Met-Signalweges und ist prognostisch für die Metastasierung des Kolonkarzinoms. (2008). Online-Publikation; <https://edoc.hu-berlin.de/bitstream/handle/18452/16626/arlt.pdf?sequence=1> 09.10.2017.
5. Barthel, S. R., Gavino, J. D., Descheny, L., et al Dimitroff, C. J. (2007): Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets.*, (11), 1473–1491.
6. Becker, H., Locascio, L. E. (2002): Polymer microfluidic devices. *Talanta* 56. (2), 267–287. doi:10.1016/S0039-9140(01)00594-X
7. Bergeron, S., Laforte, V., Lo, P.-S., et al Juncker, D. (2015): Evaluating mixtures of 14 hygroscopic additives to improve antibody microarray performance. *Analytical and bioanalytical chemistry* 407. (28), 8451–8462. doi:10.1007/s00216-015-8992-8
8. BioTeZ Berlin Buch GmbH. (2014): General User Information Polystreptavidin R. Berlin:
9. Burdick, M. M., Henson, K. A., Delgadillo, L. F., et al Benencia, F. (2012): Expression of E-selectin ligands on circulating tumor cells: Cross-regulation with cancer stem cell regulatory pathways? *Frontiers in oncology* 2, 103. doi:10.3389/fonc.2012.00103
10. CELLSEARCH® | Product and Systems Overview. Online-Publikation; <https://www.cellsearchctc.com/product-systems-overview/> 06.12.2014.
11. Chang, K. C., Tees, D. F., Hammer, D. A. (2000): The state diagram for cell adhesion under flow: leukocyte rolling and firm adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97. (21), 11262–11267. doi:10.1073/pnas.200240897
12. Chen, S., Springer, T. A. (1999): An Automatic Braking System That Stabilizes Leukocyte Rolling by an Increase in Selectin Bond Number with Shear. *J Cell Biol* 144. (1), 185–200. doi:10.1083/jcb.144.1.185
13. Chen, Y., Zhang, L., Chen, G. (2008): Fabrication, modification, and application of poly(methyl methacrylate) microfluidic chips. *Electrophoresis* 29. (9), 1801–1814. doi:10.1002/elps.200700552
14. Cheng, B., Song, H., Wang, S., et al Xiong, B. (2014): Quantification of rare cancer cells in patients with gastrointestinal cancer by nanostructured substrate. *Translational Oncology* 7. (6), 720–725. doi:10.1016/j.tranon.2014.10.001
15. Cheng, X., Irimia, D., Dixon, M., et al Toner, M. (2007): A microfluidic device for practical label-free CD4(+) T cell counting of HIV-infected subjects. *Lab on a chip* 7. (2), 170–178. doi:10.1039/b612966h
16. Cheng Dong, Xiao X. Lei. (2000): Biomechanics of cell rolling: shear flow, cell-surface adhesion, and cell deformability. *Journal of Biomechanics*, (33), 35–43.

17. Cheung, L. S.-L., Zheng, X., Wang, L., et al Zohar, Y. (2011): Adhesion dynamics of circulating tumor cells under shear flow in a bio-functionalized microchannel. *J. Micromech. Microeng.* 21. (5), 54033. doi:10.1088/0960-1317/21/5/054033
18. Choi, S., Karp, J. M., Karnik, R. (2012): Cell sorting by deterministic cell rolling. *Lab on a chip* 12. (8), 1427–1430. doi:10.1039/c2lc21225k
19. Christophis, C., Taubert, I., Meseck, G. R., et al Rosenhahn, A. (2011): Shear stress regulates adhesion and rolling of CD44+ leukemic and hematopoietic progenitor cells on hyaluronan. *Biophysical Journal* 101. (3), 585–593. doi:10.1016/j.bpj.2011.05.045
20. Conde, J., Dias, J. T., Grazú, V., et al La Fuente, J. M. de. (2014): Revisiting 30 years of bio-functionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Frontiers in chemistry* 2, 48. doi:10.3389/fchem.2014.00048
21. Darain, F., Wahab, M. A., Tjin, S. C. (2012): Surface Activation of Poly(Methyl methacrylate) by Plasma Treatment: Stable Antibody Immobilization for Microfluidic Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Analytical Letters* 45. (17), 2569–2579. doi:10.1080/00032719.2012.698673
22. Diaz, R., Nguewa, P. A., Parrondo, R., et al Calvo, A. (2010): Antitumor and antiangiogenic effect of the dual Research article EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib in a lung cancer model. *BMC Cancer* 10. (188).
23. Dixit, C. K., & Kaushik, A. (Eds.). (2016): *Microfluidics for Biologists: Fundamentals and Applications*.
24. Dorranean, D., Abedini, Z., Hojabri, M., et al Ghoranneviss, M. (2009): Structural and optical characterization of PMMA surface treated in low power nitrogen and oxygen plasmas. *Journal of Non-Oxide Glasses* 1. (3), 217–229.
25. Farace, F., Massard, C., Vimond, N., et al Vielh, P. (2011): A direct comparison of Cell Search and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *British journal of cancer* 105. (6), 847–853. doi:10.1038/bjc.2011.294
26. Fu-Bin Wang, Xue-Qin Yang, Shuo Yang, et al Jian-Cheng Tu. (2011): A Higher Number of Circulating Tumor Cells (CTC) in Peripheral Blood Indicates Poor Prognosis in Prostate Cancer Patients - A Meta-analysis. *Asian Pacific J Cancer Prev.*, (12), 2629–2635.
27. Gao, Y., Li, W., Pappas, D. (2013): Recent advances in microfluidic cell separations. *The Analyst* 138. (17), 4714–4721. doi:10.1039/c3an00315a
28. Gasiorowski, L., Dyszkiewicz, W., Zielinski, P. (2017): In-vivo isolation of circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients by CellCollector. *Neoplasma*. doi:10.4149/neo_2017_618
29. Green, N. M. (1963): The nature of the biotin-binding site. *Biochem. J.* 89, 599–609.
30. Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011): Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144. (5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
31. Harris, C. C., Reddel, R., Modali, R., et al Pfeifer, A. (1990): Oncogenes and Tumor Suppressor Genes Involved in Human Lung Carcinogenesis. In: Sutherland, B. M., Woodhead, A. D. (Eds.): *Basic Life Sciences: Vol. 53. DNA Damage and Repair in Human Tissues* (pp. 363–379). Boston, MA: Springer US.
32. Hosseini, S., Ibrahim, F., Djordjevic, I., et al Koole, L. H. (2014): Polymethyl methacrylate-co-methacrylic acid coatings with controllable concentration of surface carboxyl groups: A novel approach in fabrication of polymeric platforms for potential bio-diagnostic devices. *Applied Surface Science* 300, 43–50. doi:10.1016/j.apsusc.2014.01.203

33. Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M., & Schade, R. (Eds.). (2007): *Bioactive Egg Compounds*. Berlin Heidelberg: Springer.
34. Karabacak, N. M., Spuhler, P. S., Fachin, F., et al Toner, M. (2014): Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. *Nat Protoc* 9. (3), 694–710. doi:10.1038/nprot.2014.044
35. Kenis, P. J. (1999): Microfabrication Inside Capillaries Using Multiphase Laminar Flow Patterning. *Science* 285. (5424), 83–85. doi:10.1126/science.285.5424.83
36. Kim, K., Koo, J., Moon, S., et al Lee, W. G. (2016): Role of micropillar arrays in cell rolling dynamics. *The Analyst* 142. (1), 110–117. doi:10.1039/c6an01506a
37. Kim, Y., Kim, H. S., Cui, Z. Y., et al Ahn, M.-J. (2009): Clinicopathological Implications of Ep-CAM Expression in Adenocarcinoma of the Lung. *ANTICANCER RESEARCH* 29, 1817–1822.
38. Kitsara, M., Ducrée, J. (2013): Integration of functional materials and surface modification for polymeric microfluidic systems. *J. Micromech. Microeng.* 23. (3), 33001. doi:10.1088/0960-1317/23/3/033001
39. Koretzky, G. A., Picus, J., Schultz, T., et al Weiss, A. (1991): Tyrosine phosphatase CD45 is required for T-cell antigen receptor and CD2-mediated activation of a protein tyrosine kinase and interleukin 2 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2037–2041.
40. Krebsinformationsdienst & Krebsforschungszentrum, D.: *Arztbriefe: Befunde verstehen*. (2017). Online-Publikation; <https://www.krebsinformationsdienst.de/untersuchung/krebsbefunde-verstehen.php/> 09.10.2017.
41. Kumai, T., Matsuda, Y., Oikawa, K., et al Kobayashi, H. (2013): EGFR inhibitors augment antitumor helper T-cell responses of HER family-specific immunotherapy. *British journal of cancer* 109. (8), 2155–2166. doi:10.1038/bjc.2013.577
42. Kusnezow, W., Jacob, A., Walijew, A., et al Hoheisel, J. D. (2003): Antibody microarrays: An evaluation of production parameters. *Proteomics*, (3), 254–264.
43. Li, P., Stratton, Z. S., Dao, M., et al Huang, T. J. (2013): Probing circulating tumor cells in microfluidics. *Lab Chip* 13. (4), 602–609. doi:10.1039/c2lc90148j.
44. Lin, C.-W., Liao, M.-Y., Lin, W.-W., et al Wu, H.-C. (2012): Epithelial cell adhesion molecule regulates tumor initiation and tumorigenesis via activating reprogramming factors and epithelial-mesenchymal transition gene expression in colon cancer. *The Journal of biological chemistry* 287. (47), 39449–39459. doi:10.1074/jbc.M112.386235
45. Livnah, O., Bayer, E. A., Wilchek, M., et al Sussman, J. L. (1993): Three-dimensional structures of avidin and the avidin- biotin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, pp. 5076–5080.
46. Lustberg, M., Jatana, K. R., Zborowski, M., et al Chalmers, J. J. (2012): Emerging technologies for CTC detection based on depletion of normal cells. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* 195, 97–110. doi:10.1007/978-3-642-28160-0_9
47. Marrinucci, D., Bethel, K., Bruce, R. H., et al Kuhn, P. (2007): Case study of the morphologic variation of circulating tumor cells. *Human pathology* 38. (3), 514–519. doi:10.1016/j.humpath.2006.08.027
48. Matsuo, T., Nishizuka, S. S., Ishida, K., et al Wakabayashi, G. (2011): Analysis of the anti-tumor effect of cetuximab using protein kinetics and mouse xenograft models. *BMC research notes* 4, 140. doi:10.1186/1756-0500-4-140
49. Mavroudis, D. (2010): Circulating cancer cells. *Ann. Oncol.* 21 Suppl 7, vii95-100. doi:10.1093/annonc/mdq378

50. McEver, R. P., Zhu, C. (2010): Rolling cell adhesion. Annual review of cell and developmental biology 26, 363–396. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113238
51. Mehlen, P., Puisieux, A. (2006): Metastasis: a question of life or death. Nature reviews. Cancer 6, (6), 449–458. doi:10.1038/nrc1886
52. Meng, J., Zhang, P., Zhang, F., et al Wang, S. (2015): A Self-Cleaning TiO₂ Nanosisal-like Coating toward Disposing Nanobiochips of Cancer Detection. ACS nano 9, (9), 9284–9291. doi:10.1021/acsnano.5b04230
53. microfluidic ChipShop GmbH (Ed.). (2016): Lab-on-a-Chip_Katalog_10_2016. Jena:
54. Mints, M., Souchelnytskyi, S. (2011): Proteomic Strategy for detection of Circulating Tumor Cell surface antigens. Experimental Oncology 33, 193–195.
55. Nakano, A., Harada, T., Morikawa, S., et al Kato, Y. (1990): Expression of Leukocyte Common Antigen (CD45) on Various Human Leukemia/Lymphoma Cell Lines. Pathology International 40, (2), 107–115. doi:10.1111/j.1440-1827.1990.tb01549.x
56. Naruse, I., Ohmori, T., Ao, Y., et al Nishio, K. (2002): Antitumor activity of the selective epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) Iressa (ZD1839) in an EGFR-expressing multidrug-resistant cell line in vitro and in vivo. International journal of cancer 98, (2), 310–315. doi:10.1002/ijc.10173
57. NCI Dictionary of Cancer Terms. (2017). Online-Publikation; <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=45333/> 09.10.2017.
58. Nel, I. (2013): Identifizierung und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen beim Hepatozellulären Karzinom: unv. Dissertation.
59. Nel, I., Baba, H. A., Ertle, J., et al Hoffmann, A.-C. (2013): Individual Profiling of Circulating-Tumor Cell Composition and Therapeutic Outcome in Patients with Hepatocellular Carcinoma. Translational Oncology 6, (4), 420–428. doi:10.1593/tlo.13271
60. Neubauer, G., Neubauer, A. (2012): Krebs im Fokus – Häufigkeit und Kosten in Deutschland. Limburg an der Lahn: WORTREICH Gesellschaft für individuelle Kommunikation mbH,.
61. Paget, S. (1989): The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. Cancer metastasis reviews 8, (2), 98–101.
62. Pantel, K., Alix-Panabières, C. (2012): Detection methods of circulating tumor cells. J Thorac Dis 4, (5), 446–447. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2012.08.15
63. Patel, S., Thakar, R. G., Wong, J., et al Li, S. (2006): Control of cell adhesion on poly(methylmethacrylate). Biomaterials 27, (14), 2890–2897. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.12.009
64. Plaks, V., Koopman, C. D., Werb, Z. (2013): Cancer. Circulating tumor cells. Science 341, (6151), 1186–1188. doi:10.1126/science.1235226.
65. pmhdev: Cancer - PubMed Health - National Library of Medicine - PubMed Health. (2012). Online-Publikation; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0002267/> 08.11.2014.
66. Polyscience, I.: The Benefits of Neutravidin over Streptavidin and Avidin. Technical Data Sheet 779.
67. Powell, A. A., Talasaz, A. H., Zhang, H., et al Jeffrey, S. S. (2012): Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. PloS one 7, (5), e33788. doi:10.1371/journal.pone.0033788

68. Radenovic, A.: Microfluidics Lab on a Chip. Online-Publikation;
<http://lben.epfl.ch/files/content/sites/lben/files/users/179705/Lab%20on%20a%20Chip%20Handout.pdf/>.
69. Raimondi, C., Nicolazzo, C., Gradilone, A. (2015): Circulating tumor cells isolation: The "post-EpCAM era". *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu* 27. (5), 461–470. doi:10.3978/j.issn.1000-9604.2015.06.02
70. Ribatti, D. (op. 2010): *Protagonists of medicine*. Dordrecht: Springer.
71. Robert Koch-Institut (RKI). (2016): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Online-Publikation;
http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile/.
72. Rohrreibung bei laminarer / turbulenter Strömung. (2017). Online-Publikation;
<http://www.gunt.de/de/produkte/rohrreibung-bei-laminarer-turbulenter-stroemung/070.15001/hm150-01/glct-1:pa-119:pr-548/> 09.10.2017.
73. Sackmann, E. K., Fulton, A. L., Beebe, D. J. (2014): The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* 507. (7491), 181–189. doi:10.1038/nature13118
74. Sano, S., Kato, K., Ikada, Y. (1993): Introduction of functional groups onto the surface of polyethylene for protein immobilization. *Biomaterials* 14. (11), 817–822. doi:10.1016/0142-9612(93)90003-K
75. Schilling, E.: *Basic Microfluidic Concepts*. (2013). Online-Publikation;
<http://faculty.washington.edu/yagerp/microfluidicstutorial/basicconcepts/basicconcepts.htm/> 09.10.2017.
76. Shin, H.-M., Cho, W.-D., Lee, G.-K., et al Song, H.-G. (2011): Characterization of Monoclonal Antibodies against Human Leukocyte Common Antigen (CD45). *Immune network* 11. (2), 114–122. doi:10.4110/in.2011.11.2.114
77. Sieuwerts, A. M., Kraan, J., Bolt-de Vries, J., et al Foekens, J. A. (2009): Molecular characterization of circulating tumor cells in large quantities of contaminating leukocytes by a multiplex real-time PCR. *Breast cancer research and treatment* 118. (3), 455–468. doi:10.1007/s10549-008-0290-0
78. Squires, T. M., Quake, S. R. (2005): Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of modern physics* 77, 978–1026.
79. Statistisches Bundesamt: Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Die 10 häufigsten Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis). (2015). Online-Publikation;
https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HaeufigsteTodesursachen.html;jsessionid=1A110F8472C0818E896DE048CA3FBCE4.ca_e3/ 09.10.2017.
80. Steven A. Soper, Sean M. Ford, Shize Qi, et al and Michael C. Murphy. (2000): Peer Reviewed: Polymeric Microelectromechanical Systems. *Analytical Chemistry* 72. (19), 642 A-651 A. doi:10.1021/ac0029511
81. Stott, S. L., Hsu, C.-H., Tsukrov, D. I., et al Toner, M. (2010): Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107. (43), 18392–18397. doi:10.1073/pnas.1012539107
82. Sun, Y.-S. (2016): Comparison of Chip Inlet Geometry in Microfluidic Devices for Cell Studies. *Molecules (Basel, Switzerland)* 21. (6). doi:10.3390/molecules21060778

83. Sutherland, B. M., & Woodhead, A. D. (Eds.). (1990). *Basic Life Sciences: Vol. 53: DNA Damage and Repair in Human Tissues*. Boston, MA: Springer US.
84. Talmadge, J. E., Fidler, I. J. (2010): AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research* 70. (14), 5649–5669. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1040
85. Tantec GmbH: Was ist Corona Behandlung und wie funktioniert sie! Online-Publikation; <https://www.tantec-gmbh.de/was-ist-corona-behandlung-und-wie-funktioniert-sie.html/> 13.10.2017.
86. Tees, D. F. J., Chang, K.-C., Rodgers, S. D., et al Hammer, D. A. (2002): Simulation of Cell Adhesion to Bioreactive Surfaces in Shear: The Effect of Cell Size. *Ind. Eng. Chem. Res.* 41. (3), 486–493. doi:10.1021/ie010383p
87. Thermo Fisher Scientific. (2012): Thermo Scientific Crosslinking Technical Handbook. Online-Publikation; <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602163-Crosslinking-Reagents-Handbook.pdf/>.
88. Thomas, M. (1989): The Leukocyte Common Antigen Family. *Annual Review of Immunology* 7. (1), 339–369. doi:10.1146/annurev.immunol.7.1.339
89. Tiraferri, A., Elimelech, M. (2012): Direct quantification of negatively charged functional groups on membrane surfaces. *Journal of Membrane Science* 389, 499–508. doi:10.1016/j.memsci.2011.11.018
90. Varricchio, C. G. (op. 2004): *A cancer source book for nurses*. 8. ed. Sudbury, Mass.: Jones and Bartlett Publishers.
91. Vona, G., Sabile, A., Louha, M., et al Paterlini-Bréchet, P. (2000): Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells. *The American Journal of Pathology* 156. (1), 57–63. doi:10.1016/S0002-9440(10)64706-2
92. Weigelt, B., Peterse, J. L., van 't Veer, L. J. (2005): Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews. Cancer* 5. (8), 591–602. doi:10.1038/nrc1670
93. Welch, D. R., Tomasovic, S. P. (1985): Implications of tumor progression on clinical oncology. *Clinical & Experimental Metastasis* 3. (3), 151–188. doi:10.1007/BF01786761
94. Whitesides, G. M. (2006): The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442. (7101), 368–373. doi:10.1038/nature05058
95. Wieduwilt, M. J., Moasser, M. M. (2008): The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65. (10), 1566–1584. doi:10.1007/s00018-008-7440-8
96. Wu, P., Grainger, D. W. (2006): Comparison of Hydroxylated Print Additives on Antibody Microarray Performance. *J. Proteome Res.* 5. (11), 2956–2965. doi:10.1021/pr060217d
97. Xu, Y., Phillips, J. A., Yan, J., et al Tan, W. (2009): Aptamer-based microfluidic device for enrichment, sorting, and detection of multiple cancer cells. *Anal. Chem.* 81. (17), 7436–7442. doi:10.1021/ac9012072.
98. Yu, M., Stott, S., Toner, M., et al Haber, D. A. (2011): Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *The Journal of cell biology* 192. (3), 373–382. doi:10.1083/jcb.201010021
99. Zheng, X., Cheung, L. S.-L., Schroeder, J. A., et al Zohar, Y. (2011): Cell receptor and surface ligand density effects on dynamic states of adhering circulating tumor cells. *Lab on a chip* 11. (20), 3431–3439. doi:10.1039/c1lc20455f

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Englisch	Deutsch
BSA	Bovine Serum Albumin	Rinderalbumin
CAD	Computer Aided Design	rechnerunterstütztes Konstruieren
CD	Cluster of Differentiation	Unterscheidungsgruppen
cDNA	Compelemtary DNA	Komplementäre DNA
CK	Cytokeratines	Zytokeratine
CTC	Circulating Tumor Cell	zirkulierende Krebszelle
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DNA	Desoxyribonukleinacid	Desoxyribonukleinsäure
dpi	dots per inch	Punkte pro Zoll
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochloride	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	Enzymvermitteltes, immunologisches Nachweisverfahren
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule	epitheliales Zelladhäsionsmolekül
FBS	Fetal bovine serum	fetales Kälberserum
FDA	US Food and Drug Administration	US Behörde für Lebens- und Arzneimittel
fps	frames per second	Bilder pro Sekunde
Ftl.	Consecutively	Fortlaufend
HRP	horseradish peroxidase	Meerrettichperoxidase
ISET	isolation by size of epithelial tumour cells	größenbasierte Isolation von epithelialen Tumorzellen
MACS	Magnetic activated cell sorting	Magnetisch-aktivierte Zellsortierung
MB	Megabyte	Megabyte
mRNA	Messenger RNA	Boten-RNA
NHS	N- Hydroxysuccinimide	N- Hydroxysuccinimid
NSCLS	Non small cell lung cancer	Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig
PBMNC	Peripheral blood mononuclear cells	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphate buffered saline	phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Polycarbonate	Polycarbonat
PDMS	Polydimethylsiloxane	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylene glycol	Polyethylenglycol
pL	Pico litre	Pikoliter
PMMA	Polymethylmethacrylate	Polymethylmethacrylat
pmol	Pikomole	Pikomol
px	pixel	Pixel
qRT-PCR	Quantitative real-time Polymerase chain reaction	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
Re	Reynolds number	Reynoldszahl
SLA	Stereolithography	Stereolithografie
SU-8	epoxy-based negative photoresist	epoxidbasierter Negativ-Fotolack
TB	Toluidineblue	Toluidinblau
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
UV	Ultraviolet	Ultraviolettstrahlung

8.2 Danksagung

Ich danke **Univ.-Prof. Dr. med. Guido Gerken**, Direktor Emeritus der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie, ganz herzlich für die Übernahme der Betreuung dieses Promotionsprojektes.

Mein besonderer Dank gilt **Priv.-Doz. Dr. med. Andreas-Claudius Hoffmann**, für die Mitwirkung an diesem Projekt, die Stellung von Probenmaterial, Mitteln und Räumen an der Universitätsklinik Essen sowie für die Unterstützung und kritische Diskussion der Ergebnisse.

Ich bedanke mich ganz besonders bei Herrn **Dr. Sylvain Tourel**, Geschäftsführer der Firma ABA Biotech GmbH & Co. KG, für das sehr interessante Projekt, seine außerordentlich engagierte Auseinandersetzung und Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse, die vielen kritischen Diskussionen sowie natürlich die Finanzierung.

Ich bedanke mich insbesondere bei **Dr. Ivonne Nel**, zunächst wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Dr. Hoffmann und nachfolgend bei der Firma ABA Biotech GmbH & Co. KG, für die tolle Unterstützung, klinische Anleitung und Motivation während des gesamten Projektes.

Mein großer Dank gilt dem gesamten **Team der Firmen ABA und SIT** aus Dortmund, für die stetige Unterstützung und die beratenden Gespräche.

Ich danke **Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Bauer** und seinem extrem kooperativen Labor-team für die stete Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung dieser Weg nicht möglich gewesen wäre, sowie meinem Mann, ohne dessen aufbauende Worte und Motivation diese Arbeit wohl nie entstanden und fertiggestellt worden wäre.

8.3 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.