

Entwicklung und Anwendung neuer Sensoren in der Biotechnologie

der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Daniel Riechers

geboren am 29.04.1976, in Hannover

2010

Referent: Prof. Dr. T. Scheper
Institut für technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann
Institut für technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 14.09.2010

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Thomas Scheper für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis.

Für die Übernahme des Korreferats gilt der Dank Herrn Prof. Bernd Hitzmann.

Für die Diskussion diverser Fragestellungen und die Betreuung danke ich Frau PD Dr. Cornelia Kaper und Herrn Dr. Sascha Beutel.

Für die elektrotechnische Beratung und den Aufbau von Schaltungen bedanke ich mich bei Herrn Thorleif Hentrop und fürs Grobe bei den Kollegen aus der feinmechanischen Werkstatt.

Herrn Martin Pähler und Frau Martina Weiss, den beiden Koryphäen im Umgang mit jedem Laborgerät gilt an dieser Stelle Dank für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft.

Sonia und meinen Eltern, die mich während der Anfertigung der Arbeit unterstützt haben, danke ich ganz besonders.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Aufgabestellung	1
2	Grundlagen	3
2.1	<i>Einweg-Sensoren für das Bioprozess-Monitoring</i>	3
2.2	<i>Optische Sensoren</i>	4
2.2.1	Optischer pO ₂ -Sensor	5
2.2.2	Optische pH-Messung	6
2.3	<i>Leitfähigkeitsmessung</i>	8
2.4	<i>Impedanzmessungen zur nicht-invasiven Online-Analytik</i>	9
2.4.1	Die elektrische Impedanz	9
2.5	<i>Impedanzspektroskopie</i>	10
2.6	<i>Electric Cell Substrate Impedance Sensing</i>	11
2.6.1	Allgemeines Messprinzip	12
2.6.2	Elektrisches Modell	13
3	Weiterentwicklung eines blasenfreien Begasungssystems	18
3.1	<i>Kommerzielles System zur scherstressarmen Begasung</i>	19
3.2	<i>Bau von Hohlfaser-Begasungssystemen mit verschiedenen Membrantypen</i>	20
3.3	<i>Sauerstofftransfercharakteristika</i>	20
3.3.1	k _L a-Werte	21
3.3.2	Bestimmung der Diffusionskoeffizienten	22
3.3.3	Einfluss der Sterilisationsmethode	23
3.4	<i>Optimiertes System unter Kultivierungsbedingungen – Hefekultivierung</i>	24
3.5	<i>Optimiertes System unter Kultivierungsbedingungen –Hybridomzellkultivierung</i>	27
4	Aufbau eines ECIS-Messsystems	34
4.1	<i>Elektrischer Aufbau</i>	34
4.1.1	Allgemeines Lock-In-Prinzip	34
4.1.2	Aufbau von digitalem Lock-In-Verstärker und ECIS-System	36
4.1.3	Messablauf	37
4.1.4	Test des Systems	38
4.2	<i>Zytotoxizitätstests</i>	40
4.2.1	Zytostatika und Zellzyklus	40
4.2.2	Substanzen	42
4.2.3	MTT-Assay zur Durchführung von Zytotoxizitätstests	43

4.2.4	Elektrodenbedeckungsgrad und Impedanz	44
4.2.5	ECIS-Messung zur Durchführung von Zytotoxizitätstests	45
4.3	<i>ECIS in dehnbaren Silikonschalen</i>	46
4.3.1	ECIS-Slides mit Silikon-Metall-Komposit-Elektroden	48
4.3.2	Herstellung von ECIS-Slides mit Silikon-Metall-Komposit-Elektroden	50
4.3.3	Elastizität dehnbare Silikon-Metall-Komposit-Elektroden	51
4.3.4	Oberflächenverteilung der Metallpartikel	52
4.3.5	Impedanzspektroskopische Untersuchung von Gold-Silikon-Komposit-Elektroden	53
4.3.6	Einfluss mechanischer Dehnung auf die Elektrodenimpedanz	55
4.3.7	REM-Aufnahmen besiedelter Elektroden	56
4.4	<i>Dehnbare ECIS-Elektroden in Dünnschichttechnik</i>	58
4.4.1	Optimierung der Herstellungsparameter	60
4.4.2	Impedanzspektroskopische Untersuchung der Golddünnfilmelektroden	62
4.4.3	Finite Elemente Analyse der Stressschalen	64
4.4.4	Einfluss mechanischer Dehnung auf die Elektrodenimpedanz	67
4.4.5	Test des dehnbaren ECIS-Slides	69
5	Zusammenfassung und Ausblick	71
6	Anhang	75
6.1	<i>Ergebnisse</i>	75
6.1.1	BJH-Messungen	75
6.1.2	Tests des CO ₂ -Sensors Capnostat 5	76
6.1.3	Hybridomzellkultivierung im Spinner (Glutamin-fed-batch)	77
6.1.4	ECIS-Messungen zur Durchführung von Zytotoxizitätstests	78
6.2	<i>Methoden</i>	79
6.2.1	Bestimmung des $k_L a$ -Werts nach der Sulfit-Methode	79
6.2.2	BJH-Messung	80
6.2.3	Berechnung der spezifischen Produktbildungsrate	81
6.2.4	Maximale mit Sauerstoff zu versorgende Zelldichte	81
6.2.5	Durchführung von ECIS-Messungen für Zytotoxizitätstests	81
6.2.6	Elektrochemische Vergoldung von Silbersilikon-elektroden	82
6.2.7	Zellkultur	82
6.2.8	Offline-Analytik	84
6.3	<i>Medien und Puffer</i>	87
6.3.1	Zellkultur	87
6.3.2	Offline-Analytik	88
6.4	<i>Zelllinien</i>	89
6.5	<i>Materialien</i>	90

6.5.1	Messkammern zur Durchführung von Impedanzmessungen	90
6.5.2	Zur Herstellung dehnbarer ECIS-Slides verwendete Masken	90
6.5.3	Geräte	91
6.5.4	Verbrauchsmaterialien	92
6.5.5	Reagenzien und Kits	92
7	Literaturverzeichnis	95

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AU	Absorbance Unit
CoA	Coenzym A
D	Diffusionskoeffizient
D_{eff}	effektiver Diffusionskoeffizient
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI	Elektrodenimpedanz
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBS	fötales Rinderserum
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
IR	Infrarot
KGV	Korngrößenverteilung
mg	Milligramm
MSa	Megasample (1 Million Messungen)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid
μg	Mikrogramm
min	Minute
μm	Mikrometer
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
PDMS	Polydimethylsiloxan
PWV	Porenweitenverteilung
PP	Polypropylen
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
REM	Rasterelektronenmikroskop
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit

Abstract

This study entails developments and applications of modern single use sensors in the field of biotechnology and life sciences. A new hollow-fiber based system for the shear stress-free aeration of mammalian cell cultures was evaluated. The system's oxygen transfer characteristics were determined by application of a single use optical oxygen sensor. Different types of hollow-fibers were tested for their oxygenation-performance and an optimized membrane-spinner system was developed. This optimized system was applied to the cultivation of a mouse hybridoma model cell line. The maximum cell densities and antibody yields for the optimized system were determined and compared to standard spinner flasks. Furthermore a carbondioxide sensor-system with a disposable flowthrough cell from critical care patient monitoring was evaluated for the application in bioreactor exhaust gas analysis.

In the second part of the study a cost-effective system for *electric cell substrate sensing* (ECIS) on adherent cell mono layers was developed. The measurement technique was introduced by Giaever and Keese in 1984 and is suitable to determine the effect of chemical, biological and physical stimuli on mammalian cells growing in mono layers on gold microelectrodes. By means of a commercially available oscilloscope a digital lockin-amplifier was set up, the data acquisition software for the ultralow-current impedance measurements was implemented in Labview[®]. Cytotoxicity assays for the determination of dose-response-curves for the effect of Tributyltin, α -Solanine and Ratjadone on the model cell lines A549 and Saos-2 were carried out to demonstrate the system's feasibility. Furthermore an innovative system for ECIS-measurements on mechanically strained cell mono layers was developed. Therefore basic techniques for the creation of flexible gold microelectrodes on silicone membranes were evaluated. The dependency of the electrode properties on the extent of linear strain was determined. In a proof-of-concept the feasibility for the newly developed ECIS-measurement principle could be demonstrated by application of mechanical strain to MC3T3-E1 cell mono layers growing on flexible gold microelectrodes. The adhesion and proliferation of cells could be monitored by impedance measurements under parallel application of 5% uni-axial cyclic strain.

Keywords: membrane aeration, oxygen transfer, *electric cell substrate sensing*, flexible gold microelectrodes

Kurzfassung

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Fragestellungen aus dem Bereich der Biotechnologie bzw. der Lebenswissenschaften mit modernen - teilweise Einweg-Sensoren untersucht und diskutiert. Unter anderem wurde ein neuartiges Einweg-Hohlfasermembran-Begasungssystem für die Säugetierzellkultur evaluiert und hinsichtlich seiner Sauerstofftransfer-Charakteristika untersucht. Dazu kamen optische Einweg-Sauerstoffsensoren zum Einsatz. Verschiedene Hohlfaser-Membrantypen wurden im Laufe der Arbeiten getestet. Anhand einer Maus-Hybridom-Modellzelllinie wurde ein bezügl. des Sauerstofftransfers optimiertes Membranbegasungssystem evaluiert und hinsichtlich der Antikörperproduktionsraten mit standardgemäßen Spinnerflaschen verglichen. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeiten beinhaltet die Evaluierung eines neuartigen Kohlenstoffdioxidgasphasensensors aus der Medizintechnik, mit Einweg-Durchflußzelle, unter Kultivierungsbedingungen.

Weiterhin wurde ein kostengünstiges Messsystem für Impedanzmessungen an Säugetierzellschichten aufgebaut. Dazu wurde mittels eines handelsüblichen Digital-Oszilloskops mit integriertem Signalgenerator ein digitaler Lock-In-Verstärker aufgebaut. Die Auswertungs- und Steuerungssoftware wurde in Labview[®] implementiert. Die als *electric cell substrate sensing* (ECIS) bekannten und von Giaever und Keese vorgestellten Impedanzmessungen an konfluenten Zellschichten ermöglichen es Informationen über die Morphologie, Motilität und Viabilität von auf Mikroelektroden anhaftenden Zellschichten zu gewinnen. Das System wurde zunächst für Zytotoxizitäts- bzw. Proliferationsinhibierungstests an einigen Modellzelllinien eingesetzt. Hierbei wurden Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Einwirkung von Tributylzinnhydrid, α -Solanin und Ratjadon auf die Modellzelllinien A549 und Saos-2 ermittelt. Weiterhin wurde ein neuartiges System für ECIS-Messungen an mechanisch gestressten Zellschichten entwickelt. Hierzu wurden die Grundlagen zur Herstellung dehnbarer ECIS-Mikroelektroden auf Silikonsubstraten gelegt sowie die generelle Machbarkeit der ECIS-Messung mittels flexibler Goldmikroelektroden auf Silikonmembranen gezeigt.

Schlagworte: Membranbegasung, Sauerstofftransfer, *electric cell substrate impedance sensing*, dehbare Goldmikroelektroden

1 Einleitung und Aufgabestellung

Die biotechnologische Herstellung und Vermarktung rekombinanter Produkte erlebt ein seit Jahren ungebrochenes weltweites Wachstum. Hierbei geht der Trend weg von teuren und unflexiblen monolithischen Produktionsstraßen - hin zu flexiblen, vorsterilisierten, skalierbaren, einmal verwendbaren Systemen. Die zunehmende Verbreitung von Einwegsystemen in der pharmazeutischen Industrie resultiert aus dem geringeren Validierungsaufwand beim Einsatz dieser Systeme. Konventionelle Edelstahlreaktorsysteme und Medien- bzw. Produkthalt tanks müssen nach jedem Produktionszyklus zeitaufwändigen Reinigungs- und Sterilisierungszyklen mit hohem Dokumentationsaufwand unterworfen werden. Einwegsysteme bieten demgegenüber den Vorteil, dass sie als *ready-to-use*-Lösung schnell in Betrieb genommen und anschließend nach thermischer Inaktivierung unkompliziert entsorgt werden können, wodurch sich Produktionszyklen deutlich verkürzen lassen. Die Sterilisationsvalidierung verlagert sich hierbei zum Zulieferer, die Reinigungsvalidierung entfällt. Der reduzierte Zeitaufwand ist vor allem bei der Entwicklung pharmakologischer Wirkstoffe vorteilhaft, da die *time-to-market* in vielen Fällen erfolgsentscheidend ist. Ein weiterer Vorteil von Einwegsystemen besteht in dem signifikant niedrigeren Risiko der Kreuzkontamination zwischen verschiedenen Prozessen. Aus wirtschaftlicher Sicht führt die Verwendung von Einwegprozessequipment zu niedrigeren initialen Anschaffungskosten und einer günstigeren Kostenverteilung über die Projektlaufzeit [1, 2]. Aufgrund der variablen Anbindung von Einwegsystemen beispielsweise an Medienanschlüsse oder die auf die Produktion (*Upstream*) folgenden *Downstreaming*schritte ergeben sich flexiblere Prozessstrukturen als bei festverrohrten Produktionsanlagen. Nachteilig bei der Verwendung von Einwegsystemen scheint jedoch, dass aufgrund der aufwendigen Validierung von GMP-Prozessen (*Good Manufacturing Practice*) zur biotechnologischen Herstellung von Pharmaprodukten eine langfristige Bindung an den Zulieferer der *single-use*-Systeme entsteht. Die zurzeit noch fehlende Standardisierung der Einwegprodukte, mit momentan noch vielen proprietären Lösungen, beispielsweise bei Fluidikverbindungen und Sensorsystemen, verstärkt die Abhängigkeit vom Zulieferer zusätzlich, welche durch langfristige Lieferverträge abgemildert werden kann.

Um eine gleichbleibende hohe Qualität bei der Produktion pharmakologischer Wirkstoffe zu gewährleisten, werden in Kombination zu den *single-use*-Bioreaktorsystemen verlässliche Sensorsysteme benötigt, die optimal in diese Systeme migrieren. Durch die PAT-Initiative (*Process Analysis Technology*) der FDA, welche den gezielten Einsatz von Prozessanalysetechnik in der Entwicklung, Produktion und dem Qualitätsmanagement in der Nahrungsmittel- und der pharmazeutischen Industrie fördert, wird die Bedeutung der Sensorik für Bioprozesse in den kommenden Jahren weiter zunehmen. Auch die Einwegsensoren und Einwegreaktorsysteme werden sich an den strengen Standards der FDA messen lassen müssen.

In der vorliegenden Arbeit soll ein *single-use* Zellkultursystem, der SuperSpinner (Sartorius Stedim Biotech) zur Herstellung kleiner Produktmengen oder zum Einsatz als *Seed*-Reaktor mithilfe eines wegwerfbaren optischen Sauerstoffsensors auf seine Sauerstofftransfereigenschaften untersucht werden. Das System basiert auf Hohlfasermembranen zur blasenfreien und scherstressarmen Begasung von Zellkulturen. Im Laufe der Arbeiten sollen basierend auf verschiedenen Typen von Hohlfasermembranen eigene Prototypen des Reaktorsystems aufgebaut und hinsichtlich ihrer Sauerstofftransfercharakteristika mit etablierten Systemen verglichen werden. Ein optimiertes System soll zur Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* sowie der Modellhybridomzelllinie IV F19.23 verwendet werden. Hierbei sollen vor allem die maximal erreichbaren Zellzahlen in Abhängigkeit des Sauerstoffeintrags ermittelt werden. Weiterhin soll die Antikörperproduktionsrate der Hybridomzelllinie im SuperSpinner mit der Rate in Systemen mit optimiertem Sauerstoffeintrag verglichen werden. Bei der Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* soll ein neuartiger Sensor zur CO₂-Messung (Capnostat 5, Respirationics) im Reaktorabgasstrom, mit Einweg-Durchflusszelle getestet werden. Dieser Sensor wird bislang in der Medizintechnik zur respiratorischen Überwachung von Intensivpatienten eingesetzt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll ein kostengünstiges System für Impedanzmessungen an adhärent wachsenden Säugetierzellkulturen aufgebaut werden. Generell eignen sich diese Systeme für das *High-Throughput-Screening* (HTS) bei pharmakologischen Wirkstofftests. Einige derartige Systeme wurden in den letzten Jahren erfolgreich von z.B. Applied Biophysics in Form des ECISz-Systems und durch Roche Diagnostics (xCELLigence) kommerzialisiert. Hierbei stellen beide Anbieter dedizierte HTS-Lösungen zur Impedanzmessung in Einweg- 96-Wellplatten.

Das aufzubauende Impedanzmesssystem soll auf einem handelsüblichen Digitaloszilloskop mit integriertem Signalgenerator basieren und anhand von Testungen bekannter zytotoxischer Substanzen evaluiert werden. Weiterhin soll getestet werden, ob sich die Elektrodenstrukturen für Impedanzmessungen an adhärent wachsenden Säugetierzellschichten innerhalb von dehnbaren Silikonschalen implementieren lässt. Diese Silikonschalen werden bislang zur Untersuchung des Differenzierungsverhaltens von Knochenvorläuferzellen unter mechanischem Stress verwendet.

2 Grundlagen

2.1 Einweg-Sensoren für das Bioprozess-Monitoring

Die Qualität und die Ausbeute biotechnologisch gewonnener Wirkstoffe und Substanzen basieren auf der strikten Einhaltung eines physikalischen, chemischen und biologischen Parameterraums bei der Herstellung. Als entscheidende physikalische Größen treten bei der Produktion von z.B. therapeutischen Proteinen mittels der Expression in tierischen Zellen oder Mikroorganismen die Medientemperatur, Scherkräfte, der Druck im Reaktorkopfraum und die Medienleitfähigkeit auf. Wichtige chemische Prozessgrößen stellen dabei der Gehalt an Gelöstsauerstoff (pO_2) und Kohlenstoffdioxid (pCO_2), Glucose und Laktat, sowie der pH-Wert dar. Als biologische Einflussgrößen sind die Zelldichte und die Viabilität der Kultur zu nennen. Zur Regelung der genannten Parameter müssen geeignete Sensoren den Zustand der Kultivierung kontinuierlich überwachen. Die dafür nötigen Antwort- bzw. Analysenzeiten der Sensoren richten sich nach der Geschwindigkeit der Änderungen des Parameters im System. Während bei der Steuerung von Kultivierungen langsam wachsender Organismen wie beispielsweise tierischer Zellen Sensorantwortzeiten im Bereich mehrerer Minuten akzeptabel sind, müssen z.B. Fermentationen von schnellwachsenden Bakterien oder Pilzzellen durch Sensoren mit Antwortzeiten im Bereich mehrerer Sekunden bis zu einer Minute erfasst werden. Die Ansprüche an die Langzeitstabilität der Sensoren ergeben sich aus der Dauer der zu überwachenden Prozesse und liegen bei Batch-Fermentationen von Mikroorganismen im Bereich von wenigen Stunden bis zu einer Woche. Bei Kultivierungen tierischer Zellen, beispielsweise im Perfusionsbetrieb, können Prozesszeiten bis zu mehreren Monaten auftreten [3]. Ein Vorteil bei der Verwendung von Einwegsensoren besteht darin, dass die Sensorperformance nur für den zu überwachenden Kultivierungszeitraum erbracht werden muss. Eine Validierung des Sensors als Vorbereitung für den nächsten Produktionszyklus entfällt. Die Anbindung des Sensors an den Prozess kann dabei auf unterschiedliche Weise erreicht werden, bzw. ergibt sich aus dem Sensorprinzip. *In-situ*-Sensorik wird direkt in den Reaktor eingebracht und ermöglicht repräsentative Messungen des Reaktorinhalts ohne bzw. mit geringer Zeitverzögerung. Für Einweg-*in-situ*-Sensoren ergibt sich daraus die Anforderung, dass sie mittels β - oder γ -Bestrahlung unter Erhalt der Funktionalität sterilisierbar sein müssen. Sensoren welche auf ionensensitiven Feldeffekttransistoren (ISFET) basieren, wie z.B. pH-Sensoren (pHFET) erfüllen diese Anforderung nicht, da ionisierende Strahlung die Halbleitereigenschaften dieser Systeme verändert und die Sensoren damit zerstört werden [4]. *In-line*-Anbindung von Sensorik, also die Platzierung des Sensors in einem Reaktorbypass wird z.B. dann angewandt wenn das Messprinzip durch die im Bioreaktor vorherrschenden Bedingungen (Temperaturschwankungen, Gasblasen) beeinträchtigt wird. Beispiele hierfür sind ultraschallbasierte Sensoren [5] sowie Messungen in Durchflusszellen zur IR-Spektroskopie [6, 7]. In

der nachfolgenden Tabelle 2.1 sind einige Beispiele für biotechnologisch relevante Parameter und entsprechende Messprinzipien von Einweg-Sensoren für diese Größen angegeben.

Tabelle 2.1: Biotechnologisch relevante Prozessparameter und Einwegsensoren zu deren Messung.

Parameter	Messprinzip	Einschränkungen	Hersteller (ausgewählte Beispiele)
Temperatur	faseroptisch	hoher Preis	GetSens (Dortmund)
	Thermistor	-	Heraeus (Kleinostheim)
Druck	MEMS (Micro Electro Mechanical System)	-	Scilog (Middleton, USA)
Leitfähigkeit	Dickschicht-Elektroden	-	Heraeus Scilog
pH	optisch	-	Presens (Regensburg) Fluorometrix (Baltimore, USA) Finesse (Santa Clara, USA) Polestar (Needham H., USA)
	pHFET	nicht gammasterilisierbar, bislang keine Einweg- Referenzelektrode verfügbar	Sentron (Roden, NL)
pO ₂	optisch	-	Presens Ocean Optics (Dunedin, USA) Polestar Fluorometrix Finesse
pCO ₂ (fl. Phase)	optischer pH-Sensor als Transducer für Severinghaus-Sensor	eingeschränkte Lagerfähigkeit	Presens Polestar
pCO ₂ (Gasphase)	optisch (MIR)	Druckkompensation nötig	Respironics (Murrysville, USA)
Biomasse	Kapazitätsmessung	aufwendige Kalibration	Fogale Nanotech Aber
Glucose, Laktat, Glutamat	Enzymelektrode	eingeschränkte Lagerfähigkeit	C-CIT (Wädenswill, CH)

2.2 Optische Sensoren

Einen wachsenden Anteil der Sensoren zum Bioprozessmonitoring stellen optische Systeme dar. Zu den optischen Sensoren werden alle Systeme gezählt bei denen die Messung auf der Interaktion von elektromagnetischer Strahlung mit Materie basiert. Da diese Wechselwirkung im Allgemeinen schwach ausgeprägt ist und zudem außerordentlich schnell vonstatten geht, arbeiten optische Sensoren nicht-invasiv und zerstörungsfrei [8]. Da die Messzeiten optischer Verfahren gering sind, können für die überwachten Prozesse zumeist Echtzeitdaten gewonnen werden. Optische Sensoren können über Lichtwellenleiter und transparente Fenster mit Bioreaktoren gekoppelt werden. Dadurch können Detektor und Transducer räumlich getrennt voneinander betrieben werden, so dass empfindliche Detektoren geschützt werden. Die optischen Signale selbst sind unempfindlich gegenüber

elektromagnetischen Feldern, wie sie z.B. RührerMotoren von Bioreaktoren abstrahlen. Die Auftrennung des Messsystems in den teuren wiederverwendbaren Detektor und einen preisgünstigen wegwerfbaren Transducer prädestiniert diese Systeme für Einweg-Sensoren. Mittels der Einbringung von im relevanten Wellenlängenbereich transparenten Fenstern in Einweg-Bioreaktoren können sowohl Transmissions-, als auch Reflektionsmessungen durchgeführt werden. Dadurch werden alle Formen der spektroskopischen Analyse wie UV-,IR- und VIS-Spektroskopie möglich [9], sind aber bislang für die Einweg-Sensorik noch nicht kommerzialisiert worden. Spektroskopische Methoden ermöglichen es aufgrund der hohen Informationsdichte häufig, viele Prozessgrößen simultan zu erfassen. Aufgrund der starken Überlagerung der Banden werden chemometrische Auswerteverfahren nötig [10]. Einschränkend gilt auch hier, dass die Fenstermaterialien gegenüber ionisierender Strahlung, der etablierten Sterilisationsmethode für Einwegbioreaktoren, stabil sein müssen. Idealerweise sollten sie sich direkt mit den für Einwegbioreaktoren üblichen polymerbasierten Reaktorwänden oder anderen biokompatiblen Kunststoffen thermisch verschweißen lassen.

Reflektionsmessungen werden sowohl bei der Trübungsmessung (Turbidimetrie) zur Bestimmung von Zelldichten als auch für Fluoreszenzmessungen (Fluorimetrie) zur Messung von Substrat-, Produkt- oder Metabolitkonzentrationen eingesetzt. Der Einsatz von Multiplexern, welche eine Ankopplung nahezu beliebig vieler faseroptischer Sensoren an ein Spektrometer erlaubt, ermöglicht es mehrere Reaktoren parallel mit einem einzigen Detektor zu überwachen [11].

2.2.1 Optischer pO_2 -Sensor

Mit optischen pO_2 -Sensoren lassen sich Sauerstoffkonzentrationen in kleinsten Volumina bestimmen. Ein Vorteil dieser Sensorsysteme im Vergleich zur elektrochemischen Clark-Elektrode ist die verbrauchsfreie und nicht-invasive Messung. Die pO_2 -Messung mit optischen Sensoren wird somit unabhängig von der Anströmgeschwindigkeit des Sensors. Optische pO_2 -Sensoren lassen sich generell sowohl zur Messung in der flüssigen als auch in der Gasphase anwenden. Der prinzipielle Aufbau eines solchen Sensorsystems ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

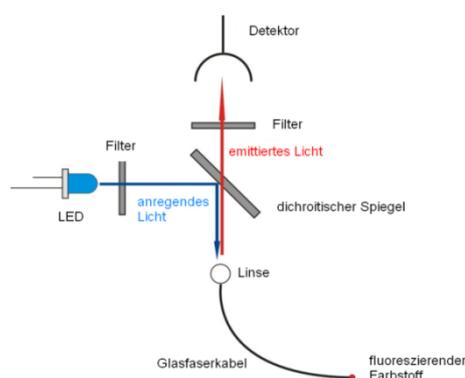


Abbildung 2.1: Prinzipieller Aufbau eines faseroptischen Sauerstoffsensors.

Das Messprinzip optischer O₂-Sensoren beruht auf dem dynamischen Quenching der Fluoreszenz von Farbstoffen, welche z.B. an der Spitze eines Lichtwellenleiters immobilisiert vorliegen können, durch molekularen Sauerstoff. Über eine Glasfaser wird der Farbstoff mit Licht aus einer LED zur Fluoreszenz angeregt. Lebensdauer und Intensität der Fluoreszenz hängen dabei von der Sauerstoffkonzentration in der Umgebung der Sensorchemie ab. Das rückwärtige Fluoreszenzlicht wird wieder in den Lichtwellenleiter eingekuppelt, durch einen dichroitischen Spiegel vom Anregungslicht abgetrennt und mit einem Photomultiplier oder einer Photodiode gemessen. Der quantitative Zusammenhang zwischen der Quencherkonzentration und der Fluoreszenzlebenszeit bzw. der Fluoreszenzintensität des Fluorophors in Gegenwart des Quenchers und in dessen Abwesenheit wird durch die Stern-Volmer-Gleichung beschrieben [12]:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad (2.1)$$

Mit	I_0/τ_0	Fluoreszenzintensität/Fluoreszenzlebenszeit für [Q]=0 mol/L
	I/τ	Fluoreszenzintensität/Fluoreszenzlebenszeit für [Q]≠0 mol/L
	K_{SV}	Stern-Volmer-Konstante
	$[Q]$	Quencherkonzentration

Zur pO₂-Messung werden häufig in Silikon oder Sol-Gel-Gläsern, immobilisierte Komplexe wie z.B. Tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin-Ruthenium(II) oder Platinocäthylporphyrin als Fluoreszenzfarbstoffe verwendet [13]. Die kommerziell erhältlichen optischen Sauerstoffsensoren können unter Erhalt ihrer Sensitivität autoklaviert oder strahlensterilisiert werden. Nachteilig auf die Langzeitstabilität optischer Sauerstoffsensoren wirkt sich das Photobleichen der Farbstoffe aus. Intensitätsbasierte Messungen werden durch diesen Effekt stärker beeinträchtigt als Fluoreszenzlebenszeit-Messungen.

2.2.2 Optische pH-Messung

Die optische pH-Messung ist sowohl mittels pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen, als auch mit absorptionsbasierten pH-Indikatoren möglich. Zwei häufig verwendete Vertreter der ersten Klasse sind Fluoresceinderivate und 8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonsäure (HPTS). Die Fluoresceinderivate werden jedoch aufgrund ihrer geringen Photostabilität und des geringen Messbereichs hauptsächlich in der Fluoreszenzmikroskopie zur Bestimmung intrazellulärer pH-Werte eingesetzt [14, 15]. Zu den klassischen absorptionsbasierten pH-Indikatoren gehören z.B. Phenol- und Kongorot [16, 17]. Die genannten Farbstoffe lassen sich z.B. am Ende einer Glasfaser in protonendurchlässigen Matrices immobilisieren [18]. Der immobilisierte Farbstoff, ändert seine optischen Eigenschaften in Abhängigkeit der Protonen-Konzentration des mit ihm in Kontakt stehenden Mediums. Der generelle

Aufbau eines fluoreszenzbasierten faseroptischen pH-Sensors entspricht dem System aus Abbildung 2.1. Nachteile der fluoreszenzbasierten pH-Messung sind der eingeschränkte analytische Messbereich von ca. pH 5,5-8,5 und die Ionenstärke-Abhängigkeit der pH-Indikatoren [19]. Viele in polymeren Matrices oder Membranen eingeschlossene Indikatoren verlieren beim Autoklavieren ihre Sensitivität oder werden bei andauerndem Medienkontakt aus der Trägermatrix ausgewaschen. Besonders das letztgenannte *Leaching* der Farbstoffe ist bei der Anwendung optischer pH-Sensoren in Pharmaprozessen problematisch. Neuere Ergebnisse zeigen, dass kovalent gebundene Fluoreszenzfarbstoffe größere Stabilität gegenüber Temperatur und Auswaschung aufweisen, so dass die für biotechnologische Anwendungen wichtigen SIP-Prozesse (*steam-sterilization in place*) möglich werden [20]. Die Cross-Sensitivität auch dieser Systeme gegenüber der Ionenstärke bleibt jedoch weiterhin problematisch und macht einen industriellen Einsatz nur unter kontrollierten Bedingungen möglich. Die Immobilisierung von Farbstoffen in Trägermaterialien, in denen nativ eine hohe Ionenstärke vorliegt, kann die Signalabhängigkeit darauf basierender Sensoren gegenüber der Ionenstärke der Analytlösung minimieren [20]. Durch eine einfache Abwandlung optischer pH-Sensoren nach dem Prinzip der Severinghaus-Elektrode, lassen sich optische pCO₂-Sensoren aufbauen [21-23]. Dazu muss der optische Sensor lediglich mit einem Karbonatpuffer in Kontakt gebracht und mit einer CO₂-permeablen Membran abgedeckt werden. Der optische pH-Sensor, welcher hier die Rolle des Transducers einnimmt, misst den pH-Wert des Karbonatpuffers, der mit dem CO₂ außerhalb der Membran im Gleichgewicht steht. Erhöht sich die CO₂-Konzentration im Medium, so diffundiert Kohlendioxid durch die Membran und verändert über das Hydrogenkarbonatgleichgewicht entsprechend der Henderson-Hasselbalch-Gleichung den Puffer-pH-Wert. Da die Gleichgewichtseinstellungen zwischen Karbonatpuffer und Medium durch die Membran nur langsam abläuft, liegen die Ansprechzeiten dieser Sensoren im Bereich von Minuten. Die bei fluoreszenzbasierten pH-Sensoren auftretende geringe Temperaturstabilität nicht-kovalent gebundener Farbstoffe, gilt auch für die optischen CO₂-Sensoren. Ein weiterer Nachteil dieser Sensoren besteht darin, dass diese Sensoren aufgrund der Austrocknung des Puffers durch Diffusion des Wassers durch die CO₂-permeable Membran, nur eine geringe Lagerbarkeit aufweisen. Ein Ansatz diesen Nachteil zu überwinden besteht darin pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe mit langkettigen quaternären Alkylaminen ionisch zu verpaaren [24]. Hierdurch werden die Farbstoffe in Silikonen löslich und können als solche direkt zur pCO₂-Messung eingesetzt werden. Die Einstellung des pH-Gleichgewichts wird hierbei nicht in einem alkalischen Puffer wie beim Severinghaus-Prinzip, sondern im den Farbstoff umgebenden Kristall- bzw. Hydratwasser erreicht, welches am Farbstoff so fest gebunden ist, dass der Sensor bei der Lagerung nicht dehydriert.

2.3 Leitfähigkeitsmessung

Die elektrolytische Leitfähigkeit ist in vielen Teilgebieten der Biotechnologie ein wichtiger Parameter. Sie stellt ein Maß für die Konzentration im Medium gelöster Ionen dar und ist beispielsweise bei der Wasseraufbereitung mittels Ionentauschern zur Herstellung von Fermentationsmedien ein entscheidendes Qualitätskriterium [25]. Gleiches gilt bei der galenischen Formulierung biotechnologischer Produkte wie z.B. von Vakzinen oder therapeutischen Antikörpern. Auch bei der Chromatographie zur Aufreinigung biotechnologischer Produkte spielt die Medienleitfähigkeit eine Schlüsselrolle [26]. Die Bindung oder Elution von Proteinen an oder von der stationären Chromatographiephase wird beim Downstream-Prozess im Allgemeinen unter definiertem pH-Wert, definierter Temperatur und Ionenstärke geführt. Die Ionenstärke korreliert hierbei mit der Medienleitfähigkeit. Das Funktionsprinzip von Leitfähigkeitssensoren ist altbekannt. In der einfachsten Ausführung besteht ein Leitfähigkeitssensor aus einer Spannungsquelle, welche eine Sinus- oder rechteckförmige Wechselspannung auf zwei parallele durch die Analytlösung getrennte Elektroden aufprägt. Durch Messung des Stromflusses und der über den Elektroden abfallenden Spannung erhält man nach dem Ohmschen Gesetz den Widerstand der Messzelle. Da der Zellenwiderstand von der Elektrodengeometrie, dem Elektrodenmaterial und deren Oberflächeneigenschaften abhängt, muss die Messzelle mit einer Lösung bekannter Leitfähigkeit zur Ermittlung der sog. Zellkonstanten kalibriert werden. Der Zusammenhang zwischen dem Zellwiderstand R und der Leitfähigkeit κ ergibt sich mit der Zellkonstanten κ_{Zell} zu $\kappa_{Zell} = \kappa \cdot R$. Ein Nachteil der 2-Elektroden-Leitfähigkeitssensoren resultiert aus der Elektrodenpolarisation durch die Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht an der Elektrodengrenzfläche, welche die Messung beeinträchtigt. Eine Verbesserung der Messgenauigkeit kann durch die Anwendung des 4-Elektrodensystems erzielt werden. Hierbei fließt von vier parallelen Elektroden nur durch die äußeren beiden der Wechselstrom, an den inneren beiden Elektroden wird stromlos und somit ohne die Ausbildung der elektrischen Doppelschicht der Spannungsabfall gemessen. Für gewöhnlich wird bei der Leitfähigkeitsmessung der Spannungsabfall über den inneren Elektroden konstant gehalten, der Stromfluss durch die äußeren Elektroden korreliert mit der Leitfähigkeit. Da die Ionenmobilität mit zunehmender Temperatur ansteigt, muss die Leitfähigkeit temperaturkompensiert werden. Vereinbarungsgemäß wird die Leitfähigkeit auf 25°C bezogen. Obwohl eine Vielzahl von Multi-Use-Leitfähigkeitssensoren kommerzialisiert wurde, existiert bislang nur ein einziges Einweg-System (Scilog, WI, USA) auf dem Markt. Es besteht aus einer vorkalibrierten, strahlensterilisierten, wegwerfbaren Durchflusszelle und einem mehrfach verwendbaren Transmitter. Die Zellkonstante und die Kalibrationsparameter des integrierten Temperatursensors sind auf einem Eprom gespeichert.

2.4 Impedanzmessungen zur nicht-invasiven Online-Analytik

Pro- und eukaryontische Zellen besitzen elektrische Eigenschaften, welche durch ihre Physiologie und Morphologie bestimmt werden. Durch die Messung der frequenzabhängigen elektrischen Impedanz eines zellhaltigen Mediums können Zustandsänderungen kontinuierlich und nicht-invasiv erfasst werden. Impedanzmessungen werden bereits seit den 80er Jahren zur *in situ* und *online* Überwachung von biotechnologischen Prozessen eingesetzt. Bekannt ist vor allem das von *Aber Instruments* vertriebene so genannte *Bugmeter* [27]. Mithilfe des *Bugmeters* lässt sich die durch das Zellwachstum bedingte Kapazitätzunahme von Kulturmedien messtechnisch erfassen. Die in der Kultursuspensionen Zellen wirken mit ihrer für den elektrischen Gleichstrom undurchlässigen Membran wie kleine Kugelkondensatoren. Die Kapazitätzunahme über den Kulturverlauf ist nahezu proportional zur Zunahme der Zellzahl. Die elektrische Kapazität der Kultur hängt außerdem noch von deren elektrischer Leitfähigkeit, der Zellgröße und Zellform sowie der Art und Beschaffenheit der Zellmembran ab. Das Messprinzip wurde erfolgreich auf das Monitoring von Säugetierzellkulturen, Hefe- und filamentöse Pilzzellkulturen angewendet [28, 29].

2.4.1 Die elektrische Impedanz

Entsprechend der Definition des Gleichstromwiderstands R ist der komplexe Wechselstromwiderstand Z^* als Verhältnis aus komplexer Spannung u^* und komplexem Strom i^* definiert.

$$Z^* = \frac{u^*}{i^*} = \frac{\hat{u}}{\hat{i}} \cdot \exp^{j(\varphi_u - \varphi_i)} = |Z| \cdot \exp^{j\varphi_Z} = R + jX = Z' + jZ'' \quad (2.2)$$

Für den Betrag der Impedanz $|Z|$ und die Phasenbeziehung gelten dabei folgende Zusammenhänge:

$$|Z| = \sqrt{R^2 + X^2} = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad (2.3)$$

$$\text{sowie} \quad \varphi_Z = \tan^{-1} \left(\frac{\text{Im}(Z)}{\text{Re}(Z)} \right) = \tan^{-1} \left(\frac{X}{R} \right) \quad (2.4)$$

Im technischen Sprachgebrauch werden R oder Z' als Wirk-, X oder Z'' als Blind- und $|Z|$ auch als Scheinwiderstand bezeichnet. Weiterhin gelten folgende Zusammenhänge zwischen den Größen:

$$R = Z \cdot \cos \varphi_Z \quad (2.5)$$

$$X = Z \cdot \sin \varphi_Z \quad (2.6)$$

2.5 Impedanzspektroskopie

In der Impedanzspektroskopie wird der komplexe Wechselstromwiderstand eines elektrochemischen Systems über einen breiten Frequenzbereich ermittelt. Dazu wird dem System eine Wechselspannung einer diskreten Frequenz aufgeprägt - aus der Wechselstromantwort des Systems wird phasenaufgelöst die Impedanz bestimmt. Dieser Vorgang wird für einige Frequenzen im interessierenden Bereich wiederholt, so dass man letztendlich ein Impedanzspektrum für das System erhält. Übliche Impedanzspektrometer decken hierbei Frequenzbereiche von 10^{-5} bis 10^7 Hz ab. Aus den Spektren lassen sich mittels geeigneter elektrochemischer Modelle charakteristische Systemparameter wie z.B. Dielektrizitätszahlen von Materialien oder Oberflächeneigenschaften von Elektroden ermitteln. Das generelle Schema für die Durchführung und Interpretation von impedanzspektroskopischen Untersuchungen elektrochemischer Systeme ist in der nachfolgenden Abbildung 2.2 dargestellt. Ausgehend vom elektrochemischen System wird ein physikalisches Modell formuliert und ein dem entsprechendes elektrisches Ersatzschaltbild aufgestellt. Das experimentell ermittelte Impedanzspektrum des Systems wird über eine nichtlineare Kurvenanpassung an das durch das Ersatzschaltbild vorgegebene Modell angepasst. Aus den Fit-Parametern können die für das elektrochemische Modell spezifischen Systemparameter gewonnen werden.

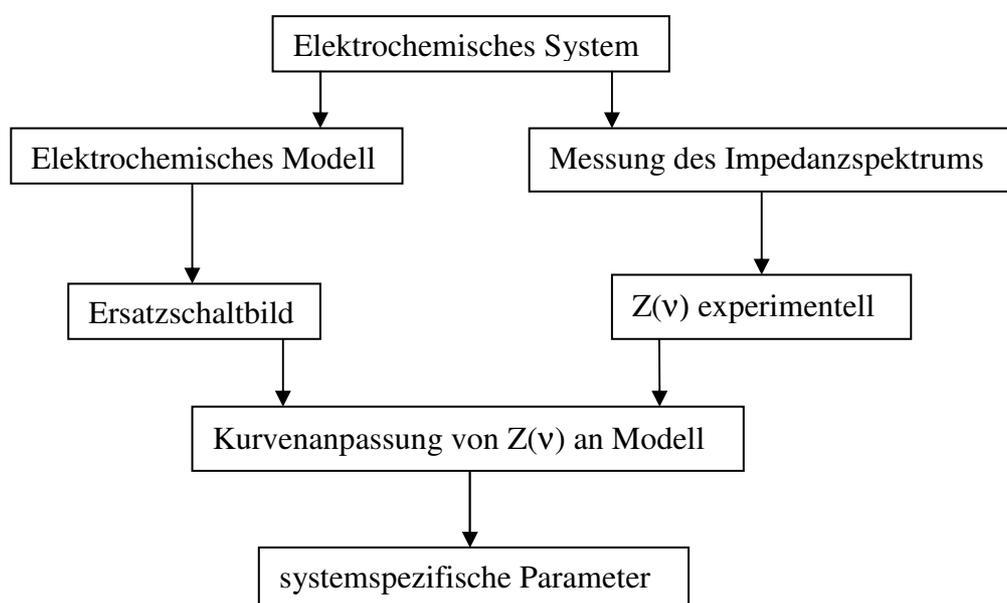


Abbildung 2.2: Schema zum generellen Prozedere bei der Durchführung impedanzspektroskopischer Untersuchungen.

2.6 Electric Cell Substrate Impedance Sensing

Das *electric cell substrate impedance sensing* (ECIS) ist eine 1984 von Giaever und Keese etablierte biophysikalische Messmethode [30]. Die Methode ermöglicht die Untersuchung morphologischer Eigenschaften adhärent wachsender Zellen unter Einwirkung verschiedener Stimuli. Als solche können chemische Substanzen (z.B. Zytostatika, Antibiotika), biologische Einwirkung durch beispielsweise Virusinfektion oder physikalische Einflüsse wie Temperaturänderung, mechanischer Scherstress oder elektrische Felder (Elektroporation) gelten. Die folgende Tabelle 2.2 gibt eine Übersicht relevanter Arbeiten zu verschiedenen ECIS-Techniken, auf die hier jedoch nicht im Einzelnen eingegangen werden soll.

Tabelle 2.2: Anwendungen der ECIS-Technik und weiterführende Literatur

Anwendung/	Zelllinie / System	Referenz
ECIS-Technik		
Wundheilung und Zellmigration	AU-565 (<i>human mamma carcinoma cell line</i>)	[31]
	Caco 2-BBE (<i>human Caucasian colon adenocarcinoma</i>)	[32]
	BS-C-1 (<i>African green monkey kidney</i>)	[33]
	NRK (<i>normal rat kidney cells</i>)	
Zellanheftung und Spreizung	Jurkat E6.1T (<i>leukemic T cell lymphoblasts</i>) und Caco2-BBE	[34]
	Fibroblasten aus Lungengewebe von WT und S-/- C57Bl6/J Mäusen	[35]
	LP3 und LP9 (<i>human peritoneale Mesothelialzellen</i>)	[36]
	MDCK-I (<i>madine darby canine kidney</i>)	[37]
Invasion und metastatisches Potential	HCT116 (<i>human colectoral carcinoma</i>)	[38]
	HUVEC (<i>Human umbilical vein endothelial Cells</i>) und Dunnings Maus Prostata-Adenoma Zelllinien (G, AT1, AT2, AT3,ML, MLL)	[39]
Angiogenese	BPAEC (<i>bovine pulmonary artery endothelial cells</i>)	[40]
	BLMVEC (<i>bovine lung microvascular endothelial cells</i>)	
Barrierefunktion von Mono-Zellschichten	HPAEC (<i>human pulmonary artery endothelial cells</i>)	[41]
	PBCEC (<i>porcine brain capillary endothelial cells</i>)	[42]
Zytotoxizität	V79 (<i>chinese hamster lung fibroblast</i>)	[43]
	PBCEC (<i>porcine brain capillary endothelial cells</i>)	[44]
Proliferation	A549 (<i>human alveolar epithelial cells</i>)	[45]
Zell-Substrat- Interaktion	HUVEC (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)	[46]
Signal-Transduktion	HMEC (<i>human dermal microvascular endothelial cells</i>)	[47]
Zell-Motilität	HOSE (<i>normal human ovarian surface epithelial</i>)	[48]
	SKOV3 (<i>human ovarian cancer cells</i>)	

2.6.1 Allgemeines Messprinzip

Beim *electric cell substrate impedance sensing* wird die frequenzabhängige Impedanz von zellbewachsenen Goldmikroelektroden gemessen um morphologische Eigenschaften von Mono-Zellschichten zu ermitteln. Eine Messzelle für das ECIS (s. Abbildung 2.3 A) besteht aus einer Zellkulturschale mit zwei am Boden aufgebracht Goldfilmelektroden. Eine der Elektroden besitzt einen geringen Durchmesser von ca. 250 μm , diese Elektrode wird als Arbeitselektrode bezeichnet, die Gegenelektrode besitzt eine Fläche in der Größenordnung von 1 cm^2 .

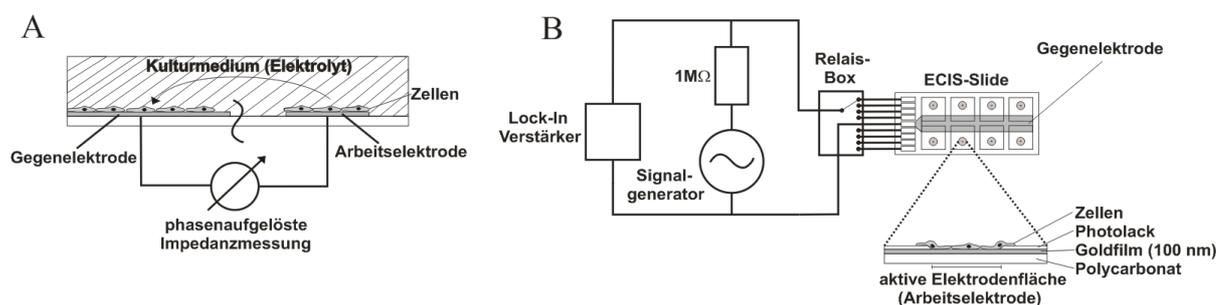


Abbildung 2.3: Das ECIS-Messprinzip und genereller Aufbau eines ECIS-Messsystems

A: ECIS-Messprinzip als phasenaufgelöste Impedanzmessung an zellbewachsenen Goldmikroelektroden.

B: Elektrischer Aufbau eines ECIS-Messsystems mit Lock-In-Verstärker, Signalgenerator mit 1 M Ω Vorwiderstand, Relais-Umschaltbox und ECIS-Messkammern.

An die Elektroden wird nun beispielsweise eine Wechselspannung mit einer Frequenz von 4 kHz und einer Amplitude von 1 V_{SS} mit einem vorgeschalteten 1 M Ω Widerstand angelegt. Der Widerstand dient dazu den maximalen Strom auf 1 μA zu begrenzen, so dass die Zellen auf den Elektroden nicht geschädigt werden und die Messung nicht-invasiv erfolgt. Wird die Messkammer nun mit einer Suspension adhärent wachsender Zellen in einem geeigneten Kulturmedium befüllt, so adhären die Zellen auf der Arbeitselektrode. Das elektrolythaltige Kulturmedium stellt die elektrisch leitende Verbindung zwischen den Elektroden her. Durch das Anhaften und das nachfolgende Spreiten der Zellen ändern sich die elektrischen Eigenschaften der Messzelle. Dieser Vorgang wird durch einen Lock-In-Verstärker (s. Abbildung 2.3 B) zeitaufgelöst erfasst. Eine tierische Zelle kann modellhaft als Reihenschaltung von Widerstand und Kondensator betrachtet werden (RC-Glied). Für ein RC-Glied (s. Abbildung 2.4), eine Reihenschaltung aus einem Widerstand und einem Kondensator, setzt sich die Impedanz Z als komplexe Größe aus dem reellen Widerstand R und dem kapazitiven Widerstand X_c , auch als Kapazitätz bezeichnet, zusammen. Strom und Spannung sind um den Winkel φ phasenverschoben. Der Strom eilt der Spannung voraus.



Abbildung 2.4: links: RC-Kreis aus Reihenschaltung von Wechselspannungsquelle, Widerstand R und Kondensator C . rechts: Zeigerdiagramm zur Verdeutlichung des Zusammenhangs zwischen reellem Widerstand R , der Kapazität X_c und Z als Vektorsumme aus beiden Größen.

Zur Darstellung des komplexen Widerstands Z werden häufig Zeigerdiagramme wie in Abbildung 2.4, bzw. Cole-Cole-, Bode- oder Warburg-Diagramme verwendet. Diese Darstellungsformen werden auch zur Modellierung von Ersatzschaltbildern für durch impedanzspektroskopische Messungen gewonnene Daten angewendet. Der Betrag des Vektors Z ergibt sich für den RC-Kreis analog Gleichung (2.3) zu:

$$|Z| = \sqrt{R^2 + X_c^2} \quad (2.7)$$

Die Kapazität C eines Kondensators im RC-Kreis berechnet sich wie folgt:

$$C = -\frac{1}{2\pi \cdot f \cdot X_c} \quad (2.8)$$

Die Kapazität ist von der Frequenz der Wechselspannung f abhängig und wird mit zunehmender Frequenz kleiner. Durch das Anheften auf der Arbeitselektrode steigt der faradaysche Widerstand der Messzelle, die Kapazität hingegen sinkt. Nach den Gleichungen (2.7) und (2.8) steigt damit die Gesamtimpedanz der Messzelle Z an. Die Größenordnung der Impedanzzunahme korreliert mit dem Bedeckungsgrad der Arbeitselektrode. Der genaue Zusammenhang ist jedoch komplex und wird in Abschnitt 2.6.2 diskutiert.

2.6.2 Elektrisches Modell

In einem Setup wie in Abbildung 2.3 A dargestellt, steht der Widerstand des Kulturmediums in Reihe zu den Impedanzen der Elektroden und dominiert die Messung, außer wenn eine der Elektroden klein ist [49]. Der Widerstand des Kulturmediums manifestiert sich als elektrodengrößenabhängiger Ausbreitungswiderstand. Für eine zirkuläre Elektrode in einer Elektrolytlösung unendlicher Ausdehnung ändert sich der Ausbreitungswiderstand mit $\rho/2d$, mit ρ als Widerstand der Elektrolytlösung und d dem Elektrodendurchmesser [50]. Da die Impedanz des Elektrolyt/Elektroden-Übergangs umgekehrt proportional zur Fläche $4/\pi d^2$ ist, kann sie gegenüber dem Ausbreitungswiderstand dominieren, solange der Elektrodendurchmesser klein genug ist. Bei 4 kHz wird der faradaysche Widerstand einer zirkulären Elektrode mit 250 μm Durchmesser größer als der Ausbreitungswiderstand, wodurch das Anhaften von Zellen auf der Elektrode detektierbar wird. Bei

einer ECIS-Messung mit zwei großen Elektroden würde die Aktivität der Zellen durch den dominierenden Widerstand des Mediums verschleiert. Das Model um die spezifische Impedanz, also die Impedanz bezogen auf eine Flächeneinheit, einer zellbedeckten Elektrode als Funktion der Frequenz ν zu berechnen ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Es basiert auf der spezifischen Impedanz der zellfreien Elektrode $Z_n(\nu)$, der Impedanz durch die Zellschicht $Z_m(\nu)$ und dem Widerstand ρ des Zellkulturmediums. Das Modell basiert außerdem auf folgenden vereinfachenden Annahmen:

- Die Zellen haben eine scheibenartige Form mit dem Radius r_c .
- Der Stromfluss erfolgt radial in dem Spalt zwischen der ventralen Oberfläche der Zellen und der Elektrode.
- Die Stromdichte unter den Zellen ist gleichverteilt.
- Die Impedanz durch die Zellschicht $Z_m(\nu)$ wird maßgeblich durch die Kapazität der Zellmembranen bestimmt. Für eine intakte Zelle gilt

$$Z_m(\nu) = j / \pi \nu C_m \quad (2.9)$$

- Das Elektrodenpotential V_n und das Potential innerhalb der Zelle V_m sind konstant
- Die Zellen beeinflussen die Polarisation der Elektrode nicht.

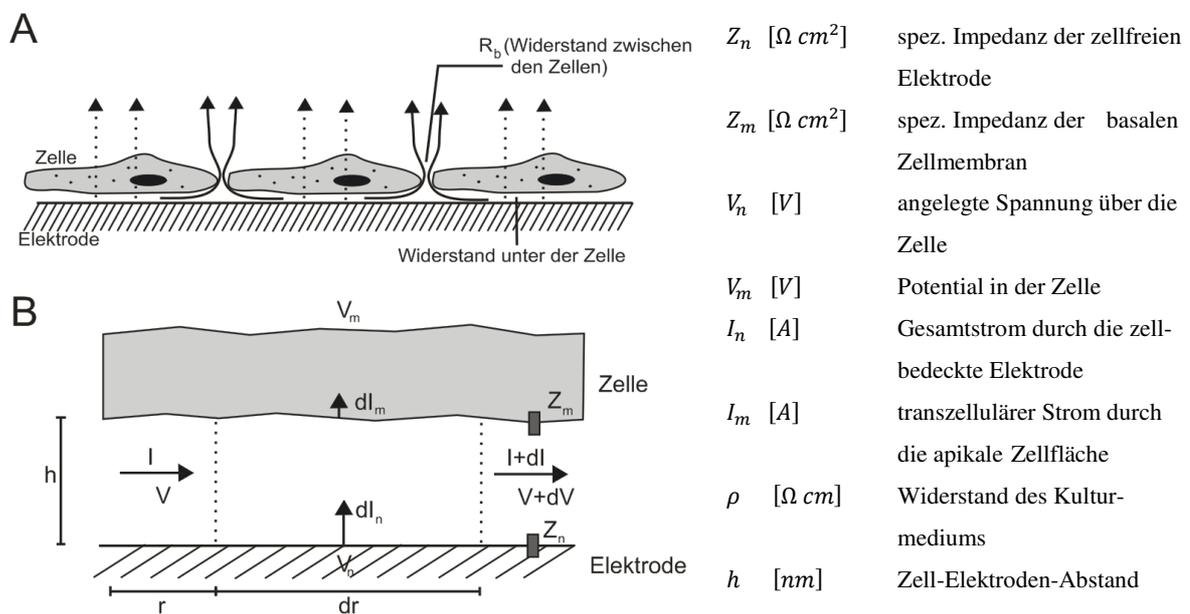


Abbildung 2.5: A: Schema einer zellbewachsenen Goldmikroelektrode. Der Strom fließt sowohl im Spalt zwischen Zellen und Elektrode, als auch im Raum zwischen den Zellen. Gestrichelte Linien repräsentieren den kapazitiven Fluss. B: Schema des Zell-Elektroden-Spalts mit den Einflussgrößen des Modells.

Durch Anwendung des Ohmschen Gesetzes auf das Model aus Abbildung 2.5 erhält man folgende Gleichungen:

$$-dV = \frac{\rho dr}{2h\pi r} \quad (2.10)$$

$$V_n - V = \frac{Z_n(f)}{2\pi r dr} dI_n \quad (2.11)$$

$$V - V_m = \frac{Z_m(f)}{2\pi r dr} dI_m \quad (2.12)$$

$$dI = dI_n - dI_m \quad (2.13)$$

Die Gleichungen (2.10) bis (2.13) können zusammengefasst werden zur Besselschen Differentialgleichung:

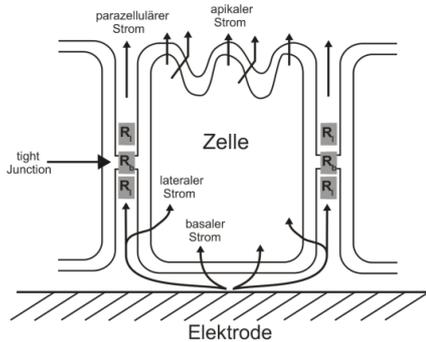
$$\frac{d^2V}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{dV}{dr} - \gamma^2 V + \beta = 0 \quad (2.14)$$

mit
$$\gamma^2 = \frac{\rho}{h} \left(\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right) \quad (2.15)$$

und
$$\beta = \frac{\rho}{h} \left(\frac{V_n}{Z_n} + \frac{V_m}{Z_m} \right) \quad (2.16)$$

Die allgemeine Lösung von Gleichung (2.14) besteht aus einer Besselfunktion erster Art.

$$V = AI_0(\gamma r) + \frac{\beta}{\gamma^2} \quad (2.17)$$



R_b [$\Omega \text{ cm}^2$] Widerstand zwischen den Zellen pro Flächeneinheit
 R_l [$\Omega \text{ cm}^{-1}$] lateraler parazellulärer Widerstand pro Längeneinheit

Abbildung 2.6: Schema einer zellbewachsenen Goldmikroelektrode und Darstellung der verschiedenen Ströme durch die Monozellschicht.

Für den interzellulären lateralen Stromfluss (Abbildung 2.6) können folgende Zusammenhänge abgeleitet werden:

$$dV_m = -2I_l R_l \quad (2.18)$$

und
$$V_l - V_m = \frac{Z_l}{2\pi r_c dz} (-dI_l) \quad (2.19)$$

Hier ist I_l der parazelluläre Strom durch den lateralen interzellulären Weg, R_l ist der parazelluläre Widerstand für eine Längeneinheit, V_l repräsentiert das elektrische Potential innerhalb des lateralen

interzellulären Wegs und Z_l entspricht der spezifischen Impedanz durch letztgenannten Weg. Durch Kombination von Gleichung (2.18) und (2.19) gelangt man zu folgender Differentialgleichung:

$$\frac{d^2 V_l}{dz^2} - \lambda^2 V_l + \lambda^2 V_m = 0 \quad (2.20)$$

mit
$$\lambda = \sqrt{\frac{4\pi r_c R_l}{Z_l}} \quad (2.21)$$

Die Lösung von Gleichung (2.20) ist gegeben durch:

$$V_l = V_i + C e^{\lambda z} + D e^{-\lambda z} \quad (2.22)$$

Zur Bestimmung der vier Konstanten A , C , D und V_i aus den Gleichungen (2.17) und (2.22) sind vier Grenzbedingungen notwendig:

$$V(r = r_c) = V_l(z = 0) \quad (2.23)$$

$$I(r = r_c) = I_l(z = 0) \quad (2.24)$$

$$I_l(z = l) \times R_b^* = V_l(z = l) \quad (2.25)$$

$$I_n = I_m + I_l(z = l) \quad (2.26)$$

Unter Berücksichtigung der Randbedingungen lässt sich die spezifische Impedanz einer zellbedeckten Goldmikroelektrode mit folgender Übertragungsfunktion beschreiben:

$$\frac{1}{Z_c} = \frac{1}{Z_n} \left(\frac{Z_n}{Z_n + Z_m} + \frac{\frac{Z_m}{Z_n + Z_m}}{\frac{j\gamma r_c I_0(\gamma r_c)}{2 I_1(\gamma r_c)} + 2R_b \left(\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right)} \right) \quad (2.27)$$

mit
$$\gamma r_c = r_c \sqrt{\frac{\rho}{h} \left(\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right)} = \alpha \sqrt{\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m}} \quad (2.28)$$

Hierbei sind I_0 und I_1 modifizierte Besselfunktionen erster Art, der Ordnungen 0 und 1 und j ist gleich $\sqrt{-1}$. Die Lösung in Form der Gleichung (2.27) hängt von zwei Parametern ab: R_b , dem Widerstand zwischen den Zellen für eine Flächeneinheit und α aus der Definition in Gleichung (2.28). α hängt hierbei von der der spezifischen Elektrolytleitfähigkeit ρ im Spalt zwischen Elektrode und Zellen, sowie dem Abstand der Zellen zur Elektrode h und dem Zellradius r_c ab. Die Impedanz der zellfreien Elektrode $Z_n(v)$ kann entweder gemessen werden oder nach folgender Gleichung für ein CPE (*constant phase element*) modelliert werden [51]:

$$Z_n(v) = \frac{1}{Q_0(j\omega)^n} \quad (2.29)$$

Q_0 entspricht der der Admittanz der Elektrode bei $\omega=\pi/s$. Gleichung (2.29) liegt die Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht an der Elektrodenoberfläche bei angelegtem elektrischem Feld zugrunde. Der Exponent n beschreibt das Ausmaß des hieraus resultierenden kapazitiven Verhaltens. Die Impedanz eines CPE entspricht für $n=1$ der einer reinen Kapazität; für $n=0$ entspricht sie der eines ohmschen Widerstands. $Z_m(\nu)$ entspricht der Impedanz von zwei Zellmembranen in Reihe und enthält nach Gleichung (2.9) die Abhängigkeit der Impedanz von der Frequenz. Durch Anfitzen der Impedanzspektren von zellbewachsenen Elektroden an theoretisch berechnete Spektren nach Wegener *et al.* [52] können die Zellparameter R_b , C_m , h und r_c ermittelt werden. In der folgenden Abbildung 2.7 ist beispielhaft ein simuliertes Impedanzspektrum einer mit humanen Dermalfibroblasten bewachsenen Mikrogoldelektrode (250 μm Durchmesser) unter Verwendung der folgenden Parameter dargestellt [53].

Tabelle 2.3: Parameter für simuliertes Impedanzspektrum humaner Dermalfibroblasten

R_b [$\Omega \text{ cm}^2$]	C_m [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	h [nm]	α [$\Omega^{1/2} \text{ cm}$]
2,2	1,0	34	3,6

Häufig wird zur Darstellung von Impedanzspektren zellbewachsener Elektroden eine Normierung des Spektrums durch Division des Spektrums der zellbewachsenen Elektrode durch das Spektrum der zellfreien Elektrode vorgenommen (Abbildung 2.7 rechts).

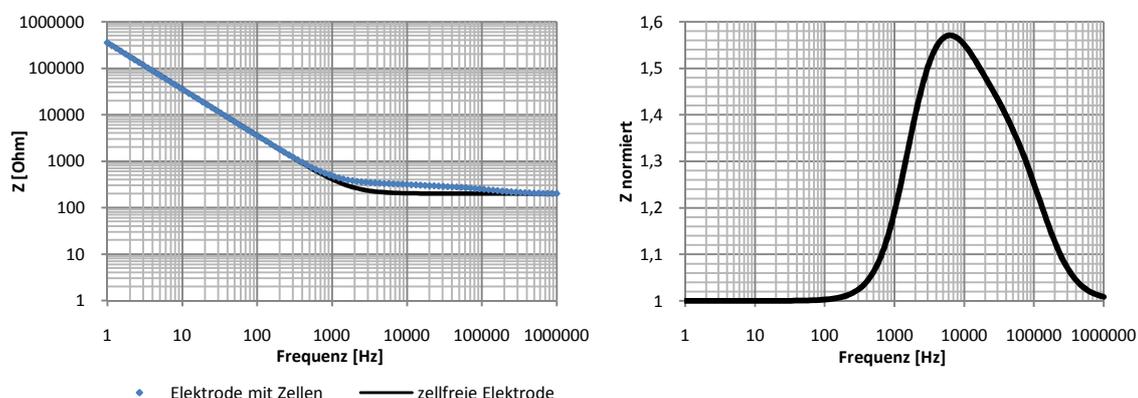


Abbildung 2.7: links: simuliertes Impedanzspektrum humaner Dermalfibroblasten auf 250 μm Goldelektrode und Impedanzspektrum der zellfreien Elektrode; rechts: normiertes Impedanzspektrum

Aus dieser Darstellungsform lässt sich sofort die günstigste Messfrequenz zur Verfolgung von Anheftungsvorgängen von Zellen auf der Elektrode als Maximum der normierten Kurve entnehmen.

3 Weiterentwicklung eines blasenfreien Begasungssystems

Zur Produktion posttranslational modifizierter, rekombinanter Proteine oder monoklonaler Antikörper ist die Expression in tierischen Zellen die Methode der Wahl. Für das Zellwachstum und die Produktivität geeigneter Zelllinien spielen Prozessparameter wie z.B. die Einhaltung der optimalen Medien-Temperatur, des pH-Werts und eine ausreichende Nährstoffversorgung eine entscheidende Rolle. Einen besonders wichtigen Faktor zur Erhaltung des Zellmetabolismus – und damit einhergehend der Produktivität – stellt die Versorgung mit Sauerstoff dar. Für eine möglichst hohe Produktivität und eine effektive Ausnutzung der im Kulturmedium gelösten Nährstoffe soll ein Begasungssystem geeignet sein auch noch hohe Zellkonzentrationen über einen längeren Zeitraum mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen. Aufgrund der Empfindlichkeit von z.B. Säugetierzellen gegenüber mechanischer Beanspruchung sollte die Begasung zudem möglichst scherstressarm erfolgen. Die einfachste Methode, das direkte Begasen mittels des direkten Eintrags von Luft in das Kulturmedium führt durch das Aufsteigen und Platzen der Blasen zu erheblichem Scherstress für die Zellen [54]. Eine Variante zur scherstressarmen Begasung besteht darin, den Sauerstoffeintrag in das Kulturmedium nicht direkt über z.B. einen *Sparger* oder Blasenring zu realisieren, sondern indirekt über gasdurchströmte, dünnwandige Silikonschläuche [55] oder hydrophobe, poröse Hohlfasermembranen [56]. Hierbei ist die Gasphase durch eine Barriere von der flüssigen Phase getrennt, der Sauerstoff diffundiert durch die Barriere in das Kulturmedium. Bei den offenporigen Hohlfasermembranen werden die Eigenschaften der Gas-Flüssigkeits-Phasengrenzfläche in den Poren durch den Druck und durch hydrophobe Kräfte bestimmt. Durch Membranbegasung können ähnliche Sauerstofftransferaten wie durch direktes *Sparging* erzielt werden, jedoch sind hierzu große Membranlängen, hohe Gasflussraten und Drücke vonnöten [57]. Diese Einschränkungen, welche insbesondere für die Begasung mit statischen Membrankörben gelten, führen dazu, dass diese Systeme auf den Einsatz in kleineren bis mittleren Reaktorgrößen (5-500L) beschränkt sind [58]. Zur Membranbegasung größerer Reaktorsysteme können die Membranen direkt auf den Rotor oder einen Taumelkorb angebracht werden, wodurch der Medienaustausch an der Membrangrenzfläche und damit der Sauerstoffübergang erhöht wird [59].

In den folgenden Arbeiten soll ein Hohlfasermembran-basiertes System zur blasenfreien Begasung von Säugetierzellkulturen der Firma Sartorius Stedim Biotech (SSB, Göttingen) hinsichtlich seiner Sauerstofftransfercharakteristika untersucht werden. Hierbei kommt ein optischer *single-use* Sauerstoffsensoren (Presens, Regensburg) zum Einsatz. Weiterhin werden eigene Varianten des genannten Begasungssystems, basierend auf verschiedenen Hohlfasertypen hergestellt und untersucht. Ein optimiertes System wird sowohl zur Kultivierung der Säugetiermodellzelllinie IV F19.23 angewandt, als auch auf die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*. Anhand der Hefezellkultivierung wird ein neuartiger Kohlenstoffdioxidensoren mit Einwegdurchflußzelle für die

Abgasanalytik getestet. Der Fokus der Arbeiten liegt auf den im jeweiligen System erreichbaren maximalen Zellzahlen, welche mit der Sauerstoffversorgung im System korreliert. Weiterhin werden die spezifischen Maus-IgG-Produktionsraten der Zelllinie IV F19.23, kultiviert in standardgemäßen Spinnerflaschen mit reiner Oberflächenbegasung mit den Produktionsraten im kommerziell erhältlichen System und einer selbst hergestellten, optimierten Variante des Systems verglichen. Teile der Arbeiten wurden von Frau Anne Glindkamp im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt.

3.1 Kommerzielles System zur scherstressarmen Begasung

Ein kommerziell erhältliches System zur blasenfreien Begasung stellt das SuperSpinner-System (Sartorius Stedim Biotech) dar. Integraler Bestandteil des in CO₂-Inkubatoren einsetzbaren Systems ist ein Magnetrührkern, um den hydrophobe, mikroporöse Hohlfasermembranen gewickelt sind. Durch die Hohlfasern wird mit einer Membranpumpe Inkubator-Luft geleitet.

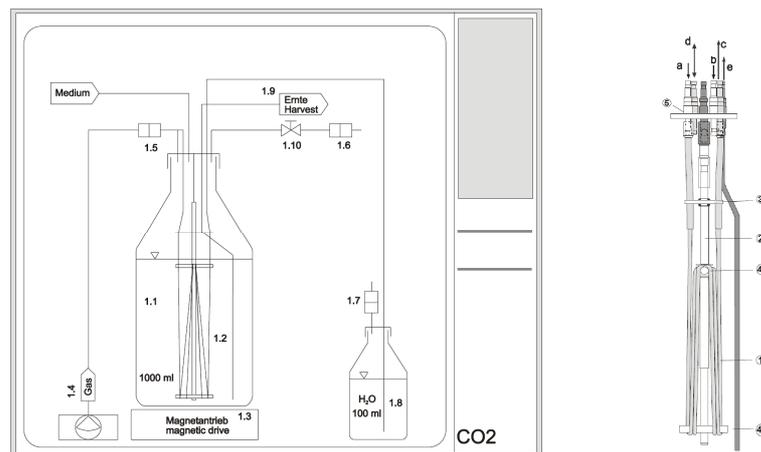


Abbildung 3.1: schematischer Aufbau des SuperSpinner-Systems

links: Aufstellung des SuperSpinners im CO₂-Inkubator. 1.1 1L-Glasflasche, 1.2 Membranrührer, 1.3 Magnetantrieb, 1.4 Membranpumpe, 1.5 1.7 1.8 Sterilfilter, 1.6 Waschflasche, 1.9 Leitung für Probenentnahme, 1.10 Schlauchklemme; **rechts:** 1 Einweg-Membranrührer, 2 Halterung, 3 Fixierung für Membranschläuche, 4a und 4b Halter für Begasungsmembranen, 5 Kopfstück mit Schlaucholiven

Der Sauerstoffeintrag erfolgt mittels Diffusion durch die Membran. Durch die Verwendung von Hohlfasermembranen besitzt das System eine große Oberfläche und dadurch einen hohen Gasaustausch. Zusätzlich zur Durchströmung der Membranen (Abbildung 3.1, 1.2) mit CO₂-angereicherter Inkubator-Luft übt die Membran-Pumpe (1.4) über eine Y-Verzweigung Druck auf den Kopfraum des in Form einer einfachen Laborglasflasche (1.1) ausgestalteten Bioreaktors aus. Die Druckbeaufschlagung des Kopfraums verhindert die Ausbildung eines Druckgradienten zwischen Hohlfasermembran und Kulturmedium, der ansonsten zur Bildung unerwünschter Luftbläschen führen würde. Der SuperSpinner eignet sich sowohl für die Herstellung kleiner Produktmengen als auch zur

Vorkulturherstellung für Bioreaktoren mit bis zu 10L Arbeitsvolumen. Das integrierte Steigröhrchen ermöglicht eine einfache Probeentnahme unter sterilen Bedingungen. Der Magnetantrieb sorgt für eine schonende, scherstressarme Durchmischung. Im Lieferzustand ist das SuperSpinner-System unsteril und muss vor der Verwendung autoklaviert werden.

3.2 Bau von Hohlfaser-Begasungssystemen mit verschiedenen Membrantypen

Zum Aufbau von Vergleichssystemen zur Bestimmung von $k_L a$ -Werten in Hohlfaser-basierten Begasungssystemen (Membran-Spinnern) wurden die in Tabelle 3.1 angegebenen Membrantypen verwendet. Sowohl die Oxyphan- als auch die Accurel-Membran bestehen aus Polypropylen, die Toyobo-Membran besteht aus Polyvinylidifluorid. Die Oxyphan-Membran wird bei der Herstellung des kommerziell erhältlichen Systems eingesetzt.

Tabelle 3.1: Materialien und geometrische Parameter der verwendeten Membrantypen

Membran-Typ	Basis-Material	Innendurchmesser [μm]	Außendurchmesser [μm]	Wandstärke [μm]	Oberfläche pro Längeneinheit [cm]	
					innere	äußere
Toyobo MF-AR001	PVDF	680	1240	280	0,21	0,39
Oxyphan PP 50/280	PP	280	380	50	0,09	0,12
Accurel PP S6/2	PP	1800	2700	450	0,57	0,85

Zum Aufbau der Vergleichssysteme wurden die Membranen in verschiedenen Längen parallel gebündelt. Die Membranenden wurden in Eppendorfhütchen mit dem RTV-Silikon Elastosil RT601 vergossen, nach dem Aushärten um den Rührkern (Abbildung 3.1 2) eines von Membranen befreiten SuperSpinners gewunden und mit der Verschlauchung (Abbildung 3.1 3) verbunden.

3.3 Sauerstofftransfercharakteristika

Zur Bestimmung der $k_L a$ -Werte der aufgebauten Membran-Spinner wurde die Sulfit-Methode verwendet (Abschnitt 5.2.1). Die Messung erfolgte im Inkubationsschrank bei 37°C und einer Rührgeschwindigkeit von 40 rpm. Der Sauerstoffgehalt der Sulfitlösung im Membran-Spinner-System wurde mit einem optischen $p\text{O}_2$ -Sensorsystem verfolgt. Hierzu wurde die Laborglasflasche an der Innenseite mit einem fluoreszenzbasierten $p\text{O}_2$ -Sensorpatch ausgerüstet, der mit einem an der

Aussenseite des transparenten Kulturgefäßes angebrachten polymeroptischen Lichtwellenleiter mit einem 4-Kanal-Transmitter der Firma Presens verbunden wurde. Die Protokollierung des pO_2 -Wertes erfolgte mit einem Standard-PC.

3.3.1 k_{La} -Werte

Als Benchmark soll im Folgenden das kommerzielle System angesehen werden. Das System besteht aus 5x2 m Oxyphan-Membran. Der k_{La} -Wert des unsterilisierten Systems beträgt $5,0 \text{ h}^{-1}$. Die k_{La} -Werte der Vergleichssysteme wurden zunächst für die nicht sterilisierten Systeme bestimmt. Mit der Toyobo-Membran wurden Membran-Spinner mit 5, 10 und 15 parallelen Membranabschnitten mit Längen von 10 cm bis 40 cm aufgebaut. Die Anzahl der parallelen Hohlfasermembranen für die Systeme mit der Accurel und der Oxyphan-Membran wurde nun so gewählt, dass alle drei Membrantypen einen ähnlichen Bereich der inneren Membranoberfläche abdecken.

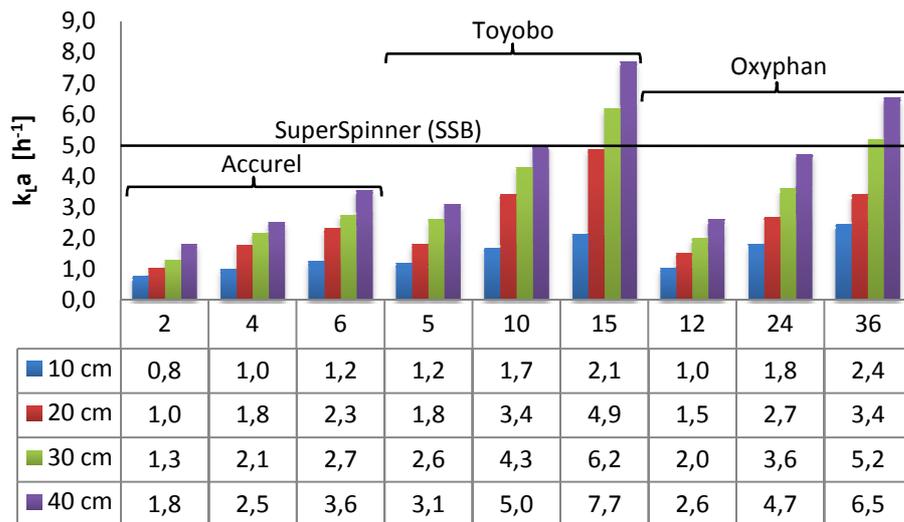


Abbildung 3.2: k_{La} -Werte von Spinnersystemen mit verschiedenen Typen, Längen und Anzahlen paralleler Hohlfasermembranen.

Die Messergebnisse sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Wie zu erwarten nehmen die k_{La} -Werte sowohl mit steigender Anzahl als auch mit steigender Länge der Membranen zu. Membran-Spinner mit derselben Gesamtlänge der Membran, z.B. das System aus 5x20 cm und 10x10 cm Toyobo-Membranen, führen zu ähnlichen k_{La} -Werten ($1,8 \text{ h}^{-1}$ bzw. $1,7 \text{ h}^{-1}$). Der k_{La} -Wert des kommerziellen SuperSpinners liegt mit einer Gesamtlänge der Oxyphan-Membran von 10 m erwartungsgemäß zwischen den Werten der selbst aufgebauten Systeme mit 24x40 cm Membranlänge ($9,6 \text{ m}$; $4,7 \text{ h}^{-1}$) und dem System mit 36x30 cm Oxyphanmembran ($10,8 \text{ m}$; $5,2 \text{ h}^{-1}$). Trägt man die ermittelten k_{La} -Werte gegen die innere Membranoberfläche der getesteten Systeme auf, so ergibt sich der in Abbildung 3.3 dargestellte lineare Zusammenhang.

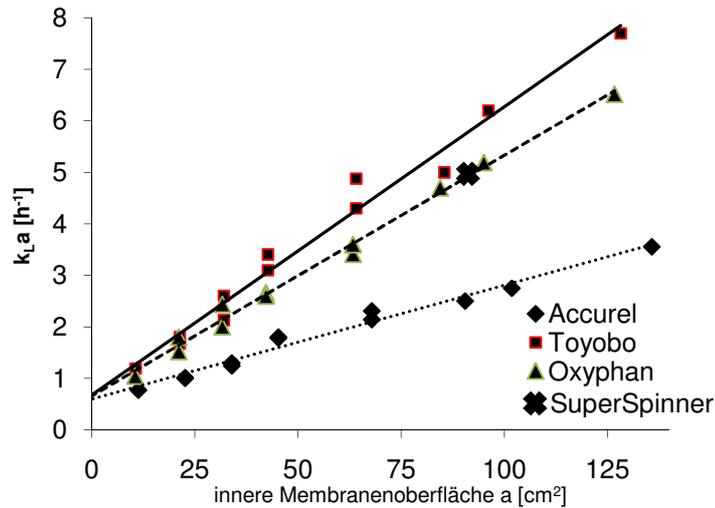


Abbildung 3.3: $k_{L,a}$ -Werte in Abhängigkeit von der inneren Membranoberfläche

Der Sauerstoffeintrag findet nicht nur über die Membran statt, sondern auch durch Diffusion aus dem Kopfraum in die Lösung. Die Messung des aus statischer Kopfraumbegasung resultierenden $k_{L,a}$ -Wertes führt zu einem Wert von $0,6 \text{ h}^{-1}$. Dieser Wert entspricht dem Ordinatenabschnitt der drei Regressionsgeraden in Abbildung 3.3.

3.3.2 Bestimmung der Diffusionskoeffizienten

Aus den ermittelten $k_{L,a}$ -Werten lassen sich die Diffusionskoeffizienten für Sauerstoff innerhalb der Wandungen der verschiedenen Membrantypen berechnen. Ausgehend vom ersten Fick'schen Gesetz ergeben sich folgende Gleichungen:

$$D = \frac{n(\text{SO}_3^{2-})}{2 \cdot \Delta t} \ln\left(\frac{r_a}{r_i}\right) \frac{1}{2\pi L(c_i - c_a)} \quad (3.1)$$

$$D_{eff} = \frac{D}{\ln\left(\frac{r_a}{r_i}\right)} = \frac{n(\text{SO}_3^{2-})}{2 \cdot \Delta t} \frac{1}{2\pi L(c_i - c_a)} \quad (3.2)$$

Mit:	D, D_{eff}	Diffusionskoeffizient, effektiver Diffusionskoeffizient
	$n(\text{SO}_3^{2-})$	Stoffmenge SO_3^{2-}
	Δt	Zeit bis zum Anstieg der O_2 -Konzentration
	r_i, r_a	innerer Membranradius, äußerer Membranradius
	c_i	Sauerstoffkonzentration innerhalb der Membran
	c_a	Sauerstoffkonzentration außerhalb der Membran
	L	Gesamtlänge der Membran

Der Diffusionskoeffizient D ist von der Geometrie der Hohlfasern (vgl. Tabelle 3.1) unabhängig. Berücksichtigt man diese, ergibt sich der effektive Diffusionskoeffizient D_{eff} nach der Form von

Gleichung (3.2). Die für die getesteten Membrantypen ermittelten Werte sind in Tabelle 3.2 angegeben. Der effektive Diffusionskoeffizient für Sauerstoff der Toyobo-Membran, welche aus Polyvinylidendifluorid besteht ist ca. doppelt so hoch wie der der Oxyphan-Membran und nahezu dreifach höher als der der Accurel-Membran. Letztgenannte Hohlfasermembrantypen bestehen beide aus dem Basismaterial Polypropylen.

Tabelle 3.2: Diffusionskoeffizienten der untersuchten Hohlfasermembranen

Membrantyp	D [cm ² /h]	D _{eff} [cm ² /h]
Toyobo	0,0350	0,0583
Oxyphan	0,0088	0,0288
Accurel	0,0084	0,0207

3.3.3 Einfluss der Sterilisationsmethode

Vor dem Einsatz des SuperSpinners zu Zellkulturzwecken muss der in Abbildung 3.1 dargestellte Aufbau sterilisiert werden. Beim Autoklavieren des Systems mittels Heissdampf Atmosphäre unter 2 bar Druck und 121°C (30 min) ist eine Veränderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Hohlfasermembranen aufgrund des Erweichens der Polymere zu erwarten. Gleiches gilt bei der γ -Bestrahlung. Hierbei treten bei Polymeren im Allgemeinen eine Erhöhung des mittleren Molgewichts und dadurch eine mechanische Versprödung auf. Im Folgenden wurde der Einfluss der Sterilisation mittels Heißdampf und γ -Bestrahlung (25 kGy) auf den SuperSpinner und auf die in Tabelle 3.1 angegebenen Hohlfasermembrantypen untersucht. Hierzu wurden die Porenvolumina und die Porenweitenverteilungen (PWV) der Membranen nach der BJH-Methode (s. Abschnitt 5.2.2), sowie die $k_{L,a}$ -Werte vor und nach der Sterilisation mit der jeweiligen Methode bestimmt.

Tabelle 3.3: Einfluss der Sterilisationsmethode auf Porenvolumen nach BJH und $k_{L,a}$ -Wert der untersuchten Hohlfasermembranen

Membrantyp	Sterilisationsmethode	V _{tot} vor	V _{tot} nach	ΔV_{tot} [%]	$\Delta k_{L,a}$ [%]	D _{eff} [cm ² /h] (unsterilisiert)
		Sterilisation [cm ³ /g]	Sterilisation [cm ³ /g]			
Toyobo	Autoklavieren	0,118	0,059	50,0	50	0,0583
	γ -Bestrahlung		0,083	29,6	10	
Oxyphan	Autoklavieren	0,073	0,042	42,6	50	0,0288
	γ -Bestrahlung		0,069	5,5	15	
Accurel	Autoklavieren	0,038	0,034	10,5	30	0,0207
	γ -Bestrahlung		0,039	-	-	

Aus der Auftragung des Porenvolumens gegen die Porengröße für die drei unbehandelten Membrantypen (Abbildung 6.1) läßt sich ein genereller Unterschied zwischen der Toyobo-Membran aus PVDF und den PP-basierten Membrantypen ersehen. Die PWV der Toyobo-Membran weist ein globales Maximum bei ca. 150 Å auf, wohingegen das Maximum beim Accurel-Typ bei ca. 20 Å liegt. Für die Oxyphan-Membran liegt kein Maximum vor, jedoch ähnelt der Verlauf der PWV dem der Accurel-Membran. Die kumulierten Porenvolumina der unsterilisierten Membrantypen spiegeln den Gang der effektiven Diffusionskoeffizienten wider, wobei kein linearer Zusammenhang auftritt. Der Effekt des Autoklavierens auf das kumulierte Porenvolumen und damit auf den k_{La} -Wert aufgebauter Membran-Spinnerysteme ist generell größer als der einer γ -Bestrahlung. Autoklavieren führt bei der Toyobo-Membran zu einer Verschiebung der PWV hin zu kleineren Porengrößen und einer Abnahme des kumulierten Porenvolumens um 50%. Eine Verschiebung zu kleineren Porengrößen ist für die PP-basierten Membranen nicht zu beobachten, jedoch sinken die kumulierten Porenvolumina und damit die k_{La} -Werte auch hier. Die γ -Bestrahlung scheint für die Toyobo- und die Oxyphan-Membran die geeignete Sterilisationmethode zu sein, da die Abnahme der k_{La} -Werte hier am geringsten ist. Die Accurel-Membran versprödet durch die Bestrahlung so stark, dass sie bei geringster mechanischer Belastung bricht, somit ist die Methode für diese Membran ungeeignet.

3.4 Optimiertes System unter Kultivierungsbedingungen – Hefekultivierung

Die Auswirkung des unterschiedlichen Sauerstoffübergangs in mit verschiedenen Membranen aufgebauten Spinnerystemen wurde unter Kultivierungsbedingungen untersucht. Als Modellorganismus wurde hier zunächst *Saccharomyces cerevisiae* gewählt. Die Kultivierung erfolgte in modifiziertem Schatzmann-Medium im 1L-Maßstab. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde mit dem optischen Sensorsystem der Firma Presens gemessen. Die Kohlenstoffdioxidkonzentration im Abgasstrom wurde mit dem Capnostat 5 der Firma Respirationics, einem respiratorischen CO₂-Sensor aus der Intensivmedizin, verfolgt (siehe Abschnitt 6.1.2). Die Vorkultur wurde mit Hefezellen aus Schrägagarröhrchen angeimpft und 16 h bei 30 °C und 120 rpm geschüttelt. Während der Hauptkultivierung (30°C, 40 rpm) wurden Proben zur Bestimmung der optischen Dichte bei 580 nm entnommen. Glukose- und Ethanolmessungen wurden an zellfreien Proben durchgeführt (siehe Abschnitt 6.2.8). In Abbildung 3.4 links sind exemplarische Messdaten einer Hefekultivierung in einem MembranSpinner, aufgebaut aus 20x60cm der Toyobo-Membran dargestellt. Der k_{La} -Wert des verwendeten Spinners betrug nach Autoklavieren 8,2 h⁻¹, die Animpfdichte betrug 8·10⁻² AU (OD₅₈₀).

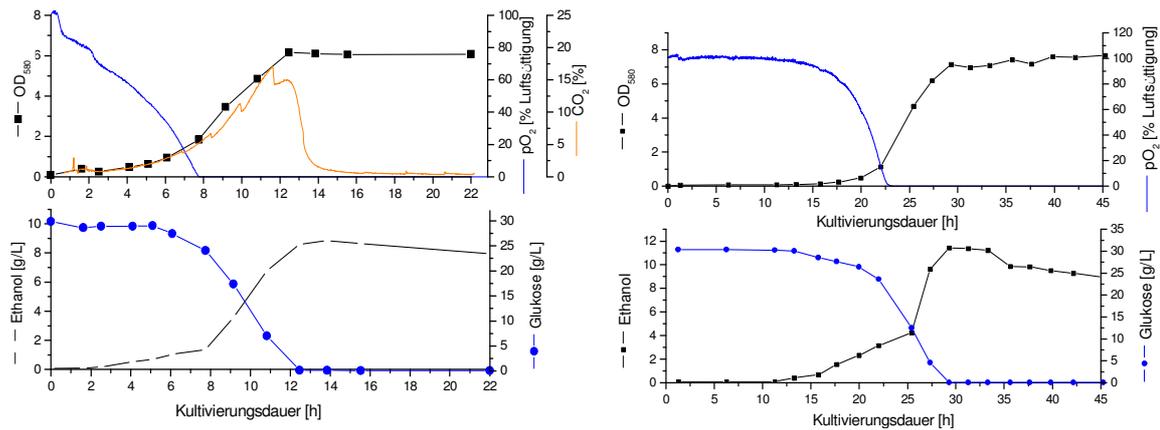


Abbildung 3.4: links: Hefekultivierung im Membran-Spinner mit Toyobo-Membran (20x60 cm, k_La -Wert = $8,2 \text{ h}^{-1}$), Animpfdichte $8 \cdot 10^{-2} \text{ AU}$ (OD_{580}); rechts: Hefekultivierung im Membran-Spinner mit Accurel-Membran (3x110 cm, k_La -Wert = $5,9 \text{ h}^{-1}$), Animpfdichte = $5,2 \cdot 10^{-4} \text{ AU}$ (OD_{580})

Nach 12 h wurde die maximale optische Dichte von 6,1 AU erreicht. Zu diesem Zeitpunkt war auch die Glukose im Medium verbraucht. Der Sauerstoffgehalt der Lösung war nach 7,5 h auf 0% abgesunken. Die Ethanolkonzentration begann nach 6 h stark zu steigen, bis sie nach 13 h bei 9 g/L ein Maximum erreichte. Oxidativer Ethanolabbau fand trotz Glukoselimitierung kaum statt, was auch durch den Verlauf der CO_2 -Kurve gestützt wird. Dem Medium wurde über die Membranen immer noch Sauerstoff zugeführt, der von der Hefe für die langsame Oxidation des Ethanols verbraucht wurde. Die Geschwindigkeit des Ethanolabbaus korrespondiert mit dem Sauerstoffeintrag. In Tabelle 3.4 sind Messdaten von Hefekultivierungen mit dynamischer Kopfraumbegasung (Überströmen des Kopfraums mit Luft aus der Membranpumpe), im kommerziellen System und im Spinner mit Toyobo-Membran bei einer Animpfdichte von $8 \cdot 10^{-2} \text{ AU}$ (OD_{580}) aufgeführt. Trotz eines fünfmal höheren k_La -Wertes des γ -sterilisierten Toyobo-Membranspinners im Vergleich zum System mit reiner Kopfraumbegasung werden ähnliche maximale Zelldichten erreicht.

Tabelle 3.4: Gegenüberstellung der k_La -Werte, der Kultivierungszeit bis $pO_2=0\%$ und der maximalen optischen Dichte von Hefekultivierungen in verschiedenen MembranSpinner-Systemen mit einer Animpfdichte von $8 \cdot 10^{-2} \text{ AU}$ (OD_{580})

Spinner-System	k_La -Wert [h^{-1}]	t bis $pO_2=0\%$ [h]	max. OD_{580} [AU]
Kopfraumbegasung mit Rührer	2,0	1,5	5,8
SuperSpinner (SSB), autoklaviert	2,3	2,1	5,8
SuperSpinner (SSB), γ -sterilisiert	4,6	4,2	6,2
Toyobo-Membran, 20x60 cm, autoklaviert	8,2	7,5	6,1
Toyobo-Membran, 20x60 cm, γ -sterilisiert	10,1	6,9	6,2

Offenbar war die gewählte Animpfdichte so hoch, dass ein Großteil der Glukose anaerob verstoffwechselt wurde, so dass ein Vergleich der vom Sauerstoffeintrag abhängigen maximal erreichbaren Zelldichten verschiedener MembranSpinner-Systeme nicht möglich ist. Deshalb wurden Folgeexperimente (siehe z.B. Abbildung 3.4) mit einer deutlich geringeren Animpfdichte von $5,2 \cdot 10^{-4}$ AU durchgeführt. Die erreichten maximalen optischen Dichten variierten hierbei stärker als bei den vorangegangenen Kultivierungen (Tabelle 3.5). Der Trend zu höheren Zelldichten in Systemen mit höherem $k_L a$ -Wert ist deutlicher ausgeprägt, was aus einer länger andauernden und effektiveren aeroben Verstoffwechslung der Glukose resultiert. Trotzdem wird immernoch ein großer Anteil der Glukose anaerob verbraucht.

Tabelle 3.5: Gegenüberstellung der $k_L a$ -Werte, der Kultivierungszeit bis $pO_2=0\%$ und der maximalen optischen Dichte von Hefekultivierungen in verschiedenen MembranSpinner-Systemen mit einer Animpfdichte von $5,2 \cdot 10^{-4}$ (OD_{580})

Spinner-System	$k_L a$ -Wert [h^{-1}]	t bis $pO_2=0\%$ [h]	max. OD_{580} [AU]
Kopfraumbegasung mit Rührer	2,0	16,4	5,8
SuperSpinner (SSB), autoklaviert	2,3	19,2	6,6
Accurel-Membran, 3x110 cm, autoklaviert	5,9	23,2	7,6
Toyobo-Membran, 20x60 cm, autoklaviert	7,9	25,8	7,8

Maximale mit Sauerstoff versorgbare Hefezelldichte im MembranSpinner

In Abbildung 3.5 sind die gelöstsauerstoffkonzentrationen der Hefezellkultivierungen in der exponentiellen Wachstumsphase in verschiedenen Spinnersystemen gegen die optischen Dichten zur selben Zeit aufgetragen. Extrapoliert man die Kurven auf eine Sauerstoffsättigung von 0 %, erhält man die Zelldichten, die maximal versorgt werden können, ohne dass die Zellen zum anaeroben Metabolismus wechseln. Der Crabtree-Effekt wurde hierbei vernachlässigt.

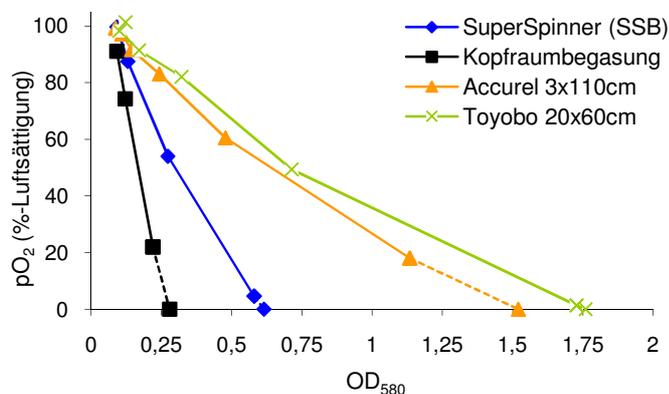


Abbildung 3.5: Sauerstoffsättigung als Funktion der optischen Dichte von Hefezellen in der exponentiellen Wachstumsphase (gestrichelte Linie: Extrapolation auf $pO_2 = 0\%$)

Man erhält die in Tabelle 3.6 angegebenen Werte für die optischen Dichten. Das Verhältnis dieser optischen Dichten entspricht bei den MembranSpinnern dem Verhältnis der $k_L a$ -Werte zueinander. Die Anzahl der Hefezellen, welche mit Sauerstoff versorgt werden können, ist bei den MembranSpinnern proportional zum $k_L a$ -Wert.

Tabelle 3.6: Gegenüberstellung der OD_{580} bei $pO_2 = 0\%$ und der $k_L a$ -Werte der verwendeten SuperSpinner

MembranSpinner-System	OD_{580} bei $pO_2 = 0\%$	$k_L a$ -Wert [h^{-1}]
Kopfraumbegasung	0,3	2,0
SuperSpinner (SSB)	0,6	2,3
Accurel-Membran, 3x110 cm, autoklaviert	1,5	5,9
Toyobo-Membran, 20x60 cm, autoklaviert	1,8	7,9

3.5 Optimiertes System unter Kultivierungsbedingungen – Hybridomzellkultivierung

Das dedizierte Einsatzgebiet des kommerziell erhältlichen Systems besteht in der Anwendung als Seed-Reaktor, bzw. der Herstellung kleiner Produktmengen in der Suspensionszellkultur. Deshalb wurden sowohl das SuperSpinner-System als auch selbst hergestellte Membran-Spinner-Systeme anhand von Kultivierungen der Modellhybridomzelllinie IV F19.23 getestet. Diese Maus-Maus-Hybridomzelllinie produziert einen monoklonalen Antikörper gegen Penicillin-G-Amidase.

Besiedlungstest

Vor Beginn der eigentlichen Kultivierungen in den verschiedenen MembranSpinnern wurde in einem Vorversuch auf allen verwendeten Membrantypen ein Besiedlungstest durchgeführt (Abschnitt 5.2.8). Hierzu kam ein MTT-Test zur Anwendung. Da die Zellen im SuperSpinner etwa 7 Tage kultiviert werden, wurde dieser Zeitraum als Inkubationszeit gewählt. Die Adsorption bei 570 nm ist ein Maß für die Anzahl der auf den Membranen anhaftenden Zellen. Es wurden 3 Bestimmungen durchgeführt. Die Adsorption liegt für alle Membranen nahe 0 AU (Tabelle 3.7). Die Zellen der Linie IV F19.23 besiedeln die Membranen nicht.

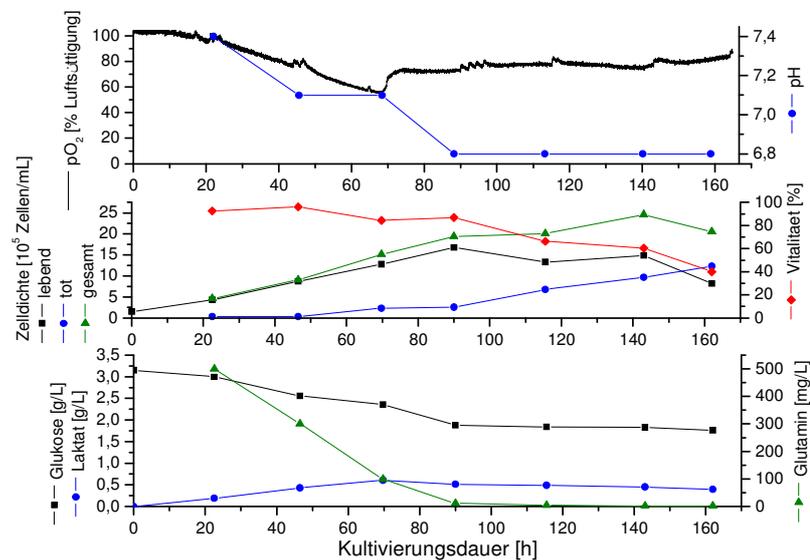
Tabelle 3.7: Absorptionswerte des MTT-Tests nach einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen

Membrantyp	Absorption bei 570 nm [AU]
Toyobo	0,0001
Oxyphan	0,0002
Accurel	0,0063

Kultivierung

Die Hybridomzellen wurden in DMEM/HAM's F-12 Medium mit 5 % Pferdeserum und 1 % Antibiotika (1000 Units/ml Penicillin G, 0,1 mg·ml⁻¹ Streptomycin) kultiviert. Die Animpfdichte betrug bei allen Experimenten 1,5·10⁵ Zellen/ml. Neben den Kultivierungen in den verschiedenen MembranSpinner-Systemen wurden zum Vergleich Kultivierungen in 250 ml-Standardspinnerflaschen durchgeführt. Um den Einfluss der Begasung auf den Metabolismus und das Wachstum der Zellen zu untersuchen, wurden täglich Proben entnommen und Zelldichte, Vitalität, die Laktat- und Glukosekonzentration, der pH-Wert, die Aminosäurekonzentration und die Antikörperkonzentration bestimmt. Die Gelöst-Sauerstoffkonzentration wurde online gemessen.

In Abbildung 3.6 sind exemplarische Daten einer Kultivierung in einem MembranSpinner mit 20x60 cm Toyobo-Membran dargestellt. Der k_{La} -Wert des Systems betrug 7,7 h⁻¹. Die Gelöstsauerstoffkonzentration sank zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung unter 55%.

**Abbildung 3.6:** Hybridomzellkultivierung im MembranSpinner mit Toyobo-Membran (20x60 cm, $k_{La} = 7,7 \text{ h}^{-1}$)

Unter der Annahme einer spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate von $1,7 \cdot 10^{-10} \text{ mmol}/(\text{Zelle} \cdot \text{h})$ für Hybridomzellen bei 37°C können in einem MembranSpinner mit einem k_{La} -Wert von 7,7 h⁻¹ $9,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit Sauerstoff versorgt werden [60]. Die maximale Lebendzellzahl von $1,7 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurde schon nach 90 h erreicht, entsprechend ca. 19% der theoretisch möglichen Zellzahl. Bei Erreichen der maximalen Lebendzellzahl lag die Glukosekonzentration bei 2 g/L. Die

Wachstumslimitierung resultierte aus dem vollständigen Verbrauch der Stickstoffquelle Glutamin bei 90 h. Die Limitierung aufgrund schneller Glutamin-Metabolisierung wurde auch bei vielen weiteren Hybridomzelllinien beobachtet [61-63]. Sie bewirkt, dass in Systemen mit hohem k_{La} -Wert, wie z.B. dem Membran-Spinner mit der Toyobo-Membran nur sehr ähnliche Lebendzellichten im Vergleich zum kommerziellen SuperSpinner mit deutlich niedrigerem k_{La} -Wert erreicht werden (Tabelle 3.8). Lediglich bei dem SpinnerSystem mit reiner Kopfraumbegasung tritt nach 23 h eine frühe Sauerstofflimitierung auf, so dass nur eine maximale Lebendzellichte von $8 \cdot 10^5$ Zellen/ml erreicht wurde.

Tabelle 3.8: Gegenüberstellung der k_{La} -Werte, der Zeit bis Absinken der Gelöstsauerstoffkonzentration auf 0%, der erreichten und der errechneten maximalen Lebendzellichten von Hybridomaktivierungen in verschiedenen MembranSpinnern

Spinner-System	k_{La} [h ⁻¹]	t bis pO ₂ =0% [h]	Max. Lebend- zellichte [10 ⁶ Zellen/ml]	theoretische max. Lebendzellichte [10 ⁶ Zellen/ml]
Kopfraumbegasung mit Rührer	2,0	23	0,8	2,3
SuperSpinner (SSB), autoklaviert	2,3	65	1,8	2,7
Toyobo-Membran, 20x60cm, autoklaviert	7,7	-	1,7	9,1
250 ml-Standard-Spinnerflasche (Techne), Füllstand 150 ml	7,9	70	1,9	9,3

Vergleich von Glutamin- und DCA-Supplementierung

Um verwertbare Aussagen über den Effekt von MembranSpinnern mit unterschiedlich hohem Sauerstofftransfer auf die maximale erreichbaren Lebendzellichten treffen zu können, musste der Einfluss der Glutamin-Limitierung auf die zu vergleichenden Kultivierungen ausgeschlossen werden. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Strategien getestet. Als einfachste Variante wurden Kultivierungen mit unterschiedlichen Glutamin-Startkonzentrationen in 100ml-Standard-spinnerflaschen ohne Membranbegasung durchgeführt. Weiterhin wurde der Effekt von Dichloressigsäure-Supplementierung (DCA) auf den Glutamin-Metabolismus [64], die maximal erreichbare Lebendzellichte und die Antikörperproduktion untersucht. Säugetierzellkulturen weisen im Allgemeinen hohe Glykolyseraten und geringe Pyruvatoxidationsraten auf [65]. Bei unvollständiger Glukoseoxidation, mit Laktat als Endprodukt, werden nur 2 Mol ATP pro Mol Glukose erzeugt. Bei vollständiger Oxidation der Glukose im Citratzyklus zu Wasser und CO₂ werden pro Mol Glukose 36 Mol ATP gewonnen. Dichloressigsäure ist eine hypoglykämisch wirkende Substanz zur Behandlung von Typ 2 Diabetes [66, 67]. Dichloressigsäure aktiviert die Pyruvatdehydrogenase (PDH), welche die Schnittstelle zwischen Glykolyse und Citratzyklus darstellt, durch Inhibierung der Pyruvatdehydrogenasekinase (PDHK). Die Aktivierung der PDH führt zu einer vermehrten Bildung von Acetyl-Coenzym A welches in den Citratzyklus eingeht und effektiv verstoffwechselt wird. Hierdurch wird bei Hybridomazellen die Nutzung von Glutamin als

Energiequelle zugunsten der Verstoffwechslung von Glukose vermindert. Somit steht mehr Glutamin als Stickstoffquelle zur Verfügung was zu höheren Antikörperproduktionsraten führen kann. Gleichzeitig verringert sich durch die vermehrte Acetyl-Coenzym A-Bildung die Menge verfügbaren Pyruvats, welches bei Sauerstoffmangel das Substrat der Milchsäuregärung darstellt.

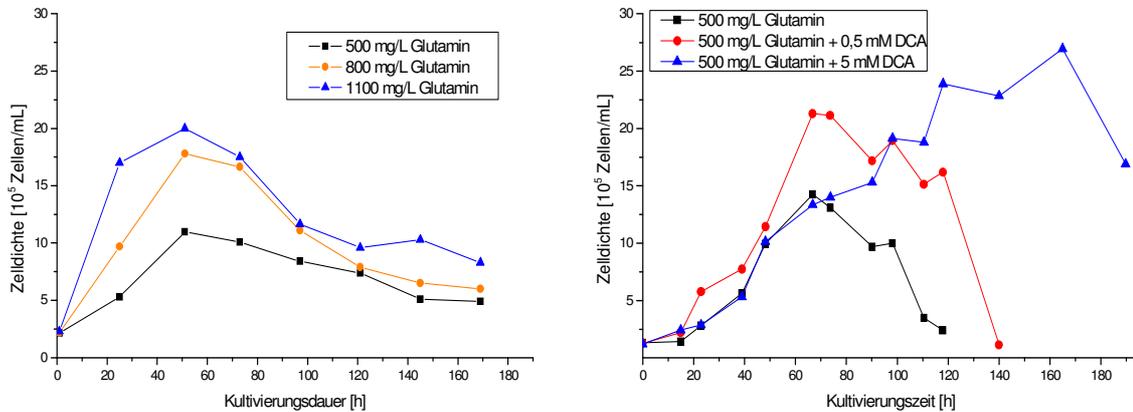


Abbildung 3.7: links: Einfluss unterschiedlicher Glutamin-Supplementierung auf die maximale Lebendzellendichte (Maus-Hybridoma IV F19.23), Animpfdichte $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml rechts: Einfluss unterschiedlicher Dichloressigsäure-Supplementierung auf die maximale Lebendzellendichte (Maus-Hybridoma IV F19.23), bei konstantem Startglutaminwert von $500 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$; Animpfdichte $1,2 \cdot 10^5$ Zellen/ml

Somit wird durch Supplementierung mit DCA weniger wachstumsinhibierendes Laktat gebildet. In Abbildung 3.7 sind Kultivierungsverläufe der Hybridoma-Zelllinie Hybridoma IV F19.23 bei unterschiedlicher Glutaminstartkonzentration und bei Supplementierung des Mediums mit Dichloressigsäure dargestellt.

Wie erwartet steigen die erreichbaren maximalen Lebendzellendichten mit steigender Glutaminkonzentration an. Die Dauer der Wachstumsphase verlängert sich jedoch nicht. Durch Verwendung höherer Glutaminkonzentrationen im Medium zum Kultiverungsbeginn, oder durch Glutamin-Fed Batch sollte es also möglich sein in MembranSpinnern den Einfluss der systemspezifischen Sauerstofftransferrate zu untersuchen. Das Gleiche gilt für die Supplementierung des Mediums mit DCA, mit dem Unterschied, dass hier eine deutliche Verlängerung der Wachstumsphase von ca. 50 h auf 170 h auftritt. In Abbildung 3.8 ist der vollständige Kultivierungsverlauf unter DCA-Einfluss dargestellt. Bemerkenswert ist der um den Faktor 10 höhere Antikörpertiter (Maus-IgG gegen PenG-Amidase) zum Kultivierungsende unter DCA-Zusatz, bei gleicher Glutamin-Startkonzentration von $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Außerdem wird eine doppelt so hohe maximale Lebendzellendichte, bei deutlich geringerer Laktatbildung und unter vollständigem Glukoseumsatz erreicht.

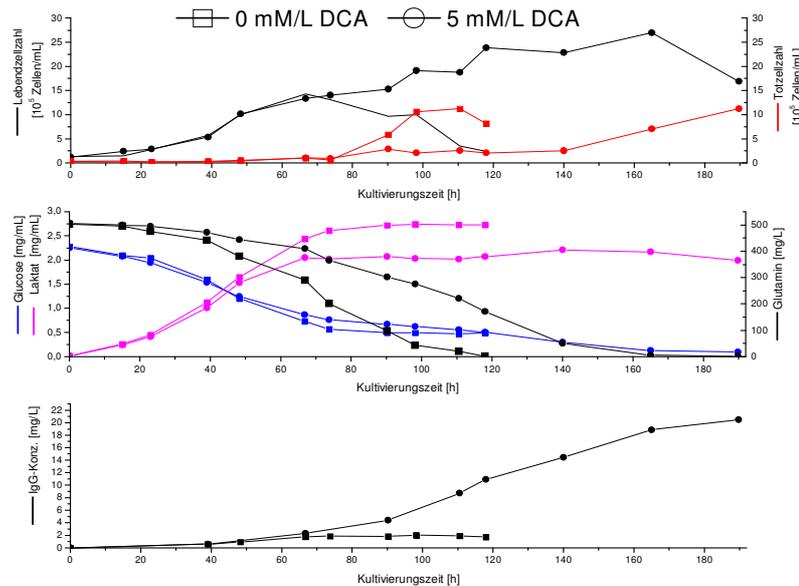


Abbildung 3.8: Einfluss von Dichloressigsäure-Supplementierung (5 mM/L) auf Wachstum, Glukose- und Glutaminverbrauch, Laktat- und Antikörperproduktion der Zelllinie Maus-Hybridoma IV F19.23

Murray *et al.* [64] fanden für eine DCA-Konzentration von 1 mmol/L bei der Kultivierung von Maushybridomzellen der Linie PQXB 1/2 eine um 16% höhere Zelldichte und eine 55%ige Steigerung der Antikörperproduktion (IgG₁ gegen Paraquat), bei einer Ausgangsglutaminkonzentration von 300 mg·l⁻¹ im Medium RPMI 1640.

Kultivierung von Maus-Hybridoma unter Glutaminzufütterung im MembranSpinner

Um den Einfluss des Sauerstoffeintrags, als wachstumslimitierende Größe, auf die Zelldichten zu untersuchen wurden die Kultivierungen im kommerziellen MembranSpinner und in Standard-Spinnerflaschen (Techne) im Glutamin-fed-batch-Modus wiederholt. Der Kultivierungsverlauf im SuperSpinner ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Nach ca. 110 h begann der Sauerstoffgehalt im Medium zu steigen. Die Zelldichte betrug zu diesem Zeitpunkt $1,9 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Bei Zugabe von Glutamin sank der Sauerstoffgehalt des Mediums wieder auf 0%. Die Zelldichte stieg im weiteren Verlauf auf $2,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml an, damit wurde fast die errechnete maximale Zelldichte von $2,7 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht.

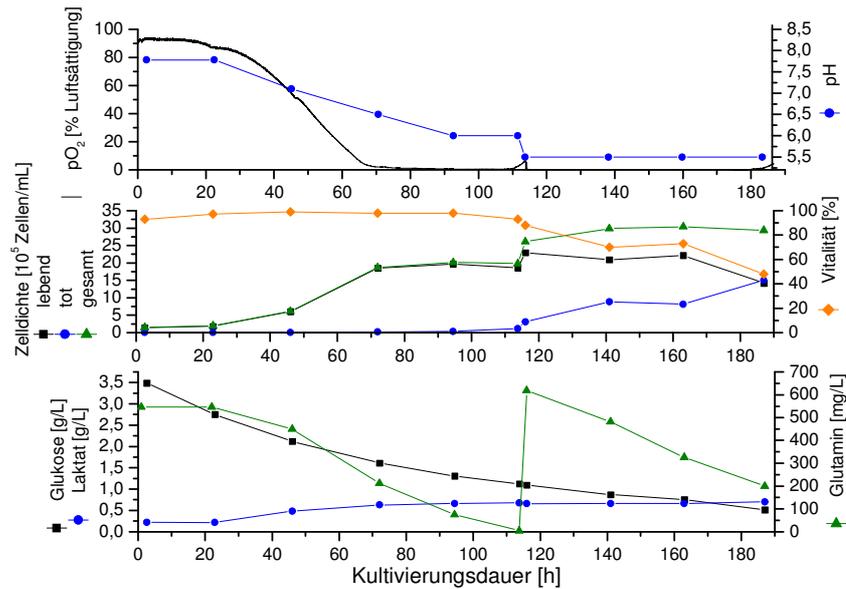


Abbildung 3.9: Hybridomzellkultivierung SuperSpinner (SSB, $k_{L,a} = 2,3h^{-1}$)

Das Zellwachstum wurde nun durch Sauerstoffmangel limitiert. Die Ergebnisse bzgl. der $k_{L,a}$ -Werte und der erreichten Zelldichten vor dem Einsetzen der Wachstumslimitierung durch Glutaminmangel und nach der Glutaminzugabe sind in Tabelle 3.9 im Vergleich zu den errechneten maximalen Zelldichten dargestellt. Die Zelldichten vor der Zugabe von Glutamin waren in beiden Kultivierungen fast identisch (vgl. Abschnitt 5.1.3).

Tabelle 3.9: Gegenüberstellung der $k_{L,a}$ -Werte, der erreichten Zelldichten vor und nach Glutaminzufütterung und der errechneten maximalen Zelldichten von Hybridomkultivierungen der Linie IV F19.23

Spinner-System	$k_{L,a}$ -Wert [h^{-1}]	Zelldichte vor Glutaminzugabe [10^6 Zellen/ml]	Zelldichte 2 h nach Glutaminzugabe [10^6 Zellen/ml]	theoretische max. Zelldichte [10^6 Zellen/ml]
SuperSpinner (SSB), autoklaviert	2,3	1,9	2,2	2,7
250 ml-Spinner (Techne), Füllstand 150ml	7,9	2,0	2,8	9,3

In der Standard-Spinnerflasche bewirkte die Glutaminzugabe einen größeren Anstieg der Zelldichte als im SuperSpinner (SSB). Bis auf den Sauerstoffeintrag herrschten bei beiden Kultivierungen dieselben Bedingungen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Zellwachstum im SuperSpinner durch Sauerstoffmangel limitiert wird. Die maximale erreichte Zelldichte in der Standard-Spinnerflasche lag mit $2,8 \cdot 10^6$ Zellen/ml deutlich unter der errechneten maximalen Zelldichte von $9,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Hier wurde das Wachstum vermutlich durch weitere, unbekannte Faktoren limitiert. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die angewandte Glutamin-Zufütterungsstrategie ungeeignet war. Zum

Zeitpunkt des Gelöstsauerstoffanstiegs aufgrund des vollständigen Glutaminverbrauchs könnten die Zellen, oder Teile der Population bereits in die Absterbephase eingetreten gewesen sein, so dass die theoretisch berechneten Maximalzellichten nicht erreicht wurden. Dieses Vorgehen war nötig, da keine schnelle *at-line* Analytik für Glutamin zur Verfügung stand.

Vergleich der IgG-Produktionsraten

Zur Untersuchung des Einflusses der verschiedenen MembranSpinner-Systeme auf die Produktivität der Hybridomzellen wurden die Antikörperkonzentrationen in den zellfreien Überständen der durchgeführten Kultivierungen untersucht. Der Verlauf der IgG-Konzentrationen in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer ist in Abbildung 3.10 links dargestellt. Bei der Kultivierung im kommerziellen SuperSpinner und in der Standard-Spinnerflasche handelt es sich um die Glutamin-fed-batch-Kultivierungen.

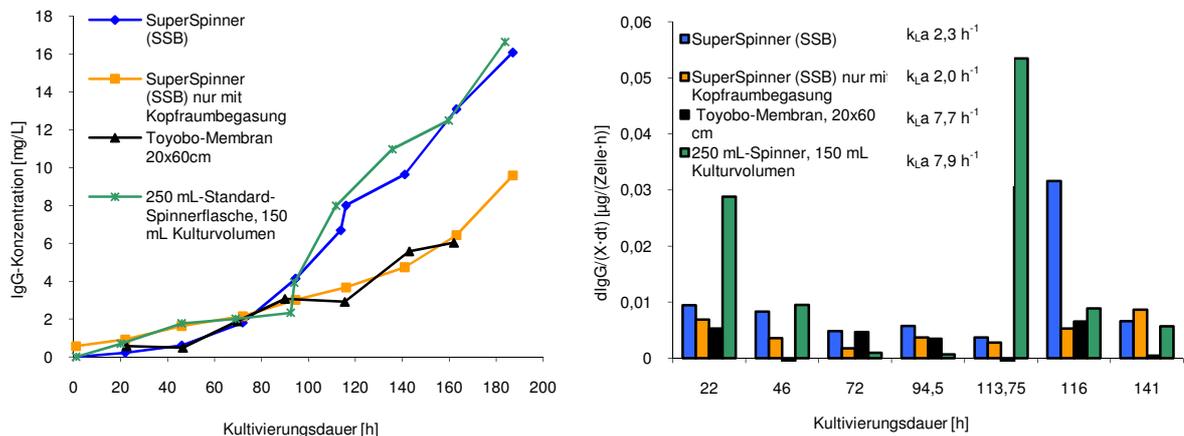


Abbildung 3.10: links: IgG-Konzentrationsverlauf für Hybridomzellkultivierungen in verschiedenen Spinnersystemen rechts: spezifische IgG-Bildungsrate in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

Die höchsten IgG-Konzentrationen wurden im kommerziellen SuperSpinner und in der Standard-Spinnerflasche mit Glutaminzufütterung erreicht ($\sim 16 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Ohne Glutaminzufütterung wurde im Toyobo-MembranSpinner ein IgG-Titer von $5,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ und im Super-Spinner mit reiner Kopfraumbegasung ein Titer von $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ erreicht. Nach etwa 90 h, also vor Glutaminzugabe, unterschieden sich die Antikörperkonzentrationen in den vier Kulturen kaum. Ein Vergleich der spezifischen IgG-Bildungsraten (Abbildung 3.10 rechts) mit den $k_{L,a}$ -Werten der verwendeten Systeme zeigt keinen Trend zu höheren IgG-Bildungsraten bei höheren $k_{L,a}$ -Werten. Die höchsten Raten traten jeweils direkt nach der Glutamin-Zufütterung im SuperSpinner und in der Standard-Spinnerflasche ohne Membranbegasung auf.

4 Aufbau eines ECIS-Messsystems

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens *in vitro* kultivierter Säugetierzelllinien und des Einflusses physikalischer, biologischer und chemischer Stimuli auf den Metabolismus bzw. die Vitalität dieser Zellen ist vielen Bereichen biotechnologischer Forschung von Interesse. Beispiele hierfür sind die Qualitätskontrolle von Zellen, Untersuchungen zur Zellproliferation, zur Substanz-, Zell- oder Virus-vermittelten Zytotoxizität, zur Barrierefunktion von Zellschichten, zur Messung der Zelladhäsion sowie zur Rezeptor-vermittelten Signalübertragung (siehe Tabelle 2.2). Hierzu werden bisher vor allem Endpunktbestimmungen in Form von Färbeassays oder der Markierung relevanter Substrate mit radioaktiven Markern eingesetzt [68]. Ein Nachteil dieser Methoden ist, dass die Messungen im Allgemeinen nicht unter den Kultivierungsbedingungen durchgeführt werden können, sondern dass oft invasive Verfahrensschritte nötig sind unter denen die Zellen fixiert oder durch Reagenzien in ihren Eigenschaften verändert werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass die genannten Färbeassays nur Momentaufnahmen des Zellzustands ermöglichen. Impedanzmessungen hingegen ermöglichen die nicht-invasive, *real-time* Beobachtung von Zellen *in vitro*.

In den folgenden Arbeiten soll ein System zur Durchführung von Impedanzmessungen an konfluenten Säugetierzellschichten aufgebaut werden. Dazu werden kommerzielle ECIS-Messkammern der Firma Applied Biophysics (Troy, NY) in Verbindung mit einem auf der Basis eines handelsüblichen Digitaloszilloskops aufgebauten digitalen Lock-In-Verstärkers eingesetzt. Mit dem aufgebauten Messsystem sollen Zytotoxizitätstests an den Modellzelllinien A549 und SaOs-2 durchgeführt werden. Als Testsubstanzen werden Tributylzinn, sowie die beiden Naturstoffe α -Solanin und Ratjadon eingesetzt. Weiterhin soll getestet werden ob Impedanzmessungen auch auf Zellen unter gleichzeitig mit der Messung appliziertem mechanischem Stress angewandt werden können. In einer parallel laufenden Dissertation von Frau Solvig Diederichs wurde der Einfluss von mechanischem Stress auf das Differenzierungsverhalten von Knochenvorläuferzellen evaluiert [69].

Zur Impedanzmessung an Zellschichten unter mechanischem Stress sollen dehnbare Messkammern auf Silikonbasis hergestellt und der Einfluss der Herstellungsparameter auf die Systemeigenschaften untersucht werden.

4.1 Elektrischer Aufbau

4.1.1 Allgemeines Lock-In-Prinzip

Impedanzmessungen an Säugetierzellschichten, nach dem Aufbau aus Abbildung 2.3, können nur unter Einprägung sehr geringer Ströme $<1\mu\text{A}$ in die zellbewachsene Elektrode ($\varnothing 250\mu\text{m}$) durchgeführt werden, da bei höheren Strömen bzw. größeren elektrischen Feldstärken eine

Elektroporation der Zellmembranen auftritt [70]. Derartig geringe Ströme, bzw. die an der Messzelle abfallenden geringen Spannungen, können mithilfe eines Lock-In Verstärkers vor einem hohen Rauschhintergrund gemessen werden. Der Rauschanteil am Signal kann mehrere Größenordnungen höher sein als das zu messende Nutzsignal. Bei der Messung wird das zu untersuchende System durch ein periodisches Signal in der Form $U_{in}(t) = \hat{U}_{in} \cdot \sin(\omega t)$ angeregt. Als Signalquelle für das System wird normalerweise das, über einen Ausgang am Lock-In zugängliche, Signal der Referenzquelle verwendet. Die Systemantwort erfolgt für lineare Systeme mit gleicher Frequenz, jedoch unter Umständen phasenverschoben $U_{System}(t) = \hat{U}_{System} \cdot \sin(\omega t + \phi)$. Ein einfacher Single-Phase-Lock-In Verstärker ermittelt die Korrelation zwischen Eingangs- und Ausgangssignal, das Signal am Lock-In-Ausgang ergibt sich nach der Autokorrelationsfunktion zu:

$$U_{out} \propto \varphi(\phi) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{\hat{U}_{in} \hat{U}_{System}}{T} \int_0^T \sin(\omega t) \sin(\omega t + \phi) dt = \frac{\hat{U}_{in} \hat{U}_{System}}{2} \cos \phi \quad (4.1)$$

Ein maximales Ausgangssignal ergibt sich demnach wenn zwischen den Signalen keine Phasenverschiebung vorliegt. Frequenzanteile im Signal außerhalb einer schmalen Bandbreite um die Referenzfrequenz, also z.B. Rauschanteile korrelieren nicht mit dem Referenzsignal und tragen deshalb nichts zum Signal am Ausgang des Lock-In-Verstärkers bei. Bei den im Laboralltag viel häufiger anzutreffenden Dual-Phase-Lock-In-Verstärkern wird das Eingangssignal sowohl mit dem genuinen, als auch mit einem um 90° - verschobenen Referenzsignal multipliziert, hierdurch werden sowohl Magnitude als auch Phasenlage, bzw. der Real- und der Imaginärteil des Signals zugänglich (s. Abbildung 4.1).

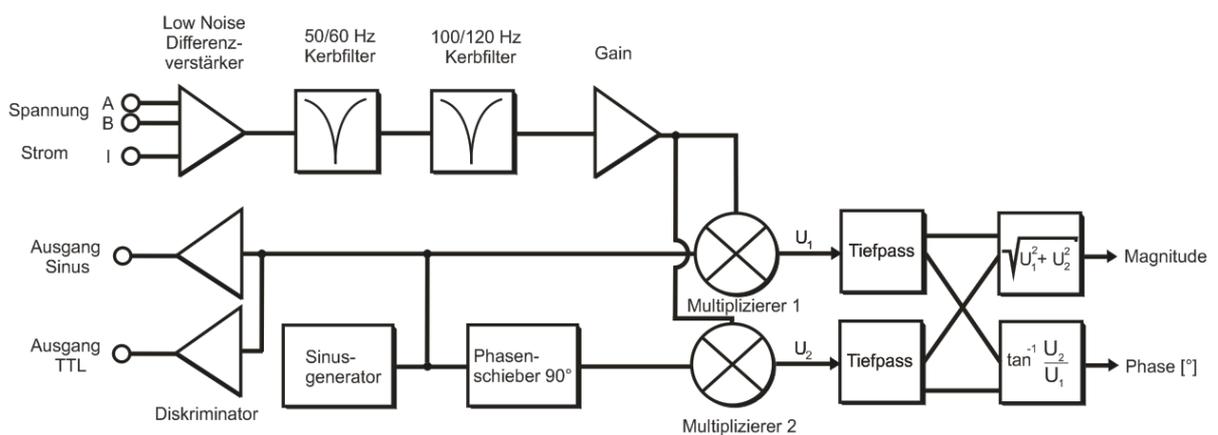


Abbildung 4.1: Prinzipieller Aufbau eines Dual-Phase Lock-In Verstärkers. Das Eingangssignal wird mit dem frequenzgleichen Referenz-Sinus und -Cosinus multipliziert um Real- und Imaginärteil des Eingangssignals zu bestimmen. Real- und Imaginärteil werden verrechnet zu Magnitude und Phasendifferenz zwischen Eingangssignal und Referenzsignal.

4.1.2 Aufbau von digitalem Lock-In-Verstärker und ECIS-System

Für den Aufbau eines digitalen Lock-In-Verstärkers zur Durchführung von ECIS-Messungen wird ein CS328A-Digitaloszilloskop der Firma Cleverscope (Auckland, Neuseeland) verwendet. Das 2-Kanal-Gerät bietet 14 Bit Auflösung bei einer Eingangsspannung von 18 mV. Die Samplingrate beträgt 100 MSa/s. Für jeden Messkanal stehen 8 MSa Speicher zur Verfügung. Der integrierte Signalgenerator liefert per digitaler Direktsynthese (DDS) Sinus-, Rechteck und Sägezahnsignale mit Amplituden von 0-10 VSS bei Frequenzen von 10^{-2} - 10^7 Hz und 12 Bit Auflösung. Die Verschaltung des Digitaloszilloskops und der restliche Aufbau zur Durchführung von ECIS-Messungen sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Mittels des im Oszilloskop integrierten Signalgenerators wird über einen $1\text{M}\Omega$ -Widerstand eine Spannung von 1 VSS bei einer Frequenz von 4 kHz bzw. bei 40 kHz angelegt. Diese beiden Frequenzen wurden von Wegener et al. als geeignete Messfrequenzen zur Verfolgung der Anheftung von MDCK-Zellen auf Goldmikroelektroden ermittelt [71]. Bei 4 kHz lässt sich nach Rechnungen Wegeners, basierend auf dem elektrischen Modell von Giaever und Keese [72], die Impedanzänderung durch die Anheftung der Zellen mit hoher Sensitivität erfassen. Gleiches gilt für die Messung der Änderung der Elektrodenkapazität aufgrund der Zellanhaftung bei einer Messfrequenz von 40 kHz. Das injizierte Signal wird am Oszilloskop über den Eingang B als Referenz-Signal für das Lock-In-Prinzip gemessen. Über den Signaleingang A wird die über Arbeits- und Gegenelektrode auf dem ECIS-Messslide (Abbildung 4.2) abfallende Spannung, welche zuvor über einen Impedanzwandler vorverstärkt wird, gemessen. Ein PC mit einer Labview-Applikation (Abbildung 4.3) steuert über eine Relais-Umschaltbox die einzelnen Wells des ECIS-Messslides an und verrechnet die per Oszilloskop gemessenen Signalverläufe, entsprechend des Lock-In-Prinzips in Elektrodenimpedanz und -kapazität. Die minimale Messfrequenz des Systems beträgt 20 Sekunden pro Well, entsprechend 160 Sekunden für die Vermessung des gesamten Slides.

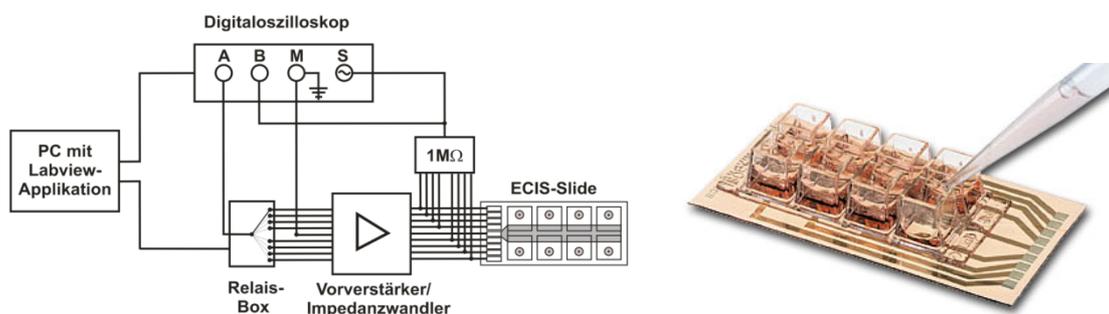


Abbildung 4.2: links: Schema des aufgebauten ECIS-Systems, mit den Signaleingängen A und B am Oszilloskop, M Masse, S Signalgenerator. rechts: Kommerziell erhältlicher ECIS-Messslide 8W1E (Applied Biophysics) mit 8 ECIS-Messkammern, die Größe der Arbeitselektroden beträgt $250\ \mu\text{m}$. Am rechten Rand des Slides befinden sich Gold-Kontaktpads welche mit gefederten Prüfstiften kontaktiert werden.

Alle signalführenden Leitungen des Systems sind als geschirmte Koax-Kabel ausgeführt. Der ECIS-Slide wird mittels einer Vorrichtung mit gefederten Prüfkontakten kontaktiert, welche in einem Standard-CO₂-Inkubator aufgestellt wird. Der Vorverstärker zur Impedanzwandlung ist in die Vorrichtung zur Kontaktierung integriert.

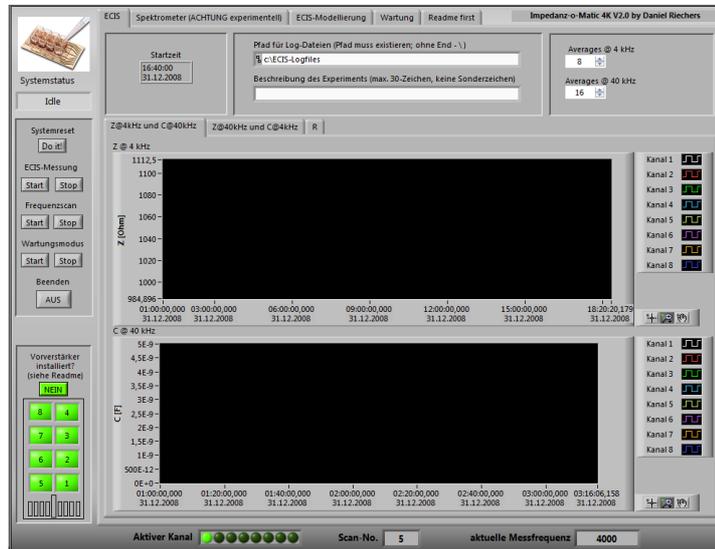


Abbildung 4.3: Screenshot der Labview-Anwendung zur Steuerung des Messablaufs und zur Aufzeichnung von ECIS-Messdaten

4.1.3 Messablauf

Der Messablauf zur Bestimmung von Elektrodenkapazität und –impedanz geht folgendermaßen vonstatten:

- Anwahl des zu vermessenden Wells über die Relaisbox
- Setzen der Frequenz am Signalgenerator (Sinus, 4 kHz bzw. 40 kHz, 1 V_{ss})
- Sampling von 100 Sinus-Perioden auf Kanal A mit Eingangsempfindlichkeit von 50mV/div, Berechnung der optimalen Eingangsverstärkung aus Signallevel, Setzen der neuen Eingangsverstärkung
- Sampling von 1000 Sinus-Perioden auf Kanal A und B, Bandpassfilterung der Signale (Butterworth, 3.ter Ordnung, untere Grenzfrequenz 0,9xMessfrequenz, obere Grenzfrequenz 1,1xMessfrequenz), Abschneiden der ersten 50 Perioden des Signalverlaufs (Einschwingen des Filters)

- Berechnung der Signalkorrelation nach Gleichung (4.1) (sampleweise Multiplikation Signalverlauf(Kanal A) mit Signalverlauf(B)) → Realteil U_R
- Berechnung der Korrelation von Signalverlauf A mit -90° verschobenem Signalverlauf B → Imaginärteil U_I
- Berechnung von Elektrodenimpedanz und Kapazität nach folgenden Gleichungen

$$Z = \sqrt{\left(\frac{U_R \cdot 1M\Omega}{1V}\right)^2 + \left(\frac{U_I \cdot 1M\Omega}{1V}\right)^2} \quad (4.2)$$

$$C = \frac{-1V}{2\pi \cdot f \cdot U_I \cdot 1M\Omega} \quad (4.3)$$

4.1.4 Test des Systems

Um das aufgebaute ECIS-Messsystem zu testen wurden Slides mit Serienschaltungen verschiedener Widerstands- und Kondensator-Kombinationen mit dem System vermessen. Der Vergleich zwischen der theoretisch berechneten Impedanz bzw. Kapazität bei der jeweiligen Messfrequenz mit der gemessenen soll eine Aussage über die Linearität des ECIS-Systems ermöglichen. Die genauen Widerstände und Kapazitäten der Bauteile wurden zuvor mit einem kalibrierten LCR-Meter (HP 4262A) ermittelt. Die typische Kapazität einer unbewachsenen, zirkulären $250\mu\text{m}$ -Goldelektrode in DMEM-Medium liegt bei einer Messfrequenz von 40 kHz im Bereich zwischen 4-5 nF. Bei bewachsenen Elektroden sinkt die Kapazität auf Werte um 1 nF [71]. Typische Impedanzen bewachsener und unbewachsener Elektroden dieses Typs liegen bei 4 kHz im Bereich zwischen 1-20 k Ω . Der zu testende Impedanzbereich wurde hier jedoch deutlich höher ausgelegt, da für die im späteren Verlauf zu testenden dehnbaren Elektroden eine höhere Impedanz als bei den statischen Goldmikroelektroden erwartet wurde. Die getesteten RC-Kombinationen sind in der nachfolgenden Tabelle 4.1 zusammen mit den theoretisch berechneten Impedanzen angegeben.

Tabelle 4.1: Slides mit verschiedenen RC-Kombinationen zur Testung der Linearität und Messgenauigkeit des aufgebauten ECIS-Systems.

Slide-Nr.	Widerstand [Ω]	Kapazität [nF]	berechnete Impedanz bei 4 kHz [Ω]	berechnete Impedanz bei 40 kHz [Ω]
1	1006	4,35	9202	1360
2	3932	0,31	129668	13544
3	14960	0,66	62116	16129
4	9960	1,07	38507	10670
5	8195	2,20	19856	8392

Die Auftragung der Messwerte gegen die theoretisch berechneten Größen ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Die Ergebnisse der Impedanzmessungen weisen sowohl bei 4 kHz als auch bei 40 kHz im Bereich zwischen 1-130 k Ω eine hohe Linearität auf. Auch die Kapazitätsmessung ist bei beiden Frequenzen linear, jedoch werden bei 40 kHz um 12 % zu hohe Kapazitäten ermittelt. Nach Angaben des Oszilloskop-Herstellers tritt die Abweichung aufgrund der im Oszilloskop implementierten Kaskade aus Operationsverstärkern und Filtern auf [73]. Zur Eliminierung des bei der Eingangsverstärkung auftretenden Offsets wird das Signal mittels eines 12 Bit AD-Wandlers und einem Puffer-Operationsverstärker (Offset 25 μ V) aufbereitet. Um das durch den Operationsverstärker auftretende Rauschen zu eliminieren wird das Ausgangssignal der Kette zur Offset-Eliminierung vor der Weiterverarbeitung durch einen LRC-Filter in der Signalbandbreite begrenzt. Die Crossover-Frequenz dieses Filters liegt bei 20 kHz. Unterhalb von 20 kHz wird die ECIS-Messung nicht beeinflusst. Oberhalb der Crossover-Frequenz des Filters wird das Messsignal durch den Filter in der Phase verschoben. Da die Phasenverschiebung je nach Eingangsverstärkung unterschiedlich ist und Referenzsignal und Messsignal auf den Kanälen A und B bei unterschiedlicher Eingangsverstärkung gemessen werden, tritt die in Abbildung 4.4 gezeigte Messungenauigkeit auf.

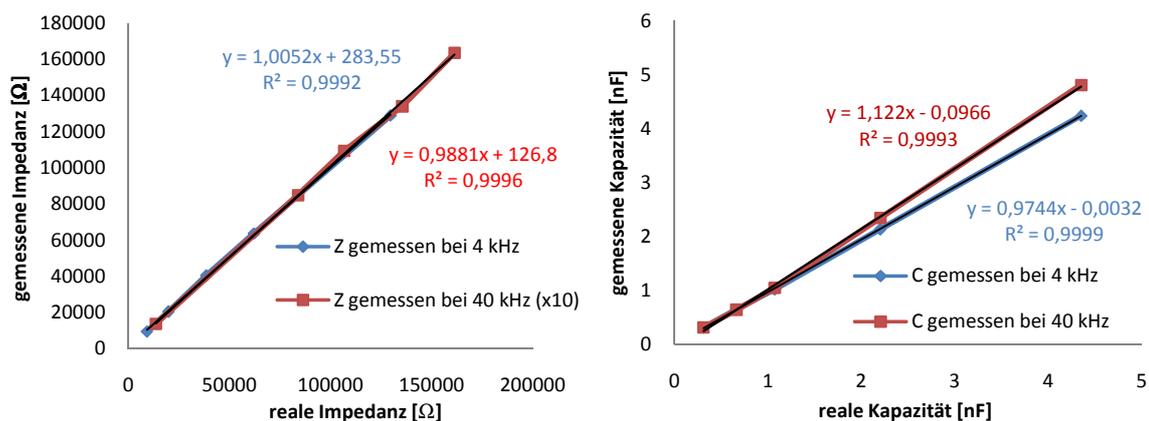


Abbildung 4.4: Linearität von Impedanz- und Kapazitätsmessung des aufgebauten ECIS-Systems

Die Impedanzmessung bei 40 kHz wird durch die Phasenverschiebung nicht beeinflusst, da sie sich unabhängig von der Phasenlage des Signals nach Gleichung (2.3) als Vektorsumme aus Realteil und Imaginärteil der an der ECIS-Messzelle abfallenden Spannung zusammensetzt. Aufgrund des bei der Kapazitätsmessung von der Impedanz abhängigen Messfehlers wird in den folgenden Abschnitten nur die Impedanz selbst als Messgröße zur Durchführung von ECIS-Experimenten herangezogen.

4.2 Zytotoxizitätstests

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das ECIS-System zur Durchführung von Zytotoxizitätstests bzw. Proliferationshemmtests an adhärent wachsenden Säugetierzelllinien eingesetzt. Hierbei wurden Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Einwirkung von Tributylzinn, α -Solanin und Ratjadon auf die Krebszelllinien A549 (humanes Lungenkarzinom) und SAOS-2 (humanes Osteosarkom) untersucht. Zuvor wurde der relevante Konzentrationsbereich mittels eines kolorimetrischen MTT-Proliferationsschnelltest ermittelt. Der MTT-Test basiert auf der Metabolisierung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in den Mitochondrien lebender Zellen zu einem unlöslichen blauen Formazansalz. Nach Resolubilisierung des Salzes mittels SDS wird die Absorption bei 570 nm gemessen. Die gemessene Absorption ist proportional zur Zellzahl [74]. Die Substanzen α -Solanin und Ratjadon weisen ein Anwendungspotential als Zytostatika in der Krebstherapie auf. Tributylzinn stellt eine gut charakterisierte Modellsubstanz zur Auslösung von Apoptose/Nekrose dar, wobei sich die Wirkung jedoch unspezifisch gegen Tumorzellen und unauffällige Zellen richtet. Aufgrund der in Abschnitt 4.1.4 beschriebenen Messungengenauigkeit bei der Kapazitätsmessung mittels des aufgebauten ECIS-Systems, konnte keine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose bei der Einwirkung der Testsubstanzen auf die beiden getesteten Zelllinien untersucht werden. Das Auftreten von Apoptose kann mittels kommerziell verfügbarer ECIS-Messtechnik über eine Zunahme der Kapazität, welche mit der Auffaltung der Zellmembran aufgrund der Bildung von Apoptose-Körperchen (*blebbing*, s.u.), bzw. der vorgelagerten Zeiose einhergeht, detektiert werden. Das kürzlich von Roche auf den Markt gebrachte xCELLigence[®]-System ist ebenfalls nur für reine Impedanzmessungen ohne Erfassung der Elektrodenkapazität geeignet.

4.2.1 Zytostatika und Zellzyklus

Der Zellzyklus wird bei Eukaryonten in fünf Phasen unterteilt. In der G₀-Phase (G steht für engl. *gap*) befinden sich Zellen, welche sich z.B. aufgrund eines Mangels an Wachstumsfaktoren oder essentiellen Substraten nicht mehr teilen. Durch Induktion bestimmter Zellsignalfade kann eine Zelle aus der G₀- in die G₁-Phase und somit in den Zellzyklus eintreten. In der G₁-Phase werden Proteine- bzw. Enzyme aufgebaut, welche für die Zellteilung vonnöten sind. In der nächsten Phase des Zyklus, S-Phase (S für DNA-Synthese) genannt, wird die DNA repliziert, dem Übergang in die S-Phase ist eine Kontrolle der DNA-Integrität und der zur Zellteilung nötigen Mitogene vorgelagert. In der anschließenden G₂-Phase werden Proteine für die darauf folgende M-Phase (Mitose) translatiert. Vor dem Übergang in die M-Phase wird die Vollständigkeit der replizierten DNA überprüft. In der M-Phase teilt sich die Zelle in zwei Tochterzellen. Wird an einem der Kontrollpunkte des Zyklus eine nicht-integere DNA festgestellt, so wird vermehrt das Tumorsuppressor-Protein p53 exprimiert,

welches u.a. zur Expression des p21-Proteins führt, wodurch der Übergang zwischen G₁- und S-Phase unterbunden wird. Kann der, beispielsweise durch Cancerogene ausgelöste, Fehler in der DNA nicht durch zelleigene Reparaturmechanismen behoben werden, so leitet die Zelle den Apoptose-Vorgang ein. Bei der Apoptose handelt es sich um eine Form des programmierten Zelltods, welcher sowohl durch äußere Faktoren, wie z.B. chemische Wirkstoffe oder Immunzellen, ausgelöst werden kann, oder auch durch zelleigene, innere Vorgänge, wie eine fehlerhafte DNA-Replikation. Das immer gleich ablaufende Suizid-Programm der Zelle beinhaltet die Kondensation des Zellkerns, eine vorgelagerte Expression sog. Caspasen, welche einerseits das Aktin-Skelett der Zelle zerschneiden, andererseits eine Nuklease aktiviert welche zur Kondensation des Zellkerns führt. Das Zerschneiden des Aktin-Skeletts führt unter anderem zum sog. *blebbing* der Zelle, der Auffaltung der Plasmamembran welche zur Bildung apoptischer Vesikel führt, die im Körper dann durch phagozytierende Zellen aufgenommen und abgebaut werden. Die Erkennung der Zellfragmente durch Phagozyten basiert auf der bei der Apoptose stattfindenden Translokation von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Zellmembran. Im Gegensatz zur Apoptose resultiert die Nekrose von Zellen immer aus äußeren Reizen, wie z.B. Sauerstoffmangel, Toxineinwirkung oder Temperaturschock. Sie geht einher mit einem Anschwellen und Platzen der Zelle, wobei im Zytoplasma enthaltene Faktoren Entzündungsreaktionen im umgebenden Gewebe auslösen können. Als Zytostatika werden Substanzen bezeichnet, die auf Säugetierzellen toxisch bzw. proliferationshemmend wirken. Zur Beschreibung des durch eine Substanz gehemmten Wachstums von Zellen *in vitro* ist in der Pharmakologie die Angabe der halbmaximalen Proliferationshemmkonzentration IC₅₀ üblich. Bei dieser Konzentration entspricht die Wachstumsrate 50% der Rate des ungehemmten Wachstums. Zellen, die den Zellzyklus durchlaufen, der durch unterschiedlichste Wirkmechanismen von Zytostatika unterbrochen, bzw. arretiert werden kann, sind besonders sensibel gegenüber Zytostatika. Da Krebszellen sich ununterbrochen teilen und keine Verweilzeit in der G₀-Phase aufweisen, können Zytostatika zur Therapie von Krebserkrankungen eingesetzt werden. Nach der allgemeinen Auffassung lassen sich die bisher bekannten Zytostatika generell in vier Gruppen einteilen:

Tabelle 4.2: Klassen von Zytostatika.

Substanzklasse	Wirkmechanismus	Beispiele
Antimetabolite	Hemmung essentieller Enzyme	Methotrexat, Purin-Analoga
Naturstoffe	Mitosehemmung	Colcemid, Mithramycin, Azaserin
Alkylantien	Alkylieren die DNA	Mechlorethamin, Cyclophosphamid
Sonstige		Hydroxyharnstoff, Hydrazone

4.2.2 Substanzen

Tributylzinnhydrid

Jahrzehntelang als *Anti-Fouling*-Mittel eingesetzt, wurde Tributylzinnhydrid (TBT) 2003 aufgrund der Anreicherung in der marinen Nahrungskette für den Einsatz in Schiffsanstrichen verboten. Nach Nakatsu *et al.* löst Tributylzinnhydrid konzentrationsabhängig Apoptose bzw. Nekrose bei PC12-Zellen aus [75]. Aufgrund der bereits erfolgten Anreicherung in Meeresböden und der weiterhin erlaubten Verwendung der Substanz als Stabilisator für Kunststoffe und Druckfarben ist TBT weiterhin Gegenstand aktueller Forschung, insbesondere im Hinblick auf die Langzeitwirkung auf marine Ökosysteme.

α -Solanin

Nachtschattengewächse wie Tomate und Kartoffel nutzen als Schutz gegen Fraßfeinde und Pilzbefall steroid Glykoalkaloide wie α -Solanin, α -Chaconin und Solamargin [76]. Hierbei machen α -Solanin und α -Chaconin mehr als 95% der, vor allem in den grünen Pflanzenteilen und der Schale vorkommenden, Alkaloide der Kartoffel aus. In mehreren Studien wiesen die beiden Hauptalkaloide

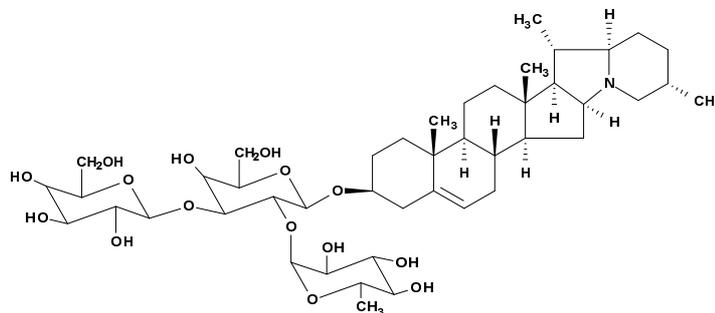


Abbildung 4.5: Struktur von α -Solanin

insbesondere Solanin einen inhibierenden Effekt auf Haut-, Brust-, Prostata- und Kolontumorzellen auf [77-80]. α -Solanin bewirkt bei der aus einem humanen Leberkarzinom etablierten HepG2-Zelllinie einen Zellzyklusarrest in der S-Phase [81].

Ratjadon

Ratjadon stellt ein zytotoxisches Antibiotikum dar, welches erstmals 1994 aus dem Myxobakterienstamm *Sorangium Cellulosum* (So ce360) isoliert wurde [82]. In seinen biologischen Eigenschaften und seiner Struktur ähnelt es den Leptomycinen [83]. In ersten Voruntersuchungen wurde die Anti-Tumorwirksamkeit von Burzlaff [84] mittels Durchflusszytometrie untersucht.

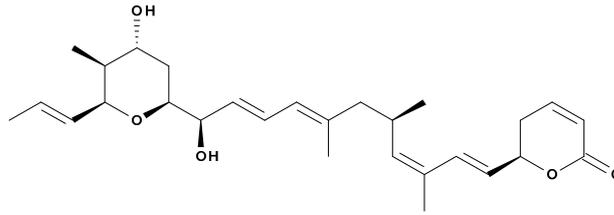


Abbildung 4.6: Struktur von Ratjadon

Gierse führte eine Analyse des Wirkmechanismus von Ratjadon auf HepG2-Zellen mittels DNA-Microarraytechnik durch [85]. Nach diesen Ergebnissen tritt nach 48 h eine im Vergleich zur unbehandelten Zelle erhöhte Expression des Apoptose-induzierenden BCL2-Gens sowie des zellzyklusregulierenden Gens CDKN1A auf. Letzteres Gen bewirkt einen Zellzyklusarrest in der G₁/S-Phase [86].

4.2.3 MTT-Assay zur Durchführung von Zytotoxizitätstests

Mittels des MTT-Tests wurde der relevante Konzentrationsbereich für die ECIS-Messung ermittelt. Als Inokulationszellendichte wurden für den MTT-Test jeweils 5000 Zellen/Well eingesetzt. Für A549-Zellen wurde als Inkubationszeit 24h gewählt, respektive 48 h bei der SAOS-2-Zelllinie. Um einen Effekt des für die jeweilige Testsubstanz verwendeten Lösemittels auszuschließen, wurden mit dem Lösemittel in gleicher Konzentration behandelte Zellen als Negativkontrolle betrachtet. Die Konzentration des Lösemittels betrug in allen Experimenten jeweils 1% (v/v). Zur Ermittlung der Proliferationshemmung wurde in den folgenden Darstellungen die Differenz der per MTT-Test gemessenen Intensitäten für die Negativkontrollen zum Zeitpunkt t=0h und dem jeweiligen Endpunkt zu 100% gesetzt und alle anderen Werte hierauf normiert.

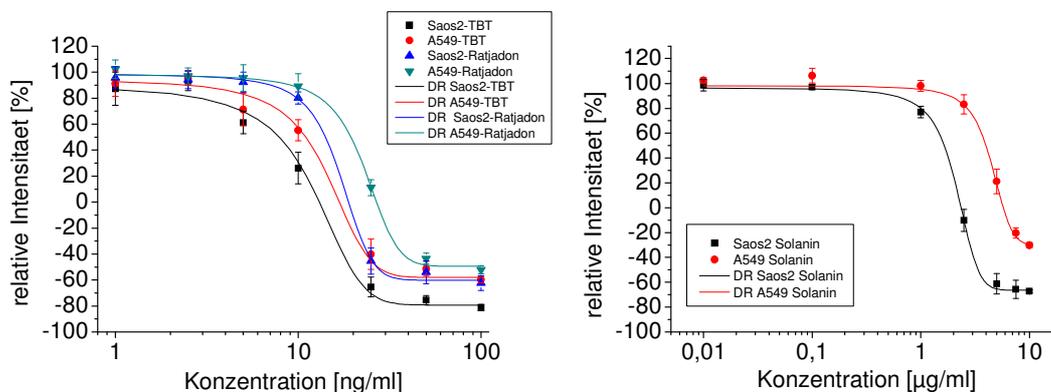


Abbildung 4.7: Relative Intensitäten im MTT-Test in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der Testsubstanz. **Links:** Darstellung für die Substanzen Tributylzinnhydrid und Ratjadon. **Rechts:** Ergebnisse für α -Solanin. Die Werte beziehen sich für A549-Zellen auf eine Inkubationszeit von 24h, für Saos-2-Zellen auf eine Inkubationszeit von 48h. Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichung mit jeweils n=5.

Für Tributylzinnhydrid und Ratjadon wurde zunächst ein Konzentrationsbereich von 1-100 ng·ml⁻¹ an beiden Zelllinien getestet. Für die Experimente mit α -Solaniin wurde der Bereich von 10 ng·ml⁻¹-10 μ g·ml⁻¹ gewählt.

Die in Abbildung 4.7 dargestellten Ergebnisse zeigen einen sigmoidalen Zusammenhang zwischen der Proliferation und der Konzentration der eingesetzten Substanzen. Aus den Parametern der nichtlinearen Kurvenanpassungen nach Boltzmann wurden die IC₅₀- und die IC₉₅- Werte für die jeweiligen Zelllinie-Wirkstoff-Kombinationen berechnet.

Tabelle 4.3: Mittels MTT-Test bestimmte IC₅₀- und IC₉₅-Konzentrationen für die Einwirkung von Tributylzinnhydrid, Ratjadon und α -Solaniin auf die Zelllinien A549 und Saos2:

	A549		Saos-2	
	IC₅₀	IC₉₅	IC₅₀	IC₉₅
Tributylzinnhydrid [ng·ml⁻¹]	11,1	16,7	7,9	13,1
Ratjadon [ng·ml⁻¹]	19,5	27,4	14,1	19,1
α-Solaniin [μg·ml⁻¹]	4,0	5,9	1,6	2,4

Die IC₉₅-Konzentrationen wurden in den nachfolgenden ECIS-Messungen als Maximal-Konzentrationen eingesetzt. Da bei Innokulation der ECIS-Messzellen und paralleler Zugabe der Zellgifte nur vitale, proliferierende Zellen ein Signal erzeugen, konnten mit dem angewandten Messprotokoll keine höheren Konzentrationen getestet werden. In diesem Falle würden die Zellen kaum adhähieren bzw. spreiten, so dass keine Zunahme der Elektrodenimpedanz zu beobachten wäre.

4.2.4 Elektrodenbedeckungsgrad und Impedanz

Als Vorbereitung für die Zytotoxizitätstests wurde der Zusammenhang zwischen der Elektrodenimpedanz und dem Bedeckungsgrad bzw. der Anzahl der auf der Elektrode adhärierenden Zellen untersucht. Hierzu wurden zunächst Fibronectin-beschichtete 6-Well-Platten mit A549-Zellen bzw. Saos2-Zellen besiedelt und für einige Tage inkubiert. Bei Erreichen der visuellen Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert und ausgezählt. Für A549-Zellen wurde eine Konfluenzdichte von $1,31 \cdot 10^5$ Zellen/cm² ($\pm 3,3\%$; n=6) ermittelt, für Saos2-Zellen ergab sich eine Dichte von $6,9 \cdot 10^4$ Zellen/cm² ($\pm 5,0\%$; n=6). Anschließend wurden je vier Fibronectin-beschichtete ECIS-Slides mit ansteigender Dichte bis zur Konfluenz besiedelt. Die bei 4 kHz, 3 h nach der Besiedelung gemessenen Elektrodenimpedanzen wurden invers gegen die Dichte aufgetragen und gefittet. Die Fit-Parameter wurden in den folgenden Experimenten zur Bestimmung des Bedeckungsgrads der Elektroden verwendet.

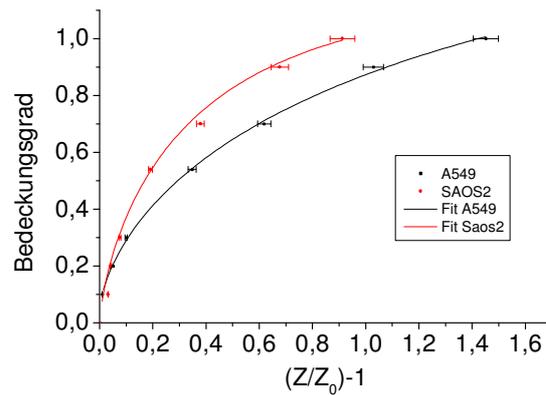


Abbildung 4.8: Zusammenhang zwischen normierter Elektrodenimpedanz und Elektrodenbedeckungsgrad (\varnothing 250 μ m) für die Zelllinien A549 und Saos-2 in 8W1E-Slides (Applied Biophysics).

4.2.5 ECIS-Messung zur Durchführung von Zytotoxizitätstests

Zur Ermittlung der IC₅₀-Konzentrationen für die Modellsubstanzen nach der ECIS-Methode wurde das Wachstum der beiden Modellzelllinien mittels des zuvor aufgebauten Systems verfolgt. Hierzu wurden die Slides mit Zellsuspension, welche außerdem die Zellgifte in der jeweiligen Konzentration enthielten besiedelt- die Elektrodenimpedanz wurde bei der A549-Zelllinie über 24 h, bei der Saos2-Zelllinie über 48 h aufgezeichnet. Die Messergebnisse sind in Abschnitt 5.1.4 dargestellt. In Abbildung 4.9 ist der Zusammenhang zwischen dem normierten Elektrodenbedeckungsgrad zum Zeitpunkt des Abbruchs der Messung und der Konzentration der Modellsubstanzen dargestellt. Der Bedeckungsgrad wurde mit den in Abschnitt 4.2.4 ermittelten Fit-Parametern berechnet und auf den Bedeckungsgrad des Kontrollexperiments mit dem reinen Lösemittel (1% v/v) des Zellgiftes normiert.

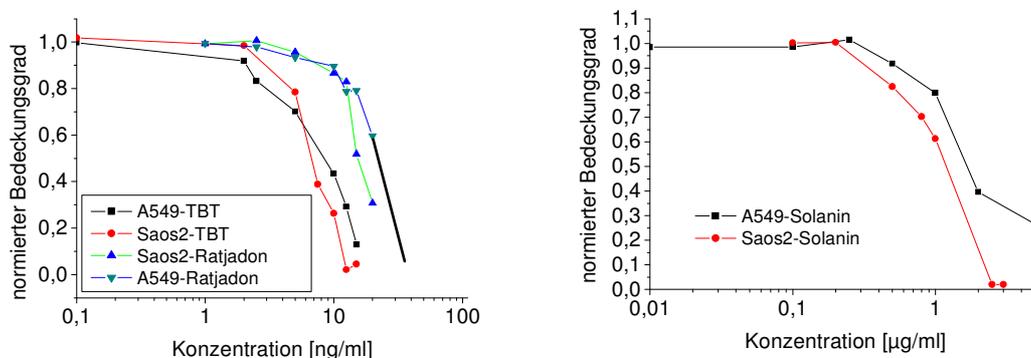


Abbildung 4.9: Normierte Elektrodenimpedanzen der ECIS-Messung in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der Testsubstanz. **Links:** Darstellung für die Substanzen Tributylzinnhydrid und Ratjadon.

Rechts: Ergebnisse für α -Solanin. Die Werte beziehen sich für A549-Zellen auf eine Inkubationszeit von 24h, für Saos-2-Zellen auf eine Inkubationszeit von 48h.

Da für die gesamten Experimente nur eine sehr geringe Menge Ratjadon zur Verfügung stand, konnten für die Testung des Ratjadons nur noch geringere Konzentrationen als für den IC₉₅-Wert der A549-Zellen im MTT-Test ermittelt wurde, eingesetzt werden. Deshalb wurde die IC₅₀-Konzentration für A549-Ratjadon mittels einer linearen Extrapolation der normierten Bedeckungsgrade ermittelt. Die graphisch ermittelten IC₅₀-Werte (ECIS-IC₅₀) sind für alle Zell-Substanzkombinationen in der nachfolgenden Tabelle 4.4 den mittels des MTT-Assays bestimmten Werten gegenübergestellt (MTT-IC₅₀).

Tabelle 4.4: Halbmaximal proliferationsinhibierenden Konzentrationen ermittelt durch MTT-Assay und ECIS von Tributylzinnhydrid, Ratjadon und α -Solaniin für die Modellzelllinien A549 und Saos2.

	A549		Saos2	
	MTT- IC₅₀	ECIS- IC₅₀	MTT- IC₅₀	ECIS- IC₅₀
Tributylzinnhydrid [ng·ml⁻¹]	11,1	8,6	7,9	6,8
Ratjadon [ng·ml⁻¹]	19,5	21,9*	14,1	15,3
α-Solaniin [μg·ml⁻¹]	4,0	1,7	1,6	1,2

*(linear extrapoliert)

Für beide Methoden liegen die ermittelten IC₅₀-Werte in der gleichen Größenordnung und zeigen eine sehr gute Übereinstimmung. Die größte prozentuale Abweichung trat beim α -Solaniin auf.

4.3 ECIS in dehnbaren Silikonschalen

Trotz der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten der ECIS-Technik bei der Untersuchung der Wirkung physikalischer, chemischer und biologischer Stimuli (Tabelle 2.2) auf adhärent wachsende Zellen war es bislang nicht möglich den Einfluss mechanischen Stresses, also z.B. der Längsdehnung von auf flexiblen Substraten aufgewachsenen Zellschichten mit dieser Technik zu untersuchen. Diese Methode böte ein Anwendungspotenzial bei der Untersuchung des Einflusses von mechanischem Stress auf das Differenzierungsverhalten von Knochenvorläuferzellen [69]. Ein weiteres Gebiet ist die Untersuchung des Metastasierungsverhaltens von, an Blutgefäße angrenzenden, bzw. von vaskularisierten Tumoren. Keese *et al.* [39] untersuchten mit der ECIS-Methode das metastatische Potential humaner Prostata-Krebszellen der Linien DU145, PC3, TSU und PPC1 bezüglich konfluenter Schichten von HUVE-Zellen (*human umbilical vein endothelial cells*). Dazu besiedelten sie zuerst ECIS-Messkammern mit einer konfluente Schicht von HUVE-Zellen und gaben anschließend die Prostata-Krebszellen in den Medienüberstand der Messkammer. Das Metastasierungsereignis, also die Durchdringung der Endothelzellschicht und damit das modellhafte Eintreten der Krebszelle in den Blutkreislauf, konnte mit der ECIS-Messung durch ein Absinken der Impedanz der vormals geschlossenen HUVE-

Zellschicht nachgewiesen werden. Die mechanische Belastung der simulierten venösen Endothelschicht durch den Blutkreislauf wurde hierbei vernachlässigt, könnte jedoch mit dehnbaren ECIS-Slides simuliert werden. Ein weiteres aktuelles Forschungsgebiet stellt die Untersuchung des Einflusses der, in vielen Produkten immer weitere Verbreitung findenden, Nanopartikel auf menschliche Zellen dar. Erste Arbeiten von Tarantola *et al.* untersuchten die Zytotoxizität von Goldnanopartikeln und verschiedener fluoreszierender Nanopartikel, sog. *quantum dots*, bezüglich MDCK-Zellen mit der ECIS-Methode [87]. Auch zur Untersuchung des Einflusses mechanischen Stresses bezüglich der Aufnahme von Nanopartikeln durch die Zelle wäre der Einsatz dehnbare ECIS-Slides sinnvoll, da die mechanische Beanspruchung der Zellen den realen Gegebenheiten z.B. menschlicher Hautschichten näher steht.

Bisherige Arbeiten zur Herstellung flexibler Elektrodenstrukturen bzw. Elektrodenarrays beschäftigten sich vor allem mit der Herstellung von medizinischen Implantaten, welche sich in geometrisch komplexe, flexible und druckempfindliche Gewebe integrieren lassen müssen. Beispiele hierzu sind Cochlea-Implantate [88] oder Ableitelektroden zur Untersuchungen der Hirnaktivität bei neurochirurgischen Eingriffen [89]. Cochlea-Implantate (CI) werden eingesetzt um Hörgeschädigten mit degenerativen oder schon bei der Geburt vorliegenden Veränderungen an der Hörschnecke (Cochlea) einen Teil des Hörvermögens zurückzugeben. Ein CI besteht aus einem flexiblen Polyimid-Substrat mit einem lithographisch aufgetragenen Mikroelektrodenarray (Abbildung 4.10). Das Elektrodenarray wird bei der Implantation direkt in die Hörschnecke eingeführt und windet sich dabei aufgrund seiner Flexibilität so, dass das Array bis ans Ende der Cochlea geschoben werden kann. Angesteuert über einen Sprachcomputer kann über das Array eine direkte Stimulation der Hörnerven ausgeübt werden. In Arbeiten von Lacour *et al.* wurde der Einfluss zweidimensionaler mechanischer Dehnung auf Rattenhirnschnitte untersucht [90]. Hierzu wurden dünne Silikonmembranen mit einem Goldelektrodenarray bedampft. Die Elektrodenzuleitungen wurden durch Abdeckung mit einer dünnen Silikonschicht von dem auf dieser Schicht kultivierten Rattenhirnschnitt isoliert, so dass nur die Aktionspotentiale von auf den freiliegenden Elektroden aufgewachsenen Rattenneuronen erfasst wurden. Mittels der zweidimensionalen Dehnung des Rattenhirnschnittes sollte die bei Verkehrsunfällen auftretende mechanische Belastung menschlichen Gehirngewebes simuliert und die daraus resultierenden Effekte untersucht werden.

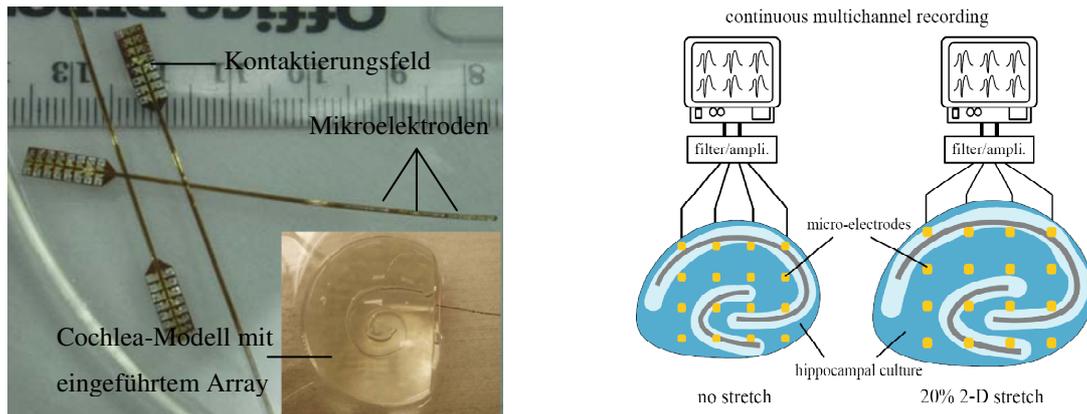


Abbildung 4.10: links: Flexibles Mikroelektrodenarray als medizintechnisches Cochlea-Implantat [88]. rechts: Aufbau zur Untersuchung des Einflusses zweidimensional mechanischer Dehnung auf Rattenhippocampus-Schnitte. Die Aktionspotentiale der Rattenneuronen werden über ein auf Silikon aufgebrachtes Goldmikroelektrodenarray abgeleitet [90].

Weitere Arbeiten zur Herstellung flexibler und dehnbarer leitender Strukturen und somit von potentielltem Elektrodenmaterial für dehbare ECIS-Slides stammen aus dem Umfeld der Mikroelektronik. Hier tritt häufig das Problem auf, dass Materialien mit verschiedenen thermischen Ausdehnungskoeffizienten leitend miteinander verbunden werden müssen. Dazu werden häufig leitfähige Silikone eingesetzt. Die Leitfähigkeit des Silikons ergibt sich aus einer Füllung des Materials mit 60-85 % (m/m) Silberpartikeln mit Größen im Bereich von einigen μm . Die Partikel sind in die flexible und dehbare Silikonmatrix eingebettet und führen durch statistische Kontakte mit Nachbarpartikeln (Perkolation) zu einer makroskopischen Leitfähigkeit des Materials [91].

Im Folgenden sollen Methoden für die Herstellung mechanisch dehnbarer Elektroden und die Möglichkeit diese Elektroden zur ECIS-Messung einzusetzen, evaluiert werden. Dazu werden zunächst dehbare ECIS-Slides mit Elektroden aus mit Edelmetallpartikeln gefülltem Silikon hergestellt und getestet. Im Anschluss daran werden dehbare Slides auf der Basis der Technik von Lacour *et al.* hergestellt und impedanzspektroskopisch untersucht. Beide Typen dehnbarer Slides werden auf ihr elektrisches Verhalten bei eindimensionaler Dehnung im Bereich von 0-10% untersucht und miteinander verglichen.

4.3.1 ECIS-Slides mit Silikon-Metall-Komposit-Elektroden

Zur Herstellung leitfähiger Elektrodenstrukturen für ECIS-Messungen wurden Komposite aus Silber-Silikon bzw. Gold-Silikon als Elektrodenmaterial verwendet. Hierbei wurde ein Massenanteil der Edelmetallpartikel von 80 % eingesetzt, welcher mit dem zellkultur-kompatiblen RTV-Silikon Elastosil RT601 (Wacker) vermischt wurde. Die Korngrößenverteilung der Silberpartikel lag dabei im Bereich zwischen 4-7 μm , die der Goldpartikel zwischen 2-3,5 μm . Der Herstellungsprozess wird im folgenden Abschnitt 4.3.2 beschrieben. Die Elektroden wurden in Silikonschalen (Abbildung 4.11)

eingbracht, welche in der Dissertation von Frau Solvig Diederichs zur Untersuchung des Einflusses mechanischen Stresses auf das Differenzierungsverhalten von Knochenvorläuferzellen verwendet wurden.

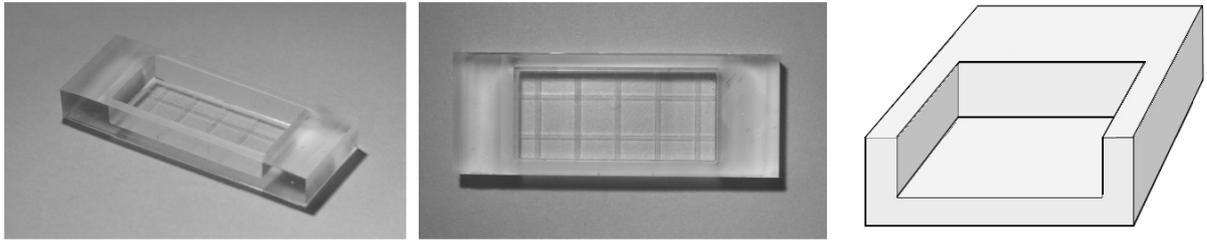


Abbildung 4.11: Silikonschale für die zyklische Dehnung von Zellen. Außenmaße 80 x 30 x 11 mm³. Zentrale Vertiefung : 50 x 23 mm² [69]

Als Teil ihrer Arbeit wurden die Schalen mit adhärent wachsenden Zellen besiedelt und nach definierten zeitlichen Mustern zyklisch gedehnt. Anschließend wurde der Effekt der mechanischen Stimulation auf die Zellen über die Expression von für die Knochenbildung relevanter Gene mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese, sowie der DNA-Chiptechnologie untersucht. Die dabei verwendete, auf van Griensven *et al.* zurückgehende Apparatur [92] zur zyklischen Dehnung der Silikonschalen ist Abbildung 4.12 dargestellt. Über zwei verschraubbare Klemmbacken wird die

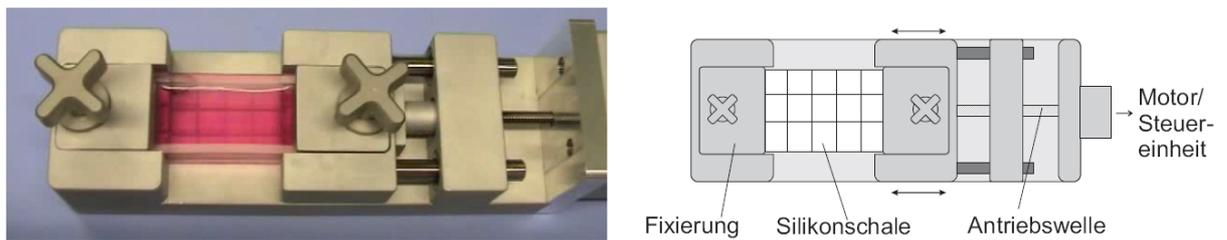


Abbildung 4.12: Einspannvorrichtung zur mechanischen Stimulation von adhärent wachsenden Zellen. Die Schale aus zellkulturkompatiblen Silikon kann durch einen Schrittmotor mit variabler Frequenz und wählbarem Dehnungsgrad zyklisch gedehnt werden [69].

Silikonschale fixiert und kann über einen von einem Schrittmotor bewegten Schlitten entlang der Längsachse der Schale gedehnt werden. Diese Apparatur ist gut geeignet um die mechanische Dehnung der flexiblen ECIS-Slides zu vollziehen und soll im Folgenden genutzt werden, um den Einfluss des mechanischen Stresses auf die herzustellenden Elektrodenstrukturen zu untersuchen.

4.3.2 Herstellung von ECIS-Slides mit Silikon-Metall-Komposit-Elektroden

Die Schalen wurden aus einem platinvernetzenden, zellkulturkompatiblen 2-Komponenten-Polydimethylsiloxan (Wacker, Elastosil RT601) gegossen. Hierfür wurden, in der feinmechanischen Werkstatt des Instituts für Technische Chemie der Universität Hanover angefertigte, Delrin®-Gussformen (Abbildung 4.13 A) verwendet. Der Herstellungsprozess lief folgendermaßen ab:

- Im ersten Schritt wurde die Kavität für die Gegenelektrode (10x10x1mm³) mit leitfähigem Silikon befüllt, zwei 300µm-Metallbohrer wurden mit dem glatten Schaft nach unten, als Platzhalter für die Arbeitselektroden in die dafür vorgesehenen Kavitäten, welche einen 3 mm tiefen Absatz aufweisen, gesteckt
- Die Gegenelektrode wurde mit Leitlitze kontaktiert
- Die Gussform wurde mit Silikon bis zum Rand aufgefüllt, im Vakuum von Luftblasen befreit und für eine Stunde bei 140°C ausgehärtet
- Die Silikonschale wurde von den Platzhaltern befreit und aus der Gussform genommen
- Durch die von den Platzhaltern geschaffenen Kanäle wurde mit einer Spritze leitfähiges Silikon gedrückt, welches rückseitig mit einem Stück Leitlitze kontaktiert wurde
- Das leitfähige Silikon wurde für eine Stunde bei 140°C ausgehärtet
- Der 3 mm-Absatz, welcher nun das ausgehärtete Leitsilikon für die Arbeitselektrode enthielt wurde mit einem geraden Skalpellschnitt auf der Höhe des Schalenbodens entfernt

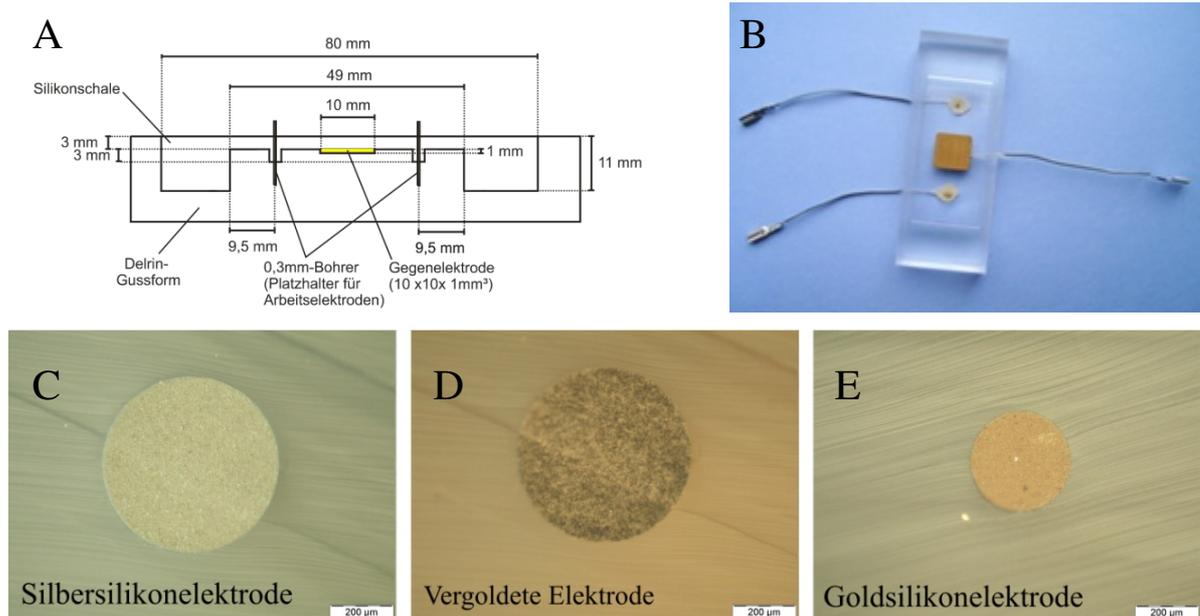


Abbildung 4.13: **A:** Schema der Delrin-Gussform zur Herstellung von ECIS-Silikonschalen. **B:** ECIS-Silikonschale mit elektrischen Anschlüssen für die beiden Arbeitselektroden und die 1cm²-Gegenelektrode. **C:** Mikroskopische Aufnahme einer Silbersiliconelektrode (\varnothing 500 μ m) **D:** linke Elektrode nach potentiostatischer Vergoldung (vergl. Abbildung 4.15) **E:** Goldsiliconelektrode (\varnothing 320 μ m)

4.3.3 Elastizität dehnbarer Silikon-Metall-Komposit-Elektroden

Die Elastizität der leitfähigen Metallsiliconelektroden stellt eine zwingende Voraussetzung für dehnbare ECIS-Slides dar. Um diese sicher zu stellen wurden die Messschalen unter mechanischer Dehnung entlang einer Raumachse unter dem Aufrichtmikroskop betrachtet, fotografiert und vermessen. Abbildung 4.14 zeigt exemplarisch eine ungedehnte Elektrode, sowie dieselbe Elektrode unter 5% und 10% Dehnung.

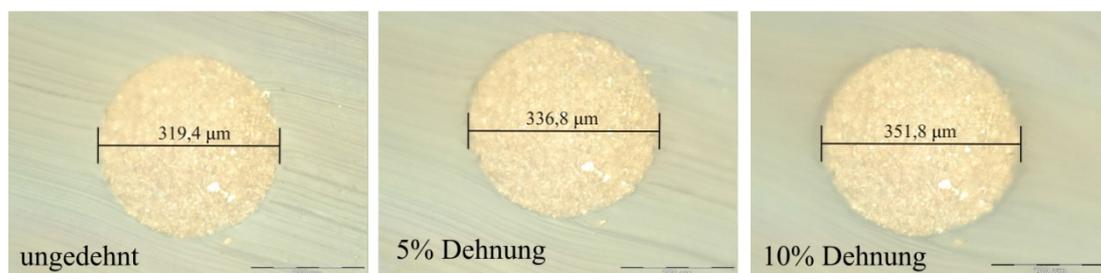


Abbildung 4.14: Aufnahme einer leitfähigen Silbersiliconelektrode unter verschiedenen Längsdehnungen. **Links:** ungedehnt **mitte:** unter 5%iger Dehnung **rechts:** unter 10%iger Dehnung

Die im ungedehnten Zustand zirkuläre Elektrode geht bei zunehmender Dehnung in ein Oval über. Der Abstand zwischen den Elektrodenrändern nimmt entlang der Belastungsrichtung proportional zum Ausmaß der Dehnung zu (319,4 μm - 351,8 μm). Nach der Expansion geht die Elektrode in ihre Ausgangsform zurück (ohne Abbildung). Hierbei traten rund um die Elektrode keinerlei Risse oder Verwerfungen auf.

4.3.4 Oberflächenverteilung der Metallpartikel

Zur Bestimmung des Flächenanteils der Silberpartikel im Verhältnis zum Silikon an der Elektrodenoberfläche wurde am Institut für Physikalische Chemie der Universität Hannover eine energiedispersive Röntgenanalyse (EDX) der Oberfläche vorgenommen (Abbildung 4.15). Die Silberpartikel weisen eine homogene Verteilung in der Oberfläche auf. Es treten jedoch einige Mikrometergroße Bereiche mit hoher Silbermenge, sowie auch inselartige Bereiche, welche ausschließlich aus Silikon bestehen auf. Um den Anteil der leitfähigen Population der Silberpartikel an der Elektrodenoberfläche zu bestimmen wurde die Elektrode potentiostatisch vergoldet (Abschnitt 5.2.6). Hierbei zeigte sich, dass Bereiche, welche nach der EDX-Aufnahme Silberpartikel aufweisen nicht vergoldet wurden. Es wurden hauptsächlich einzelne Partikel in der Oberfläche vergoldet. An diesen Keimen wuchsen dann grobkörnige Goldkristalle, welche jedoch mechanisch so instabil waren, dass sie sich bei leichtem Kontakt abstreifen ließen.

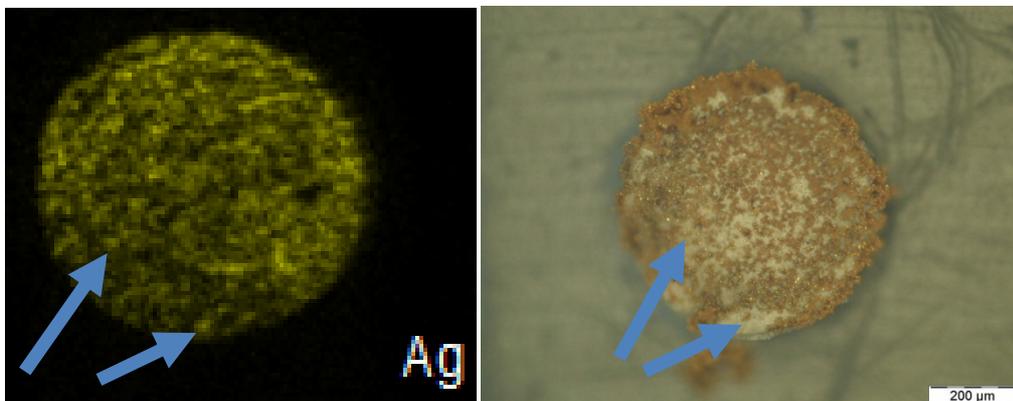


Abbildung 4.15: links: Energiedispersive Röntgenanalyse (EDX) einer Silbersilikonelektrode. Silberpartikel sind in der Falschfarbendarstellung als gelbe Bereiche zu erkennen. Das Silikon erscheint schwarz. rechts: Dieselbe Elektrode direkt nach potentiostatischer Vergoldung, mit aufgewachsenen Goldkristallen ohne mechanische Stabilität. Die Pfeile zeigen die größten unvergoldeten Bereiche der Elektrode, welche jedoch lt. EDX aus Silber bestehen.

Hieraus lässt sich schließen, dass die unvergoldeten Partikel nicht an der Perkolations teilnehmen, welche die makroskopische Leitfähigkeit Metallpartikel-gefüllter Silikone verursacht. Da die unvergoldeten Silberpartikel gegenüber Zellkulturmedien nur eine geringe Stabilität aufweisen und mit den darin enthaltenen schwefelhaltigen Aminosäuren Silbersulfid bilden, wurden die weiteren

Versuche mit Gold-Silikon Elektroden durchgeführt. Die Einwirkung des zwar nur gering – aber doch teilweise löslichen Silbersulfids auf die an der Elektrode anhaftenden Zellen widerspräche einer nicht-invasiven ECIS-Messung. Somit war es nicht möglich kostengünstige Silbersilikon Elektroden, mit anschließender Vergoldung für dehnbare ECIS-Slides einzusetzen.

4.3.5 Impedanzspektroskopische Untersuchung von Gold-Silikon-Komposit-Elektroden

Zur näheren Charakterisierung der hergestellten Elektroden wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Joachim Wegener am Institut für Biochemie der Universität Münster Impedanzspektren der dehnbaren Elektrodenstrukturen gemessen. Dazu wurde mittels eines Funktionsgenerators eine sinusförmige Wechselspannung von 20 mV_{ss} in einem Frequenzbereich von $1\text{-}10^6\text{ Hz}$ an die zu untersuchende Arbeitselektrode angelegt, die 1 cm^2 -Gegenelektrode wurde hierbei auf Masse gelegt. Die über den Elektroden abfallende Spannung wurde über den Frequenzbereich phasenaufgelöst von einem Solartron 1260A *Frequency Response Analyzer* (Schlumberger) erfasst. Als Elektrolyt wurde DMEM-Medium mit 10% FCS verwendet, die Messung wurde im CO_2 -Inkubator bei 37°C durchgeführt. Die Berechnung der Elektrodenimpedanz (EI) wurde mittels eines Labview-Programms vorgenommen. Es wurden drei Schalen mit jeweils zwei Goldsilikon Elektroden mit einem Durchmesser von $320\text{ }\mu\text{m}$ vermessen, wobei eine der Elektroden sich im Experiment als nicht leitfähig herausstellte (Slide 3 Elektrode 2). Die Impedanzspektren der aktiven Elektroden und ein simuliertes Spektrum für eine Goldfilmelektrode gleicher Größe sind in Abbildung 4.16 dargestellt.

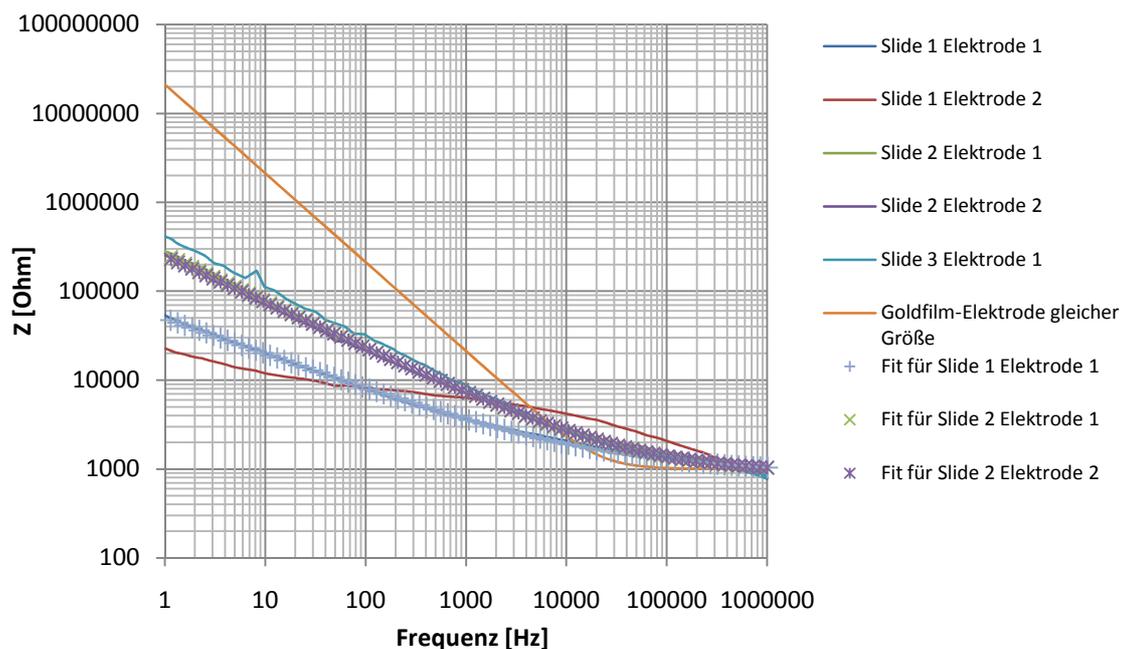


Abbildung 4.16: Impedanzspektren der Arbeitselektroden von drei dehnbaren ECIS-Slides und simuliertes Spektrum einer Goldfilm-Elektrode gleicher Größe.

Die Spektren der Elektroden, mit Ausnahme derer aus Slide 1, zeigen ähnliche Verläufe. Bei Annahme eines CPE-Modells in Reihenschaltung mit einem Widerstand, welcher den Einfluss der Elektrodenzuleitungen und des Mediums erfasst, zur Beschreibung des Verhaltens der Goldsilikonelektroden nach Gleichung (2.29) lassen sich durch nichtlineare Kurvenanpassung die in Tabelle 4.5 angegebenen Parameter für die Elektroden ableiten. Für die spezifischen Admittanzen Q_0/a der Goldsilikonelektroden wird nach dem zuvor genannten Modell ein um nahezu zwei Größenordnungen höherer Wert gefunden als für Goldfilmelektroden. Dieses Phänomen könnte aus der partikulären Struktur der Elektrodenoberfläche resultieren. Die tatsächliche, elektroaktive Oberfläche der Elektroden könnte aufgrund der dreidimensionalen Struktur der Goldpartikel und auch der Oberfläche, in der die Partikel sitzen um ein Vielfaches größer sein als nach dem Elektrodendurchmesser zu erwarten wäre.

Tabelle 4.5: Durch nichtlineare Kurvenanpassung ermittelte Parameter der impedanzspektroskopisch vermessenen Goldsilikonelektroden nach dem CPE-Modell und Parameter einer Goldfilmelektrode zur ECIS-Messung nach Giaever und Keese.

Elektrode	Q_0/a [$\mu\text{F}\cdot\text{s}^{n-1}/\text{cm}^2$]	n []
Slide 1 Elektrode 1	$1,20 \cdot 10^{-2}$	0,41
Slide 1 Elektrode 2	-	-
Slide 2 Elektrode 1	$1,80 \cdot 10^{-3}$	0,53
Slide 2 Elektrode 2	$1,95 \cdot 10^{-3}$	0,52
Slide 3 Elektrode 1	$1,05 \cdot 10^{-3}$	0,58
ideale Goldfilmelektrode	$1,50 \cdot 10^{-5}$	1,00

Weiterhin wird nach der nichtlinearen Kurvenanpassung für den Exponenten n aus Gleichung (2.29) ein Wert zwischen 0,41 und 0,58 gefunden. Für den Grenzfall dass n gleich 1 ist, der nur bei ideal glatten Elektroden auftritt, zeigt die Elektrode aufgrund der Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht ein ideal kapazitives Verhalten, welches bei sinkendem n in ein zunehmend resistives Verhalten übergeht. Nach Mulder *et al.* treten Exponenten n um 0,5 für fraktal gebrochene dreidimensionale Elektrodenoberflächen aufgrund einer abnehmenden Tafel-Stromdichte über die Tiefe der Elektrodenpore auf [93]. Die ermittelten Werte für die Goldsilikonelektroden stellen demnach ein weiteres Indiz für eine nicht-ideal glatte Elektrodenoberfläche und stattdessen für eine poröse, dreidimensional-topologische Oberflächenstruktur dar.

4.3.6 Einfluss mechanischer Dehnung auf die Elektrodenimpedanz

Aufgrund der in den Elektroden flexibel eingebetteten Goldpartikel ist zu erwarten, dass bei der Dehnung eine statistische Lösung und Neuausbildung von Partikel-Partikel-Kontakten stattfindet. Hierdurch bleibt die makroskopische Leitfähigkeit der Elektrode bei der Dehnung erhalten, der Einfluss auf die EI kann aufgrund der statistischen Natur der Vorgänge und der Elektrodengröße jedoch nicht vorhergesagt werden. Im Folgenden wurde die Impedanz zweier Elektroden für Dehnungsgrade von 0-10 % untersucht. Es wurden zwei Elektroden getestet, welche nach den Ergebnissen der impedanzspektroskopischen Messungen ähnliche Eigenschaften aufwiesen. Dazu wurde Slide Nr. 2 in die in Abbildung 4.12 dargestellte Apparatur eingespannt, der jeweilige Dehnungslevel angefahren, die Elektrodenimpedanzen wurden bei 4 kHz, nach einer Haltezeit von 15 min bestimmt. Als Elektrolyt wurde DMEM mit 10% FCS verwendet, die Messungen wurden im CO₂-Inkubator bei 37°C durchgeführt. Um eine mögliche Hysterese zu untersuchen wurden nach Erreichen der maximalen Dehnung die einzelnen Dehnungsgrade in absteigender Reihenfolge durchfahren. Die auf die Impedanzen im ungedehnten Zustand normierten Messergebnisse sind in Abbildung 4.17 dargestellt.

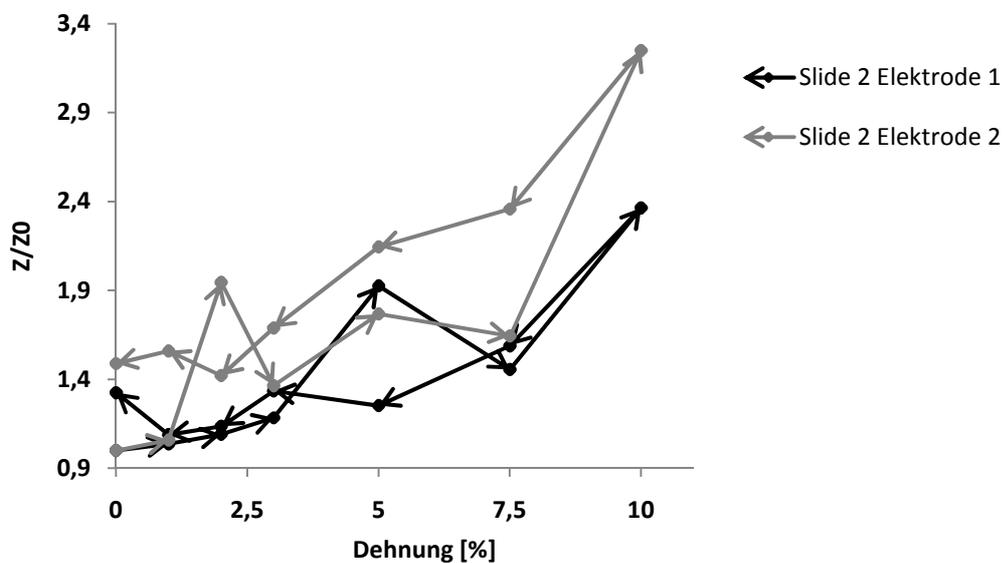


Abbildung 4.17: Normierte Impedanzen der Elektroden in Slide 2 bei 4kHz bei eindimensionaler Dehnung und Relaxation im Bereich von 0-10%.

Generell ist ein Ansteigen der der EI bei zunehmendem Dehnungsgrad zu beobachten. Bei 10%-iger Dehnung steigt für Elektrode 1 die Impedanz auf den 2,3-fachen Wert, für Elektrode 2 auf den 3,2-fachen Wert des ungedehnten Zustands an. Die Dehnungsgrade dazwischen sind von einem nahezu kontinuierlichen Anstieg gekennzeichnet. Bei Elektrode 1 tritt jedoch bei 2%-iger und bei Nr.2 bei 5%-iger Dehnung ein höherer Wert auf als nach dem Verlauf zu erwarten gewesen wäre. Diese

Abweichung resultiert vermutlich aus der statistischen Natur der Partikel-Partikel-Kontakte. Bei der Relaxation der Dehnung tritt bei beiden Elektroden eine Hysterese auf. Die Impedanzen bei der Relaxation liegen über denen bei der ansteigenden Dehnung. Bei vollständiger Relaxation beträgt für Elektrode 1 die Impedanz dem 1,3-fachen und bei Elektrode 2 dem 1,5-fachen des Ausgangswertes.

4.3.7 REM-Aufnahmen besiedelter Elektroden

Für die Durchführung von ECIS-Messungen in dehnbaren Slides muss gewährleistet sein, dass die auf der Elektrode angewachsenen Zellen bei der mechanischen Dehnung der Elektrode nicht aufgrund der Elektrodenoberflächenstruktur geschädigt werden. Bei einer topologischen Struktur, auf welche die Ergebnisse der impedanzspektroskopischen Untersuchung der Goldsilikonelektroden hinweisen, kann nicht sichergestellt werden, dass die Zellen durch die aus der Elektrode herausragenden, scharfkantigen Metallpartikel nicht geschädigt werden. Um die Größenverhältnisse bezüglich der Oberflächentopologie und der Zellgröße zu ermitteln, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer mit SaOs-2-Zellen bewachsenen Goldmikroelektrode angefertigt. Dazu wurde ein durch Autoklavieren sterilisierter, dehnbare ECIS-Slide mit 320 μm großen Elektroden mit $5 \cdot 10^5$ Zellen/cm² in DMEM-Medium mit 10% FKS innokuliert. Der Slide wurde über Nacht bei 5%-CO₂-Atmosphäre und 37°C inkubiert. Anschließend wurde vorsichtig das Medium entfernt, die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und nach dem im Anhang beschriebenen Protokoll fixiert und entwässert. Die REM-Aufnahmen von 1mm-Schnitten der Oberfläche der ECIS-Schale mit fixierten Zellen, sowie von einer gleich behandelten Schale ohne Zellen wurden von Frau Yvonne Stark am Institut für Physikalische Chemie der Universität Hannover angefertigt. Die erhaltenen Bilder sind in Abbildung 4.18 gezeigt. Wie durch die Ergebnisse der impedanzspektroskopischen Untersuchung der Elektroden schon indiziert, weisen die Elektroden eine dreidimensionale und poröse Oberflächenstruktur auf. In Aufnahme A ist zu erkennen, dass einige der Metallpartikel in der Elektrodenoberfläche entgegen der Korngrößenverteilung des zur Elektrodenherstellung eingesetzten Gold-Pulvers (2-3,5 μm) Sehnenlängen bis zu 20 μm aufweisen. Vermutlich resultiert dieses Phänomen aus einem Verschmieren der weichen Goldpartikel (99,9% Au) durch den Skalpellschnitt zur Erzeugung der Elektrode (siehe Abschnitt 4.3.2). Dieser Effekt ist für die ECIS-Messung in dehnbaren Slides als negativ anzusehen, da die Zellen bei der mechanischen Stimulation nicht auf einzelnen undeformbaren Inseln adhären sollten. In Aufnahme B ist zu erkennen, dass einzelne aus der Elektrodenoberfläche herausstehende Goldpartikel von SaOS-2-Zellen umwachsen wurden. Die Aufnahmen C und D zeigen die poröse Oberfläche einer unbesiedelten Elektrode. In Aufnahme D sind die Goldpartikel am Grund einer Elektrodenpore gezeigt. Diese Partikel hatten keinen Kontakt zur Klinge des Skalpells und passen zur Korngrößenverteilung des verwendeten Goldpulvers.

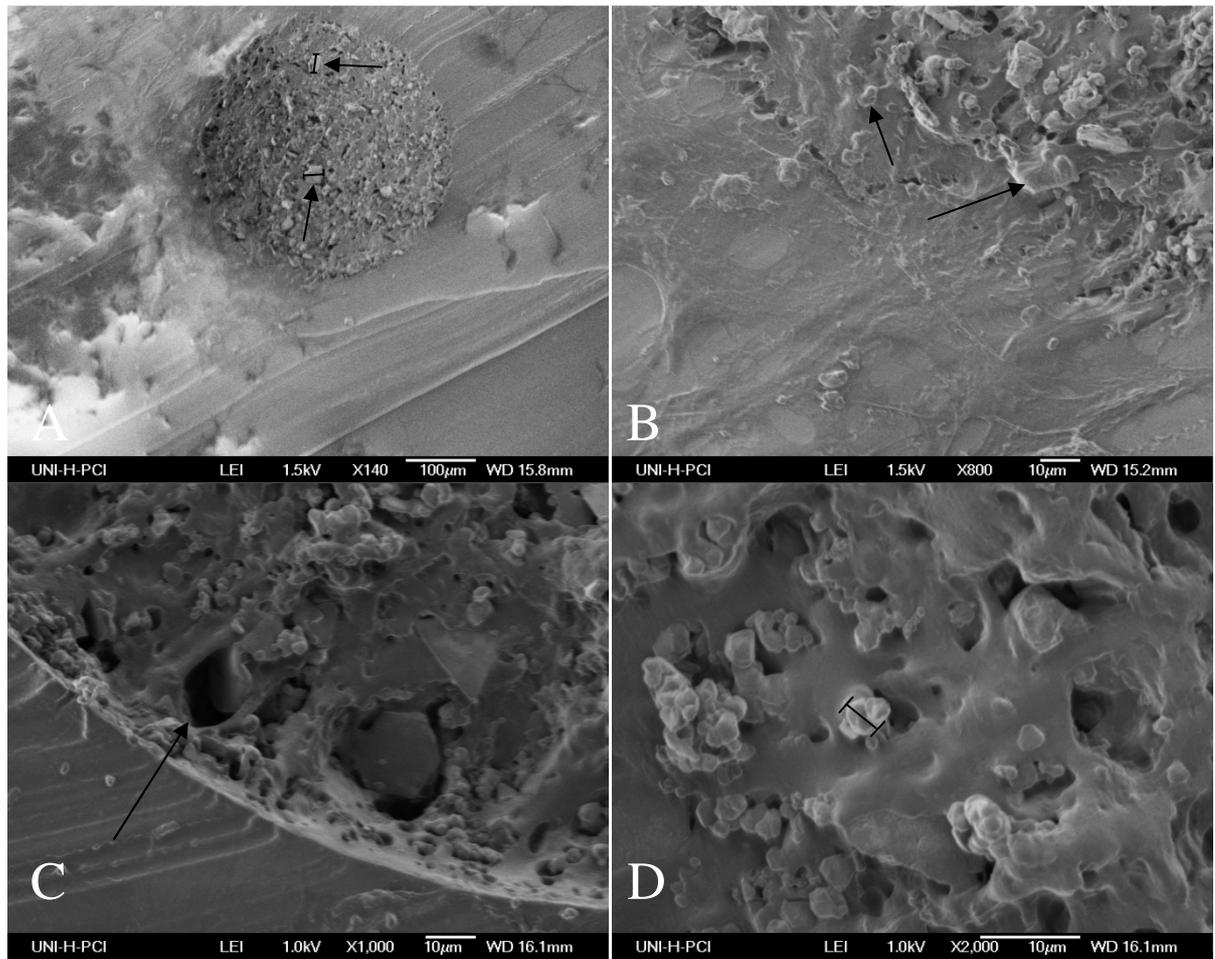


Abbildung 4.18: **A:** 320µm-Goldsilikon­elektrode mit SaOS-2-Zellen in 140-facher Vergrößerung. **B:** Elektrode mit SaOS-2 Zellen in 800-facher Vergrößerung. **C:** Unbesiedelte Elektrode in 1000-facher Vergrößerung. **D:** Unbesiedelte Elektrode in 2000-facher Vergrößerung.

4.4 Dehnbare ECIS-Elektroden in Dünnschichttechnik

Eine weitere Methode zur Herstellung dehnbare Elektrodenstrukturen basiert auf der Technik von Lacour *et al.* [90, 94-100]. Nach ihren Arbeiten können zweidimensional dehnbare Goldelektrodenstrukturen auf Elastomeren wie PDMS erzeugt werden. Vorangehende Arbeiten berichteten, dass freistehende oder durch polymere Substrate unterstützte Gold-, Aluminium- oder Kupferfilme bei Längendehnungen von 1-2% reißen und ihre elektrische Leitfähigkeit verlieren [101, 102]. Diese Werte sind viel kleiner als die Volumen-Reißfestigkeiten der Metalle und resultieren aus der Kornstruktur der Metalle, welche bei der Filmerzeugung mittels PVD der Metalle (*physical vapor deposition*) zumeist auftritt. Die Struktur der Metallfilme kann sowohl durch verunreinigte Korngrenzen, als auch durch eine zu hohe Porosität des Films so geschwächt werden, dass die Volumen-Reißfestigkeiten nicht erreicht werden. Für auf Polymeren aufgetragene Metallfilme ist die Stärke der Adhäsion des Films auf der Oberfläche ein entscheidender Parameter für eine hohe Reißfestigkeit. Von Kang *et al.* wurden unter Erhalt der Leitfähigkeit bis zu 20% längendehnbare, stark adhärierende Aluminiumfilme auf Polyimid berichtet [103]. Bei guter Adhäsion des Metallfilms auf dem Substrat verteilt sich der mechanische Stress über die gesamte Länge des Substrats, so dass es nicht zu lokalisierten Stress-Maxima im Metallfilm kommen kann, welche zum Reißen und damit zum Verlust der Leitfähigkeit führen. Lacour *et al.* erzeugten dehnbare Goldmikroelektrodenarrays auf PDMS nach dem in Abbildung 4.19 (links) dargestellten Schema.

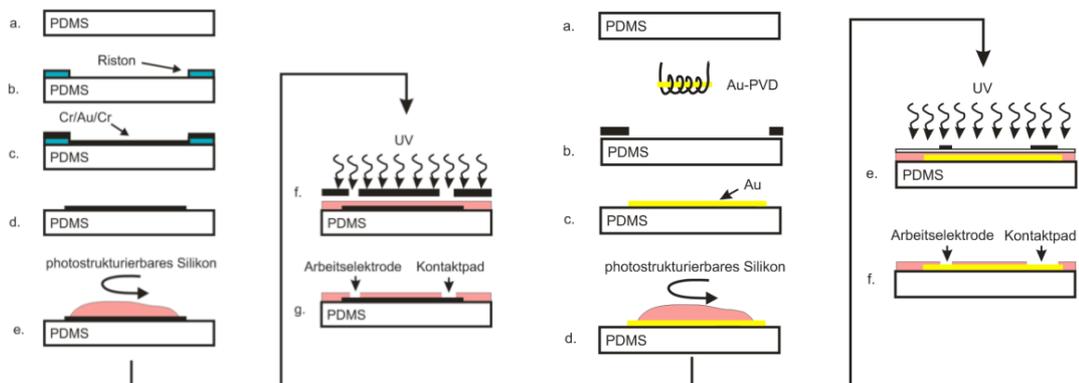


Abbildung 4.19: links: Protokoll zur Herstellung zweidimensional-dehnbare Goldmikroelektroden auf Elastomeren Substraten wie PDMS von Lacour *et al.* [90]. **Rechts:** Abgewandeltes Protokoll zur Herstellung dehnbare ECIS-Slides.

Im ersten Prozessschritt wird auf ein 1mm-starkes PDMS-Substrat ein lithographisch strukturierter, trockener 32 μ m-Riston-Photolack (Dupont) auf laminiert, welcher auf dem PDMS die Bereiche definiert, welche später keine Leiterbahnen/Elektroden aufweisen sollen. Anschließend wird im Hochvakuum durch Elektronenstrahlverdampfung eine Chrom/Gold/Chrom-Sandwichschicht aufgetragen. Die jeweils 5 nm starken Chromschichten dienen als Adhäsionsvermittler zwischen der 25 nm Goldschicht und dem Silikon. Der Riston-Photolack wird in Natronlauge aufgelöst und

photostrukturierbares Silikon (WL5150, Dow Corning) wird per Spin-Coating aufgetragen und durch eine Schattenmaske belichtet. Es folgt eine Aushärtung des unbelichteten Silikons bei erhöhter Temperatur. Durch das anschließende Waschen mit Toluol werden die zuvor belichteten, nicht ausgehärteten Bereiche des photostrukturierbaren Silikons abgelöst. Nach dem Ausdampfen des Toluols und dem vollständigen Aushärten des Silikons bei erhöhter Temperatur ist die Herstellung des dehnbaren Elektrodenarrays abgeschlossen. In Ermangelung einer Elektronenstrahlverdampfungsanlage zur Erzeugung von Cr/Au/Cr-Schichten, sowie geeigneter Lithographietechnik zur Prozessierung von Trocken-Photolacken musste das Protokoll von Lacour *et al.* für die Herstellung von dehnbaren ECIS-Slides abgewandelt werden. Ein Schema des abgewandelten Protokolls ist in Abbildung 4.19 (rechts) dargestellt. Auf eine 1 mm dicke Schicht Elastosil RT601, auf einem 120x120x2 mm³ Glaswafer wurde durch eine Maske Abbildung 5.8, links) ein Goldfilm (99.99% Au; Auto 306, Edwards) aufgedampft. Hierzu wurde 50 mg Golddraht in die Wolframwendel der Bedampfungsanlage eingesetzt und im Abstand von 8 cm über dem Zentrum des PDMS-Substrats bei 0,1 mbar verdampft. In Vorversuchen zur Ermittlung der Abhängigkeit der, bei der Verdampfung verschiedener Goldmengen erzeugten, Schichtdicke wurde bei Verwendung von 50 mg Gold eine Schichtdicke von 60 nm mit einem Profilometer (Dektak 6M Stylus, Veeco) ermittelt. Nach Lacour *et al.* weisen Goldfilme mit einer Dicke kleiner als 100 nm die höchste Dehnbarkeit auf [100]. Im nächsten Schritt wurde per Spin-Coating photostrukturierbares Silikon (PSS) aufgetragen. Das PSS wurde durch Mischen des Photoinitiators 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon in wenig Dichlormethan mit (Methacryloxypropyl)methylsiloxane-dimethylsiloxanocopolymer hergestellt. Das Dichlormethan wurde durch Erhitzen auf 120°C abgedampft (Pre-Bake). Anschließend wurde das PSS mit einer Schattenmaske Abbildung 5.8, rechts) abgedeckt und mit einem Gerät zur PCB-Herstellung mit fünf parallelen 5W-UV-Röhren belichtet. Der direkte Kontakt der mittels eines Tintenstrahl Druckers auf einer 3M-Inkjet-Folie gedruckten Schattenmaske zum PSS verhinderte hierbei das Eindringen von Luftsauerstoff, welcher die radikalische Polymerisation des Silikons inhibiert. Die Schattenmaske wurde nach der Polymerisation des PSS und einer anschließenden Post-Bake-Phase bei 120°C vorsichtig abgezogen. Nicht polymerisiertes Silikon wurde durch Waschen mit Xylol auf dem Spin-Coater entfernt. Zur Entfernung des in das Silikon eindiffundierten Xylols sowie zur Zersetzung überschüssigen Photoinitiators wurde der Wafer mit der fertig prozessierten Elektrodenstruktur 24h bei 100°C ausgeheizt. Anschließend wurde der Wafer entfernt und auf die Kontaktpads wurde mit leitfähigem Epoxid-Kleber (14G, Conrad Electronic) eine kleine Platine aufgeklebt. Die Platine kann über gefederte Prüfstifte mit dem ECIS-Messgerät verbunden werden. Im letzten Schritt wurde ein 1cm-hoher Silikonrahmen auf das ECIS-Elektrodenarray mit Elastosil RT601 aufgeklebt. Das Silikon wurde bei 100°C für 1h ausgehärtet. Ein nach dem beschriebenen Protokoll hergestellter dehnbare ECIS-Slide ist zusammen mit einer modifizierten Apparatur zur eindimensionalen Dehnung des Slides in Abbildung 4.20 gezeigt.

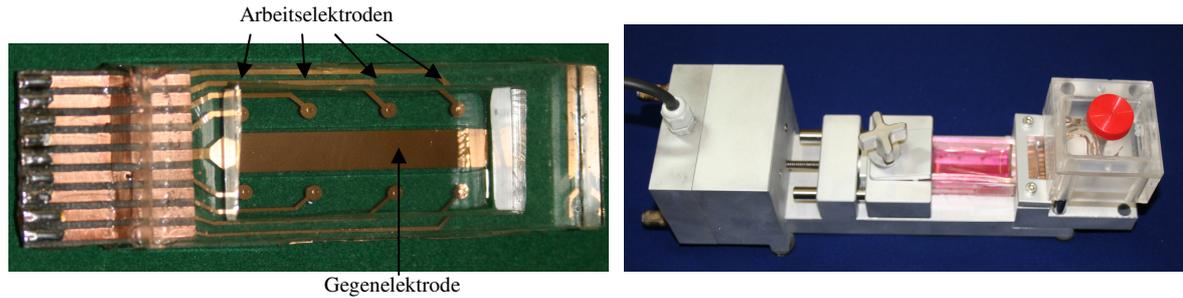


Abbildung 4.20: links: Dehnbarer ECIS-Slide, hergestellt nach einem abgewandelten Protokoll nach Lacour *et al.* Links im Bild befindet sich das PCB zur Kontaktierung der einzelnen ECIS-Arbeits Elektroden, sowie der Gegenelektrode mittels gefederter Prüfstifte. **Rechts:** Modifizierte Apparatur zur Ausübung eindimensionalen mechanischen Stresses auf in Silikonschalen adhären-wachsende Zellen nach van Griensven. Rechts im Bild befindet sich ein auf Bolzen geführter Plexiglastasten, der sowohl die gefedernten Prüfstifte zur Kontaktierung des dehnbaren Slides, als auch den Vorverstärker für das ECIS-Messsystem enthält (vergl. Abbildung 4.2).

4.4.1 Optimierung der Herstellungsparameter

Für die Herstellung der dehnbaren ECIS-Slides wurden die Parameter der einzelnen Prozessschritte optimiert. Eine Übersicht zu den durchgeführten Experimenten gibt Tabelle 4.6. Hierin sind die einzelnen Parameter dem subjektiven Eindruck von den Oberflächeneigenschaften des photostrukturierten Silikons und der Qualität der Elektroden (Abbildung 4.21) gegenübergestellt.

Tabelle 4.6: Durchgeführte Experimente zur Optimierung des Herstellungsprozesses von Elektrodenstrukturen für dehnbaren ECIS-Slides (-- sehr schlecht, - schlecht, o befriedigend, + gut).

Experiment Nr.	Spin-Coating			Photo-initiator			Pre-Bake @ 120°C			ø-Arbeits-elektrode			Belichtung			Post-Bake @ 120°C			Entwicklung			Subjektives Ergebnis				
	1000 rpm	2000 rpm	3000 rpm	100 mg/10 g Silikon	200 mg/10 g Silikon	300 mg/10 g Silikon	1 min	3 min	5 min	250 µm	500 µm	750 µm	10 mW·min/cm²	25 mW·min/cm²	50 mW·min/cm²	3 min	5 min	10 min	3 ml Xylol	5 ml Xylol	10 ml Xylol	500 rpm	1000 rpm	2000 rpm	Silikonoberfläche	Auflösung-Elektrodenstruktur
1	X			X			X			X			X			X			X			X			--	--
2		X		X				X		X				X				X			X		X		--	--
3			X		X				X	X				X			X			X			X		O	O
4	X				X			X			X			X			X			X		X			-	-
5		X			X			X			X			X			X			X		X			O	-
6			X		X			X			X				X		X			X		X			O	-
7		X				X			X	X				X			X			X			X		O	O
8			X		X		X					X	X			X				X			X		-	-
9			X		X			X				X			X		X			X			X		+	O
10			X		X			X				X		X			X			X			X		+	+

Die Erzeugung von ECIS-Arbeits Elektroden mit einem Durchmesser von 250 μm mittels einer Belichtungsmaske mit Strukturen gleicher Größe gelang wegen des verwendeten röhrenbasierten UV-Belichtungsgeräts nicht, da hiermit keine gute Projektion der Belichtungsmaske zu erreichen war. Bei der Verwendung von Masken für größere Strukturen (500 μm , 750 μm) wurden dementsprechend kleinere Strukturen erhalten, als bei einer optimalen Projektion zu erwarten gewesen wären. Als optimale Konzentration des Photoinitiators wurden 200 mg 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon ermittelt, welche in 400 μl gelöst zu (Methacryloxypropyl)-methylsiloxane-dimethylsiloxanocopolymer gegeben wurden und 24 h bei 10 rpm in einem Überwurschüttler vermischt wurden. Die optimale Drehzahl beim Auftragen des photostrukturierbaren Silikons lag bei 3000 rpm, die optimale Belichtungsdosis wurde zu 25 $\text{mW}\cdot\text{min}\cdot\text{cm}^{-2}$ gefunden. Niedrigere Drehzahlen beim Auftrag des PSS führten zu dickeren Silikonfilmen, welche schlechter auspolymerisierten. Höhere Belichtungsdosen führten dazu, dass auch durch die Maske abgeschattete Bereich auspolymerisierten was vermutlich durch an dem Goldfilm gestreutes bzw. reflektiertes UV-Licht ausgelöst wurde. Als Pre-Bake-Phase bewährten sich 3 min bei 120°C. Die Post-Bake-Zeit stellte einen besonders kritischen Parameter dar. Zu kurze Zeiten führten dazu, dass das nicht genügend auspolymerisierte Silikon sich beim Abziehen der Belichtungsmaske von den Goldfilmbahnen ablöste (Abbildung 4.21 A). Eine zu lange Post-Bake-Phase führte dazu, dass das PSS auch an unbelichteten Stellen auspolymerisierte, so dass die Arbeits Elektroden beim anschließenden Entwickeln nicht freigespült werden konnten (Abbildung 4.21 B). Bei der Entwicklung führte ein Auftrag von 5 ml Xylol bei 2000 rpm zu den besten Ergebnissen. Sowohl höhere Xylolvolumina als auch niedrigere Drehzahlen führten zum Quellen des Silikons, bzw. zur Ablösung der PSS-Schicht vom PDMS-Substrat und dem Goldfilm. Einige mikroskopische Aufnahmen erfolgreicher Elektrodenherstellprozesse sind in Abbildung 4.21 C bis E gezeigt. In Aufnahme F ist zum Vergleich eine Arbeits Elektrode des kommerziell erhältlichen ECIS-Slides 8W1E dargestellt. Die Aufnahmen G und H zeigen eine mit MC3T3-Zellen besiedelte Arbeits Elektrode in der Aufsichtdarstellung und als DAPI-Färbung. Die Zellen besiedelten sowohl das photostrukturierte Silikon, als auch die Arbeits Elektrode.

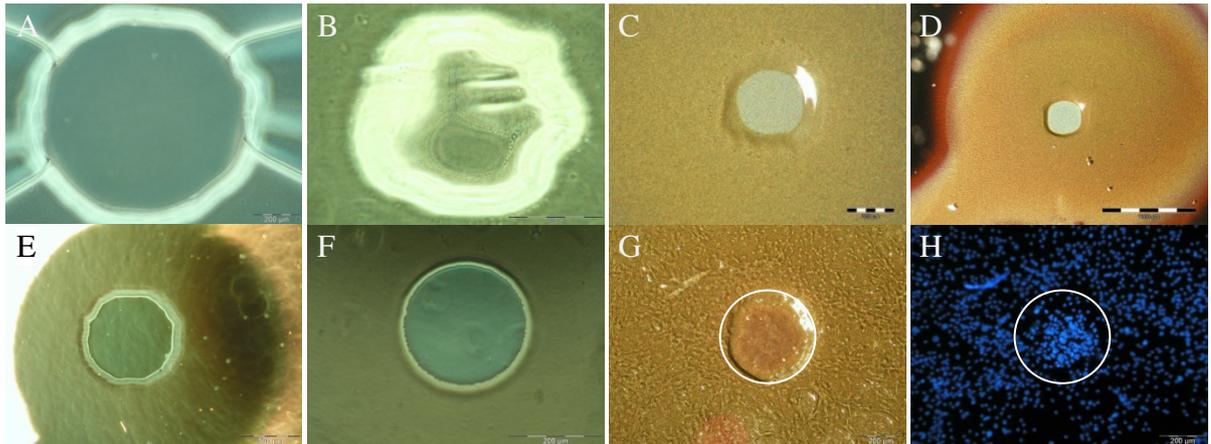


Abbildung 4.21: **A:** Durchlichtaufnahme einer Arbeitselektrode im dehnbaren ECIS-Slide (Experiment 8). Durch ungenügende Polymerisation des PSS wurde die Elektrodenstruktur beim Entfernen der Belichtungsmaske zerstört. **B:** Endergebnis von Experiment 2 im Durchlicht. Durch zu lange Post-Bake-Zeit wurde auch das unbelichtete PSS teilweise polymerisiert, so dass die Elektrodenstruktur nicht aufgelöst wurde. **C:** Endergebnis von Experiment 3 im Auflicht., **D:** Größenvergleich von Arbeitselektrode und umgebendem Goldfilm. **E:** Durchlichtaufnahme einer Arbeitselektrode erhalten in Experiment 10. **F:** Durchlichtaufnahme einer 250µm-Arbeitselektrode im kommerziellen ECIS-Slide (Applied Biophysics), **G:** Arbeitselektrode besiedelt mit MC3T3-Zellen. **H:** Elektrode und MC3T3-Zellen aus G als DAPI-Färbung.

4.4.2 Impedanzspektroskopische Untersuchung der Golddünnsfilmelektroden

Wie in Abschnitt 4.3.5 wurden von den Golddünnsfilmelektroden Impedanzspektren gemessen. Der Slide wurde nach der Vorschrift aus Experiment 7 in Tabelle 4.6 mit einer Maske für 500µm-Arbeitselektroden hergestellt. Vier von insgesamt acht ECIS-Arbeitselektroden waren in diesem Slide aktiv und konnten vermessen werden. Hierzu wurde ein Iviumstat-Impedanzspektrometer (Ivium Technologies, Eindhoven) verwendet. Die Messung fand bei Raumtemperatur mit DMEM und 10% FCS als Elektrolyt statt. Als Elektrodenprüfspannung wurden wiederum 20 mV angesetzt, die Spektren, welche in Abbildung 4.22 dargestellt sind, wurden im Frequenzbereich von $10\text{-}10^6$ Hz aufgenommen.

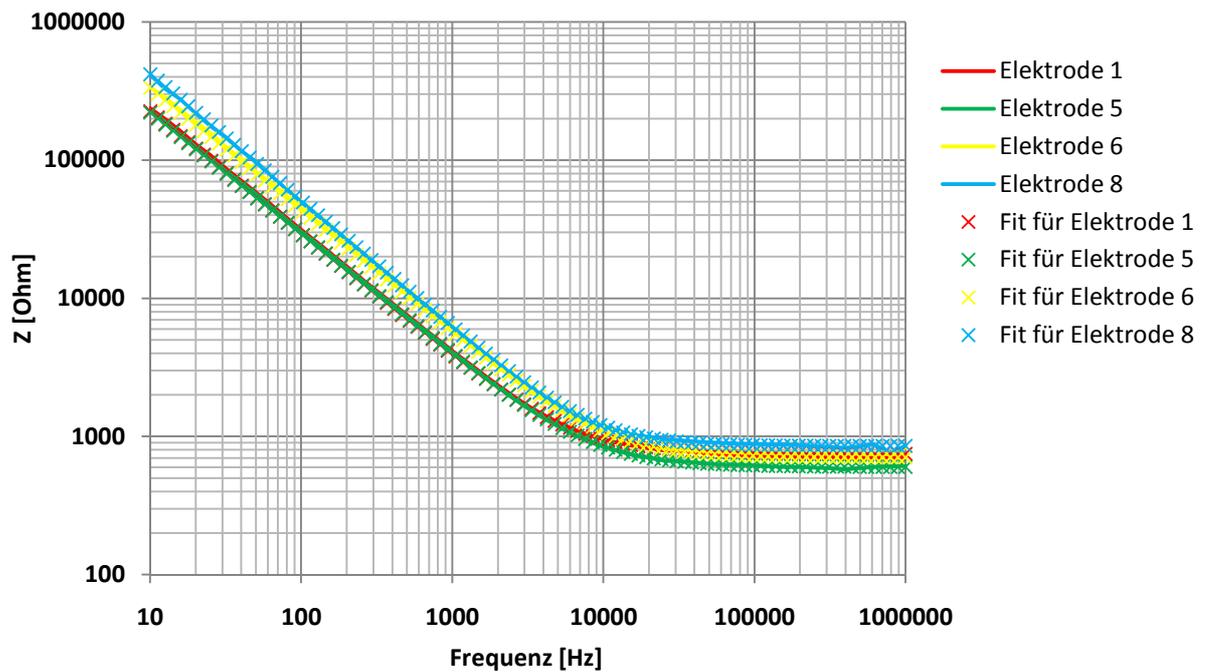


Abbildung 4.22: Impedanzspektren der Arbeitselektroden eines dehnbaren ECIS-Slides mit Dünnschichtgoldelektroden.

Die nichtlineare Kurvenanpassung an die erhaltenen Spektren wurde mit der Software Iviumsoft V1.503 nach dem Modell aus Gleichung (2.29) vorgenommen. Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst. Zur Ermittlung der spezifischen Admittanz $Q_{0/a}$ musste die Elektrodenfläche aufgrund der ungleichmäßigen Form durch Vermessen von mikroskopischen Aufnahmen der Elektroden ermittelt werden. Hierzu wurde das Programm CorelDraw 10 zur grafischen Freistellung der Elektrode mit anschließender Integration der flächenbezogenen Pixelanzahl im entsprechenden Bereich des Bildhistogramms verwendet (Abbildung 4.23).

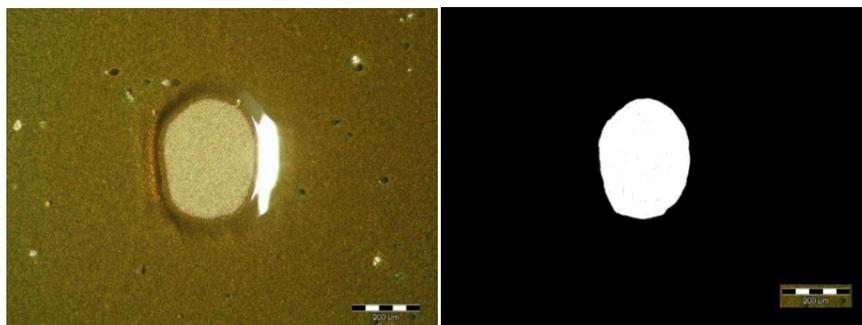


Abbildung 4.23: Zur Ermittlung der realen Elektrodenfläche von dehnbaren Goldfilmelektroden mit dem Grafikprogramm CorelDraw 10. Durch Freistellen der unregelmäßigen Elektrodenfläche und anschließendes Integrieren der Pixelanzahl im Bildhistogramm kann die Fläche bestimmt werden.

Tabelle 4.7: Durch nichtlineare Kurvenanpassung ermittelte Parameter der impedanzspektroskopisch vermessenen Golddünnschichtelektroden nach dem CPE-Modell und Parameter einer Goldfilmelektrode zur ECIS-Messung nach Giaever und Keese.

Elektrode	Q_0/a [$\mu\text{F}\cdot\text{s}^{n-1}/\text{cm}^2$]	n []
Elektrode 1	$1,38 \cdot 10^{-4}$	0,89
Elektrode 5	$1,24 \cdot 10^{-4}$	0,88
Elektrode 6	$1,02 \cdot 10^{-4}$	0,89
Elektrode 8	$1,06 \cdot 10^{-4}$	0,92
ideale Goldfilmelektrode	$1,50 \cdot 10^{-5}$	1,00

Die spezifischen Admitzenzen der dehnbaren Golddünnschichtelektroden übertreffen die einer ECIS-Elektrode nach Giaever und Keese um nahezu eine Größenordnung. Der Grund hierfür ist wiederum eine unterschiedliche Oberflächenrauigkeit der beiden Elektrodentypen. Die Golddünnschichtelektroden in Standard-ECIS-Slides werden durch Magnetron-Sputtering erzeugt und besitzen eine sehr geringe Porosität und Rauigkeit. Zur Herstellung von dehnbaren ECIS-Slides wurde der Goldfilm thermisch aufgedampft. Dieses Verfahren führt im Gegensatz zum Sputtering im Allgemeinen zu grobkristallineren Goldoberflächen [104]. Für den Exponenten n des Modells aus Gleichung (2.29) wurden Werte um 0,9 ermittelt, entsprechend einer annähernd zweidimensionalen Elektrodenoberfläche.

4.4.3 Finite Elemente Analyse der Stressschalen

In Experimenten von Lacour *et al.* ließen sich silikongekapselte 25nm-Golddünnschichtelektroden ($100 \mu\text{m} \times 4000 \mu\text{m}$) unter Erhalt der Leitfähigkeit bis zu 7 % equibiaxial dehnen, wobei sich die EI bezogen auf den Ausgangszustand verdreifachte [90]. Bei höherer Dehnung (8,5 %) stieg die Impedanz sprunghaft auf das 300-fache des Ausgangswertes an. Bei abfallender Dehnung kehrte die EI nicht ganz auf den Ausgangswert zurück (Abbildung 4.24 B). Lacour *et al.* verwendeten bei ihren Experimenten einen Aufbau der sicherstellte, dass die Dehnungskräfte ausschließlich durch das zweidimensionale Elektrodenarray aufgenommen wurden und nicht durch die Seitenwände der Kavität zur Aufnahme der Zellen und des Kulturmediums (Abbildung 4.24 A). Die Dehnungskräfte wurden hier über das Andrücken eines Stutzens an das flexible Elektrodenarray gleichmäßig über die ganze Fläche verteilt.

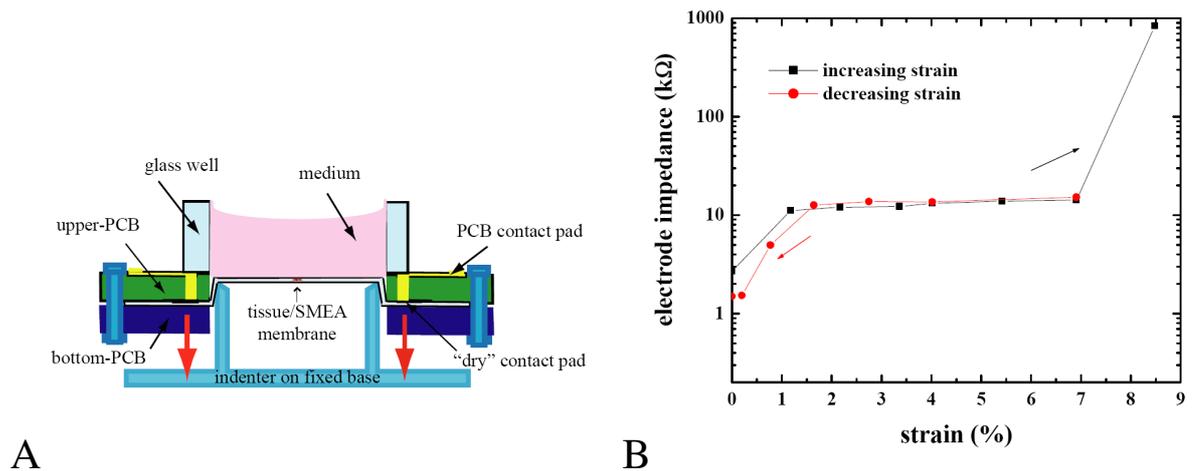


Abbildung 4.24: **A:** Aufbau von Lacour *et al.* zur biaxialen Dehnung von Rattenhippocampuschnitten auf zweidimensionalen Elektrodenarrays. Das Anpressen des Elektrodenarrays an den Bodeneinsatz führt zur biaxialen Dehnung. **B:** Impedanz einer 25nm-Goldfilmelektrode ($100\ \mu\text{m} \times 4000\ \mu\text{m}$) nach Lacour *et al.* bei 1 kHz für verschiedene equibiaxiale Dehnungslevel [90].

Für den Aufbau von dehnbaren ECIS-Schalen wurde eine Kavität auf dem planaren Elektrodenarray mit PDMS als Kleber befestigt. Aufgrund dieser Fixierung und der sich daraus ergebenden komplexeren Geometrie war zu erwarten, dass bei der Dehnung eine uneinheitliche Verteilung der mechanischen Kräfte auftritt. Um das sich im ECIS-Slide ergebende Dehnungsprofil abzuschätzen wurde eine finite Elemente Analyse (FEA) vorgenommen. Die FEA sollte dazu dienen, Bereiche mit besonders hohem Dehnungsgrad, welche dann zu einer besonders hohen Elektrodenimpedanz führen würden, zu identifizieren um ggf. die Schalengeometrie anpassen zu können. Vereinfachend wurde hierbei angenommen, dass die Klemmbanken zur Fixierung des Slides keine Verformung verursachen und dass die Silikonschale keine Klebestellen (Grenzfläche zwischen Elektrodenarray und aufgeklebter Kavität) enthält. Die FEA wurde für Dehnungslevel von 5% und 10% mit ANSYS® V10 berechnet. Hierzu wurde ein einfaches neo-Hook-Hyperelastik-Modell verwendet [105]. Die für das Modell nötigen Materialparameter wurden von dem, bei der Herstellung mikromechanischer Aktuatoren und Sensoren weit verbreiteten PDMS Sylgard 184 übernommen, welches ähnliche Eigenschaften aufweist wie das verwendete Elastosil RT 601 [106]. Da keine realen Tensilometerdaten für das Elastosil RT601 zur Verfügung standen, handelt es sich bei den Ergebnissen der FEA, welche in Abbildung 4.25 dargestellt sind, nur um eine fundierte Abschätzung des Dehnungsprofils. Die Angriffsfläche der Dehnungskraft ist hier mit roten Linien angedeutet, und entspricht der Stelle an der die ECIS-Schalen mit den Klemmbanken des Schlittens in der Apparatur zur mechanischen Dehnung fixiert wurden (vgl. Abbildung 4.12).

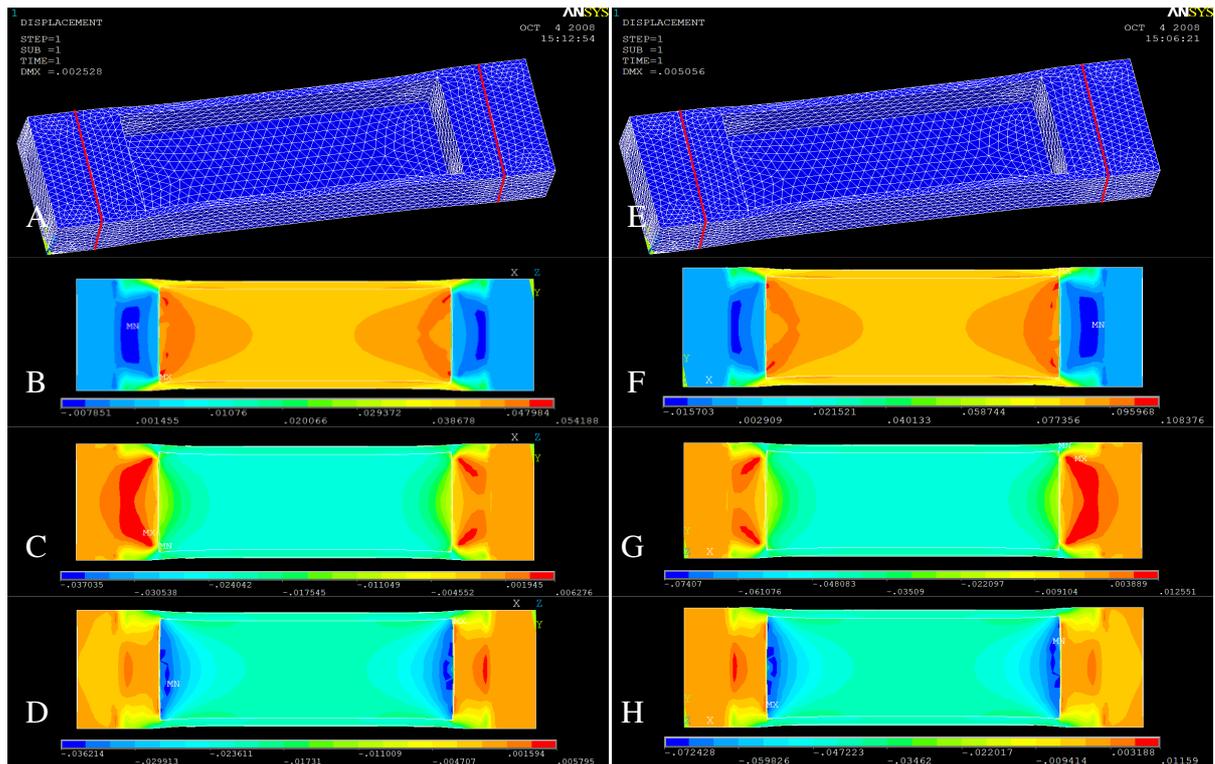


Abbildung 4.25: Graphische Darstellung der Kräfteverteilung auf der Oberfläche einer Silikonschale mit dehnbarem Elektrodenarray, ermittelt durch Finite Elemente Analyse. In A bis D sind die Profile für 5%ige longitudinale Dehnung dargestellt. E bis H zeigen die Ergebnisse für eine 10%ige Dehnung. Zur Ermittlung der prozentualen Dehnung sind die Skalenwerte in der Legende mit 100 zu multiplizieren.

A, E: Ansicht der gedehnten Meshstruktur, **B, F:** longitudinale Komponente der Dehnung (x-Komponente), **C, G:** transversale Komponente (y-Komponente), **D, H:** Wölbung (z-Komponente)

Die Ergebnisse der FEA zeigen, dass die Dehnung entlang der Längsachse der Schale aufgrund der Volumenkonstanz des Silikons erwartungsgemäß zu einer parallelen Kontraktion in transversaler Richtung führt. Bei der nominell 5%igen Elongation, welche zu einer verhältnismäßig gleichverteilten Dehnung von um 4,5% in der Schalenmitte führt, tritt eine transversale Stauchung von ca. 2,5-3,0% auf. Höhere longitudinale Dehnungen als 5% treten im Bereich der Seitenwände neben den Klemmbacken zur Fixierung auf. Der Beitrag dieser Bereiche zur Impedanz des Elektrodenarrays wird demgemäß durch die überdurchschnittliche Beanspruchung der zuführenden Leitungen, bzw. der Elektroden selbst überproportional groß sein. Nahezu proportional zur nominell 5%igen Elongation treten bei der 10%igen Dehnung eine annähernd gleichmäßige longitudinale Verteilung um ca. 9,0% und eine transversale Stauchung von ca. 5,0-5,5% auf. Außerdem tritt in beiden Fällen zusätzlich eine Wölbung der Schale in z-Richtung auf, welche aber auf die Elektroden keinen nennenswerten Einfluss haben kann, da der Gradient der Wölbung klein ist. Die FEA hat ergeben, dass bei der 5%igen Dehnung keine Bereiche des Elektrodenarrays mit über 7 % Dehnung auftreten, so dass bei der Annahme, dass die Daten von Lacour *et al.* für die biaxiale Dehnung (Abbildung 4.24) auch für den uniaxialen Fall gelten sollten, kein abrupter Anstieg der EI um zwei Größenordnungen für Dehnungen

$\leq 5\%$ zu erwarten ist. Literaturdaten für die EI bei uniaxialer Dehnung stehen bislang nicht zur Verfügung.

4.4.4 Einfluss mechanischer Dehnung auf die Elektrodenimpedanz

Zur Überprüfung des Einflusses der mechanischen Dehnung auf die Impedanz der Golddünnschichtelektroden wurde wie in Abschnitt 4.3.6 ein Slide mit vier aktiven Elektroden bei ansteigender und abfallender Dehnung mit einer Schritt-Haltezeit von 15 min untersucht. Die Ergebnisse sind in normierter Form in Abbildung 4.26 dargestellt. Wie auch bei den Goldsilikonelektroden tritt eine Hysterese der EI auf. Bei ansteigender Dehnung von 0% auf 1% sinkt die EI um 2-3% ab. Dieses Phänomen resultiert vermutlich aus der thermischen Ausdehnung des Silikonsubstrats beim Aufdampfen des Goldfilms. Der Goldfilm wird beim Erkalten des Substrats gestaucht, wobei er sich stellenweise aufwölbt und eine geringere Leitfähigkeit bzw. EI aufweist, als ein planarer Goldfilm gleicher Höhe [98, 107].

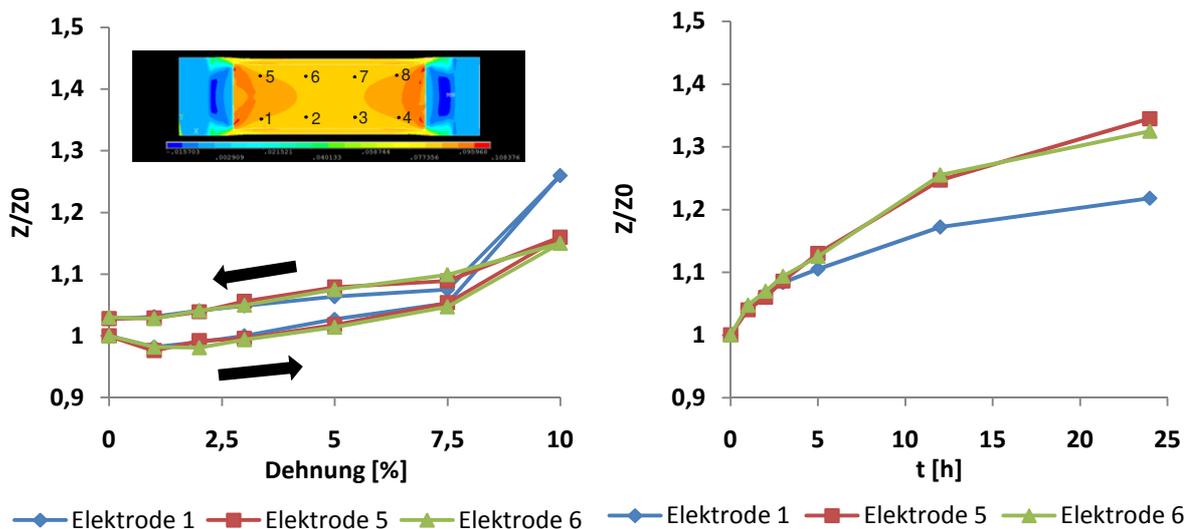


Abbildung 4.26 : links: Normierte Impedanzen von Golddünnschichtelektroden in einem dehnbaren ECIS-Slide bei 4kHz bei uniaxialer Dehnung und Relaxation im Bereich von 0-10% und Positionen der Elektroden im Slide mit longitudinale Dehnungsprofil bei 10%iger uniaxialer Dehnung. rechts: Zeitlicher Verlauf der normierten Impedanzen von vorgedehnten (10%) Golddünnschichtelektroden in einem dehnbaren ECIS-Slide bei 4kHz bei zyklischer Dehnung (1 Hz, 0-5%). Die Messwerte beziehen sich hierbei auf den relaxierten Zustand.

Bei einer Dehnung von 1% ist der Film planar, so dass hier der geringste Wert auftrat. Bei höherer Dehnung (1% bis 7,5%) stieg die Impedanz der Elektroden nahezu linear auf das 1,05-fache des Ausgangswertes an. Bei einer Dehnung von 10% traten höhere Elektrodenimpedanzen auf, als nach dem Verlauf zu erwarten gewesen wären. Elektrode 8 zeigte ein von den restlichen Elektroden abweichendes Verhalten mit einem Anstieg auf das 320-fache der Ausgangsimpedanz (nicht gezeigt). Bei der Relaxation des Slides liegen die Messwerte aller Elektroden ca. 0,03-0,05 Z_0 über denen der

aufsteigenden Dehnung. Elektrode 8 wurde bei der Dehnung auf 10% beschädigt, so dass es sich nicht um eine Relaxation im eigentlichen Sinne handelt. Bei 0% beträgt die Impedanz von Elektrode 8 $1,43 Z_0$. Alle anderen Elektroden kehren auf einen Wert von ca. $1,03 Z_0$ zurück. Die normierten Messwerte von Elektrode 6 liegen bei ansteigender Dehnung jeweils unter denen der anderen Elektroden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass diese Elektrode aufgrund der Position nahe der Schalenmitte (siehe Abbildung 4.26) geringere Dehnungskräfte aufnehmen muss als die Elektroden 1, 5 und 8 nahe den Seiten der Schale. In einem weiteren Experiment wurde der Langzeiteffekt von zyklisch appliziertem mechanischem Stress bei 1 Hz und einer Dehnung von 5% auf die Elektroden ermittelt. Die in Abbildung 4.26 (rechts) dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Elektrodendegradation über den Beobachtungszeitraum von 24 h kontinuierlich zunahm, wobei die Steigung der EI-Zunahme mit der Zeit abnahm. Die Elektroden 5 und 6 wiesen hierbei ein sehr ähnliches Verhalten mit einem Anstieg der EI auf ca. $1,34 Z_0$ auf. Elektrode 1 degradierte im Vergleich zu den anderen beiden deutlich langsamer, mit einem Anstieg der EI auf ca. $1,23 Z_0$. In den ersten drei Stunden des Dauerbelastungstests verlaufen alle drei Graphen nahezu übereinander. Die Elektroden zeigten in diesem Zeitraum somit ein reproduzierbares Verhalten, welches bei der späteren Anwendung der dehnbaren ECIS-Slides rechnerisch kompensiert werden könnte.

Der Degradationsvorgang der Elektroden resultiert aus der Bildung von Mikrorissen in der Elektrodenoberfläche. In Abbildung 4.27 sind mikroskopische Aufnahmen von Elektrode 1 sowohl vor (links) als auch nach (Mitte) dem Langzeitbelastungstest dargestellt. Aufgrund der Ausbildung der Risse verkleinert sich die aktive Elektrodenoberfläche, so dass die EI ansteigt. Dieser Effekt wird nach Lacour *et al.* abgemildert durch die Ausbildung eines perkolierenden Netzwerks von am PDMS-Substrat anhaftenden Goldfilmdomänen [94]. Wenn das elastomere Substrat gedehnt wird, verwindet sich der Goldfilm aus der Ebene, so dass eine große Elongation des Substrats nur eine geringe Dehnung des Goldfilms hervorruft (rechts).

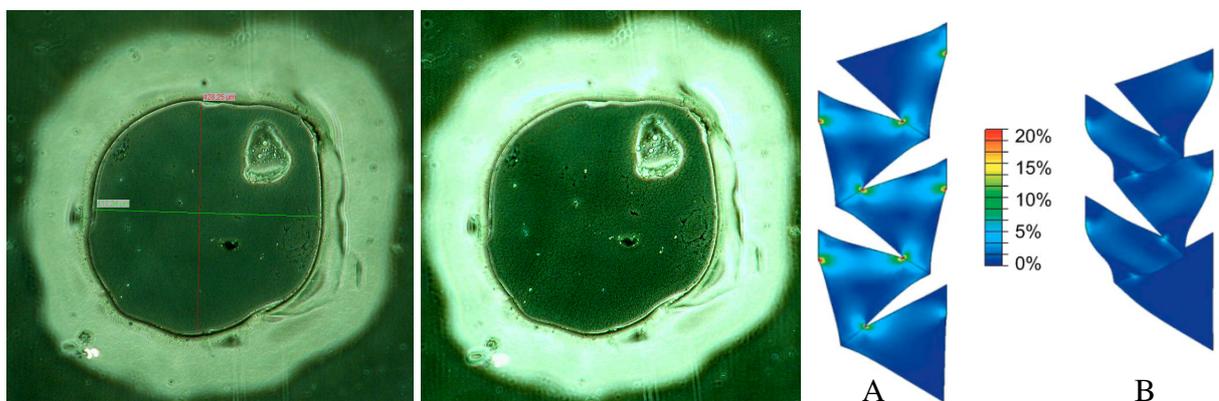


Abbildung 4.27: links: Elektrode 1 vor Beginn der zyklischen Langzeitdehnung, einzelne kleinere Risse in der Goldoberfläche sind erkennbar. mitte: Elektrode 1 nach 24 h zyklischer mechanischer Dehnung (1 Hz, 5%). Die gesamte Elektrodenoberfläche ist von feinverästelten Rissen durchzogen. rechts: Schema des perkolierenden Netzwerks von auf dem PDMS anhaftenden Goldfilmdomänen [94] **A:** unter 20%iger Dehnung; **B:** ungedehnt.

4.4.5 Test des dehnbaren ECIS-Slides

Als Proof-of-Concept wurde eine mit Zellen besiedelte dehnbare ECIS-Schale mechanisch gestresst. Hierbei sollte ermittelt werden, ob die Zellen weiterhin auf den Elektroden adhären und ob unter diesen Bedingungen die Verfolgung der Proliferation der Zellen möglich ist. Die mechanische Stimulation wurde bei geringerem Elektrodenbedeckungsgrad durchgeführt, damit ausgeschlossen werden kann, dass die Adhäsion über Zell-Zell-Kontakte bestehen bleibt.

Die flexible ECIS-Schale wurde über Nacht mit DMEM (10% FBS) equilibriert und die Impedanz der unbesiedelten Elektroden wurde bestimmt. Die Schale wurde zur 20%igen Konfluenz mit MC3T3-E1-Zellen ($2,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm²) in 5 ml Medium (DMEM, 10% FBS) besiedelt und gewogen. Nach 40 h wurde mittels der Apparatur aus Abbildung 4.12 eine zweistündige mechanische Stimulation durchgeführt (5%, 1 Hz). Nach 208 h wurde die ECIS-Schale erneut gewogen und der durch die Verdunstung des Mediums über den langen Kultivierungszeitraum aufgetretene Verlust wurde mittels eines Gemisches aus ddH₂O und Triton-X 100 ersetzt. Hierdurch sollte der Einfluss der Medienleitfähigkeit auf die EI nivelliert werden. Mittels des Triton-X 100 wurden die Zellen zur Messung der Impedanzen der unbesiedelten Elektroden abgetötet. Für die Elektroden 1, 2 und 4 entsprach der Endwert der EI nach zweistündiger mechanischer Dehnung jeweils ca. dem 1,05-fachen des Ausgangswerts und bestätigte qualitativ die in Abbildung 4.26 dargestellten Zusammenhänge. Die gegenüber der an einer unbesiedelten Schale gemessene geringere Zunahme der EI auf das 1,02-fache (Abbildung 4.26), könnte durch auf den Elektroden anhaftende Zelltrümmer oder adsorbierten Zell-Proteinen beruhen. Für Elektrode 3 betrug der Quotient 1,12, diese Elektrode wurde demnach durch die mechanische Beanspruchung stärker geschädigt.

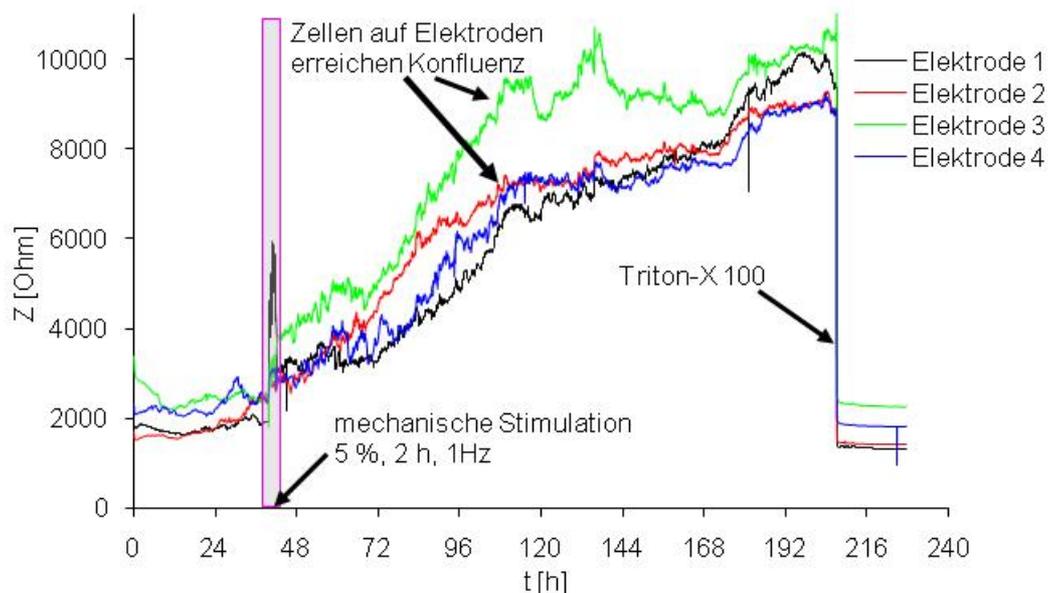


Abbildung 4.28: Signalverläufe der Besiedlung und Proliferation mit MC3T3-E1-Zellen ($2,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm²) für vier Elektroden in einer dehnbaren ECIS-Schale.

Alle verwendeten Elektroden waren geeignet den durch die Proliferation der MC3T3-E1-Zellen ansteigenden Bedeckungsgrad zu messen. Aufgrund der sehr geringen Ausbeuten bei der manuellen Herstellung der dehnbaren Slides und aufgrund der ungenügenden Reproduzierbarkeit der erhaltenen Elektrodenflächen bzw. Rundheit konnte der genaue Zusammenhang zwischen EI und Bedeckungsgrad nicht ermittelt werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Teil der Arbeit führte die Untersuchung des Sauerstoffeintrags von MembranSpinner-Systemen mit unterschiedlicher Anzahl und Länge der Membranen zu dem Ergebnis, dass der k_{La} -Wert von der inneren Gesamtoberfläche der Hohlfasern abhängt. Bei gleicher Oberfläche erwies sich die Toyobo-Membran als Membran mit dem höchsten effektiven Diffusionskoeffizienten. Der Ersatz der Oxyphanmembran im kommerziellen SuperSpinner von SSB durch die Toyobo-Membran könnte zu Systemen mit höheren k_{La} -Werten führen. Die maximale Länge und Anzahl der Membranen, die bei der industriellen Herstellung praktikabel ist, wird hier jedoch von fertigungstechnischen und wirtschaftlichen Faktoren abhängen. Der Vergleich des Einflusses der Sterilisierungsmethode auf die getesteten Membrantypen ergab, dass die Porenvolumina und k_{La} -Werte bei der γ -Bestrahlung weniger stark abnehmen (10-15 %) als beim Autoklavieren (30-50%). Zum Zeitpunkt der schriftlichen Niederlegung dieser Arbeit, wird der SuperSpinner neuerdings als Ethylenoxid-sterilisiertes *ready-to-use*-System in einer 1000 ml-Polycarbonatflasche vertrieben. Die für die getesteten Systeme ermittelten k_{La} -Werte und die theoretischen maximalen mit Sauerstoff versorgbaren Zellzahlen sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1: k_{La} -Werte der verschiedenen MembranSpinner und errechnete maximale Zelldichten, welche basierend auf einem Sauerstoffverbrauch von $1,7 \cdot 10^{-10}$ mmol/(Zelle·h) versorgt werden können

Typ		k_{La} -Wert [h ⁻¹]	Anzahl der Experimente	theoretische max. Zelldichte [10 ⁶ Zellen/ml]
SuperSpinner (SSB)	- unsteril	5,0	2	5,9
	- autoklaviert	2,3	3	2,7
	- γ -sterilisiert	4,6	1	5,4
Toyobo-Membran (20x60 cm)	- unsteril	14,1	9	16,6
	- autoklaviert	7,7	8	9,1
	- γ -sterilisiert	10,1	1	11,9
Accurel-Membran (3x110 cm)	- unsteril	7,1	2	8,4
	- autoklaviert	5,9	2	7,0
	- γ -sterilisiert	–	–	–
dynamische Oberflächenbegasung		2,0	3	2,3
250ml- (Techne-Fl.), 150ml Füllstand		7,9	2	9,3

Die Kultivierung von Maus Hybridomzellen in verschiedenen MembranSpinners zeigte, dass höhere k_{La} -Werte zu höheren Zelldichten führen können. Allerdings wurde bei Kultivierungen der Hybridomzellen in DMEM/HAM's F12 die maximale Zellzahl schon bei k_{La} -Werten über 2 h^{-1} durch Glutaminmangel limitiert. Die Wiederholung der Experimente unter Glutaminzufütterung verstärkte den Trend zu höheren Zelldichten bei höheren k_{La} -Werten. Die theoretisch berechneten maximalen Zelldichten konnten auch hier nicht erreicht werden. Unter optimalen Bedingungen ließen sich im

autoklavierten MembranSpinner mit 20x60 cm Toyobo-Membran theoretisch Zelldichten von $9,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreichen. In Standard-Spinnerflaschen ohne Membranbegasung wurden ähnliche $k_{L,a}$ -Werte, allerdings für ein deutlich geringeres Arbeitsvolumen gemessen. Somit könnte auf nahezu der gleichen Standfläche im Inkubationsschrank in einem Toyobo-MembranSpinner die sechsfache Zellmasse in Kultur gehalten werden. Der höchste $k_{L,a}$ -Wert eines sterilisierten MembranSpinners ($10,1 \text{ h}^{-1}$) wurde für das γ -bestrahlte System basierend auf der Toyobo-Membran gemessen. Unter optimierten Bedingungen könnten hierin $1,2 \cdot 10^7$ Zellen/ml versorgt werden, was einen Fortschritt gegenüber den Standard-Spinnerflaschen darstellen würde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein kostengünstiges ECIS-System auf der Basis eines Digitaloszilloskops aufgebaut. Die sichere Messung der Proliferationsinhibierung von Zellen zur in-vitro-Testung potenzieller Pharmawirkstoffe ist bei der Entwicklung neuer Zytostatika von größter Bedeutung. Aufgrund der reichhaltigen Bibliothek der Natur an potentiellen Wirkstoffen wie z.B. dem Ratjadon, welches ursprünglich aus dem Bodenorganismus *Sorangium cellulosum* isoliert wurde, sind hierzu kostengünstige Screeningsysteme vonnöten. Traditionelle Assays wie z.B. der MTT-Test bei dem die Anzahl lebender Zellen über den Umsatz von MTT in den Mitochondrien in ein, im solubilisierten Zustand, blaues Formazan kolorimetrisch bestimmt wird, ermöglichen nur Endpunktmessungen. Mittels des *electric cell substrate impedance sensings* ist eine zeitaufgelöste Verfolgung der Wirkung potentieller Zytostatika möglich.

Einfache ECIS-Systeme wie das von Roche kommerzialisierete xCELLigence[®]-System erlauben hierbei die Messung der Impedanzen zellbesiedelter Elektroden und darüber die Ermittlung von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen. Höherwertige Systeme wie z.B. das Ecis Z θ von Applied Biophysics erlauben außerdem Kapazitätsmessungen und bieten einen weiten Arbeitsfrequenzbereich. Mittels dieser Systeme können auch morphologische Parameter wie der Faltungsgrad der Zellmembran oder der mittlere Zellspaltdurchmesser adhären wachsender Zellschichten ermittelt werden und dadurch sogar der programmierte Zelltod, die Apoptose, labelfrei erkannt werden. Die für das ECIS nötigen Messkammern werden in Form von Einweg-Slides oder Einweg-Wellplatten zumeist vom Hersteller der Messsysteme angeboten und erlauben aufgrund der maschinellen Fertigung der Messkammern eine hohe Reproduzierbarkeit der Elektrodeneigenschaften und somit auch der Messung. Die höheren Kosten für die Einweg-Messkammern im Vergleich zum günstigen MTT-Assay werden aufgrund der Eignung der Messtechnik für High-Throughput-Screening und dem damit einhergehenden geringeren Personalaufwand wettgemacht. Die labelfreie Detektion erlaubt nicht-invasive, zeitaufgelöste Messungen.

Aufgrund des internen elektrischen Aufbaus des verwendeten Oszilloskops, ließ sich das System nicht für Kapazitätsmessungen im bei ECIS-Anwendungen interessanten Frequenzbereich um 40 kHz einsetzen. Das System wurde zunächst zur Ermittlung der Proliferationsinhibierung von drei Modellsubstanzen bezügl. der Modellzelllinien A549 und Saos2 eingesetzt. Als halbmaximal hemmende Konzentrationen (ECIS-IC₅₀) wurden für Tributylzinnhydrid, Ratjadon und α -Solanin 8,6

ng·ml⁻¹, 21,9 ng·ml⁻¹ und 1,7 µg·ml⁻¹ gefunden. Die Ergebnisse korrelierten gut mit dem zum Vergleich durchgeführten MTT-Test, welcher MTT-IC₅₀-Werte von 11,1 ng·ml⁻¹, 19,5 ng·ml⁻¹ und 4,0 µg·ml⁻¹ ergab. Für die Saos2-Zelllinie wurden ECIS-IC₅₀-Werte von 6,8 ng·ml⁻¹, 15,3 ng·ml⁻¹ und 1,2 µg·ml⁻¹ ermittelt, ebenfalls mit guter Vergleichbarkeit zu den Ergebnissen des MTT-Tests mit 7,9 ng·ml⁻¹, 14,1 ng·ml⁻¹ und 1,2 µg·ml⁻¹.

Im zweiten Abschnitt der Arbeiten am ECIS-System wurden Methoden zur Herstellung dehnbarer ECIS-Slides untersucht. Trotz der vielseitigen Einsetzbarkeit der ECIS-Messtechnik zur Untersuchung der Wirkung chemischer, biologischer oder physikalischer Stimuli auf adhärent wachsende Zellschichten war es bislang nicht möglich den Einfluss mechanischer Dehnung auf Zellschichten mittels ECIS zu untersuchen. Dieser Parameter ist z.B. von Interesse bei der Untersuchung des Differenzierungsverhaltens und den damit einhergehenden morphologischen Veränderungen von Stammzellen unter mechanischem Stress. Ein weiteres aktives Forschungsgebiet ist die Untersuchung der Wirkung der, in immer mehr Produkten Verbreitung findenden, Nanopartikel auf menschliche Zellen. Der Effekt des mechanischen Stresses auf die Zellen, beispielsweise beim Auftragen von Titandioxid-Nanopartikel-haltigen Sonnencremes auf die Haut wird hierbei jedoch vernachlässigt.

Zum Aufbau dehnbarer Elektrodenstrukturen wurden zunächst Metallpulver-Silikon-Komposite eingesetzt. Die impedanzspektroskopische Charakterisierung von Gold-Silikon-Kompositelektroden ergab eine für ECIS-Messungen ungeeignete dreidimensionale, fraktale Oberfläche der Elektroden, welche durch REM-Aufnahmen besiedelter Elektroden bestätigt wurde. Die Untersuchung der Abhängigkeit der Elektrodenimpedanz vom Dehnungsgrad im Bereich von 0-10 % ergab einen diskontinuierlichen Signalverlauf, welcher mutmaßlich durch die statistische Natur der Gold-Partikel-Kontakte, welche die makroskopische Leitfähigkeit des gefüllten Silikons bedingen, verursacht wurde. Weiterhin wurden dehbare Goldmikroelektroden nach der Technik von Lacour *et al.* aufgebaut. Hierzu wurden mittels Lithographie Golddünnschichten auf Silikonmembranen aufgebracht. Die Elektrodenstrukturen wurden mittels *Spin-Coating* und Belichtung photostrukturierbaren Silikons definiert. Die einzelnen Einflussparameter der Herstellung wurden untersucht und bezüglich der Auflösung der Elektrodenstruktur und Elektrodengröße optimiert. Die erhaltenen Ausbeuten an verwendbaren dehnbaren ECIS-Slides lagen mit dem optimierten Protokoll im Bereich von nur 10 %. Nach diesem Protokoll hergestellte Slides wurden impedanzspektroskopisch charakterisiert. Hierbei wiesen die nach dem Protokoll von Lacour hergestellten Goldmikroelektroden zu den kommerziell erhältlichen ECIS-Slides vergleichbare Eigenschaften bezüglich der spezifischen Elektrodenkapazitäten und Oberflächenrauigkeit auf. Analog zu den Gold-Silikon-Kompositelektroden wurde der Einfluss linearer mechanischer Dehnung von 0-10 % auf die Elektroden untersucht. Hier wurde im Gegensatz zu den Komposit-Elektroden ein stetiger Anstieg der Elektrodenimpedanzen ermittelt. Im Langzeittest bei 5%iger-Dehnung zeigten drei von vier Elektroden eine gleichmäßige Degradation, welche durch die Ausbildung von Mikrorissen in der Elektrodenfläche verursacht wird. Dieses Phänomen könnte durch den Einsatz höherwertiger Lithographietechniken in Verbindung mit der

Aufbringung von 5 nm Chrom- bzw. Titanadhäsionsschichten als Haftvermittler zwischen Silikon und Gold stark herabgesetzt werden. Zudem würden hierdurch wesentlich höhere Ausbeuten bei der Herstellung der dehnbaren ECIS-Slides möglich.

In einem finalen *Proof-of-Concept* wurde gezeigt, dass mittels dehnbare Goldmikroelektroden die Zunahme des Elektrodenbedeckungsgrads bei der Kultivierung von MC3T3-Zellen unter während der Messung applizierter mechanischer Dehnung (5%, 1 Hz) qualitativ verfolgt werden kann. Der genaue Zusammenhang zwischen Bedeckungsgrad und Elektrodenimpedanz konnte jedoch aufgrund der geringen Ausbeuten bei der Herstellung der Slides und der geringen Reproduzierbarkeit der Elektrodengröße und -Form nicht ermittelt werden. Auch hier würde der Einsatz hochwertigerer Lithographietechnik zu einer verbesserten Reproduzierbarkeit führen.

6 Anhang

6.1 Ergebnisse

6.1.1 BJH-Messungen

Zur Untersuchung des Einflusses der Sterilisationsmethode auf die Sauerstoff-transfercharakteristika der Membran-Spinnerysteme wurden BJH-Messungen (Barret, Joyner, Halenda) an 5 mm langen Membranabschnitten vor und nach der Sterilisation durch Autoklavieren bzw. vor und nach γ -Bestrahlung (25 kGy) durchgeführt. Die PWV der einzelnen Membrantypen sind in der folgenden Abbildung 5.1 dargestellt.

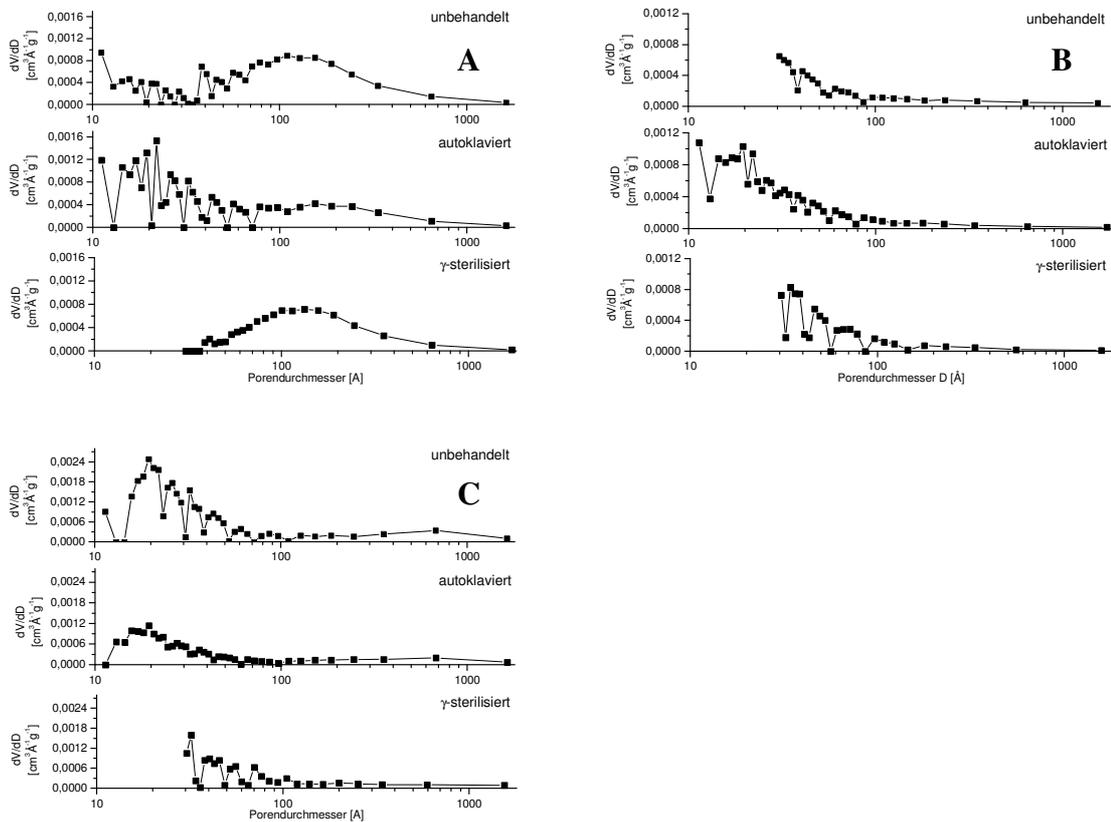


Abbildung 6.1: Porenweitenverteilung sterilisierter und unsterilisierter Hohlfasermembranen, bestimmt nach der BJH-Methode. A Toyobo; B Accurel; C Oxyphan

6.1.2 Tests des CO₂-Sensors Capnostat 5

Bei dem Capnostat 5-CO₂-Sensor (Respironics, USA) handelt sich um ein Sensorsystem zur Aufnahme von Respirationen in der Intensivmedizin. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das System erstmals zur Abgasanalytik an Bioreaktoren eingesetzt. Der Sensor besteht aus einer Einweg-Durchflussskammer und einer wiederverwendbaren Messzelle (siehe Abbildung 6.2). Die Messzelle ist mit einer Widerstandsheizung ausgestattet, welche eine Kondensation von Wasserdampf auf den Fenstern der Durchflussskammer verhindert.

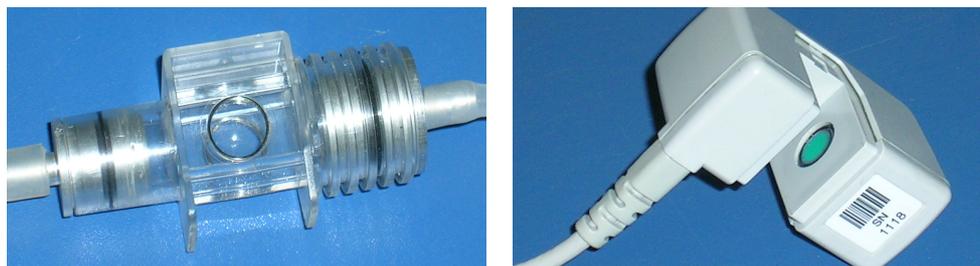


Abbildung 6.2: Durchflussskammer (links) und Messzelle (rechts) des Capnostat 5

Das Messprinzip beruht auf der intensiven Absorption der Fundamentalschwingungen von CO₂ in Bereichen des mittleren Infrarots. Das Licht wird durch die Durchflussskammer gestrahlt, die sich direkt im Abgasweg eines Bioreaktors befindet. Ein Photodetektor vermisst die verbleibende Strahlungsintensität. Die Abnahme der Intensität hängt direkt vom CO₂-Partialdruck ab. Die Intensitätsmessung wird mittels einer parallelen Messung bei einer Wellenlänge, bei der CO₂ nicht absorbiert, referenziert. Durch diese Referenzierung wird die Messung unabhängig von der Umgebungstemperatur und der Alterung von Strahlungsquelle und Photodetektor. Um die Messgenauigkeit des Capnostat 5-CO₂-Sensors zu untersuchen, wurden mit Hilfe von zwei Massendurchflussreglern stufenweise verschiedene Gemische von CO₂ und Druckluft eingestellt. Die CO₂-Konzentration wurde mit dem Capnostat 5 gemessen. Als Referenzmessgerät wurde ein etabliertes System von Sick-Maihak (S710) verwendet, dessen Messprinzip ebenfalls auf Infrarotabsorption beruht. Das erhaltene Stufenprofil ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Die Reaktionszeit des Sensors ist sehr schnell, die Einstellung auf die neue CO₂-Konzentration erfolgt nach wenigen Sekunden. Die Abweichung der Steigung von eins in der Auftragung der Signale beider Systeme gegeneinander lässt sich durch einen generellen Unterschied beider Systeme erklären. Das Capnostat 5-System vermisst das Analysengas bei dem im Abgasweg und damit in der Durchflussskammer vorherrschenden Druck, das System von Sick Maihak entspannt das Analysengas vor der Messung bis auf Atmosphärendruck. Die Messung mit dem Capnostat 5 System muss also entweder mit einem Drucksensor referenziert werden oder der Messaufbau sollte dazu führen, dass in der Messzelle immer Atmosphärendruck vorherrscht.

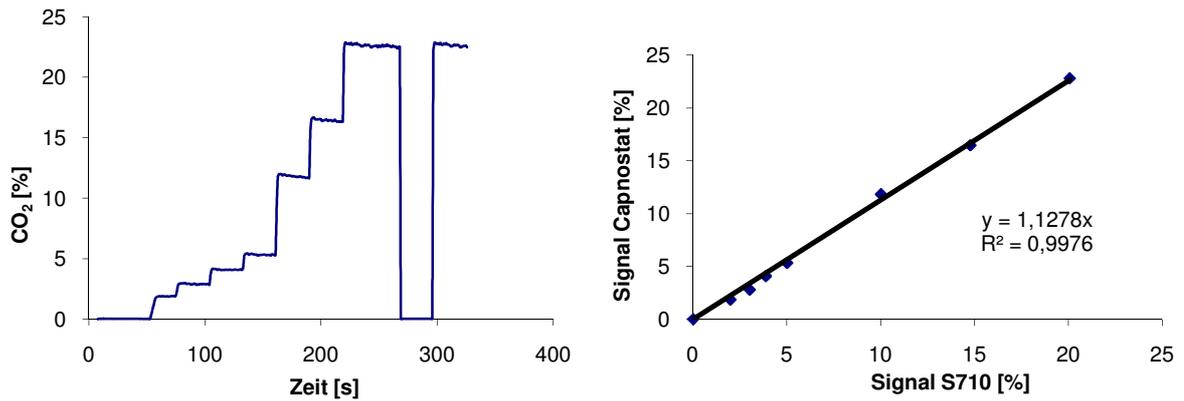


Abbildung 6.3: links: CO₂-Stufenprofil, aufgenommen mit dem Capnostat 5-System; rechts: Auftragung der Signale des Capnostat 5-Systems gegen Messwerte des Referenzgeräts S710 (Sick Maihak)

6.1.3 Hybridomzellkultivierung im Spinner (Glutamin-fed-batch)

Bei der Kultivierung von Maus-Hybridomzellen der Linie IV F19.23 in einer Standard-Spinnerflasche (250ml, Techne) unter fed-batch-Bedingungen (Zugabe von 600 mg·l⁻¹ Glutamin bei ca. 95 h) wurden folgende Verläufe gemessen:

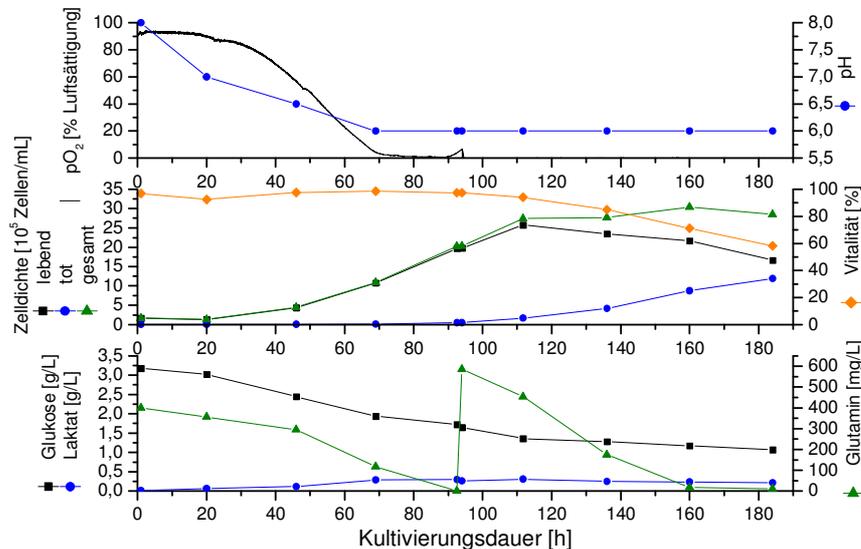


Abbildung 6.4: Hybridomzellkultivierung im 250 ml-Spinner mit 150 ml Kulturvolumen unter fed-batch-Bedingungen.

6.1.4 ECIS-Messungen zur Durchführung von Zytotoxizitätstests

In den folgenden Abbildungen sind die Impedanzverläufe bei 4kHz aus den Experimenten zur Untersuchung der Zytotoxizität von α -Solanin, Tributylzinn und Ratjadon bezüglich der Zelllinien A549 und Saos-2 dargestellt. Die Impedanz wurde hierbei auf die Impedanz der unbesiedelten Elektrode normiert. Zur Beseitigung der durch die Mikromotilität der Zellen auftretenden Signalschwankungen [48] sind die Daten in Form eines gleitenden Mittelwertes dargestellt (n=10 entsprechend 20 min). In den ersten 2 h finden bei den A549-Zellen die Adhäsion und das Spreiten auf den Fibronectin-beschichteten Elektroden statt. Bei den Saos2-Zellen dauert dieser Vorgang ca. 4 h.

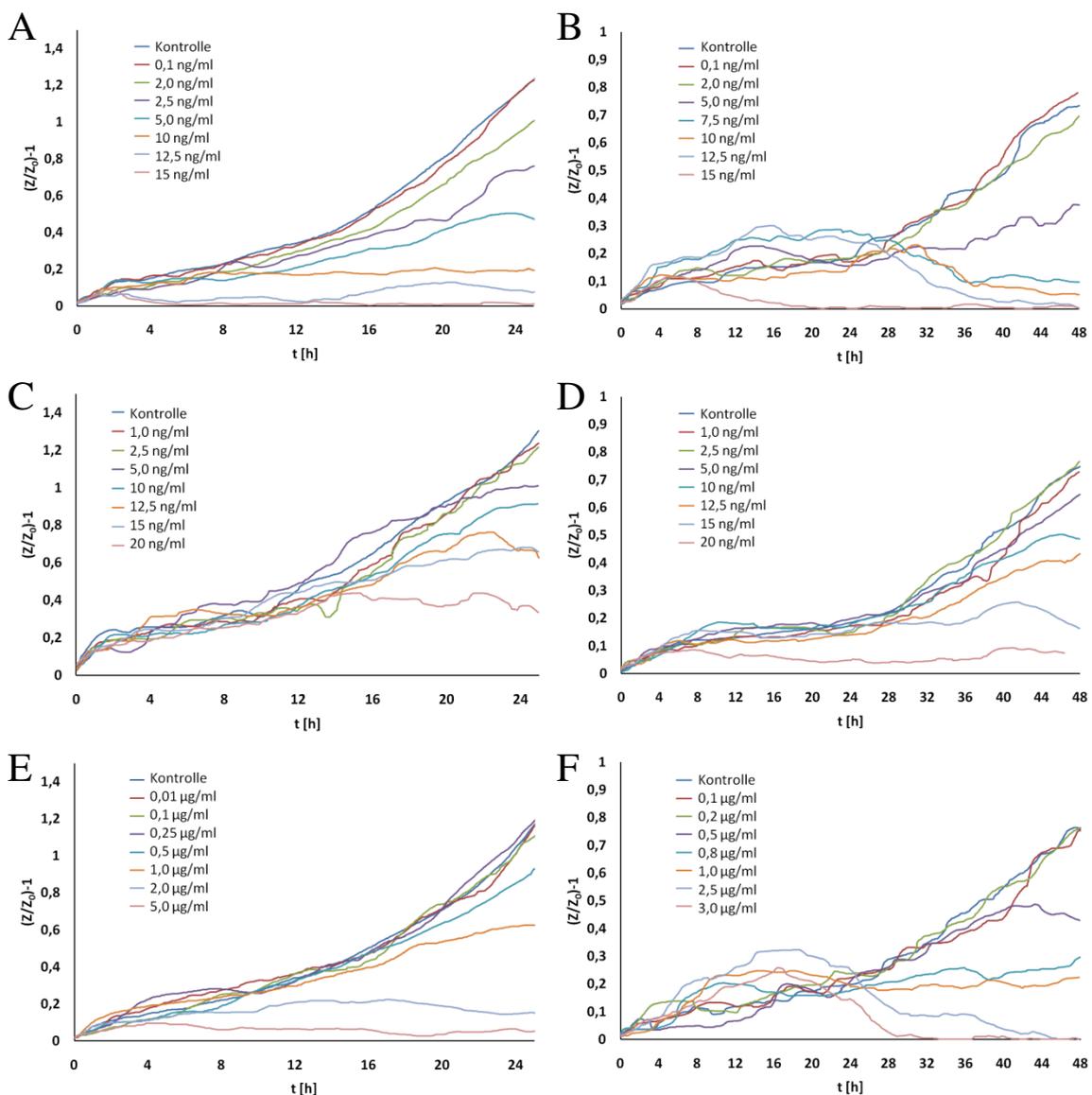


Abbildung 6.5: Normierte Verläufe der Impedanz bei 4kHz. **A:** Tributylzinnhydrid-A549; **B:** Tributylzinnhydrid-Saos2; **C:** Ratjadon-A549; **D:** Ratjadon-Saos2; **E:** α -Solanin-A549; **F:** α -Solanin Saos-2

6.2 Methoden

6.2.1 Bestimmung des $k_L a$ -Werts nach der Sulfit-Methode

Zur Bestimmung des volumetrischen Sauerstoffübergangskoeffizienten, des $k_L a$ -Wertes in den hohlfaserbasierten Begasungssystemen bzw. den Spinnerflaschen wird folgende Stoffübergangsgleichung herangezogen :

$$OTR = k_L \cdot a \cdot (c_S - c_L) \quad (6.1)$$

Mit:	OTR	Sauerstoffübergangsrate
	k_L	Übergangskoeffizient
	a	Grenzfläche zwischen Gas und Flüssigkeit
	c_L	O ₂ -Konzentration in der Lösung
	c_S	O ₂ -Sättigungskonzentration in Lösung

Die Gleichung lässt sich aus der Betrachtung des Sauerstoffübergangs im Bioreaktor nach dem Zweifilmmmodell ableiten [108]. Nach der Prandtl'schen Theorie existiert auf jeder Seite der Grenzfläche zwischen den beiden Phasen ein dünner Film, durch den der Stofftransport ausschließlich durch Diffusion erfolgt (s. Abbildung 6.6). An der Phasengrenze befindet sich die übergehende Komponente im Gleichgewicht mit der jeweiligen Phase. Des Weiteren ist die Konzentration der übergehenden Komponente innerhalb jeder Kernphase durch vollständige Vermischung konstant.

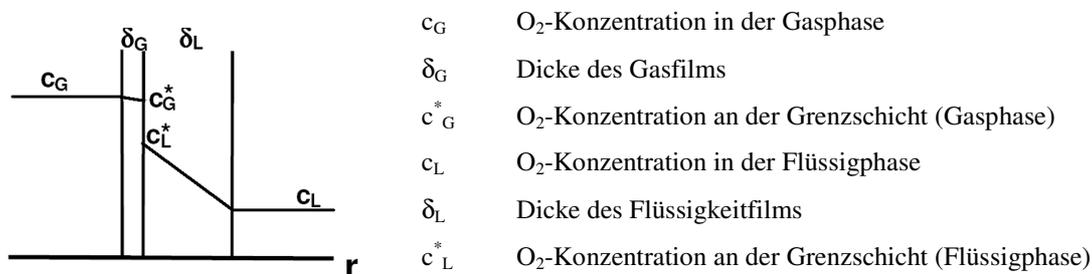


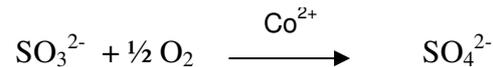
Abbildung 6.6: Sauerstoffübergang an Phasengrenzen [109]

Geschwindigkeitsbestimmend für den Sauerstoffübergang ist die Diffusion durch die beiden Grenzschichten. Die Dicke des Flüssigkeitsfilm δ_L ist sehr viel größer als die Dicke des Gasfilms δ_G und der Diffusionskoeffizient im Gasfilm viel größer als im Flüssigfilm. Daher kann als treibende Kraft des Sauerstofftransports die Differenz zwischen der Sauerstoffkonzentration an der Grenzschicht c_L^* , die der Sättigungskonzentration c_S entspricht, und der Sauerstoffkonzentration in der Lösung c_L angenommen werden. c_S wird durch das Henrysche Gesetz beschrieben. Für ein ideales Gas hängt der Henrykoeffizient hauptsächlich von der Temperatur ab, es gilt:

$$c_G^* = c_S \cdot He(T) \quad (6.2)$$

Mit:	c_S	Sättigungskonzentration
	He	Henrykoeffizient
	T	Temperatur

Zur Bestimmung des k_{La} -Werts nach der Sulfitmethode wird eine 0,5%ige Natriumsulfit-Lösung in 12 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8) im zu untersuchen System begast. Die Oxidation von Sulfit zu Sulfat erfolgt unter Katalyse durch Cobaltnitrat (10^{-7} mol/L).



Die Oxidation von Sulfit verläuft sehr viel schneller als die Diffusion von Sauerstoff in die Lösung. Solange die Lösung Sulfit enthält, bleibt der Sauerstoffgehalt daher bei null. Erst nach vollständiger Oxidation des Sulfits steigt der Sauerstoffgehalt der Lösung. Der Sauerstoffgehalt der Lösung wird hierbei mit einem optischen Sensor der Firma Presens (Regensburg) verfolgt. Aus der Zeit von Beginn der Begasung bis zum Anstieg der Sauerstoffkonzentration, lässt sich die Sauerstoffübergangsrate und damit nach Gleichung (6.1) der k_{La} -Wert berechnen. Die Messungen werden im Inkubator bei 37 °C durchgeführt, die Rührgeschwindigkeit beträgt 40 rpm. Die Sauerstoffsättigungskonzentration bei dieser Temperatur beträgt $6,9 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

6.2.2 BJH-Messung

Die BJH-Messung (Barret, Joyner, Halenda) dient zur Bestimmung des totalen Poren-volumens und der Porenweitenverteilung. Die Probe wird hierzu im Hochvakuum auf -178°C abgekühlt. Dann wird kontinuierlich das Analysengas Stickstoff zugeführt. Die Erfassung der adsorbierten Gasmenge als Funktion des Druckes bei konstanter Temperatur liefert die Adsorptionsisotherme. Nach erfolgtem Druckausgleich wird das Analysengas schrittweise entfernt. Man erhält die Desorptionsisotherme. Aus den Isothermen lassen u.a. das totale Porenvolumen und die Porenweitenverteilung der Probe bestimmen.

6.2.3 Berechnung der spezifischen Produktbildungsrate

Die spezifische Produktbildungsrate r_{IgG} entspricht der zeitlichen Änderung der Konzentration pro Zeiteinheit geteilt durch die Zelldichte.

$$r_{IgG} = \frac{1}{N_{L,2}} \frac{c_{IgG,2} - c_{IgG,1}}{t_2 - t_1} \quad (6.3)$$

$N_{L,2}$ = lebend-Zelldichte zum Zeitpunkt t_2

$c_{IgG,1}, c_{IgG,2}$ = IgG-Konzentration zum Zeitpunkt t_1 bzw. t_2

6.2.4 Maximale mit Sauerstoff zu versorgende Zelldichte

Die maximale Zellzahl ist dann erreicht, wenn die Sauerstoffaufnahme der Zellen (OUR) gleich der Sauerstofftransportrate in das Medium (OTR) ist. Es gilt:

$$OUR = r_{O_2} \cdot N_{\max} = k_L a \cdot (c_s - c_t) = OTR \quad (6.4)$$

bzw.:

$$N_{\max} = \frac{k_L a (c_s - c_t)}{r_{O_2}} \quad (6.5)$$

r_{O_2} = spezifischer Sauerstoffverbrauch

N_{\max} = maximale Zelldichte die mit Sauerstoff versorgt werden kann

c_s = Sauerstoffsättigungskonzentration

c_t = Sauerstoffkonzentration zur Zeit t

6.2.5 Durchführung von ECIS-Messungen für Zytotoxizitätstests

Zur Durchführung von ECIS-Messungen werden die acht Kavitäten eines 8W1E-Slides (s. Abschnitt 6.5.1) zunächst mit je 100 μ l Fibronectin-Lösung (0,1 mg·ml⁻¹ in PBS) befüllt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Hierbei adsorbiert das Fibronectin über seine Thiolgruppen an der Goldoberfläche der Elektroden. Die Vorbehandlung der Elektroden erhöht in ECIS-Experiment die Reproduzierbarkeit der Zelladhäsion [71]. Anschließend wird die Fibronectin-Lösung abgezogen und jede Kavität wird dreimal mit 200 μ l PBS gewaschen. Die Kavitäten werden mit je 200 μ l DMEM mit 10% FBS befüllt und in den CO₂-Inkubator in die Slidehalterung (Abbildung 4.2) eingesetzt (37°C, 5% CO₂). Nach 60 min wird für alle acht Elektroden die Impedanz bei 4kHz ohne Zellen gemessen (Z₀), hierzu werden je

10 Messwerte aufgenommen und gemittelt. Parallel zur Vorbereitung der Slides werden die jeweilig zu testenden Zellen aus einer subkonfluenten T-Flasche trypsiniert, gezählt, zentrifugiert und mit DMEM mit 10% FBS auf eine Zelldichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml (Saos-2) bzw. $6,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml (A549) eingestellt. Das Medium wird aus den Kavitäten des Slides abgezogen, 100 μ l der Zellsuspension werden in jede Kavität pipettiert, anschließend werden 200 μ l der jeweiligen Testlösung in der jeweiligen Konzentration hinzupipettiert. Zur Durchmischung von Zellsuspension und Testlösung wird mittels einer 1ml-Eppendorfpipette zweimal invertiert. Als Kontroll-Experiment wird jeweils in Kavität #1 des 8W1E-Slides das zum Ansetzen der Testsubstanz verwendete reine Lösemittel eingesetzt. Der Anteil des Lösemittels beträgt in jedem Well 1% (v/v). Für Tributylzinnhydrid und α -Solanin wird DMSO, für Ratjadon wird Methanol als Lösemittel eingesetzt. Nach dem Befüllen des Slides mit Zellen und Testlösungen wird die Messung gestartet. Die Impedanz wird bei 4kHz mit einem Messintervall von 2 min/Well aufgezeichnet. Die Experimentdauer für A549-Zellen betrug 24 h, bei den Experimenten mit SAOS-2 Zellen wurden über 48 h Daten aufgezeichnet.

6.2.6 Elektrochemische Vergoldung von Silbersilikon Elektroden

Die potentiostatische Abscheidung von Gold wird in einer elektrochemischen Zelle mit Drei-Elektroden-Anordnung durchgeführt. Dabei dient ein Platindraht als Gegenelektrode und die mit Gold zu beschichtende Elektrode der Schale fungierte als Arbeitselektrode. Als Referenzelektrode (Radiometer Analytical XR 300) wird eine Ag/AgCl-Elektrode eingesetzt gegen die ein Potential von -0,7 V zur Abscheidung von Gold angelegt wird (AMEL Instruments MOD. 7050). Die Abscheidung erfolgt aus einer Lösung, die 0,24 g HAuCl_4 , 0,605 ml HClO_4 und 69,5 ml ultrareines Wasser enthält. Die Abscheidungszeit lag bei 50 s.

6.2.7 Zellkultur

Alle verwendeten Lösungen, Flaschen und Pipettenspitzen werden vor Gebrauch autoklaviert (30 min, 121 °C, 3 bar). Medien und frisch angesetzte Lösungen werden sterilfiltriert. Alle Lösungen und Medien werden bei 4 °C gelagert und vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Alle verwendeten Zelllinien werden bei 37°C und 5%- CO_2 -Atmosphäre kultiviert.

Auftauen von Zellen

Ein Kryoröhrchen mit konservierten Zellen wird im Wasserbad bei 37 °C angetaut. Nach dem vollständigen Auftauen werden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und 3 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Adhärenz wachsenden Zellen werden in 20 ml Medium aufgenommen und in T-Flaschen (75cm²) bei 37°C und 5%-CO₂-Atmosphäre kultiviert. Suspensionszelllinien werden in 50 ml Medium resuspendiert und in Spinnerflaschen bei 25 rpm unter gleichen Bedingungen kultiviert. Vor der Verwendung der Zellen für Experimente werden die Zellen für eine Woche in Kultur gehalten.

Passagieren von Zellen

Adhärenz wachsende Zelllinien werden bei ca. 90%iger Konfluenz passagiert. Hierzu wird das Medium aus der Kulturflasche abgezogen, die Zellen werden mit 5 ml PBS-Lösung gewaschen und mit 1 ml Trypsin-Lsg. für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen werden in 9 ml des jeweiligen Mediums aufgenommen, 2 ml entsprechend einem Splitverhältnis von 5:1 werden zusammen mit 18 ml Medium zurück in die T-Flasche gegeben und bei 37°C und 5%-CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach drei Passagen wird in einer neuen Kulturflasche kultiviert. Bei Erreichen der 20ten Passage werden die Zellen verworfen und es werden neue Zellen aus der Arbeitszellbank aufgetaut. Suspensionszellen werden zur Kulturhaltung bei Erreichen einer Zelldichte von 1,5·10⁶ Zellen/ml im Verhältnis 3:1 gesplittet.

Zellzahlbestimmung

100 µl Probe wurden 1:1 mit einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung gemischt. Der Farbstoff permeiert die defekte Zellmembran toter Zellen, sodass eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen möglich ist. Die Zellsuspension wird in eine Neubauerzählkammer pipettiert und unter einem Phasenkontrastmikroskop (Olympus, 200x Vergrößerung) ausgezählt. Zur Fehlerminimierung, wird aus vier Zählungen der Mittelwert gebildet. Die Berechnung der Zelldichte und der Vitalität erfolgt nach den Gleichungen:

$$\text{Zelldichte} \frac{\boxed{\text{Zellen}}}{\boxed{\text{mL}}} = \frac{\boxed{\text{Zellzahl}}}{\boxed{\text{Anzahl der Großquadrate}}} \cdot 2 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1} \quad (6.6)$$

$$\text{Vitalität} [\%] = \frac{\boxed{\text{Gesamtzellzahl}}}{\boxed{\text{lebende Zellen}}} \cdot 100\% \quad (6.7)$$

6.2.8 Offline-Analytik

Aminosäure HPLC

Die Konzentrationen der Aminosäuren Glutamin und Glutamat im Kulturüberstand wurden mittels RP-HPLC (C18 Säule, 5 μ m, 3,9x150 mm, Waters) ermittelt. Zuvor wurden die Aminosäuren mit Ortho-Phtaldialdehyd (OPA) derivatisiert.

Zur Fällung störender Proteine wurden 100 μ l zellfreier Kulturüberstand in 400 μ l eiskaltes Methanol gegeben. Durch 24-stündiges Lagern bei -20 °C wurde die Fällung vervollständigt. Die ausgefällten Proteine wurden abzentrifugiert (1000 g, 3 min) und der Überstand mit Boratpuffer verdünnt (pH 10).

Laufbedingungen: Flussrate 1 ml/min; 30 °C
 Detektion: Fluoreszenzdetektor RF-10AxL (Shimadzu, Duisburg)
 bei Ex 330/ Em 420 nm

DAPI-Färbung

Das Medium wurde vorsichtig von Zellen abgenommen. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurde mit 500 μ l Ethanol (100% eisgekühlt) bedeckt und 30 min im Eisfach gelagert. Das Ethanol wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe 200 μ l DAPI-Lösung und die Zellen wurden 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Abnahme der Lösung wurde dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop untersucht und das Ergebnis mit einer Digitalkamera dokumentiert.

Ethanolmessung

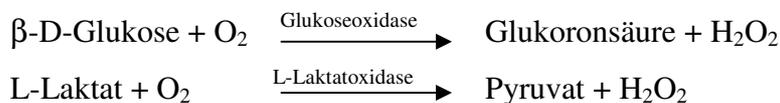
Die Messung des Ethanolgehalts erfolgte am Gaschromatographen (GC-14 b, Shimadzu, Japan). Den Messungen ging eine Zweipunkt-Kalibration mit 1 g/L und 10 g/L Ethanollösung voraus. Die Einstellungen und technischen Daten des Geräts sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Tabelle 6.1: Einstellungen und technische Daten des Gaschromatographen

Interner Standard	n-Propanol (8 g/L)
Einspritzvolumen	0,5 ml
Laufzeit	10 min
Säule	Chromosorb 101, 80/100, 6'x18
Detektor	Flammenionisationsdetektor
Starttemperatur	70 °C
Heizrate	10 °C/min
Endtemperatur	170 °C

Glukose-/ Laktatbestimmung

Die Messung der Glukose- und Laktatkonzentrationen erfolgt mit dem *YSI 2700 select* (Yellow Springs Instruments, USA). Sie basiert auf folgenden enzymatisch katalysierten Reaktionen:



Das entstehende Wasserstoffperoxid wird an einer Platinelektrode oxidiert. Die entstehende Spannung, gemessen gegen eine Silber/Silberchloridelektrode, ist proportional zur Konzentration der Analyten.

IgG-Messung

Die Messung der Antikörperkonzentration erfolgt mit Hilfe des Mouse-IgG ELISA der Firma Roche Applied Science. Alle in dem Kit enthaltenen Reagenzien werden nach Anleitung verdünnt und gelagert. Die Durchführung erfolgt nach einem Standardsandwich-ELISA-Protokoll. Jede Inkubation wird auf einem Schüttler bei 700 rpm und Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wird eine 96-Loch-Platte mit einem polyklonalen Antikörper gegen die Fc-Region von Maus-IgG beschichtet. Dazu werden 50 μl Antikörper-Lösung in jede Vertiefung gegeben und 30 min inkubiert. Die Lösung wird entfernt und die Platte auf einem Tuch trocken geschlagen. Anschließend wird dreimal mit je 200 μl Wasch-Lösung für je 15 s gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, erfolgt die Zugabe von 200 μl Block-Lösung in jede Vertiefung. Nach 15 min Inkubation wird die Lösung entfernt, die Platte getrocknet und wieder dreimal gewaschen. Es erfolgt die Zugabe von 50 μl Probe bzw. Standardlösung. Anschließend wird 30 min inkubiert. In dieser Zeit wird der in der Probe vorhandene Antikörper an den auf der Platte immobilisierten Antikörper gebunden. Die Lösung wird entfernt, die Platte getrocknet und anschließend dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen. Es erfolgt die Zugabe von 50 μl einer Mischung aus Anti-Maus- κ - und Anti-Maus- λ -Antikörpern, die Peroxidase konjugiert sind. Diese Antikörper binden im Gegensatz zum immobilisierten Antikörper nicht an der Fc-Region, sondern an das Fab-Fragment. Die Inkubationszeit beträgt 30 min. Die Platte wird wiederum gewaschen und getrocknet. Um den gebundenen Antikörper sichtbar zu machen, wird 50 μl Substrat-Lösung hinzugegeben und 30 min inkubiert. Die Substrat-Lösung enthält den Farbstoff 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure) (ABTS). Die Oxidation des farblosen ABTS wird durch die Peroxidase katalysiert. Es entsteht ein grün gefärbtes konjugiertes System, welches photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm quantifiziert wird.

MTT-Test für Zytotoxizitätsuntersuchungen

Die Viabilität von Zellen lässt sich anhand der Aktivität mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen bestimmen. Lebende, stoffwechselaktive Zellen sind fähig, die wasserlösliche gelbe Verbindung MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoniumbromid) zu einem blau-

violetten wasserunlöslichen Formazan-Komplex zu reduzieren. MTT dringt in die Zellen ein, sein Tetrazoliumring wird durch die Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgebrochen. Gebildet wird der blau-violette Formazan-Komplex. Abhängig von der Viabilität und Anzahl der lebenden Zellen wird der Farbstoff von den Mitochondrien unterschiedlich schnell umgesetzt. Die Solubilisierungslösung SDS lysiert die Zellen und Formazan wird freigesetzt. Die Intensität der alkoholischen Formazanlösung wird photometrisch bestimmt. Das erhaltene Signal kann als Maß der Viabilität der Zellen angenommen werden.

96-Loch-Platten wurden mit der entsprechenden Zellzahl angeimpft und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird das Medium abgenommen und Lösungen mit entsprechenden Konzentrationen des Zellgiftes in 200 µl Medium zugegeben. Als Blindprobe wurden 200 µl Medium mit dem für das Zellgift verwendeten Lösungsmittel verwendet. Jedes Experiment wird mit 5 Replikaten durchgeführt. Zum entsprechenden Zeitpunkt wurde das Medium abgenommen und in jede Kavität 10 µL MTT-Lösung und 100 µl Medium gegeben. Nach 4 h Inkubation wurden 100 µl der Solubilisierungslösung (1 g Natriumdodecylsulfat (SDS) in 10 ml 0,01 M HCl, sterilfiltriert) zugegeben. Über Nacht wurde bei 37 °C inkubiert, dabei gehen die Formazan-Kristalle in Lösung. Es folgte eine Absorptionmessung der Lösung bei 570 nm gegen 630 nm als Referenz im Immunoreader.

MTT-Test als Besiedlungsassay

Die Besiedlung der Membranen mit Hybridomzellen wurde mittels MTT-Test untersucht. Es wurden etwa 1 cm lange Membran-Stücke autoklaviert, anschließend wurden je 4-5 Membranstücke pro Vertiefung in einer 24-Loch-Platte über Nacht in Medium eingelegt. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und pro Vertiefung 250 µL Zellsuspension mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml zugegeben. Für die Blindproben wurden 250 µL reines Medium zugegeben. Die 24-Loch-Platte wurde bei 37°C und 5 % CO₂ eine halbe Stunde bei 370 rpm geschüttelt. Nach weiteren 2 Stunden wurde in jede Vertiefung 750 µl Medium zugesetzt. Nach sieben Tagen Inkubation (200 rpm, 37 °C, 5 % CO₂) wurde das Medium mit nicht adhärierenden Zellen abgenommen und die Membranen in eine frische 24-Loch-Platte umgesetzt. In jede Vertiefung wurde 1 ml einer Lösung aus 100 µL MTT auf 1 ml Medium zugegeben. Nach 4 h Inkubation wurde 1 ml Solubilisierungslösung in jede Vertiefung gegeben. Über Nacht wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, wobei die Formazan-Kristalle in Lösung gingen. 200µl der Lösungen wurden in eine 96-Loch-Platte überführt. Die Absorption des Formazans wurde bei 570 nm gegen 630 nm als Referenzsignal im Immunoreader gemessen.

Probenvorbereitung für REM-Aufnahmen

Zur Anfertigung rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen zellbewachsener Gold-Silikon-Elektroden wurde der besiedelte ECIS-Slide nach Entfernen des Mediums 3x mit PBS gewaschen und

über Nacht in Karnovsky-Puffer bei 4°C fixiert. Der Slide wurde mit Cacodylat-Puffer (0,2 M in ddH₂O, pH 7,3) gewaschen. Anschließend wurden die fixierten Zellen im Slide durch 15-minütiges Überschichten bei Raumtemperatur mit Aceton/Wassergemischen ansteigender Acetonkonzentration (10%, 25%, 50%, 75%, 100% (v/v)) entwässert. Nach der Entwässerung wurde mittels eines Skalpell ein ca. 3x3x1mm³ großer Schnitt um die ECIS-Elektrode geführt. Die Probe wurde von Frau Yvonne Stark an einem JEOL JSM-6700F Rasterelektronenmikroskop vermessen.

6.3 Medien und Puffer

6.3.1 Zellkultur

DMEM/HAM's F12

Die DMEM/HAM's F12-Zubereitung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) wird nach der Herstellerangabe in ddH₂O gelöst. Nach Zugabe von 2,1 g/L NaHCO₃ wird der pH-Wert mit 1N Salzsäure auf 7,2 eingestellt und das Medium sterilfiltriert. Für die Kultur der Zellen, wird das Medium mit 5% (v/v) Pferde Serum und 1% (v/v) Antibiotika (1000 Units/ml Penicillin G und 0,1 mg·ml⁻¹ Streptomycin) versetzt.

DMEM mit 10% FBS

Die DMEM-Zubereitung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) wird nach der Herstellerangabe in 10L ddH₂O gelöst, es werden 37 g NaHCO₃ zugegeben, der pH-Wert wird mit 1N Salzsäure auf 7,2 eingestellt. Die Lösung wird sterilfiltriert und es werden 10% FBS (v/v), sowie 1%-Antibiotikastammlösung (v/v) zugesetzt (1000 Units/ml Penicillin G und 0,1 mg·ml⁻¹ Streptomycin).

Modifiziertes Schatzmann-Medium

In 500 ml ddH₂O, das mit konzentrierter H₂SO₄ auf pH 2 eingestellt wurde, werden 0,34 g MgSO₄·7H₂O und 0,42 g CaCl₂·2H₂O gelöst. Es wird 1 ml einer Lösung aus 1,5·10⁻² g/L FeCl₃·6H₂O, 0,9·10⁻² g/L ZnSO₄·7H₂O, 0,24·10⁻² g/L CuSO₄·5H₂O und 1,05·10⁻² g/L zugegeben. Anschließend werden 4,5 g (NH₄)₂SO₄, 1,9 g (NH₄)₂HPO₄ und 1,44 g KCl zugegeben und mit ddH₂O auf 1 L aufgefüllt. Dann wird mit konzentrierter H₂SO₄ ein pH-Wert von 5,5 eingestellt. Die Lösung wird autoklaviert. Nach dem Abkühlen werden Antibiotika (0,5·10⁻⁴ g/L Ampicillin, 0,2·10⁻⁴ g/L Tetracyclin und 0,3·10⁻⁴ g/L Chloramphenicol), 1 ml einer Vitaminlösung (6,0·10⁻² g/L myo-Inositol, 3,0·10⁻² g/L Calcium-D-Pantothenat, 0,6·10⁻² g/L Thiaminhydrochlorid (Vitamin B₁), 0,15·10⁻² g/L Pyridoxolhydrochlorid (Vitamin B₆) und 0,3·10⁻⁴ g/L Biotin) und Glucose-Lösung (Endkonzentration: 30 g/L) über einen Sterilfilter hinzugegeben. Für die Vorkultur werden 100 ml Medium mit 0,58 g Natriumcitrat versetzt.

PBS

In einem Liter ddH₂O werden 140 mM NaCl, 27 mM KCl, 7,2 mM Na₂HPO₄, und 14,7 mM KH₂PO₄ gelöst, der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt. Der PBS-Puffer wird sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

6.3.2 Offline-Analytik**Aminosäurenanalytik**

Boratpuffer pH 10

12,36 g Borsäure in 500 ml ddH₂O

Eluent A

13,6 g Natriumacetat-Trihydrat und 12,0 g wasserfreies Natriumdihydrogenphosphat werden in etwa 2 L ddH₂O gelöst. Mit 5 ml 10 M NaOH wird der pH-Wert auf 7 eingestellt, dann wird auf 2 L aufgefüllt. Die Lösung wird filtriert und es werden 42 ml Tetrahydrofuran (THF) und 42 ml Methanol zugegeben.

Eluent B

920 ml ddH₂O werden mit 1080 ml Methanol gemischt.

OPA-Reagenz

270 mg (OPA) in 5 ml Ethanol auflösen. 200 µl Mercaptoethanol (MCE) zufügen und mit Boratpuffer auf 50 ml auffüllen. Die Lösung muss vor gebrauch etwa 24 h altern. Jede Woche werden ca. 20 µl MCE als Oxidationsmittel zugegeben. Die Lösung ist 4 Wochen haltbar.

DAPI-Färbung

Zum Ansetzen der Stammlösung 500 µg/ml DAPI in ddH₂O lösen. Für den Färbepuffer 100 mM Tris pH 7 (Sigma 7-9), 150 mM NaCl, 1 mM CaCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,1% Nonidet- P40 in 1 L ddH₂O lösen.

Glukose- und Laktatbestimmung

YSI-Kalibrationslösung

0,539 g Li-Laktat, 1 g D-Glukose und 3,5 mg Gentamycinsulfat, in 250 ml ddH₂O lösen. 24 h vor Gebrauch ansetzen.

YSI-Puffer

0,147 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7 mg Gentamycinsulfat, 0,973 g Natriumbenzoat, 1,84 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7,293 g Na_2HPO_4 , 3,289 g NaCl und 27 mg KCl in 1 L ddH₂O lösen.

REM-Vorbereitung

Karnovsky-Puffer

5 mg CaCl_2 , 10 ml Cacodylatpuffer, 20 μl Glutaraldehyd (50%) und 2,48 ml ddH₂O mischen. Kühl lagern.

6.4 Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C und 5%-CO₂-Atmosphäre im jeweils angegeben Medium kultiviert.

IV F19.23

Die Maus-Maus-Hybridom-Suspensionszelllinie IV F19.23 exprimiert I_gG gegen Penicillin-Amidase. Die Verdopplungszeit beträgt in DMEM/HAMs F12 ca. 28h [110].

MC3T3-E1

Die adhärent und fibroblastenartig wachsenden Mauszelllinie MC3T3-E1 wurde 1981 aus der Calvaria eines C57BL/6-Mausembryos etabliert [111]. Die Verdopplungszeit in DMEM mit 10% FBS beträgt ca. 36 h.

A549

Die A549-Zelllinie wurde 1972 aus einem primären Lungenkarzinom eines 58-jährigen Mannes etabliert [112]. Die adhärent wachsende Epithelzelllinie weist bei Kultivierung in DMEM mit 10% FBS eine Verdopplungsrate von ca. 40 h auf.

SAOS-2

Die adhärent wachsende SAOS-2-Zelllinie wurde 1973 aus einem primären Osteosarkom der 11-jährigen Alice Abernathy etabliert [113]. Die Zelllinie weist osteoblastenartige Eigenschaften auf und wird deshalb häufig als Modellsystem für humane Knochenzellsysteme eingesetzt [114]. Die Verdopplungszeit der Zelllinie beträgt bei Kultivierung in DMEM-Medium (10% FBS) ca. 40 h.

6.5 Materialien

6.5.1 Messkammern zur Durchführung von Impedanzmessungen

Für die ECIS-Messungen an konfluenten Säugetierzellschichten zur Durchführung von Zytotoxizitätstest werden kommerziell erhältliche 8W1E-Messslides der Firma Applied Biophysics eingesetzt. Jedes der acht Wells besitzt eine Fläche von $0,8 \text{ cm}^2$ und ein Volumen von $400 \mu\text{l}$. Jede Kavität ist mit je einer runden Arbeitselektrode ($\text{Ø } 250 \mu\text{m}$) am Boden ausgestattet. Die Fläche der Gegenelektrode beträgt ca. $0,3 \text{ cm}^2$. Durch das Verhältnis der Elektrodenflächen wird die Gesamtimpedanz des Systems durch die Impedanz der Arbeitselektrode dominiert.

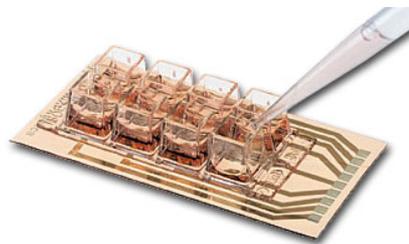


Abbildung 6.7: 8W1E-Slide der Firma Applied Biophysics.

6.5.2 Zur Herstellung dehnbare ECIS-Slides verwendete Masken

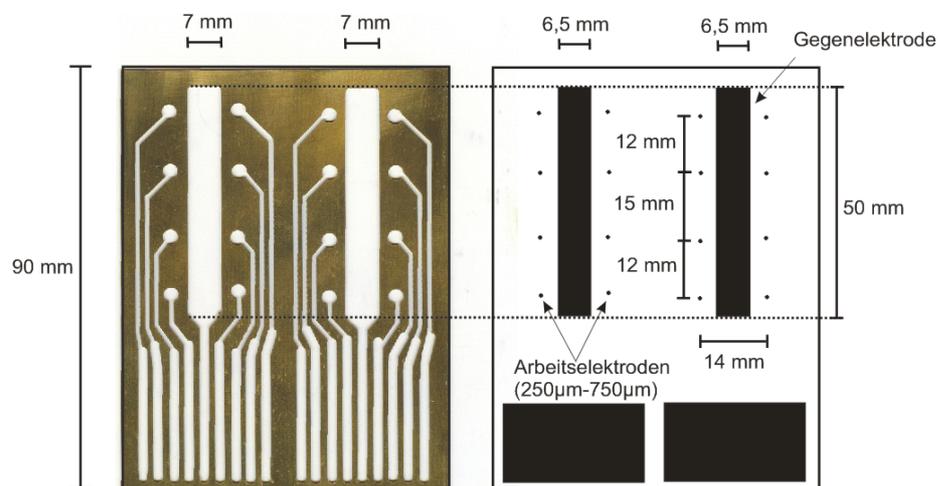


Abbildung 6.8: links: Maske zur Definition der Goldstrukturen beim thermischen Aufdampfen von Gold auf PDMS. Rechts: Schattenmaske zur UV-Belichtung photostrukturierbaren Silikons. Die Maske wird mit einem HP-Officejet 5400 bei $1200 \times 1200 \text{ dpi}^2$ bei höchstem Schwärzungsgrad auf einer 3M-Tintenstrahlfolie (CG3460) gedruckt.

6.5.3 Geräte

Gerät

4-Kanal-Sauerstoff-Messgerät
 Analysenwaage „Analytik AC 210S“
 Aquariumspumpe „Elite 801“,
 Nennleistung: 60 L/h
 Autoklav

 HPLC-Autosampler „Triathlon“
 Bedampfungsanlage (Gold)
 Edwards Auto 306
 BJH-Messgerät „Autosorb[®]-1“
 CO₂-Sensor „Capnostat 5“
 Digital-Manometer
 Eppendorf Research Pipetten
 Eppendorf Thermo Schüttler
 Fluoreszenzdetektor „RF-10AxL“
 Gaschromatograph „GC-14 b“
 Inkubator „B 5060EK“
 Iviumstat-Impedanzspektrometer
 Kryobehälter „Orion ET-44“
 Magnetrührer für Spinnerflaschen

 Magnetrührer für SuperSpinnerflaschen
 Neubauerzählkammer
 Phasenkontrastmikroskop „BX 41“
 Plattenlesegerät „Microplate Reader
 Benchmark“
 Profilometer
 Spinnerflaschen
 1L-Laborglasflasche
 Sterilwerkbank „Hera Safe“
 Tisch-Zentrifuge „5415C“,
 max 13200 rpm
 Vortex Mixer „VM-300“
 Wasseraufbereitungsanlage „Arium“

Hersteller

Precision Sensing GmbH, Regensburg
 Sartorius AG, Göttingen
 Hagen Deutschland, Holm

 Integra Biosciences, Tecnomara Deutschland GmbH,
 Fernwald
 Spark, Holland

 BOC Edwards, UK
 Quantachrome, Odelzhausen
 Respironics, USA
 Mannix Testing and Measurement, USA
 Eppendorf AG, Hamburg
 Eppendorf AG, Hamburg
 Shimadzu, Duisburg
 Shimadzu, Duisburg
 Heraeus, Hanau
 Ivium Technologies, Eindhoven
 MVE Crogenics, USA
 Techne MCS- 102L bzw. 104L Biological Stirrer,
 USA
 H+P Variomac Biosystem, Oberschleißheim
 LO-Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, 0,1 mm Tiefe
 Olympus, Hamburg
 BIO-RAD, München

 Dektak 6M Stylus, Veeco
 Techne Corporation, England
 Schott AG, Mainz
 Kendro Laboratory Products, Langenselbold
 Eppendorf AG, Hamburg

 Neo-Lab, Heidelberg
 Sartorius AG, Göttingen

Wasserbad	Julabo UC, Seelbach
YSI 2700 select	Yellow Springs Instruments, USA
Zentrifuge „Multifuge® 3S“, 5000 rpm	Heraeus, Hanau

6.5.4 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
24-Loch-Platte	Nunc, Wiesbaden
96-Loch-Platte	Nunc, Wiesbaden
Einmalpipetten	Greiner, Österreich
Einmalspritzen	Chirana-Prema Deutschland, Aachen
Kryoröhrchen (1,25 ml)	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
PVC-Schlauch	VWR, Darmstadt
Silikonschlauch	VWR, Darmstadt
SuperSpinner	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Sterilfilter 0,20 µm Minisart High-Flow	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Sterilfilter 0,20 µm Minisart 2000	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Eppendorf-Hütchen	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

6.5.5 Reagenzien und Kits

Alle hier aufgeführten Reagenzien und Chemikalien hatten, falls nicht anders aufgeführt, den kommerziell höchsterhältlichen Reinheitsgrad.

Reagenz	Hersteller
Dichloressigsäuredinatriumsalz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs
DMEM (Pulver)	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt
FBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Fibronectin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Golddraht ø 0,5 mm (99,99% Au)	ABCR, Karlsruhe
Goldpulver (99,9%, KGV 2-3,5 µm)	ABCR, Karlsruhe

Kaliumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs
Natriumcarbonat	Fluka Chemie AG, Buchs
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumsulfit	VWR, Darmstadt
Methanol	Roth GmbH, Karlsruhe
Epoxidkleber	R&G, Waldenbuch
di-Kaliumhydrogenphosphat	Riedel-de-Haën, Seelze
Kobaltnitrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
(Methacryloxypropyl)- methylsiloxane(2-4 %)-dimethylsiloxane- copolymer	ABCR, Karlsruhe
Methylendichlorid	Riedel-de-Haën, Seelze
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Pferde-Serum	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RTV-Silikon Elastosil ®RT 601	Wacker, Ottobrunn
Silberpulver (99,9%, KGV 4-7 µm)	ABCR, Karlsruhe
α-Solanin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
SDS	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Tributylzinnhydrid	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Xylol	Riedel-de-Haën, Seelze

Antibiotika

Ampicillin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloramphenicol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin G	PAA Laboratories, Österreich
Streptomycin	PAA Laboratories, Österreich
Tetracyclin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Kit

Mouse-IgG-ELISA	Roche Applied Science, Mannheim
-----------------	---------------------------------

Hersteller**Hersteller**

7 Literaturverzeichnis

- [1] NOVAIS, J.L., N.J. TITCHENER-HOOKER, and M. HOARE, *Economic comparison between conventional and disposables-based technology for the production of biopharmaceuticals*. Biotechnology and Bioengineering, 2001. **75**(2): p. 143-153.
- [2] FARID, S.S., J. WASHBROOK, and N.J. TITCHENER-HOOKER, *Decision-support tool for assessing biomanufacturing strategies under uncertainty: Stainless steel versus disposable equipment for clinical trial material preparation*. Biotechnology Progress, 2005. **21**(2): p. 486-497.
- [3] JUNKER, B.H. and H.Y. WANG, *Bioprocess monitoring and computer control: Key roots of the current PAT initiative*. Biotechnology and Bioengineering, 2006. **95**(2): p. 226-261.
- [4] SHIMADA, K., et al., *Application of catheter-tip i.s.f.e.t. for continuous in vivo measurement*. Med Biol Eng Comput, 1980. **18**(6): p. 741-5.
- [5] HENNING, B. and J. RAUTENBERG, *Process monitoring using ultrasonic sensor systems*. Ultrasonics, 2006. **44**: p. E1395-E1399.
- [6] MAZAREVICA, G., et al., *On-line fermentation monitoring by mid-infrared spectroscopy*. Applied Spectroscopy, 2004. **58**(7): p. 804-810.
- [7] VEALE, E.L., J. IRUDAYARAJ, and A. DEMIRCI, *An on-line approach to monitor ethanol fermentation using FTIR spectroscopy*. Biotechnology Progress, 2007. **23**(2): p. 494-500.
- [8] SCHEPER, T.R., K.F. , *Sensors in Biotechnology*. Sensors, ed. W.H. Göpel, J.; Zemel, J.N. 1991, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft. 1024/1046.
- [9] SCHEPER, T., et al., *Bioanalytics: detailed insight into bioprocesses*. Analytica Chimica Acta, 1999. **400**: p. 121-134.
- [10] BOUHEDJA, W., et al., *Non-invasive characterisation of yeasts: Insight from ATR-FTIR spectroscopy and chemometrics methods*. Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends, 1997: p. 487-488.
- [11] BROWN, R.G.W., *Laser fibre optics in biotechnology*. Trends in Biotechnology, 1985. **3**(8): p. 200/203.
- [12] STERN, O.V., M., *Über die Abklingungszeit der Fluoreszenz*. Physikalische Zeitschrift, 1919. **20**: p. 183-188.
- [13] AMAO, Y., *Probes and polymers for optical sensing of oxygen*. Microchimica Acta, 2003. **143**(1): p. 1-12.
- [14] ZHOU, Y., et al., *Use of a New Fluorescent-Probe, Seminaaphthofluorescein-Calcein, for Determination of Intracellular Ph by Simultaneous Dual-Emission Imaging Laser-Scanning Confocal Microscopy*. Journal of Cellular Physiology, 1995. **164**(1): p. 9-16.
- [15] HILLE, C., et al., *Time-domain fluorescence lifetime imaging for intracellular pH sensing in living tissues*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(5): p. 1871-1879.
- [16] ROUHANI, S., S. SALIMI, and K. HAGHBEEN, *Development of optical pH sensors based on derivatives of hydroxyazobenzene, and the extended linear dynamic range using mixture of dyes*. Dyes and Pigments, 2008. **77**(2): p. 363-368.
- [17] JONES, T.P. and M.D. PORTER, *Optical Ph Sensor Based on the Chemical Modification of a Porous Polymer Film*. Analytical Chemistry, 1988. **60**(5): p. 404-406.
- [18] MISRA, V., et al., *An optical pH sensor based on excitation energy transfer in Nafion (R) film*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2002. **82**(2-3): p. 133-141.
- [19] DREMEL, B.A.A. and R.D. SCHMID, *Optical Sensors for Bioprocess Control*. Chemie Ingenieur Technik, 1992. **64**(6): p. 510-517.
- [20] KERMIS, H.R., Y. KOSTOV, and G. RAO, *Rapid method for the preparation of a robust optical pH sensor*. Analyst, 2003. **128**(9): p. 1181-1186.
- [21] WALT, D.R., et al., *Development of a fiber optic sensor system for long-duration unattended measurement of CO₂ in seawater*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1998. **216**: p. U885-U885.

- [22] KAWABATA, Y., et al., *Fiber-Optic Sensor for Carbon-Dioxide with a Ph-Indicator Dispersed in a Poly(Ethylene Glycol) Membrane*. *Analytica Chimica Acta*, 1989. **219**(2): p. 223-229.
- [23] NIVENS, D.A., M.V. SCHIZA, and S.M. ANGEL, *Multilayer sol-gel membranes for optical sensing applications: single layer pH and dual layer CO₂ and NH₃ sensors*. *Talanta*, 2002. **58**(3): p. 543-550.
- [24] WEIGL, B.H. and O.S. WOLFBEIS, *New Hydrophobic Materials for Optical Carbon-Dioxide Sensors Based on Ion-Pairing*. *Analytica Chimica Acta*, 1995. **302**(2-3): p. 249-254.
- [25] MCNEIL, B.H., L. M., *Practical Fermentation Technology* 2008: John Wiley & Sons, Ltd.
- [26] NECINA, R., K. AMATSCHEK, and A. JUNGBAUER, *Capture of human monoclonal antibodies from cell culture supernatant by ion exchange media exhibiting high charge density*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998. **60**(6): p. 689-698.
- [27] DAVEY, C.L., et al., *Real-Time Monitoring of the Accretion of Rhizopus-Oligosporus Biomass during the Solid-Substrate Tempe Fermentation*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1991. **7**(2): p. 248-259.
- [28] CARVELL, J.P. and J.E. DOWD, *On-line measurements and control of viable cell density in cell culture manufacturing processes using radio-frequency impedance*. *Cytotechnology*, 2006. **50**(1-3): p. 35-48.
- [29] XIONG, Z.Q., et al., *Real-time viable-cell mass monitoring in high-cell-density fed-batch glutathione fermentation by Saccharomyces cerevisiae T65 in industrial complex medium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008. **105**(4): p. 409-413.
- [30] GIAEVER, I. and C.R. KEESE, *Monitoring Fibroblast Behavior in Tissue-Culture with an Applied Electric-Field*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 1984. **81**(12): p. 3761-3764.
- [31] EARLEY, S. and G.E. PLOPPER, *Disruption of focal adhesion kinase slows transendothelial migration of AU-565 breast cancer cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006. **350**(2): p. 405-412.
- [32] KUCHARZIK, T., et al., *Activation of epithelial CD98 glycoprotein perpetuates colonic inflammation*. *Laboratory Investigation*, 2005. **85**(7): p. 932-941.
- [33] KEESE, C.R., et al., *Electrical wound-healing assay for cells in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(6): p. 1554-1559.
- [34] CHARRIER, L., et al., *ADAM-15/metargidin mediates homotypic aggregation of human T lymphocytes and heterotypic interactions of T lymphocytes with intestinal epithelial cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(23): p. 16948-16958.
- [35] BARKER, T.H., et al., *SPARC regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(43): p. 36483-36493.
- [36] REN, J., et al., *Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial cells and enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells*. *Cancer Research*, 2006. **66**(6): p. 3006-3014.
- [37] DE BLASIO, B.F., et al., *Combining optical and electrical impedance techniques for quantitative measurement of confluence in MDCK-I cell cultures*. *Biotechniques*, 2004. **36**(4): p. 650-+.
- [38] SAWHNEY, R.S., et al., *Integrin alpha(2) and extracellular signal-regulated kinase are functionally linked in highly malignant autocrine transforming growth factor-alpha-driven colon cancer cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(22): p. 19861-19869.
- [39] KEESE, C.R., et al., *Real-time impedance assay to follow the invasive activities of metastatic cells in culture*. *Biotechniques*, 2002. **33**(4): p. 842-+.
- [40] GARCIA, J.G.N., et al., *Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement*. *Journal of Clinical Investigation*, 2001. **108**(5): p. 689-701.
- [41] LOW, B., M. LIANG, and J. FU, *p38 Mitogen-activated protein kinase mediates sidestream cigarette smoke-induced endothelial permeability*. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2007. **104**(3): p. 225-231.

- [42] HARTMANN, C., et al., *The impact of glia-derived extracellular matrices on the barrier function of cerebral endothelial cells: An in vitro study*. Experimental Cell Research, 2007. **313**(7): p. 1318-1325.
- [43] XIAO, C.D., et al., *Assessment of cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing: Concentration and time response function approach*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(22): p. 5748-5753.
- [44] CHANANA, M., et al., *Interaction of polyelectrolytes and their composites with living cells*. Nano Letters, 2005. **5**(12): p. 2605-2612.
- [45] ZUDAIRE, E., et al., *The aryl hydrocarbon receptor repressor is a putative tumor suppressor gene in multiple human cancers*. Journal of Clinical Investigation, 2008. **118**(2): p. 640-650.
- [46] KATAOKA, N., et al., *Measurements of endothelial cell-to-cell and cell-to-substrate gaps and micromechanical properties of endothelial cells during monocyte adhesion*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(24): p. 15638-15643.
- [47] QIAO, J., et al., *Lysophosphatidylcholine impairs endothelial barrier function through the G protein-coupled receptor GPR4*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2006. **291**(1): p. L91-L101.
- [48] LOVELADY, D.C., et al., *Distinguishing cancerous from noncancerous cells through analysis of electrical noise*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2007. **76**(4 Pt 1): p. 041908.
- [49] GIAEVER, I. and C.R. KEESE, *Micromotion of Mammalian-Cells Measured Electrically (Proc Natl Acad Sci USA, Vol 88, Pg 7896, 1991)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(4): p. 1634-1634.
- [50] HOLM, R., *Electrical Contacts*. 1946, Uppsala: Almquist & Wiksells.
- [51] LANG, G. and K.E. HEUSLER, *Remarks on the energetics of interfaces exhibiting constant phase element behaviour*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1998. **457**(1-2): p. 257-260.
- [52] WEGENER, J., A. HAKVOORT, and H.J. GALLA, *Barrier function of porcine choroid plexus epithelial cells is modulated by cAMP-dependent pathways in vitro*. Brain Research, 2000. **853**(1): p. 115-124.
- [53] LO, C.M. and J. FERRIER, *Impedance analysis of fibroblastic cell layers measured by electric cell-substrate impedance sensing*. Physical Review E, 1998. **57**(6): p. 6982-6987.
- [54] BUTLER, M., *Animal Cell Culture and Technology*. 2 ed. 2004, London: BIOS Scientific Publishers.
- [55] EMERY, A.N., D.C.H. JAN, and M. ALRUBEAI, *Oxygenation of Intensive Cell-Culture System*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995. **43**(6): p. 1028-1033.
- [56] SCHNEIDER, M., et al., *Bubble-Free Oxygenation by Means of Hydrophobic Porous Membranes*. Enzyme and Microbial Technology, 1995. **17**(9): p. 839-847.
- [57] HENZLER, H.J. and D.J. KAULING, *Oxygenation of Cell-Cultures*. Bioprocess Engineering, 1993. **9**(2-3): p. 61-75.
- [58] DOYLE, A.G., J.B.; NEWELL, D.G., *Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures*. 1998, Chichester NewYork Brisbane Toronto Singapore: JohnWiley & Sons.
- [59] FRAHM, B., et al., *Dynamic membrane gassing in the bioreactor for the intensification of the oxygen supply to sensitive cell lines*. Chemie Ingenieur Technik, 2007. **79**(7): p. 1052-1058.
- [60] JORJANI, P. and S.S. OZTURK, *Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines*. Biotechnology and Bioengineering, 1999. **64**(3): p. 349-356.
- [61] DALILI, M., G.D. SAYLES, and D.F. OLLIS, *Glutamine-Limited Batch Hybridoma Growth and Antibody-Production - Experiment and Model*. Biotechnology and Bioengineering, 1990. **36**(1): p. 74-82.
- [62] JENKINS, H.A., M. BUTLER, and A.J. DICKSON, *Characterization of Glutamine-Metabolism in 2 Related Murine Hybridomas*. Journal of Biotechnology, 1992. **23**(2): p. 167-182.
- [63] REUVENY, S., et al., *Factors Affecting Cell-Growth and Monoclonal-Antibody Production in Stirred Reactors*. Journal of Immunological Methods, 1986. **86**(1): p. 53-59.

- [64] MURRAY, K., K. GULL, and A.J. DICKSON, *Dichloroacetate increases cell and antibody yields in batch cultures of a hybridoma cell line*. Biotechnology and Bioengineering, 1996. **49**(4): p. 377-382.
- [65] EIGENBRODT, E.F., P.; REINACHER, M., *New perspectives on carbohydrate metabolism in tumor cells*. Regulation of carbohydrate metabolism, ed. R. Beitner. Vol. II. 1985, Boca Raton, FL.: CRC Press. 141-179.
- [66] CLAUS, T.H. and S.J. PILKIS, *Effect of Dichloroacetate and Glucagon on Incorporation of Labeled Substrates into Glucose and on Pyruvate-Dehydrogenase in Hepatocytes from Fed and Starved Rats*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1977. **182**(1): p. 52-63.
- [67] GOODMAN, M.N., N.B. RUDERMAN, and T.T. AOKI, *Glucose and Amino-Acid Metabolism in Perfused Skeletal-Muscle - Effect of Dichloroacetate*. Diabetes, 1978. **27**(11): p. 1065-1074.
- [68] DESAULNIERS, D., et al., *Optimization of an MCF7-E3 cell proliferation assay and effects of environmental pollutants and industrial chemicals*. Toxicology in Vitro, 1998. **12**(4): p. 409-422.
- [69] DIEDERICHS, S., *Dynamische Kultivierungsmethoden für das Tissue Engineering von Knochen*, in *Dissertation*. 2008, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover: Hannover.
- [70] WEGENER, J., C.R. KEESE, and I. GIAEVER, *Recovery of adherent cells after in situ electroporation monitored electrically*. Biotechniques, 2002. **33**(2): p. 348+.
- [71] WEGENER, J., C.R. KEESE, and I. GIAEVER, *Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces*. Experimental Cell Research, 2000. **259**(1): p. 158-166.
- [72] GIAEVER, I. and C.R. KEESE, *Micromotion of Mammalian-Cells Measured Electrically*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(17): p. 7896-7900.
- [73] SCHRODER, B. *Digitize Performance of CS328A*. [Webresource] 2007 [cited 2008 07.07.]; Available from: <http://www.cleverscope.com/resources/Cleverscope%20CS328A%20performance.pdf> (Page 24).
- [74] COLE, S.P., *Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay*. Cancer Chemother Pharmacol, 1986. **17**(3): p. 259-63.
- [75] NAKATSU, Y., Y. KOTAKE, and S. OHTA, *Concentration dependence of the mechanisms of tributyltin-induced apoptosis*. Toxicol Sci, 2007. **97**(2): p. 438-47.
- [76] JI, Y.B. and S.Y. GAO, *The effect of solanine on the membrane potential of mitochondria in HepG(2) cells and [Ca²⁺]_i in cells*. 2007 Ieee/Icme International Conference on Complex Medical Engineering, Vols 1-4, 2007: p. 1030-10372018.
- [77] CHAM, B.E. and H.M. MEARES, *Glycoalkaloids from Solanum sodomaeum are effective in the treatment of skin cancers in man*. Cancer Lett, 1987. **36**(2): p. 111-8.
- [78] HOPKINS, J., *The glycoalkaloids: naturally of interest (but a hot potato?)*. Food Chem Toxicol, 1995. **33**(4): p. 323-8.
- [79] KUO, K.W., et al., *Anticancer activity evaluation of the solanum glycoalkaloid solamargine. Triggering apoptosis in human hepatoma cells*. Biochem Pharmacol, 2000. **60**(12): p. 1865-73.
- [80] HU, K., et al., *Antineoplastic agents. III: Steroidal glycosides from Solanum nigrum*. Planta Med, 1999. **65**(1): p. 35-8.
- [81] JI, Y.B., et al., *Induction of apoptosis in HepG2 cells by solanine and Bcl-2 protein*. Journal of Ethnopharmacology, 2008. **115**(2): p. 194-202.
- [82] GERTH, K., et al., *Ratjadon: a new antifungal compound from Sorangium cellulosum (myxobacteria) production, physio-chemical and biological properties*. J Antibiot (Tokyo), 1995. **48**(9): p. 973-6.
- [83] SCHAUMBERG, J.P.H., G. C. FRENCH, J. C., *The structures of the antitumour antibiotics, PD 114720 and PD 114721*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1984: p. 1450-1452.
- [84] BURZLAFF, P.A., *Neue Anwendungsmethoden der Durchflusszytometrie in der Biotechnologie*. 2005.

- [85] GIERSE, A., *Anwendung moderner optischer Analysensysteme in der Biotechnologie*. 2007.
- [86] CAZZALINI, O., et al., *p21CDKN1A does not interfere with loading of PCNA at DNA replication sites, but inhibits subsequent binding of DNA polymerase delta at the G1/S phase transition*. *Cell Cycle*, 2003. **2**(6): p. 596-603.
- [87] TARANTOLA, M., et al., *Cytotoxicity of Metal and Semiconductor Nanoparticles Indicated by Cellular Micromotility*. *Acs Nano*, 2009. **3**(1): p. 213-222.
- [88] JOHNSON, W.A., *Microfabrication of Biocompatible Stimulation Electrode Arrays for Cochlear Implants*, in *24th Annual Microelectronic Engineering Conference*, . 2006: Rochester Institute of Technology.
- [89] LEE, K.K., et al., *Polyimide-based intracortical neural implant with improved structural stiffness*. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2004. **14**(1): p. 32-37.
- [90] LACOUR, S.P., et al., *Stretchable micro-electrode Arrays for dynamic neuronal recording of in vitro mechanically injured brain*. 2005 IEEE Sensors, Vols 1 and 2, 2005: p. 617-620.
- [91] JAGT, J.C., P.J.M. BERIS, and G.F.C.M. LIJTEN, *Electrically Conductive Adhesives - a Prospective Alternative for Smd Soldering*. *Ieee Transactions on Components Packaging and Manufacturing Technology Part B-Advanced Packaging*, 1995. **18**(2): p. 292-298.
- [92] VAN GRIENSVEN, M., et al., *Cyclic mechanical strain induces NO production in human patellar tendon fibroblasts--a possible role for remodelling and pathological transformation*. *Exp Toxicol Pathol*, 2003. **54**(4): p. 335-8.
- [93] MULDER, W.H., et al., *Tafel Current at Fractal Electrodes - Connection with Admittance Spectra*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1990. **285**(1-2): p. 103-115.
- [94] LACOUR, S.P., et al., *Mechanisms of reversible stretchability of thin metal films on elastomeric substrates*. *Applied Physics Letters*, 2006. **88**(20): p. -.
- [95] LACOUR, S.P., et al., *Deformable interconnects for conformal integrated circuits*. *Electronics on Unconventional Substrates-Electrotextiles and Giant-Area Flexible Circuits*, 2003. **736**: p. 183-188.
- [96] LACOUR, S.P., et al., *Design and performance of thin metal film interconnects for skin-like electronic circuits*. *Ieee Electron Device Letters*, 2004. **25**(4): p. 179-181.
- [97] LACOUR, S.P., et al., *Elastomeric interconnects*. *Frontiers in Electronics*, 2006. **41**: p. 397-407.
- [98] LACOUR, S.P., et al., *Stretchable interconnects for elastic electronic surfaces*. *Proceedings of the Ieee*, 2005. **93**(8): p. 1459-1467.
- [99] LACOUR, S.P. and S. WAGNER, *Thin film transistor circuits integrated onto elastomeric substrates for elastically stretchable electronics*. *Ieee International Electron Devices Meeting 2005, Technical Digest*, 2005: p. 109-112.
- [100] LACOUR, S.P., S. WAGNER, and Z. SUO, *Stretchable conductors: thin gold films on silicone elastomer*. *Thin Films-Stresses and Mechanical Properties X*, 2004. **795**: p. 193-198.
- [101] PASHLEY, D.W., *A Study of the Deformation and Fracture of Single-Crystal Gold Films of High Strength inside an Electron Microscope*. *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences*, 1960. **255**(1281): p. 218-&.
- [102] HUANG, H.B. and F. SPAEPEN, *Tensile testing of free-standing Cu, Ag and Al thin films and Ag/Cu multilayers*. *Acta Materialia*, 2000. **48**(12): p. 3261-3269.
- [103] KANG, Y.S., et al., *Film thickness effect on tensile properties and microstructures of submicron aluminum thin films on polyimide*. *Thin Films: Stresses and Mechanical Properties Vi*, 1997. **436**: p. 35-40 542.
- [104] *Handbook of physical vapor deposition (PVD) processing*, ed. D.M. Mattox. 1998: William Andrew. 917.
- [105] VALENTA, L.M., L., *VERGLEICH DES NEO-HOOKE'SCHEN UND DES MOONEY-RIVLIN'SCHEN MATERIALMODELLS IN DER FEM-BERECHNUNG*. *PERIODICA POLYTECHNICA SER. MECH. ENG*, 2000. **45**(1): p. 95-101.
- [106] SCHNEIDER, F., et al., *Mechanical properties of silicones for MEMS*. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2008. **18**(6): p. -.
- [107] LI, T., et al., *Stretchability of thin metal films on elastomer substrates*. *Applied Physics Letters*, 2004. **85**(16): p. 3435-3437.
- [108] BAERNS, M.B., A.; BREHM, A.; GMEHLING, J.; HOFMANN, H.; ONKEN, U., *Technische Chemie*. 1 ed. 2006, Berlin-New York: WILEY-VCH Verlag GmbH.

- [109] AACHEN, R., *Skript: Einführung in die Bioreaktortechnik II: Sauerstofftransfer und Leistungseintrag*, 2008.
- [110] LUDEMANN, I., et al., *Improvement of the culture stability of non-anchorage-dependent animal cells grown in serum-free media through immobilization*. *Cytotechnology*, 1996. **19**(2): p. 111-124.
- [111] KODAMA H, A.Y., SUDO H, KASAI S, YAMAMOTO S, *Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria*. *Jpn J Oral Biol* 1981. **23**: p. 899–901
- [112] GIARD, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. *J Natl Cancer Inst*, 1973. **51**(5): p. 1417-23.
- [113] FOGH, J., J.M. FOGH, and T. ORFEO, *One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice*. *J Natl Cancer Inst*, 1977. **59**(1): p. 221-6.
- [114] RODAN, S.B., et al., *Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties*. *Cancer Res*, 1987. **47**(18): p. 4961-6.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Riechers, Daniel
Geburtsdatum und –ort	29.04.1976 in Hannover
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1982-1986	Grundschule Seelze
1986-1988	Orientierungsstufe Seelze
1988-1995	Georg-Büchner-Gymnasium, Letter, Erlangung der Hochschulreife, Note 1,7

Studium

1996-2005	Studium der Chemie, Universität Hannover
April 2005	Abschluss mit Diplom
2005-2008	Doktorand am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover
2008-heute	wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Sartorius Stedim Biotech

Veröffentlichungen

Posterbeiträge:

Cell Culture Engineering X Whistler/Canada 2006: D. Riechers, F. Anton, A. Glindkamp, L. Behr, C. Kasper, T. Scheper *Application of a hollow-fiber membrane stirring system for oxygenation in suspension cell culture*

ESACT Meeting 2007, Dresden: S. Diederichs, D. Riechers, F. Sempf, S. Kall, C. Kasper, M. van Griensven, T. Scheper: *Investigation of the effect of mechanical strain on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells*

Journalbeiträge:

Chemie Ingenieur Technik Volume 80 Issue 3 , Pages 247 - 406 (March, 2008)
Bioprozessanalytik C. Rehbock, S. Beutel, T. Brückerhoff, B. Hitzmann, D. Riechers, G. Rudolph, F. Stahl, T. Scheper, K. Friehs

Buchbeiträge:

Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Springer Verlag, Heidelberg; 2009;
Mechanical strain using 2D and 3D bioreactors induces osteogenesis – implications for bone tissue engineering; M. van Griensven, S. Diederichs, S. Röker, S. Böhm, A. Peterbauer, S. Wollbank, D. Riechers, F. Stahl, C. Kasper

Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Springer Verlag, Heidelberg; 2009;
Sensors in Disposable Bioreactors Status and Trends; A. Glindkamp, D. Riechers, C. Rehbock, B. Hitzmann, T. Scheper, K. F. Reardon

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Diese Arbeit wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im Mai 2010