Mikrofluidische Komponenten für die Vollblut-Aufbereitung und Einzelzell-Isolation in der Liquid Biopsy

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTOR-INGENIEURS (Dr.-Ing.)

der Fakultät für Ingenieurwissenschaften, Informatik und Psychologie der Universität Ulm

von

Samir Kadić
aus Ulm

Betreuer:	Prof. Dr.-Ing. Steffen Strehle
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Peter Unger
Drittgutachter:	Prof. Dr.-Ing. Karsten Seidl
Amtierende Dekanin:	Prof. Dr. Anke Huckauf
Verteidigt:	13. Februar 2025

Für meine Eltern.
Und, natürlich, für meine kleine Nervensäge …

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

2 ZIELSETZUNG UND AUFBAU DER ARBEIT 3

I STAND VON WISSENSCHAFT UND TECHNIK 5

3 BIOTECHNOLOGISCHE ASPEKTE DER MODERNEN ONKOLOGIE 7
- 3.1 Zirkulierende Tumorzellen als Tumor-Biomarker . . . 7
- 3.2 Biochemische Eigenschaften von Vollblut . . . 9
  - 3.2.1 Vollblut-Zusammensetzung . . . 9
  - 3.2.2 Selektive Erythrozytenlyse . . . 10
- 3.3 Verfahren für die Vollblut-Aufbereitung . . . 12
  - 3.3.1 Das CellSearch®-System . . . 14
  - 3.3.2 Die maintrac®-Methode . . . 14
- 3.4 Technologien für die Einzelzell-Isolation . . . 17
  - 3.4.1 Mikrowannen-basierte Ansätze . . . 18
  - 3.4.2 Das DEPArray™ NxT System . . . 20

4 LAB-ON-A-CHIP-SYSTEME 23
- 4.1 Eine Gesamtlösung: Wunsch und Umsetzungsformen . . . 23
- 4.2 Die *Vivalytic*-Plattform: Analysen am Point-of-Care . . . 25

5 STRÖMUNGSMECHANIK IN MIKROFLUIDIKSYSTEMEN 27
- 5.1 Grundlagen der Fluiddynamik . . . 27
- 5.2 Das Gesetz von Hagen-Poiseuille . . . 28
- 5.3 Medium-Partikel-Wechselwirkung . . . 29

6 PARTIKELMANIPULATION PER DIELEKTROPHORESE: THEORIE UND PRAKTISCHE ANWENDUNG 31
- 6.1 Physikalische Grundlagen . . . 31
  - 6.1.1 Elektrisches Feld und induzierte Polarisation . . . 31
  - 6.1.2 DC-Betrieb: DEP-Kraft auf einen elektrischen Dipol . . . 33
  - 6.1.3 Lineare Multipol-Momente höherer Ordnung . . . 35
- 6.2 Spezialfall: DEP-Manipulation von biologischen Zellen . . . 36
  - 6.2.1 AC-Betrieb: Polarisationsmechanismen und elektrische Verluste 36
  - 6.2.2 Verallgemeinerung des Dipolmoments . . . 38
  - 6.2.3 Ein-Schalen-Modell für sphärische Partikel . . . 40
- 6.3 Die Dielektrophorese in Mikrofluidiksystemen . . . 45
  - 6.3.1 Manipulationsszenarien und Elektrodengeometrien . . . 45
  - 6.3.2 Möglichkeiten und Limitierungen . . . 48

II EXPERIMENTELLE VORGEHENSWEISE 51

7 MATERIAL 53
- 7.1 Probenmaterial . . . 53
- 7.2 Weiteres Material . . . 54

8 METHODEN 55
8.1 Prototyp-Auslegung und -Herstellung . . . 55
8.1.1 Finite-Elemente-Analysen . . . 55
8.1.2 MEMS-Fabrikation . . . 56
8.1.3 Leiterplattenherstellung . . . 56
8.1.4 Aufbau von Funktionsmustern . . . 57
8.2 Probenvorbereitung . . . 59
8.2.1 Ansetzen von Lösungen . . . 59
8.2.2 Subkultivierung von Tumorzellen . . . 61
8.2.3 Einstellung der Partikelkonzentration . . . 62
8.2.4 Herstellung von Modellproben . . . 62
8.3 (Vor-) Charakterisierung . . . 65
8.3.1 Messaufbau . . . 65
8.3.2 Bildaufnahme und -auswertung . . . 66
8.3.3 Vorbetrachtungen . . . 67
8.3.4 Experimente zur Vollblut-Aufbereitung . . . 70
8.3.5 Experimente zur Einzelzell-Isolation . . . 72

III SEDIMENTATIONSBASIERTE AUFBEREITUNG VON VOLLBLUT IN EINEM MIKROFLUIDIKSYSTEM 73

9 KONZEPTFINDUNG 75
9.1 Anforderungen an eine mikrofluidische Implementierung der maintrac®-Methode . . . 75
9.2 Vorstellung eines neuartigen Arbeitsablaufs . . . 76
9.2.1 Zellmarkierung . . . 76
9.2.2 Zellvereinzelung . . . 77
9.2.3 Erythrozytenbeseitigung . . . 78

10 REALISIERUNG EINES PROTOTYPEN 81
10.1 Vorbetrachtungen . . . 81
10.1.1 System-Miniaturisierung . . . 81
10.1.2 Materialwahl und Prototyp-Layout . . . 86
10.1.3 Mikrowannen-Befüllbarkeit . . . 87
10.2 Simulation des Betriebsverhaltens . . . 88
10.2.1 Simulationsgeometrie und Randbedingungen . . . 88
10.2.2 Erythrozytenbeseitigung . . . 89

11 CHARAKTERISIERUNG 91
11.1 Zellmarkierung . . . 91
11.2 Zellvereinzelung . . . 92
11.3 Erythrozytenbeseitigung . . . 93

12 ZUSAMMENFASSUNG ZUR VOLLBLUT-AUFBEREITUNG 95

IV ELEKTRIFIZIERTE MIKROWANNEN FÜR EINE KONTAKTLOSE EINZELZELL-ISOLATION 97

13 KONZEPTFINDUNG 99
13.1 Anforderungen an eine DEP-basierte Erweiterung der mikrofluidischen Vollblut-Aufbereitung . . . 99

13.2 Vorstellung eines neuartigen DEP-Chips . . . 100
13.2.1 Beladung . . . 100
13.2.2 Medienwechsel . . . 101
13.2.3 Selektive Freigabe . . . 102
14 REALISIERUNG EINES PROTOTYPEN 105
14.1 Vorbetrachtungen . . . 105
14.1.1 Technologiewahl und Prototyp-Layout . . . 105
14.1.2 Kalibrier-Setup . . . 106
14.1.3 ROT-Experimente . . . 107
14.2 Simulation des Betriebsverhaltens . . . 108
14.2.1 Simulationsgeometrie und Randbedingungen . . . 108
14.2.2 Beladung . . . 109
14.2.3 Medienwechsel . . . 111
14.2.4 Selektive Freigabe . . . 112
15 CHARAKTERISIERUNG 115
15.1 Isolation von Polymerbeads . . . 115
15.2 Isolation von Tumorzellen . . . 116
16 ZUSAMMENFASSUNG ZUR EINZELZELL-ISOLATION 119

17 GESAMTFAZIT 121
18 AUSBLICK 123

V ANHANG 125
A DIELEKTROPHORETISCHE MULTIPOL-MOMENTE 127
B ERGÄNZUNGEN ZUM MATERIALVERZEICHNIS 135
C PARAMETER ZUR FEM-SIMULATION 147
D ERGÄNZUNGEN ZUR REINRAUMFABRIKATION 149
E GRAFISCHE BENUTZEROBERFLÄCHE 151

LITERATUR 153

VERZEICHNIS DER WICHTIGSTEN ABKÜRZUNGEN 173
VERZEICHNIS DER WICHTIGSTEN SYMBOLE 179

DANKSAGUNG 187
ERKLÄRUNG 191

PUBLIKATIONSLISTE 193
AKADEMISCHER LEBENSLAUF 197

1

EINLEITUNG

Im Zeitalter der Digitalisierung kann – nicht zuletzt dank technologischer Entwicklungen im globalen Gesundheitswesen – insbesondere in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen ein immer besserer Umgang mit den meisten Erkrankungen erreicht werden [1]. Die daraus hervorgehende kontinuierliche Steigerung der Lebenserwartung des Menschen stellt die Welt jedoch einer anstehenden epidemiologischen Transition gegenüber, die bereits bald zu einer neuen Rangordnung unter den nicht-übertragbaren Krankheiten führen könnte [2]: Noch in diesem Jahrhundert könnte Krebs, verantwortlich für ca. 19,3 Mio. Neuerkrankungen und ca. 10,0 Mio. Todesfälle weltweit im Jahr 2020 [3], die Herz-Kreislauf-Erkrankungen auf Platz eins der häufigsten Todesursachen ablösen [4].

Um diesem Trend in Zukunft entgegenwirken zu können, bedarf es unter anderem den Einsatz von frühzeitigeren und effizienteren Formen der Krebsbehandlung [5]. Ein möglicher und vielversprechender Ansatz, der diesen Anforderungen gerecht werden könnte und in der modernen Onkologie bereits seit einigen Jahren intensiv verfolgt wird, besteht in der Ableitung von personalisierten Krebstherapien aus der Detektion und Analyse von Tumor-Biomarkern in Körperflüssigkeiten (Liquid Biopsy). Vor allem zirkulierenden Tumorzellen (Circulating Tumor Cells, CTCs) im Blut von Krebspatienten mit soliden bösartigen Tumoren, der mit Abstand häufigsten Krebserkrankung, wird in diesem Kontext eine große Bedeutung zugeschrieben, zumal diese durch Metastasenbildung in der Mehrheit aller Fälle für einen tödlichen Ausgang der Erkrankung verantwortlich sind. Dennoch konnten CTCs und deren potentiell hoher Informationsgehalt, welcher durch (i) CTC-Quantifizierung (Bestimmung der CTC-Anzahl pro Einheitsvolumen Vollblut) und (ii) CTC-Charakterisierungen (Multiparameter-Analysen und funktionale Assays) auf Einzelzell-Ebene extrahiert werden kann [6], bislang prinzipiell noch nicht in Entscheidungen im klinischen Alltag eingebunden werden. Dies geht im Wesentlichen auf folgende Limitierungen bei der Vollblut-Prozessierung zurück:

1. CTC-Quantifizierung:

   Ein entscheidender Umstand, der den Prozess der Akzeptanz von CTCs im klinischen Umfeld verzögert, ist der Mangel an zugelassenen Systemen, mit denen der für eine CTC-Quantifizierung und nachfolgende Einzelzell-Analysen erforderliche Schlüssel-Vorprozess der Vollblut-Aufbereitung (dieser umfasst die Probenlagerung, CTC-Anreicherung, Zellmarkierung sowie Zellvereinzelung) durchgeführt werden könnte. Für diesen Zweck ist das CellSearch®-System (Menarini Silicon Biosystems S.p.A., Bologna, Italien) momentan die einzige durch die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) freigegebene Lösung und damit *de facto* als Goldstandard aufzufassen. In den vergangenen Jahren manifestierte sich jedoch in direkten Vergleichen mit alternativen Verfahren [7] zunehmend der Verdacht, dass die Ergebnisse einer Vollblut-

Aufbereitung und CTC-Quantifizierung mit dem CellSearch®-System trotz relativ großer verwendeter Blutvolumina (bei der Aufbereitung und CTC-Zählung kommen mehrere Milliliter Vollblut zum Einsatz) eventuell nur eingeschränkte Aussagekraft besitzen könnten [8].

Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die maintrac®-Methode (SIMFO GmbH, Bayreuth, Deutschland) dank annähernd verlust- und zerstörungsfreier Prozessschritte bei der Vollblut-Aufbereitung CTC-Quantifizierungen mit einer um mehrere Größenordnungen höheren Sensitivität zulässt (das für eine Aufbereitung und CTC-Zählung effektiv eingesetzte Blutvolumen beträgt wenige Mikroliter Vollblut) als das CellSearch®-System[1] [9]. Nach einer Vollblut-Aufbereitung mit der maintrac®-Methode bleiben Zellen ferner zum größten Teil vital, womit diese für ein weites Spektrum von Charakterisierungen auf Einzelzell-Ebene zur Verfügung stehen [10]. Da die maintrac®-Methode aktuell aber noch weitestgehend manuell und unter Einsatz von traditionellem Labor-Equipment durchgeführt wird, handelt es sich um ein arbeitsintensives und zentralisiertes [11, 12] Verfahren, welches relativ viele serielle Prozessschritte mit makroskopischem Probenhandling umfasst.

2. Einzelzell-Charakterisierung:

   CTC-Charakterisierungen auf Einzelzell-Ebene erfordern nicht nur den Vorprozess der Vollblut-Aufbereitung, sondern darüber hinaus auch einen Zwischenprozess der Einzelzell-Isolation (räumliche Abtrennung der einzelnen zu charakterisierenden CTCs). Um Letzteren durchzuführen, kann zwar auf zahlreiche etablierte Technologien zurückgegriffen werden, allerdings sind diese entweder nur für große Zellmischungen ($\sim$ Millionen Zellen) und mit beschränkter Möglichkeit der visuellen Kontrolle ausgelegt (z. B. Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS) oder vor allem zeitaufwendig und mühsam (z. B. manuelles Zellpicking per Mikrokapillare).

   Moderne Technologien sind davon abzugrenzen, da sie dem Anwender insbesondere auch bei der Analyse von kleinen und mittelgroßen Biopsien ($\sim$ Zehn- bis Hunderttausende Zellen) schnelle Einzelzell-Isolationen mit einem hohen Grad der Automatisierung zur Verfügung stellen [13]. Ein Beispiel, welches sich in die Rubrik dieser modernen Technologien einordnen lässt, ist das Dielektrophorese (DEP)-basierte DEPArray™ NxT System (Menarini Silicon Biosystems S.p.A., Bologna, Italien)[2]. Es ist die bislang einzige mikrofluidische Technologie, mit der eine digitale und effiziente Isolation von einzelnen lebenden Tumorzellen aus gesunden Blutzellen mit 100 % Reinheit erreicht wurde [14, 15]. Obwohl das DEPArray™ NxT System damit prinzipiell ideal mit dem CellSearch® System kombiniert werden kann, ist ein routinemäßiger Einsatz mit diesem momentan jedoch noch mit manuellen Zwischenschritten und relativ hohen Gesamtkosten der Einzelzell-Isolation verbunden [13].

Eine Überwindung dieser Limitierungen könnte eine Etablierung von CTCs als eine neue Klasse von Tumor-Biomarker mit großem Potential bedeuten und damit weitreichende Änderungen im bisherigen Umgang mit Krebs zur Folge haben.

1 Bemerkung: Die Verfahren werden in den Unterabschnitten 3.3.1 und 3.3.2 vorgestellt.
2 Bemerkung: Ausgewählte Technologien werden in den Unterabschnitten 3.4.1 und 3.4.2 vorgestellt.

2

ZIELSETZUNG UND AUFBAU DER ARBEIT

Diese Arbeit soll eine technologische Grundlage bereitstellen, mit deren Hilfe die Einbindung von zirkulierenden Tumorzellen als Tumor-Biomarker in den klinischen Alltag der Onkologie bei der Auswahl von personalisierten Krebstherapien zukünftig beschleunigt werden kann. Genauer werden in dieser Arbeit dafür zwei neuartige Komponenten (im weiteren Verlauf auch als Komponente A und Komponente B bezeichnet), die eine Quantifizierung und Einzelzell-Charakterisierung von CTCs aus dem Blut von Krebspatienten mit soliden bösartigen Tumoren erlauben, eingeführt und untersucht. Durch die Komponenten sollen (i) der Vorprozess der Vollblut-Aufbereitung sowie (ii) der Zwischenprozess der Einzelzell-Isolation gemäß der in Abbildung 2.1 dargestellten Vollblut-Prozessierung in einem einfachen und kompakten Gesamtsystem realisiert werden. Unter Berücksichtigung der zuvor genannten Limitierungen des Stands der Wissenschaft und Technik seien dabei die im Folgenden ausgeführten Strategien und übergeordneten Zielsetzungen[1] verfolgt:

1. Vollblut-Aufbereitung (Komponente A):

   Bei der Komponente A soll das Grundprinzip der Vollblut-Aufbereitung aus der sensitiven, schonenden und standardisierten maintrac®-Methode (Referenz-Methode) abgeleitet und das dabei effektiv eingesetzte Blutvolumen als eine für eine CTC-Quantifizierung repräsentative Stichprobe angesehen werden. Um eine Automatisierung und Miniaturisierung der maintrac®-Methode zu erreichen, soll der zugehörige Arbeitsablauf in eine mikrofluidische Umgebung integriert werden.

   - Automatisierung:

     Ausgehend von der Lagerung der Blutprobe und Eingabe dieser in das Gesamtsystem, kann die Komponente ihre Funktion potentiell vollkommen ohne weiteres menschliches Eingreifen erfüllen. Eine Vollblut-Aufbereitung könnte damit maximal anwenderfreundlich durchgeführt werden.

   - Miniaturisierung:

     Eine Vollblut-Aufbereitung mit der neuartigen Komponente erfordert ein Minimum an Probenmaterial und Reagenzien. Sie ist ferner schnell genug, um auch dezentralisiert am Ort der Analyse (Point-of-Care, PoC) eingesetzt werden zu können.

   Die Untersuchung der Komponente konzentriert sich im Wesentlichen auf deren biologisches und hydrodynamisches Betriebsverhalten. Das genaue Untersuchungsvorgehen ist in Teil iii dieser Arbeit zusammengefasst.

1 Bemerkung: Die Anforderungen bzw. Konzepte zu den jeweiligen Komponenten sind im Detail in den Abschnitten 9.1 und 13.1 bzw. 9.2 und 13.2 festgehalten.

2. Einzelzell-Isolation (Komponente B):

   Komponente B soll eine effiziente, reine und schonende Einzelzell-Isolation per Dielektrophorese erlauben und eine integrierte und kostengünstige Erweiterung der zuvor eingeführten mikrofluidischen Vollblut-Aufbereitung darstellen.

   - Integration:

     Im Gegensatz zu komplex und kaskadiert aufgebauten Ansätzen nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft und Technik entfallen durch die neuartige Komponente der Einzelzell-Isolation insbesondere manuelle Zwischenschritte der Volumenreduktion nach einer Vollblut-Aufbereitung.

   - Kostengünstigkeit:

     Die Komponente ist kostengünstig genug, um auch für Routine-Analysen im klinischen Alltag geeignet zu sein. Bei einem modular aufgebauten Gesamtsystem könnte die Komponente dann als Analysekartusche im Einweggebrauch in Kombination mit einem festen Analysegerät betrieben werden.

   Bei der Untersuchung der Komponente sei der Fokus auf das elektrische Betriebsverhalten gelegt. Die einzelnen Schritte der Untersuchung sind in Teil iv dieser Arbeit aufgeführt.

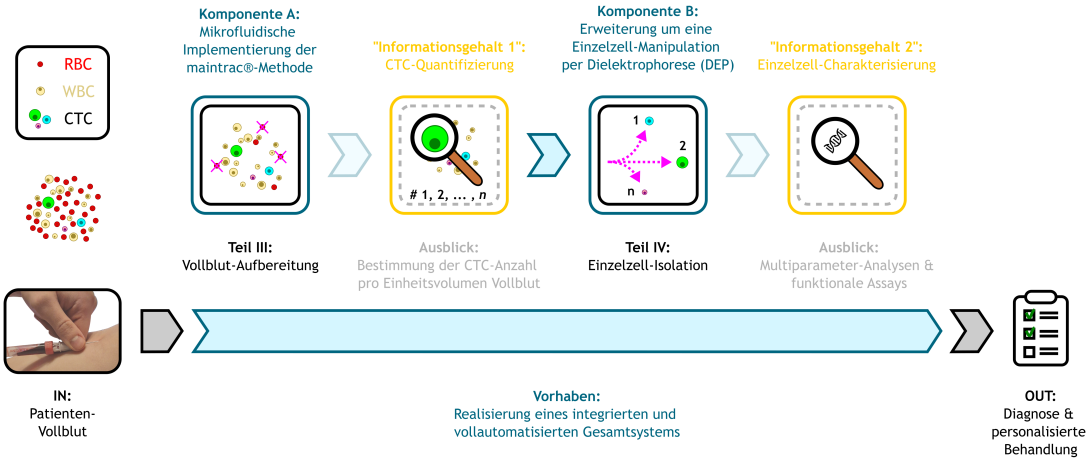


Abbildung 2.1: Grafische Gliederung des Hauptteils der vorliegenden Arbeit mit Schritten der Vollblut-Prozessierung in einem Gesamtsystem im Überblick. Die neuartigen Komponenten A und B sollen, voneinander entkoppelt, in den Teilen iii und iv untersucht werden. Abkürzungen: RBC – Red Blood Cell, WBC – White Blood Cell, CTC – Circulating Tumor Cell.

In den Teilen i und ii dieser Arbeit werden der Stand von Wisschenschaft und Technik sowie die experimentelle Vorgehensweise eingeführt. Die zentralen Ergebnisse und die Bedeutung der Arbeit sowie Vorschläge für zukünftige Forschungsarbeiten sind abschließend in einem Gesamtfazit und Ausblick zusammengefasst. Ergänzende Informationen zu den Komponenten sind als Anhang in Teil v zu finden.

Teil I

STAND VON WISSENSCHAFT UND TECHNIK

Im ersten Teil der Arbeit werden die zur Einordnung der Inhalte in den Teilen iii und iv erforderlichen Grundlagen als Vorarbeiten in Wissenschaft und Technik vorgestellt. Diese umfassen:

- Biotechnologische Aspekte der modernen Onkologie (Kapitel 3):

  Es wird ein Überblick zur Bedeutung von zirkulierenden Tumorzellen als Tumor-Biomarker in der Liquid Biopsy, zu den biochemischen Eigenschaften von Vollblut sowie zu technologischen Ansätzen, mit denen derartige Zellen aktuell in Vollblut nachgewiesen und auf Einzelzell-Ebene isoliert werden können, geliefert.

- Lab-on-a-Chip-Systeme (Kapitel 4):

  In diesem Kapitel werden Vorteile, verschiedene Typen und Umsetzungen von Lab-on-a-Chip-Systemen aufgeführt.

- Strömungsmechanik in Mikrofluidiksystemen (Kapitel 5):

  Hier werden die für Mikrofluidiksysteme zutreffenden wichtigsten Gesetzmäßigkeiten der Strömungsmechanik behandelt. Es werden unter anderem das Gesetz von *Hagen-Poiseuille* und Formen der Medium-Partikel-Wechselwirkung beschrieben.

- Partikelmanipulation per Dielektrophorese (Kapitel 6):

  In diesem Kapitel wird abschließend die Physik der Dielektrophorese, die in Mikrofluidiksystemen insbesondere für die räumliche Bewegung von biologischen Zellen eingesetzt werden kann, eingeführt.

3

BIOTECHNOLOGISCHE ASPEKTE DER MODERNEN ONKOLOGIE

3.1 ZIRKULIERENDE TUMORZELLEN ALS TUMOR-BIOMARKER

Die Diagnose eines soliden bösartigen Tumors – sich unkontrolliert und wuchernd neubildendes Gewebe ohne ursprüngliche Gewebsfunktion – ist für den betroffenen Patienten eine angsteinflößende Erkenntnis. In der Mehrheit aller Situationen ist der tödliche Ausgang einer Erkrankung jedoch nicht auf den zunächst identifizierten lokalen Ursprungstumor, sondern auf selbst nach einer erfolgreichen Operation des Ursprungstumors im weiteren Krankheitsverlauf auftretende Metastasen in entfernten und lebenswichtigen Organen zurückzuführen. Es wird vermutet, dass für den Metastasierungsprozess, welcher schematisch in Abbildung 3.1 veranschaulicht ist, zirkulierende Tumorzellen (Circulating Tumor Cells, CTCs) als systemische Komponente des Tumors verantwortlich sind. Dabei handelt es sich um Tumorzellen, die sich ab einem fortgeschrittenen Stadium des Wachstums vom festen Zellverbund lösen und in das Blut- oder Lymphgefäßsystem eintreten können. Einigen wenigen dieser Zellen gelingt nach Zirkulation der Wiederaustritt an einer anderen Stelle im Körper, wo sie in der Lage sind, sich in neuem gesundem Gewebe invasiv abzusiedeln[1]. Dies kann schließlich das Versagen der betroffenen Organe und damit den Tod des Patienten zur Folge haben [10, 18–24]. Zu den weltweit häufigsten und tödlichsten Krebserkrankungen zählten im Jahr 2020 Brust-, Lungen-, Dickdarm-, Prostata-, Magen- und Leberkrebs [3].

Liquid Biopsy *Detektion und Analyse von Tumor-Biomarkern in Körperflüssigkeiten [17].*

INFORMATIONSGEHALT Zirkulierende Tumorzellen in peripherem Blut werden als attraktive Biomarker angesehen, die zur Beobachtung der Metastasierungsaktivität von soliden bösartigen Tumoren eingesetzt werden können. Die Analyse einer Körperflüssigkeit (Liquid Biopsy) bietet, gegenüber der konventionellen Gewebebiopsie und bildgebenden Verfahren, potentiell die entscheidenden Vorteile der minimalen Invasivität und seriellen Wiederholbarkeit bei ganzheitlicher Repräsentation des Tumors und erhöhter Sensitivität der Analyse. Man geht somit davon aus, dass sich CTCs insbesondere für das klinische Therapie-Monitoring in Echtzeit eignen und in Zukunft folgendermaßen einsetzen lassen[2] [6, 16, 17, 25, 27]:

1. CTC-Quantifizierung:

   Die Präsenz von zirkulierenden Tumorzellen in Blut ist nicht nur als ein bloßer qualitativer Indikator für die Möglichkeit der Streuung eines soliden Tumors zu interpretieren. Die Anzahl der pro Einheitsvolumen Vollblut vorkommenden CTCs im zeitlichen Verlauf kann vielmehr auch ein quantitatives Maß

1 Bemerkung: Es besteht der Verdacht, dass dieser Vorgang durch die sogenannte epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) des CTC-Phänotyps ermöglicht wird [16, 17].

2 Bemerkung: Auch nicht-zelluläre Tumor-Bestandteile, wie z. B. zirkulierende Tumor-DNA (Circulating Tumor DNA, ctDNA), extrazelluläre Vesikel (EV), Proteine oder Metaboliten, wurden bereits als Biomarker vorgeschlagen [17, 27, 28], sollen in dieser Arbeit aber nicht untersucht werden.

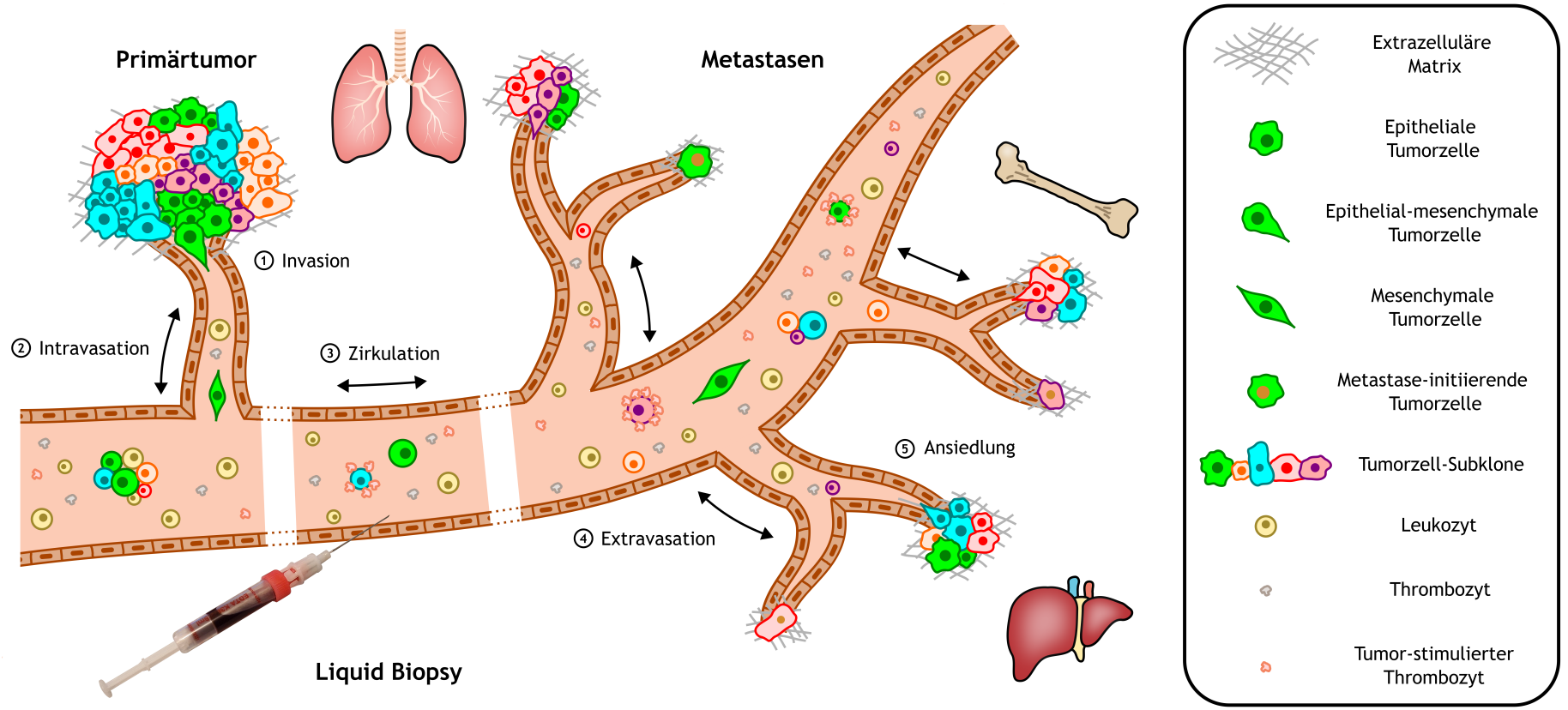


Abbildung 3.1: Vorgang der Metastasenentstehung durch CTCs. (1) Invasion: Entscheidende (angehäufte) Mutationen in Tumorsuppressor- (Herunterregulierung) oder/und Wachstumsfaktor- (Hochregulierung) genen im Genom einer zuvor gesunden Gewebezelle können durch unkontrollierte Zellteilungen zu einem bösartigen Primärtumor führen. (2) Intravasation: Eine Versorgung mit Nährstoffen aus dem umliegenden Gewebe ist für kleine Tumore zunächst noch per Diffusion möglich. Erreicht der Tumor jedoch eine gewisse Größe, so entstehen durch Angiogenese neue Blutgefäße zur aktiven Tumorversorgung. Einzelne Zellen des Tumors können ab diesem Zeitpunkt über diese neuen Pfade in das Blut- oder Lymphgefäßsystem gelangen, wo sie via Liquid Biopsy detektiert und analysiert werden können. (3) Zirkulation: Die meisten dieser zirkulierenden Tumorzellen sterben unter den neuen biochemischen Umgebungsbedingungen und mechanischen Belastungen durch Scherbeanspruchung ab oder werden durch das körpereigene Immunsystem eliminiert. (4) Extravasation: Sehr wenige Tumorzellen wechselwirken mit ihrer neuen Umgebung jedoch geeignet, verändern sich und können das Blut- oder Lymphgefäßsystem wieder lebend verlassen. (5) Ansiedlung: Diese Zellen können dann, selbst nach mehreren Jahren der Inaktivität, zunächst Mikro- und später Makrometastasen in lebenswichtigen Organen (wie z. B. Leber, Lunge oder Knochen) bilden, welche ihrerseits wiederum neue Quellen von CTCs darstellen können. Nach [16, 17, 25, 26].

liefern, um z. B. die Dynamik und das Ansprechen der Rest-Tumorlast auf eine Therapie nach einer operativen Entfernung des Primärtumors zu bewerten. Eine steigende CTC-Zahl würde demzufolge ein Rezidiv prognostizieren, während mit einer sinkenden CTC-Zahl die Reduzierung der Rest-Tumorlast infolge von Therapiewirksamkeit aufzufassen wäre [19]. In Abschnitt 3.3 werden ausgewählte Verfahren für die Vollblut-Aufbereitung vorgestellt, mit denen eine Quantifizierung von zirkulierenden Tumorzellen ermöglicht wird.

2. Einzelzell-Charakterisierung:

   Ein solider Tumor besteht in der Regel aus mehreren Subklonen, die sich in ihren molekularen Eigenschaften unterscheiden. Diese Heterogenität wird als einer der Hauptgründe für die Entwicklung von Resistenzen bei Krebstherapien angesehen. Mit klassischen Assays, die lediglich das durchschnittliche Erscheinungsbild einer CTC-Population erfassen, können demnach wertvolle Informationen über kleine aber unter Umständen sehr wichtige Subpopulationen mit Schlüsselrollen beim Metastasierungsprozess (Tumorzellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften) übersehen werden. Die Präzisionsonkologie verfolgt den Ansatz, Tumor-Heterogenitäten durch molekulare Einzelzell-Analysen zeitlich sowie räumlich aufzulösen, um daraus personalisierte Therapien für den Patienten abzuleiten. Es können Multiparameter-Analysen einzelner CTCs auf DNA (Genom)-, RNA (Transkriptom)- und/oder Protein (Proteom)-Ebene [17, 27, 29] sowie funktionale Assays wie etwa Zellkultivierungen [30], Medikamententests [31, 32] oder Xenografts [16, 33] zum Einsatz kommen. Eine Grundvoraussetzung zur Durchführung von Einzelzell-Analysen ist die Verwendung von geeigneten Technologien für die Einzelzell-Isolation. Einige davon werden in Abschnitt 3.4 zusammengefasst.

Im nachfolgenden Abschnitt 3.2 werden die wichtigsten biochemischen Eigenschaften von Vollblut als Probenmaterial in der Liquid Biopsy, die bei der Extrahierung des Informationsgehalts von CTCs berücksichtigt werden müssen, dargestellt.

3.2 BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN VON VOLLBLUT

3.2.1 *Vollblut-Zusammensetzung*

Die vielseitigen Funktionen des Bluts, zu denen die Immunabwehr, die Pufferung, die Gerinnung, der Gastransport sowie der Salz- und Wasserhaushalt gehören, spiegeln sich in dessen komplexer Zusammesetzung als Suspension wider. Durch Zentrifugation kann auf die zwei Fraktionen des Bluts geschlossen werden, welche im Detail weiterhin enthalten [34] (Kap. 18 bis 20):

1. Blutplasma (flüssiger Überstand):

   Das Blutplasma (Blutserum mit Gerinnungsfaktoren) ist eine klare, leicht gelbliche Flüssigkeit, welche zu ca. 90 % aus Wasser besteht. Darin gelöst sind:

   - Nährstoffe (Kohlenhydrate, Lipide und Vitamine),
   - Proteine (Albumin sowie α_1-, α_2-, β- & γ- Globuline),

- Elektrolyte (unter anderem elementare Ionen wie Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} sowie Cl^-, HCO_3^-, SO_4^{2-}, PO_4^{3-} und weitere Ionen),
- Hormone und
- Gase.

2. Blutzellen (festes Sediment):

   Die zellulären Bestandteile des peripheren Bluts eines erwachsenen Menschen sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Zu den drei Typen von Blutzellen gehören:

   - Erythrozyten (Red Blood Cells, RBCs):

     Hierbei handelt es sich um Blutzellen, die der Versorgung des Körpers mit Sauerstoff sowie dem Abtransport von Kohlenstoffdioxid dienen. Erythrozyten sind kernlos und besitzen eine bikonkave Scheibenform. Sie bilden den überwiegenden Volumenanteil ($>$ 99 %) des Hämatokrits. Die Trockenmasse des Erythrozyten setzt sich zu ca. 90 % aus in dessen Zytoplasma gelöstem Hämoglobin (Hb) zusammen. Dieser rote Blutfarbstoff ist ein Tetramer und besteht aus 4 Globin-Untereinheiten mit jeweils einer angebundenen Häm-Gruppe (Eisen-II-Komplex).
   - Leukozyten (White Blood Cells, WBCs):

     Leukozyten sind Zellen der körpereigenen Immunabwehr. Sie sind kernhaltig, sphärisch und besitzen Subpopulationen, nämlich Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten, mit spezifischen Aufgaben.
   - Thrombozyten:

     Thrombozyten sind in der Blutgerinnung involviert. Sie sind kernlos, im inaktivierten Zustand diskoid und die mit Abstand kleinsten Blutzellen.

Eine Prozessierung von Vollblut gestaltet sich in der Liquid Biopsy dahingehend als herausfordernd, zumal allgemein anerkannt wird, dass CTCs in ihren biophysikalischen Eigenschaften nicht nur extrem heterogen sind, sondern unter gesunden Blutzellen zudem selten vorkommen müssen. Trotz intensiver Forschungsarbeiten besteht bis heute jedoch kein Konsens über die genauen Erscheinungsformen oder Konzentrationen von CTCs im Blut von Krebspatienten[3]. Aus diesem Grund können sich insbesondere Strategien der Vollblut-Aufbereitung in ihren Ansätzen und Ergebnissen sehr stark voneinander unterscheiden (weiterführende Details hierzu sind in Abschnitt 3.3 zu finden).

3.2.2 *Selektive Erythrozytenlyse*

Die Plasmamembran einer Zelle besteht aus einer Doppellipidschicht, welche als semipermeable Schnittstelle der Zelle zur Außenwelt fungiert [35] (Abschn. 8.3): Während ungeladene Moleküle die Membran passiv größenselektiv passieren können, wird der Durchgang von Ionen aktiv über integrierte Ionenkanäle reguliert.

3 Bemerkung: Eine gängige Arbeitshypothese besteht darin, dass ein durchschnittlicher bösartiger Tumor schätzungsweise $\sim$ eine Millionen CTCs pro Tag in die Blutbahn abzugeben vermag, diese Zellen jedoch nicht länger als 24 h überleben [46].

Tabelle 3.1: Ausgewählte Eigenschaften von CTCs und Zell (sub) typen des peripheren Blutes eines erwachsenen Menschen (Normalwerte). Die Zelldurchmesser beziehen sich auf undeformierte Zellen innerhalb eines isotonen Mediums. Die mittlere Massendichte von Blutplasma liegt bei ca. 1.035 kg/m³. Das Blutvolumen eines gesunden Erwachsenen beträgt ca. 5 l bis 6 l. Nach [8] (Tab. II), [35] (Tab. 1.2), [36] (Tab. 2.1), [37] (Tab. 12.1, 12.2, 12.3, 13.1, 13.2 & 14.1, Abb. 13.1, 13.3 & 13.4 sowie Abschn. 13.1 & 13.2), [38] (Abb. 2-1), [39] (Abb. 1 & Tab. 1), [16, 40–45].

ZELLTYP	SUBPOPULATION	RADIUS R (in µm)	MASSENDICHTE ρ_p (in kg/m³)	ZELL-KONZENTRATION (in 1/ml)	MORPHOLOGIE	MERKMAL
Erythrozyt	–	3,6 ... 4,25	1.090 ... 1.110	$4,8 \pm 0,9 \cdot 10^9$		kernlos
Leukozyt				$8,0 \pm 4,7 \cdot 10^6$		kernhaltig
	Lymphozyt			$2,7 \pm 1,3 \cdot 10^6$		mononukleär
	B-Lymphozyt	3,25 ... 4,25	1.055 ... 1.070			
	T-Lymphozyt	3,25 ... 4,25	1.055 ... 1.070			
	Natürliche Killerzelle	3,25 ... 4,25	1.055 ... 1.070			
	Granulozyt			$4,9 \pm 3,2 \cdot 10^6$		polynukleär
	Neutrophil	4,5 ... 5	1.075 ... 1.085			
	Eosinophil	4,5 ... 5	1.075 ... 1.085			
	Basophil	4,5 ... 5	1.075 ... 1.085			
	Monozyt	4,5 ... 7,5	1.055 ... 1.070	$4 \pm 2 \cdot 10^5$		mononukleär
Thrombozyt	–	0,5 ... 1,5	1.040 ... 1.060	$2,7 \pm 0,5 \cdot 10^8$		kernlos
CTC		3 ... > 10	1.060 ... 1.085	unklar		kernhaltig

Ein Ionenkanal, der bei Erythrozyten eine wichtige Funktion für den CO_2-Transport übernimmt, zugleich aber auch für die selektive Lyse[4] eingesetzt werden kann, ist das Bande-3-Protein [34] (Kap. 18 bis 20). Wird Blut mit einem isotonen Ammoniumchlorid-Lysepuffer vermischt, so werden nach [48]

$$NH_4Cl + H_2O \Leftrightarrow NH_3 + H_3O^+ + Cl^- \tag{3.1}$$

die Konzentrationen von NH_3 und Cl^- in Lösung erhöht. NH_3 kann ungehindert durch die Erythrozytenmembrane diffundieren und in deren Zytosol gemäß

$$NH_3 + H_2O \Leftrightarrow NH_4^+ + OH^- \tag{3.2}$$

dissoziieren. Parallel dazu findet im Inneren der Erythrozyten, beschleunigt durch Carbonat-Dehydratase, weiterhin nach der Reaktion

$$CO_2 + OH^- \Leftrightarrow HCO_3^- \tag{3.3}$$

die Entstehung von Hydrogencarbonat statt. Das Bande-3-Protein sorgt über den sogenannten *Hamburger*-Shift[5] für dessen aktiven Austausch mit Chlorid außerhalb der Erythrozyten und damit für eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts in Gleichung (3.2). Das resultierende osmotische Ungleichgewicht durch einen Netto-Fluss von NH_3 in die Erythrozyten wird durch ein Nachströmen von Wasser ausgeglichen, was ein Anschwellen und schließlich die Lyse der Erythrozyten zur Folge hat. Da andere Blutzellen nicht über das Bande-3-Protein verfügen, bleiben sie vom Mechanismus der Erythrozytenlyse unbetroffen.

3.3 VERFAHREN FÜR DIE VOLLBLUT-AUFBEREITUNG

Ehe zirkulierende Tumorzellen unter gesunden Blutzellen quantifiziert oder analysiert werden können, muss zunächst ein geeigneter Vorprozess der Vollblut-Aufbereitung vollzogen werden. Für den Fall der immunzytochemischen Fluoreszenzmikroskopie sind dabei in der Regel folgende Schritte durchzuführen [16, 25, 49]:

- Probenlagerung:

  Initial wird dem Patienten venöses Vollblut in Blutentnahmeröhrchen abgenommen. Den Röhrchen sind mindestens Antikoagulanzien zur Unterbindung der Blutgerinnung durch Inaktivierung von Gerinnungsfaktoren und, optional, Fixierungsmittel zur Konservierung der Zellmorphologie beigesetzt.

- CTC-Anreicherung:

  Um bei der CTC-Quantifizierung eine aussagekräftige Statistik führen zu können, kann im Schritt der CTC-Anreicherung das Verhältnis von Tumorzellen zu gesunden Blutzellen erhöht werden. Bei einer Zellsortierung können, wie in Abbildung 3.2 dargestellt, sowohl biologische (Markerabhängigkeit), als auch physikalische (Markerfreiheit) Unterschiede in den Eigenschaften der Zelltypen

4 Bemerkung: Vertiefende Grundlagen zur Hämolyse können beispielsweise [47] entnommen werden.
5 Bemerkung: Nach Hartog Jakob Hamburger (1859 – 1924).

ausgenutzt werden. (i) Biologische Strategien können auf der Funktionalisierung von Eisenpartikeln (Immunomagnetophorese) oder Oberflächen von mikrofluidischen Strukturen (Immunocapture) mit Fängermolekülen gegen Tumor- (Positivselektion von Zielzellen) [50, 51] oder Leukozyten- (Negativselektion von Nicht-Zielzellen) [52] spezifische Proteine auf der Oberfläche der Plasmamembran basieren. (ii) Physikalische Ansätze können Unterschiede in der Größe [53, 54], Verformbarkeit, Massendichte sowie in den elektrischen und optischen Eigenschaften von Zellen ausnutzen. Um eine selektive Manipulation hervorzurufen, können dafür sowohl interne (Hydrodynamik), als auch externe (Magnete, Elektroden sowie Lichtquellen) Kraftfelder eingesetzt werden. Typischerweise findet während der Anreicherung mindestens eine Beseitigung von Erythrozyten im Hintergrund statt. Falls weiterhin keine Anreicherung unter kernhaltigen Zellen, also unter Leukozyten und morphologisch stark ähnlichen zirkulierenden Tumorzellen, vorgesehen wird, bezeichnet man ein solches Verfahren [55–59] auch als selektionsfrei.

- Zellmarkierung:

  In diesem Schritt werden die für eine Fluoreszenzdetektion, und gegebenenfalls CTC-Anreicherung, relevanten Proteine der Zellen markiert. Dafür kommen mit Fluorophoren oder Eisenpartikeln versehene Antikörper oder Aptamere zum Einsatz. Je nach Tumorart können epitheliale, mesenchymale und/oder Gewebe-spezifische bzw. Tumor-assoziierte molekulare Marker verwendet werden (für den Fall, dass bei der Identifizierung von CTCs neben Proteinen auf der Plasmamembran auch intrazelluläre Marker eingesetzt werden, ist eine vorherige Fixierung und Permeabilisierung der Zellen notwendig). Da die meisten bösartigen Tumore epithelialen Ursprungs sind, ist eine Markierung am häufigsten gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (Epithelial Cell Adhesion Molecule, EpCAM) und Cytokeratine (CK) gerichtet. Der Ausschluss von Leukozyten kann beispielweise über die Markierung von CD45 erfolgen. Weiterhin können bei der Zellmarkierung Kernfärbungen (z. B. mit DAPI oder Propidiumiodid, PI) eingesetzt werden.

- Zellvereinzelung:

  Die kernhaltigen Zellen der Probe werden in eine gemeinsame Fokusebene überführt, in welcher sie mikroskopisch aufgelöst und untersucht werden können. Die von den Zellen ausgehenden Fluoreszenzsignale werden im Rahmen der CTC-Quantifizierung final detektiert und interpretiert.

Generell ist festzuhalten, dass eine Vollblut-Aufbereitung mit Anreicherung von CTCs relativ zu gesunden Blutzellen primär schonend sein und eine möglichst sensitive, spezifische und standardisierte CTC-Quantifizierung zulassen sollte [10, 27, 46, 60–62].

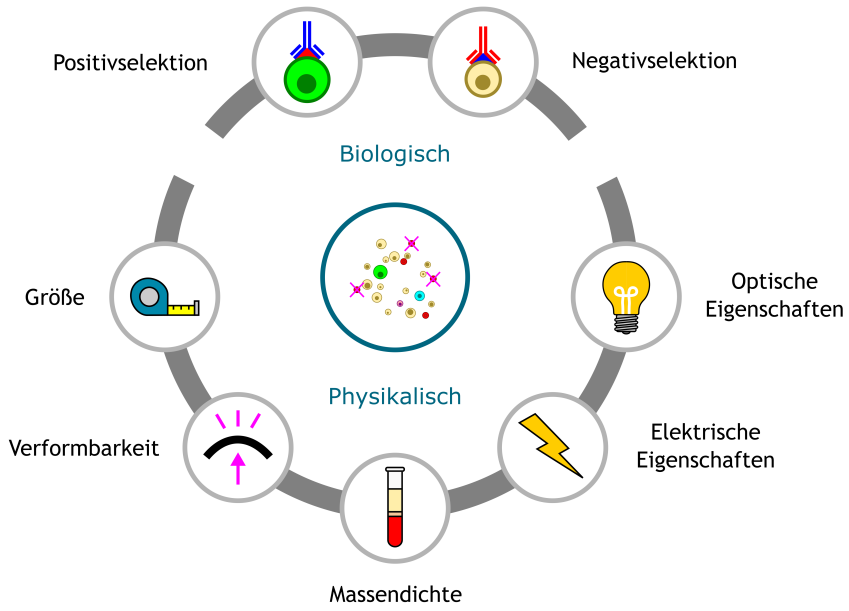


Abbildung 3.2: Strategien der CTC-Anreicherung im Überblick (Farbkodierung siehe Abbildung 2.1). Im Rahmen einer Vollblut-Aufbereitung können Zellsortierungen auf (i) biologischen (differentielle Expression von Oberflächenproteinen, wahlweise in einer Positiv- oder Negativselektion) oder/und (ii) physikalischen (Größe, Verformbarkeit, Massendichte sowie optoelektrische Eigenschaften) Unterschieden zwischen Tumorzellen und gesunden Blutzellen basieren. Nach [63].

3.3.1 *Das CellSearch®-System*

Die differentielle Expression von Proteinen auf der Plasmamembran ist die für eine Anreicherung von CTCs am häufigsten ausgenutzte biologische Zelleigenschaft und findet unter anderem beim CellSearch®-System (Menarini Silicon Biosystems S.p.A., Bologna, Italien) Anwendung (siehe Abbildung 3.3). Mit dem modularen und halb-automatisierten System können Zellen mit einer ausreichend hohen EpCAM-Expression zunächst immunomagnetisch angereichert und, nach einer Permeabilisierung und fluoreszenten Markierung, optisch detektiert werden. Eine Zelle wird als CTC klassifiziert, wenn diese Cytokeratin- und DAPI-positiv, jedoch CD45-negativ ist [64]. Für Patienten mit metastasierten Brust- und Prostata- bzw. Kolorektalkarzinomen korreliert die Detektion von ≥ 5 CTCs bzw. ≥ 3 CTCs je 7,5 ml Blut signifikant mit der Prognose eines kürzeren progressionsfreien Überlebens sowie kürzeren Gesamt-Überlebens [65].

3.3.2 *Die maintrac®-Methode*

Eine Vollblut-Aufbereitung und CTC-Quantifizierung nach der maintrac®-Methode (SIMFO GmbH, Bayreuth, Deutschland) unterscheidet sich in folgenden drei Aspekten von anderen Verfahren:

1. Es handelt sich um ein selektionsfreies Verfahren mit effizienter Erythrozytenbeseitigung [10, 19].

2. Waschschritte werden gänzlich vermieden [10, 19].

3. Das zu markierende Tumor-Protein (EpCAM) wird bei der Probenlagerung nicht fixiert [9].

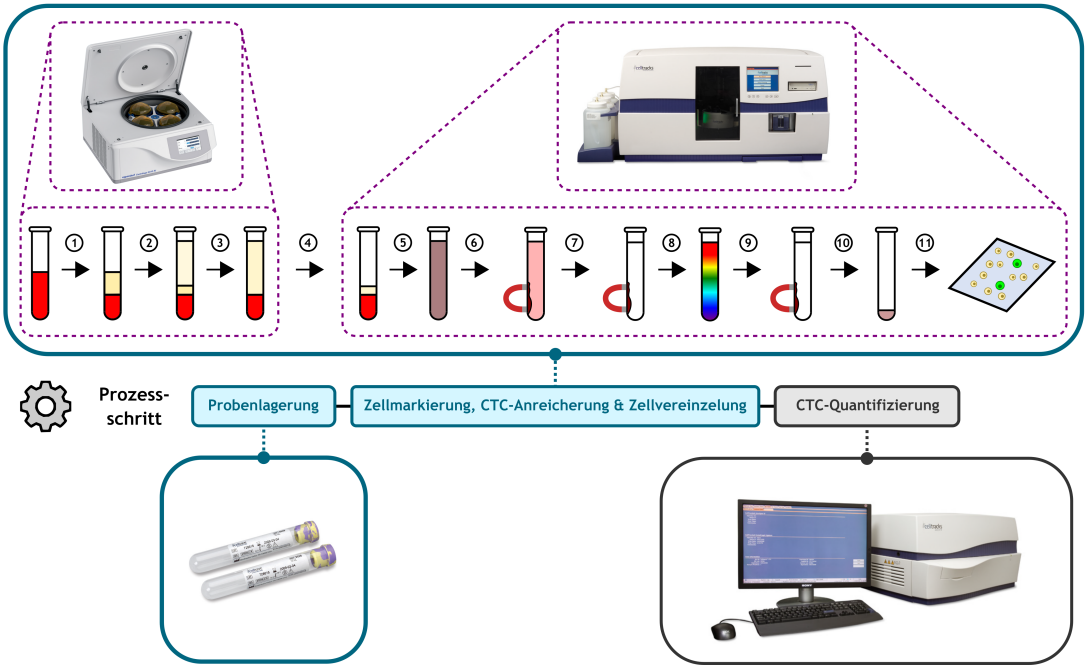


Abbildung 3.3: Workflow des modularen CellSearch®-Systems. (i) Teil 1 (proprietäre CellSave Preservative Tubes, CTC Kit, Zentrifuge, CELLTRACKS® AUTOPREP® System & MAGNEST Cartridge Holder): Vollblut-Aufbereitung (in Blau hervorgehoben), umfassend die Probenlagerung (mit Zellfixierung) sowie Zellmarkierung, CTC-Anreicherung (mit Waschschritten) und Zellvereinzelung. Die einzelnen Schritte stellen im Detail dar: (1) Zentrifugation eines mit Vollblut befüllten Tubes, (2) & (3) Verdünnung des Blutplasmas, (4) Absaugen des verdünnten Überstands, (5) Inkubation von EpCAM-Ferrofluid, (6) & (7) immunomagnetische Anreicherung mit Waschen, (8) & (9) Inkubation von Färbereagenzien mit Waschen, (10) Absaugen des Überstands und (11) Zellvereinzelung. (ii) Teil 2 (CELLTRACKS® ANALYZER II® System): CTC-Quantifizierung. Nach [66–69].

Der zugehörige Arbeitsablauf ist in einer Übersicht in Abbildung 3.4 dargestellt. Vor der Analyse werden 7,5 ml Blut des Patienten in Standard EDTA-Röhrchen entnommen [9], zur Kompensation von Lieferverzögerungen und zur Demaskierung von zunächst noch unzugänglichen Antigenen[6] [70–72] jedoch erst nach 24 (aber nicht mehr als 48) Stunden Lagerung bei Raumtemperatur (RT) weiterprozessiert. Ausgangspunkt der Analyse ist ein Milliliter Vollblut und die selektive Erythrozytenlyse per Ammoniumchlorid (vgl. Unterabschnitt 3.2.2). Das resultierende Blutlysat, im Wesentlichen bestehend aus Erythrozytenmembranen und freigesetztem Hämoglobin in Blutplasma und Lysepuffer, kann nach Zentrifugation als Überstand dekantiert und nahezu vollständig von den in der Probe vorhandenen kernhaltigen

6 Bemerkung: Es wird vermutet, dass eine Demaskierung von EpCAM-Molekülen durch Proteasen, welche durch absterbende Granulozyten freigesetzt werden, ermöglicht wird [70].

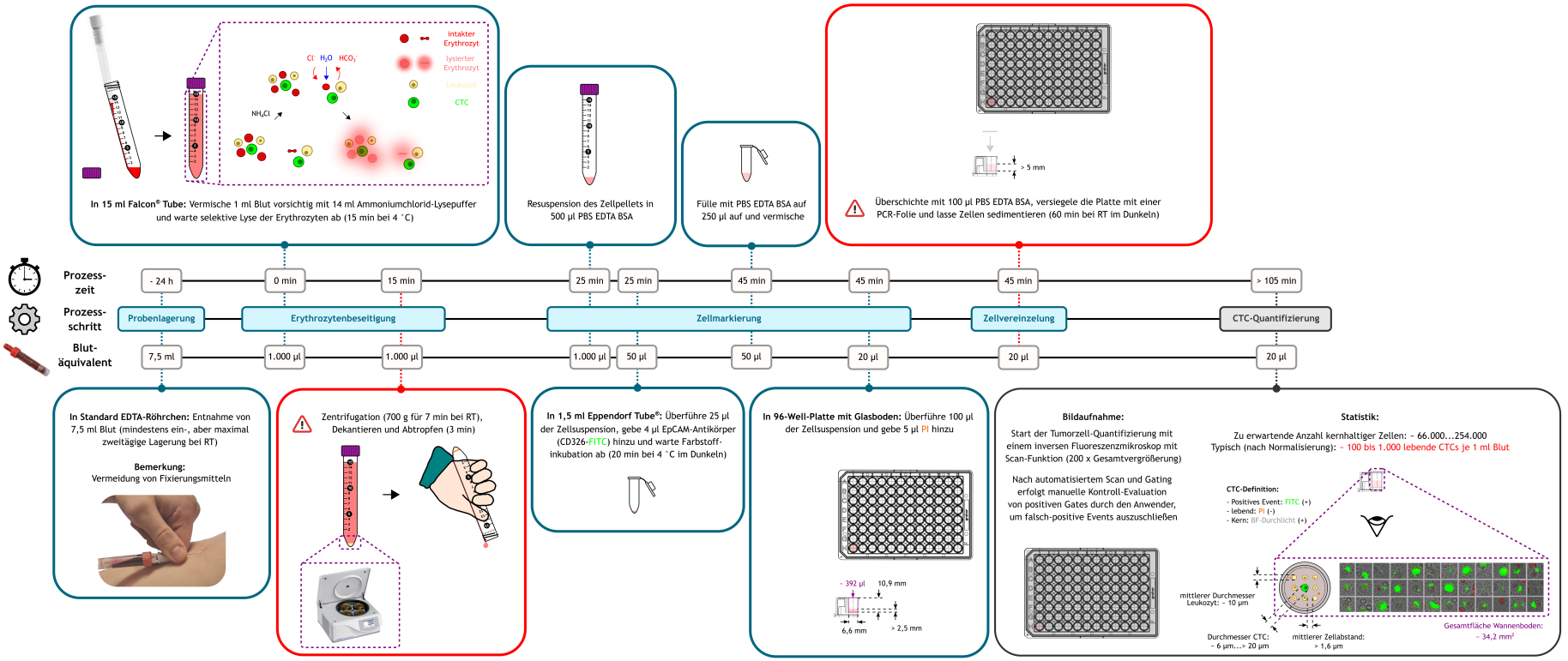


Abbildung 3.4: Workflow der maintrac®-Methode. (i) Teil 1 (EDTA-Röhrchen & traditionelles Labor-Equipment): Vollblut-Aufbereitung (in Blau hervorgehoben), welche die Probenlagerung, Erythrozytenbeseitigung, Zellmarkierung sowie Zellvereinzelung umfasst. (ii) Teil 2 (inverses Fluoreszenzmikroskop): CTC-Quantifizierung. Zu jedem Prozessschritt sind weiterhin die Prozesszeit (Zeitpunkt des Starts seit Prozessbeginn, siehe obere Schiene) sowie das Blutäquivalent (Vollblut-Volumen mit der äquivalenten Anzahl kernhaltiger Zellen, siehe untere Schiene) dargestellt. Die Bedeutung der in Rot hervorgehobenen Schritte wird in Kapitel 9 erläutert. Nach [9, 10, 19, 69, 71, 73–75].

Zellen als Sediment („Zellpellet“) abgetrennt werden. Es folgen Anfärbeschritte mit Verdünnungen und Aliquotierungen zur fluoreszenten Markierung von CTCs mit FITC-gelabelten EpCAM-Antikörpern und toten Zellen mit Propidiumiodid. Nach Herabsetzen auf den Boden einer 96-Well-Platte können die kernhaltigen Zellen aus einem Äquivalent von 20 µl Vollblut mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop quantifiziert werden. In die CTC-Statistik werden nur lebende EpCAM-positive Zellen mit Kern einbezogen, wobei angenommen wird, dass es sich im Falle von Krebspatienten dabei zum größten Teil um Zellen handelt, die dem Tumorgewebe entstammen und Metastasierungspotential besitzen [10, 19].

3.4 TECHNOLOGIEN FÜR DIE EINZELZELL-ISOLATION

Da die Reinheit einer CTC-Suspension nach einer Vollblut-Aufbereitung typischerweise noch unzureichend niedrig für Einzelzell-Analysen ist, bedarf es eines separaten Zwischenprozesses der Einzelzell-Isolation zur räumlichen Abtrennung der zu charakterisierenden Zellen. Dazu können, wie in Abbildung 3.5 zu sehen, traditionelle und moderne Technologien zum Einsatz kommen. Je nachdem, ob sich je Durchlauf räumlich abgetrennte Analysen von weniger als Hundert, wenigen Tausend oder mehr als Zehntausend Zellen ermöglichen lassen, können Technologien niedrige, mittlere oder hohe Isolationsdurchsätze zugeordnet werden [13, 29]. (i) Das Repertoire der ersten und bis heute noch routinemäßig eingesetzten Verfahren der Einzelzell-Isolation umfasst zwei Extrema: Zum einen beinhaltet es Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierungen (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS), die zwar standardmäßig automatisiert und für höchste Isolationsdurchsätze von bis zu mehreren Zehntausend Zellen pro Sekunde optimiert sind, jedoch nur mit großen Zellmischungen ($\sim$ Millionen Zellen) und im Durchflussverfahren mit limitierter visueller Kontrolle betrieben werden können. Ist man hingegen an einer Bild-basierten Einzelzell-Isolation aus unbewegten kleinen bis mittelgroßen Zellmischungen ($\sim$ Zehn- bis Hunderttausende Zellen) interessiert, so kann zum anderen die Lasermikrodissektion (Laser Capture Microdissection, LCM) oder Mikromanipulation via feiner Kapillare eingesetzt werden. Dabei können je Durchlauf allerdings nur sehr wenige Zellen pro Stunde manuell aus einem typischerweise fixierten Gewebe oder einer stark verdünnten Zellsuspension entnommen werden. (ii) Neu aufkommende Technologien bilden eine Brücke zwischen diesen beiden Extrema und vereinen deren Stärken durch den Einsatz von mikrostrukturierten Bauteilen (die Vorteile einer System-Miniaturisierung werden in Kapitel 4 erläutert). Somit können traditionelle Technologien nicht nur komplementiert, sondern zum Teil sogar bereits vollständig ersetzt werden. Als die drei größten und durchsatzstärksten Gruppen von mikrofluidischen Ansätzen, mit denen eine räumliche Abtrennung von einzelnen Zellen erreicht werden kann, lassen sich integrierte fluidische Netzwerke (Integrated Fluidic Circuits, IFCs), Mikrowannen und wässrige Tröpfchen in Öl benennen [76].

Je mehr Zellen von Interesse aus einer Zellmischung exklusiv und qualitativ hochwertig charakterisiert werden können, umso präziser ist die Beschreibung der zugrundeliegenden Heterogenität. Eine ideale Einzelzell-Isolation sollte daher nicht nur möglichst effizient, rein und schonend, sondern zugleich maximal schnell und automatisiert sein [13, 15, 77].

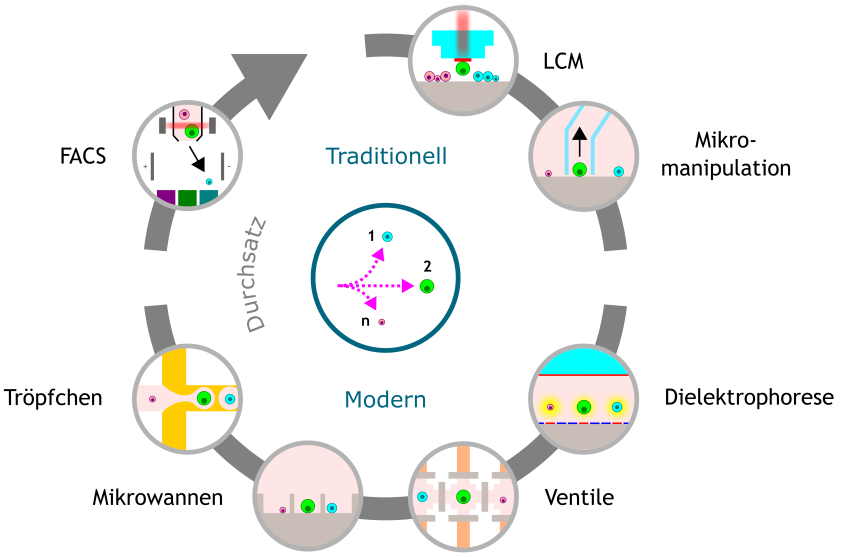


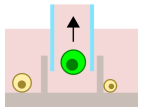
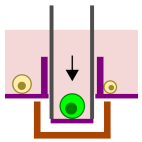
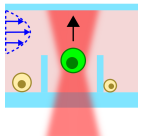
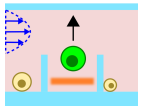
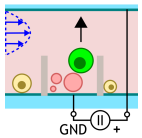
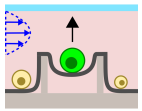
Abbildung 3.5: Technologien für die Einzelzell-Isolation im Überblick (angeordnet nach Isolationsdurchsatz, Farbkodierung siehe Abbildung 2.1). (i) Traditionelle Technologien umfassen die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS), Lasermikrodissektion (Laser Capture Microdissection, LCM) und Mikromanipulation. (ii) Moderne Technologien können Tröpfchen-, Mikrowannen-, Ventil- oder Dielektrophorese-basiert sein. Nach [13] (Abb. 1), [29] (Abb. 1).

3.4.1 *Mikrowannen-basierte Ansätze*

Mikrowannen sind miniaturisierte Behältnisse mit Durchmessern und Tiefen im Mikrometer-Bereich [76, 78]. Sie können entweder in einer offenen oder mikrofluidisch integrierten Konfiguration vorliegen und passiv über Sedimentation (Verteilung nach *Poisson*-Statistik[7]) oder aktiv über beispielsweise hydrodynamische Kräfte mit Zellen bzw. deren Komponenten beladen werden (siehe hierzu auch Kapitel 5). Nach einer Beladung stehen, je nach angestrebter Form der Einzelzell-Analyse, generell zwei Arten der Einzelzell-Isolation zur Verfügung, welche Mikrowannen-basierte Systeme gegenüber Tröpfchen- und Ventil-basierten Systemen durch relativ hohen Durchsatz bei gleichzeitig einfacher Handhabung auszeichnen: (i) Räumlich abgetrennte und mikroskopisch einsehbare Reaktionen können on-Chip mit sämtlichen Zellen innerhalb der Mikrowannen stattfinden, nachdem diese entweder chemisch durch eine nicht-wässrige Phase (z. B. Öl) oder mechanisch durch eine geeignete Abdeckung (diese kann undurchlässig, semipermeabel oder funktionalisiert sein) versiegelt wurden. Diese Form der Kompartimentierung kann z. B. bei der Antikörper-Entdeckung [79, 80] oder bei der Probenvorbereitung für Einzelzell-Sequenzierungen [81, 82] eingesetzt werden. (ii) Sollen einzelne Zellen aus den Mikrowannen hingegen (weiterführenden) Analysen off-Chip unterzogen werden, so können Mikrowannen um einen Mechanismus der selektiven Freigabe für eine Zellausgabe in Trägergefäße (Mikrotiterplatten, Reaktionsgefäße, etc.) erweitert werden. Einige bisherige Umsetzungen solcher Mechanismen mit Anwendungsbeispielen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

7 Bemerkung: Nach Siméon Denis Poisson (1781–1840).

Tabelle 3.2: Mikrowannen-basierte Systeme der Einzelzell-Isolation mit Möglichkeit der selektiven Freigabe von beladenen Zellen. Das vierte Umsetzungsbeispiel (OET) wird in der Draufsicht, die restlichen Umsetzungen in der Seitenansicht dargestellt.

SELEKTIVE FREIGABE		MIKROWANNEN		BELADUNG	ANWENDUNG	PRODUKT	REFERENZ
		Durchmesser & Tiefe (in µm)	Material				
OFFENE KONFIGURATION							
Automatisierte Kapillare		50 & 50	PDMS	Sedimentation	CTC Exom-Sequenzierung	ALS CellCelector™	[83]
Automatisierter Puncher		80 & 400	Si/Si_3N_4	Hydrodynamisch	CTC Viabilitätsuntersuchungen	VyCAP Puncher Platform	[84]
MIKROFLUIDISCH INTEGRIERTE KONFIGURATION							
Optical Tweezers (OT)		30 & 35	PDMS	Sedimentation	Manipulation von Zelllinien-Tumorzellen	Forschungsprototyp	[85]
Optoelectronic Tweezers (OET)		25 – 120 & 160 – 370	SU-8	OET	Antikörperentdeckung	Berkeley Lights Beacon® Optofluidic System	[86]
Bläschenerzeugung		130 & 130	SU-8	Sedimentation	Manipulation von Maus-Embryonen	Forschungsprototyp	[87]
Elastische Membran		30 – 100 & 30 – 100	Polymer-Kombination	Sedimentation	Manipulation von Zelllinien-Tumorzellen	Forschungsprototyp	[88]

3.4.2 *Das DEPArray™ NxT System*

Unter modernen Isolationsverfahren nehmen Dielektrophorese (DEP)-basierte Ansätze eine Exotenrolle ein. Zwar wurden in der Forschung bislang zahlreiche Architekturen für eine präzise DEP-Manipulation von einzelnen Zellen vorgeschlagen, allerdings haben sich nur die wenigsten Umsetzungen in der Routine-Anwendung als praktikabel bewährt (die wichtigsten Grundlagen und Umsetzungsbeispiele zur DEP in Mikrofluidiksystemen sind in Kapitel 6 zu finden).

Eine der prominentesten Technologien, bei der eine Kommerzialisierung erreicht wurde, ist das vollautomatisierte und Bild-basierte DEPArray™ NxT System (Menarini Silicon Biosystems S.p.A., Bologna, Italien) [14, 15, 89]. Das Kernelement des modularen Systems ist ein CMOS-Chip aus Silizium, mit dem Zellen in Suspension kontaktlos in sogenannten DEP-Käfigen manipuliert werden können (siehe Abbildungen 3.6a und 3.6b). Ein Chip besteht im Wesentlichen aus drei flachen Kammern, nämlich einer Haupt-, Park- und Ausgabekammer, deren Wände über ein doppelseitiges Klebeband definiert sind. Die Kammern sind jeweils mit einem Inlet-Outlet-Paar ausgestattet und über kleine Durchgangsöffnungen fluidisch miteinander verbunden. Auf den Böden der Kammern erstreckt sich lückenlos eine regelmäßige Anordnung von planaren und individuell adressierbaren Mikroelektroden, auf den Decken eine flächige Gegenelektrode aus optisch transparentem Indiumzinnoxid (Indium Tin Oxide, ITO). Ein funktionaler DEP-Käfig lässt sich insgesamt aus 3 x 3 Bodenelektroden und dem unmittelbar darüberliegenden Segment der Deckenelektrode generieren. Werden bei einer periodischen Anregung hierfür eine zentrale Bodenelektrode und die Deckenelektrode auf dem gleichen Potential („+“ bzw. In-Phase), die verbleibenden acht ringförmig angeordneten Bodenelektroden hingegen dazu gegenphasig („-“ bzw. Counter-Phase) angesteuert, so entsteht ein Minimum der elektrischen Feldstärke inmitten der flachen Kammern. In solchen geschlossenen DEP-Käfigen können Zellen dann auch in physiologischen Medien durch ausschließlich repulsive DEP-Kräfte in stabilen Gleichgewichtspunkten gehalten werden. Eine Zellbewegung resultiert nach Programmierung durch schrittweises Fortbewegen des Belegungsmusters an den Bodenelektroden, womit sich Zielzellen aus einer Zellsuspension in der Hauptkammer über eine Durchgangsöffnung in die mit einem frischen physiologischen Puffer befüllte Parkkammer transportieren und zwischenlagern lassen. Zellen können final, individuell oder in Pools, aus der Parkkammer in die Ausgabekammer transportiert und über einen Spülvorgang ausgegeben werden. Ein idealer Betrieb ist nach einem manuellen Zwischenschritt der Volumenreduktion mit dem VR™ NxT System [90] und einer Beladung der 9,26 µl großen Hauptkammer mit bis zu 20.000 angefärbten Zellen gewährleistet [14]. In der Liquid Biopsy lassen sich mit dem System innerhalb von etwa 3 Stunden insgesamt bis zu 96 lebende (oder geeignet fixierte) CTCs aus gesunden Blutzellen getrennt isolieren [91].

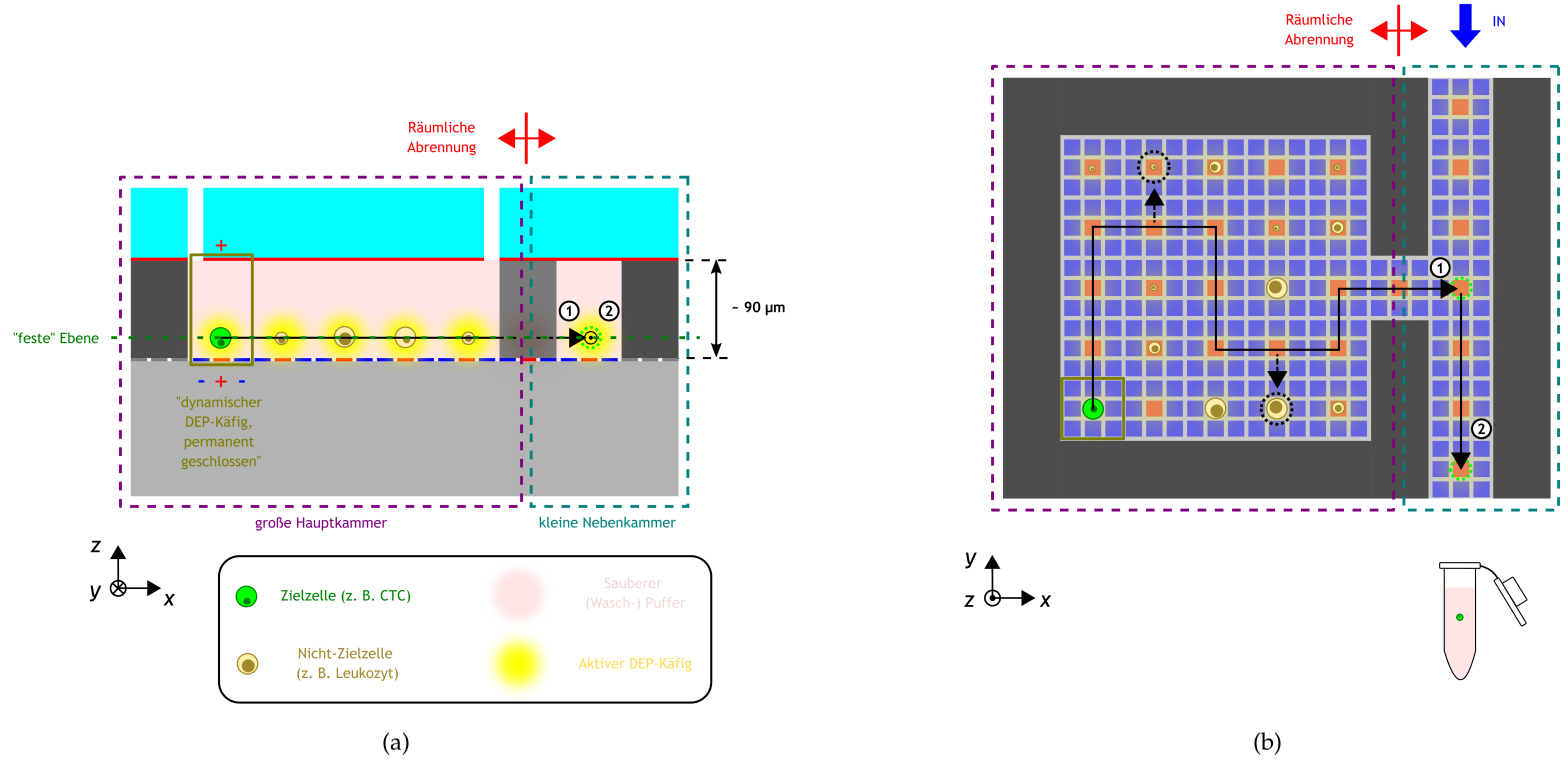


Abbildung 3.6: CMOS-Chip des modularen DEPArray™ Nxt Systems in einer perspektivischen Ansicht (Analysegerät nicht dargestellt). Der Chip besitzt eine große Hauptkammer, eine kleine Parkkammer und eine kleine Ausgabekammer. (1) Selektive Freigabe und (2) Zwischenlagerung: Einzelne Zielzellen können mithilfe von räumlich dynamischen und permanent geschlossenen DEP-Käfigen in einer festen Manipulationsebene (Ebene in Hellblau) parallelisiert und entlang von deterministischen Trajektorien an Nicht-Zielzellen vorbei aus der Hauptkammer in die Parkkammer überführt werden. (3) Ausgabe: Aus der Parkkammer ist eine Ausgabe in Standard-Trägergefäße möglich. Ein Chip integriert auf einer effektiven Gesamtfläche von 12,8 mm x 9,6 mm insgesamt über 300.000 quadratische Mikroelektroden mit 20 µm Kantenlänge, wobei in der Hauptkammer bei einer 3 x 3 Standard-Konfiguration ca. 30.000 DEP-Käfige erzeugt werden können. Nach [14] (Abb. 1), [92] (Abb. 1 & 2), [93].

4

LAB-ON-A-CHIP-SYSTEME

4.1 EINE GESAMTLÖSUNG: WUNSCH UND UMSETZUNGSFORMEN

Lab-on-a-Chip
Mikrofluidische Plattform als integriertes, miniaturisiertes und automatisiertes Zentrallabor [94, 95].

Bereits vor mehreren Jahrzehnten äußerte sich zum ersten Mal die Vision, den vollständigen Arbeitsablauf biochemischer Labore auf der Oberfläche eines einzigen Mikrochips – dem Lab-on-a-Chip (LoC)- System oder auch Micro Total Analysis System (μTAS) – integriert, miniaturisiert und automatisiert zusammenzufassen. Analog zum elektronischen Pendant einer integrierten Schaltung (Integrated Circuit, IC), bei der auf einer Leiterplatte einzelne Bauelemente mit verschiedenen Funktionen zu einem leistungsstarken Netzwerk zusammengefasst werden, besteht die Idee einer universellen mikrofluidischen Plattform darin, die für einen spezifischen Arbeitsablauf im Labormaßstab erforderlichen Teilschritte durch ein Repertoire mikrofluidischer Einheitsoperationen unter Einsatz einer wohldefinierten Fabrikationstechnologie in einer möglichst einfachen, schnellen, kostengünstigen und idealerweise monolithischen Form (z. B. auf einem Halbleiter-, Glas- oder Polymersubstrat) abzubilden. Zu den mikrofluidischen Einheitsoperationen können beispielsweise die Lagerung und Freisetzung, der Transport, die Portionierung, das Mischen, die Temperierung oder die Verschaltung von Fluiden durch Ventile, aber auch die Bildung und Teilung von Tröpfchen sowie die Anreicherung bzw. Amplifikation, Sortierung und Detektion eines Analyten gehören [96] (Kap. 1), [94, 95].

VORTEILE Die wesentlichen Vorteile, die mit einer solchen System-Miniaturisierung in Verbindung stehen, sind zusammengefasst [97] (Abschn. 1.1), [95, 98]:

- „Neuartige Physik“ (Skalierungsgesetze):
  Betrachtet man das Verhältnis [96] (Gl. (1.1))

  $$\frac{A}{V} \propto \frac{R^2}{R^3} = \frac{1}{R} \to \infty \; (R \to 0)$$

  zwischen der Oberfläche A und dem Volumen V eines Körpers mit charaktersitischer Abmessung R, dann wird ersichtlich, dass Volumenkräfte (wie z. B. die Gravitationskraft) und Effekte mit kubischer Abhängigkeit von R, die auf makro-/mesoskopischer Skala dominierend sind, mit zunehmender Miniaturisierung an Bedeutung verlieren. Stattdessen bestimmen auf Mikrometer-Skala Oberflächenkräfte (wie z. B. die Oberflächenspannung) und Effekte mit quadratischer (bzw. noch kleinerer Ordnung) Abhängigkeit von R das physikalische Erscheinungsbild des Körpers [96] (Abschn. 1.2). Damit lässt sich die Bibliothek der nutzbaren physikalischen Effekte zur Umsetzung von mikrofluidischen Einheitsoperationen entscheidend erweitern [35] (Unterabschn. 1.2.1).
- Reduzierung von Proben- und Reagenzienvolumina (Piko- bis Mikroliter)
- Reduzierung von Reaktionsdauern („Time-to-Result“ in Minuten bis Stunden)

- Steigerung von Sensitivität und Spezifität (räumlich, wie auch zeitlich)
- Tragbarkeit, niedriger Energieverbrauch sowie Reduzierung der Kosten je Gerät und Test (Einweggebrauch)
- Steigerung von Durchsatz und statistischer Aussagekraft
- Programmierbarkeit und Benutzerfreundlichkeit

Das während des 20. Jahrhunderts etablierte Know-How und die Prozesse zur Herstellung klassischer Halbleiter-basierter MEMS (Microelectromechanical Systems) legten den Grundstein für die bis heute andauernde dramatische Entwicklung der Mikrofluidik und Bio-MEMS ab den frühen 2000er Jahren [95, 99]. Es entwickelte sich eine Vielzahl von mikrofluidischen Plattformen, die auf unterschiedlichen Aktuationsmechanismen beruhen und in verschiedenen Bereichen des alltäglichen Lebens eingesetzt werden können. So unterscheidet man, wie in den Abbildungen 4.1a bis 4.1d zu erkennen ist, heutzutage kapillar-, druck-, zentrifugal- und elektrokinetisch-betriebene Plattformen, die überwiegend in der In-Vitro-Diagnostik, Medikamentenforschung, Biotechnologie und Ökologie eingesetzt werden [95, 100–102].

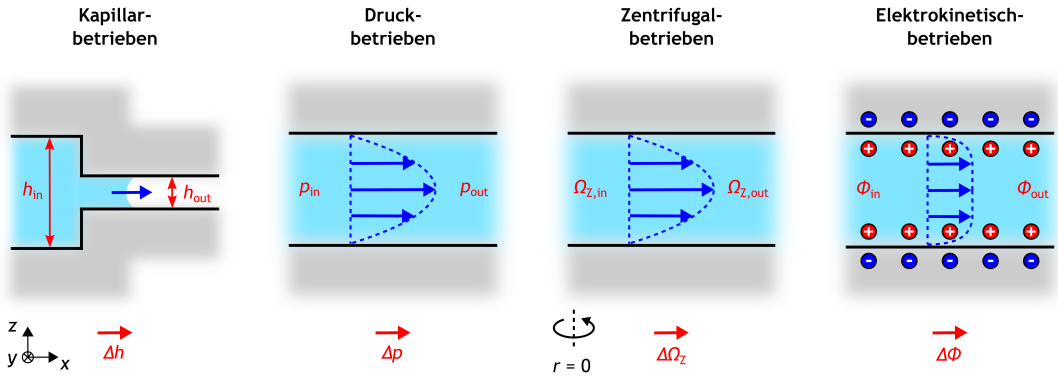


Abbildung 4.1: Typen von Lab-on-a-Chip-Systemen (Mikrofluidikkanäle in der Seitenansicht mit dem jeweiligem Aktuationsmechanismus in Rot). Zwischen dem In- und Outlet eines Kanals vorliegende Differenzen (a) in der Kanalhöhe h, (b) im hydraulischen Druck p, (c) in der Winkelgeschwindigkeit Ω_Z oder (d) im elektrostatischen Potential ϕ (elektroosmotischer Fluss, EOF) können für eine Bewegung des eingeschlossenen Fluids sorgen. Nach [95] (Abb. 4).

Eines der ältesten und womöglich bekanntesten Beispiele für eine erfolgreich kommerzialisierte mikrofluidische Plattform ist der Lateral-Flow-Test („Teststreifen“). Hierbei handelt es sich um einen kapillar-betriebenen Schnelltest, der z. B. zur Messung des Blutzuckerspiegels und zum Nachweis von Schwangerschaften oder viralen Infektionen eingesetzt werden kann. Nach Eingabe der Probe wird diese durch ein absorbierendes Pad (poröses Papier, Vliesstoff, etc.) rein passiv über Kapillarkräfte quer über den Schnelltest transportiert. Der nachzuweisende Analyt durchläuft dann ein weiteres Pad, in welchem mit Nanopartikeln konjugierte Primärantikörper trocken vorgelaget sind. Trägt der Analyt ein Antigen, welches mit dem Primärantikörper kompatibel ist, so kommt es zu einer Bindung der beiden Partner. An einer

Testlinie, entlang welcher eine zweite Sorte von Antikörpern immobilisiert ist, können diese Bindungspartner zurückgehalten und durch ein Detektionsfenster anhand eines Farbumschlags mit dem bloßen Auge nachgewiesen werden. Ein Testergebis liegt in der Regel in weniger als 15 Minuten vor. Lateral-Flow-Tests können dank ihres sehr einfachen Aufbaus extrem konstengünstig und somit in großen jährlichen Stückzahlen (∼ Milliarden) hergestellt werden [95].

4.2 DIE *vivalytic*-PLATTFORM: ANALYSEN AM POINT-OF-CARE

Klassischerweise werden in der In-vitro-Diagnostik die Analysen von Patientenproben in einem Zentrallabor durchgeführt. Damit liegt zwischen der Entnahme der Probe durch den Arzt und der Diagnose für den Patienten ein in der Regel mehrtägiger und teilweise manueller Arbeitsaufwand vor. Wie in Abbildung 4.2 für die Molekulardiagnostik dargestellt, kann dieser unter anderem die Vorbereitung der Probe, die Zellyse, die DNA- bzw. RNA-Extraktion, -Aufreinigung und -Amplifikation sowie die finale bioanalytische Detektion umfassen. Sind an eine Analyse allerdings zeitkritischere Rahmenbedingungen gestellt, etwa im Kontext einer Epidemie mit schnell steigenden Erkrankungszahlen, so müssen weitreichendere Bemühungen unternommen werden. Ein Lösungsansatz, der sich hierfür etabliert hat und dem eine immer größere Bedeutung zugewiesen wird, ist die Testung am sogenannten Point-of-Care (PoC). Er versteht eine Analyse der Patientenprobe innerhalb von wenigen Minuten noch am Ort der Entnahme, also zum Beispiel in der Arztpraxis, und prädestiniert somit den Einsatz von tragbaren Lab-on-a-Chip-Systemen [95].

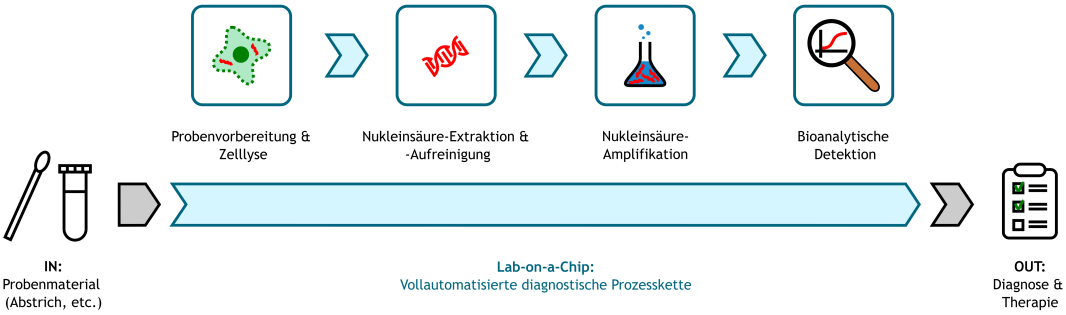


Abbildung 4.2: Typischer Arbeitsablauf einer molekulardiagnostischen Analyse mit Möglichkeit der Automatisierung durch ein Lab-on-a-Chip. Nach [103] (Abb. 1).

Im Jahr 2020 notierte die Bosch Healthcare Solutions (BHCS) GmbH den Markteintritt der *Vivalytic*-Plattform, einem proprietären Lab-on-a-Chip-System als All-in-One-Lösung für molekulardiagnostische Analysen von medizinischen Proben. Es handelt sich, wie den Abbildungen 4.3a und 4.3b entnommen werden kann, um eine modulare druck-betriebene Mikrofluidikplattform, bestehend aus einem universellen Analysegerät (Diagnostics Unit, DxU) und einer an die zu untersuchende Erkrankung angepassten Analysekartusche (Diagnostics Cartridge, DxC) [104, 105].

Eine Analysekartusche ist für den Einweggebrauch bestimmt und kann Proben variabler Art (Blut, Abstriche, Sputum, Urin, Gewebeproben, etc.) mit Volumina zwischen 50 µl bis maximal 1.000 µl fassen. Sie setzt sich aus mehreren Lagen spritzge-

gossener Einzelteile aus optisch transparentem Polycarobnat (PC) und schwarzem thermoplastischem Polyurethan (TPU) zusammen und integriert sämtliche für einen automatisierten Testlauf erforderlichen Reagenzien in Vorlagerungskapseln (insgesamt bis zu sechs Kapseln à 350 µl und drei Kapseln à 650 µl bei einer maximalen Lagerdauer von bis zu zwei Jahren). Die gegenwärtig angebotenen Analysekartuschen können unter anderem zum Nachweis von sexuell übertragbaren Infektionen (Sexually Transmitted Infection, STI), Atemwegsinfektionen (Respiratory Tract Infection, RTI) und SARS-CoV-2 [106] eingesetzt werden. Weitere anwendungsspezifische mikrofluidische Netzwerke können sowohl in der Serienfertigung, als auch im Prototyping [107], realisiert und per Software angesteuert werden, wobei z. B. peristaltischer Flüssigkeitstransport, eine Mischkammer sowie ein Waste-Management zur Verfügung stehen [104, 105].

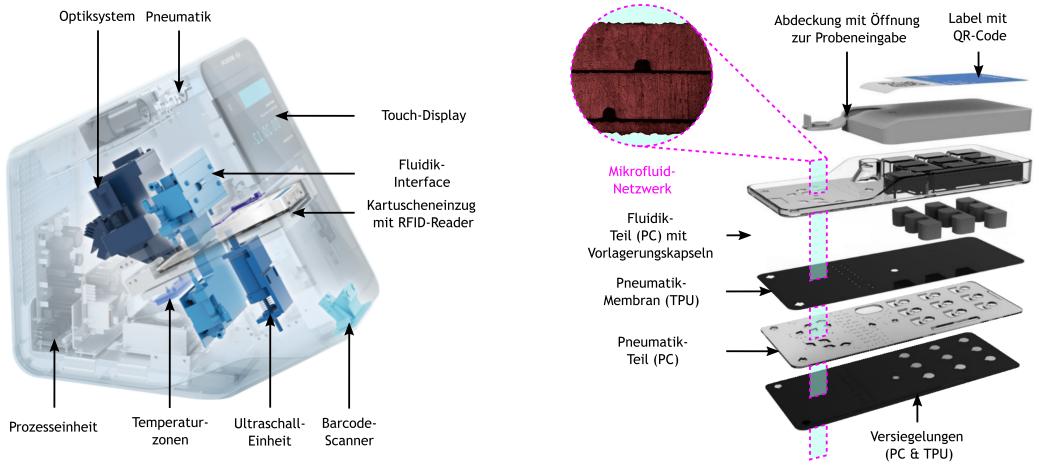


Abbildung 4.3: (a) Perspektivische Darstellung eines Analysegeräts (inkl. eingelegter Analysekartusche) der modularen *Vivalytic*-Plattform mit den wichtigsten Komponenten und (b) Explosionszeichnung einer Analysekartusche. Der Detailausschnitt zeigt eine Mikroskopieaufnahme des Lagenaufbaus einer realen gefügten Analysekartusche mit Mikrofluidikkanälen im Querschnitt. Abgeändert aus [104, 105] mit Genehmigung durch die Bosch Healthcare Solutions GmbH.

Der für die Aktuation der flexiblen Pneumatik-Membran erforderliche Druckgradient wird über ein Mikro-Makro-Fluidikinterface zur Pneumatik innerhalb des Analysegeräts bereitgestellt. Letzteres kann ohne weitere Peripheriegeräte bedient werden und enthält ferner Heizelemente und eine Optikeinheit zur Temperierung und Detektion biochemischer Reaktionen. Die aktuell unterstützten Nachweismethoden sind Schmelzkurvenanalysen sowie qualitative und quantitative Polymerase-Kettenreaktionen (qPCR) im Singleplex und Multiplex per Silizium-Mikroarray [104, 105].

5

STRÖMUNGSMECHANIK IN MIKROFLUIDIKSYSTEMEN

Mikrofluidik
Bewegung von Fluiden in Systemen mit Sub-Millimeter-Abmessungen [96].

Die Mikrofluidik ist ein Teilgebiet der Strömungsmechanik, welches sich mit der Bewegung von Fluiden, also Gasen und Flüssigkeiten, durch äußere Kräfte in Systemen mit Sub-Millimeter-Abmessungen beschäftigt [96] (Kap. 1). In LoC-Systemen spielen vor allem inkompressible Newton'sche Flüssigkeiten[1], wie z. B. Wasser, eine zentrale Rolle und sollen daher in den nachfolgenden Abschnitten genauer betrachtet werden.

5.1 GRUNDLAGEN DER FLUIDDYNAMIK

Die Strömung einer inkompressiblen newton'schen Flüssigkeit kann durch die nichtlineare partielle Differentialgleichung 2. Ordnung [96] (Gl. (2.30)), [109] (Gl. (5.3))

$$\rho_\mathrm{m}\left(\frac{\partial\overline{v}(\overline{r},t)}{\partial t}+(\overline{v}(\overline{r},t)\cdot\nabla)\overline{v}(\overline{r},t)\right)=-\nabla p(\overline{r},t)+\eta\Delta\overline{v}(\overline{r},t)+\overline{f}_V(\overline{r},t) \tag{5.1}$$

beschrieben werden, welche auch als *Navier-Stokes*-Gleichung[2] (Impulssatz) bezeichnet wird[3]. Hierbei stellen $\overline{r}=(x,y,z)^\mathrm{T}$ den kartesischen Ortsvektor und t die Zeit dar. Weiterhin stehen ρ_m für die Massendichte, η für die dynamische Viskosität und $\overline{v}(\overline{r},t)$ für den Geschwindigkeitsvektor der Flüssigkeit (im weiteren Verlauf der Arbeit auch als Medium bezeichnet). $\overline{f}_V(\overline{r},t)$ ist der Vektor einer allgemeinen äußeren Gesamt-Volumenkraft (enthält beispielsweise einen gravitativen oder elektrischen Beitrag) und $p(\overline{r},t)$ der hydraulische Druck, die auf ein Einheitsvolumen dieses Mediums wirken [96] (Unterabschn. 2.2.4 & 2.2.5), [109] (Abschn. 5.3).

INTERPRETATION Möchte man eine pauschale Aussage über die Strömungsform treffen, so bietet sich dafür die dimensionslose Reynolds-Zahl [96] (Gl. (2.39))

$$Re\equiv\frac{\rho_\mathrm{m}v_0l_0}{\eta}$$

an. Sie kann nach Gleichung (5.1) als Verhältnis zwischen Trägheitsterm $\rho_\mathrm{m}(\overline{v}\cdot\nabla)\overline{v}$ und viskosem Term $\eta\Delta\overline{v}$ aufgefasst werden. Für eine Situation, in der ein Kanal der charakteristischen Dimension l_0 mit der Geschwindigkeit v_0 durchströmt wird, resultieren damit folgende Regime (siehe hierzu auch Abschnitt 5.3):

- Schwach gedämpfte Strömung:

  Für $Re\gtrsim 2.000$ wird eine Strömung als turbulent bezeichnet. Stromlinien von $\overline{v}$ folgen keinem räumlich oder zeitlich deterministischen Verlauf und es kommt zu einem chaotisch-konvetkiven Durchmischen der Flüssigkeit [98].

1 Bemerkung: Es liegt eine Invarianz der Massendichte gegenüber Druckänderungen sowie der Viskosität gegenüber Belastungsänderungen vor [108] (Kap. 6). Nach Isaac Newton (1643–1727).
2 Bemerkung: Nach Claude Louis Marie Henri Navier (1785–1836) & George Gabriel Stokes (1819–1903).
3 Bemerkung: Eine ausführliche Herleitung ist z. B. in [96] (Kap. 2) zu finden.

- Gedämpfte Strömung:

  Für $Re \lesssim 2.000$ wird eine Strömung als laminar bezeichnet. Benachbarte Flüssigkeitsschichten verlaufen parallel zueinander und eine Vermischung geschieht nur durch Diffusion. Dieser Fall trifft in Mikrofluidiksystemen mit $l_0 \lesssim 1.000\ \mu\text{m}$ und $v_0 \lesssim 1\ \text{m/s}$ typischerweise zu, denn für Wasser mit $\rho_\text{m} \sim 1 \cdot 10^3\ \text{kg/m}^3$ und $\eta \sim 1 \cdot 10^{-3}\ \text{Pa} \cdot \text{s}$ ist $Re \lesssim 1.000$ [109] (Unterabschn. 5.1.2).

- Stark gedämpfte Strömung:

  Für Reynolds-Zahlen $\ll 1$ kann der Trägheitsterm in der Impulsgleichung (5.1) sogar vollkommen vernachlässigt werden und es wird von einer kriechenden Strömung (*Stokes*-Strömung) gesprochen [98].

5.2 DAS GESETZ VON HAGEN-POISEUILLE

Eine analytische Lösung der *Navier-Stokes*-Gleichung mit fundamentaler Bedeutung für den Flüssigkeitstransport in Lab-on-a-Chip-Systemen ist die *Hagen-Poiseuille*-Strömung[4]. Damit ist eine Strömung zu verstehen, die sich nach Anlegen einer hydraulischen Druckdifferenz $\Delta p = p_\text{in} - p_\text{out}$ zwischen dem Ein- und Ausgang (In- und Outlet) eines langgezogenen[5] Kanals mit festen Wänden und konstantem Querschnitt im zeitlich stationären Zustand[6] einstellt [96] (Abschn. 3.4).

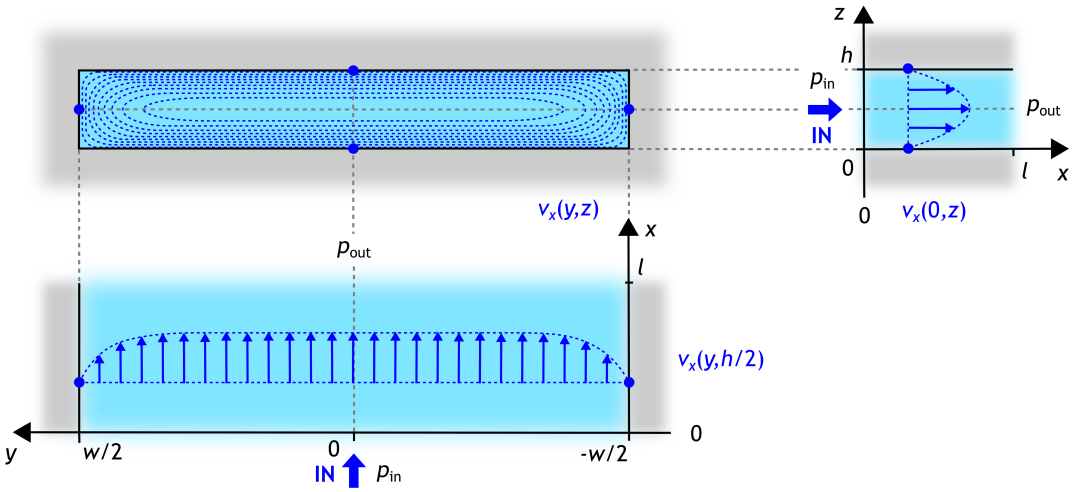


Abbildung 5.1: Isolinien des laminaren Strömungsprofils $v_x(y,z)$ nach *Hagen-Poiseuille* für einen beispielhaften rechteckigen Mikrofluidikkanal der Höhe h, Breite w und Länge l (die Kanalwände sind parallel zur x-Achse orientiert). Die Projektionen zeigen das Profil in der x-y- (Draufsicht) sowie in der x-z- (Seitenansicht) Ebene, jeweils entlang eines Schnitts durch die Kanalmitte. $v_x(0,z)$ entspricht qualitativ dem parabolischen Strömungsprofil, das in einem unendlich breiten Kanal vorzufinden wäre. Nach [96] (Abb. 3.9).

4 Bemerkung: Nach Gotthilf Hagen (1797–1884) & Jean Léonard Marie Poiseuille (1797–1869).

5 Annahme: Das Strömungsprofil ist vollständig aufgebaut. Das heißt, die Beschreibung bezieht sich auf ein Kanalsegment, welches weit genug – nämlich mindestens eine Eingangslänge – vom Eingangspunkt entfernt liegt. In Mikrofluidiksystemen und für niedrige Reynolds-Zahlen ist die Eingangslänge in der Regel klein genug, um vernachlässigt werden zu können [109] (Unterabschn. 5.2.2), [108] (Abb. 6.6).

6 Annahme: $\overline{v}(\overline{r},t)$ besitzt keine Zeitabhängigkeit, womit $\frac{\partial \overline{v}(\overline{r},t)}{\partial t} = 0$ ist [96] (Abb. 4.1).

Ein besonders einfach realisierbarer und daher häufig eingesetzter Kanaltyp ist der Rechteckkanal. Für einen unendlich breiten Kanal mit Höhe h und Länge l kann der Geschwindigkeitsvektor $\overline{v}$ im laminaren Fall nach [96] (Gl. (3.29))

$$\overline{v}(\overline{r}) = v_x(z)\ \hat{\mathrm{e}}_x = \frac{\Delta p}{2\eta l}(h-z)z\ \hat{\mathrm{e}}_x \tag{5.2}$$

mit einer Funktion zweiter Ordnung beschrieben werden ($\hat{\mathrm{e}}_x$ ist der kartesische Einheitsvektor in x-Richtung). Es wird angenommen, dass es an den Wänden des Kanals durch Reibung zu einem Ruhen der Flüssigkeit kommt (No-Slip-Bedingung). In der Realität muss Gleichung (5.2) allerdings um eine zusätzliche Abhängigkeit in y-Richtung erweitert werden, da Mikrofluidikkanäle, wie in Abbildung 5.1 dargestellt, nur eine endliche Breite w besitzen. Mithilfe der Fourier-Reihe [96] (Gl. (3.56))

$$\overline{v}(\overline{r}) = v_x(y,z)\ \hat{\mathrm{e}}_x = \frac{4h^2\Delta p}{\pi^3\eta l}\sum_{m=1}^{\infty}\frac{1}{m^3}\left(1-\frac{\cosh\left(m\pi\frac{y}{h}\right)}{\cosh\left(m\pi\frac{w}{2h}\right)}\right)\sin\left(m\pi\frac{z}{h}\right)\ \hat{\mathrm{e}}_x \tag{5.3}$$

kann diese Situation berücksichtigt und das Strömungsprofil in einem solchen flachen Kanal beschrieben werden (m ist ungerade und es gelte $w \geq h$). Eine Integration des Profils über die Querschnittsfläche in der y-z-Ebene gemäß [96] (Gl. (3.57))

$$Q = \int_{y=-\frac{w}{2}}^{\frac{w}{2}}\int_{z=0}^{h} v_x(y,z)\ \mathrm{d}y\ \mathrm{d}z = \frac{h^3 w\Delta p}{12\eta l}\left(1-\sum_{m=1}^{\infty}\frac{1}{m^5}\frac{192}{\pi^5}\frac{h}{w}\tanh\left(m\pi\frac{w}{2h}\right)\right) \tag{5.4}$$

liefert den Gesamt-Volumenstrom durch den Kanal.

5.3 MEDIUM-PARTIKEL-WECHSELWIRKUNG

Ist das mikrofluidische Durchmischen oder der Transport von Probenmaterial erwünscht, so muss ein grundlegendes Verständnis für die Wechselwirkungen zwischen einem Trägermedium und dem darin enthaltenen Analyten vorliegen.

MECHANISMEN Eine einfache, jedoch häufig ausreichende Annahme besteht darin, den in seiner Geometrie in der Regel komplexen Analyten, nachfolgend auch als Partikel bezeichnet, als ein starres Kügelchen mit effektivem hydrodynamischem Radius R anzusehen. In den meisten Fällen ist R deutlich kleiner als die charakteristische Systemdimension, so dass darüber hinaus eine Störung des Strömungsprofils durch das Partikel vernachlässigt werden kann [110]. Für eine Partikelbewegung können folgende Effekte ausgenutzt werden:

1. Konvektion:

   Das Gesetz von *Stokes* formuliert die Reibungskraft (*Stokes*-Kraft) auf ein sphärisches Partikel in einer schleichenden Flüssigkeit als [96] (Gl. (3.128))

   $$\overline{F}_{\mathrm{Stokes}} = 6\pi\eta R\overline{v}_{\mathrm{rel}} = 6\pi\eta R(\overline{v}-\overline{v}_{\mathrm{p}}). \tag{5.5}$$

   $\overline{v}_{\mathrm{rel}}$ ist hier die Relativgeschwindigkeit, die zwischen dem Medium und dem Partikel mit den Geschwindigkeiten $\overline{v}$ und $\overline{v}_{\mathrm{p}}$ vorliegt (siehe Abbildung 5.2a).

Ein Spezialfall entsteht, wenn das Medium ruht und eine Partikelbewegung rein gravitativ induziert ist. In dieser Situation spricht man auch von Sedimentation (siehe Abbildung 5.2b). Eine Sedimentationskraft [35] (S. 35)

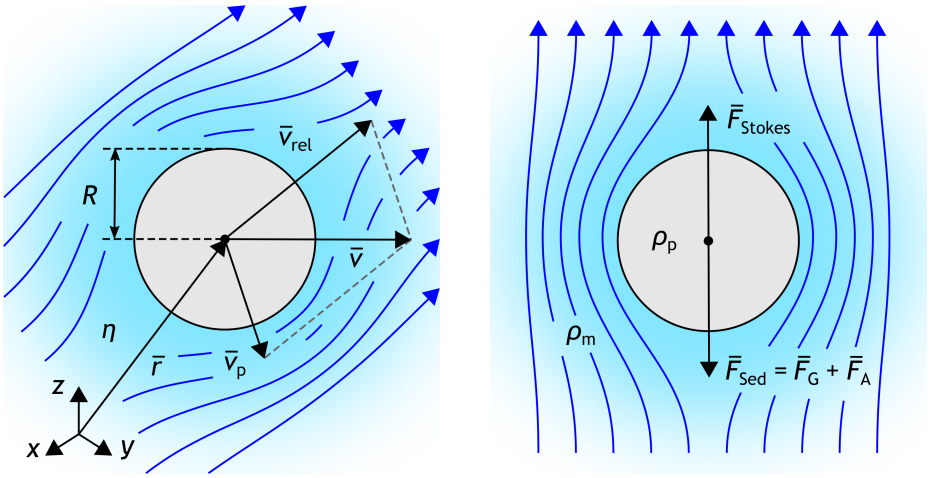
$$\overline{F}_{\mathrm{Sed}} = \overline{F}_{\mathrm{G}} + \overline{F}_{\mathrm{A}} = -\frac{4}{3}\pi R^3(\rho_{\mathrm{p}} - \rho_{\mathrm{m}})g\ \hat{\mathrm{e}}_z \tag{5.6}$$

als Summe der Gewichtskraft des Partikels $\overline{F}_{\mathrm{G}}$ und der statischen Auftriebskraft des verdrängten Mediums $\overline{F}_{\mathrm{A}}$ resultiert dann, wenn Partikel und Medium unterschiedliche Massendichten ρ_{p} und ρ_{m} besitzen. Je nachdem, ob ein Partikel schwerer ($\rho_{\mathrm{p}} > \rho_{\mathrm{m}}$) oder leichter ($\rho_{\mathrm{p}} < \rho_{\mathrm{m}}$) als das Medium ist, sinkt es mit der Erdbeschleunigungskonstanten $g = 9{,}806\ \mathrm{m/s^2}$ in Richtung Boden herab oder treibt in entgegengesetzter Richtung auf. Ein Vergleich von (5.5) und (5.6) liefert die Gleichgewichtsgeschwindigkeit des Partikels [109] (Gl. (9.1))

$$\overline{v}_{\mathrm{p}} = \overline{v}_{\mathrm{Sed}} = -\frac{2}{9}\frac{(\rho_{\mathrm{p}} - \rho_{\mathrm{m}})}{\eta}R^2 g\ \hat{\mathrm{e}}_z. \tag{5.7}$$

2. Diffusion:

   Für Partikel mit Durchmessern $\lesssim 1\ \mu\mathrm{m}$ sind weiterhin thermisch induzierte Kollisionen mit den Atomen des Trägermediums signifikant, welche sich in einer ungerichteten *Brown*'schen Bewegung[7] äußern [110, 111].



(a) (b)

Abbildung 5.2: (a) *Stokes*-Kraft auf ein bewegtes Partikel in einer schleichenden Strömung. $\overline{v}_{\mathrm{p}}$ ist die Geschwindigkeit des Partikels im Gleichgewichtszustand nach Überlagerung sämtlicher im System wirkenden Kräfte, $\overline{v}$ die lokale Strömungsgeschwindigkeit. (b) Sedimentation eines sphärischen Partikels. Die blauen Stromlinien deuten eine Bewegung der Flüssigkeit relativ zu einem als ruhend gedachten Partikel an. Nach [96] (Abb. 3.12).

7 Bemerkung: Nach Robert Brown (1773–1858).

6

PARTIKELMANIPULATION PER DIELEKTROPHORESE: THEORIE UND PRAKTISCHE ANWENDUNG

DEP-Manipulation
Räumliche Bewegung eines Partikels via Dielektrophorese [35].

In diesem Kapitel werden diejenigen theoretischen Grundlagen eingeführt, die zum Verständnis der Dielektrophorese als Manipulationswerkzeug für in Mikrofluidiksystemen suspendierte Partikel, so etwa für die Isolation und Charakterisierung von Stammzellen, die Sortierung von Tumorzellen aus Blut oder die Zell-basierte Medikamententestung, notwendig sind. Die Möglichkeit der Anwendung der Theorie soll hierbei aber nicht nur auf Mikropartikel wie Zellen oder zelluläre Komponenten beschränkt sein, sondern kann gleichermaßen auch auf gelöste Nanopartikel wie zum Beispiel Viren, Proteine oder Nukleinsäuren ausgeweitet werden [35, 112].

6.1 PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN

Die Dielektrophorese (DEP) beschreibt die Bewegung eines elektrisch polarisierbaren Partikels innerhalb eines, relativ dazu, unterschiedlich polarisierbaren Mediums infolge der Wechselwirkung von induzierten Polarisationsladungen mit einem räumlich inhomogenen elektrischen Gleich- oder Wechselfeld (DC- oder AC-Betrieb). Der elektrokinetische Effekt kann insbesondere auch zur Manipulation von elektrisch neutralen Partikeln eingesetzt werden und ist damit gegenüber der Elektrophorese (EP), die auf der Bewegung eines geladenen Partikels innerhalb eines statischen elektrischen Feldes beruht, grundlegend abzugrenzen [113, 114].

6.1.1 *Elektrisches Feld und induzierte Polarisation*

Die elektrische Feldstärke ist definiert als [35] (Gl. (2.1))

$$\overline{E}(\overline{r}) = \frac{\overline{F}_{\mathrm{EP}}(\overline{r})}{q} \tag{6.1}$$

und beschreibt die Fähigkeit eines elektrischen Feldes, eine *Coulomb*-Kraft[1] $\overline{F}_{\mathrm{EP}}(\overline{r})$ auf eine infinitesimal kleine Testladung q an der Stelle $\overline{r}$ auszuüben. Das elektrische Feld, dass durch eine (negative) Punktladung hervorgerufen wird, ist radialsymmetrisch und schematisch in Abbildung 6.1a zu erkennen. Nach dem Superpositionsprinzip können die Beiträge einzelner Punktladungen linear überlagert und das resultierende Feld an einer beliebigen Stelle im Raum als Vektorsumme aller Einzelfelder berechnet werden. Dies wird durch den *Gauß*'schen Satz[2] [109] (Gl. (2.3))

$$\nabla \cdot \overline{E} = \frac{\rho}{\varepsilon_0} \tag{6.2}$$

für elektrische Felder im Vakuum verallgemeinert. ρ ist eine beliebige Dichteverteilung freier Raumladungen und $\varepsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12}$ F/m die elektrische Feldkonstante.

1 Bemerkung: Nach Charles Augustin de Coulomb (1736–1806).
2 Bemerkung: Nach Johann Carl Friedrich Gauß (1777–1855).

Aus einer gegebenen Feldstärkeverteilung lässt sich dann mithilfe von [109] (S. 16)

$$\overline{E} = -\nabla\phi$$

das elektrostatische Potential ϕ ableiten [35] (Abschn. 2.2), [109] (Abschn. 2.1).

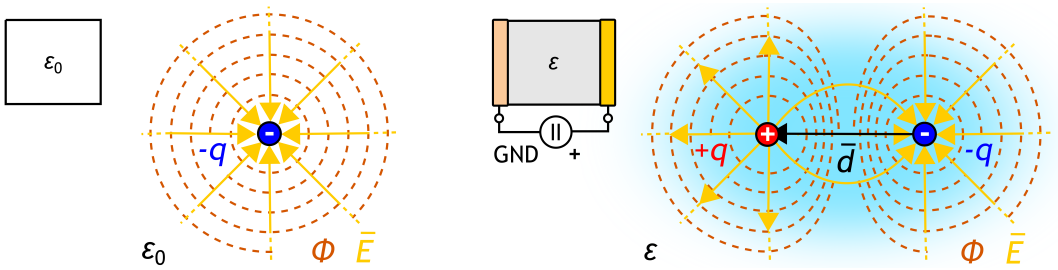


Abbildung 6.1: (a) Negative Punktladung im Vakuum ($\varepsilon_r = 1$) und (b) induzierter physikalischer elektrischer Dipol, bestehend aus zwei im Abstand d voneinander getrennten Punktladungen $-q$ und $+q$, in polarisierbarer Materie ($\varepsilon_r > 1$). Die durchgezogenen Pfeile (in Gelb) deuten den Vektor der elektrischen Feldstärke $\overline{E}$ und die unterbrochenen Linien (in Orange) Äquipotentiallinien des elektrostatischen Potentials ϕ an. Abkürzungen: GND – Ground. Nach [109] (Abb. 2.2 & 2.3).

Als Dielektrikum wird ein Material bezeichnet, welches beim Anlegen eines elektrischen Feldes Polarisationsladungen ausbilden kann. Positive und negative Ladungen, die in einem ungeladenen Dielektrikum paarweise auftreten, werden dabei in entgegengesetzte Richtungen ausgelenkt und es formt sich, wie in Abbildung 6.1b dargestellt, ein elektrischer Dipol mit dem Dipolmemoment [109] (Gl. (2.11))

$$\overline{p}^{(1)} = q\overline{d}. \tag{6.3}$$

Hier ist $\overline{d}$ der Abstandsvektor, der die getrennten Punktladungen $-q$ und $+q$ verbindet. Das Polarisationsfeld lässt sich über [109] (Gl. (2.18))

$$\overline{P} = N\overline{p}^{(1)} = N\alpha\overline{E}$$

mit der (lokalen) elektrischen Feldstärke in eine Beziehung bringen, in der N die Dipol-Anzahl pro Volumen und α die Polarisierbarkeit des Dielektrikums ist[3]. Unter Anwesenheit von polarisierbarer Materie muss Gleichung (6.2) zu [109] (Gl. (2.24))

$$\nabla \cdot \overline{D} = \rho$$

umformuliert werden, um, neben freien Ladungen, weiterhin induzierte Polarisationsladungen zu berücksichtigen. Die neue Größe, die dabei eingeführt wird, ist die elektrische Flussdichte $\overline{D}$. Sie steht im Allgemeinen wie folgt mit der elektrischen Feldstärke und Polarisation in Verbindung [109] (S. 24):

$$\overline{D} = \varepsilon_0\overline{E} + \overline{P}.$$

3 Bemerkung: Lässt sich ein Dielektrikum verlustfrei polarisieren, so wird es als ideal, und im Falle von elektrischen Verlusten als real, bezeichnet. Je nach Mechanismus können an der Polarisation entweder gebundene oder frei bewegliche Ladungen beteiligt sein (siehe hierzu auch Unterabschnitt 6.2.1).

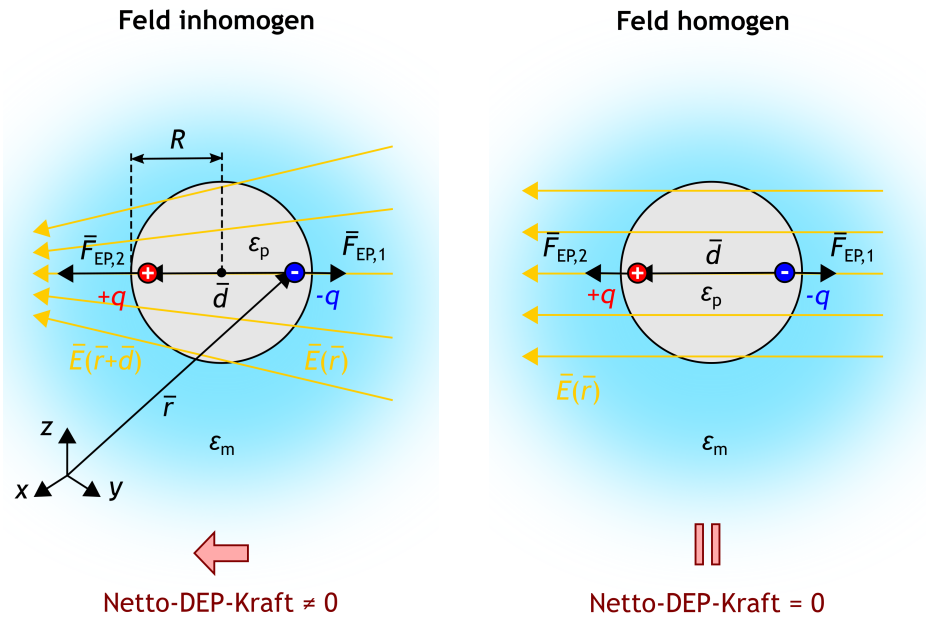
Häufig handelt es sich beim betrachteten Dielektrikum um ein lineares und isotropes Medium, sodass eine Vereinfachung zu [109] (S. 24)

$$\overline{D} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \overline{E} = \varepsilon \overline{E}$$

vorgenommen werden kann, in der $\varepsilon_r > 1$ die relative und ε die absolute elektrische Permittivität des Mediums ist [109] (Abschn. 2.2 & 2.3).

6.1.2 *DC-Betrieb: DEP-Kraft auf einen elektrischen Dipol*

In Abbildung 6.2a ist ein homogenes dielektrisches sphärisches Partikel (grau) mit Radius R und Permittivität ε_p dargestellt. Das Partikel sei ungeladen und enthalte einen induzierten Dipol der Länge $\overline{d}$, dessen Punktladungen $-q$ und $+q$ innerhalb eines homogenen dielektrischen Mediums (Wolke in Hellblau) der Permittivität ε_m unterschiedlich großen Feldstärken $\overline{E}(\overline{r})$ und $\overline{E}(\overline{r}+\overline{d})$ eines zeitlich invarianten rotations- und divergenzfreien elektrischen Feldes ausgesetzt seien. Gemäß Gleichung (6.1) kann für jede Punktladung separat eine elektrische Kraft $\overline{F}_{EP,1} = -q\overline{E}(\overline{r})$ und $\overline{F}_{EP,2} = +q\overline{E}(\overline{r}+\overline{d})$ berechnet werden.



(a) (b)

Abbildung 6.2: Herleitung und Veranschaulichung des DEP-Kraftausdrucks: Ungeladenes sphärisches Partikel mit induziertem Dipolmoment innerhalb eines (a) (leicht) räumlich inhomogenen (DEP-Bewegung) und (b) räumlich homogenen (keine DEP-Bewegung) elektrischen Gleichfeldes (Positions- und Richtungsangaben in kartesischen Koordinaten, die felderzeugenden Elektroden sind nicht eingezeichnet). Nach [35] (Abb. 2.9), [24] (Abb. 1A), [115] (Abb. 2.1).

Die DEP-Kraft auf das Partikel resultiert dann als Gesamtkraft aus der Kräfteüberlagerung [35] (Box 2.4)

$$\overline{F}_{\mathrm{DEP}} = \overline{F}_{\mathrm{EP},1} + \overline{F}_{\mathrm{EP},2} \tag{6.4}$$

und kann in einer *Taylor*-Reihenentwicklung[4] des Feldstärketerms $\overline{E}(\overline{r} + \overline{d})$ um $\overline{r}$ für moderat inhomogene elektrische Felder (die Ausdehnung der Feldinhomogenität ist sehr viel größer als die des Partikels) als [112] (Gl. (2a))

$$\overline{F}_{\mathrm{DEP}} \approx (\overline{p}^{(1)} \cdot \nabla)\overline{E} = \overline{F}^{(1)}_{\mathrm{DEP}} \tag{6.5}$$

angenähert werden (siehe (A.1) in Anhang A). Das induzierte Moment für den Dipol (Multipol der Ordnung $n = 1$) nach (6.3) kann für ein verlustloses sphärisches Partikel effektiv als [112] (Gl. (4))

$$\overline{p}^{(1)} = 4\pi\varepsilon_{\mathrm{m}} f^{(1)}_{\mathrm{CM}} R^3 \overline{E} \tag{6.6}$$

formuliert werden und man erhält somit mithilfe der Rechenregeln für Differentialoperatoren [112] (Gl. (5))

$$\overline{F}^{(1)}_{\mathrm{DEP}} = 2\pi\varepsilon_{\mathrm{m}} f^{(1)}_{\mathrm{CM}} R^3 \nabla E^2 \tag{6.7}$$

für den dipolaren DEP-Kraftausdruck, mit $E^2 = |\overline{E}|^2 \equiv \overline{E} \cdot \overline{E}$ (siehe (A.2) in Anhang A). Hierbei steht [112] (Gl. (4))

$$f^{(1)}_{\mathrm{CM}} = \frac{\varepsilon_{\mathrm{p}} - \varepsilon_{\mathrm{m}}}{\varepsilon_{\mathrm{p}} + 2\varepsilon_{\mathrm{m}}} \tag{6.8}$$

für den *Clausius-Mossotti* (CM)- Faktor[5] erster Ordnung.

INTERPRETATION In den meisten DEP-Anwendungen sind die felderzeugenden Elektroden bzw. Strukturen deutlich größer als die zu manipulierenden Partikel und der Term (6.7) reicht vollständig zur Beschreibung der (Gesamt-) DEP-Kraft aus, so dass mit guter Zuverlässigkeit

$$\overline{F}_{\mathrm{DEP}} \approx \overline{F}^{(1)}_{\mathrm{DEP}}$$

angenommen werden darf [112]. Für diese Situationen lassen sich bereits an dieser Stelle mithilfe von (6.7) und (6.8) wichtige Abhängigkeiten für die dielektrophoretische Bewegung ableiten [35] (Abschn. 2.6).

- Betrag der DEP-Kraft:

  Die (Gleichgewichts-) Geschwindigkeit hängt unter anderem von der Größe (und auch der Form) des Partikels sowie von der Stärke des Feldgradienten $\nabla|\overline{E}|^2$ ab. Insbesondere ist festzuhalten, dass für homogene elektrische Felder $\nabla|\overline{E}|^2 = 0$ resultiert und somit keine dielektrophoretische Partikelbewegung hervorgerufen werden kann, wie in Abbildung 6.2b angedeutet ist.

- Richtung der DEP-Kraft:

  Die Richtung hängt von der Orientierung des induzierten Dipolmoments ab, welche wiederum aus unterschiedlichen dielektrischen Polarisierbarkeiten von Partikel und umgebendem Medium hervorgeht und im *Clausius-Mossotti*-Faktor

4 Bemerkung: Nach Brook Taylor (1685–1731).
5 Bemerkung: Nach Rudolf Clausius (1822–1888) & Ottaviano Fabrizio Mossotti (1791–1863).

festgehalten ist. (i) Für $\varepsilon_p > \varepsilon_m$ und $f_{CM}^{(1)} > 0$ sind Dipolmoment und elektrisches Feld gleichgerichtet und die DEP-Kraft deutet in Richtung der maximalen (Anziehung durch positive Dielektrophorese, pDEP) elektrischen Feldstärke. (ii) Für $\varepsilon_p < \varepsilon_m$ und $f_{CM}^{(1)} < 0$ ist die Situation entgegengesetzt und die DEP-Kraft deutet in Richtung der minimalen (Abstoßung durch negative Dielektrophorese, nDEP) elektrischen Feldstärke. (iii) Sind Partikel und Medium dielektrisch nicht zu unterscheiden, also ist $\varepsilon_p = \varepsilon_m$, so resultiert $f_{CM}^{(1)} = 0$ und das Partikel wird nicht bewegt.

Da das elektrische Feld und das induzierte Dipolmoment nach Gleichung (6.6) stets parallel zueinander orientiert sind, wird auf ein verlustloses sphärisches Partikel ohne eigene permanente Dipole kein Drehmoment ausgeübt.

6.1.3 *Lineare Multipol-Momente höherer Ordnung*

Für den Fall, dass das Partikel aus Abbildung 6.2 Feldinhomogenitäten ausgesetzt ist, deren charakteristische Abmessungen vergleichbar mit dem Partikelradius R sind, so muss der Dipol-Term (6.6), wie in Abbildung 6.3 schematisch angedeutet ist, um zusätzliche lineare Multipol-Momente höherer Ordnung und deren Wechselwirkungen mit den Feldgradienten erweitert werden, um die Polarisation des Partikels präzise genug abzubilden. Sämtliche Multipol-Momente der Ordnung $n \geq 1$ lassen sich in Tensor-Notation allgemein und kompakt als [112] (Gl. (6)), [116]

$$\overline{\overline{\overline{p}}}^{(n)} = \frac{4\pi\varepsilon_m R^{2n+1} n}{(2n-1)!!} f_{CM}^{(n)} (\nabla)^{n-1} \overline{E} \tag{6.9}$$

schreiben, mit $(2n-1)!! := (2n-1)\cdot(2n-3)\cdot\ldots\cdot 5\cdot 3\cdot 1$ als Doppelfakultät, $(\nabla)^{n-1}$ als $(n-1)$-fachem Anwenden des Nabla-Operators und [112] (Gl. (6))

$$f_{CM}^{(n)} = \frac{\varepsilon_p - \varepsilon_m}{n\varepsilon_p + (n+1)\varepsilon_m} \tag{6.10}$$

als zugehörigem verallgemeinertem *Clausius-Mossotti*-Faktor n-ter Ordnung[6]. Analog zu (6.5) kann die multipolare DEP-Kraft dann kompakt als [112] (Gl. (A1))

$$\overline{F}_{DEP}^{(n)} = \frac{\left(\overline{\overline{\overline{p}}}^{(n)} [\cdot]^n (\nabla)^n\right) \overline{E}}{n!} \tag{6.11}$$

geschrieben werden, in welcher $[\cdot]^n$ für ein n-faches Skalarprodukt steht. Die DEP-Kraft setzt sich, ausgehend vom Dipolmoment, in Summe gemäß

$$\overline{F}_{DEP} = \sum_{m=1}^{n\to\infty} \overline{F}_{DEP}^{(m)}$$

aus allen wirkenden multipolaren DEP-Kräften zusammen.

6 Bemerkung: Das Moment der Ordnung $n = 0$, eine isolierte Punktladung als Monopol, stellt ein geladenes Partikel dar und ist nur für die elektrophoretische Bewegung von direkter Bedeutung. Die Bedeutung der Netto-Ladung eines Partikels für die Dielektrophorese wird in Abschnitt 6.2 behandelt.

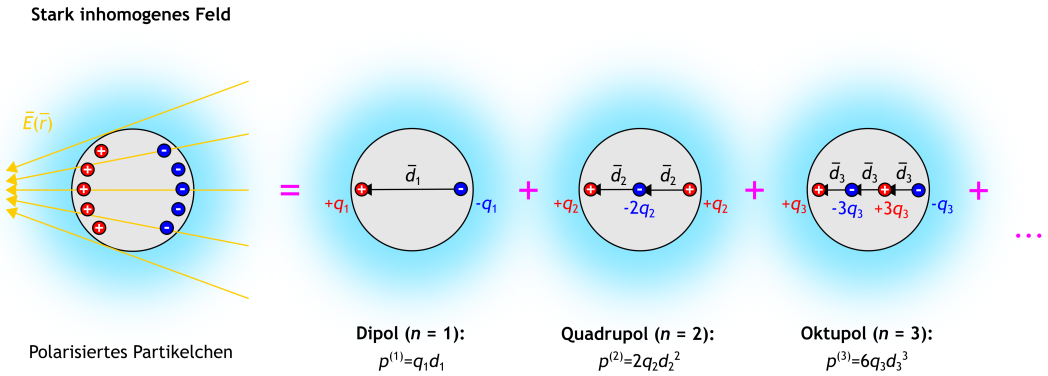


Abbildung 6.3: Einbeschreibung von Multipol-Momenten der Ordnung $n \geq 1$ in ein ungeladenes aber polarisiertes sphärisches Partikel innerhalb eines stark inhomogenen elektrischen Gleichfeldes, wobei es sich bei $n = 1$ um ein Dipol-, bei $n = 2$ um ein Quadrupol- und bei $n = 3$ um ein Oktupolmoment handelt. Nach [35] (Abb. 10.2), [112] (Abb. A1), [115] (Abb. B.2 & Tab. B.2), [117] (Abb. 2.7).

6.2 SPEZIALFALL: DEP-MANIPULATION VON BIOLOGISCHEN ZELLEN

In dieser Arbeit soll der Fokus der Untersuchungen auf biologischen Zellen liegen, welche sich in der Realität in zwei wesentlichen Aspekten von einem Partikel, wie es zuvor in Abschnitt 6.1 vorgestellt wurde, unterscheiden [112]:

1. Zellen und typische Zellmedien sind, elektrisch gesehen, verlustbehaftet, so dass eine Beschreibung dieser als ideale Dielektrika unzulässig ist.

2. Zellen sind keine einfachen homogenen und ungeladenen Kügelchen, sondern hoch-komplexe Zusammensetzungen verschiedenster Kompartimente mit jeweils individuellen elektrischen Signaturen und, gegebenenfalls, permanent vorhandenen Oberflächenladungen.

Insofern soll in diesem Teil das bisher bekannte Modell der Partikelpolarisation an diese beiden Umstände angepasst und geeignet präzisiert werden.

6.2.1 *AC-Betrieb: Polarisationsmechanismen und elektrische Verluste*

In der Regel besitzen die eingesetzten elektrischen Felder eine Zeitabhängigkeit[7], die für den allgemeinsten Fall der harmonischen Anregung mit [112] (Gl. (10))

$$\overline{E}(\bar{r}, t) = \mathrm{Re}\left[\underline{\overline{E}}(\bar{r}) \exp\left\{\mathrm{i}\omega t\right\}\right] \tag{6.12}$$

beschrieben werden kann. $\underline{\overline{E}}(\bar{r}) = \overline{E}_\mathrm{R}(\bar{r}) + \mathrm{i}\overline{E}_\mathrm{I}(\bar{r})$ ist ein komplexwertiger Vektor mit Realteil $\overline{E}_\mathrm{R}(\bar{r})$ und Imaginärteil $\overline{E}_\mathrm{I}(\bar{r})$ zur Darstellung der räumlichen Feld-Abhängigkeit, $\mathrm{i} = \sqrt{-1}$ die imaginäre Einheit und $\omega = 2\pi f$ die (Betriebs-) Kreisfrequenz[8]. Im AC-Betrieb müssen innerhalb eines realen Dielektrikums dann Energieverluste in

7 Bemerkung: Es wird weiterhin ein quasi-elektrostatischer Fall angenommen, in dem die Bewegung von Ladungen und die Erzeugung von magnetischen Feldern vernachlässigbar sei [109] (S. 15).

8 Bemerkung: Die Feldstärke nimmt in Gleichung (6.12) sowie in sämtlichen weiteren zeitabhängigen Betrachtungen in dieser Arbeit den Root-Mean-Square (RMS)- Wert an [112].

Form von Wärmeabgabe durch die *Debye*-Relaxation[9] von permanenten oder induzierten Dipolen (dielektrische Verluste) und die Relaxation von freien Ladungsträgern (*Ohm*'sche Verluste[10]) berücksichtigt werden [35] (Kap. 7 & Abschn. 10.3.2). Diese äußern sich in vier frequenzabhängigen Polarisationsmechanismen, die in Abbildung 6.4 überblicksartig zusammengefasst sind und durch eine formale Erweiterung der bisher als konstant und rein reell angenommenen Permittivität aus Abschnitt 6.1 um eine Frequenzabhängigkeit des Realteils und einen zusätzlichen frequenzabhängigen Imaginärteil zu [109] (Gl. (2.44) & (2.45)), [118] (Abschn. II.1)

$$\underline{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon'(\omega) - \mathrm{i}\varepsilon''(\omega) \tag{6.13}$$

festgehalten werden können. Der Imaginärteil $\varepsilon''(\omega)$ impliziert einen Phasenversatz zwischen dem induzierten Polarisationsfeld und dem anregenden elektrischen Wechselfeld, welcher der umgesetzten Verlustwärme entspricht und, je nach Relaxationszeit τ (= Antwortzeit) des stattfindenden Polarisationsmechanismus, bei einer bestimmten Kreisfrequenz $\omega = \frac{1}{\tau}$ maximal groß wird (maximaler zeitgemittelter Stromfluss). Für deutlich niedrigere bzw. deutlich höhere Frequenzen kann ein Polarisationsmechanismus dem äußeren Wechselfeld ohne Versatz (der Mechanismus ist schnell genug und baut sich vollständig und quasi instantan auf) bzw. überhaupt nicht mehr (der Mechanismus ist zu träge und fällt aus) folgen – es kommt zu einem stufenartigen Sprung im Realteil $\varepsilon'(\omega)$.

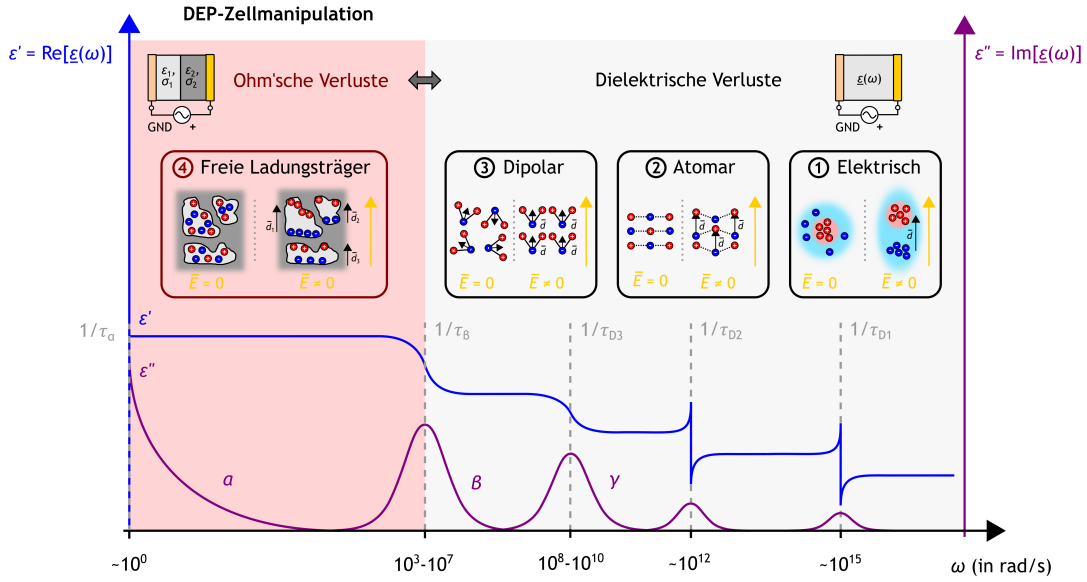


Abbildung 6.4: Elektrische Polarisationsmechanismen im Überblick. Nach [35] (Abb. 7.13), [109] (Abb. 2.7, 3.1 & 3.2), [117] (Abb. 2.4), [119] (Abb. 2), [120] (Abb. 4), [121] (Abb. 1 & 2), [122] (Abb. 1).

Die für die dielektrischen Verluste verantwortlichen Polarisationsmechanismen finden auf atomarer bzw. molekularer Ebene statt und besitzen daher die kürzesten Reichweiten und kleinsten *Debye*-Relaxationszeiten τ_D (dielektrische Verluste werden erst ab Frequezen $f \sim 1$ MHz bemerkbar) [112]. Zu diesen insgesamt drei Mechanismen gehören (1) die elektrische Polarisation (Verschiebung von beweglichen

9 Bemerkung: Nach Peter Debye (1884–1966).
10 Bemerkung: Nach Georg Simon Ohm (1789–1854).

negativen Elektronenwolken um positive Atomkerne), (2) die atomare Polarisation (Verschiebung von Bindungen innerhalb eines molekularen oder ionischen Gefüges) sowie (3) die Orientierungspolarisation (Umorientierung von permanenten Dipolen, auch als γ-Dispersion bezeichnet). Im Gegensatz dazu erstreckt sich der letzte Polarisationsmechanismus, (4) die Grenzflächenpolarisation als Verschiebung von frei beweglichen Ladungsträgern entlang von (α-Dispersion bei niedrigen Frequenzen $f < 1$ kHz) oder bishin an (β-Dispersion für mittlere bis hohe Frequenzen zwischen 50 kHz und 200 MHz) Störstellen oder Grenzflächen eines Dielektrikums, weit über atomare Abmessungen hinaus [35] (Abschn. 9.1), [123]. Für biologische Zellen, die größtenteils aus einem hoch-leitfähigen Elektrolyten bestehen und unter physiologischen Bedingungen auch in einem solchen suspendiert sind, führt dieser Mechanismus entsprechend zu einer deutlich größeren Wärmeabgabe durch *Ohm*'sche Verluste. Damit lässt sich für Anwendungen, in denen eine Manipulation von Zellen per Dielektrophorese verfolgt wird, (6.13) zu [112] (Gl. (11))

$$\underline{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon - \mathrm{i}\frac{\sigma}{\omega}$$

vereinfachen, wobei σ die elektrische Leitfähigkeit innerhalb des realen Dielektrikums bezeichnet und der Realteil von $\underline{\varepsilon}(\omega)$ weiterhin einen konstanten Wert (= DC-Permittivität) annehmen soll. Eine besondere Bedeutung für zellbiologische Anwendungen besitzt die β-Dispersion, die auch als *Maxwell-Wagner* (MW)- Grenzflächenpolarisation[11] mit Relaxationszeit $\tau_\beta = \tau_{\mathrm{MW}}$ bekannt ist [35] (Abschn. 9.4). Sie soll im nächsten Unterabschnitt deshalb genauer betrachtet werden.

6.2.2 *Verallgemeinerung des Dipolmoments*

Energierverluste erfordern – für ein zunächst noch weiterhin homogenes Kügelchen – neue Formulierungen für das induzierte Dipolmoment als [112] (Gl. (12))

$$\underline{\overline{p}}^{(1)} = 4\pi\varepsilon_{\mathrm{m}}\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}R^3\underline{\overline{E}} \tag{6.14}$$

und für die nun zeitgemittelte (RMS-Wert) und allgemeine dipolare DEP-Kraft nach den Rechenregeln für Differentialoperatoren als [112] (Gl. (15) & (17))

$$\begin{aligned}\langle\overline{F}_{\mathrm{DEP}}^{(1)}\rangle &= \mathrm{Re}\left[\left(\underline{\overline{p}}^{(1)}\cdot\nabla\right)\underline{\overline{E}}^{*}\right]\\ &= 2\pi\varepsilon_{\mathrm{m}}R^3\left(\mathrm{Re}\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]\nabla E^2 + 2\mathrm{Im}\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]\nabla\times\left(\overline{E}_{\mathrm{I}}\times\overline{E}_{\mathrm{R}}\right)\right),\end{aligned} \tag{6.15}$$

mit $E^2 = |\underline{\overline{E}}|^2 \equiv \underline{\overline{E}}\cdot\underline{\overline{E}}^{*}$ (siehe (A.2) & (A.3) in Anhang A).

Der zuvor rein reelle *Clausius-Mossotti*-Faktor erster Ordnung wird nun komplexwertig und kann für die *Maxwell-Wagner*-Grenzflächenpolariation als [112] (Gl. (13))

$$\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)} = \mathrm{Re}\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right] + \mathrm{iIm}\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right] = \frac{\underline{\varepsilon}_{\mathrm{p}}-\underline{\varepsilon}_{\mathrm{m}}}{\underline{\varepsilon}_{\mathrm{p}}+2\underline{\varepsilon}_{\mathrm{m}}} = f_{\mathrm{CM},\infty}^{(1)} + \frac{f_{\mathrm{CM},0}^{(1)} - f_{\mathrm{CM},\infty}^{(1)}}{\mathrm{i}\omega\tau_{\mathrm{MW}}^{(1)}+1} \tag{6.16}$$

geschrieben werden (*Debye*-Relaxations-Form)[12].

11 Bemerkung: Nach James Clerk Maxwell (1831–1879) & Karl Willy Wagner (1883–1953).

12 Bemerkung: Die α-Dispersion wird erst in Unterabschnitt 6.2.3 aufgegriffen.

INTERPRETATION Gleichung (6.15) kann als eine Erweiterung der bisher bekannten DEP-Bewegung aufgefasst werden und tritt nur für rotierende Felder in Erscheinung: Während das Vorzeichen von Re $\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]$ im linken Term, nach wie vor, die Bewegung des Partikels in Richtung von elektrischen Feldmaxima oder -minima vorgibt (klassicher DEP-Teil), deutet das Vorzeichen von Im $\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]$ im rechten Term den Rotationssinn bei einer Partikeldrehung an (neuer ROT-Teil). Diese wird durch ein zeitgemitteltes Drehmoment auf den induzierten Dipol [112] (Gl. (18))

$$\langle \overline{T}_{\mathrm{DEP}}^{(1)} \rangle = \mathrm{Re}\left[\overline{\underline{p}}^{(1)} \times \overline{\underline{E}}^{*}\right] \tag{6.17}$$

bewirkt, da dieser dem äußeren Feld für den verlustbehafteten Fall nach (6.14) im Allgemeinen nicht mehr parallel gerichtet ist und bei Drehung nur mit Versatz folgt. Detailliertere Betrachtungen von (6.16) ergeben folgende Frequenzabhängigkeiten für die dielektrophoretische Bewegung, welche im weiteren Verlauf auch Abbildung 6.5 entnommen werden können:

- Niedrige Frequenzen:

  Für niedrige Frequenzen ($\omega \to 0$) wird Re $\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]$ maßgeblich von den elektrischen Leitfähigkeiten von Partikel und Medium bestimmt und nimmt den Wert $f_{\mathrm{CM},0}^{(1)} = \dfrac{\sigma_{\mathrm{p}} - \sigma_{\mathrm{m}}}{\sigma_{\mathrm{p}} + 2\sigma_{\mathrm{m}}}$ an [112] (Gl. (14a)). Die Extremfälle, die erreicht werden können, sind hier (i) $f_{\mathrm{CM},0}^{(1)} \to +1$ für $\sigma_{\mathrm{p}} \gg \sigma_{\mathrm{m}}$ (pDEP) bzw. (ii) $f_{\mathrm{CM},0}^{(1)} \to -0{,}5$ für $\sigma_{\mathrm{p}} \ll \sigma_{\mathrm{m}}$ (nDEP).

- Hohe Frequenzen:

  Bei sehr hohen Frequenzen ersetzt die Orientierungspolarisation die *Maxwell-Wagner*-Grenzflächenpolarisation als dominierenden Polarisationsmechanismus. In diesem Fall ($\omega \to \infty$) wird Re $\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]$ maßgeblich von den Permittivitäten von Partikel und Medium bestimmt und nimmt den Wert $f_{\mathrm{CM},\infty}^{(1)} = \dfrac{\varepsilon_{\mathrm{p}} - \varepsilon_{\mathrm{m}}}{\varepsilon_{\mathrm{p}} + 2\varepsilon_{\mathrm{m}}}$ an [112] (Gl. (14a)). Die Extremfälle sind hier (i) $f_{\mathrm{CM},\infty}^{(1)} \to -0{,}5$ für $\varepsilon_{\mathrm{p}} \ll \varepsilon_{\mathrm{m}}$ (nDEP) bzw. (ii) $f_{\mathrm{CM},\infty}^{(1)} \to +1$ für $\varepsilon_{\mathrm{p}} \gg \varepsilon_{\mathrm{m}}$ (pDEP).

- Übergang:

  Der Übergang $f_{\mathrm{CM},0}^{(1)} \to f_{\mathrm{CM},\infty}^{(1)}$ im Realteil Re $\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]$ geschieht bei der Kreisfrequenz $\omega_{\mathrm{MW}}^{(1)} = \frac{1}{\tau_{\mathrm{MW}}^{(1)}} = \dfrac{\sigma_{\mathrm{p}} + 2\sigma_{\mathrm{m}}}{\varepsilon_{\mathrm{p}} + 2\varepsilon_{\mathrm{m}}}$ unter Annahme eines Maximums bzw. Minimums des Imaginärteils zu Im $\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right] = \frac{1}{2}\left(\dfrac{\varepsilon_{\mathrm{p}} - \varepsilon_{\mathrm{m}}}{\varepsilon_{\mathrm{p}} + 2\varepsilon_{\mathrm{m}}} - \dfrac{\sigma_{\mathrm{p}} - \sigma_{\mathrm{m}}}{\sigma_{\mathrm{p}} + 2\sigma_{\mathrm{m}}}\right)$ mit den Extremfällen (i) $-0{,}75$ für $\sigma_{\mathrm{p}} \gg \sigma_{\mathrm{m}}$ und $\varepsilon_{\mathrm{p}} \ll \varepsilon_{\mathrm{m}}$ sowie (ii) $+0{,}75$ für $\sigma_{\mathrm{p}} \ll \sigma_{\mathrm{m}}$ und $\varepsilon_{\mathrm{p}} \gg \varepsilon_{\mathrm{m}}$. $\tau_{\mathrm{MW}}^{(1)}$ bezeichnet hier die dipolare Relaxationszeit der *Maxwell-Wagner*-Grenzflächenpolari-sation [112] (Gl. (14b)), [109] (Gl. (3.12)).

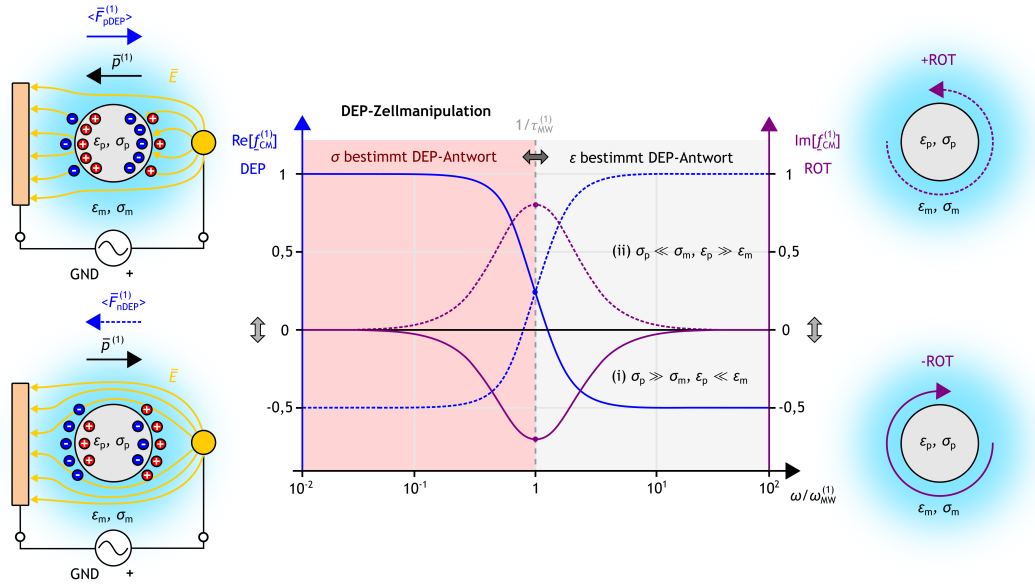


Abbildung 6.5: *Maxwell-Wagner*-Grenzflächenpolarisation. Annehmbare Verläufe des DEP- (blaue Kurven) und ROT- (lila Kurven) Teils in (6.16) für (i) $\sigma_\mathrm{p} \gg \sigma_\mathrm{m}$ & $\varepsilon_\mathrm{p} \ll \varepsilon_\mathrm{m}$ (durchgezogene Kurven) sowie, umgekehrt, für (ii) $\sigma_\mathrm{p} \ll \sigma_\mathrm{m}$ & $\varepsilon_\mathrm{p} \gg \varepsilon_\mathrm{m}$ (gestrichelte Kurven). Bei $\omega_\mathrm{MW}^{(1)} = \frac{1}{\tau_\mathrm{MW}^{(1)}}$ ist ein Wendepunkt im Real- bzw. Extremum im Imaginärteil des dipolaren *Clausius-Mossotti*-Faktors zu beobachten. „pDEP“ bzw. „nDEP“ bezeichnen die Anziehung eines Partikels per positiver bzw. dessen Abstoßung per negativer Dielektrophorese in Richtung Maximum bzw. Minimum der elektrischen Feldstärke. „-ROT“ bzw. „+ROT“ bezeichnen die Rotationsbewegung eines Partikels innerhalb eines Drehfeldes im bzw. gegen den Uhrzeigersinn. Nach [62] (Abb. 1), [109] (Abb. 1.6 & 2.8), [112] (Abb. 3), [121] (Abb. 6.).

Wie bereits in Unterabschnitt 6.1.3 vorgestellt (siehe (6.9) bis (6.11)), können, der Vollständigkeit halber, nun auch für den AC-Fall sehr starke Feldinhomogenitäten in der Modellierung des DEP-Verhaltens berücksichtigt werden. In Anhang A sind hierfür die Ausdrücke (A.4) und (A.5) für die komplexwertigen linearen Multipol-Momente und den komplexwertigen *Clausius-Mossotti*-Faktor n-ter Ordnung aufgeführt. Mit ihnen lassen sich für verlustbehaftete sphärische Partikel die multipolare zeitgemittelte DEP-Kraft n-ter Ordnung nach (A.6) und das multipolare zeitgemittelte DEP-Drehmoment n-ter Ordnung nach (A.10) konstruieren.

6.2.3 *Ein-Schalen-Modell für sphärische Partikel*

Zellen bilden die Grundbausteine des Lebens und können generell drei Domänen zugeordnet werden: Diese werden als Prokaryoten, Archaeen und Eukaryoten bezeichnet. Im Gegensatz zu den Prokaryoten und den Archaeen, zu denen Lebewesen gezählt werden, deren Erbinformation frei beweglich im Zytoplasma vorliegt, umfassen Eukaryoten sämtliche Lebewesen – nämlich Pilze, Pflanzen und Tiere – die einen Zellkern als kompakten Träger des Erbguts besitzen [35] (Abschn. 9.2), [36] (Abschn. 1.1), [124] (Kap. 2). Der Aufbau einer tierischen Zelle, der auch auf eine menschliche Zelle zutrifft, ist schematisch in Abbildung 6.6a dargestellt. Das dielektrische Verhalten der Zelle wird maßgeblich von zwei Entitäten bestimmt: Während

(i) das Zellinnere, welches sich zum überwiegenden Teil aus dem Zytosol, dem Zytoskellet und dem Zellkern zusammensetzt, als ein hoch-leitfähiger Elektrolyt beschrieben werden kann, stellt (ii) die Plasmamembran im intakten Zustand einen elektrischen Isolator dar [35] (Abschn. 9.3 & 9.7), [112, 123].

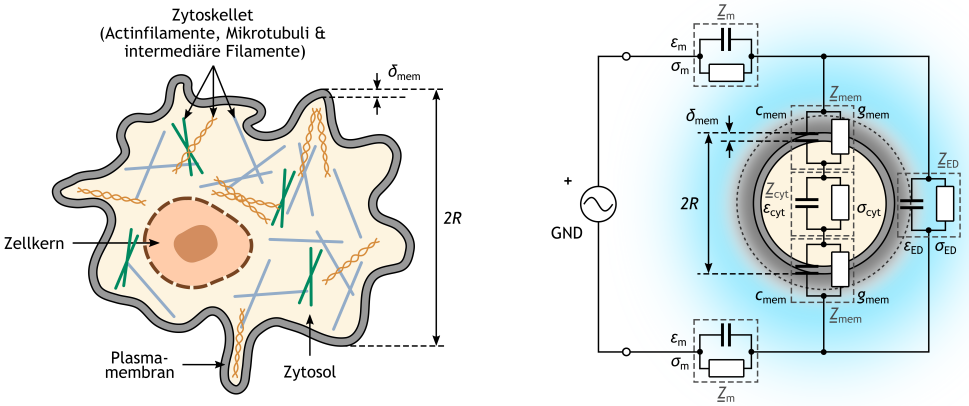


Abbildung 6.6: Modellierungsgrundlage in dieser Arbeit: (a) Aufbau einer eukaryotischen Tierzelle mit den wichtigsten Zellbestandteilen. (b) Elektrisches Ersatzschaltbild nach dem Ein-Schalen-Modell als homogene Kugel mit dünner Schale und elektrischer Doppelschicht. Nach [36] (Abb. 1.1), [109] (Abb. 6.10), [112] (Abb. 4), [115] (Abb. C.3), [121] (Abb. 1).

Diese vereinfachte Unterteilung gibt das sogenannte Ein-Schalen-Modell in Abbildung 6.6b wieder[13]. In diesem wird das Zellinnere als eine homogene Kugel mit effekiver Impedanz $\underline{Z}_{cyt}$ und die Plasmamembran als eine die Kugel umhüllende dünne Schale mit seriell verschalteter Impedanz $\underline{Z}_{mem}$ abgebildet. Das Zellinnere besitzt die Permittivität ε_{cyt} bzw. Leitfähigkeit σ_{cyt} und die Membran der Dicke δ_{mem} die Kapazität je Membranoberfläche $c_{mem} = \frac{\varepsilon_{mem}}{\delta_{mem}}$ und den Leitwert je Membranoberfläche $g_{mem} = \frac{\sigma_{mem}}{\delta_{mem}}$, wobei ε_{mem} bzw. σ_{mem} die Membran-Permittivität bzw. Membran-Leitfähigkeit ist und $\delta_{mem} \ll R$ mit R als der (mittlere) Außenradius der Modellgeometrie angenommen wird. Die Zelle ist in einem wässrigen Elektrolyten, welcher im Folgenden auch als (Zell-) Medium bezeichnet wird, suspendiert. Lebende Tierzellen tragen eine negative Nettoladung auf ihrer Plasmamembran, infolge derer es im umgebenden Medium in unmittelbarer Membrannähe zur Ausbildung einer positiven Gegenladung in Form der sogenannten elektrischen Doppelschicht (ED) kommt. Neben einem Strompfad senkrecht durch die Plasmamembran, welcher verantwortlich für die *Maxwell-Wagner*-Grenzflächenpolarisation bzw. β-Dispersion ist, kann aufgrund dieser teilweise beweglichen Schicht ein weiterer Pfad parallel entlang an der Plasmamembran vorgefunden werden, der die Ursache für die α-Dispersion ist. Dem Medium und der elektrischen Doppelschicht können die Impedanzen $\underline{Z}_m$ und $\underline{Z}_{ED}$ zugeordnet werden, wobei ε_m und ε_{ED} bzw. σ_m und σ_{ED} die jeweiligen Permittivitäten bzw. Leitfähigkeiten bezeichnen [35] (Abschn. 9.1, 9.3.1.4 & 9.7), [109] (Kap. 6), [115] (Apx. C), [112, 120, 123].

13 Bemerkung: Es liege eine Metallelektroden-basierte DEP-Architektur vor.

INTERPRETATION Innerhalb des Ein-Schalen-Modells ist jede identifizierbare Kontaktfläche zwischen zwei angrenzenden Dielektrika als Ursprung eines individuellen Mechanismus der *Maxwell-Wagner*-Grenzflächenpolarisation zu interpretieren [115] (Apx. C), [125]. Die wichtigsten Einflüsse, die demnach bei der Modellierung der DEP-Antwort Re $\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]$ einer menschlichen Zelle berücksichtigt werden können, sind in Abbildung 6.7 zu erkennen und im Folgenden näher beschrieben [123]:

- Niedrige Frequenzen:

  Die Ionenkonzentration innerhalb der elektrischen Doppelschicht kann die Ionenkonzentration innerhalb des restlichen Elektrolyten gegebenenfalls um mehrere Größenordnungen überschreiten [123]. Die Zelle erscheint in dieser Situation aufgrund dieser zusätzlichen hoch-leitfähigen Schicht, die als äußerste Grenzfläche (0) mit exklusiven dielektrischen Eigenschaften angesehen werden kann, stark polarisierbar. Das induzierte Dipolmoment ist dann mit dem äußeren elektrischen Feld, dessen Feldlinien an der elektrischen Doppelschicht abfallen, gleichgerichtet und die Zelle wird per pDEP angezogen (vgl. Situation links oben in Abbildung 6.5). Zumal dabei allerdings eine makroskopische Relaxation von Ionen um die gesamte Zelle herum, tangential an der Plasmamebran entlang, stattfindet, liegt eine vergleichsweise große Zeitkonstante der Polarisation $\tau_{\alpha}^{(\mathrm{ED})}$ vor [109] (Abb. 7.5). Für ausreichend große Zellen und Frequenzen kann der Einfluss der elektrischen Doppelschicht demzufolge vernachlässigt werden und die Gleichgewichtsgeschwindigkeit einer dielektrophoretisch bewegten Zelle kann, anders als bei der elektrophoretischen Bewegung, ohne die Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung und mithilfe des *Stokes*'schen Gesetzes alleine abgeschätzt werden [35] (Abschn. 2.6). Für sehr kleine Partikel hingegen (Sub-Mikrometer-Skala), wie beispielsweise für einzelne Makromoleküle (DNA, Proteine, etc.) oder Viren, ist die elektrische Doppelschicht der dominierende Mechanismus für Ionentransport und DEP-Antwort, da die Ausdehnung der Doppelschicht vergleichbar zu oder sogar größer als die Ausdehnung des Partikels selbst ist. Dann ist eine dielektrische Unterscheidung von sehr ähnlichen Partikeln nur bedingt möglich [109] (Kap. 7), [123].

- Mittlere Frequenzen:

  Für Frequenzen $\frac{1}{\tau_{\alpha}^{(\mathrm{ED})}} < \omega < \frac{1}{\tau_{\mathrm{MW}}^{(\mathrm{mem})}}$ bestimmen die dielektrischen Eigenschaften der Plasmamembran die DEP-Antwort der Zelle, wobei $\tau_{\mathrm{MW}}^{(\mathrm{mem})}$ die Relaxationszeit der *Maxwell-Wagner*-Grenzflächenpolarisation für die Grenzfläche (1) zwischen der Plasmamembran und dem umgebenden Medium ist. Eine intakte Plasmamembran besitzt in diesem Frequenzbereich eine hochohmige Impedanz $|\underline{Z}_{\mathrm{mem}}| \gg |\underline{Z}_{\mathrm{m}}|$, weshalb die Zelle in (hoch-) leitfähigen Medien, wie sie typischerweise in DEP-Zellexperimenten eingesetzt werden, wie eine isolierende Kugel erscheint. Das induzierte Dipolmoment ist dem äußeren elektrischen Feld, dessen Feldlinien von der Plasmamembran verdrängt werden, entgegengerichtet und die Zelle wird per nDEP abgestoßen (vgl. Situation links unten in Abbildung 6.5). In diesem Fall liegt das lokale elektrische Feld wegen $|\underline{Z}_{\mathrm{mem}}| \gg |\underline{Z}_{\mathrm{cyt}}|$ (nahezu) vollständig an der Doppellipidschicht an [126]. Verliert die Plasmamembran einer Zelle hingegen ihre Barrierefunktion und

wird durchlässig für Ionen (dies ist der Fall für z. B. tote Zellen), so kommt es zu einem Ausgleich der elektrischen Leitfähigkeiten zwischen dem Zellinneren und dem Medium. Es folgt $\mathrm{Re}\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right] = 0$, weshalb keine DEP-Bewegung mehr induziert werden kann [62, 127].

- Hohe Frequenzen:

  Für Frequenzen $\frac{1}{\tau_{\mathrm{MW}}^{(\mathrm{mem})}} < \omega < \frac{1}{\tau_{\mathrm{MW}}^{(\mathrm{cyt})}}$ passiert das elektrische Feld wegen $|\underline{Z}_{\mathrm{mem}}| \ll |\underline{Z}_{\mathrm{cyt}}|$ die Plasmamembran und dringt in das Zellinnere ein, welches nun den Verlauf der DEP-Antwort vorgibt. Dabei ist $\tau_{\mathrm{MW}}^{(\mathrm{cyt})}$ die Relaxationszeit der *Maxwell-Wagner*-Grenzflächenpolarisation für die Grenzfläche (2) zwischen dem Zellinneren und der Plasmamembran. Je nachdem, ob (i) das Medium leitfähiger ist als das Zellinnere, oder (ii) umgekehrt, kann die Zelle innerhalb eines inhomogenen elektrischen Feldes abgestoßen (nDEP) oder angezogen (pDEP) werden. Während Fall (i) für physiologische hoch-leitfähige Zellmedien (Zellkulturmedium, PBS, etc.) vorliegt, kann Fall (ii) nur innerhalb von künstlichen DEP-Medien mit reduzierter elektrischer Leitfähigkeit erreicht werden. Die Stellen, an denen die DEP-Kraft für ausreichend niedrig-leitfähige Medien gerade ihr Vorzeichen wechselt, werden als Übergangs (kreis) frequenzen $\omega_{\mathrm{xo},1} = 2\pi f_{\mathrm{xo},1}$ und $\omega_{\mathrm{xo},2} = 2\pi f_{\mathrm{xo},2}$ bezeichnet. Die erste Übergangsfrequenz, deren Position primär vom Zelldurchmesser und von der Plasmamembrankapazität (die Morphologie der Membran wird durch beispielsweise Mikrovilli, Membranausstülpungen und Falten bestimmt) abhängt, erlaubt die dielektrophoretische Sortierung von Zellen unterschiedlicher Populationen. Bei Frequenzen oberhalb von $\frac{1}{\tau_{\mathrm{MW}}^{(\mathrm{cyt})}}$ dominiert die Orientierungpolarisation gegenüber der Grenzflächenpolarisation und die DEP-Antwort wird durch die Permittivitäten von Medium und Zellinnerem bestimmt.

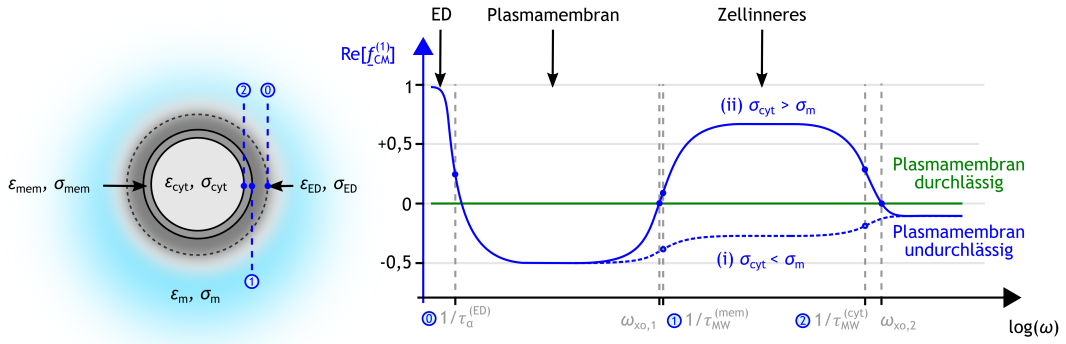
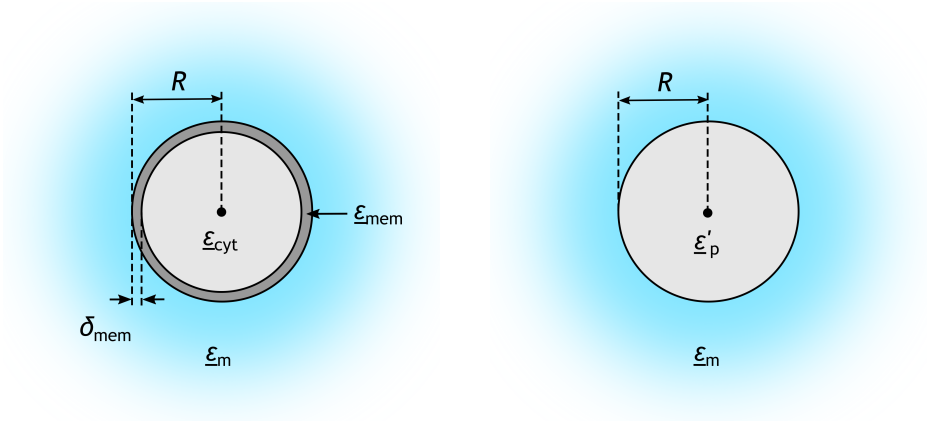


Abbildung 6.7: Ein-Schalen-Modell (links) und zugehöriger qualitativer Verlauf der DEP-Antwort (rechts) für ein ausgedehntes Partikel mit einer dünnen Schale zur Darstellung einer tierischen Zelle. Für $f \lesssim 1$ MHz dominiert die Plasmamembran und für $f \gtrsim 10$ MHz das Zellinnere die DEP-Eigenschaften der Zelle. Im Bereich von bis zu etwa einem Kilohertz bestimmt die elektrische Doppelschicht der Plasmamembran die DEP-Anwort. Nach [35] (Tab. 9.3), [109] (Abb. 3.7), [123] (Abb. 2), [128] (Abb. 2), [129] (Abb. 1).

Die bisher betrachtete DEP-Theorie ist lediglich für verlustbehaftete homogene Kugeln gültig. Damit die hergeleiteten Ausdrücke für die DEP-Kraft und das DEP-Drehmoment aber auch auf das Ein-Schalen-Modell übertragen werden können, bedarf es einer Transformation der neuen Schalengeometrie gemäß den Abbildungen 6.8a und 6.8b. Mithilfe der auf die elektrostatische Potentialfunktion angewendeten Störungstheorie kann hierfür einer umhüllten Kugel eine homogenene Kugel mit gleichem Außenradius R und komplexer Ersatz-Permittivität [112] (Gl. (19))

$$\underline{\varepsilon}_{\mathrm{p}}^{\prime(1)} = \underline{\varepsilon}_{\mathrm{mem}} \left(\frac{\left(\frac{R}{R-\delta_{\mathrm{mem}}}\right)^3 + 2\frac{\underline{\varepsilon}_{\mathrm{cyt}}-\underline{\varepsilon}_{\mathrm{mem}}}{\underline{\varepsilon}_{\mathrm{cyt}}+2\underline{\varepsilon}_{\mathrm{mem}}}}{\left(\frac{R}{R-\delta_{\mathrm{mem}}}\right)^3 - \frac{\underline{\varepsilon}_{\mathrm{cyt}}-\underline{\varepsilon}_{\mathrm{mem}}}{\underline{\varepsilon}_{\mathrm{cyt}}+2\underline{\varepsilon}_{\mathrm{mem}}}} \right)$$

zugeordnet werden, welche innerhalb des umgebenden Mediums effektiv das identische Dipolmoment ausbildet.



(a) (b)

Abbildung 6.8: Transformation eines (a) sphärischen Partikels mit umhüllender dünner Schale (siehe Ein-Schalen-Modell) in eine (b) in ihren dielektrischen Eigenschaften äquivalente homogene Kugel. Nach [112] (Abb. 2).

Für stark inhomogene Felder und jedes Multipol-Moment n-ter Ordnung muss die Ersatz-Permittivität des Ein-Schalen-Modells separat berechnet werden. Die zugehörige Berechnungsvorschrift (A.11) kann mit dem bereits bekannten komplexwertigen *Clausius-Mossotti*-Faktor n-ter Ordnung (A.5) kombiniert werden [112, 125].

6.3 DIE DIELEKTROPHORESE IN MIKROFLUIDIKSYSTEMEN

Seit der erstmaligen Beschreibung der „Dielektrophorese“ durch Herbert Pohl in den 1950er Jahren wurden in der Forschung und Industrie zahlreiche Elektrodenausformungen für die unterschiedlichsten Arten der DEP-Partikelmanipulation auf (Sub-) Mikrometerskala vorgeschlagen und praktisch umgesetzt. Ausgehend von den ersten Apparaturen, die noch aus einfachen makroskopischen Metalldrähten und -folien bestanden und mit Spannungen von bis zu mehreren Kilovolt versorgt wurden, entwickelten sich im Zuge der Etablierung neuartiger Herstellungsmethoden der Mikrosystemtechnik [130] bis heute rasant neue Elektrodengeometrien und Manipulationsszenarien, die mit modernen Mikrofluidiksystemen kombiniert werden können. Einige Beispiele und die damit in Verbindung stehenden Möglichkeiten und Limitierungen der DEP sollen in diesem Abschnitt vorgestellt werden.

6.3.1 *Manipulationsszenarien und Elektrodengeometrien*

Je nachdem, welche Vorzeichen und relativen Beiträge der Real- bzw. Imaginärteil $\mathrm{Re}\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]$ bzw. $\mathrm{Im}\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]$ aus (6.16) bei einer Partikelmanipulation annehmen (vgl. auch Abbildung 6.5), lassen sich Elektroden und elektrische Ansteuervarianten verschiedener Art für individuelle Anwendungen definieren [112].

RÄUMLICH BEWEGTE FELDER Elektrorotation (ROT)[14]

Um ein Partikel (z. B. Zelle, Polystyrol-Bead, etc.) per DEP deterministisch manipulieren zu können, muss dessen DEP-Antwort $\mathrm{Re}\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]$ innerhalb des Mediums der Wahl bekannt sein. Anstatt die DEP-Antwort aus einer Translationsbewegung des Partikels in einem stationären Feld abzuschätzen, besteht die Möglichkeit, diese alternativ auch durch Integration des Verlaufs von $\mathrm{Im}\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]$ im Frequenzbereich zu extrahieren. Hierfür werden in der Praxis Partikelcharakterisierungen in Form von sogenannten Elektrorotations (ROT)- Experimenten [133] durchgeführt. Dabei wird die Winkelgeschwindigkeit Ω_{ROT} des innerhalb des Mediums zur Rotation versetzten Partikels in Abhängigkeit von der Kreisfrequenz ω eines äußeren Drehfeldes aufgezeichnet (ROT-Spektrum). Im stationären Zustand wird das antreibende Drehmoment nach (6.17) durch ein Reibungs-Gegenmoment ausgeglichen und für kleine Drehraten kann [109] (Gl. (5.41))

$$\Omega_{\mathrm{ROT}} = \frac{\varepsilon_{\mathrm{m}} E^2}{2\eta} \mathrm{Im}\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]$$

geschrieben werden (wie in Kapitel 5 eingeführt, steht η dabei für die dynamische Viskosität des Mediums). Für ROT-Experimente werden typischerweise Quadrupol-Strukturen [134–138], wie in Abbildung 6.9a zu erkennen, eingesetzt.

14 Bemerkung: Auch die Wanderwellen-Dielektrophorese (Travelling-Wave DEP, twDEP) kann zur Manipulation von Partikeln durch räumlich bewegte elektrische Felder eingesetzt werden [131, 132], soll in dieser Arbeit aber nicht weiter betrachtet werden.

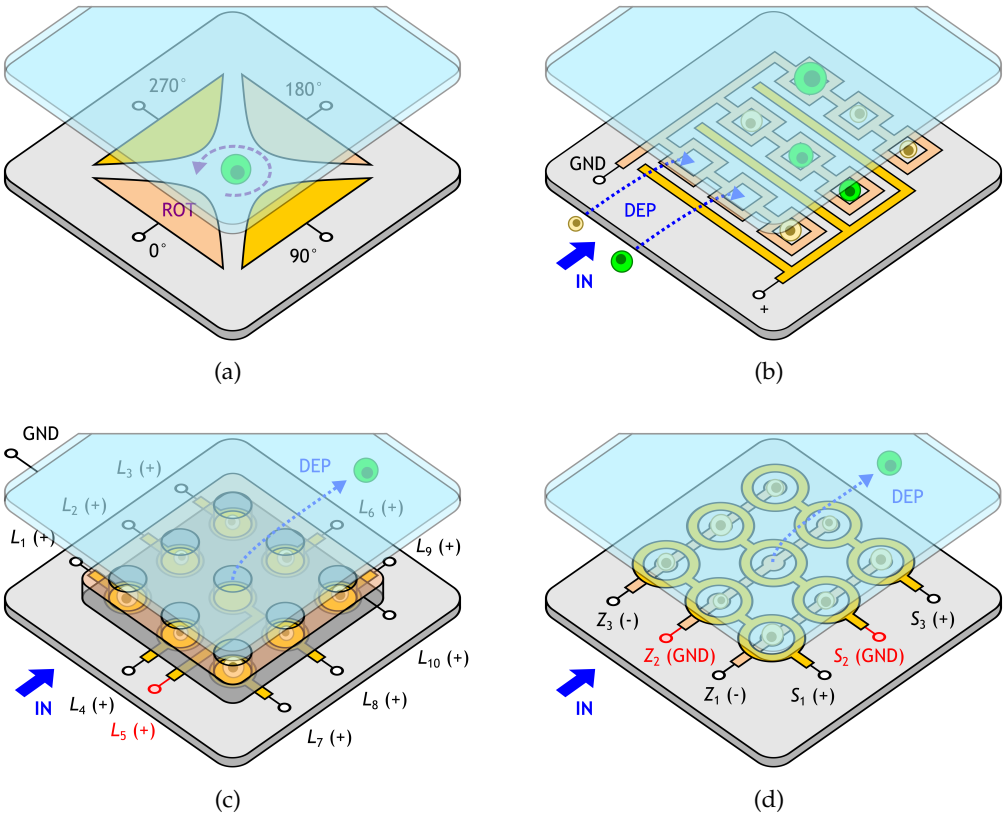


Abbildung 6.9: Perspektivische Ausschnitte von mikrofluidisch integrierten Elektrodengeometrien für die Partikelmanipulation mit (a) räumlich bewegten (ROT) und (b) bis (d) räumlich stationären (DEP) elektrischen Feldern. Die Manipulation soll hier für CTCs (Partikel in Grün) und Leukozyten (Partikel in Beige) demonstriert sein (vgl. Kapitel 3). In (a) ruht das Medium, während es in den Fällen (b) bis (d) in Bewegung sei (blaue Pfeile). (a) Planarer Quadrupol für die Partikelcharakterisierung per Elektrorotation. Zwischen benachbarten Elektroden liegt eine Phasenverschiebung von 90° vor, die Drehbewegung findet hier gegen den Uhrzeigersinn statt. (b) Partikel-Patterning durch Quadratringe mit Streifenleitungen als Gegenelektroden (planare DEP-Fallen ohne Möglichkeit der selektiven Ansteuerung). Jeweils eine Zelle wird durch nDEP in einen Quadratring gestoßen und dort entgegen der Strömung festgehalten. Eine Freigabe von Zellen kann nur im Kollektiv erfolgen. (c) Einzelpartikel-Isolation per Mehr-Elektrodenlagen-Aufbau (elektrifizierte Mikrowannen als DEP-Fallen mit Möglichkeit der selektiven Ansteuerung über direkte elektrische Zuleitungen). Die Ansteuerung einer Bodenleitung (hier L_5) führt zur Freigabe einer in der zugehörigen Mikrowanne einzeln beladenen CTC durch nDEP. (d) Einzelpartikel-Isolation via Ring-Punkt-Geometrie (planare DEP-Fallen mit Möglichkeit der selektiven Ansteuerung in einer passiven Matrix). Die Erdung einer Spalte (hier S_2) und Zeile (hier Z_2) führt an der DEP-Falle des zugehörigen Kreuzungspunkts zu einem feldfreien Zustand. Die DEP-Kraft verschwindet, womit eine zuvor per pDEP einzeln immobilisierte CTC freigegeben und weggespült werden kann. Nach [139] (Abb. 3).

RÄUMLICH STATIONÄRE FELDER Rückhaltung und -Abstoßung (DEP)

- Partikelsortierung:

  Eine der häufigsten Anwendungen der Dielektrophorese entfällt auf die Sortierung von dielektrisch unterschiedlichen Partikeln, und zwar insbesondere von biologischen Zellen in künstlichen DEP-Medien auf Basis der ersten Übergangsfrequenz $f_{x0,1}$[15]. Dabei wird versucht, eine Population von Zielzellen ($f_{x0,1}$ niedrig, z. B. CTCs) per Dielektrophorese räumlich möglichst effizient und rein von Populationen von Nicht-Zielzellen ($f_{x0,1}$ hoch, z. B. WBCs) abzutrennen. Zell-Sortierungen mit räumlich stationären Feldern wurden bislang nach drei Varianten umgesetzt [62, 140]: (i) Differential DEP Affinity [22, 141–146] und (ii) DEP-Ablenkung [147–151] als Ungleichgewichts- sowie (iii) DEP-Field-Flow-Fractionation (DEP-FFF) [60, 152–161] als Gleichgewichts-Verfahren. Die für DEP-Sortierungen am häufigsten eingesetzte Elektrodengeometrie ist die (Castellated) Finger-Interdigitalelektrode.

- Immobilisierung und selektive Freigabe von Partikeln:

  Eine weitere Einsatzmöglichkeit der DEP besteht in der Immobilisierung und selektiven (Wieder-) Freigabe von Partikeln durch stationäre DEP-Fallen in einem wohldefinierten räumlichen Muster [128, 162].

  Findet keine selektive Ansteuerung der DEP-Fallen statt, kann an sämtliche Fallen eines Typs also das gleiche elektrische Signal angelegt werden, so lassen sich bereits mit wenigen (in der Regel nur zwei) elektrischen Zuleitungen große Anordnungen (Tausende bis Zehntausende) von DEP-Fallen betreiben. Für Zellanwendungen kann diese Situation vor allem dann interessant sein, falls beispielsweise die hoch-parallelisierte Immobilisierung von Zellen mit optischer Analyse in einer Fokusebene und schnellen Medienwechseln oder weiteren Arbeitsschritten (z. B. Zell-Zell-Paarungen, Zelltransfektionen, etc.) verfolgt wird, der Vorgang aber elektrisch und einfach kontrollierbar sein soll. Analog zur Partikelsortierung wurden für die Partikelimmobilisierung ohne Möglichkeit der selektiven Ansteuerung von DEP-Fallen, das Partikel-Patterning, sowohl pDEP- [163–171], als auch nDEP-basierte [172] Strategien eingesetzt. Ein Beispiel für das Zell-Patterning durch planare Quadratringe mit Streifenleitungen als Gegenelektroden (nDEP-basierte DEP-Fallen) ist in Abbildung 6.9b zu sehen [173–175].

  Können DEP-Fallen selektiv angesteuert, also mit exklusiven elektrischen Signalen beaufschlagt werden, so sind zusätzliche Manipulationsszenarien denkbar. Für den Fall, dass stationäre DEP-Fallen mit einzelnen Zellen beladen und in einem bewegten Medium platziert werden, lassen sich bei selektiver Zellfreigabe Einzelzell-Isolationen von Zielzellen aus Suspensionen von Nicht-Zielzellen erreichen. Kommen DEP-Fallen hingegen nicht als Aktuatoren, sondern als Sensoren zum Einsatz, so können potentiell auch Analysen (z. B. Impedanzmessungen, etc.) auf Einzelzell-Ebene durchgeführt werden. Die selektive Ansteuerung in einer Anordnung kann entweder durch direkte elektrische Verbindung [176–185] (relativ kleine Anordnungen) oder durch Matrix-

15 Bemerkung: DEP-Sortierungen sind in dieser Arbeit nicht weiter von Bedeutung.

Adressierung der DEP-Fallen (Größe einer Anordnung prinzipiell unbeschränkt) realisiert werden[16]. Beispiele für stationäre DEP-Fallen, mit denen Einzelzell-Isolationen demonstriert werden konnten, sind die elektrifizierten Mikrowannenn als DEP-Fallen mit direkten elektrischen Zuleitungen in Abbildung 6.9c [186–188] und die planaren DEP-Fallen mit passiver Matrix-Ansteuerung in Abbildung 6.9d [189, 190]. DEP-Fallen mit aktiver Matrix-Ansteuerung können eingesetzt werden, um immobilisierte Zellen auch bei ruhendem Medium mit einem räumlich bewegten Feld deterministisch zu transportieren [191, 192]. Eine für diese Arbeit relevante Umsetzung ist das in Unterabschnitt 3.4.2 vorgestellte DEPArray™ NxT System.

6.3.2 *Möglichkeiten und Limitierungen*

MÖGLICHKEITEN Eine Zellmanipulation per Dielektrophorese eröffnet Anwendungen im mikrofluidischen Umfeld weitreichende Gestaltungsmöglichkeiten. Die wesentlichen Vorteile gegenüber alternativen Manipulationsmethoden lauten:

- Markerfreiheit, Spezifität und Sanftheit:

  Zellen müssen für eine dielektrophoretische Manipulation nicht zusätzlich markiert werden, so etwa durch Antikörper-konjugierte fluoreszente oder magnetische Label, wie sie beispielsweise bei der Fluoreszenz (FACS)- oder Magnet (Magnetic-Activated Cell Sorting, MACS)-aktivierten Zellsortierung benötigt werden. Eine Markierung mit Antikörpern gestaltet sich insbesondere dann als problematisch, wenn die betroffenen Proteine auf der Plasmamembran unterexprimiert und/oder stark heterogen bzw. sogar nicht bekannt sind. Stattdessen bestimmt, wie zuvor in den Abschnitten 6.1 und 6.2 beschrieben, die intrinsische dielektrische Polarisierbarkeit einer Zelle deren spezifische frequenzabhängige DEP-Antwort innerhalb eines gegebenen Mediums, wobei sowohl anziehende, als auch abstoßende Kräfte ausgeübt werden können. Da die DEP-Kraftwirkung ferner kontaktlos vermittelt wird, lassen sich die Viabilität der Zelle und der Zustand ihrer Plasmamembran optimal konservieren. Dies kann für nachfolgende molekulargenetische Charakterisierungen, wie beispielsweise die Untersuchung von Expressionsprofilen, von großer Bedeutung sein [24].

- Skalierbarkeit und MEMS-Kompatibilität:

  Nach (6.15) wird die Stärke der DEP-Kraft von der Feldinhomogenität

  $$|\nabla E^2| \propto \frac{U^2}{L^3}$$

  bestimmt, wobei U die Betriebsspannung ist, die an eine Elektrodengeometrie mit charakteristischer Größe L (dies entspricht der Breite bzw. dem Abstand der Elektroden) angelegt wird. Anders als im Falle der Magnetophorese, bei der zur Erzeugung von Inhomogenitäten der magnetischen Flussdichte $\overline{B}$ komplexe magnetische Geometrien erforderlich sind, können in einem Mikrofluidiksystem demzufolge DEP-Kräfte relativ einfach und präzise

16 Bemerkung: Optisch induzierte Elektroden, sogenannte Optoelectronic Tweezers, werden als eine gesonderte Strategie zur selektiven Freigabe von Partikeln aus Mikrowannen aufgefasst (siehe Tabelle 3.2).

durch eine geeignete Elektrodendimensionierung eingestellt werden. Klassische MEMS-Herstellungsverfahren lassen dies über mehrere Größenordnungen ($L \sim$ Hunderte µm bis wenige Hundert nm) hinweg zu, womit die für eine Manipulation erforderlichen DEP-Kräfte mit Spannungen erzielt werden können, die sich auch durch integrierte Schaltungen oder Batterien tragbarer Geräte zur Verfügung stellen lassen [35] (Abschn. 1.6), [110, 112, 193].

LIMITIERUNGEN Die bei einer Systemauslegung mit der Dielektrophorese einhergehenden Limitierungen seien nachfolgend genauer dargestellt:

- Durchsatz:

  Die Feldinhomogenität $|\nabla E^2|$ fällt, ausgehend von der Oberfläche einer Elektrodengeometrie, in ihrem Betrag exponentiell ab, was zu einer verhältnismäßig kleinen effektiven Reichweite der DEP-Kraft führt. Ist der Abstand zwischen einer Zelle und den felderzeugenden Elektroden demnach zu groß, liegt die Zelle also außerhalb dieser Reichweite ($\sim$ ein Elektrodenabstand und mehr), so ist die resultierende DEP-Kraft zu klein um eine Zellbewegung zu bewirken. Das Problem kann für klassische, quasi-planare Elektroden durch den Einsatz von ausreichend flachen Mikrofluidikkanälen umgangen werden, limitiert im Umkehrschluss jedoch das Fassungsvermögen und damit den Durchsatz eines DEP-Chips bei einer Zellmanipulation [194] (Gl. (11)).

  Geraten bei einer DEP-Manipulation, andererseits, Zellen zu nah aneinander, so kommt es zu einer unspezifischen Wechselwirkung (*Coulomb*-Anziehung) ihrer induzierten Dipole und, infolgedessen, zur sogenannten „Kettenbildung“. In diesem Zustand bewegen sich die beteiligten Zellen als Gruppe und einzelne Zellen können dielektrisch nicht länger voneinander unterschieden werden. Dies kann beispielsweise bei DEP-Sortierexperimenten eine Reduzierung der Sortiereffizienz und/oder -reinheit zur Folge haben. Der Effekt der Dipol-Dipol-Wechselwirkung kann dadurch vermieden werden, indem ein mittlerer Zellabstand von mindestens drei Zelldurchmessern eingehalten wird. Abermals ist dann aber der Durchsatz des DEP-Chips, nun jedoch bedingt durch eine reduzierte Beladekonzentration der Zellen, beschränkt [62, 111].

- Direkte Zellschäden:

  Fallen an der Plasmamembran einer Zelle lokal zu hohe externe elektrische Feldstärken ab, so kann es zu deren Beschädigung oder, im ungünstigsten Fall, sogar zu deren Zerstörung und damit zum Zelltod kommen, wonach eine DEP-Manipulation nicht länger möglich ist. Bei einer dielektrophoretischen Zellmanipulation sollte eine Transmembranspannung von $\sim$ 200 mV zur Aufrechterhaltung der Zellphysiologie nicht überschritten werden [175].

- Indirekte Zellschäden:

  In physiologischen Elektrolyten mit Leitfähigkeiten $\sigma_m > 1$ S/m können *Ohm*'sche Verluste zu einer signifikanten *Joule*'schen Erwärmung[17] führen, welche sich nachteilig auf die Zellviabilität auswirken kann. Die Temperaturerhöhung in einem Mikrofluidiksystem sollte bei tierischen Zellen, relativ zu einer physiologischen Temperatur von 37 °C, dauerhaft möglichst unterhalb von ~ 1 K gehalten werden [162].

- Nebeneffekte:

  Eine Möglichkeit, die Erwärmung innerhalb eines Mikrofluidiksystems zu reduzieren, besteht in der Strategie, die Medienleitfähigkeit unter Beibehaltung der isotonen Osmolarität künstlich herunterzusetzen, was z. B. durch den gleichwertigen Austausch von Ionen mit ungeladenen Osmolyten wie Saccharose oder Mannitol erfolgen kann[18]. Dieser Ansatz kann als Grundlage für klassische DEP-Sortierexperimente aufgefasst werden, bei denen sowohl attraktive, als auch repulsive, Kräfte bewirkt werden müssen. Die Medienleitfähigkeiten liegen dabei typischerweise bei $\sigma_m < 0,1$ S/m. Als kritisch gestalten sich hierbei jedoch zwei Probleme, die auf das Auslaufen der Ionen aus dem Zellinneren durch die Plasmamembran in das umgebende Medium infolge eines Gradienten der Ionenkonzentration zurückzuführen sind: (i) Der Ausgleich der Ionenkonzentration führt zu einem zeitlich exponentiellen Abfall der Amplitude der effetiven DEP-Kraft und beschränkt die Dauer von DEP-Sortierexperimenten auf ca. 15 Minuten. (ii) Weiterhin wurde gezeigt, dass es bei Zellen in niedrigleitfähigen DEP-Medien zu einer Veränderung der Zellphysiologie und Einschränkungen von Teilungs- und Lebensfähigkeiten kommen kann [62].

17 Bemerkung: Nach James Prescott Joule (1818–1889).

18 Bemerkung: In künstlichen DEP-Medien kann die Energieversorgung von Zellen durch Hinzugabe von Dextrose sichergestellt werden [35] (Abschn. 8.3).

Teil II

EXPERIMENTELLE VORGEHENSWEISE

Im nachfolgenden, zweiten Teil der Arbeit sind das Material zusammengefasst (Kapitel 7) und die Methoden beschrieben (Kapitel 8), die in den Teilen iii und iv für die Auslegung und Herstellung von Prototypen, die Vorbereitung von Proben und die (Vor-) Charakterisierung von ausgewählten Prozessschritten eingesetzt wurden.

7

MATERIAL

7.1 PROBENMATERIAL

Bei den experimentellen Untersuchungen in den Teilen iii und iv wurde sowohl auf Modell-, als auch auf Realproben zurückgegriffen.

MODELLPROBEN Modellproben sollten nicht jederzeit und/oder nur in beschränkten Mengen verfügbare Realproben in ausgewählten Beschaffenheiten möglichst definiert, einfach und robust nachbilden, um Untersuchungen mit maximaler Flexibilität und Reproduzierbarkeit zu erlauben. Für Modellproben sind folgende Haupt-Komponenten zum Einsatz gekommen (genaue Zusammensetzungen siehe Unterabschnitt 8.2.4):

- Blut gesunder Spender:

  Experimente in Teil iii, bei denen keine Markierung von kernhaltigen Blutzellen mit EpCAM-Antikörpern durchgeführt wurde, gestatteten die Verwendung von unmodifiziertem Vollblut gesunder Spender. Dieses wurde durch den Betriebsarzt bei Bosch am Standort in Renningen anonymisiert zur Verfügung gestellt. Hierzu wurde venöses Blut von freiwilligen Spendern in Standard EDTA-Röhrchen entnommen und (maximal zwei Tage lang) bis zur Verwendung im Kühlschrank bei + 4 °C gelagert.

- Tumorzellen:

  Bei den in den Teilen iii und iv eingesetzten Tumorzellen handelte es sich um Zellen der menschlichen Darmkrebs-Zelllinie HCT116 (DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland) [195]. Nähere Details zur Subkultivierung sind in Unterabschnitt 8.2.2 zu finden.

- Polymerbeads:

  In Teil iv sind des Weiteren monodisperse grün-fluoreszente Polystyrol (PS)-Beads vom Typ Fluoresbrite® YG[1] (Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstraße, Deutschland) mit 10 µm Durchmesser zum Einsatz gekommen. Die PS-Beads konnten bis zur Verwendung in deionisiertem (DI-) Wasser lichtgeschützt und im Kühlschrank bei + 4 °C gelagert werden. Die Beads wurden in Fläschchen mit Stamm-Konzentrationen von $\sim 4{,}55 \cdot 10^7$ 1/ml geliefert [197].

1 Bemerkung: Die Anregungs- und Emissionsmaxima des Farbstoffs liegen bei $\lambda_{ex} = 441$ nm und $\lambda_{em} = 486$ nm [196].

REALPROBEN In Teil iii wurden Blutproben von Krebspatienten mit gastrointestinalen Tumoren verwendet, welche Bosch im Rahmen der klinischen Studie (Aktenzeichen 114083 2019 05 08 vv) mit dem Arbeitstitel

„Therapy monitoring by (epithelial) circulating tumor cells (CETCs/CTCs) for patients with advanced gastrointestinal tumors“

in regelmäßigen Zeitabständen durch das Universitätsklinikum Tübingen (UKT) zur firmeninternen Durchführung von Forschungs- und Weiterentwicklungsarbeiten zur Verfügung gestellt wurden. Die anonymisierten Patientenproben wurden nach dem in Unterabschnitt 3.3.2 beschriebenen Vorgehen der maintrac®-Methode entnommen und bis zur Verwendung gelagert.

7.2 WEITERES MATERIAL

In Anhang B sind weiterhin sämtliche Chemikalien, das Einweg- und Verbrauchsmaterial, das Equipment sowie die Computerprogramme, die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommen sind, aufgelistet.

8

METHODEN

8.1 PROTOTYP-AUSLEGUNG UND -HERSTELLUNG

8.1.1 *Finite-Elemente-Analysen*

Um die Betriebsverhalten der in dieser Arbeit realisierten Prototypen besser abschätzen zu können, wurden Simulationen nach der Finite-Elemente-Methode (FEM) mithilfe von COMSOL Multiphysics durchgeführt. Dabei eingesetzte Simulationsparameter sind in Anhang C zu finden.

HYDRODYNAMISCHES BETRIEBSVERHALTEN Zur Beschreibung einer Kriechströmung mit dem Modul „Fluidströmung“ wurden folgende Randbedingungen für das Flussfeld $\overline{v}$ und den Druck p im stationären Fall angenommen:

- Gleichung (5.1) vereinfacht sich ohne äußere Volumenkräfte zu der linearen Impulsgleichung [96] (Gl. (2.41))

$$0 = -\nabla p + \eta \Delta \overline{v}.$$

- Für inkompressible Fluide erhält man eine vereinfachte Kontinuitätsgleichung (Massenerhaltung) der Gestalt [96] (Gl. (2.9))

$$\rho_m \nabla \cdot \overline{v} = 0.$$

ELEKTRISCHES BETRIEBSVERHALTEN Die wichtigsten Randbedingungen, die im Modul „AC/DC“ für das Potentialfeld ϕ im quasi-elektrostatischen Fall angenommen wurden, lauten [115] (Apx. A), [193] (Teil III), [198]:

- Es gilt das *Ohm*'sche Gesetz

$$\overline{j} = (\sigma + i\omega\varepsilon)\overline{E},$$

  in welchem sowohl Leitungsströme, als auch dielektrische Verschiebungsströme berücksichtigt werden [109] (Gl. (2.33)).

- Es gilt die Kontinuitätsgleichung (Ladungserhaltung) [109] (Gl. (2.10))

$$\nabla \cdot \overline{j} = 0.$$

Mithilfe des Moduls „Mathematik“ wurden weiterhin räumliche Ableitungen des Potentialfelds ϕ der Ordnung > 2 über eine Umwandlung von *Curl*-Elementen in *Lagrange*-Elemente durch partielle Differentialgleichungen (Partial Differential Equation, PDE) in Koeffizientenform berechnet.

8.1.2 *MEMS-Fabrikation*

Die in Teil iii eingesetzten Silizium (Si)-Chips wurden im Forschungsreinraum der Firma Bosch am Standort in Renningen gefertigt. Eine Übersicht zum Herstellungsprozess ist in Abbildung 8.1 gegeben (die genauen Parameter zu einzelnen Prozessschritten können Anhang D entnommen werden). Masken für die Fotolithographie-Schritte wurden mit der Software KLayout entworfen. Die Materialwahl und Definition von Mikrowannen als funktionale Strukturen wird in Unterabschnitt 10.1.2 diskutiert.

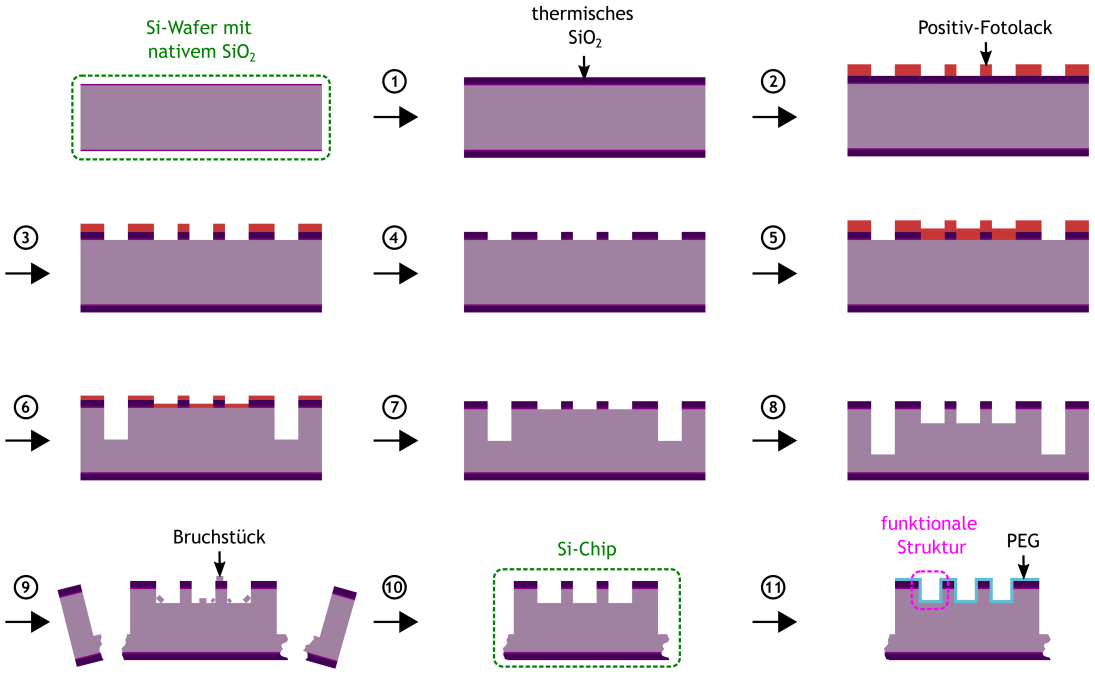


Abbildung 8.1: Herstellung von Si-Chips: (1) Thermische Oxidation, (2) Fotolithographie (Belacken, Belichten und Entwickeln) für die funktionalen Strukturen (Mikrowannen) und Brechgräben, (3) trockenchemisches Oxid-Ätzen, (4) Sauerstoffplasma, (5) Fotolithographie für die Brechgräben, (6) tiefes reaktives Ionentiefätzen (Deep Reactive Ion Etching, DRIE), (7) Sauerstoffplasma, (8) flaches reaktives Ionentiefätzen, (9) Chip-Vereinzelung, (10) Reinigung und Sauerstoffplasma & (11) Eintrocknung von Polyethylenglykol (PEG) [199].

8.1.3 *Leiterplattenherstellung*

Für die Untersuchungen in Teil iv wurden insgesamt drei Typen von Leiterplatten (Printed Circuit Board, PCB) realisiert:

1. Einzelzell-Isolationen wurden mit dreilagigen DEP-PCBs[1] (Cicorel SA, Boudry, Schweiz) nach Abbildung 8.2a durchgeführt. Die Technologiewahl und Definition von elektrifizierten Mikrowannen als funktionale Strukturen wird in Unterabschnitt 14.1.1 diskutiert.

1 Bemerkung: Es handelt sich hierbei um HDI-Leiterplatten in Sonderanfertigung.

2. Zur Bestimmung der DEP-Antwort von Tumorzellen in Vorcharakterisierungen wurden zweilagige Kalibrier-PCBs[2] (Multi Leiterplatten GmbH, Brunnthal, Deutschland) nach Abbildung 8.2b entwickelt. Die Technologiewahl und Definition von Quadrupolen als funktionale Strukturen wird in Unterabschnitt 14.1.2 diskutiert.

3. Eine elektrische Verbindung zu den DEP- und Kalibrier-PCBs wurde über ein Ansteuer-PCB hergestellt. Für weitere Details siehe Paragraph *Elektrische Ansteuerung* in Unterabschnitt 8.3.1.

Sämtliche PCB-Layouts und -Schaltpläne wurden mit EAGLE erstellt.

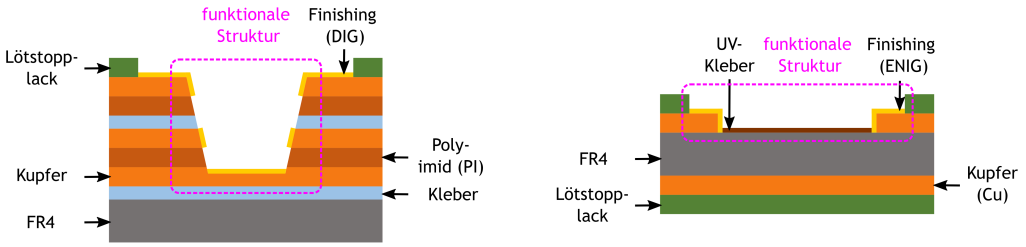


Abbildung 8.2: Lagenaufbau der (a) DEP- und (b) Kalibrier-PCBs. In (a) wurden funktionale Strukturen (elektrifizierte Mikrowannen) lasergebohrt. Für die Endoberfläche wurde direktes Immersionsgold (Direct Immersion Gold, DIG) eingesetzt. In (b) wurden FR4-Flächen in Bereichen der funktionalen Strukturen (Quadrupole) mit einem UV-Kleber übergossen (Eingabe via Dispenser und Dosiernadeln, Aushärtung gemäß Herstellerangaben). Als Endoberfläche diente „chemisch Gold“ (Electroless Nickel Immersion Gold, ENIG).

8.1.4 *Aufbau von Funktionsmustern*

Bevor Bauteile charakterisiert werden konnten, mussten diese zunächst mikrofluidisch integriert und kontaktiert werden. Hierfür wurden Prototypen (nachfolgend auch als Funktionsmuster bezeichnet) nach den Abbildungen 8.3a und 8.3b aufgebaut. Für die Erstellung der Layouts der Funktionsmuster-Komponenten wurden Inkscape, CorelDRAW Graphics Suite und SOLIDWORKS verwendet. Für die Strukturierung der eingesetzten Materialien gemäß den Layouts wurden ein UV-Ablationslaser und eine CO_2-Lasergraviermaschine eingesetzt. Eine Übersicht zum Aufbau der jeweiligen Funktionsmuster ist in Tabelle 8.1 gegeben. Die finalen Prototyp-Layouts werden in den Unterabschnitten 10.1.2 sowie 14.1.1 und 14.1.2 vorgestellt.

2 Bemerkung: Es handelt sich hierbei um Serien-Leiterplatten, siehe Standard-Spezifikationen in [200].

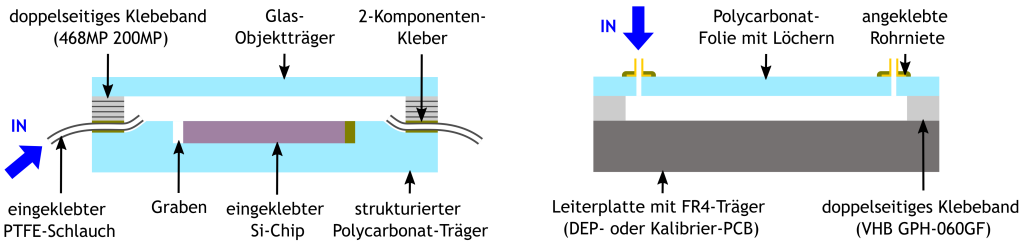


Abbildung 8.3: Prototyp-Aufbau für (a) Silizium-Chips sowie (b) DEP- und Kalibrier-PCBs. In (a) wurden Si-Chips und PTFE-Schläuche mit einem 2-Komponenten-Kleber in vorstrukturierte und gereinigte Objektträger aus Polycarbonat (PC) [107, 199] geklebt (eine Reinigung erfolgte in mit DI-Wasser gefüllten Färbetrögen via Ultraschallbad und Abblasen mit Stickstoff). Die Wände von Funktionsmustern wurden mit doppelseitigem Klebeband vom Typ 468MP 200MP definiert. Gereinigte Glas-Objektträger dienten als Abdeckungen (für eine Reinigung wurden Reinraum-Wischtücher, Isopropanol und Stickstoff eingesetzt). In (b) wurden Wände zwischen einer Leiterplatte und einer dünnen PC-Folie als Abdeckung mit doppelseitigem Klebeband vom Typ VHB GPH-060GF realisiert. Durch Löcher in der PC-Folie und angeklebte Rohrnieten konnten Funktionsmuster fluidisch zugänglich gemacht werden.

Tabelle 8.1: Verzeichnis der aufgebauten Funktionsmuster. Vor einer Integration wurden Bauteile mit einem Tisch-Rasterelektronenmikroskop, Nadel-Profilometer oder/und optischem Profilometer auf ordnungsgemäße Herstellung überprüft.

PROTOTYP	INTEGRIERTES BAUTEIL	WEITERE KOMPONENTEN
TEIL iii: UNTERSUCHUNG DER KOMPONENTE A		
Funktions-muster A	Si-Chip (vgl. Abbildung 8.1)	• PC-Objektträger • Doppelseitiges Klebeband (468MP 200MP) • Glas-Objektträger • PTFE-Schläuche • 2-Komponenten-Kleber

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung von Tabelle 8.1

PROTOTYP	INTEGRIERTES BAUTEIL	WEITERE KOMPONENTEN
TEIL IV: UNTERSUCHUNG DER KOMPONENTE B		
Funktions-muster B1	DEP-PCB (vgl. Abbildung 8.2a)	• Doppelseitiges Klebeband (VHB GPH-060GF) • PC-Folie • Angeklebte Rohrnieten
Funktions-muster B2	Kalibrier-PCB (vgl. Abbildung 8.2b)	• Doppelseitiges Klebeband (VHB GPH-060GF) • PC-Folie

8.2 PROBENVORBEREITUNG

8.2.1 *Ansetzen von Lösungen*

Beim Ansetzen von Lösungen wurde entweder durch Sterilfiltration (mit 50 ml Einwegspritzen und Einweg-Spritzenvorsatzfiltern) oder durch Autoklavieren (bei 121 °C für 20 min) für Sterilität gesorgt. Vor Beginn der Arbeiten wurde die Korrektheit der Messungen von pH-Wert und elektrischer Leitfähigkeit mit entsprechenden Kalibrierstandards sichergestellt. Eine Lösung wurde unmittelbar vor dem jeweiligen Experiment frisch angesetzt und, sofern nicht anders angegeben, auf Raumtemperatur gebracht. Eine Zusammenfassung der Lösungen ist in Tabelle 8.2 zu finden.

Tabelle 8.2: Verzeichnis der angesetzten Lösungen.

LÖSUNG	ZUSAMMENSETZUNG	VERWENDUNG
TEIL iii: UNTERSUCHUNG DER KOMPONENTE A		
AHD-575-Lösung	• DI-Wasser • 2 % (w/v) Triton® X-100 • 0,1 M NaOH	Untersuchung der selektiven Erythrozytenlyse (siehe 10.1.1, Teil 1)
All-in-One-Puffer (je 400 µl)	• 376 µl RBC-Lysepuffer (s. u.) • 4 µl Anti-EpCAM FITC/ 4 µl Isotyp-Kontrolle FITC • 10 µl PI (5,23 µM) • 10 µl Hoechst 33342 (317,64 µM)	Untersuchung der Zellmarkierung (siehe 11.1) und Erythrozytenbeseitigung (siehe 11.3)
Erythrozyten (RBC)-Lysepuffer (pH = 7,35 . . . 7,45)	• DI-Wasser • 155 mM NH_4Cl • 10 mM $KHCO_3$ • 1 mM EDTA • HCl bzw. KOH (für Ziel-pH-Wert)	Untersuchung der selektiven Erythrozytenlyse (siehe 10.1.1) und Zellvereinzelung (siehe 11.2)
Fluorescein-Lösung	• DI-Wasser • 0,01 % (w/v) Fluorescein-Natrium-Salz	Nachweis der Befüllbarkeit von Si-Mikrowannen (siehe 10.1.3)
PEG-Lösung	• DI-Wasser • 2 % (w/v) PEG 2000 • 75 % (v/v) Ethanol	Si-Chip-Herstellung (siehe 8.1.2 & Anhang D)
Testpuffer (je 400 µl)	• 390 µl RBC-Lysepuffer (s. o.) • 10 µl PI (5,23 µM)	Untersuchung der selektiven Erythrozytenlyse (siehe 10.1.1, Teil 3)

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung von Tabelle 8.2

LÖSUNG	ZUSAMMENSETZUNG	VERWENDUNG
Zellfixierungs-Lösung 1	• DI-Wasser • 2,5 % (w/v) Glutaraldehyd	Untersuchung der Zellvereinzelung (siehe 11.2)
Zellfixierungs-Lösungen 2 bis 9	• DI-Wasser • 30 % (v/v) ... 100 % (v/v) Ethanol (10 % (v/v)-Schritte)	
TEILE iii UND iv: UNTERSUCHUNG DER KOMPONENTEN A UND B		
PBS-Waschpuffer (pH = 7,15 ... 7,25)	• PBS • 1 mM EDTA • 1 % (w/v) BSA	Subkultivierung der HCT116-Tumorzellen (siehe 8.2.2)
Zellkulturmedium (pH = 7,35 ... 7,45)	• DMEM • + 10 % FBS • + 1 % Penicillin/ Streptomycin (1 x)	
TEIL iv: UNTERSUCHUNG DER KOMPONENTE B		
CFSE-Stammlösung (5 mM)	• 18 µl DMSO • 50 µg CFSE	DEP-Isolation von HCT116-Tumorzellen (siehe 14.1.3 & 15.2)
DEP-Puffer 1 (σ_m = 1,6 µS/cm)	• DI-Wasser • 0,004 % (v/v) Tween® 20	DEP-Isolation von PS-Beads (siehe 15.1)
DEP-Puffer 2 (σ_m = 205 µS/cm & pH = 7,25 ... 7,35)	• DI-Wasser • 9,5 % (w/v) Saccharose • 0,02 % (w/v) Dextrose • 0,1 % (w/v) BSA • 0,1 mM EDTA • 39 µM KH_2PO_4 • 61 µM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ • (NaCl für Ziel-Leitfähigkeit)	DEP-Isolation von HCT116-Tumorzellen (siehe 14.1.3 & 15.2)

8.2.2 *Subkultivierung von Tumorzellen*

Suspensionen von HCT116-Tumorzellen wurden in Aliquots zu je ca. 1 ml mit flüssigem Stickstoff kryokonserviert und für Experimente mithilfe eines auf 37 °C vorgewärmten Wasserbads aufgetaut. Eine aufgetaute Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon® Tube mit 9 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium übertragen und bei 125 g für 6 min zentrifugiert. Anschließend konnten der Überstand verworfen und die Zel-

len in 15 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert werden. Diese Suspension wurde in 75 cm² Zellkulturflaschen eingegeben und bei 37 °C und 5 % CO_2 in einem Inkubator gelagert. Bei ca. 80 % Konfluenz (Kontrolle mit einem Lichtmikroskop) wurden die Tumorzellen subkultiviert. Hierzu wurden das verbrauchte Zellkulturmedium entfernt und die adhärent gewachsenen Zellen mit 2 mal 5 ml vorgewärmtem PBS gewaschen. Um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen, folgte die Hinzugabe und Inkubation von 2 ml vorgewärmter Trypsin-EDTA-Lösung für 3 min bei Raumtemperatur. Abgelöste Zellen in Trypsin-EDTA wurden in einem 15 ml Falcon® Tube mit 8 ml Zellkulturmedium aufgenommen, bei 200 g für 5 min zentrifugiert und, nach Dekantieren des Überstands, in 10 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. 1 ml dieser Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit 14 ml frischem Zellkulturmedium ergänzt. Zum Schluss wurde die neue Flasche bis zur nächsten Subkultivierung in den Inkubator gelegt [201]. Der verbliebene Teil der Zellsuspension konnte zur Herstellung von Modellproben für Zellexperimente eingesetzt werden. Dazu wurden die Tumorzellen nach erneuter Zentrifugation bei 200 g für 5 min und Verwerfen des Überstands in das gleiche Volumen PBS-Waschpuffer resuspendiert und nach maximal 5 Stunden Standzeit bei Raumtemperatur eingesetzt.

8.2.3 *Einstellung der Partikelkonzentration*

Nach einer Subkultivierung stand in der Regel eine Zellsuspension in PBS-Waschpuffer mit etwa $5 \cdot 10^6$ Zellen je ml und > 95 % Viabilität zur Verfügung, was durch einen automatischen Zellzähler ermittelt werden konnte. Für eine Doppelbestimmung der Zellkonzentration und -Viabilität wurden 15 µl einer Mischung, bestehend aus 7,5 µl homogenisierter Zellsuspension und 7,5 µl Trypanblau (Verdünnungsverhältnis 1:2), in die zwei Kammern eines Zell-Zählslides eingegeben, welches daraufhin in den Zellzähler geschoben und durch diesen automatisch analysiert wurde. Auf die gleiche Weise konnte auch die Konzentration von PS-Beads in DI-Wasser bestimmt werden, wobei die Beads ohne weitere Verdünnung durch Trypanblau in die Zählslides eingegeben wurden (Verdünnungsverhältnis 1:1). In Kombination mit geeigneten Konzentrations- oder Verdünnungsschritten konnte der Zellzähler so auch zur Einstellung einer Wunsch-Konzentration von Tumorzellen in PBS-Waschpuffer sowie PS-Beads in DI-Wasser eingesetzt werden.

8.2.4 *Herstellung von Modellproben*

Sämtliche Modellproben, die mithilfe der in Abschnitt 7.1 vorgestellten Haupt-Komponenten und der in Tabelle 8.2 aufgeführten Lösungen im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, sind in Tabelle 8.3 zusammengefasst. Die Modellproben wurden unmittelbar vor dem jeweiligen Experiment hergestellt und, sofern nicht anders angegeben, auf Raumtemperatur gebracht. Ebenso erfolgten alle Experimente, es sei denn, es wurde anders aufgeführt, bei Raumtemperatur. Die einzelnen Schritte der Modellproben-Herstellung sind im Folgenden beschrieben:

UNTERSUCHUNG DER KOMPONENTE A

- Modellprobe A1:

  Es handelt sich um das Vollblut gesunder Spender, welches ohne weitere Modifikationen oder Beimischungen direkt für Experimente eingesetzt wurde.

- Modellprobe A2:

  Um Modellprobe A2 zu erhalten, wurden die kernhaltigen Zellen des Vollbluts gesunder Spender mit unangefärbten Tumorzellen der Zelllinie HCT116 ersetzt. Hierzu wurde ein mindestens 3 ml Vollblut enthaltendes EDTA-Röhrchen zunächst bei 100 g für 10 min zentrifugiert, um die festen und flüssigen Bestandteile der Probe sanft voneinander zu trennen. Anschließend wurden, unter Vermeidung der Aspiration von kernhaltigen Zellen als Schicht zwischen den getrennten Phasen, 450 µl des klaren Blutplasmas und 500 µl der Erythrozyten-Fraktion am Boden des Röhrchens entnommen und in einem 1,5 ml Eppendorf Tube® zusammengemischt. Der Mischung wurden final 50 µl einer Suspension von HCT116-Tumorzellen in PBS-Waschpuffer mit ca. $1 \cdot 10^8$ Zellen je ml hinzugegeben, um eine Gesamt-Zell-Konzentration von $\sim 5 \cdot 10^6$ 1/ml zu erhalten.

UNTERSUCHUNG DER KOMPONENTE B

- Modellprobe B1:

  PS-Beads mit 10 µm Durchmesser wurden nach zweimaligem Waschen mit DEP-Puffer 1 in einem 15 ml Falcon® Tube bei 700 g für 2 min mit einer finalen Bead-Konzentration von ca. $5 \cdot 10^4$ 1/ml in 10 ml DEP-Puffer 1 verteilt.

- Modellprobe B2:

  Als Modellprobe B2 dienten mit CFSE angefärbte und in DEP-Puffer 2 suspendierte HCT116-Tumorzellen. Für eine Färbung wurden hierzu zu 5 ml Tumorzell-Suspension in PBS-Waschpuffer nach einer Subkultivierung in einem 15 ml Falcon® Tube zunächst 2 µl CFSE-Stammlösung hinzugegeben. Einer Durchmischung und lichtgeschützten Inkubation bei 37 °C für 20 min folgte dann eine Zentrifugation der Zellen bei 700 g für 2 min. Danach wurden der Überstand dekantiert und die Tumorzellen rasch in 5 ml DEP-Puffer 2 verteilt. Um die Ziel-Leitfähigkeit des DEP-Puffers beizubehalten, wurde der Waschvorgang nocheinmal wiederholt. Die finale Zell-Konzentration wurde durch 100-fache Verdünnung von 100 µl Zellsuspension mit 9,9 ml DEP-Puffer 2 in einem neuen 15 ml Falcon® Tube auf etwa $5 \cdot 10^4$ 1/ml eingestellt. DEP-Experimente mussten unmittelbar nach Herstellung der Modellprobe begonnen und auf maximal 15 Minuten Dauer beschränkt werden[3].

3 Bemerkung: Siehe Paragraph *Limitierungen* in Unterabschnitt 6.3.2.

Tabelle 8.3: Verzeichnis der hergestellten Modellproben.

MODELLPROBE	ZUSAMMENSETZUNG	VERWENDUNG
TEIL iii: UNTERSUCHUNG DER KOMPONENTE A		
Modellprobe A1	Vollblut gesunder Spender (unmodifiziert)	Untersuchung der selektiven Erythrozytenlyse (siehe 10.1.1) und Zellvereinzelung (siehe 11.2)
Modellprobe A2	• Vollblut gesunder Spender (ohne kernhaltige Zellen) • HCT116-Tumorzellen (unangefärbt, $\sim 5 \cdot 10^6$ 1/ml)	Untersuchung der Zellmarkierung (siehe 11.1)
TEIL iv: UNTERSUCHUNG DER KOMPONENTE B		
Modellprobe B1	• DEP-Puffer 1 • 10 µm PS-Beads ($\sim 5 \cdot 10^4$ 1/ml)	DEP-Isolation von PS-Beads (siehe 15.1)
Modellprobe B2	• DEP-Puffer 2 • HCT116-Tumorzellen (Anfärbung mit CFSE-Stammlösung, $\sim 5 \cdot 10^4$ 1/ml)	DEP-Isolation von HCT116-Tumorzellen (siehe 14.1.3 & 15.2)

8.3 (VOR-) CHARAKTERISIERUNG

8.3.1 *Messaufbau*

PNEUMATISCHE AKTUIERUNG Funktionsmuster konnten in den Teilen iii und iv über Silikonschläuche entweder manuell per Pipette und Filterspitzen oder automatisiert mithilfe einer Spritzenpumpe mit Probenmaterial befüllt werden. In letzterem Fall ließ sich der Volumenstrom im Bereich $0,01\ \mu l/s \leq Q \leq 200\ \mu l/s$ präzise und reproduzierbar einstellen. Das zugehörige Verbindungsschema ist in Abbildung 8.4 zu erkennen.

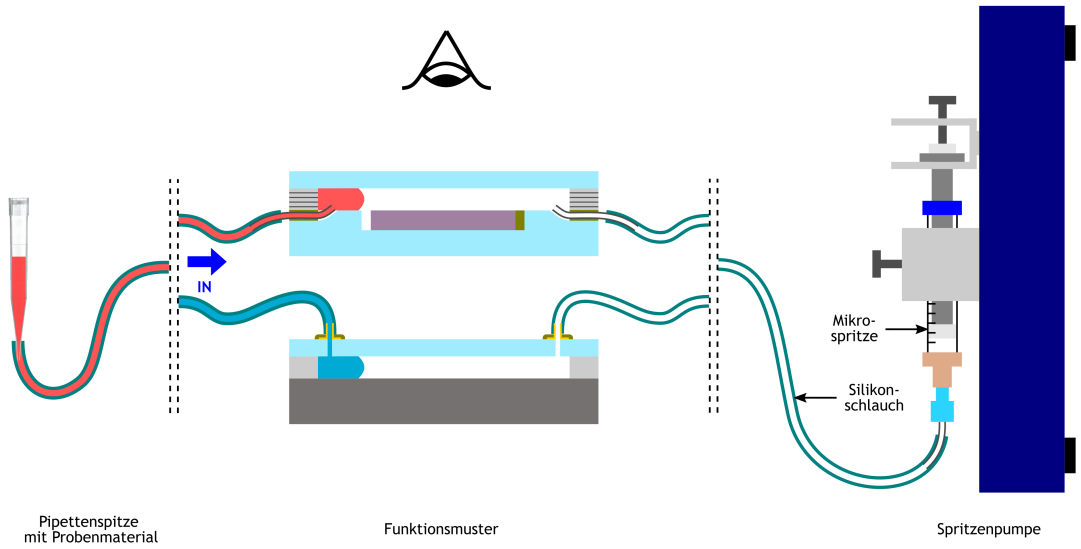


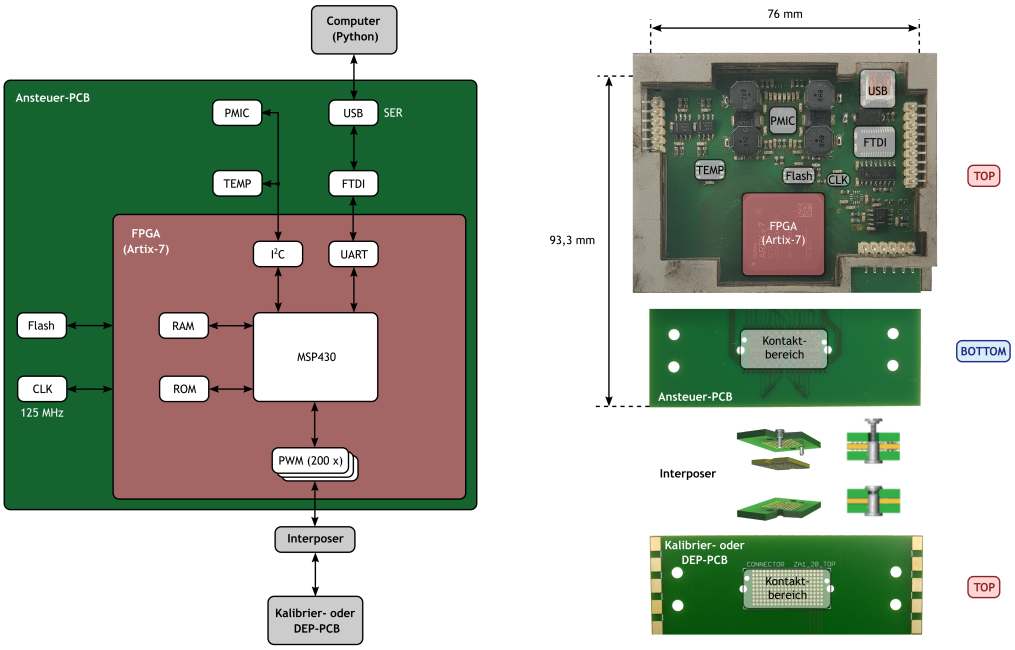
Abbildung 8.4: Kontrolle des Flüssigkeitstransports mithilfe einer Spritzenpumpe. Durch Erzeugen eines Unterdrucks in einer Mikrospritze konnte eine Probe aus einer 1.000 µl Pipettenspitze angezogen und durch einen Silikonschlauch in ein Funktionsmuster befördert werden (der gleichmäßigen Befüllung eines initial trockenen Funktionsmusters konnte durch leichtes Anheben dieses auf der Outlet-Seite nachgeholfen werden). Weitere Flüssigkeiten konnten blasenfrei nachgezogen werden, nachdem sie sequentiell in die Pipettenspitze einpipettiert wurden.

ELEKTRISCHE ANSTEUERUNG Die in Teil iv für eine dielektrophoretische Manipulation von Partikeln erforderlichen elektrischen Signale wurden mit einem vierlagigen Ansteuer-PCB[4] (Multi Leiterplatten GmbH, Brunnthal, Deutschland) generiert, dessen Blockschaltbild und Layout in den Abbildungen 8.5a und 8.5b dargestellt sind. Das Ansteuer-PCB wurde mit einem Field Programmable Gate Array (FPGA) ausgestattet[5] und konnte durch Anpressen und Anschrauben über einen Interposer elektrisch mit den Elektroden eines DEP- oder Kalibrier-PCBs verbunden werden. Jeder Elektrode ließ sich exklusiv einer der insgesamt 200 als Ausgänge vorkonfigurierten Pins des FPGAs zuweisen, wobei an jedem Output-Pin durch Pulsweitenmodu-

4 Bemerkung: Es handelt sich hierbei um Serien-Leiterplatten, siehe Standard-Spezifikationen in [200]. Das Layout und die Programmierung basierten auf der langjährigen FPGA-Expertise von Dr. Michael Dreschmann bei der Robert Bosch GmbH. – Vielen herzlichen Dank dafür!

5 Bemerkung: Als FPGA wurde ein Artix®-7 (Xilinx, Inc., San José, USA) verbaut.

lation (PWM) Rechteckspannungen mit variablem Duty-Cycle bei Frequenzen bis zu maximal 62,5 MHz und Spannungspegeln mit 0 V (OFF) und 3,3 V (ON) eingestellt werden konnten. Für die Programmierung der PWM-Generatoren nach Verbinden des Ansteuer-PCBs per USB mit dem Computer wurde die integrierte Entwicklungsumgebung Spyder und die Programmiersprache Python eingesetzt. Skripte und eine grafische Benutzeroberfläche (Graphical User Interface, GUI) vereinfachten die Bedienung während Experimenten (siehe hierzu auch Anhang E).



(a) (b)

Abbildung 8.5: FPGA-basiertes Ansteuer-PCB mit den wichtigsten Komponenten als (a) Blockschaltbild und (b) bestückte Platine mit teiltransparentem Gehäuse. Das Ansteuer-PCB wurde über ein Interposer-System (mit insgesamt 10 x 20 Kontakten) [202] mit den DEP- bzw. Kalibrier-PCBs verbunden. Die Oberseite (TOP) einer Platine ist rot und die Unterseite (BOTTOM) blau markiert. Die Formen angelegter Signale konnten zu jedem Zeitpunkt mit einem Oszilloskop und einem Hand-Multimeter über Pads am linken und rechten Rand der angesteuerten Platinen überwacht werden.

8.3.2 *Bildaufnahme und -auswertung*

LICHTMIKROSKOPIE Für die optische Inspektion von Funktionsmustern, Mikrotiterplatten und Zell-Zählslides während Experimenten wurden in den Teilen iii und iv ein inverses und ein aufrechtes Fluoreszenzmikroskop verwendet. Beide Mikroskope verfügten jeweils über eine integrierte Kamera mit Videoaufnahme-Funktion und einen motorisierten *x*-*y*-Scanningtisch. Während Aufnahmen in Fluoreszenzkanälen wurden die Räume abgedunkelt und die Mikroskope abgedeckt. Sämtliche Mikroskopiebilder wurden im *.tif*-Dateiformat (sRGB-Farbraum) abgespeichert.

ZELLZÄHLUNG Aufgezeichnete Bilder konnten per Mikroskopie-Software zusammengesetzt und zu einem späteren Zeitpunkt mit ImageJ nachbearbeitet und ana-

lysiert werden. Für halbautomatisierte Zellzählungen wurden (i) die Find-Maxima-Funktion (Prominence: Benutzerdefiniert) nach einer vorausgegangenen Hintergrund-Subtraktion (Rolling Ball Radius: 10 Pixel) und (ii) die Analyze-Particles-Funktion (Size: 10 ... ∞ Pixel², Circularity: 0,00 ... 1,00) nach einer vorausgegangenen Subtraktion des Hintergrunds (Rolling Ball Radius: 100 Pixel), Einstellung eines Schwellenwerts (Limits: Benutzerdefiniert) sowie Anwendung der Funktionen Fill Holes, Open, Mask Conversion und Watershed eingesetzt.

8.3.3 *Vorbetrachtungen*

SYSTEM-MINIATURISIERUNG Die Untersuchung der selektiven Erythrozytenlyse in Unterabschnitt 10.1.1 erfolgte in den insgesamt vier nachfolgenden Teilen.

- Teil 1:

  Für die Untersuchung der Lyseeffizienz als Funktion der Verdünnung von Vollblut mit RBC-Lysepuffer wurden insgesamt 29 mal 15 ml Falcon® Tubes mit jeweils 3 ml AHD-575-Lösung vorbeladen (die Tubes wurden bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt aufbewahrt). Um Mess-Lösungen zu erhalten, wurden jedem Falcon® Tube im weiteren Verlauf 580 µl Probenmaterial aus einer (i) Standard- oder (ii) Test-Reihe hinzugegeben. (i) Um eine Standard-Reihe vorzubereiten, wurden Blutplasma und Blutlysat ohne Erythrozytenmembrane aus Modellprobe A1[6] benötigt. 2 ml klares Blutplasma konnte nach sanfter Zentrifugation eines ersten EDTA-Röhrchens mit Modellprobe A1 bei 100 g für 10 min als Überstand gewonnen und in ein separates 15 ml Falcon® Tube abgesaugt werden. Um das Blutlysat ohne Erythrozytenmembrane herszustellen, wurde 1 ml der Modellprobe A1 aus einem zweiten EDTA-Röhrchen in ein 15 ml Falcon® Tube gegeben und zunächst mit 14 ml RBC-Lysepuffer vermischt. Einer 15-minütigen Lyse folgte anschließend eine Zentrifugation des Röhrchens bei 500 g für 30 min und ein Überführen von 5 ml des Blutlysats ohne Erythrozytenmembrane als Überstand in ein separates 15 ml Falcon® Tube. Als Standards für eine 100, 90, 75, 50, 25 und 0 %-ige RBC-Lyse wurden 580 µl, 522 µl, 435 µl, 290 µl, 145 µl und 0 µl des Blutlysats ohne Erythrozytenmembrane zusammen mit 0 µl, 2 µl, 5 µl, 10 µl, 15 µl und 20 µl Blutplasma sowie 0 µl, 56 µl, 140 µl, 280 µl, 420 µl und 560 µl PBS in sechs mit 3 ml AHD-575-Lösung vorbeladene Falcon® Tubes gegeben. (ii) Für eine Test-Reihe wurden in 23 mal 15 ml Falcon® Tubes zu jeweils 100 µl Modellprobe A1 aus dem zweiten EDTA-Röhrchen zwischen 1.300 µl und 50 µl RBC-Lysepuffer (Verdünnungsverhältnisse zwischen 1:14 und 1:1,5) beigemischt. Nach 15 min Lysezeit erfolgten ein Auffüllen in allen Tubes mit PBS auf 1.500 µl sowie eine Zentrifugation der Tubes bei 500 g für 30 min. Aus jedem Tube wurden am Ende 580 µl Überstand in ein mit 3 ml AHD-575-Lösung vorbeladenes Falcon® Tube gegeben.

  Nachdem alle Mess-Lösungen angesetzt und sorgfältig durchgemischt wurden, erfolgte ein Transfer von 2 ml jeder Lösung in jeweils eine Küvette. Mit einem Mikroplatten-Reader als Photospektrometer wurde dann die Extinktion

6 Bemerkung: Die hier eingesetzten Modellproben A1 besaßen eine Standzeit von 0 Tagen.

jeder Mess-Lösung bei einer Schichtdicke von 10 mm zwischen 450 nm und 650 nm (in Schritten von 5 nm) gemessen.

- Teil 2:

  Für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Lyseeffizienz wurden in insgesamt 60 Küvetten jeweils 2 ml PBS vorgelagert. Der Beginn einer Zeitaufnahme bei einer Messung erfolgte ab dem Moment, in dem in einem 15 ml Falcon® Tube zu 1.600 µl RBC-Lysepuffer 400 µl der Modellprobe A1[7] hinzugegeben wurden (Start der RBC-Lyse im Verdünnungsverhältnis 1:5). Um die Lysereaktion zu gegebenen Zeitpunkten zu stoppen, wurden, unmittelbar nach Eingabe und sorgfältigem Durchmischen, für eine Dauer von insgesamt 15 min in Zeitabständen von 15 Sekunden Aliquots des lysierenden Bluts zu je 25 µl in jeweils eine mit 2 ml PBS vorbeladene Küvette gegeben. Die Inhalte der Küvetten wurden dann in umgekehrter Reihenfolge der Aliquot-Eingabe vorsichtig durchmischt und für ein Auslesen der Extinktion bei einer Schichtdicke von 10 mm bei 540 nm in einen Mikroplatten-Reader als Photospektrometer gelegt.

  Um eine (i) Positiv- und (ii) Negativ-Kontrolle zu erhalten, wurden in weiteren zwei 1,5 ml Eppendorf Tubes® 200 µl der Modellprobe A1 (i) einmal mit 800 µl RBC-Lysepuffer und (ii) einmal mit 800 µl PBS vermischt (jeweils Verdünnungsverhältnis 1:5). Nach 15 Minuten Standzeit wurden jeweils 25 µl einer Mischung in eine mit 2 ml PBS vorbeladene Küvette gegeben und sorgfältig durchmischt. Für die Positiv- und Negativ-Kontrollen wurde die Extinktion bei einer Schichtdicke von 10 mm jeweils zwischen 350 nm und 620 nm (in Schritten von 5 nm) vermessen.

- Teil 3:

  Bei der Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Viabilität von kernhaltigen Zellen in Blutlysat erfolgte der Beginn einer Zeitaufnahme für eine Messung ab dem Moment, in dem in einem 1,5 ml Eppendorf Tube® zu 800 µl Testpuffer weitere 200 µl der Modellprobe A1[8] hinzugegeben wurden (Start der Verweildauer und Lyse mit dem Testpuffer im Verdünnungsverhältnis 1:5). Nach einer 5-minütigen RBC-Lyse wurden 15 µl des Blutlysats mit kernhaltigen Zellen in ein Zell-Zählslide eingegeben. Es vergingen weitere 5 Minuten für das Abdichten von Inlet und Outlet des Zählslides mit einem optisch transparenten Klebeband, das Einlegen des Slides in die Halterung eines inversen Fluoreszenzmikroskop und die Einstellung der Parameter am Mikroskop zur Untersuchung der sedimentierten kernhaltigen Zellen in einem Ausschnitt des Slide-Bodens. Danach konnte eine Messreihe, bei der insgesamt 2 Stunden lang alle 2 min jeweils eine Aufnahme im Hellfeld-Kanal (Durchlicht) sowie im Fluoreszenzkanal DsRED (jeweils 40 x Gesamtvergrößerung) gemacht wurde, gestartet werden.

  Die in einer Messreihe (i) vorhandene Gesamtanzahl von kernhaltigen Zellen sowie (ii) der prozentuale Anteil von toten Zellen im zeitlichen Verlauf wur-

7 Bemerkung: Die hier eingesetzten Modellproben A1 besaßen eine Standzeit von einem Tag.
8 Bemerkung: Die hier eingesetzten Modellproben A1 besaßen eine Standzeit von einem Tag.

den mithilfe von ImageJ bestimmt. (i) Zur Bestimmung der Gesamt-Zellzahl wurde dafür die Find-Maxima-Funktion und die erste Hellfeld-Aufnahme der Messreihe verwendet. (ii) Der prozentuale Anteil von toten Zellen im zeitlichen Verlauf wurde nach einem Stack-Import aus allen Aufnahmen der Messreihe im DsRED-Kanal anhand der Kernfärbung durch PI mithilfe der Analyze-Particles-Funktion extrahiert.

- Teil 4:

  Für die Messung der Massendichte und dynamischen Viskosität eines Sedimentationsmediums in Abhängigkeit von der Temperatur wurde als Probenmaterial in 3 mal 15 ml Falcon® Tubes (i) einmal 2 ml Modellprobe A1 mit 8 ml PBS (Verdünnungsverhältnis 1:5), (ii) einmal 2 ml Modellprobe A1 mit 8 ml RBC-Lysepuffer (Verdünnungsverhältnis 1:5) sowie (iii) einmal 10 ml DI-Wasser eingegeben und sorgfältig durchmischt, wobei in Fall (ii) das Blutlysat als Überstand nach einer 5-minütigen RBC-Lyse und Zentrifugation bei 700 g für 7 min weiterverwendet wurde. Vor jedem Messvorgang wurden die Messleitungen des eingesetzten Viskosimeters zunächst gründlich mit DI-Wasser, Isopropanol und Petrolether gereinigt und mit Druckluft getrocknet. Erst im Anschluss wurden 5 ml Probenmaterial, welches aus einem 15 ml Falcon® Tube in ein sauberes Becherglas pipettiert wurde, in eine neue 10 ml Einwegspritze aufgenommen und blasenfrei in die Messleitungen gepumpt. Die Massendichte und die dynamische Viskosität einer Probe wurden zwischen 20 °C und 38 °C an 45 äquidistanten Messpunkten bestimmt.

MIKROWANNEN-BEFÜLLBARKEIT Zur Beurteilung der Mikrowannen-Befüllbarkeit in Unterabschnitt 10.1.3 wurden Funktionsmuster vom Typ A, für welche für Vergleichszwecke fertig prozessierte und gereinigte Silizium-Chips (i) ohne und (ii) mit eingetrockneter PEG-Schicht (siehe Schritt 11 in Abbildung 8.1) eingesetzt wurden, aufgebaut. Mit einer Spritzenpumpe wurden durch beide Typen von Funktionsmustern zunächst jeweils 300 µl Fluorescein-Lösung bei 20 µl/s und, unmittelbar im Anschluss und ohne Einschluss von Luftblasen, jeweils 600 µl FC-40 bei 2 µl/s befördert (siehe hierzu auch [203]). Die Mikrowannen der Si-Chips konnten mit einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop im Hellfeld- (Auflicht) sowie im FITC-Kanal (jeweils 25 x Gesamtvergrößerung) untersucht werden.

ROT-EXPERIMENTE Für die ROT-Experimente in Unterabschnitt 14.1.3 wurden Funktionsmuster vom Typ B2 hergestellt. Messungen fanden in voneinander isolierten $\sim$ 4,2 µl großen ROT-Kammern statt, auf deren Böden jeweils ein Quadrupol gemäß Abbildung 6.9a angeordnet war. Für eine Messung wurden 13 Kammern manuell mit einer Pipette und feinen Filterspitzen direkt durch die Öffnungen in der PC-Folie vollständig mit Modellprobe B2 befüllt. Um Verdunstung vorzubeugen, wurden die befüllten Kammern sofort mit einem Streifen optisch transparentem Klebeband versiegelt. Nach 3 Minuten Sedimentationszeit wurde für eine ROT-Analyse diejenige Kammer ausgewählt, bei der lediglich eine lebende Tumorzelle zwischen den Elektrodenspitzen eines Quadrupols vorzufinden war. Der Durchmesser dieser Zelle konnte mit einem Mikrometer bestimmt werden. Mit einem räumlich stationären elektrischen Feld[9] ($f = 10$ kHz, $U_{RMS} = 1{,}65$ V) wurde die Zelle dann

9 Bemerkung: Benachbarte Elektroden besitzen eine Phasenverschiebung von 180°.

zunächst per nDEP in das Zentrum des Quadrupols gedrückt. Bei gleicher Spannungsamplitude konnte an die Elektroden anschließend ein Drehfeld angelegt und die Zelle zur Rotation angeregt werden. Die Rotation wurde mit einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop im FITC-Kanal (50 x Gesamtvergrößerung) gefilmt. Einzelne Bilder eines Videos wurden mithilfe von MATLAB für eine Bestimmung der Zell-Winkelgeschwindigkeit via ImageJ extrahiert. Insgesamt wurden für eine Tumorzelle 17 Frequenzen zwischen 10 kHz und 15 MHz (5 Frequenzen je Dekade) für jeweils 10 s angefahren (Mittelung aus 4 Messwerten für jede Frequenz). Basierend auf (A.5) und (A.11) konnte mithilfe des Programms MyDEP aus den Messdaten eine optimale DEP-Antwort Re $\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]$ der HCT116-Tumorzellen nach dem Ein-Schalen-Modell bestimmt werden.

8.3.4 *Experimente zur Vollblut-Aufbereitung*

Die experimentellen Ergebnisse in Kapitel 11 beruhen auf nachfolgend zusammengefasstem Vorgehen.

ZELLMARKIERUNG Zur Untersuchung der Anfärbung von Vollblut mit einem All-in-One-Puffer in Abschnitt 11.1 wurden zu 100 µl der Modellprobe A2 in einem 1,5 ml Eppendorf Tube® weitere 400 µl All-in-One-Puffer mit Anti-EpCAM beigemischt (Verdünnungsverhältnis 1:5). Nach einer Lysezeit von 5 min wurden Aliquots des Blutlysats mit enthaltenen Tumorzellen zu je 100 µl in die Wannen einer 96-Well-Platte mit Kunststoffboden gegeben. Die Platte wurde zur Vermeidung von Verdunstung sofort mit einer PCR-Folie versiegelt. Anschließend wurde die Platte für eine Sedimentation der Tumorzellen und vollständige Inkubation der Farbstoffe für 20 min lichtgeschützt stehen gelassen. Zum Schluss wurden die Tumorzellen auf den Böden der befüllten Wannen mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop im Hellfeld-Kanal (Durchlicht) sowie in den Fluoreszenzkanälen EGFP, DsRED und DAPI (jeweils 400 x Gesamtvergrößerung) untersucht.

Um eine Negativ-Kontrolle zu erhalten, wurde das Vorgehen unter Einsatz eines All-in-One-Puffers mit Isotyp-Kontrolle parallel nachgestellt.

ZELLVEREINZELUNG Zur Beurteilung des Effekts einer RBC-Lyse in Abschnitt 11.2 wurde für Zell-Fixierungen ein Deckglas an den Rändern mit Klebeband auf dem Kunststoffboden der Wanne einer 6-Well-Platte befestigt. Anschließend wurde in die Wanne 1,5 ml Zellfixierungs-Lösung 1 gegeben. Unter sorgfältigem Durchmischen wurden zu der befüllten Wanne weiterhin (i) 10 µl von Modellprobe A1 im verdünnten Zustand und (ii) 100 µl Blutlysat eingegeben. (i) In einem 1,5 ml Eppendorf Tube® wurde eine Verdünnung von 100 µl Modellprobe A1 durch Beimischen von 400 µl PBS realisiert (Verdünnungsverhältnis 1:5). (ii) Das Blutlysat konnte nach Vermischen von 100 µl der Modellprobe A1 mit 400 µl RBC-Lysepuffer (Verdünnungsverhältnis 1:5), 5 min Lysezeit und Zentrifugation bei 700 g für 7 min in einem 1,5 ml Eppendorf Tube® als Überstand abgesaugt werden. Nach einer Einwirkzeit von mindestens 3 Stunden wurde die Well-Platte leicht angehoben, um den Inhalt der Wanne am Rand außerhalb des Deckglases vorsichtig abzusaugen und mit 1,5 ml DI-Wasser auszutauschen. Der Vorgang des Flüssigkeitsaustauschs wurde für die Zellfixierungs-Lösungen 2 bis 9 bei Portionen à 1,5 ml und Einwirkzeiten von je-

weils 10 min wiederholt. Nach einer Lufttrocknung über Nacht wurde das Deckglas aus der Well-Platte entnommen und in einem Sputter-Cluster-System mit 30 nm Platin-Palladium beschichtet. Danach konnte das Deckglas für Aufnahmen mit einem Rasterelektronenmikroskop (5 kV Beschleunigungsspannung, etwa 20 mm Arbeitsabstand) verwendet werden.

Weiterhin wurden Funktionsmuster vom Typ A, für welche Silizium-Chips mit eingetrockneter PEG-Schicht verwendet wurden, aufgebaut. Die Funktionsmuster wurden für Vergleichszwecke mit einer Spritzenpumpe (i) einmal mit 300 µl verdünnter Modellprobe A1 und (ii) einmal mit 300 µl Blutlysat (siehe Vorbereitungen für Zell-Fixierungen zuvor) bei 20 µl/s befüllt. Nach einer Standzeit der eingegebenen Proben von 20 min wurden die Funktionsmuster ohne Einschluss von Luftblasen jeweils mit 600 µl PBS bei 2 µl/s durchspült. Die Mikrowannen der Si-Chips wurden abschließend mit einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop im Hellfeld-Kanal (Auflicht, 50 x Gesamtvergrößerung) inspiziert.

ERYTHROZYTENBESEITIGUNG Zur Untersuchung der Verteilung von kernhaltigen Zellen in den Mikrowannen eines Si-Chips vor, während und nach einem Überspülvorgang in Abschnitt 11.3 wurden fertig prozessierte und gereinigte Silizium-Chips mit eingetrockneter PEG-Schicht verwendet, um Funktionsmuster vom Typ A aufzubauen. In einem 1,5 ml Eppendorf Tube® wurden 200 µl einer Patientenprobe mit 800 µl All-in-One-Puffer vermischt (Verdünnungsverhältnis 1:5). Nach einer 5-minütigen RBC-Lyse wurde ein Funktionsmuster per Spritzenpumpe zunächst mit 300 µl der lysierten Patientenprobe mitsamt kernhaltigen Zellen bei 20 µl/s befüllt und, nach weiteren 20 Minuten Sedimentation der kernhaltigen Zellen und vollständiger Farbstoffinkubation im Dunkeln, ohne Einschluss von Luftblasen mit 600 µl PBS bei 2 µl/s durchspült. Ausgewählte Bereiche eines Si-Chips wurden zur Beurteilung von Beladeeffizienz und Rückhaltevermögen über die Dauer eines Überspülvorgangs mit einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop im Hellfeld-Kanal (Auflicht) sowie in den Fluoreszenzkanälen Cy3 und DAPI (jeweils 50 x Gesamtvergrößerung) beobachtet. Nach einem Überspülen wurde die gesamte Fläche eines Si-Chips im Hellfeld-Kanal (Auflicht) sowie in den Fluoreszenzkanälen FITC, Cy3 und DAPI (jeweils 25 x Gesamtvergrößerung) aufgezeichnet. Mithilfe der Find-Maxima- und Analyze-Particles-Funktion in ImageJ konnte aus diesen Aufnahmen auf die finale Verteilung von kernhaltigen Zellen in den Mikrowannen eines Chips geschlossen werden. Ausgewählte Bereiche eines Si-Chips konnten zusätzlich im Detail (250 x Gesamtvergrößerung) inspiziert werden.

Um eine Positiv-Kontrolle zu erhalten, wurden parallel Aliquots der lysierten Patientenprobe mitsamt kernhaltigen Zellen zu je 100 µl in die Wannen einer 96-Well-Platte mit Glasboden pipettiert. Die Platte wurde zur Vermeidung von Verdunstung sofort mit einer PCR-Folie versiegelt. Nach einer 90-minütigen Sedimentation der kernhaltigen Zellen und vollständigen Farbstoffinkubation im Dunkeln wurden die gesamten Böden der befüllten Wannen mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop im DAPI-Kanal (200 x Gesamtvergrößerung) aufgezeichnet. Auch hier wurde ImageJ am Ende zur Bestimmung der Zellverteilung eingesetzt.

8.3.5 *Experimente zur Einzelzell-Isolation*

In diesem Unterabschnitt ist die experimentelle Vorgehensweise zu den Ergebnissen in Kapitel 15 beschrieben.

ISOLATION VON POLYMERBEADS Für die Isolation von PS-Beads in Abschnitt 15.1 wurden Funktionsmuster vom Typ B1 hergestellt. Um das Sichtfeld im Detektionsbereich auf 13 x 13 elektrifizierte Mikrowannen (Ansteuerung durch GUI) einzugrenzen, wurde die PC-Folie eines Funktionsmusters außenseitig geeignet mit optisch intransparentem Klebeband abgeklebt. Der Flüssigkeitstransport wurde mit einer Spritzenpumpe kontrolliert. Mehrmaliges Vorspülen eines Funktionsmusters mit Flächendesinfektionsmittel garantierte ein blasenfreies Befüllen der elektrifizierten Mikrowannen, ein gründliches Nachspülen mit DEP-Puffer 1 beseitigte das Flächendesinfektionsmittel restlos. Anschließend wurde Modellprobe B1 bei 5 µl/s blasenfrei so lange in das mit DEP-Puffer 1 befüllte Funktionsmuster gepumpt, bis PS-Beads im Blickfeld eines aufrechten Fluoreszenzmikroskops im FITC-Kanal (12,5 x Gesamtvergrößerung) erschienen sind. Der Flüssigkeitstransport wurde pausiert und die DEP-Manipulation gemäß den definierten Betriebsmodi gestartet. Die Betriebsfrequenz der eingesetzten PWM-Signale betrug $f = 1$ MHz. Ausgewählte Bereiche eines DEP-PCBs konnten zusätzlich im Detail (100 x Gesamtvergrößerung) inspiziert werden.

ISOLATION VON TUMORZELLEN Bei Einzelzell-Isolationen mit HCT116-Tumorzellen in Abschnitt 15.2 wurden der Versuchsaufbau und die Vorgehensweise aus Abschnitt 15.1 weitestgehend übernommen. Anstelle von DEP-Puffer 1 wurde bei der Vorbehandlung eines Funktionsmusters DEP-Puffer 2 und, anstelle von Modellprobe B1 für die Untersuchungen, Modellprobe B2 verwendet. Als Betriebsfrequenz der PWM-Signale für die DEP-Manipulation wurde $f = 15$ kHz gewählt.

Teil III

SEDIMENTATIONSBASIERTE AUFBEREITUNG VON VOLLBLUT IN EINEM MIKROFLUIDIKSYSTEM

In diesem Teil wird die Komponente A für eine Vollblut-Aufbereitung nach Abbildung 2.1 beschrieben[10]. Bei der Untersuchung der Komponente wurde folgendes Vorgehen berücksichtigt:

- Konzeptfindung (Kapitel 9):

  Zunächst wurden Anforderungen definiert, auf deren Grundlage das Konzept eines neuartigen mikrofluidischen Arbeitsablaufs abgeleitet werden konnte.

- Realisierung eines Prototypen (Kapitel 10):

  Der zweite Schritt der Untersuchung umfasste die Auslegung, die Auswahl von Materialien und Layout sowie die Vorcharakterisierung eines Prototypen der Komponente gemäß des mikrofluidischen Arbeitsablaufs. Um geeignete Betriebsbedingungen für den Prototypen und den darin integrierten MEMS-Chip zu identifizieren, wurden weiterhin FEM-Simulationen des hydrodynamischen Betriebsverhaltens unter Einsatz einer angepassten Simulationsgeometrie durchgeführt.

- Charakterisierung (Kapitel 11):

  Die Vorarbeiten wurden abschließend auf Validität überprüft. Dazu wurde der neuartige mikrofluidische Arbeitsablauf unter Verwendung des Prototypen sowohl mit Modell-, als auch mit Realproben charakterisiert.

Dieser Teil der Arbeit wird mit einer Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse in Kurzform abgeschlossen (Kapitel 12).

10 Bemerkung: Teile des Inhalts wurden bereits in [204] und [205] veröffentlicht.

9

KONZEPTFINDUNG

9.1 ANFORDERUNGEN AN EINE MIKROFLUIDISCHE IMPLEMENTIERUNG DER MAINTRAC®-METHODE

In diesem Abschnitt sind die Anforderungen festgelegt, die in dieser Arbeit an eine mikrofluidische Abbildung des Arbeitsablaufs der maintrac®-Methode (Referenz-Methode) aus Unterabschnitt 3.3.2 zur Vollblut-Aufbereitung durch eine neuartige Komponente gerichtet werden.

HERAUSFORDERUNGEN Die wesentlichen Limitierungen, die momentan mit der maintrac®-Methode in Verbindung stehen und durch den Einsatz eines Mikrofluidiksystems adressiert werden sollen, lauten im Einzelnen:

- Automatisierung:

  Es bedarf der Definition von geeigneten mikrofluidischen Einheitsoperationen, mit denen die bislang händischen Schritte des Arbeitsablaufs automatisiert durchgeführt werden können. Dies betrifft (i) die Erythrozytenbeseitigung, (ii) die Zellmarkierung sowie (iii) die Zellvereinzelung.

- Miniaturisierung:

  Durch ein mikrostrukturiertes Bauteil soll die Unabhängigkeit von traditionellem Labor-Equipment erreicht werden (dies gilt vor allem für die in Abbildung 3.4 in Rot markierten Schritte). Eine System-Miniaturisierung ist dabei jedoch nicht nur (i) räumlich durch eine Minimierung von Reaktionsvolumina, sondern auch (ii) zeitlich durch eine Minimierung von Reaktionsdauern und Parallelisierung von Prozessschritten zu verstehen.

RANDBEDINGUNGEN Gleichzeitig sollte eine mikrofluidische Lösung die Vorzüge der Referenz-Methode in einer möglichst äquivalenten Art und Weise erhalten. Zu diesen Vorzügen gehören:

- Sensitivität und Standardisierung:

  Für eine CTC-Quantifizierung via immunzytochemischer Fluoreszenzmikroskopie müssen, analog zur maintrac®-Methode, die kernhaltigen Zellen aus 20 µl Vollblut geeignet markiert und selektionsfrei vereinzelt werden. Während der Detektion liegen Zellen homogen verteilt und statisch vor.

- Zellviabilität:

  Zellschäden, welche in einem Mikrofluidiksystem beispielsweise aus zu hohen Scherkräften oder unspezifischen Wechselwirkungen hervorgehen können, gilt es zu minimieren. Insbesondere müssen CTCs im Hinblick auf eine Einzelzell-Isolation nach einer Vollblut-Aufbereitung weiterhin dielektrophoretisch manipulierbar, also lebensfähig und frei beweglich, bleiben (siehe auch Kapitel 13).

9.2 VORSTELLUNG EINES NEUARTIGEN ARBEITSABLAUFS

Der neuartige Arbeitsablauf, der aus den zuvor definierten Anforderungen abgeleitet werden kann, wird in den nächsten Unterabschnitten eingeführt. Die Funktion der Vollblut-Aufbereitung sei, wie in Abbildung 9.1 zu sehen, ohne Beschränkung der Allgemeinheit beispielhaft anhand der modularen *Vivalytic*-Plattform (siehe hierzu Abschnitt 4.2) veranschaulicht. Die eingesetzten mikrofluidischen Einheitsoperationen sollen dabei von der druck-betriebenen Einweg-Analysekartusche des Systems übernommen werden, in welcher ein für diesen Zweck geeignetes mikrofluidisches Netzwerk integriert sei.

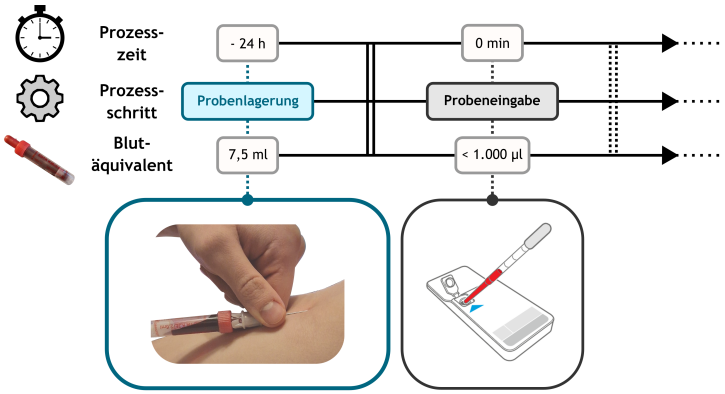


Abbildung 9.1: Der Ausgangspunkt der in dieser Arbeit vorgestellten mikrofluidischen Vollblut-Aufbereitung sei die Eingabe der Probe in ein Lab-on-a-Chip-System (Fortsetzung in Abbildung 9.2). Die Lagerbedingungen für das Vollblut sollen dieselben sein, wie bei der Referenz-Methode auch (EDTA-Röhrchen ohne Fixierungsmittel). Analog zur Darstellung in Abbildung 3.4 werden zu jedem Schritt im Workflow jeweils die bis dahin verstrichene Prozesszeit und das dabei eingesetzte Blutäquivalent aufgeführt. Weiterführende Informationen zur System-Miniaturisierung – dies betrifft die Auslegung von Reaktionsvolumina und Prozessdauern – sind in Unterabschnitt 10.1.1 zu finden. Abgeändert aus [204] (Abb. 1-1) mit Genehmigung durch die VDE Verlag GmbH.

9.2.1 *Zellmarkierung*

Für eine Zellmarkierung wird, wie durch die zugehörige mikrofluidische Einheitsoperation in Abbildung 9.2 veranschaulicht, innerhalb des Mikrofluidiksystems ein ausreichend großes Aliquot (∼ 100 µl) der eingegebenen Probe in eine Mischkammer transferiert. Um Erythrozyten in einen für die nachfolgenden Schritte günstigen (i) biologischen, (ii) hydrodynamischen sowie (iii) optischen Zustand zu überführen, wird dem portionierten Vollblut zunächst ein Puffer für die selektive Erythrozytenlyse beigemischt. Anders als bei der Referenz-Methode, soll die Lysereaktion jedoch bei einem minimalen Verdünnungsverhältnis (1:5) und einer minimalen Lysedauer (5 min) stattfinden. Um eine zusätzliche Zeitersparnis herbeizuführen, wird der Lysepuffer weiterhin um sämtliche Farbstoffe, die für eine fluoreszente Markierung der Zellen vorgesehen sind, in der jeweiligen Arbeitskonzentrationen ergänzt. In einem solchen All-in-One-Puffer kann die Farbstoffinkubation dann mit der selektiven Erythrozytenlyse parallelisiert werden. Unmittelbar vor dem nächsten Prozessschritt

kann durch ein letztes sanftes Durchmischen für eine homogene Verteilung von kernhaltigen Zellen im entstandenen Blutlysat gesorgt werden.

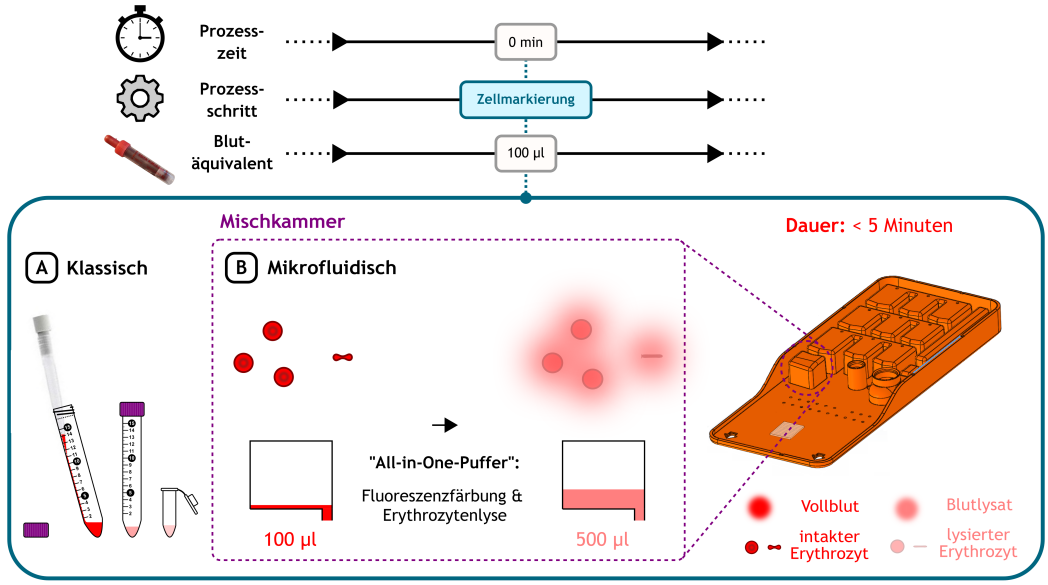


Abbildung 9.2: Prinzip der mikrofluidischen Zellmarkierung (Fortsetzung von Abbildung 9.1). (A) Die manuelle Hinzugabe von Reagenzien über serielle Pipettierschritte in mehreren makroskopischen Gefäßen kann (B) in einem Mikrofluidiksystem gleichermaßen automatisiert und parallelisiert in einer geeigneten Mischkammer stattfinden. Abgeändert aus [204] (Abb. 1-2) mit Genehmigung durch die VDE Verlag GmbH.

9.2.2 *Zellvereinzelung*

Nach einer vollständigen selektiven Erythrozytenlyse kann das Blutlysat mit kernhaltigen Zellen für eine Zellvereinzelung innerhalb des Mikrofluidiksystems aus der Mischkammer in eine flache Detektionskammer befördert werden (die entsprechende mikrofluidische Einheitsoperation ist in Abbildung 9.3 dargestellt). Anders als bei makroskopischen Systemgrößen, bei der eine effektive räumliche Bewegung von Zellen in Suspension in der Regel nur durch Zentrifugation bewirkt werden kann (so auch bei der Referenz-Methode), lässt die Detektionskammer ein Herabsetzen der kernhaltigen Zellen zu Boden in einer annehmbaren Prozessdauer ($<$ 20 min) auch über natürliche Sedimentation zu. Sämtliche im Blutlysat noch in Lösung befindliche Fluoreszenzfarbstoffe für die Zellmarkierung können parallel zur Sedimentation vollständig inkubieren. Ein solcher Sedimentationsvorgang (siehe Trajektorie der Zellbewegung als Pfeil in Dunkelblau) gestaltet sich weiterhin hinsichtlich der Sensitivität, Standardisierung und Zellviabilität bei einer CTC-Quantifizierung dahingehend als vorteilhaft, zumal (i) das Verfahren selektionsfrei und schonend ist und (ii) das zu analysierende Blutäquivalent (20 µl) präzise über das effektive Sedimentationsvolumen (100 µl) eingestellt werden kann, wobei bei konstanter Kammerhöhe eine homogene Verteilung der Zellen auf dem Kammerboden zu erwarten ist. Um eine bessere Zellvereinzelung zu erreichen, sei im Detektionsbereich von Interesse im Boden der Kammer ein MEMS-Chip mit regelmäßig angeordneten Mikrowannen, in

welche die Zellen sedimentieren können, platziert. Der Mikrowannen-Chip soll auch bei der Erythrozytenbeseitigung im nächsten Prozessschritt von Bedeutung sein.

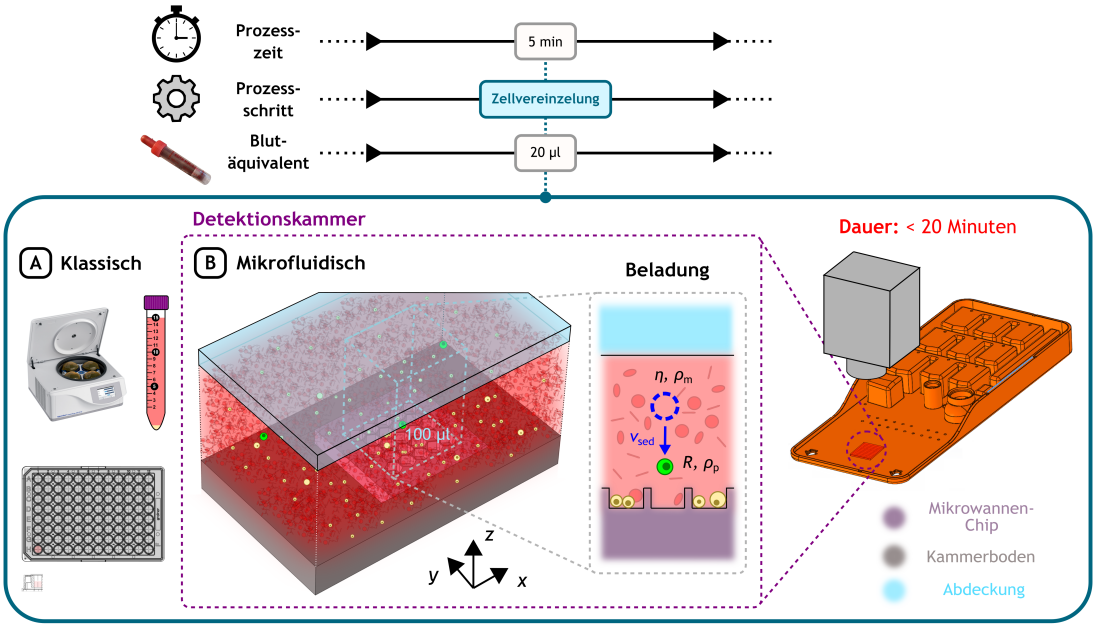


Abbildung 9.3: Prinzip der mikrofluidischen Zellvereinzelung (Fortsetzung von Abbildung 9.2). Der (A) manuell eingeleitete (und innerhalb von Blutlysat durch Zentrifugation beschleunigte) Sedimentationsvorgang von kernhaltigen Zellen in mehreren makroskopischen Gefäßen kann (B) mikrofluidisch ohne menschliches Eingreifen durch eine flache Detektionskammer mit definiertem Sedimentationsvolumen und Mikrowannen-Chip am Boden verkürzt dargestellt werden (perspektivischer Ausschnitt der flachen Detektionskammer und Darstellung eines Sedimentationsvorgangs im Sedimentationsvolumen mit Mikrowannen in der Seitenansicht). Die Materialien und Geometrieparameter eines in dieser Arbeit eingesetzten Prototypen werden in den Vorbetrachtungen in Unterabschnitt 10.1.2 vorgestellt. Abgeändert aus [204] (Abb. 1-3) mit Genehmigung durch die VDE Verlag GmbH.

9.2.3 *Erythrozytenbeseitigung*

Eine Detektion der kernhaltigen Zellen ist unmittelbar nach der Zellvereinzelung noch nicht eindeutig möglich, da das in der Detektionskammer befindliche Blutlysat eine aus (i) zellulären (vor allem Grenzflächenstreuung durch Erythrozytenmembrane) und (ii) molekularen (vor allem Absorption durch Hämoglobin) Bestandteilen zusammengesetzte optische Barriere darstellt. Um diese zu beseitigen, wird der Chip im Kammerboden im letzten Prozesschritt der Vollblut-Aufbereitung mit einem klaren wässrigen Puffer physiologischer Eigenschaften überspült, wobei die Mikrowannen dabei einen schnellen (< 5 min) und effizienten Medienwechsel unter Beibehaltung der Zellvereinzelung erlauben (siehe mikrofluidische Einheitsoperation in Abbildung 9.4). Durch einen zusätzlichen Graben vor dem Chip kann das ungewollte Einspülen von kernhaltigen Zellen außerhalb des Mikrowannen-Chips in den Detektionsbereich reduziert werden. Nachdem die optische Barriere beseitigt wurde, können die Zellen in den Mikrowannen für eine CTC-Quantifizierung mit der Optik-

einheit des Systems untersucht werden. Die hier vorgestellte Lösung steht damit in Kontrast zu bisherigen rein Mikrowannen-basierten Ansätzen, bei denen Analysen von kernhaltigen Zellen aus Vollblut in einem transparenten Puffer on-Chip nur nach manueller, jedoch nicht mikrofluidischer, Erythrozytenbeseitigung erfolgen können.

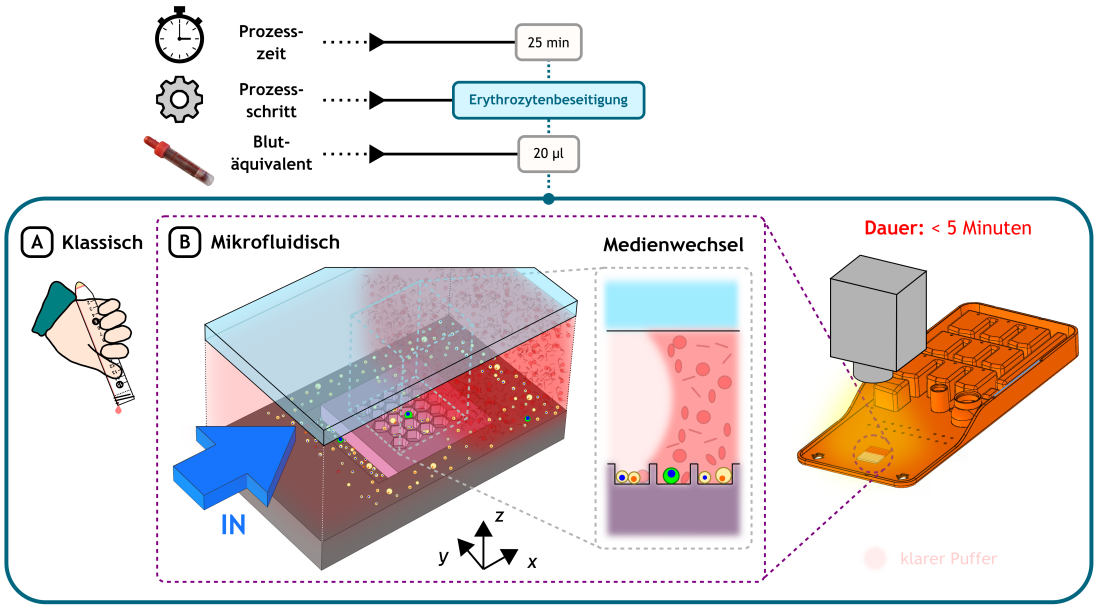


Abbildung 9.4: Prinzip der mikrofluidischen Erythrozytenbeseitigung (Fortsetzung von Abbildung 9.3). Das (A) händische Dekantieren von Blutlysat nach einem Zentrifugationsschritt kann (B) in einer mikrofluidischen Umgebung durch ein sanftes Überspülen eines zuvor mit kernhaltigen Zellen beladenen Mikrowannen-Chips mit einem klaren Puffer ermöglicht werden, was schließlich die Detektion der vereinzelten Zellen mit der Optikeinheit des Systems erlaubt. Simulationen zur mikrofluidischen Einheitsoperation der Erythrozytenbeseitigung sind in Abschnitt 10.2 zu finden. Abgeändert aus [204] (Abb. 1-4) mit Genehmigung durch die VDE Verlag GmbH.

10

REALISIERUNG EINES PROTOTYPEN

10.1 VORBETRACHTUNGEN

10.1.1 *System-Miniaturisierung*

Die Reaktionsvolumina und Prozessdauern des in Abschnitt 9.2 vorgestellten mikrofluidischen Arbeitsablaufs wurden aus einer Untersuchung der selektiven Erythrozytenlyse abgeleitet. Diese wurde, wie in Abbildung 10.1 zu sehen, in vier getrennten Teilen durchgeführt. Dabei sollte identifiziert werden:

1. Das minimale Verdünnungsverhältnis bei einer selektiven Erythrozytenlyse.
2. Die minimale Dauer einer selektiven Erythrozytenlyse.
3. Die maximale Verweildauer von kernhaltigen Zellen in Blutlysat.
4. Die optimale Geometrie eines Sedimentationsvolumens.

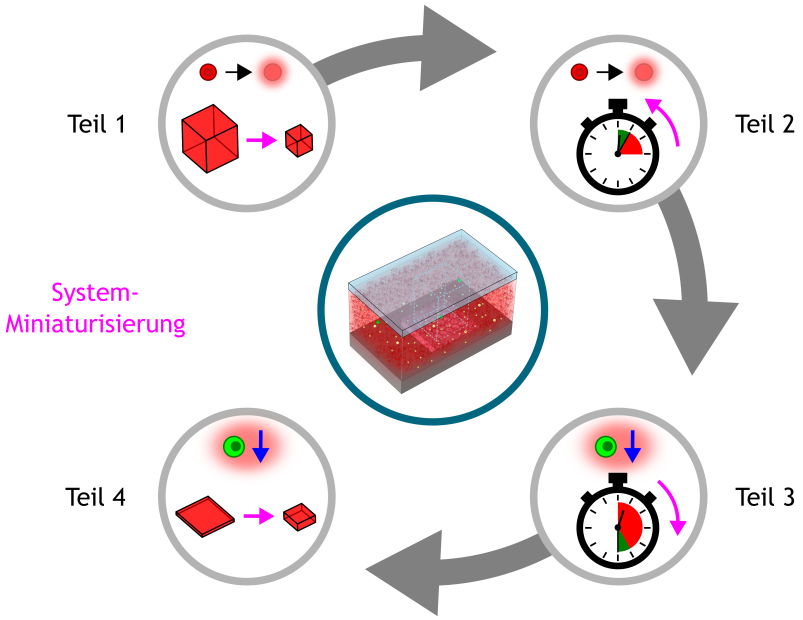
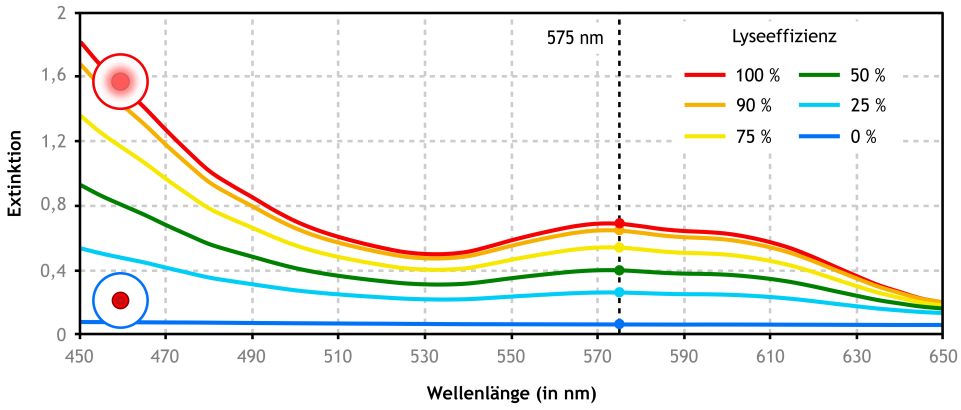


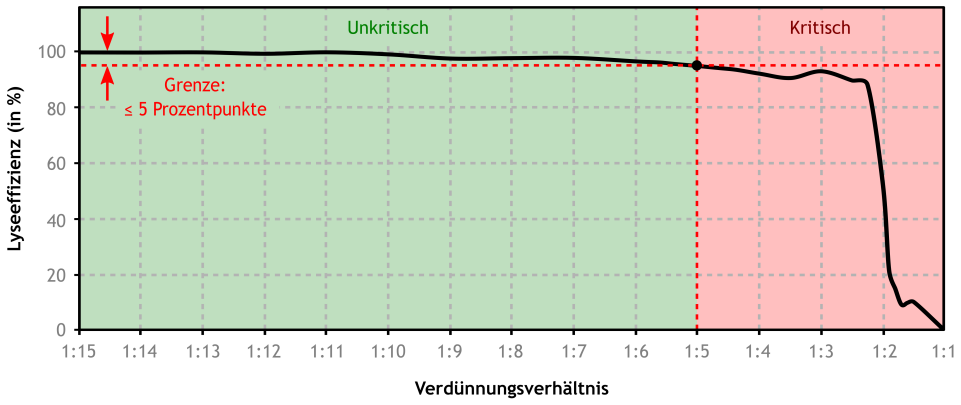
Abbildung 10.1: Auslegung des Prototypen einer Komponente für die mikrofluidische Vollblut-Aufbereitung. Um eine räumliche sowie zeitliche System-Miniaturisierung zu erzielen, wurde die der maintrac®-Methode zugrundeliegende selektive Erythrozytenlyse untersucht. (i) Eine Minimierung der Reaktionsvolumina ging aus der Identifizierung des minimalen Verdünnungsverhältnisses bei einer selektiven Erythrozytenlyse (Teil 1) sowie der optimalen Geometrie eines Sedimentationsvolumens (Teil 4) hervor. (ii) Eine Minimierung der Prozessdauern ließ sich aus der Identifizierung der minimalen Dauer einer selektiven Erythrozytenlyse (Teil 2) sowie der maximalen Verweildauer von kernhaltigen Zellen in Blutlysat (Teil 3) ableiten.

Die Ergebnisse der einzelnen Teile werden nachfolgend dargestellt. Für Details zu den jeweils eingesetzten Methoden wird auf Unterabschnitt 8.3.3 verwiesen.

TEIL 1 Um Vollblut-Aufbereitungen mit einem möglichst kleinen Sedimentationsvolumen durchführen zu können, wurde im ersten Teil der Untersuchungen das minimale Verdünnungsverhältnis identifiziert, bei welchem eine Behandlung von Vollblut mit einem Ammoniumchlorid-Lysepuffer gerade noch zu einer vollständigen selektiven Erythrozytenlyse führt. Dafür wurde die für die Lyseeffizienz repräsentative Konzentration von bei einem Lysevorgang freigesetztem Hämoglobin für Verdünnungsverhältnisse zwischen 1:14 und 1:1,5 mithilfe der AHD-575-Methode[1] erfasst. Die Methode basiert auf dem Prinzip, dass sämtliche Formen von Hämoglobin im Blut in einen langzeitstabilen und photometrisch quantifizierbaren Farbkomplex umgewandelt werden können. Wie in Abbildung 10.2a zu erkennen, besitzt das Absorptionsspektrum dieses Farbkomplexes ein charakteristisches Maximum bei 575 nm, welches dem Bouguer-Lambert-Beer'schen Gesetz gehorcht [207].



(a)



(b)

Abbildung 10.2: Identifizierung des minimalen Verdünnungsverhältnisses bei einer selektiven Erythrozytenlyse. (a) Absorptionsspektren der eingesetzten Standard-Reihe. (b) Lyseeffizienz als Funktion der Verdünnung von Vollblut mit einem Ammoniumchlorid-Lysepuffer für die verwendete Test-Reihe. Abgeändert aus [204] (Abb. 3-1) mit Genehmigung durch die VDE Verlag GmbH.

1 Bemerkung: Die AHD (Alkaline Haematin Detergent)-575-Methode wurde als nicht-toxische Alternative gegenüber der standardmäßig eingesetzten Hämiglobincyanid (HiCN)-Methode bevorzugt [206].

Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 10.2b dargestellt. Es konnte beobachtet werden, dass die Lyseeffizienz über einen weiten Verdünnungsbereich zwischen 1:15 (dies entspricht einer 100 %-igen Lyse und dem in der Referenz-Methode eingesetzten Verdünnungsverhältnis) bishin zu etwa 1:10 nahezu konstant blieb. Erst für kleinere Verdünnungsverhältnisse wurde ein allmählicher Abfall in der Lyseeffizienz, welcher sich bis zu einem Wert von ca. 85 % bei einem zugehörigen Verdünnungsverhältnis von ca. 1:2,3 erstreckte, festgestellt. Für noch kleinere Verdünnungsverhältnisse sinkte die Lyseeffizienz rapide auf Werte gegen 0 % ab, was auf einen Mangel von absolut in Lösung vorhandenem Ammoniumchlorid, welches nach den Gleichungen (3.1) bis (3.3) für einen osmotischen Druck auf Erythrozyten zur Lyse dieser erforderlich ist, hindeutete. Der bei diesem Abfall auftretende sigmoidale Verlauf lässt auf eine Normalverteilung von Erythrozyten mit unterschiedlich ausgeprägter Resistenz gegenüber der selektiven Lyse schließen[2]. Eine Lyse wurde genau dann als unvollständig und damit als für den mikrofluidischen Arbeitsablauf kritisch bewertet, sofern die selektive Erythrozytenlyse eine Lyseeffizienz von 95 % unterschritten hatte. Diese Grenze wurde bei einem Verdünnungsverhältnis von $\sim$ 1:5 erreicht. Ausgehend von einem effektiv zu analysierenden Äquivalent von 20 µl Vollblut, wurde damit aus den Ergebnissen abgeleitet, dass das kleinste Sedimentationsvolumen für einen Prototypen in dieser Arbeit zu 100 µl gewählt werden kann.

TEIL 2 Im zweiten Teil der Untersuchungen wurde die minimale Dauer bestimmt, nach welcher ein Vorgang der selektiven Erythrozytenlyse als vollständig betrachtet und der Prozessschritt der Zellvereinzelung im mikrofluidischen Arbeitsablauf gestartet werden kann (bei den Experimenten wurde das zuvor identifizierte minimale Verdünnungsverhältnis eingesetzt). Um Aussagen über den Fortschritt eines Lysevorgangs treffen zu können, wurde, wie in Abbildung 10.3 zu sehen, die Extinktion von oxygeniertem Hämoglobin (HbO_2) in lysierendem Blut am charakteristischen Maximum im Absorptionsspektrum bei 540 nm in einem Zeitraum von 15 min mit einem Photospektrometer beobachtet.

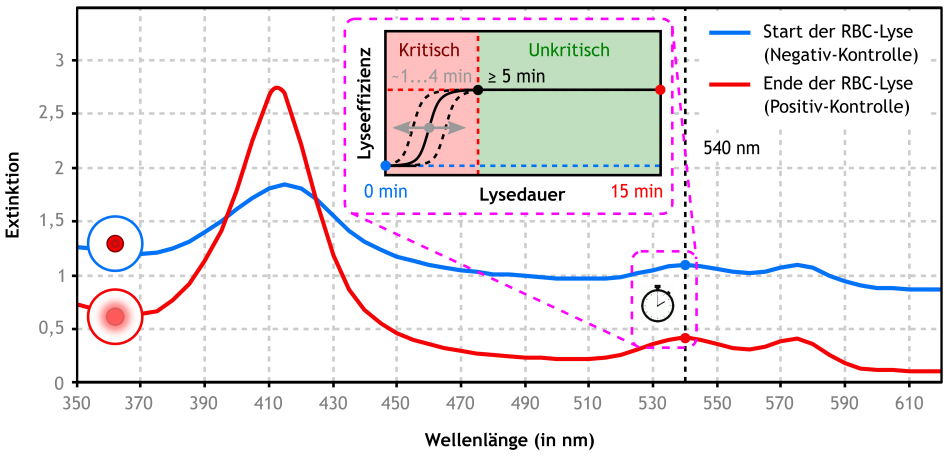


Abbildung 10.3: Identifizierung der minimalen Dauer einer selektiven Erythrozytenlyse mithilfe der Absorptionsspektren der in diesem Teil verwendeten Kontrollen.

2 Bemerkung: Siehe hierzu auch [47] (Kap. 5).

Es konnte festgestellt werden, dass der zeitliche Verlauf der Lyseeffizienz der bereits aus Abbildung 10.2b bekannten sigmoidalen Form folgte. Dabei markierte eine 15-minütige Lyse (dies entspricht der Positiv-Kontrolle und der Lysedauer, welche bei der Referenz-Methode herangezogen wird) den Grenzwert des Kurvenverlaufs für steigende Lysedauern. Der Wendepunkt einer Kurve wurde bei einem Lysevorgang – ausgehend vom Start der RBC-Lyse (Negativ-Kontrolle) – in einem Fenster zwischen ca. einer bis vier Minuten erreicht, wobei eine Sättigung im Anstieg der Lyseeffizienz jeweils innerhalb von ca. 30 Sekunden zu beobachten war. Diese relativ großen Schwankungen in der Lysedauer könnten unter Umständen auf eine Lyseinhibierende bzw. -beschleunigende Wirkung von im Blutplasma der unterschiedlichen untersuchten Blutproben gelösten Stoffen zurückzuführen sein[3]. Um diesen Ergebnissen Rechnung zu tragen, wurde die minimale Dauer für eine vollständige selektive Erytrhozytenkyse bei einer Vollblut-Aufbereitung in dieser Arbeit zu 5 min festgelegt.

TEIL 3 Um einen negativen Einfluss der selektiven Erythrozytenlyse auf das Ergebnis einer CTC-Quantifizierung auszuschließen, sollte in diesem Teil der Untersuchungen die maximal tolerierbare Verweildauer von kernhaltigen Zellen in Blutlysat identifiziert werden. Hierfür wurde die Viabilität von kernhaltigen Zellen in Blutlysat nach Kernfärbung mit Propidiumiodid über einen Zeitraum von ca. zwei Stunden mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgezeichnet.

Die Ergebnisse der Messungen lassen sich Abbildung 10.4 entnehmen. Anders als möglicherweise anzunehmen, blieb die Zellviabilität nicht über den gesamten, sondern lediglich über den Zeitraum der ersten 15 Minuten weitestgehend unverändert. Ab einer Verweildauer der kernhaltigen Zellen in Blutlysat von ca. 20 min setzte dann ein sigmoidaler Abfall in der Zellviabilität ein, welcher bishin zum Ende der Messdauer gegen einen Wert von etwa 50 % in Sättigung lief. Eine Erklärung für diesen stark beschleunigten Zelltod könnte ein Anstieg des pH-Werts im Blutlysat sein, welcher durch eine Rückwandlung von HCO_3^- durch zuvor in den Erythrozyten befindliche jedoch durch die selektive Lyse freigesetzte Carbonat-Dehydratase in CO_2 und OH^- bewirkt wird (siehe Gleichung (3.3)) [48]. Der Einfluss von Blutlysat

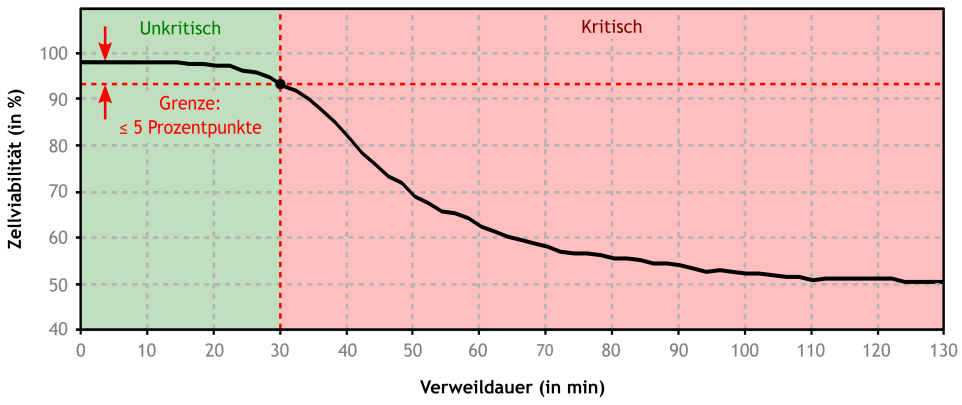


Abbildung 10.4: Identifizierung der maximalen Verweildauer von kernhaltigen Zellen in Blutlysat über die Zeitabhängigkeit der Zellviabilität.

3 Bemerkung: Siehe hierzu auch Kapitel 6 in [47].

auf kernhaltige Zellen wurde genau dann als kritisch aufgefasst, sofern sich dieser – ausgehend vom Anfangszustand – in einem Abfall der Zellviabilität um mehr als fünf Prozentpunkte äußerte. Diese Grenze wurde bei einer Verweildauer von etwa 30 min erreicht. Unter der Annahme, dass im mikrofluidischen Arbeitsablauf bei der Zellmarkierung mindestens 5 min für eine vollständige Erythrozytenlyse und bei der Erythrozytenbeseitigung weitere 5 min für ein Überspülen in Kauf genommen werden müssen, resultiert aus diesen Ergebnissen für den Sedimentationsvorgang während der Zellvereinzelung somit eine maximale Dauer von 20 min.

TEIL 4 Um mithilfe der vorausgegangenen Ergebnisse die optimale Geometrie eines Sedimentationsvolumens identifizieren zu können, sollte im letzten Teil die Sedimentationsgeschwindigkeit von kernhaltigen Zellen in Blutlysat untersucht werden. Hierzu wurden die Massendichte ρ_m und die dynamische Viskosität η als hydrodynamische Eigenschaften von verdünntem Vollblut im (i) unlysierten und (ii) lysierten Zustand in einem Temperaturbereich zwischen 20 °C und 38 °C mit einem Viskosimeter gemessen.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung 10.5 gegeben. Es wurde ersichtlich, dass eine selektive Erythrozytenlyse einen Abfall in beiden der untersuchten Messgrößen zur Folge hatte. Für die Massendichte (mittlere Reduzierung um ca. 1 %) ist dies vermutlich auf die Freigabe von zuvor komprimiert gelagertem Hämoglobin aus den Erythrozyten und eine damit einhergehende Erhöhung des Gesamtvolumens der Suspension zurückzuführen. Die Reduzierung der dynamischen Viskosität (im Mittel um ca. 20 %) hingegen lässt auf eine erhöhte Verformbarkeit der Erythrozyten infolge der selektiven Lyse schließen. Mithilfe der *Stokes*'schen Sedimentationsgleichung (5.7) kann damit auf die kleinste Sedimentationsgeschwindigkeit einer kernhaltigen Zelle im Prozessschritt der Zellvereinzelung geschlossen werden. Für die nach Tabelle 3.1 kleinste ($R = 3$ µm) und leichteste ($\rho_p = 1.060$ kg/m^3) zu erwartende lebende CTC in Blutlysat mit $\rho_m \sim 1.012$ kg/m^3 und $\eta \sim 1{,}68$ mPa · s

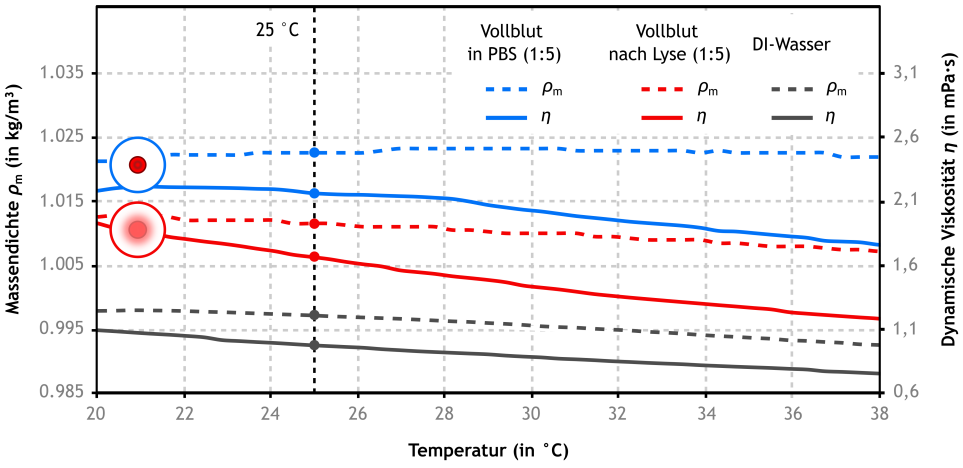
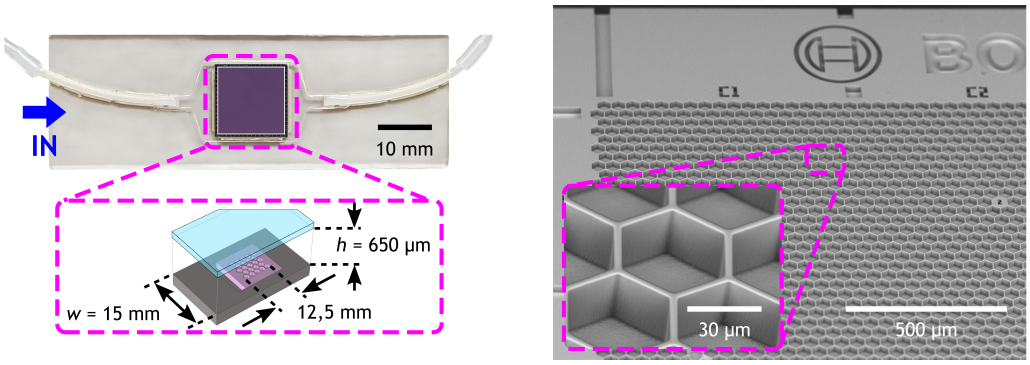


Abbildung 10.5: Identifizierung der optimalen Geometrie eines Sedimentationsvolumens durch Untersuchung der temperaturabhängigen Massendichte ρ_m und dynamischen Viskosität η verschiedener Sedimentationsmedien. Abgeändert aus [204] (Abb. 3-2) mit Genehmigung durch die VDE Verlag GmbH.

bei 25 °C Raumtemperatur beträgt diese $v_{Sed} \sim 0,56$ µm/s. Soll im mikrofluidischen Arbeitsablauf ein Herabsetzen aller kernhaltigen Zellen zu Boden in höchstens 20 min gestattet sein, so konnte aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die Höhe einer Detektionskammer nicht größer als $h \sim 672$ µm ausgelegt werden darf. Diese Grenze beschreibt gleichzeitig die optimale Geometrie eines quaderförmigen Sedimentationsvolumens (die Mikrowannen seien dabei nicht berücksichtigt), bei welchem eine Minimierung des Detektionsbereichs von Interesse erreicht wird.

10.1.2 *Materialwahl und Prototyp-Layout*

Der mikrofluidische Arbeitsablauf aus Abschnitt 9.2 wurde in dieser Arbeit wie folgt umgesetzt: Nachdem der Prozessschritt der Zellmarkierung in Mikroreaktionsgefäßen, welche als Mischkammern dienten, durchgeführt wurde, erfolgte eine Zellvereinzelung und Erythrozytenbeseitigung mit dem in Abbildung 10.6a dargestellten Prototypen. Zur Realisierung eines MEMS-Chips wurde auf Silizium zurückgegriffen, da dieses eine relativ niedrige Eigenfluoreszenz besitzt und, im Gegensatz zu transparenten Materialien wie z. B. PDMS oder SU-8, ein Übersprechen von Fluoreszenzsignalen markierter Zellen zwischen benachbarten Mikrowannen unterbindet. Silizium ist ferner biologisch verträglich und als Standard-Material in der Mikrosystemtechnik mit einer großen Auswahl von Fabrikationsprozessen kompatibel.



(a) (b)

Abbildung 10.6: (a) Prototyp der Komponente für die Vollblut-Aufbereitung (Funktionsmuster vom Typ A nach Tabelle 8.1 in der Draufsicht). Die Flusszelle definiert einen rechteckigen Mikrofluidikkanal mit $w = 15$ mm Breite und $h = 650$ µm Höhe, der Detektionsbereich umfasst eine Fläche der Größe 12,5 mm x 12,5 mm. (b) Integrierter Si-Chip mit Mikrowannen als funktionale Strukturen im Detailausschnitt (perspektivische REM-Aufnahmen). Abgeändert aus [204] (Abb. 2) mit Genehmigung durch die VDE Verlag GmbH.

Die in Abbildung 10.6b dargestellten Si-Mikrowannen wurden mittels reaktivem Ionentiefätzen strukturiert. Um selbst die größten ($R > 10$ µm) zirkulierenden Tumorzellen und Mikrocluster von solchen detektieren zu können, wurden die Durchmesser und Tiefen der Mikrowannen zu 42 µm und 28 µm definiert. Die zu diesen Abmessungen korrespondierende und im Rahmen der Fertigungsmöglichkeiten kleinste Stegbreite von 3 µm sollte eine maximale Flächennutzung und effiziente Beladung von kernhaltigen Zellen in die Mikrowannen ermöglichen. Nach diesen

Überlegungen konnten im Detektionsbereich eines Si-Chips insgesamt ca. 89.500 hexagonale Mikrowannen integriert werden. Die wichtigsten Geometrieparameter der Mikrowannen sind in Tabelle 10.1 zusammengefasst.

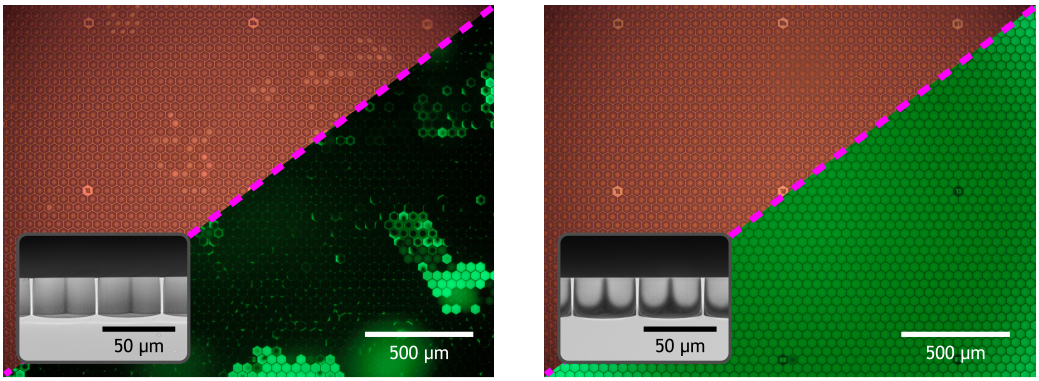
Tabelle 10.1: Geometrieparameter der Mikrowannen des in dieser Arbeit verwendeten MEMS-Chips aus Silizium.

DURCHMESSER (in µm)	TIEFE (in µm)	STEGBREITE (in µm)	WANNENFORM	WANDPROFIL
42	28	3	hexagonal	senkrecht

10.1.3 *Mikrowannen-Befüllbarkeit*

Die Mikrowannen eines Si-Chips aus Unterabschnitt 10.1.2 konnten nur dann für eine Vollblut-Aufbereitung eingesetzt werden, sofern sich diese auch vollständig mit Zellsuspension befüllen ließen. Für ein optimiertes Befüllverhalten wurden Si-Chips deshalb bei der Fabrikation mit einer PEG-Lösung nachbehandelt. Um den Einfluss einer dadurch auf einem Si-Chip eingetrockneten PEG-Schicht auf den Lufteinschluss bei der Befüllung von Mikrowannen mit einer wässrigen Phase beurteilen zu können, wurden Si-Chips (i) ohne und (ii) mit PEG-Nachbehandlung in Prototypen integriert und sequentiell mit Fluorescein-Lösung sowie fluoriertem Öl überspült. Der Überspülvorgang wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop gefilmt.

Die Abbildungen 10.7a und 10.7b zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen. Im Falle von unbehandelten Si-Chips konnten Mikrowannen nur in einzelnen und undefinierten Bereichen vollständig mit Fluorescein-Lösung befüllt werden. Dies war an einem punktuellen Aufleuchten von Mikrowannen im Fluoreszenzkanal zu erkennen



(a) (b)

Abbildung 10.7: Untersuchung der Mikrowannen-Befüllbarkeit für Si-Chips (a) ohne und (b) mit eingetrockneter PEG-Schicht (siehe REM-Aufnahmen der Mikrowannen in der Seitenansicht). Die Aufnahmen oben links bzw. unten rechts zeigen jeweils einen Si-Chip in der Draufsicht im Hellfeld- bzw. FITC-Kanal.

und vermutlich auf einen zu großen Kontaktwinkel zwischen dem Si-Substrat und der wässrigen Phase zurückzuführen [203]. Nachbehandelte Si-Chips hingegen wiesen nach einem Überspülvorgang stets ein homogenenes Erscheinungsbild auf, womit auf ein vollständiges Befüllen im gesamten Detektionsbereich geschlossen werden konnte. Die eingetrocknete PEG-Schicht verbesserte das Befüllverhalten vermutlich dadurch, indem sie den Eintritt der wässrigen Phase in die Mikrowannen hygroskopisch vermittelte und somit die Benetzung der Wände von Mikrowannen förderte. Die hier vorgeschlagene Lösung der PEG-Nachbehandlung umgeht somit die Limitierung klassischer Mikrowannen-basierter Systeme, bei denen für eine vollständige Befüllung von Mikrowannen typischerweise zusätzliche Prozessschritte der Vorbehandlung, wie zum Beispiel das Anlegen von Vakuum, das Vorspülen mit Flüssigkeiten niedriger Oberflächenspannung oder der Einsatz von Ultraschall [78], durchgeführt werden müssen. Da PEG bei der Nachbehandlung jedoch nicht eingespottet [199] oder chemisch angekoppelt [208] werden muss, liegt eine vergleichsweises einfache, kostengünstige und langzeitstabile Lösung vor, mit der eine reproduzierbare Befüllung von Mikrowannen ohne Lufteinschluss garantiert werden kann.

10.2 SIMULATION DES BETRIEBSVERHALTENS

10.2.1 *Simulationsgeometrie und Randbedingungen*

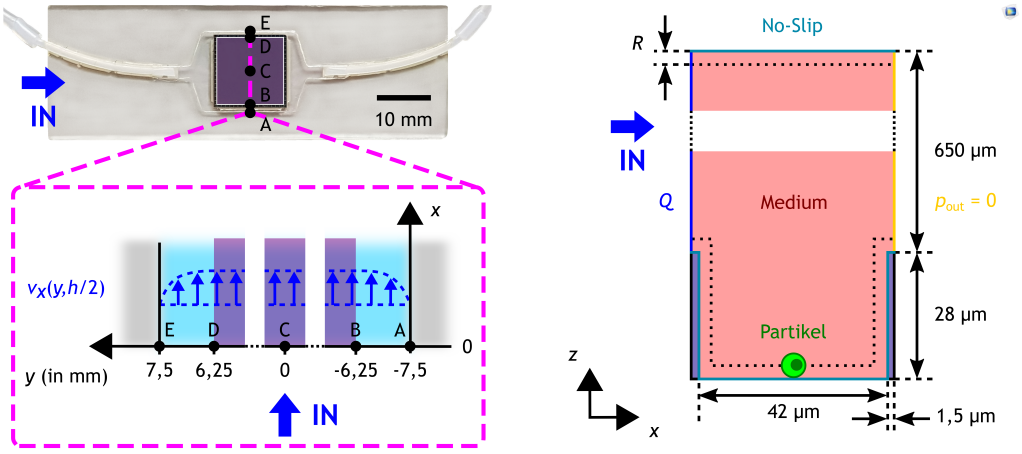
Um Betriebsbedingungen zu identifizieren, bei denen im Prozessschritt der Erythrozytenbeseitigung der Austrag von bereits in den Mikrowannen eines Si-Chips beladenen kernhaltigen Zellen vermieden werden kann, sollte die *Hagen-Poiseuille*-Strömung durch den rechteckigen Mikrofluidikkanal des Prototypen nach Abbildung 10.8a näher untersucht werden. Hierzu wurden FEM-Simulationen an der für den Detektionsbereich repräsentativen Simulationsgeometrie in Abbildung 10.8b durchgeführt. Mithilfe des Kräftegleichgewichts [110] (Gl. (27))

$$m_\mathrm{p} \frac{\mathrm{d}\overline{v}_\mathrm{p}}{\mathrm{d}t} = \overline{F}_\mathrm{ext} \tag{10.1}$$

konnte dabei auf die Bewegung einer Zelle geschlossen werden, wobei m_p die Masse der Zelle und $\overline{F}_\mathrm{ext}$ der Vektor aller in Summe auf die Zelle wirkenden externen Kräfte darstellen. Unter der Annahme, dass der Beschleunigungsterm in (10.1) für viskose Medien vernachlässigt werden kann und die externen Kräfte innerhalb des Prototypen aus der *Stokes*-Kraft (5.5) und der Sedimentationskraft (5.6) resultieren, wurde nach Umformung damit

$$\overline{v}_\mathrm{p} = \overline{v} + \overline{v}_\mathrm{Sed} = \overline{v} + \frac{\overline{F}_\mathrm{Sed}}{6\pi\eta R} \tag{10.2}$$

als Geschwindigkeit der Zelle innerhalb der Simulationsgeometrie für Abstände von festen Wänden $\geq R$ verwendet.



(a) (b)

Abbildung 10.8: (a) Das stempelförmige Strömungsprofil $v_x(y, h/2)$ kann im Detektionsbereich eines Prototypen zwischen den Punkten B und D nach Gleichung (5.3) als konstant angenommen werden. (b) Um den Berechnungsaufwand bei einer Simulation zu reduzieren, wurde das hydrodynamische Betriebsverhalten im Detektionsbereich mit einer periodisch fortsetzbaren zweidimensionalen Einheitszelle in der x-z-Ebene mit unendlicher Ausdehnung in y-Richtung dargestellt (vgl. Abbildung 9.4). Als Randbedingungen für das Flussfeld $\overline{v}$ und den Druck p wurden dabei (i) ein definierter Volumenstrom Q am Inlet (siehe Gleichung (5.4)), (ii) ein druckloses Outlet (normaler Fluss ohne Rückströmung) sowie (iii) ein Mediumruhen an festen Wänden gewählt. Weitere Simulationsparameter sind in Tabelle C.1 aufgeführt. Abgeändert aus [204] (Abb. 3-3) mit Genehmigung durch die VDE Verlag GmbH.

Simulationen von Überspülvorgängen sollten für die nach Teil 4 aus Unterabschnitt 10.1.1 kleinste und leichteste zu erwartende lebende CTC, welche in Blutlysat suspendiert und in einer Si-Mikrowanne beladen vorliegt, durchgeführt werden. Dabei wurden insgesamt folgende vereinfachende Annahmen getroffen:

- Bei den kernhaltigen Zellen in Suspension handelt es sich um starre sphärische Partikel, die keine Störung des aufgeprägten Strömungsprofils hervorrufen.
- Blutlysat soll als Newton'sche Flüssigkeit mit temperaturunabhängigen hydrodynamischen Materialparametern angesehen werden. Der Einfluss von Erythrozytenmembranen in Blutlysat auf kernhaltige Zellen sei vernachlässigbar.
- Es liege keine Wechselwirkung (Reibung, Verkleben, etc.) zwischen kernhaltigen Zellen und Mikrowannen mit ideal glatten Böden und Wänden vor.

10.2.2 *Erythrozytenbeseitigung*

Auf Grundlage der Überlegungen aus dem vorausgegangenen Unterabschnitt 10.2.1 konnten die in den Abbildungen 10.9a bis 10.9d dargestellten Abschätzungen zur Zelltrajektorie getroffen werden. Die Überlagerung von Sedimentationskraft und *Stokes*-Kraft auf eine Zelle führt für hinreichend große Volumenströme Q zur Ausbildung von wirbelartigen Stromlinien der Zellgeschwindigkeit innerhalb einer Mikrowanne.

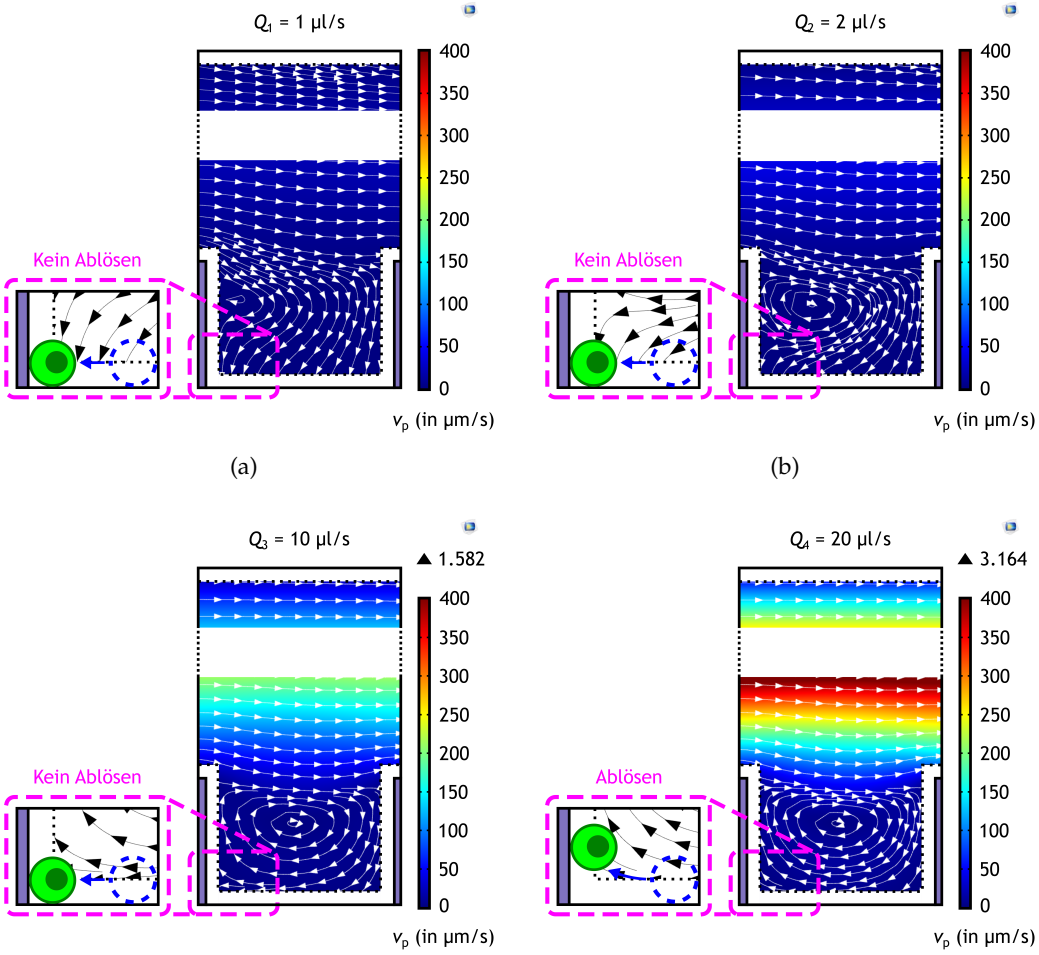


Abbildung 10.9: Darstellung der Zelltrajektorie als Stromlinien-Plot der Zellgeschwindigkeit $\overline{v}_p$ nach Gleichung (10.2) für verschiedene Volumenströme (a) $Q_1 = 1$ µl/s, (b) $Q_2 = 2$ µl/s, (c) $Q_3 = 10$ µl/s und (d) $Q_4 = 20$ µl/s durch den Prototypen. Abgeändert aus [204] (Abb. 3-3) mit Genehmigung durch die VDE Verlag GmbH.

Sofern die Ausdehnung einer solchen Verwirbelung klein genug ist (siehe Beispiele für $Q_1 = 1$ µl/s bis $Q_3 = 10$ µl/s), bleiben kernhaltige Zellen fest beladen, da diese lediglich eine laterale Bewegung entlang des Bodens bishin an die Wand einer Mikrowanne erfahren. Für steigende Volumenströme und größer werdende Verwirbelungen (siehe Beispiel für $Q_4 = 20$ µl/s) hingegen kann die Komponente der Zellgeschwindigkeit in z-Richtung am Boden der Mikrowanne das Vorzeichen wechseln, womit eine Zelle vom Boden abgelöst, entlang der Wand in Richtung Öffnung der Mikrowanne bewegt und, unter Umständen, ausgetragen werden kann. Der kritische Volumenstrom, bei welchem diese Situation theoretisch eintritt, konnte mithilfe der hier beschriebenen FEM-Simulationen zu ~ 17 µl/s bestimmt werden. Damit lag eine Orientierung für die bei einer Erythrozytenbeseitigung zu wählenden Betriebsbedingungen vor.

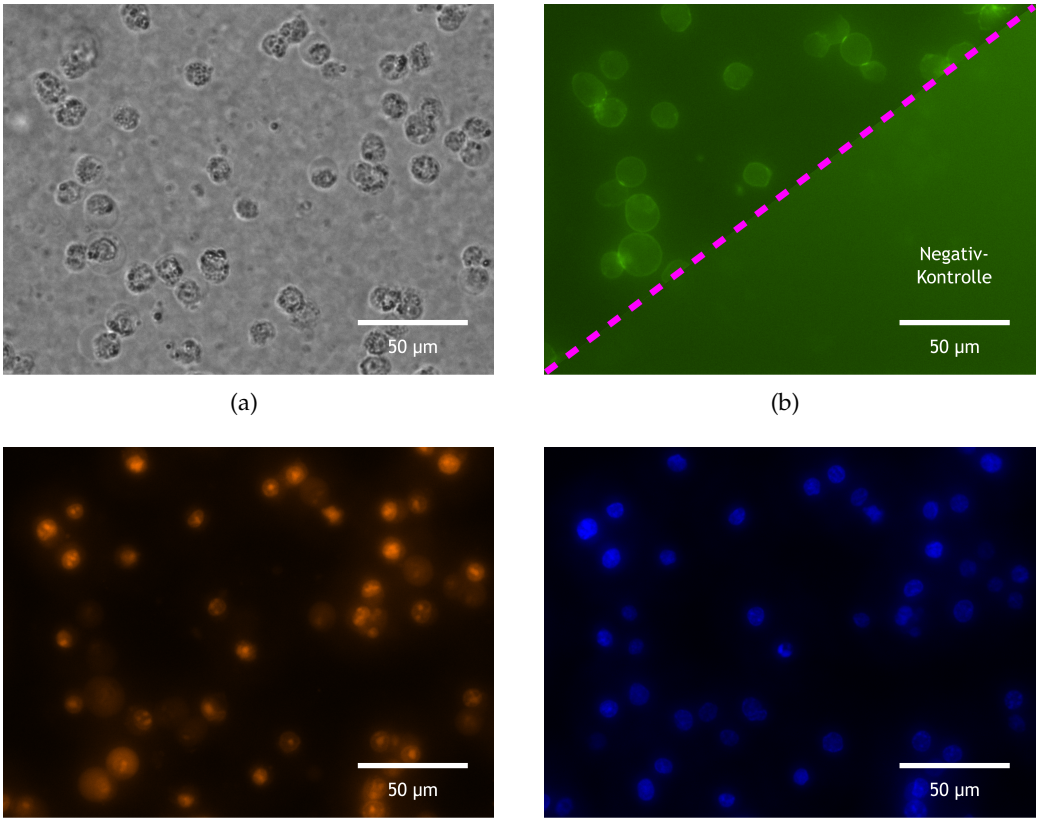
11

CHARAKTERISIERUNG

11.1 ZELLMARKIERUNG

Im ersten Teil der Charakterisierung sollte untersucht werden, inwiefern eine Markierung von kernhaltigen Zellen mit ausgewählten Fluoreszenzfarbstoffen parallel zu einer selektiven Erythrozytenlyse durchgeführt werden kann. Hierzu wurde das Vollblut eines gesunden Spenders, in welchem die kernhaltigen Zellen gegen Tumorzellen der Zelllinie HCT116 als biologische Alternative für zirkulierende Tumorzellen ausgetauscht wurden, gemäß Unterabschnitt 9.2.1 mit einem All-in-One-Puffer behandelt. Nach einer Inkubation von Anti-EpCAM FITC, PI und Hoechst 33342 konnten die Tumorzellen in Blutlysat in den Wannen einer 96-Well-Platte mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops inspiziert werden.

Die Abbildungen 11.1a bis 11.1d geben die Ergebnisse dieser Untersuchungen wieder. Die FITC-gelabelten Antikörper gestatteten eine eindeutige Identifizierung der



(a) (b)

(c) (d)

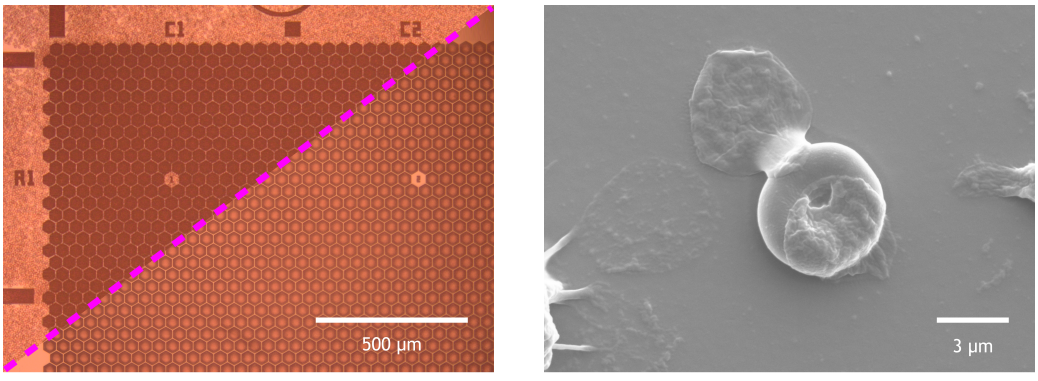
Abbildung 11.1: Anfärbung von Vollblut mit einem All-in-One-Puffer. Zuordnung der Kanäle: (a) Hellfeld, (b) EGFP, (c) DsRED und (d) DAPI.

Expression von EpCAM auf den Plasmamembranen der eingespikten Tumorzellen (siehe EGFP-Kanal). Unspezifische Bindungen konnten dabei mithilfe der Isotyp-Kontrolle ausgeschlossen werden. Analog zur Referenz-Methode ließ die intensive Anfärbung von Zellkernen mit PI des Weiteren auf tote Zellen schließen (siehe DsRED-Kanal). Die Zellmarkierung mit Hoechst 33342 hingegen stellte eine alternative Methode dar, mit der Zellkerne auch ohne Hellfeld-Aufnahmen zuverlässig nachgewiesen werden konnten (siehe DAPI-Kanal). Dies besitzt vor allem dann Relevanz, falls eine CTC-Quantifizierung in Situationen sichergestellt werden soll, in denen eine Vereinzelung von kernhaltigen Zellen auf nicht-transparenten Substraten, wie zum Beispiel auf dem in dieser Arbeit vorgeschlagenen Si-Chip, vorliegt. Da jeder der drei verwendeten Farbstoffe zu im Rahmen der jeweiligen Spezifikationen annehmbaren Fluoreszenzsignalen führte, konnte eine inhibierende Wirkung von Ammoniumchlorid und Blutplasma auf die Farbstoffinkubation ausgeschlossen werden. Der hier beschriebene All-in-One-Puffer konnte somit als eine vielversprechende Lösung betrachtet werden, mit der sich kernhaltige Zellen nach den Kriterien der Referenz-Methode auch in Blutlysat markieren lassen.

11.2 ZELLVEREINZELUNG

Um ein besseres Verständnis für die Rolle von Blutlysat als Sedimentationsmedium beim Prozessschritt der Zellvereinzelung aus Unterabschnitt 9.2.2 zu gewinnen, wurde im zweiten Teil der Charakterisierung die Erscheinungsform von Erythrozyten nach einer selektiven Lyse untersucht. Dafür wurde der mikrofluidische Arbeitsablauf unter Verwendung von Prototypen mit verdünntem Vollblut im (i) unlysierten und (ii) lysierten Zustand durchgeführt. Si-Chips konnten dabei mit einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden, eine geeignete Präparation gestattete Untersuchungen des Probenmaterials mit einem Rasterelektronenmikroskop.

Die entstandenen Aufnahmen sind in den Abbildungen 11.2a und 11.2b zu erkennen. Es konnte beobachtet werden, dass die Eingabe von unlysiertem Vollblut in die Detektionskammern von Prototypen zur Überladung von Mikrowannen durch



(a) (b)

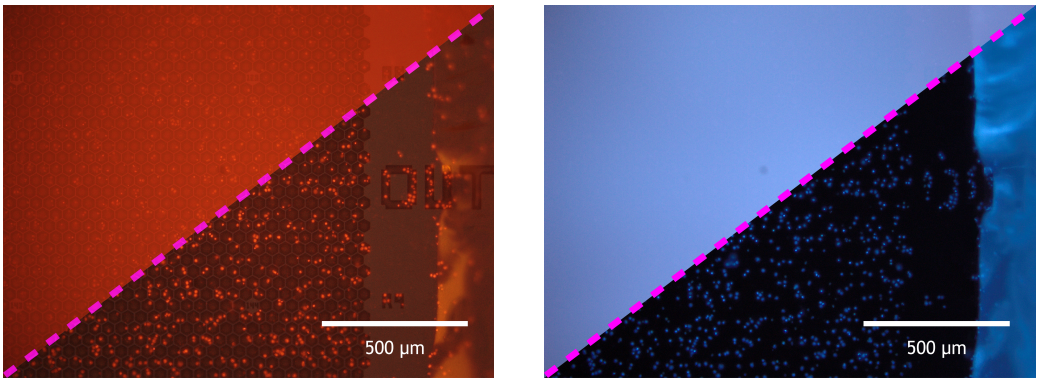
Abbildung 11.2: (a) Hellfeld-Aufnahmen von Si-Chips in der Draufsicht nach Eingabe von (i) unlysiertem (oben links) und (ii) lysiertem (unten rechts) verdünntem Vollblut. (b) REM-Aufnahme von (i) intakten und (ii) lysierten Erythrozyten.

intakte Erythrozyten führte. Eine Vereinzelung von kernhaltigen Zellen konnte in diesem Zustand nicht gewährleistet werden. Wurde ein Prototyp stattdessen mit Blutlysat prozessiert, so konnten lysierte Erythrozyten (nahezu restlos) aus der Detektionskammer beseitigt werden. Diese Beobachtung kann auf die Umwandlung von intakten Erythrozyten in sogenannte „RBC-Ghosts“ zurückgeführt werden. Infolge des osmotischen Drucks bei einer selektiven Lyse kommt es in den Membranen von Erythrozyten zur (vorübergehenden) Entstehung von Löchern, durch welche ein diffusiver Austausch zwischen dem gelösten Zellinneren und -äußeren in Gang gesetzt wird [209]. Erfährt dieser Austauschprozess eine Sättigung, liegt ein Gradient in der Hämoglobin-Konzentrationen also nicht länger vor, so setzt sich die Netto-Massendichte eines Erythrozyten im Wesentlichen nur noch aus dessen Doppellipidschicht als Plasmamembran zusammmen. Nach Gleichung (5.7) besitzen lysierte Erythrozyten, im Gegensatz zu kernhaltigen Zellen, dann nur noch verschwindend kleine Sedimentationsgeschwindigkeiten, womit eine Überladung von Mikrowannen ausgeschlossen ist. Zusammenfassend konnte damit festgehalten werden, dass eine selektive Erythrozytenlyse als notwendige Voraussetzung für den Prozessschritt der Zellvereinzelung mit Si-Mikrowannen betrachtet werden kann.

11.3 ERYTHROZYTENBESEITIGUNG

Damit im Hinblick auf eine CTC-Quantifizierung Aussagen über die Verteilung von kernhaltigen Zellen in den Mikrowannen von Si-Chips zugelassen werden konnten, sollte im abschließenden Teil der Charakterisierung der in Unterabschnitt 9.2.3 beschriebene Prozessschritt der Erythrozytenbeseitigung genauer untersucht werden. Dazu wurde der mikrofluidische Arbeitsablauf unter Verwendung von Prototypen mit Patientenproben, welche mit einem All-in-One-Puffer nach Abschnitt 11.1 behandelt wurden, durchgeführt. Si-Chips konnten während der Prozessierungen auch hier mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops inspiziert werden.

Die Abbildungen 11.3a und 11.3b zeigen Aufnahmen des Outlet-Bereichs eines Si-Chips, mit deren Hilfe die Beladeeffizienz und das Rückhaltevermögen bei

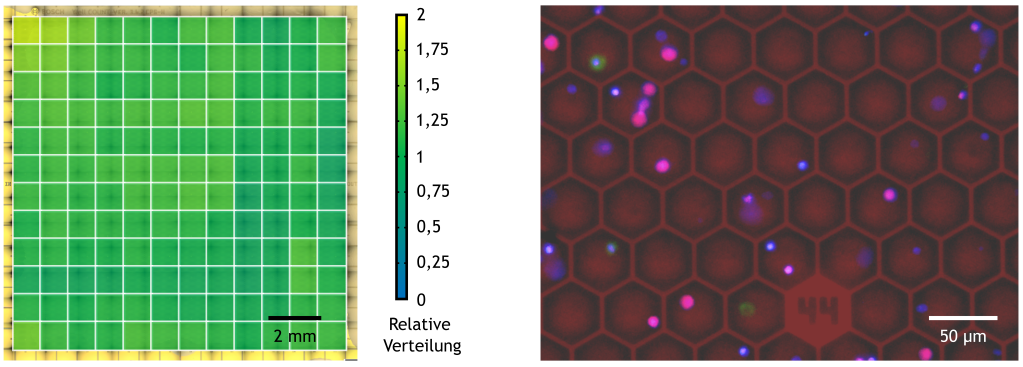


(a) (b)

Abbildung 11.3: Mikrowannen eines Si-Chips in der Draufsicht vor (oben links) sowie nach (unten rechts) einem Überspülvorgang in den Kanälen (a) Cy3 (inklusive überlagerter Hellfeld-Aufnahmen) und (b) DAPI.

einem Überspülvorgang bestimmt werden konnten. Es wurde beobachtet, dass sich nahezu sämtliche (> 99 %) aller auf den Boden sedimentierenden kernhaltigen Zellen in Mikrowannen beladen ließen (siehe Cy3-Kanal). Im Gegensatz zu kernhaltigen Zellen aus Vollblut, welche für Vergleichszwecke in PBS-Waschpuffer überführt und in separate Prototypen eingegeben wurden (Daten nicht gezeigt), konnte die Bildung von Zellklumpen und das Verkleben mit Si-Chips in Blutlysat nicht wahrgenommen werden. Dieser vorteilhafte Umstand kann vermutlich auf die Anwesenheit von Plasmaproteinen in Blutlysat zurückgeführt werden, unter welchen das Transportprotein Albumin eine dominante Rolle bei der Unterdrückung von unspezifischer Adhärenz besitzt [34] (Abschn. 18.8). Beim Überspülen eines Si-Chips mit 2 µl/s konnten sämtliche (100 %) bereits in den Mikrowannen eines Si-Chips beladene kernhaltige Zellen zurückgehalten werden, wobei ein Überspülvorgang als vollständig bewertet wurde, sobald die mit Hoechst 33342 markierten Zellkerne eindeutig detektiert werden konnten (siehe DAPI-Kanal). Anders als in Abschnitt 10.2 vorhergesagt, folgten einzelne Zellen jedoch bereits bei diesen Volumenströmen wirbelartigen Trajektorien. Dies lässt vermuten, dass durch in der Realität nicht unendlich ausgedehnte Mikrowannen und demnach bei der Simulation nicht berücksichtigte Wände tatsächlich mit erhöhten Mediengeschwindigkeiten $\overline{v}$ innerhalb von Mikrowannen gerechnet werden muss. Die ermittelten Werte für die Beladeeffizienz und das Rückhaltevermögen gestatteten eine Bezeichnung des hier vorgestellten Ablaufs als selektionsfrei.

Das Ergebnis einer mikrofluidischen Vollblut-Aufbereitung ist in den Abbildungen 11.4a und 11.4b zu sehen. Im Detektionsbereich eines Si-Chips konnten im Mittel ca. 8,2 % mehr kernhaltige Zellen mit einem um ca. 2,2 Prozentpunkte größeren Variationskoeffizienten vorgefunden werden, als dies nach der Positiv-Kontrolle zu erwarten gewesen wäre. Dies kann zum einen auf das zusätzliche Einspülen von kernhaltigen Zellen aus Totvolumina auf den Si-Chip im Inlet-Bereich, zum anderen auf Toleranzen bei der Prototyp-Fertigung zurückgeführt werden. Die Standardiesierung einer CTC-Quantifizierung konnte damit in Summe als gut bewertet werden.



(a) (b)

Abbildung 11.4: (a) Heatmap-Darstellung der Verteilung von kernhaltigen Zellen in den Mikrowannen eines Si-Chips nach einem Überspülvorgang. Eine relative Verteilung von 1 entspricht der Aliquotierung von Blutlysat in einer 96-Well-Platte (normierte Positiv-Kontrolle). (b) Si-Mikrowannen mit lebenden EpCAM-positiven Zellen mit Kern (Kanalüberlagerung). Abgeändert aus [204] (Abb. 3-4) mit Genehmigung durch die VDE Verlag GmbH.

12

ZUSAMMENFASSUNG ZUR VOLLBLUT-AUFBEREITUNG

In diesem Teil der Arbeit wurde das Konzept eines neuartigen mikrofluidischen Arbeitsablaufs zur Vollblut-Aufbereitung eingeführt (Komponente A nach Abbildung 2.1), mit welchem eine Quantifizierung von zirkulierenden Tumorzellen unter gesunden Blutzellen durchgeführt werden kann. Um die für eine immunzytochemische Fluoreszenzmikroskopie notwendigen Vorprozess-Schritte der (i) Zellmarkierung, (ii) Zellvereinzelung und (iii) Erythrozytenbeseitigung zu ermöglichen, wurde (i) die Behandlung von Vollblut mit einem All-in-One-Puffer, (ii) die Sedimentation von kernhaltigen Zellen innerhalb von Blutlysat in einer flachen Detektionskammer und (iii) das sanfte Überspülen eines im Boden dieser Detektionskammer integrierten Mikrowannen-Chips mit einem klaren wässrigen Puffer vorgeschlagen.

Bei der Realisierung eines prototypischen Mikrofluidiksystems wurde ein Silizium-Chip als MEMS-Bauteil verwendet, dessen Mikrowannen (42 µm x 28 µm) mittels reaktivem Ionentiefätzen strukturiert und – zwecks reproduzierbarer Befüllbarkeit mit Zellsuspension – mit einer Polyethylenglykol-Lösung nachbehandelt wurden. Die für einen mikrofluidischen Arbeitsablauf im Sinne einer System-Miniaturisierung optimalen Reaktionsvolumina und Prozessdauern konnten in Vorbetrachtungen mithilfe einer Untersuchung der selektiven Erythrozytenlyse ausgelegt werden. Diese vierteilige Untersuchung beinhaltete die Identifizierung (i) des minimalen Verdünnungsverhältnisses bei einer selektiven Erythrozytenlyse (1:5), (ii) der minimalen Dauer einer selektiven Erythrozytenlyse (5 min), (iii) der maximalen Verweildauer von kernhaltigen Zellen in Blutlysat (30 min) sowie (iv) der optimalen Geometrie eines Sedimentationsvolumens (Detektionskammer mit maximal $h \sim 672$ µm Höhe).

Die einzelnen Schritte des mikrofluidischen Arbeitsablaufs wurden unter Einsatz des Prototypen charakterisiert. Für den Prozessschritt der Zellmarkierung konnte mithilfe von Modellproben gezeigt werden, dass ein All-in-One-Puffer für eine parallelisierte Farbstoffinkubation (Anti-EpCAM FITC, Propidiumiodid und Hoechst 33342) und selektive Erythrozytenlyse (Ammoniumchlorid) eingesetzt werden kann. Aus einer Untersuchung von Blutlysat als Sedimentationsmedium ging weiterhin hervor, dass eine selektive Erythrozytenlyse eine notwendige Voraussetzung für den Prozessschritt der Zellvereinzelung mit einem Mikrowannen-Chip darstellt. Eine Untersuchung des Prozessschritts der Erythrozytenbeseitigung erlaubte Aussagen über die Verteilung von kernhaltigen Zellen in den Mikrowannen von Si-Chips. Im Hinblick auf eine CTC-Quantifizierung konnten die kernhaltigen Zellen aus einem Äquivalent von 20 µl Patienten-Vollblut innerhalb eines Detektionsbereichs der Größe 12,5 mm x 12,5 mm selektionsfrei vereinzelt werden (> 99 % Beladeefiizienz und 100 % Rückhaltevermögen), wobei Zellen auch nach einem Überspülen homogen verteilt vorlagen. Der bei einem Überspülvorgang maximal zulässige Volumenstrom ($Q = 2$ µl/s) wurde aus FEM-Simulationen abgeleitet, welche zuvor an einer für den Detektionsbereich repräsentativen Simulationsgeometrie durchgeführt wurden.

Teil IV

ELEKTRIFIZIERTE MIKROWANNEN FÜR EINE KONTAKTLOSE EINZELZELL-ISOLATION

Die in Abbildung 2.1 skizzierte Komponente B für eine Einzelzell-Isolation wird in diesem Teil der Arbeit beschrieben[1]. Analog zum Vorgehen in Teil iii wurden bei der Untersuchung der Komponente die nachfolgenden drei Schritte verfolgt:

- Konzeptfindung (Kapitel 13):

  Im ersten Schritt wurde das Konzept eines neuartigen DEP-Chips auf Basis von zuvor festgesetzten Anforderungen eingeführt.

- Realisierung eines Prototypen (Kapitel 14):

  Es folgten Vorbetrachtungen, in welchen die Technologie und das Layout eines Prototypen der Komponente gewählt sowie Vorcharakterisierungen von Tumorzellen einer Zelllinie in ROT-Experimenten mit einem selbstentwickelten Kalibrier-Setup durchgeführt wurden. Eine Abschätzung des elektrischen Betriebsverhaltens des im Prototypen verbauten DEP-Chips erfolgte mithilfe von FEM-Simulationen anhand einer ausgewählten Simulationsgeometrie.

- Charakterisierung (Kapitel 15):

  Im letzten Schritt wurden mit dem Prototypen Isolationen auf Einzelpartikel-Ebene demonstriert. Dafür kamen zunächst Polymerbeads und abschließend die vorcharakterisierten Tumorzellen zum Einsatz.

Wie auch in Teil iii dieser Arbeit ist am Ende dieses Teils eine knappe Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse zu finden (Kapitel 16).

1 Bemerkung: Teile des Inhalts wurden bereits in [210] veröffentlicht.

13

KONZEPTFINDUNG

13.1 ANFORDERUNGEN AN EINE DEP-BASIERTE ERWEITERUNG DER MIKROFLUIDISCHEN VOLLBLUT-AUFBEREITUNG

Die Anforderungen an eine Erweiterung der in dieser Arbeit eingeführten mikrofluidischen Vollblut-Aufbereitung um eine neuartige Komponente mit Funktion der Einzelzell-Isolation sind in diesem Abschnitt definiert. Als Werkzeug für eine Einzelzell-Manipulation soll, wie bei dem in Unterabschnitt 3.4.2 beschriebenen DEPArray™ NxT System auch, die Dielektrophorese zum Einsatz kommen.

HERAUSFORDERUNGEN Durch die neuartige Komponente gilt es die Limitierungen, welche mit DEP-basierten Ansätzen nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft und Technik aufgefasst werden können, zu überwinden. Diese sind:

- Integration:

  Die Komponente soll mit der automatisierten und miniaturisierten Vollblut-Aufbereitung aus Teil iii kompatibel sein (siehe auch Kapitel 9). Für diesen Zweck muss ein neuartiger DEP-basierter Mechanismus identifiziert werden, mit dem Mikrowannen für eine selektive Freigabe und Ausgabe von Zellen in Trägergefäße erweitert werden können. Durch die Lösung lassen sich insbesondere manuelle Zwischenschritte der Volumendreduktion umgehen.

- Kostengünstigkeit:

  Bei einem modularen Aufbau können die Gesamtkosten des Systems durch Vemeidung von aktiven Schaltungselementen (etwa in CMOS-Technologie) in der Komponente als Analysekartusche im Einweggebrauch reduziert werden. Eine durch diese Maßnahme alternativ anfallende Komplexität im Aufbau kann, stattdessen, auf die Seite des Analysegeräts verlagert werden.

RANDBEDINGUNGEN Gegenüber dem Stand der Wissenschaft und Technik sollen durch die DEP-basierte Komponente allerdings weiterhin folgende Vorteile beibehalten werden:

- Effizienz und Reinheit:

  Es liegt eine Elektrodenanordnung vor, mit der dielektrophoretische Kräfte in einem Mikrofluidiksystem derart eingesetzt werden können, so dass eine Manipulation von Zellen mit Einzelzell-Präzision im gesamten Detektionsbereich von Interesse ermöglicht wird.

- Zellviabilität:

  Um eine Maximierung der Lebensfähigkeit von Zellen für anschließende Einzelzell-Charakterisierungen sicherzustellen, sollen nach wie vor physiologische Medien und eine schonende Manipulation in DEP-Käfigen zum Einsatz kommen.

13.2 VORSTELLUNG EINES NEUARTIGEN DEP-CHIPS

Das Konzept eines neuartigen DEP-Chips, mit dem Einzellzell-Isolationen nach den im vorausgegangenen Abschnitt definierten Anforderungen ermöglicht werden können, ist in Abbildung 13.1 dargestellt. Um eine Elektrifizierung der Mikrowannen und damit Erweiterung der mikrofluidischen Einheitsoperationen aus Abschnitt 9.2 zu erreichen, soll eine dreilagige Elektrodenanordnung eingesetzt werden, die aus einer Matrix von individuell adressierbaren Spalten (Lage 1) und Zeilen (Lage 2) sowie einer davon elektrisch isolierten flächigen Gegenelektrode (Lage 3) aufgebaut ist. Elektrifizierte Mikrowannen für eine Einzellzell-Isolation entstehen an Kreuzungspunkten zwischen Spalten und Zeilen als Aussparungen bis an die unterste Elektrodenlage. Je nach Ansteuerung der Elektroden sind mit einem solchen DEP-Chip insgesamt drei Betriebsmodi mit jeweils unterschiedlichen räumlichen Verteilungen der DEP-Kraft realisierbar. Diese sollen in den nächsten Unterabschnitten vorgestellt werden.

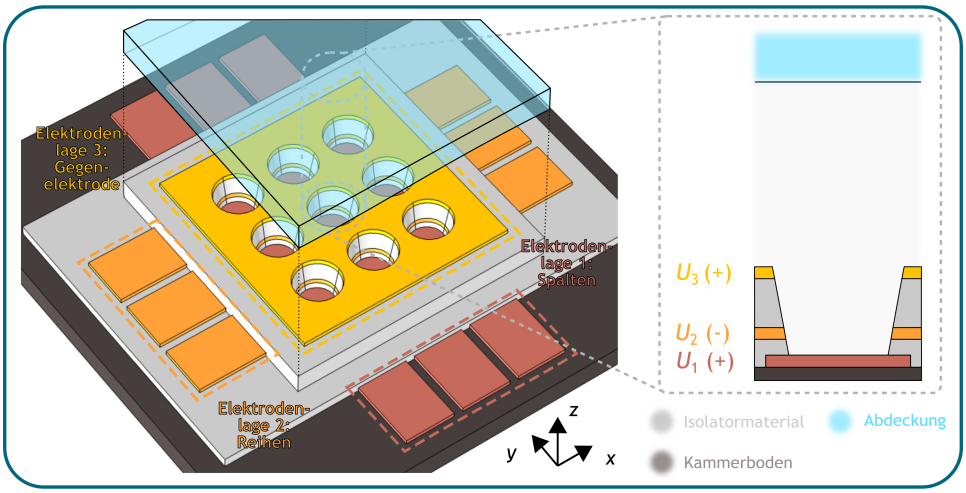


Abbildung 13.1: Lagenaufbau eines unbeladenen und mikrofluidisch integrierten DEP-Chips mit elektrifizierten Mikrowannen (perspektivischer Ausschnitt einer Elektrodenanordnung der Größe 3 x 3 und Darstellung einer elektrifizierten Mikrowanne mit Sedimentationsvolumen in der Seitenansicht). Das Ansteuerungsschema, „+“ bzw. In-Phase & „-“ bzw. Counter-Phase, ist an das Beispiel in Unterabschnitt 3.4.2 angelehnt. Die Technologie und Geometrieparameter eines in dieser Arbeit verwendeten Prototypen werden in den Vorbetrachtungen in Unterabschnitt 14.1.1 vorgestellt. Simulationen zu den mit dem DEP-Chip realisierbaren Betriebsmodi sind in Abschnitt 14.2 ausgeführt. Abgeändert aus [210] (Abb. 1) mit Genehmigung durch die Chemical and Biological Microsystems Society (CBMS) [Copyright 2024 CBMS].

13.2.1 *Beladung*

Werden im ersten Betriebsmodus, wie in Abbildung 13.2 zu sehen (lysierte Erythrozyten in Blutlysat sind, der Übersichtlichkeit halber, nicht dargestellt), sämtliche Elektroden des DEP-Chips mit einer moderaten Spannung U_B angesteuert, so kann der Prozessschritt der Zellvereinzelung aus Abbildung 9.3 durch die Ausformung von DEP-Kräften mit räumlicher Verteilung eines Trichters (siehe Wolke in Gold mit

braunen Pfeilen) unterstützt werden. Dabei wird eine sedimentierende Zelle von der maximalen Feldkrümmung $|\nabla E^2|$ an den Elektrodenkanten der Stege in Richtung minimaler elektrischer Feldstärke im Zentrum einer Mikrowanne abgestoßen (siehe Trajektorie der Zellbewegung als Pfeil in Dunkelblau). Dort angelangt, kommt die Zelle in einem stabilen Gleichgewichtspunkt zum Stillstand und schwebt. Ein solcher Betriebsmodus der kontaktlosen Beladung kann deshalb insbesondere auch in physiologischen Medien via nDEP ausgenutzt werden. Dadurch, dass die Elektroden des DEP-Chips am Boden, jedoch nicht an der Decke, der Detektionskammer angeordnet sind, können die dielektrophorestische und hydrodynamische Zellmanipulation voneinander entkoppelt werden. Damit ist, im Gegensatz zu DEP-basierten Ansätzen nach dem Stand der Technik, die Kammerhöhe und somit das Sedimentationsvolumen je Einheitsfläche prinzipiell beliebig groß auslegbar (Skalierung des DEP-Chips in z-Richtung möglich), was eine vorausgehende externe Volumenreduktion redundant macht.

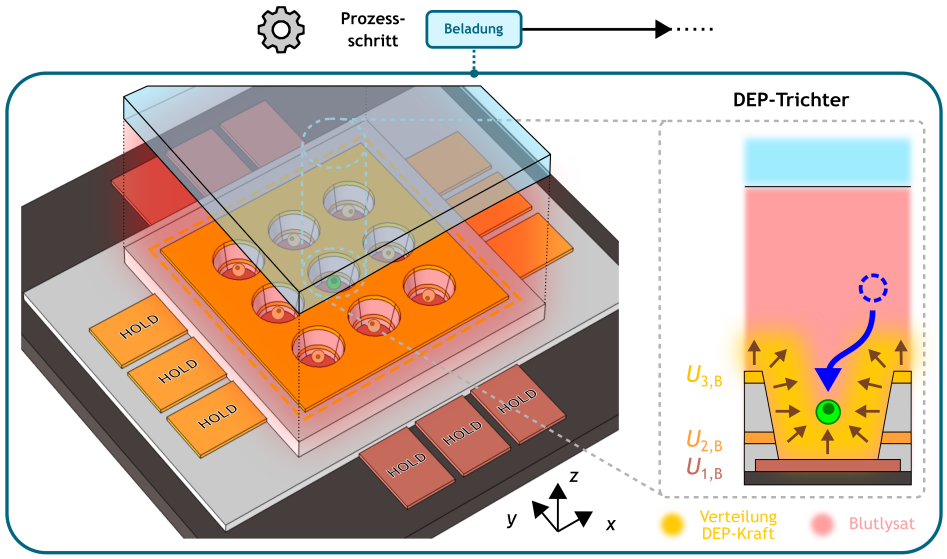


Abbildung 13.2: Prinzip der Dielektrophorese-unterstützten Beladung von kernhaltigen Zellen in elektrifizierte Mikrowannen (Fortsetzung in Abbildung 13.3). Die Elektroden seien in diesem Betriebsmodus so angesteuert, dass innerhalb der Mikrowannen ein DEP-Trichter ausgebildet wird. Abkürzungen: U_B – Für eine Beladung anzulegende Elektrodenspannung. Abgeändert aus [210] (Abb. 1) mit Genehmigung durch die Chemical and Biological Microsystems Society (CBMS) [Copyright 2024 CBMS].

13.2.2 *Medienwechsel*

Eine Maximierung der Spannung an sämtlichen Elektroden auf einen Wert U_{MW} im zweiten Betriebsmodus führt innerhalb der elektrifizierten Mikrowannen, wie in Abbildung 13.3 veranschaulicht, zur Ausbildung von geschlossenen DEP-Käfigen, mit denen der Prozessschritt der Erythrozytenbeseitigung aus Abbildung 9.4 erweitert werden kann. Gegenüber klassischen Mikrowannen-basierten Systemen in mikrofluidisch integrierter Konfiguration, bei denen es während eines Medienwechsels bereits bei relativ niedrigen Volumenströmen zum Austrag von beladenen Zellen kommen

kann, bleiben durch den hier vorgeschlagene Betriebsmodus Zellen aktiv immobilisiert. Ein Medienwechsel kann damit, unabhängig von der Größe der beladenen kernhaltigen Zellen, beschleunigt durchgeführt werden. Da Zellen außerhalb von Mikrowannen durch geschlossene DEP-Käfige abgestoßen werden, Zellen innerhalb von Mikrowannen allerdings nach wie vor schweben, ein Verkleben dieser mit den Böden und Wänden der Mikrowannen also verhindert wird, ist weiterhin die Grundlage für eine effiziente, reine und schonende selektive Freigabe geschaffen. Dieser Betriebsmodus wird im nächsten Unterabschnitt vorgestellt.

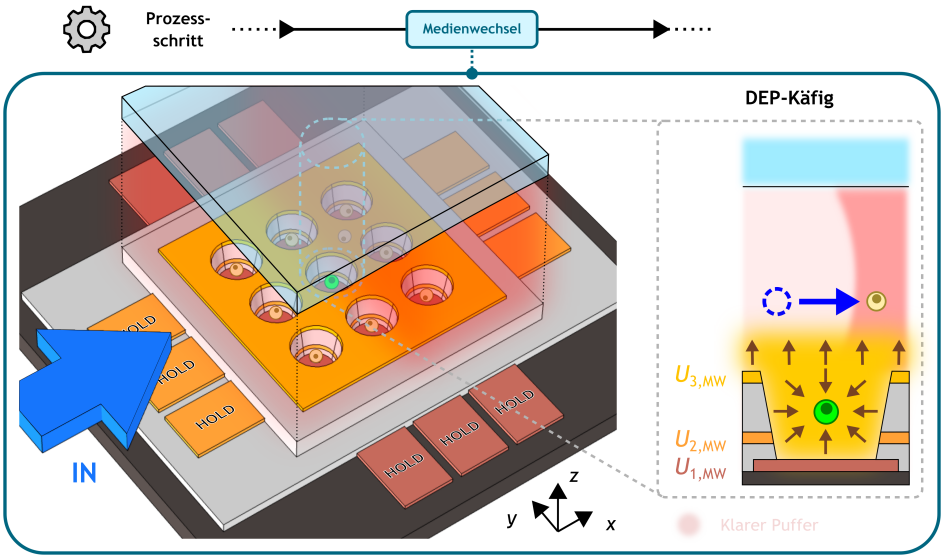


Abbildung 13.3: Prinzip des Dielektrophorese-unterstützten Medienwechsels für mit kernhaltigen Zellen beladene elektrifizierte Mikrowannen (Fortsetzung von Abbildung 13.2). Innerhalb der Mikrowannen sei für diesen Betriebsmodus ein geschlossener DEP-Käfig ausgeformt. Abkürzungen: U_{MW} – Für einen Medienwechsel anzulegende Elektrodenspannung. Abgeändert aus [210] (Abb. 1) mit Genehmigung durch die Chemical and Biological Microsystems Society (CBMS) [Copyright 2024 CBMS].

13.2.3 *Selektive Freigabe*

Nachdem in den elektrifizierten Mikrowannen im Detektionsbereich unter kernhaltigen Nicht-Zielzellen potentielle CTCs als Zielzellen identifiziert wurden, können diese durch den in Abbildung 13.4 dargestellten letzten Betriebsmodus selektiv freigegeben werden. Je Freigabevorgang müssen dafür (unter vorübergehender Reduzierung des Volumenstroms) die flächige Gegenelektrode sowie die zu einer Mikrowanne von Interesse gehörende Spalte und Zeile mit geeigneten Spannungen U_{SF} angesteuert werden. In diesem Betriebsmodus weisen die DEP-Kräfte dann exklusiv in der entsprechenden elektrifizierten Mikrowanne in Richtung eines außerhalb der Mikrowanne befindlichen Minimums der elektrischen Feldstärke (DEP-Levitator). Eine Zielzelle kann auf diese Weise aus einer ersten Manipulationsebene (Ebene in Hellblau), in welcher sie zuvor dielektrophoretisch immobilisiert wurde, in eine zweite Manipulationsebene (hellgrüne Ebene in Pfeilform), in welcher sie mikrofluidisch abtransportiert werden kann, überführt werden. Gegenüber dem Ansatz aus Unter-

abschnitt 3.4.2 ergeben sich damit zwei wesentliche Vorteile: (i) Die für die selektive Freigabe erforderlichen stationären DEP-Fallen in einem bewegten Medium[1] können kostengünstig mithilfe einer elektrisch passiven Matrix-Ansteuerung realisiert werden. (ii) Da der Abtransport nicht länger dielektrophoretisch, sondern rein mikrofluidisch, stattfindet und keine Behinderung der Zielzelle durch Nicht-Zielzellen vorliegt, lässt sich die Geschwindigkeit und damit der Durchsatz der Einzelzell-Isolation steigern (Skalierung des DEP-Chips in x-y-Richtung möglich).

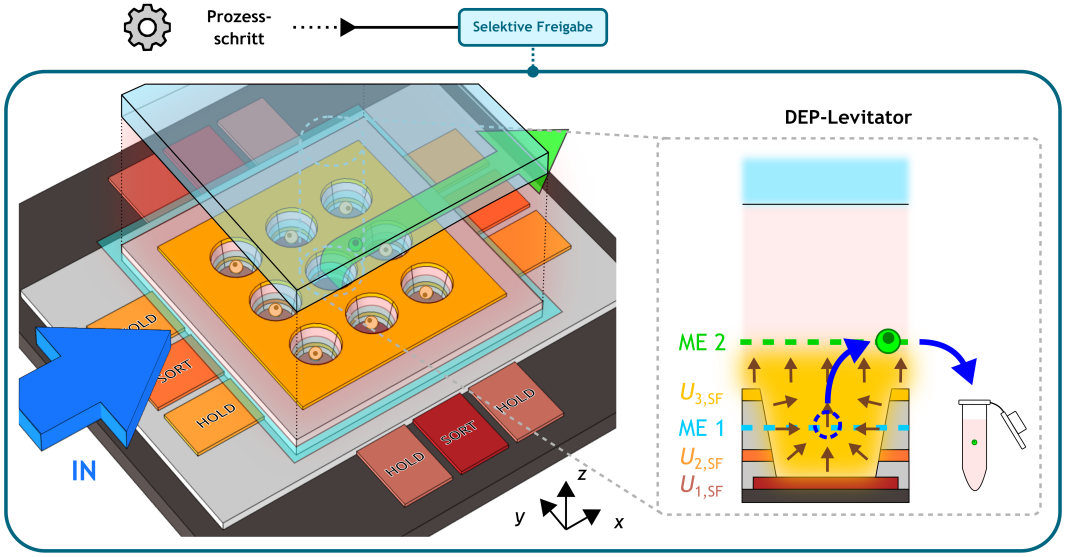


Abbildung 13.4: Prinzip der Dielektrophorese-basierten selektiven Freigabe einer kernhaltigen Zielzelle unter Nicht-Zielzellen aus elektrifizierten Mikrowannen mit Ausgabe in ein Trägergefäß (Fortsetzung von Abbildung 13.3). Die für diesen Betriebsmodus ausgenutzte räumliche Verteilung der DEP-Kraft innerhalb der Mikrowanne von Interesse ist ein DEP-Levitator. Abkürzungen: U_{SF} – Für eine selektive Freigabe anzulegende Elektrodenspannung, ME – Manipulationsebene. Abgeändert aus [210] (Abb. 1) mit Genehmigung durch die Chemical and Biological Microsystems Society (CBMS) [Copyright 2024 CBMS].

1 Bemerkung: Siehe hierzu auch Paragraph *Räumlich stationäre Felder* in Unterabschnitt 6.3.1.

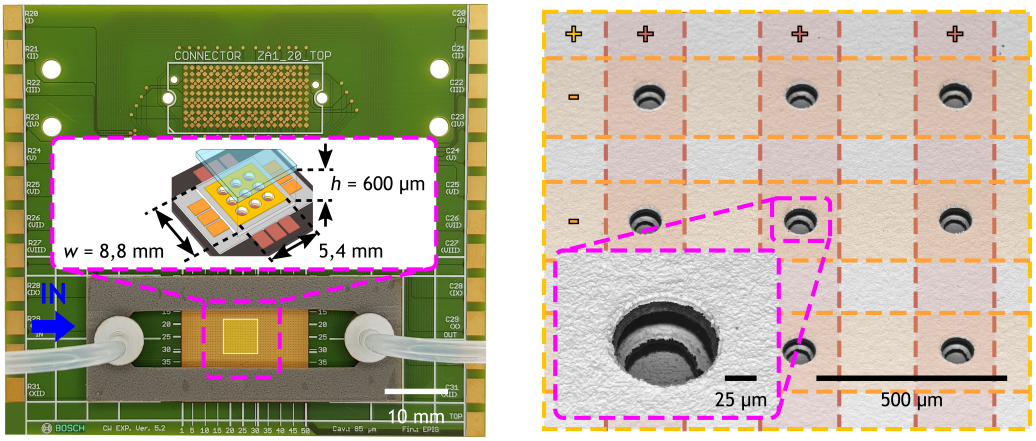
14

REALISIERUNG EINES PROTOTYPEN

14.1 VORBETRACHTUNGEN

14.1.1 *Technologiewahl und Prototyp-Layout*

Zur Demonstration des neuartigen Prinzips der Einzelzell-Isolation wurde der Prototyp aus Abbildung 14.1a verwendet. DEP-Chips wurden dabei in Leiterplatten-Technologie gefertigt, zumal damit vor allem in der Anfangsphase der Untersuchung eine kostengünstige Herstellung mit schnellen Iterationen und großen Freiheiten im Design verbunden waren. Die Technologie besaß jedoch insbesondere die intrinsische Möglichkeit, präzise definierte Elektrodenstrukturen mit hohen Aspektverhältnissen zu fertigen, was für die Realisierung der vorgeschlagenen elektrifizierten Mikrowannen von vorrangiger Bedeutung war.



(a) (b)

Abbildung 14.1: (a) Prototyp der Komponente für die Einzelzell-Isolation (Funktionsmuster vom Typ B1 nach Tabelle 8.1 in der Draufsicht). Der für diese Arbeit relevante Detektionsbereich der Größe 5,4 mm x 5,4 mm befindet sich inmitten eines $w = 8,8$ mm breiten und $h = 600$ µm hohen rechteckigen Mikrofluidikkanals. (b) Integriertes DEP-PCB mit elektrifizierten Mikrowannen als funktionale Strukturen im Detailausschnitt (perspektivische REM-Aufnahmen). Gestrichelte Linien deuten die flächige Gegenelektrode sowie die darunter als Spalten und Zeilen verlaufenden Leiterbahnen an. Abgeändert aus [210] (Abb. 2) mit Genehmigung durch die Chemical and Biological Microsystems Society (CBMS). Copyright 2024 CBMS.

Die elektrifizierten Mikrowannen in Abbildung 14.1b konnten durch Bohrung eines dreilagigen PCB-Laminats mit einem Ablationslaser realisiert werden. Die Spezifikationen des Herstellers erlaubten dabei Wannen mit minimalen Durchmessern und Tiefen von 85 µm und 66 µm. Entsprechend der kleinsten Breiten und Abstände

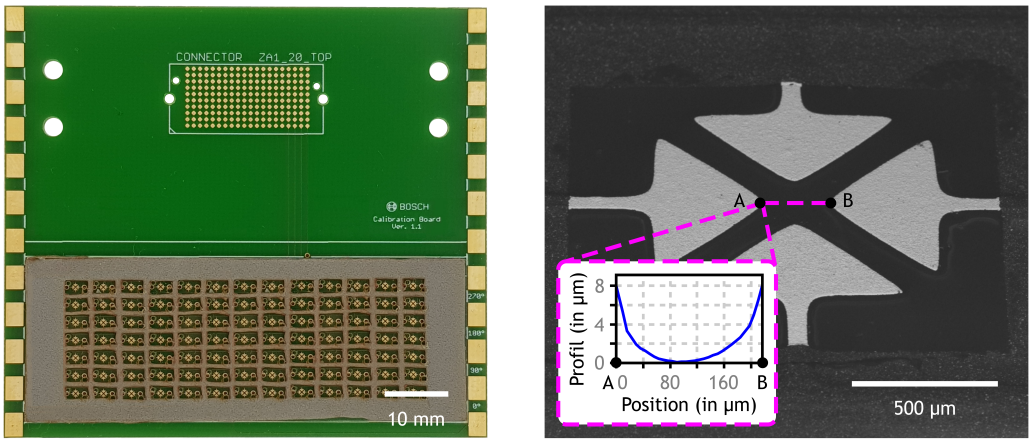
von Leiterbahnen als individuell adressierbare Spalten und Zeilen sowie der Toleranzen beim Bohren konnte die minimale Breite von Stegen zwischen benachbarten elektrifizierten Mikrowannen zu 315 µm ausgelegt werden. Es resultierten somit DEP-PCBs und Elektrodenanordnungen mit insgesamt 169 kreisrunden elektrifizierten Mikrowannen im Detektionsbereich von Interesse. Eine Übersicht zu den Geometrieparametern der elektrifizierten Mikrowannen ist in Tabelle 14.1 gegeben.

Tabelle 14.1: Geometrieparameter der elektrifizierten Mikrowannen des in dieser Arbeit eingesetzten DEP-Chips in PCB-Technologie.

DURCHMESSER (in µm)	TIEFE (in µm)	STEGBREITE (in µm)	WANNENFORM	WANDPROFIL
85	66	315	kreisrund	konisch

14.1.2 *Kalibrier-Setup*

Ehe HCT116-Tumorzellen in DEP-Experimenten gemäß den Betriebsmodi aus Abschnitt 13.2 eingesetzt werden konnten, musste im Rahmen von Vorcharakterisierungen zunächst eine geeignete Betriebsfrequenz identifiziert werden, bei der in einem gegebenen niedrig-leitfähigen DEP-Medium Abstoßung durch nDEP hervorgerufen werden kann. Um die DEP-Antwort $\mathrm{Re}\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]$ der Tumorzellen nach dem Ein-Schalen-Modell[1] zu bestimmen, wurden deshalb ROT-Experimente[2] mit dem Kalibrier-Setup aus Abbildung 14.2a durchgeführt. Analog zu den DEP-Chips aus



(a) (b)

Abbildung 14.2: (a) Kalibrier-Setup (Funktionsmuster vom Typ B2 nach Tabelle 8.1 in der Draufsicht) mit insgesamt 91 räumlich abgetrennten ROT-Kammern. (b) Integriertes Kalibrier-PCB mit Quadrupol als funktionale Struktur im Detailausschnitt (perspektivische REM-Aufnahme). Die pyramidalen Elektroden besitzen einen Spitze-zu-Spitze-Abstand von ca. 220 µm.

1 Bemerkung: Für nähere Details siehe Unterabschnitt 6.2.3.
2 Bemerkung: Für nähere Details siehe Paragraph *Räumlich bewegte Felder* in Unterabschnitt 6.3.1.

Unterabschnitt 14.1.1 wurde zur Realisierung von Quadrupol-Strukturen auf PCB-Technologie zurückgegriffen. Die Kompatibilität von Leiterplatten in ROT-Experimenten, welche nach dem Stand der Technik bislang auf Polystyrol-Beads [211] beschränkt war, konnte dabei durch zwei Anpassungen auch auf biologische Zellen erweitert werden: (i) Die Reibung von Zellen mit der Oberfläche des im Zentrum eines Quadrupols im Auslieferungszustand durch den Leiterplatten-Hersteller freistehenden FR4-Trägersubstrats konnte durch nachträgliche Glättung mit einem UV-Kleber minimiert werden. Es resultierten Quadrupol-Strukturen nach Abbildung 14.2b, bei denen der arithmetische Mittenrauwert von ca. 573 nm auf 33 nm reduziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). (ii) Um Zellen vom nicht-transparenten Substrat unterscheiden und die Winkelgeschwindigkeit Ω_{ROT} zuverlässig aufzeichnen zu können, wurde bei der Herstellung von Modellproben der fluoreszente Zytosol-Farbstoff CFSE verwendet. Vias im Mehrlagen-Aufbau gestatteten weiterhin eine einfache Parallelisierung von ROT-Experimenten mit insgesamt vier elektrischen Kontakten, was die Wahrscheinlichkeit des Auffindens von lediglich einer lebenden Tumorzelle zwischen den Elektrodenspitzen eines Quadrupols während einer Messung selbst bei verdünnten Modellproben erhöhte. Dies erübrigte den Einsatz von Optical Tweezers[3], welche bei klassischen auf Reinraumfabrikation basierenden Setups [212, 213] zum deterministischen Transport einer Zelle von Interessen in das Zentrum eines Quadrupols erforderlich sind.

14.1.3 *ROT-Experimente*

Die Vorcharakterisierungen führten zu den in Abbildung 14.3 dargestellten Ergebnissen. Wurden HCT116-Tumorzellen in dem für spätere DEP-Experimente vorgesehenen Puffer mit $\varepsilon_{\mathrm{m}}/\varepsilon_0 = 78$ und $\sigma_{\mathrm{m}} = 205\ \mu\mathrm{S/cm}$ suspendiert, so konnte ein ROT-Spektrum mit Extrema bei ca. $51,1 \pm 7,4$ kHz und $27,6 \pm 4,1$ MHz aufgezeichnet werden. Die zu diesem Kurvenverlauf korrespondierende DEP-Antwort nach

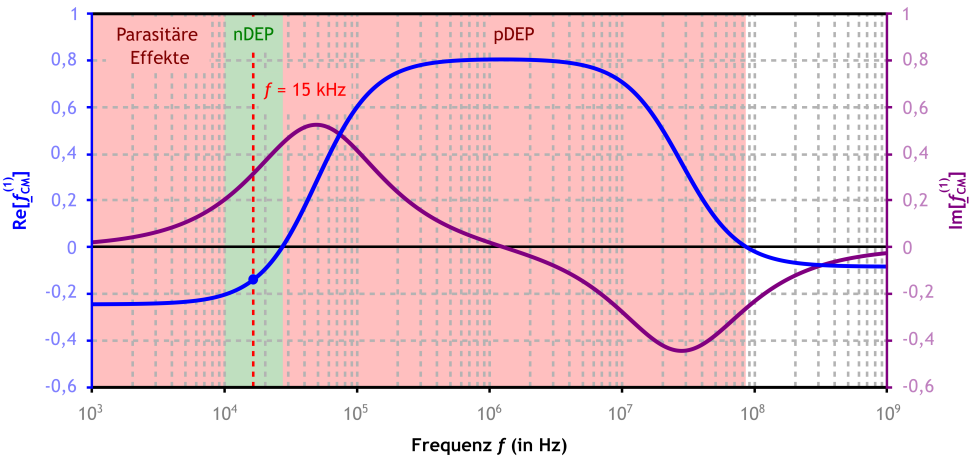


Abbildung 14.3: Aus den ROT-Experimenten in dieser Arbeit abgeleitete Verläufe des Real- und Imaginärteils des komplexwertigen *Clausius-Mossotti*-Faktors erster Ordnung für HCT116-Tumorzellen in DEP-Puffer 2 aus Tabelle 8.2.

3 Bemerkung: Siehe hierzu auch Tabelle 3.2.

dem Ein-Schalen-Modell, deren Parameter in Tabelle 14.2 zusammengefasst sind, besaß eine Übergangsfrequenz bei $\sim 28,0 \pm 5,1$ kHz. Diese Frequenz definierte die obere Grenze des für eine Zellmanipulation per nDEP in Frage kommenden Frequenzfensters. Die untere Grenze dieses Fensters bei etwa 10 kHz wurde durch parasitäre Effekte, welche sich beispielsweise in Elektrolyse (Zersetzung der Elektroden unter Gasbildung und Kontamination des Mediums mit zytotoxischer Spezies) [214], Elektrodenpolarisation (Spannungsverlust an der Kontaktkapazität zwischen Elektroden und Medium) [109] (Abschn. 6.3) oder AC-Elektroosmose (tangentiale Konvektionsbewegung des Mediums an Elektrodenoberflächen entlang infolge von *Coulomb*-Kräften auf angesammelte Ladungen) [215] äußern können, definiert. Um (i) ausreichend hohe repulsive DEP-Kräfte einerseits zu erzielen, (ii) die Belastung der Plasmamembran einer Tumorzelle durch zu hohe Transmembranspannungen bei niedrigen Frequenzen andererseits zu reduzieren, wurde die Betriebsfrequenz für DEP-Experimente inmitten des Fensters bei 15 kHz und $\mathrm{Re}\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right] \sim -0,15$ gewählt.

Tabelle 14.2: Parameter des Ein-Schalen-Modells zur Darstellung der DEP-Antwort aus Abbildung 14.3. Für die Plasmamembran wurde $\delta_{\mathrm{mem}} = 5$ nm angenommen [126].

	ZELLINNERES		PLASMAMEMBRAN	
R (in µm)	$\varepsilon_{\mathrm{cyt}}/\varepsilon_0$ (in 1)	σ_{cyt} (in S/m)	$\varepsilon_{\mathrm{mem}}/\varepsilon_0$ (in 1)	σ_{mem} (in S/m)
$6,8 \pm 1,7$	$60,3 \pm 5,8$	$0,29 \pm 0,04$	$12,0 \pm 3,6$	$(6,43 \pm 0,57) \cdot 10^{-6}$

14.2 SIMULATION DES BETRIEBSVERHALTENS

14.2.1 *Simulationsgeometrie und Randbedingungen*

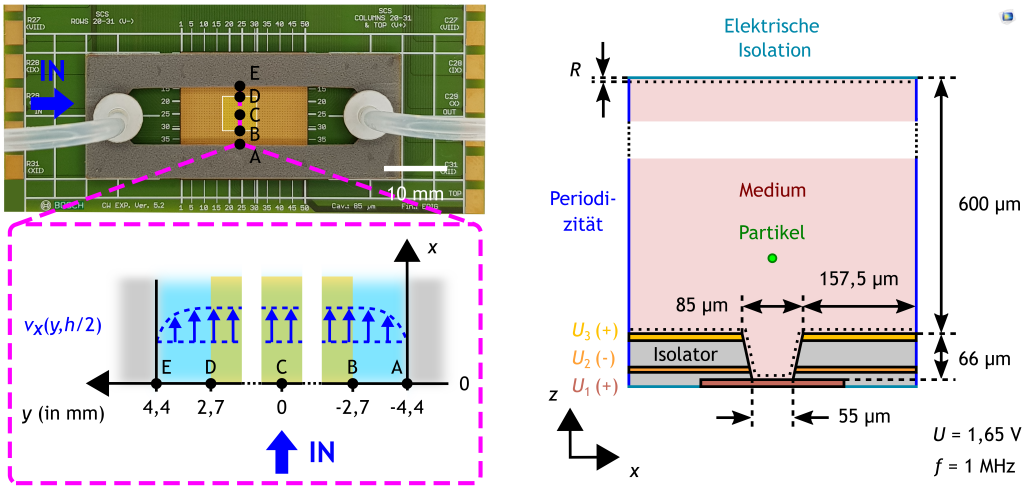
Einzelpartikel-Isolationen mit einem DEP-PCB innerhalb eines rechteckigen Mikrofluidikkanals nach Abbildung 14.4a bedingten die vorausgehende Auswahl von geeigneten Betriebsspannungen. Dazu sollten die im jeweiligen Betriebsmodus entwickelten DEP-Kräfte per FEM-Simulation untersucht werden. Zur Darstellung von elektrifizierten Mikrowannen wurde die in Abbildung 14.4b skizzierte Simulationsgeometrie eingesetzt. In einer Kräftebilanz nach (10.1) wurden als externe Kräfte neben der *Stokes*-Kraft (5.5) und der Sedimentationskraft (5.6) weiterhin die DEP-Kraft aus (A.6) berücksichtigt, womit die Partikelbewegung innerhalb eines Prototypen durch

$$\overline{v}_{\mathrm{p}} = \overline{v} + \overline{v}_{\mathrm{Sed}} + \overline{v}_{\mathrm{DEP}} = \overline{v} + \overline{v}_{\mathrm{Sed}} + \frac{\langle \overline{F}_{\mathrm{DEP}} \rangle}{6\pi\eta R} \tag{14.1}$$

beschrieben werden konnte. Für die DEP-Kraft wurden dabei gemäß

$$\langle \overline{F}_{\mathrm{DEP}} \rangle \approx \sum_{m=1}^{n=3} \langle \overline{F}_{\mathrm{DEP}}^{(m)} \rangle$$

die ersten drei multipolaren Terme (A.7) bis (A.9) verwendet.



(a) (b)

Abbildung 14.4: (a) Die Beschreibung des hydrodynamischen Betriebsverhaltens des Prototypen orientierte sich an Unterabschnitt 10.2.1. (b) Bei der Simulation des elektrischen Betriebsverhaltens wurde der rotationssymmetrische Aufbau der dreilagigen Elektrodenanordnung durch eine zweidimensionale Einheitszelle abgebildet (vgl. Abbildung 13.1). Als erweiternde Randbedingungen für das Potentialfeld ϕ wurden dabei (i) kontinuierliche Periodizität in der x-z-Ebene, (ii) elektrische Isolation an der Decke und am Boden der Einheitszelle sowie (iii) definierte elektrische Spannungen U_1 bis U_3 mit maximal $U = 1,65$ V (RMS-Werte) an den Metallelektroden angenommen. Weitere Simulationsparameter sind in Tabelle C.2 zusammengefasst.

Bei der Simulation der Betriebsmodi wurden als Partikel die in Abschnitt 7.1 vorgestellten Polystyrol-Beads und als Medium ein niedrig-leitfähiger DEP-Puffer herangezogen. Die Annahmen aus Unterabschnitt 10.2.1 wurden dabei wie folgt erweitert:

- Es liege eine harmonische Anregung mit $f = 1$ MHz vor, durch welche PS-Beads nDEP mit $\mathrm{Re}\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right] \sim -0,47$ erfahren.
- Modellproben seien verdünnt genug, so dass es nicht zu Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen PS-Beads kommt.
- Temperaturerhöhungen im Mikrofluidiksystem (und damit Änderungen von Materialparametern) infolge von Joul'scher Erwärmung können vernachlässigt werden.

14.2.2 *Beladung*

Beispielhafte Simulationen zum Beladevorgang sind in den Abbildungen 14.5a bis 14.5d gezeigt. Eine symmetrische gegenphasige Ansteuerung der dreilagigen Elektrodenanordnung lässt eine Feldverteilung entstehen, bei der insgesamt zwei Minima der elektrischen Feldstärke vorzufinden sind[4]: (i) Dabei handelt es sich zum

4 Bemerkung: Die weiteren vier Minima in den Ecken der Einheitszelle besitzen für die Untersuchungen keine Bedeutung und sind deshalb nicht dargestellt.

einen um ein erstes Minimum an der Kammerdecke unmittelbar über der Mikrowannne (äußeres Minimum), in dessen Richtung die DEP-Kraft auf außerhalb der Mikrowanne befindliche Partikel deutet. (ii) Zum anderen liegt ein weiteres Minimum inmitten einer Mikrowanne ca. 30 µm oberhalb von deren Boden vor (inneres Minimum), in welches innerhalb der Mikrowanne befindliche Partikel durch nDEP gestoßen werden. Für eine Beladung ist die Betriebsspannung U_B derart auszuwählen, dass ein Partikel zwar in eine Mikrowanne eintreten (Abstoßung in Richtung äußeres Minimum zu schwach), in dieser jedoch nicht zu Boden sedimentieren kann (Abstoßung in Richtung inneres Minimum stark genug). Für den Fall von PS-Beads liegt ein solcher vollständig ausgebildeter DEP-Trichter für $U_B \gtrsim 0,15$ V vor.

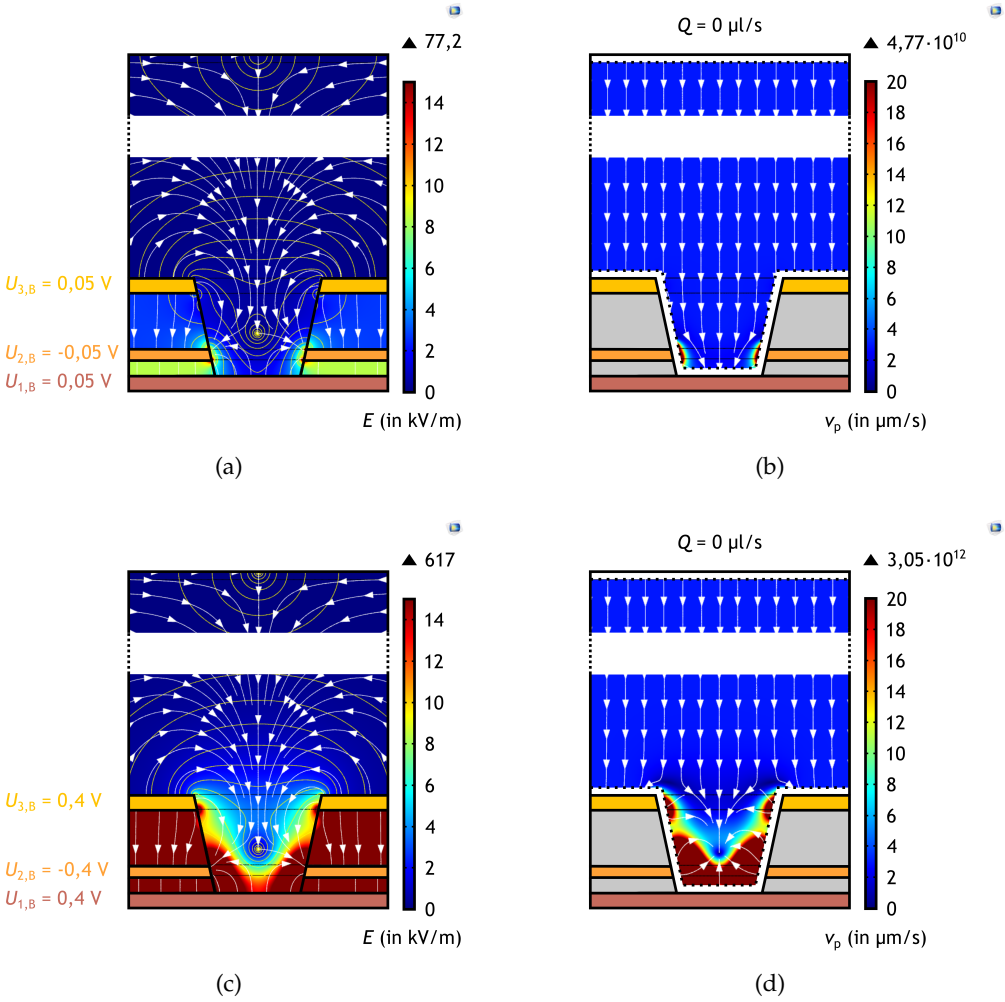


Abbildung 14.5: Simulation der Beladung von PS-Beads innerhalb eines niedrig-leitfähigen DEP-Puffers für einen (a) & (b) teilweise ($U_B = 0,05$ V) bzw. (c) & (d) vollständig ($U_B = 0,40$ V) ausgebildeten DEP-Trichter (es liege ein schmaler Ausschnitt der Einheitszelle aus Abbildung 14.4b vor). (a) und (c) zeigen jeweils den Stromlinien-Plot (Konturen mit Pfeilen in Weiß) und Isolinien (Konturen in Gelb) der elektrischen Feldstärke $\overline{E}$. (b) und (d) zeigen jeweils den zugehörigen Verlauf der Partikeltrajektorie als Stromlinien-Plot der Partikelgeschwindigkeit $\overline{v}_p$ nach Gleichung (14.1) für ein ruhendes Medium.

14.2.3 *Medienwechsel*

Ist nach einer Beladung ein wie in den Abbildungen 14.6a bis 14.6d beispielhaft dargestellter Medienwechsel erwünscht, so muss die Betriebsspannung bei gleichbleibender Feldverteilung so weit erhöht werden, dass keine weiteren Partikel in eine Mikrowanne eintreten können (Abstoßung in Richtung äußeres Minimum stark genug). Durch einen solchen geschlossenen DEP-Käfig können bereits beladene Partikel dann selbst bei vergleichsweise hohen Volumenströmen aktiv in einem stabilen Gleichgewichtspunkt gehalten werden (siehe Beispiel für $Q_1 = 20\ \mu l/s$)[5]. Für steigende Volumenströme dominiert die *Stokes*-Kraft gegenüber der DEP-Kraft allerdings zunehmend, womit eine Verschiebung dieses Gleichgewichtspunkts unter Ausbildung und Ausdehnung von wirbelartigen Stromlinien der Partikelgeschwindigkeit

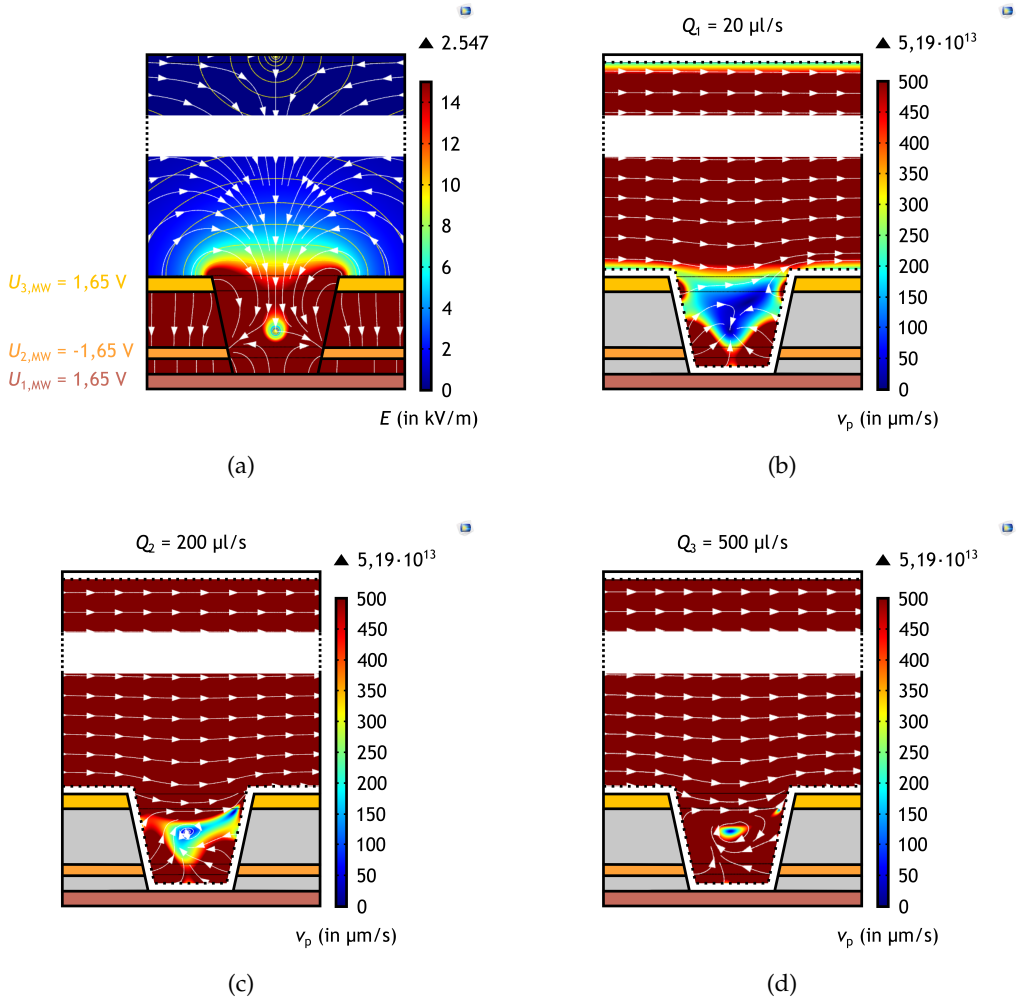


Abbildung 14.6: Simulation des Medienwechsels für PS-Beads innerhalb eines niedrigleitfähigen DEP-Puffers. Der Medienwechsel sei für (a) eine Ansteuerung mit $U_{\mathrm{MW}} = 1,65$ V und drei verschiedene Volumenströme (b) $Q_1 = 20\ \mu l/s$, (c) $Q_2 = 200\ \mu l/s$ und (d) $Q_3 = 500\ \mu l/s$ durch den Prototypen dargestellt.

5 Bemerkung: Vergleiche hierzu mit den Ergebnissen aus Unterabschnitt 10.2.2.

zu erwarten ist (siehe Beispiele für $Q_2 = 200\ \mu l/s$ und $Q_3 = 500\ \mu l/s$). Geschlossene DEP-Käfige können bei PS-Beads für schätzungsweise $U_{MW} \gtrsim 0,6$ V eingestellt werden.

14.2.4 *Selektive Freigabe*

Eine beispielhafte Ansteuerung, die für die gegebenen Geometrieparameter der elektrifizierten Mikrowannen zur selektiven Freigabe von PS-Beads führt, ist in den Abbildungen 14.7a bis 14.7d zu sehen. Für die selektive Freigabe eines Partikels durch einen DEP-Levitator muss in der elektrifizierten Mikrowanne von Interesse eine Feldverteilung hervorgerufen werden, in welcher innerhalb des Mediums ein direkter Abfall des Vektors der elektrischen Feldstärke zwischen der flächigen Gegenelektro-

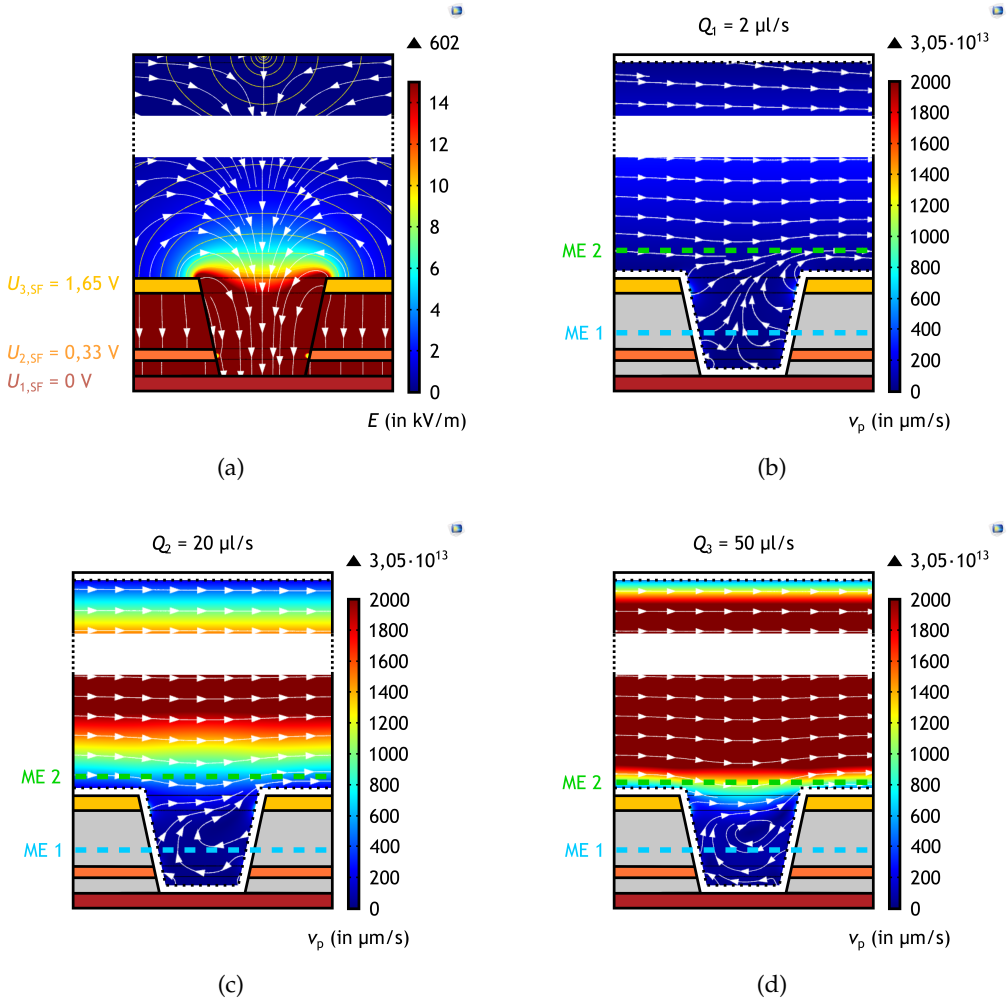


Abbildung 14.7: Simulation der selektiven Freigabe von PS-Beads innerhalb eines niedrigleitfähigen DEP-Puffers. (a) Die Spannungen an den Elektroden betragen $U_{1,SF} = 0$ V, $U_{2,SF} = 0,33$ V und $U_{3,SF} = 1,65$ V. Zur Darstellung des Abtransports wurden die Volumenströme (b) $Q_1 = 2\ \mu l/s$, (c) $Q_2 = 20\ \mu l/s$ und (d) $Q_3 = 50\ \mu l/s$ gewählt.

de und der freigestellten Oberfläche der Spaltenelektrode vorliegt (in dieser Situation gilt $U_{3,SF} > U_{2,SF} > U_{1,SF}$ mit $U_{2,SF} - U_{1,SF}$ groß genug für $U_{3,SF} > 0$)[6]. Bei der Wahl der Spannung $U_{1,SF}$ muss dabei sichergestellt werden, dass (i) auf das Zielpartikel einerseits eine ausreichend große repulsive DEP-Kraft in Richtung äußeres Minimum der elektrischen Feldstärke ausgeübt wird ($U_{3,SF} - U_{1,SF}$ groß genug), (ii) Nicht-Zielpartikel entlang der angesteuerten Spalte bzw. Zeile andererseits weiterhin hoch ($U_{3,SF} - U_{1,SF}$ klein genug) bzw. stabil genug ($U_{3,SF} - U_{1,SF}$ groß genug) in geschlossenen DEP-Käfigen schweben. Eine selektive Freigabe von Partikeln durch DEP-Kräfte kann, analog zur aktiven Immobilisierung im Betriebsmodus des Medienwechsels, nur dann sichergestellt werden (siehe Beispiele für $Q_1 = 2$ µl/s und $Q_2 = 20$ µl/s), sofern die *Stokes*-Kräfte im System nicht zu wirbelartigen Stromlinien der Partikelgeschwindigkeit führen (siehe Beispiel für $Q_3 = 50$ µl/s).

6 Bemerkung: Für weiterführende Details siehe auch [115] (Abschn. 3.4).

15

CHARAKTERISIERUNG

15.1 ISOLATION VON POLYMERBEADS

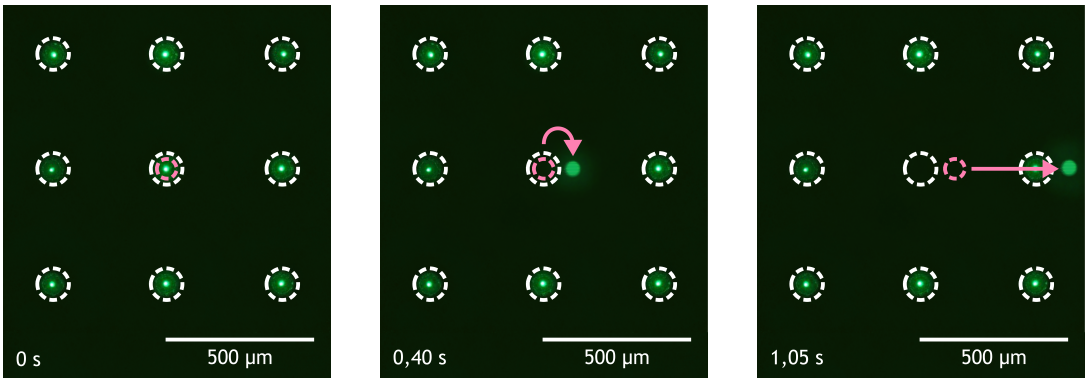
Um die Simulationen aus Abschnitt 14.2 auf Gültigkeit zu überprüfen, wurden mit Prototypen Isolationen auf Einzelpartikel-Ebene durchgeführt. Als nicht-biologische Alternative für angefärbte lebende CTCs und gesunde Blutzellen wurden als Partikel dabei PS-Beads eingesetzt. Mit einem niedrig-leitfähigen DEP-Puffer als Medium konnten (i) der Betrieb mit den limitierten Ausgangsleistungen des Ansteuer-PCBs aus Unterabschnitt 8.3.1 sichergestellt, (ii) Wärmeentwicklung innerhalb des Mikrofluidiksystems reduziert und (iii) elektrochemische Reaktionen mit der DIG-Endoberfläche von elektrifizierten Mikrowannen vermieden werden. Eine Spritzenpumpe und ein Fluoreszenzmikroskop erlaubten die Kontrolle und Beobachtung der Trajektorien von PS-Beads.

Anders als es durch die Ergebnisse aus Unterabschnitt 14.2.2 zu erwarten gewesen wäre, konnten vollständig ausgebildete DEP-Trichter bei ruhendem Medium bereits für eine geringfügig niedrigere Spannung $U_B = 0,05$ V realisiert werden. Als maßgeblicher Grund für diese Diskrepanz kann, neben unterschiedlichen Signalformen in Simulation (Sinusform) und Experiment (Rechteckform), vermutlich die dreidimensionale Gestalt der Elektrodenanordnung betrachtet werden, welche durch die Simulationsgeometrie nicht vollständig erfasst wurde. Diese führt in der Realität durch zusätzliche Beiträge zur räumlichen Inhomogenität des elektrischen Feldes entlang des Umfangs einer elektrifizierten Mikrowanne außerhalb der Zeichenebene nämlich tatsächlich zu höheren DEP-Kräften im Prototypen. Wie in Abbildung 14.5d dargestellt, konnten im Detektionsbereich lediglich unmittelbar über elektrifizierten Mikrowannen befindliche PS-Beads auch in solche beladen werden.

Bei einem Medienwechsel mit $Q = 200$ µl/s und $U_{MW} = 1,65$ V konnten beladene PS-Beads ohne Austrag zuverlässig immobilisiert werden. Wie durch Abbildung 14.6c vorhergesagt, konnte dabei jedoch eine Verschiebung des stabilen Gleichgewichtspunkts innerhalb der elektrifizierten Mikrowannen beobachtet werden, was auf signifikante *Stokes*-Kräfte unter diesen Betriebsbedingungen schließen lässt. Unbeladene PS-Beads konnten für ausreichend lange Überspülvorgänge aus einem Prototypen entfernt werden, ohne dabei in geschlossene DEP-Käfige zu gelangen.

Ähnlich wie bei der Beladung, waren auch für eine selektive Freigabe von PS-Beads kleinere Spannungsdifferenzen an den Elektroden erforderlich, als es durch die Simulationen zu vermuten gewesen wäre. Für $Q = 20$ µl/s und $U_{3,SF} = 1,65$ V an der flächigen Gegenelektrode konnten die Spalte und Zeile einer elektrifizierten Mikrowanne für eine selektive Freigabe durch einen DEP-Levitator nämlich mit $U_{1,SF} = 1,39$ V und $U_{2,SF} = 1,55$ V angesteuert werden. Damit konnten, wie in den Abbildungen 15.1a bis 15.1c dargestellt, selektive Freigaben von PS-Beads reprodu-

zierbar innerhalb von ca. 0,4 s und ein Abstransport dieser mit Geschwindigkeiten von ca. 619 µm/s realisiert werden. Dies steht insgesamt in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abbildung 14.7c, aus welchen eine Freigabedauer von etwa 0,5 s und eine Geschwindigkeit des Abtransports von ca. 350 µm/s bis 600 µm/s in einer Manipulationsebene ca. 8,9 µm bis 15,4 µm oberhalb der flächigen Gegenelektrode abgeleitet werden können. Eine maximale Geschwindigkeit des Abtransports mit ca. 6,19 mm/s konnte im Betriebsmodus des Medienwechsels erreicht werden.



(a) (b) (c)

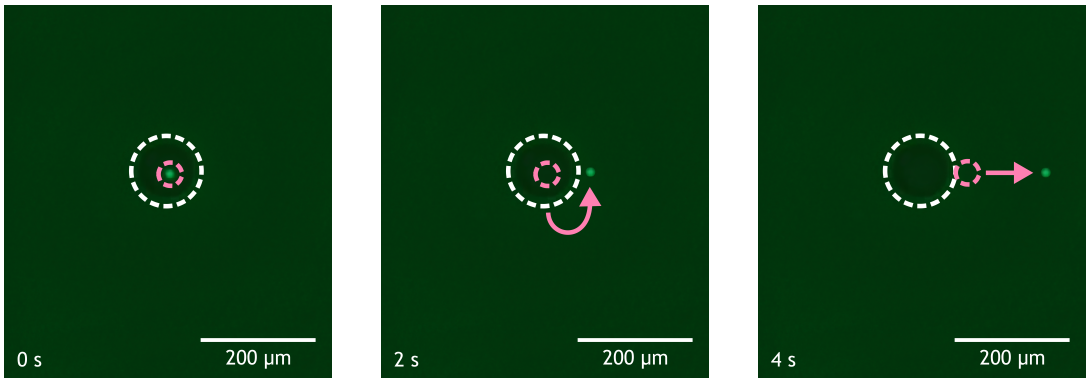
Abbildung 15.1: Vorgang der Einzelpartikel-Isolation am Beispiel von PS-Beads (Elektrodenanordnung der Größe 3 x 3 in der Draufsicht im FITC-Kanal). Die Aufnahmen zu drei verschiedenen Zeitpunkten zeigen (a) die initiale Verteilung von PS-Beads in der Elektrodenanordnung sowie (b) die selektive Freigabe und (c) den Abtransport eines ausgewählten PS-Beads durch das bewegte Medium bei $Q = 20$ µl/s. Weiße Konturen markieren die Öffnungen von elektrifizierten Mikrowannen, die Konturen und Pfeile in Pink stellen jeweils die Trajektorie des PS-Beads von Interesse dar. Abgeändert aus [210] (Abb. 3) mit Genehmigung durch die Chemical and Biological Microsystems Society (CBMS). Copyright 2024 CBMS.

15.2 ISOLATION VON TUMORZELLEN

Im zweiten Teil der Charakterisierung sollten Prototypen verwendet werden, um Isolationen auf Einzelpartikel-Ebene mit lebenden Zellen zu demonstrieren. Als biologische Alternative für zirkulierende Tumorzellen und gesunde Blutzellen wurden dabei, wie bereits in Abschnitt 11.1 auch, HCT116-Tumorzellen eingesetzt. Bei der Wahl der Betriebsfrequenz in einem niedrig-leitfähigen DEP-Puffer als Medium wurden die Ergebnisse der ROT-Experimente aus Unterabschnitt 14.1.3 berücksichtigt. Erneut konnten mit einer Spritzenpumpe und einem Fluoreszenzmikroskop die Trajektorien der zu untersuchenden Partikel in Suspension kontrolliert und beobachtet werden.

Die in Abschnitt 15.1 identifizierten Betriebsparameter mussten für eine Manipulation von Tumorzellen gemäß der Betriebsmodi aufgrund (i) einer höheren Massendichte ρ_p ($\sim 1.070\,\mathrm{kg/m^3}$ vs. $1.050\,\mathrm{kg/m^3}$) sowie (ii) einer schwächeren DEP-Antwort $\mathrm{Re}\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]$ ($\sim -0,15$ vs. $-0,47$) von Tumorzellen gegenüber PS-Beads geeignet abge-

wandelt werden. Für eine Beladung mit vollständig ausgebildeten DEP-Trichtern resultierte dies in einer Erhöhung der Betriebsspannung auf ca. $U_B = 0,48$ V. Für einen Medienwechsel mit Immobilisierung von Tumorzellen durch geschlossene DEP-Käfige ohne Austrag musste, bei gleichbleibender Betriebsspannung $U_{MW} = 1,65$ V, der Volumenstrom auf maximal $Q \sim 20$ µl/s reduziert werden. Um eine selektive Freigabe zu realisieren, mussten weiterhin die Betriebsspannungen an der Spalte und Zeile einer elektrifizierten Mikrowanne zur Ausbildung eines DEP-Levitators bei Ansteuerung der flächigen Gegenelektrode mit $U_{3,SF} = 1,65$ V auf $U_{1,SF} = 1,02$ V und $U_{2,SF} = 1,19$ V reduziert werden. Dann konnten Zellen, wie in den Abbildungen 15.2a bis 15.2c zu sehen, bei maximal $Q \sim 2$ µl/s innerhalb von ca. 2 s freigegeben und mit ca. 54 µm/s aus der Detektionskammer abtransportiert werden. Die Geschwindigkeit des Abtransports konnte im Betriebsmodus des Medienwechsels auf ca. 540 µm/s maximiert werden. Prototypen ließen sich damit in Summe erfolgreich für Einzelzell-Isolationen einsetzen, obgleich mit dem verwendeten Setup gegenüber PS-Beads hinsichtlich der Isolationsreinheit und Zellviabilität folgende Beobachtungen festgehalten werden konnten: (i) Unbeladene Tumorzellen konnten aufgrund von unspezifischer Wechselwirkung mit dem Prototypen und der beschränkten Dauer von DEP-Experimenten nicht restlos entfernt werden. (ii) Eine erfolgreiche selektive Freigabe konnte lediglich in $\sim$ 10 % aller angesteuerten Mikrowannen erzielt werden. In den restlichen Fällen kam es während der Freigabe zur Zerstörung von Zellen unter Austritt des Zellinneren, was auf einen zu hohen Spannungsabfall an der Plasmamembran der Tumorzellen bei der gewählten Betriebsfrequenz schließen lässt (siehe hierzu auch Abbildung 14.7a).



(a) (b) (c)

Abbildung 15.2: Vorgang der Einzelpartikel-Isolation am Beispiel von Tumorzellen der Zelllinie HCT116 (elektrifizierte Mikrowanne in der Draufsicht im FITC-Kanal). Die Aufnahmen zu drei verschiedenen Zeitpunkten zeigen (a) eine initial beladene Tumorzelle sowie deren (b) selektive Freigabe und (c) Abtransport durch das bewegte Medium bei $Q = 2$ µl/s. Die Darstellung von Mikrowanne und Zelltrajektorie ist dieselbe wie auch in Abbildung 15.1.

16

ZUSAMMENFASSUNG ZUR EINZELZELL-ISOLATION

In diesem Teil der Arbeit wurde das Konzept eines neuartigen Dielektrophorese-basierten Chips für die Einzelzell-Isolation präsentiert (Komponente B nach Abbildung 2.1), mit dessen Hilfe Einzelzell-Charakterisierungen von zirkulierenden Tumorzellen unter gesunden Blutzellen ermöglicht werden können. Eine dreilagige Elektrodenanordnung, bestehend aus einer Matrix von individuell adressierbaren Spalten (Lage 1) und Zeilen (Lage 2) sowie einer davon elektrisch isolierten flächigen Gegenelektrode (Lage 3), bildet die Grundlage von elektrifizierten Mikrowannen für eine dielektrophoretische Einzelzell-Manipulation in mikrofluidisch integrierter Konfiguration. Jede elektrifizierte Mikrowanne eines solchen DEP-Chips kann, abhängig von der Elektrodenansteuerung, in bis zu drei Modi mit unterschiedlichen räumlichen Verteilungen der DEP-Kraft betrieben werden: Kernhaltige Zellen in Mikrowannen können kontaktlos (i) durch DEP-Trichter beladen, (ii) bei einem Medienwechsel durch geschlossene DEP-Käfige stabilisiert und (iii) für eine Ausgabe in ein Trägergefäß durch DEP-Levitatoren selektiv freigegeben werden.

Prototypen von DEP-Chips wurden in Leiterplatten-Technologie realisiert. Elektrifizierte Mikrowannen (85 µm x 66 µm) gingen dabei aus Bohrungen von dreilagigen PCB-Laminaten mit einem Ablationslaser hervor. Die Elektroden eines DEP-PCBs konnten mithilfe eines FPGA-basierten Ansteuer-PCBs mit geeigneten elektrischen Signalen versorgt werden, wobei die Bedienung im Detektionsbereich von Interesse (Ausschnitt der Größe 13 x 13) durch eine grafische Benutzeroberfläche als digitale Schnittstelle erleichtert wurde.

Die vorgeschlagenen Betriebsmodi konnten unter Verwendung von mikrofluidisch integrierten DEP-PCBs untersucht werden. Als Modellproben und (nicht-) biologische Alternativen für zirkulierende Tumorzellen bzw. gesunde Blutzellen in physiologischen Medien fungierten dabei (i) Polystyrol-Beads sowie (ii) Tumorzellen der Zelllinie HCT116 in niedrig-leitfähigen DEP-Puffern. Die für die Untersuchungen relevanten Betriebsparameter wurden im Vorfeld getrennt ermittelt: (i) FEM-Simulationen zur Partikelbewegung innerhalb einer für den Prototypen repräsentativen Simulationsgeometrie erlaubten die Auswahl von geeigneten Volumenströmen und Betriebsspannungen für eine dielektrophoretische Manipulation von PS-Beads. (ii) Die DEP-Antwort $\mathrm{Re}\left[\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(1)}\right]$ von HCT116-Tumorzellen nach dem Ein-Schalen-Modell wurde im Rahmen von Vorcharakterisierungen aus ROT-Experimenten mit Quadrupol-Strukturen eines zweilagigen Kalibrier-PCBs bestimmt und zur Auswahl einer geeigneten Betriebsfrequenz verwendet. Mit den vorliegenden DEP-PCBs konnten selektive Partikelfreigaben innerhalb von ca. (i) 0,4 s bzw. (ii) 2 s bei Geschwindigkeiten des mikrofluidischen Abtransports von maximal (i) $v_{\mathrm{p}} \sim 6{,}19$ mm/s ($Q = 200$ µl/s) bzw. (ii) $v_{\mathrm{p}} \sim 540$ µm/s ($Q = 20$ µl/s) demonstriert werden.

17

GESAMTFAZIT

Zirkulierende Tumorzellen (Circulating Tumor Cells, CTCs) stellen attraktive Tumor-Biomarker zur Ableitung von personalisierten Krebstherapien dar. Nichtsdestotrotz ist deren routinemäßiger klinischer Einsatz aufgrund unzureichender technologischer Möglichkeiten bei der Vollblut-Prozessierung bis heute weitestgehend verwehrt geblieben. Um diese Limitierungen zu umgehen und die Extraktion des Informationsgehalts von CTCs durch ein vollautomatisiertes und integriertes Gesamtsystem zu erleichtern, wurden in dieser Arbeit zwei neuartige Komponenten für die Vollblut-Aufbereitung und Einzelzell-Isolation eingeführt und untersucht. Gegenüber Ansätzen nach dem Stand der Wissenschaft und Technik sind diese wie folgt einordenbar:

1. Vollblut-Aufbereitung (Komponente A):

   Um die Möglichkeiten der in dieser Arbeit als Referenz-Methode herangezogenen maintrac®-Methode zu erweitern, wurde der zugehörige Arbeitsablauf prototypisch in eine mikrofluidische Umgebung integriert.

   Eine Automatisierung der bislang größtenteils manuell durchgeführten Referenz-Methode konnte durch neuartige mikrofluidische Einheitsoperationen erreicht werden. Diese bilden (i) eine Zellmarkierung durch die Vollblut-Behandlung mit einem All-in-One-Puffer für die parallelisierte Farbstoffinkubation und selektive Erythrozytenlyse, (ii) eine Zellvereinzelung durch das sedimentationsbasierte Herabsetzen von kernhaltigen Zellen innerhalb von Blutlysat in einer flachen Detektionskammer und (iii) eine Erythrozytenbeseitigung durch das Überspülen eines im Boden dieser Detektionskammer integrierten Mikrowannen-Chips aus Silizium ab. Die Vollblut-Aufbereitung in einem solchen Mikrofluidiksystem bot weiterhin die Möglichkeit der Miniaturisierung der Referenz-Methode. Durch eine räumliche System-Miniaturisierung (Minimierung von Reaktionsvolumina), welche auf eine dreifache Reduzierung des Verdünnungsverhältnisses bei einer selektiven Erythrozytenlyse auf 1:5 zurückzuführen ist, konnte die Abhängigkeit von traditionellem Labor-Equipment erübrigt werden. Dies betrifft insbesondere den Einsatz von Zentrifugen und 96-Well-Platten. Eine zeitliche System-Miniaturisierung (Minimierung von Reaktionsdauern und Parallelisierung von Prozessschritten) ging aus dem Einsatz eines All-in-one-Puffers, einer dreifachen Reduzierung der Dauer einer selektiven Erythrozytenlyse auf 5 min sowie einer dreifachen Reduzierung der Sedimentationsdauer bei einer Zellvereinzelung auf 20 min hervor. Mithilfe eines Si-Chips mit einem effektiven Detektionsbereich von 12,5 mm x 12,5 mm konnte eine mikrofluidische Aufbereitung von 20 µl Patienten-Vollblut auf diese Weise in 30 min durchgeführt werden, womit sich die Gesamt-Prozessdauer der Referenz-Methode auf weniger als ein Drittel verkürzen ließ.

   Der hier präsentierte neuartige Arbeitsablauf vereint die Vorteile der maintrac®-Methode als sensitiven, schonenden und standardisierten Schlüssel-Vorprozess

der Vollblut-Aufbereitung mit den Stärken der Mikrofluidik. Durch eine entsprechend ausgelegte Komponente steht damit eine attraktive Lösung zur Verfügung, mit der CTC-Quantifizierungen zukünftig erstmals anwenderfreundlich, dezentralisiert und schnell durchgeführt werden könnten.

2. Einzelzell-Isolation (Komponente B):

   Um die Möglichkeiten von modernen Dielektrophorese (DEP)-basierten Technologien für die Einzelzell-Isolation, zu denen zum Beispiel das DEPArray™ NxT System gehört, zu erweitern, wurden die in dieser Arbeit eingeführten Einheitsoperationen der mikrofluidischen Vollblut-Aufbereitung durch eine Einzelzell-Manipulation per Dielektrophorese komplementiert.

   Die Integration einer dielektrophoretischen Einzelzell-Isolation in den bestehenden mikrofluidischen Arbeitsablauf wurde durch elektrifizierte Mikrowannen ermöglicht. Die Grundlage dafür stellte eine dreilagige Elektrodenanordnung aus einer Matrix von individuell adressierbaren Spalten (Lage 1) und Zeilen (Lage 2) sowie einer davon elektrisch isolierten flächigen Gegenelektrode (Lage 3) dar, in welcher eine elektrifizierte Mikrowanne als Aussparung der Anordnung an einem Kreuzungspunkt zwischen einer Spalte und Zeile bis an die unterste Elektrodenlage hervorging. Ein derartig aufgebauter DEP-Chip erlaubt insgesamt drei neuartige Betriebsmodi: Elektrifizierte Mikrowannen können, je nach Elektrodenansteuerung und räumlicher Verteilung der DEP-Kraft, für eine kontaktlose Einzelzell-Manipulation von kernhaltigen Zellen durch (i) eine Beladung via DEP-Trichter (DEP-unterstützte Zellvereinzelung), (ii) einen Medienwechsel durch geschlossene DEP-Käfige (DEP-unterstützte Erythrozytenbeseitigung) und (iii) eine selektive Freigabe durch DEP-Levitatoren mit Ausgabe von Zellen in Trägergefäße eingesetzt werden. Durch eine Entkopplung von dielektrophoretischer und hydrodynamischer Zellmanipulation ergeben sich gegenüber modernen DEP-basierten Technologien dabei drei entscheidende Vorteile: (i) Da die Kammerhöhe prinzipiell beliebig groß auslegbar ist (Skalierung des DEP-Chips in z-Richtung), kann eine vorausgehende externe Volumenreduktion mit manuellen Zwischenschritten erübrigt werden. (ii) Für die selektive Freigabe können stationäre DEP-Fallen in einem bewegten Medium eingesetzt werden, welche sich kostengünstig mithilfe einer elektrisch passiven Matrix-Ansteuerung umsetzen lassen (Prototypen von DEP-Chips basierten hier auf Leiterplatten-Technologie). (iii) Der Abtransport von Zellen findet nicht länger dielektrophoretisch, sondern rein mikrofluidisch statt. Da dabei keine Behinderung von Zielzellen durch Nicht-Zielzellen vorliegt, kann die Geschwindigkeit der Zellbewegung und damit der Durchsatz der Einzelzell-Isolation erhöht werden (Skalierung des DEP-Chips in x-y-Richtung ohne Zwischenlagerung in einer Parkkammer).

   Der in dieser Arbeit eingeführte neuartige Chip kombiniert die Vorteile der Dielektrophorese als schonendes und digitales Manipulationswerkzeug mit Einzelzell-Präzision beim Zwischenprozess der Einzelzell-Isolation mit den Stärken von Mikrowannen-basierten Systemen. Mithilfe einer derartigen Komponente könnten Einzelzell-Charakterisierungen in Zukunft somit erstmals einfach, kompakt und kostengünstig ermöglicht werden.

18

AUSBLICK

Das Funktionsprinzip der in dieser Arbeit eingeführten Komponenten wurde mithilfe von zugehörigen Prototypen demonstriert. Im Nachfolgenden seien Maßnahmen genannt und weitere Anwendungen in Aussicht gestellt, welche sich im Rahmen einer Optimierung dieser Prototypen zukünftig in Erwägung ziehen lassen:

1. Vollblut-Aufbereitung (Komponente A):

   - Steigerung der Sensitivität:

     Das analysierbare Blutäquivalent kann durch eine Aufskalierung der effektiven Detektionsfläche vergrößert werden. Perspektivisch könnte das Verfahren der Vollblut-Aufbereitung für CTC-Quantifizierungen somit nicht nur im Therapie-Monitoring eingesetzt, sondern insbesondere auch für die Krebsfrüherkennung in Betracht gezogen werden.

   - Steigerung der Spezifität:

     Eine zuverlässigere Definition von CTCs für Quantifizierungen mit klinisch relevanter Aussagekraft ließe sich durch eine Optimierung der Zellmarkierung mit dem All-in-One-Puffer erreichen. Dazu könnten Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden, die gegen weitere epitheliale Marker (z. B. Cytokeratine, E-Cadherin, etc.) und zusätzlich gegen mesenchymale (z. B. Vimentin, N-Cadherin, Fibronectin, Twist, etc.), Gewebe-spezifische bzw. Tumor-assoziierte (z. B. HER2, ER, AR, PSMA, PSA, EGFR, etc.) oder Counterstain-Marker (z. B. CD45 für Leukozyten, aber auch Marker für Endothelzellen und hematopoetische Stamm- und Vorläuferzellen) gerichtet sind. Die Mikrowannen eines Si-Chips könnten des Weiteren nicht nur zur Bestimmung der CTC-Anzahl pro Einheitsvolumen Vollblut via immunzytochemischer Fluoreszenzmikroskopie, sondern unter Einsatz einer geeigneten Versiegelung ebenfalls für molekulare (z. B. qRT-PCR, FISH, etc.) und funktionale Einzelzell-Analysen (z. B. EPISPOT-Assay, etc.) verwendet werden [16, 49].

   - Steigerung der Zellviabilität:

     Dem beschleunigten Tod von kernhaltigen Zellen in Blutlysat könnte durch eine optimierte Formulierung des Lysepuffers im All-in-One-Puffer entgegengewirkt werden. Hierzu ließe sich ein Puffersystem mit höherer Pufferkapazität einsetzen, durch welches der pH-Wert über die gesamte Dauer der Vollblut-Aufbereitung auf physiologischem Niveau gehalten werden könnte.

   - Steigerung des Standardisierungsgrades:

     Kleinere Fertigungstoleranzen erlauben eine präzisere Definition des zu analysierenden Blutäquivalents durch das effektive Sedimentationsvolumen in der flachen Detektionskammer. Um beim Prozessschritt der Ery-

throzytenbeseitigung ferner das ungewollte Einspülen von kernhaltigen Zellen außerhalb des Mikrowannen-Chips in den Detektionsbereich zu minimieren, könnte die Geometrie des Mikrofluidiksystems weiter optimiert werden. Dafür ließen sich mit lysiertem Vollblut befüllte Totvolumina im Inlet-Bereich reduzieren.

2. Einzelzell-Isolation (Komponente B):

   - Steigerung von Isolationseffizienz, -reinheit und -durchsatz:

     Die elektrifizierten Mikrowannen des in dieser Arbeit verwendeten Prototypen könnten in zukünftigen Arbeiten weiter miniaturisiert werden, beispielsweise durch die mikrosystemtechnische Prozessierung von Halbleiter-Materialien wie Silizium. Durch schmalere Stege zwischen benachbarten Wannen und feiner aufgelöste Elektroden könnte eine Elektrodenanordnung realisiert werden, mit der kernhaltige Zellen effizienter beladen und mit insgesamt höheren DEP-Kräften beaufschlagt werden könnten. Damit ließen sich unspezifische Wechselwirkungen mit dem Prototypen reduzieren und der Durchsatz einer Einzelzell-Isolation unter Verwendung von optimierten Ansteuersignalen weiter erhöhen. Ein miniaturisierter DEP-Chip könnte zukünftig nicht nur für onkologische Anwendungen in der In-Vitro-Diagnostik am Point-of-Care (Analytik), sondern auch in weiteren Disziplinen wie etwa der Immunologie, Neurobiologie oder Stammzell- und Entwicklungsbiologie eingesetzt werden. Problemstellungen, bei denen es Einzelzell-Isolationen von seltenen Zielzellen aus Suspensionen von Nicht-Zielzellen durchzuführen gilt, könnten das Immune-Repertoire-Profiling, die Antikörperentdeckung und Zelllinienentwicklung bei der Medikamentenherstellung (Pharmaforschung) sowie die Zelltherapie, synthetische Biologie und Genom-Editierung in der Biotechnologie (Biotransformation) sein [29, 95].

   - Steigerung der Zellviabilität:

     Um die Manipulierbarkeit von kernhaltigen Zellen per DEP über einen längeren Zeitraum (> 15 Minuten) garantieren zu können, müsste ein Betrieb in physiologischen hoch-leitfähigen Medien ermöglicht werden. Dafür bedürfe es einer leistungsfähigeren Ansteuereinheit und einer geeigneten Kühlung (z. B. per Peltier-Element, Ventilator, etc.), welche einem Temperaturanstieg innerhalb der Detektionskammer infolge *Joule*'scher Erwärmung entgegengewirken könnte. In physiologischen Medien ließe sich der Arbeitspunkt für eine Manipulation via nDEP dann jedoch derart anpassen (Auswahl einer höheren Betriebsfrequenz im MHz-Bereich), so dass die Transmembranspannung minimiert und die Zellviabilität infolgedessen maximiert wird.

   - Steigerung des Automatisierungsgrades:

     Die Ansteuerung von elektrifizierten Mikrowannen nach der Aufnahme von Fluoreszenzbildern könnte in Zukunft mit einer auf künstlicher Intelligenz basierten Zellklassifizierung fusioniert werden. Mit einem solchen DEP-Chip ließen sich benutzerdefinierte Programmabläufe dann vollautomatisiert ausführen („digitale Zellbiologie“).

Teil V

ANHANG

Ergänzende Informationen zu den Komponenten sind in diesem Teil der Arbeit zusammengefasst. Dies beinhaltet:

- Dielektrophoretische Multipol-Momente (Anhang A)
- Ergänzungen zum Materialverzeichnis (Anhang B)
- Parameter zur FEM-Simulation (Anhang C)
- Ergänzungen zur Reinraumfabrikation (Anhang D)
- Grafische Benutzeroberfläche (Anhang E)

A

DIELEKTROPHORETISCHE MULTIPOL-MOMENTE

Mathematische Grundlagen

- Vektorielle *Taylor*-Reihenentwicklung der DEP-Kraft aus (6.4) auf ein dielektrisches sphärisches Partikel mit induziertem Dipolmoment $\overline{p}^{(1)} = q\overline{d}$ (*) für den elektrostatischen Fall [35] (Box 2.4), [115] (Gl. (2.2)):

$$\begin{aligned}\overline{F}_{\mathrm{DEP}} = \overline{F}_{\mathrm{EP},1} + \overline{F}_{\mathrm{EP},2} &= q\overline{E}(\overline{r}+\overline{d}) - q\overline{E}(\overline{r}) \\ &= q\left(\overline{E}(\overline{r}) + (\overline{d}\cdot\nabla)\overline{E}(\overline{r}) + ...\right) - q\overline{E}(\overline{r}) \\ &= q(\overline{d}\cdot\nabla)\overline{E}(\overline{r}) + ... \\ &\overset{(*)}{=} (\overline{p}^{(1)}\cdot\nabla)\overline{E}(\overline{r}) + ... \\ &= \overline{F}^{(1)}_{\mathrm{DEP}} + ...\end{aligned} \tag{A.1}$$

- Vektor-Identität, wie in (6.7) und (6.15) eingesetzt, für Rotationsfreiheit $\nabla\times\overline{A} = 0$, $\nabla\times\overline{B} = 0$ (*) und den Spezialfall $\overline{A} = \overline{B}$ (**) [35] (Box 2.5):

$$\begin{aligned}(\overline{A}\cdot\nabla)\overline{B} &= \nabla(\overline{A}\cdot\overline{B}) - (\overline{B}\cdot\nabla)\overline{A} - \overline{A}\times(\nabla\times\overline{B}) - \overline{B}\times(\nabla\times\overline{A}) \\ &\overset{(*)}{=} \nabla(\overline{A}\cdot\overline{B}) - (\overline{B}\cdot\nabla)\overline{A} \\ &\overset{(**)}{=} \nabla(\overline{A}\cdot\overline{A}) - (\overline{A}\cdot\nabla)\overline{A} \\ &\overset{(**)}{=} (\overline{A}\cdot\nabla)\overline{A}\end{aligned} \tag{A.2}$$

- Vektor-Identität, wie in (6.15) eingesetzt, für Divergenzfreiheit $\nabla\cdot\overline{A} = 0$, $\nabla\cdot\overline{B} = 0$ (*) [109] (Abschn. 4.3):

$$\begin{aligned}\nabla\times(\overline{A}\times\overline{B}) &= (\overline{B}\cdot\nabla)\overline{A} - (\overline{A}\cdot\nabla)\overline{B} + (\nabla\cdot\overline{B})\overline{A} - (\nabla\cdot\overline{A})\overline{B} \\ &\overset{(*)}{=} (\overline{B}\cdot\nabla)\overline{A} - (\overline{A}\cdot\nabla)\overline{B}\end{aligned} \tag{A.3}$$

DEP-Manipulation von biologischen Zellen

- Tensorausdruck des induzierten linearen Multipol-Moments n-ter Ordnung für eine homogene verlustbehaftete Kugel und allgemeine komplexwertige elektrische Wechselfelder [112] (Gl. (23)):

$$\underline{\overline{\overline{p}}}^{(n)} = \frac{4\pi\varepsilon_\mathrm{m} R^{2n+1} n}{(2n-1)!!} \underline{f}_\mathrm{CM}^{(n)} (\nabla)^{n-1} \underline{\overline{E}} \tag{A.4}$$

- Komplexer *Clausius-Mossotti*-Faktor n-ter Ordnung für ein homogenes verlustbehaftetes sphärisches Partikel mit komplexer (Ersatz-) Permittivität $\underline{\varepsilon}_\mathrm{p}^{\prime(n)}$ (für Ein-Schalen-Modell Umwandlung mit (A.11)) in einem Medium mit komplexer Permittivität $\underline{\varepsilon}_\mathrm{m}$ [112] (Gl. (23)):

$$\underline{f}_\mathrm{CM}^{(n)} = \frac{\underline{\varepsilon}_\mathrm{p}^{\prime(n)} - \underline{\varepsilon}_\mathrm{m}}{n\underline{\varepsilon}_\mathrm{p}^{\prime(n)} + (n+1)\underline{\varepsilon}_\mathrm{m}} \tag{A.5}$$

- Zeitgemittelter multipolarer DEP-Kraftvektor der Ordnung n für eine homogene verlustbehaftete Kugel und allgemeine komplexwertige elektrische Wechselfelder [112] (Gl. (24a)):

$$\langle \overline{F}_\mathrm{DEP}^{(n)} \rangle = \mathrm{Re}\left[\frac{\left(\underline{\overline{\overline{p}}}^{(n)} [\cdot]^n (\nabla)^n \right) \overline{\underline{E}}^* }{n!} \right] \tag{A.6}$$

- Zeitgemittelte Komponenten der multipolaren DEP-Kraft in i- (d. h. x-, y- oder z-) Richtung für die Ordnungen $n = 1 \ldots 3$ in Index-Notation (Einstein'sche Summenkonvention) für ein rotationsfreies elektrisches Wechselfeld (d. h. $\overline{E}_\mathrm{I} = 0$) [112] (Gl. (16) & (B1)–(B3)):

  1. Dipol ($n = 1$):

$$\langle F_{\mathrm{DEP},i}^{(1)} \rangle = 4\pi\varepsilon_\mathrm{m} R^3 \mathrm{Re}\left[\underline{f}_\mathrm{CM}^{(1)} \right] E_m \frac{\partial E_i}{\partial x_m} \tag{A.7}$$

x-Komponente:

$$\langle F_{\mathrm{DEP},x}^{(1)} \rangle = 4\pi\varepsilon_\mathrm{m} R^3 \mathrm{Re}\left[\underline{f}_\mathrm{CM}^{(1)} \right] \left(E_x \frac{\partial E_x}{\partial x} + E_y \frac{\partial E_x}{\partial y} + E_z \frac{\partial E_x}{\partial z} \right)$$

y-Komponente:

$$\langle F_{\mathrm{DEP},y}^{(1)} \rangle = 4\pi\varepsilon_\mathrm{m} R^3 \mathrm{Re}\left[\underline{f}_\mathrm{CM}^{(1)} \right] \left(E_x \frac{\partial E_y}{\partial x} + E_y \frac{\partial E_y}{\partial y} + E_z \frac{\partial E_y}{\partial z} \right)$$

z-Komponente:

$$\langle F_{\mathrm{DEP},z}^{(1)} \rangle = 4\pi\varepsilon_\mathrm{m} R^3 \mathrm{Re}\left[\underline{f}_\mathrm{CM}^{(1)} \right] \left(E_x \frac{\partial E_z}{\partial x} + E_y \frac{\partial E_z}{\partial y} + E_z \frac{\partial E_z}{\partial z} \right)$$

2. Quadrupol ($n = 2$):

$$\langle F^{(2)}_{\mathrm{DEP},i} \rangle = \frac{4}{3}\pi\varepsilon_{\mathrm{m}} R^5 \mathrm{Re}\left[\underline{f}^{(2)}_{\mathrm{CM}}\right] \frac{\partial E_n}{\partial x_m} \frac{\partial^2 E_i}{\partial x_n \partial x_m} \tag{A.8}$$

x-Komponente:

$$\begin{aligned}\langle F^{(2)}_{\mathrm{DEP},x} \rangle = \frac{4}{3}\pi\varepsilon_{\mathrm{m}} R^5 \mathrm{Re}\left[\underline{f}^{(2)}_{\mathrm{CM}}\right] \Bigg(&\frac{\partial E_x}{\partial x}\frac{\partial^2 E_x}{\partial x \partial x} + \frac{\partial E_y}{\partial x}\frac{\partial^2 E_x}{\partial y \partial x} + \frac{\partial E_z}{\partial x}\frac{\partial^2 E_x}{\partial z \partial x} \\ &+ \frac{\partial E_x}{\partial y}\frac{\partial^2 E_x}{\partial x \partial y} + \frac{\partial E_y}{\partial y}\frac{\partial^2 E_x}{\partial y \partial y} + \frac{\partial E_z}{\partial y}\frac{\partial^2 E_x}{\partial z \partial y} \\ &+ \frac{\partial E_x}{\partial z}\frac{\partial^2 E_x}{\partial x \partial z} + \frac{\partial E_y}{\partial z}\frac{\partial^2 E_x}{\partial y \partial z} + \frac{\partial E_z}{\partial z}\frac{\partial^2 E_x}{\partial z \partial z}\Bigg)\end{aligned}$$

y-Komponente:

$$\begin{aligned}\langle F^{(2)}_{\mathrm{DEP},y} \rangle = \frac{4}{3}\pi\varepsilon_{\mathrm{m}} R^5 \mathrm{Re}\left[\underline{f}^{(2)}_{\mathrm{CM}}\right] \Bigg(&\frac{\partial E_x}{\partial x}\frac{\partial^2 E_y}{\partial x \partial x} + \frac{\partial E_y}{\partial x}\frac{\partial^2 E_y}{\partial y \partial x} + \frac{\partial E_z}{\partial x}\frac{\partial^2 E_y}{\partial z \partial x} \\ &+ \frac{\partial E_x}{\partial y}\frac{\partial^2 E_y}{\partial x \partial y} + \frac{\partial E_y}{\partial y}\frac{\partial^2 E_y}{\partial y \partial y} + \frac{\partial E_z}{\partial y}\frac{\partial^2 E_y}{\partial z \partial y} \\ &+ \frac{\partial E_x}{\partial z}\frac{\partial^2 E_y}{\partial x \partial z} + \frac{\partial E_y}{\partial z}\frac{\partial^2 E_y}{\partial y \partial z} + \frac{\partial E_z}{\partial z}\frac{\partial^2 E_y}{\partial z \partial z}\Bigg)\end{aligned}$$

z-Komponente:

$$\begin{aligned}\langle F^{(2)}_{\mathrm{DEP},z} \rangle = \frac{4}{3}\pi\varepsilon_{\mathrm{m}} R^5 \mathrm{Re}\left[\underline{f}^{(2)}_{\mathrm{CM}}\right] \Bigg(&\frac{\partial E_x}{\partial x}\frac{\partial^2 E_z}{\partial x \partial x} + \frac{\partial E_y}{\partial x}\frac{\partial^2 E_z}{\partial y \partial x} + \frac{\partial E_z}{\partial x}\frac{\partial^2 E_z}{\partial z \partial x} \\ &+ \frac{\partial E_x}{\partial y}\frac{\partial^2 E_z}{\partial x \partial y} + \frac{\partial E_y}{\partial y}\frac{\partial^2 E_z}{\partial y \partial y} + \frac{\partial E_z}{\partial y}\frac{\partial^2 E_z}{\partial z \partial y} \\ &+ \frac{\partial E_x}{\partial z}\frac{\partial^2 E_z}{\partial x \partial z} + \frac{\partial E_y}{\partial z}\frac{\partial^2 E_z}{\partial y \partial z} + \frac{\partial E_z}{\partial z}\frac{\partial^2 E_z}{\partial z \partial z}\Bigg)\end{aligned}$$

3. Oktupol ($n = 3$):

$$\langle F^{(3)}_{\mathrm{DEP},i} \rangle = \frac{2}{15} \pi \varepsilon_{\mathrm{m}} R^7 \mathrm{Re}\left[\underline{f}^{(3)}_{\mathrm{CM}}\right] \frac{\partial^2 E_n}{\partial x_l \partial x_m} \frac{\partial^3 E_i}{\partial x_n \partial x_m \partial x_l} \tag{A.9}$$

x-Komponente:

$$\begin{aligned}
\langle F^{(3)}_{\mathrm{DEP},x} \rangle = \frac{2}{15} \pi \varepsilon_{\mathrm{m}} R^7 \mathrm{Re}\left[\underline{f}^{(3)}_{\mathrm{CM}}\right] \Bigg(& \frac{\partial^2 E_x}{\partial x \partial x} \frac{\partial^3 E_x}{\partial x \partial x \partial x} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial x \partial x} \frac{\partial^3 E_x}{\partial y \partial x \partial x} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial x \partial x} \frac{\partial^3 E_x}{\partial z \partial x \partial x} \\
& + \frac{\partial^2 E_x}{\partial x \partial y} \frac{\partial^3 E_x}{\partial x \partial y \partial x} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial x \partial y} \frac{\partial^3 E_x}{\partial y \partial y \partial x} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial x \partial y} \frac{\partial^3 E_x}{\partial z \partial y \partial x} \\
& + \frac{\partial^2 E_x}{\partial x \partial z} \frac{\partial^3 E_x}{\partial x \partial z \partial x} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial x \partial z} \frac{\partial^3 E_x}{\partial y \partial z \partial x} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial x \partial z} \frac{\partial^3 E_x}{\partial z \partial z \partial x} \\
& + \frac{\partial^2 E_x}{\partial y \partial x} \frac{\partial^3 E_x}{\partial x \partial x \partial y} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial y \partial x} \frac{\partial^3 E_x}{\partial y \partial x \partial y} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial y \partial x} \frac{\partial^3 E_x}{\partial z \partial x \partial y} \\
& + \frac{\partial^2 E_x}{\partial y \partial y} \frac{\partial^3 E_x}{\partial x \partial y \partial y} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial y \partial y} \frac{\partial^3 E_x}{\partial y \partial y \partial y} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial y \partial y} \frac{\partial^3 E_x}{\partial z \partial y \partial y} \\
& + \frac{\partial^2 E_x}{\partial y \partial z} \frac{\partial^3 E_x}{\partial x \partial z \partial y} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial y \partial z} \frac{\partial^3 E_x}{\partial y \partial z \partial y} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial y \partial z} \frac{\partial^3 E_x}{\partial z \partial z \partial y} \\
& + \frac{\partial^2 E_x}{\partial z \partial x} \frac{\partial^3 E_x}{\partial x \partial x \partial z} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial z \partial x} \frac{\partial^3 E_x}{\partial y \partial x \partial z} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial z \partial x} \frac{\partial^3 E_x}{\partial z \partial x \partial z} \\
& + \frac{\partial^2 E_x}{\partial z \partial y} \frac{\partial^3 E_x}{\partial x \partial y \partial z} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial z \partial y} \frac{\partial^3 E_x}{\partial y \partial y \partial z} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial z \partial y} \frac{\partial^3 E_x}{\partial z \partial y \partial z} \\
& + \frac{\partial^2 E_x}{\partial z \partial z} \frac{\partial^3 E_x}{\partial x \partial z \partial z} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial z \partial z} \frac{\partial^3 E_x}{\partial y \partial z \partial z} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial z \partial z} \frac{\partial^3 E_x}{\partial z \partial z \partial z} \Bigg)
\end{aligned}$$

y-Komponente:

$$\begin{aligned}\langle F^{(3)}_{\mathrm{DEP},y}\rangle = \frac{2}{15}\pi\varepsilon_{\mathrm{m}}R^7\mathrm{Re}\left[f^{(3)}_{\mathrm{CM}}\right] \Bigg(&\frac{\partial^2 E_x}{\partial x\partial x}\frac{\partial^3 E_y}{\partial x\partial x\partial x} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial x\partial x}\frac{\partial^3 E_y}{\partial y\partial x\partial x} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial x\partial x}\frac{\partial^3 E_y}{\partial z\partial x\partial x}\\ &+ \frac{\partial^2 E_x}{\partial x\partial y}\frac{\partial^3 E_y}{\partial x\partial y\partial x} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial x\partial y}\frac{\partial^3 E_y}{\partial y\partial y\partial x} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial x\partial y}\frac{\partial^3 E_y}{\partial z\partial y\partial x}\\ &+ \frac{\partial^2 E_x}{\partial x\partial z}\frac{\partial^3 E_y}{\partial x\partial z\partial x} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial x\partial z}\frac{\partial^3 E_y}{\partial y\partial z\partial x} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial x\partial z}\frac{\partial^3 E_y}{\partial z\partial z\partial x}\\ &+ \frac{\partial^2 E_x}{\partial y\partial x}\frac{\partial^3 E_y}{\partial x\partial x\partial y} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial y\partial x}\frac{\partial^3 E_y}{\partial y\partial x\partial y} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial y\partial x}\frac{\partial^3 E_y}{\partial z\partial x\partial y}\\ &+ \frac{\partial^2 E_x}{\partial y\partial y}\frac{\partial^3 E_y}{\partial x\partial y\partial y} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial y\partial y}\frac{\partial^3 E_y}{\partial y\partial y\partial y} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial y\partial y}\frac{\partial^3 E_y}{\partial z\partial y\partial y}\\ &+ \frac{\partial^2 E_x}{\partial y\partial z}\frac{\partial^3 E_y}{\partial x\partial z\partial y} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial y\partial z}\frac{\partial^3 E_y}{\partial y\partial z\partial y} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial y\partial z}\frac{\partial^3 E_y}{\partial z\partial z\partial y}\\ &+ \frac{\partial^2 E_x}{\partial z\partial x}\frac{\partial^3 E_y}{\partial x\partial x\partial z} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial z\partial x}\frac{\partial^3 E_y}{\partial y\partial x\partial z} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial z\partial x}\frac{\partial^3 E_y}{\partial z\partial x\partial z}\\ &+ \frac{\partial^2 E_x}{\partial z\partial y}\frac{\partial^3 E_y}{\partial x\partial y\partial z} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial z\partial y}\frac{\partial^3 E_y}{\partial y\partial y\partial z} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial z\partial y}\frac{\partial^3 E_y}{\partial z\partial y\partial z}\\ &+ \frac{\partial^2 E_x}{\partial z\partial z}\frac{\partial^3 E_y}{\partial x\partial z\partial z} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial z\partial z}\frac{\partial^3 E_y}{\partial y\partial z\partial z} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial z\partial z}\frac{\partial^3 E_y}{\partial z\partial z\partial z}\Bigg)\end{aligned}$$

z-Komponente:

$$\begin{aligned}\langle F^{(3)}_{\mathrm{DEP},z}\rangle = \frac{2}{15}\pi\varepsilon_{\mathrm{m}}R^7\,\mathrm{Re}\left[\underline{f}^{(3)}_{\mathrm{CM}}\right]\;\Bigg(&\frac{\partial^2 E_x}{\partial x\partial x}\frac{\partial^3 E_z}{\partial x\partial x\partial x}+\frac{\partial^2 E_y}{\partial x\partial x}\frac{\partial^3 E_z}{\partial y\partial x\partial x}+\frac{\partial^2 E_z}{\partial x\partial x}\frac{\partial^3 E_z}{\partial z\partial x\partial x}\\&+\frac{\partial^2 E_x}{\partial x\partial y}\frac{\partial^3 E_z}{\partial x\partial y\partial x}+\frac{\partial^2 E_y}{\partial x\partial y}\frac{\partial^3 E_z}{\partial y\partial y\partial x}+\frac{\partial^2 E_z}{\partial x\partial y}\frac{\partial^3 E_z}{\partial z\partial y\partial x}\\&+\frac{\partial^2 E_x}{\partial x\partial z}\frac{\partial^3 E_z}{\partial x\partial z\partial x}+\frac{\partial^2 E_y}{\partial x\partial z}\frac{\partial^3 E_z}{\partial y\partial z\partial x}+\frac{\partial^2 E_z}{\partial x\partial z}\frac{\partial^3 E_z}{\partial z\partial z\partial x}\\&+\frac{\partial^2 E_x}{\partial y\partial x}\frac{\partial^3 E_z}{\partial x\partial x\partial y}+\frac{\partial^2 E_y}{\partial y\partial x}\frac{\partial^3 E_z}{\partial y\partial x\partial y}+\frac{\partial^2 E_z}{\partial y\partial x}\frac{\partial^3 E_z}{\partial z\partial x\partial y}\\&+\frac{\partial^2 E_x}{\partial y\partial y}\frac{\partial^3 E_z}{\partial x\partial y\partial y}+\frac{\partial^2 E_y}{\partial y\partial y}\frac{\partial^3 E_z}{\partial y\partial y\partial y}+\frac{\partial^2 E_z}{\partial y\partial y}\frac{\partial^3 E_z}{\partial z\partial y\partial y}\\&+\frac{\partial^2 E_x}{\partial y\partial z}\frac{\partial^3 E_z}{\partial x\partial z\partial y}+\frac{\partial^2 E_y}{\partial y\partial z}\frac{\partial^3 E_z}{\partial y\partial z\partial y}+\frac{\partial^2 E_z}{\partial y\partial z}\frac{\partial^3 E_z}{\partial z\partial z\partial y}\\&+\frac{\partial^2 E_x}{\partial z\partial x}\frac{\partial^3 E_z}{\partial x\partial x\partial z}+\frac{\partial^2 E_y}{\partial z\partial x}\frac{\partial^3 E_z}{\partial y\partial x\partial z}+\frac{\partial^2 E_z}{\partial z\partial x}\frac{\partial^3 E_z}{\partial z\partial x\partial z}\\&+\frac{\partial^2 E_x}{\partial z\partial y}\frac{\partial^3 E_z}{\partial x\partial y\partial z}+\frac{\partial^2 E_y}{\partial z\partial y}\frac{\partial^3 E_z}{\partial y\partial y\partial z}+\frac{\partial^2 E_z}{\partial z\partial y}\frac{\partial^3 E_z}{\partial z\partial y\partial z}\\&+\frac{\partial^2 E_x}{\partial z\partial z}\frac{\partial^3 E_z}{\partial x\partial z\partial z}+\frac{\partial^2 E_y}{\partial z\partial z}\frac{\partial^3 E_z}{\partial y\partial z\partial z}+\frac{\partial^2 E_z}{\partial z\partial z}\frac{\partial^3 E_z}{\partial z\partial z\partial z}\Bigg)\end{aligned}$$

- Zeitgemittelter multipolarer DEP-Drehmomentvektor der Ordnung n für eine homogene verlustbehaftete Kugel und allgemeine komplexwertige elektrische Wechselfelder [112] (Gl. (24b)):

$$\langle \overline{T}_{\mathrm{DEP}}^{(n)} \rangle = \mathrm{Re}\left[\frac{1}{(n-1)!} \left(\overline{\underline{\underline{p}}}^{\,(n)} \, [\cdot]^{n-1} (\nabla)^{n-1} \right) \times \overline{\underline{E}}^{*} \right] \tag{A.10}$$

- Komplexe Permittivität n-ter Ordnung eines homogenen verlustbehafteten Partikels als Ersatz für eine behüllte Kugel nach dem Ein-Schalen-Modell [115] (Gl. (2.51) & (C.19)):

$$\underline{\varepsilon}_{\mathrm{p}}^{\prime(n)} = \underline{\varepsilon}_{\mathrm{mem}} \left(\frac{\left(\frac{R}{R-\delta_{\mathrm{mem}}} \right)^{2n+1} + (n+1) \frac{\underline{\varepsilon}_{\mathrm{cyt}} - \underline{\varepsilon}_{\mathrm{mem}}}{n\underline{\varepsilon}_{\mathrm{cyt}} + (n+1)\underline{\varepsilon}_{\mathrm{mem}}}}{\left(\frac{R}{R-\delta_{\mathrm{mem}}} \right)^{2n+1} - n \frac{\underline{\varepsilon}_{\mathrm{cyt}} - \underline{\varepsilon}_{\mathrm{mem}}}{n\underline{\varepsilon}_{\mathrm{cyt}} + (n+1)\underline{\varepsilon}_{\mathrm{mem}}}} \right) \tag{A.11}$$

B

ERGÄNZUNGEN ZUM MATERIALVERZEICHNIS

Chemikalien

Tabelle B.1: Verzeichnis der in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien (Farbstoffe, Kits & Sonstige).

CHEMIKALIE	HANDELSNAME / DETAILS	HERSTELLER / LIEFERANT
FARBSTOFFE		
Antikörper, EpCAM, FITC-markiert	CD326 (EpCAM)-FITC, human, Clone HEA125, $\lambda_{ex} = 494$ nm & $\lambda_{em} = 518$ nm [216] (REF: 130-113-263 [217])	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Isotyp-Kontrolle, FITC-markiert	REA Control Antibody (S), human, Clone REA293, $\lambda_{ex} = 494$ nm & $\lambda_{em} = 518$ nm [216] (REF: 130-113-437 [218])	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG (Bergisch Gladbach, Deutschland)
CFSE	Invitrogen™ CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, $\lambda_{ex} = 492$ nm & $\lambda_{em} = 517$ nm [216] (REF: C34554 [219])	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)
Fluorescein-Natrium-Salz	$\lambda_{ex} = 460$ nm & $\lambda_{em} = 515$ nm [220] (REF: F6377-100G [220])	Sigma-Aldrich Produktions GmbH (Steinheim am Albuch, Deutschland)
Hoechst 33342	Invitrogen™ Hoechst 33342, 10 mg/ml (16,2 mM) Lösung in Wasser, $\lambda_{ex} = 350$ nm & $\lambda_{em} = 461$ nm (gebunden) [216] (REF: H3570 [221])	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung von Tabelle B.1

CHEMIKALIE	HANDELSNAME / DETAILS	HERSTELLER / LIEFERANT
Propidiumiodid (PI)	Propidiumiodid-Lösung 1 mg/ml Lösung in Wasser, $\lambda_{ex} = 530$ nm & $\lambda_{em} = 625$ nm (gebunden) [216] (REF: P4864-10ML [222])	Sigma-Aldrich Produktions GmbH (Steinheim am Albuch, Deutschland)
Trypanblau	Trypan Blue Stain, 0,4 % (REF: 15250-061)	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)
KITS		
Kalibrier-standards, elektrische Leitfähigkeit	InLab® Solutions Conductivity Standard, 5-Punkt-Kalibrierung: $\sigma_m = 10$ µS/cm, 84 µS/cm, 500 µS/cm & 1.413 µS/cm sowie 12,88 mS/cm	Mettler-Toledo AG (Schwerzenbach, Schweiz)
Kalibrier-standards, pH-Wert	InLab® Solutions pH All-in-One Kit 1, 3-Punkt-Kalibrierung: pH = 4,01, 7,00 & 9,21 (REF: 30095314)	Mettler Toledo AG (Schwerzenbach, Schweiz)
SONSTIGE		
2-Komponenten-Kleber	UHU® Plus Schnellfest	UHU GmbH & Co. KG (Bühl, Deutschland)
Aceton	VLSI-Grad	TECHNIC France (Saint Denis, Frankreich)
Ammonium-chlorid (NH_4Cl)	$\geq 99,5$ % (REF: A9434-500G)	Sigma-Aldrich Produktions GmbH (Steinheim am Albuch, Deutschland)
BSA	Albumin aus Rinderserum, ≥ 96 % (REF: A4503-50G)	Sigma-Aldrich Produktions GmbH (Steinheim am Albuch, Deutschland)
Deionisiertes Wasser	$\sigma_m < 1$ µS/cm	Firmeneigene Wasserversorgung
Dextrose	D(+)-Glucose, AnalaR NORMAPUR® (REF: 101174Y)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung von Tabelle B.1

CHEMIKALIE	HANDELSNAME / DETAILS	HERSTELLER / LIEFERANT
Dinatrium-hydrogen-phosphat-Dihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)	$\geq$ 99 % (REF: 71643-250G)	Sigma-Aldrich Produktions GmbH (Steinheim am Albuch, Deutschland)
DMEM (1 x)	Gibco® DMEM und GlutaMAX™-I (REF: 31966-021)	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)
DMSO (1 x)	Dimethylsulfoxid für die Zellkultur (REF: A36720100)	Illinois Tool Works, Inc. (Glenview, USA)
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure, $\geq$ 99 % (REF: EDS-100G)	Sigma-Aldrich Produktions GmbH (Steinheim am Albuch, Deutschland)
Entwickler	AZ® 726 MIF	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Ethanol absolut EMPLURA®, $\geq$ 99,5 % (REF: 8.18760.2500)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
FBS (1 x)	Gibco® Heat Inactivated FBS (REF: 16140-071)	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)
FC-40	3M™ Fluorinert™ FC-40, > 99 % (REF: FL-0005-HP-1000)	IoLiTec-Ionic Liquids Technologies GmbH (Heilbronn, Deutschland)
Flächen-desinfektions-mittel	Bacillol® AF	BODE Chemie GmbH (Hamburg, Germany)
Fotolack	AZ® ECI 3027	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Glutaraldehyd	25 % Lösung in Wasser, $\geq$ 99 % (REF: 8.20603.1000)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Isopropanol	VLSI-Grad	TECHNIC France (Saint Denis, Frankreich)
Kalilauge (KOH)	1 mol/l (1 N), Titripur® (REF: 1.09108)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Kalium-dihydrogen-phosphat (KH_2PO_4)	$\geq$ 98 % (REF: P9791-500G)	Sigma-Aldrich Produktions GmbH (Steinheim am Albuch, Deutschland)

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung von Tabelle B.1

CHEMIKALIE	HANDELSNAME / DETAILS	HERSTELLER / LIEFERANT
Kalium-hydrogen-carbonat ($KHCO_3$)	REF: 141480.1211	Illinois Tool Works, Inc. (Glenview, USA)
Natriumchlorid (NaCl)	$\geq$ 99,5 % (REF: 71376-1KG)	Sigma-Aldrich Produktions GmbH (Steinheim am Albuch, Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	Pellet-Form, $\geq$ 98 % (REF: S8045-1KG)	Sigma-Aldrich Produktions GmbH (Steinheim am Albuch, Deutschland)
Octoxinol 9	Triton® X-100, $\geq$ 98 % (REF: 437002A)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
PBS (1 x)	Gibco® PBS, pH 7.2, w/o Ca^{2+}, w/o Mg^{2+}, w/o Phenolrot (REF: 20012-019)	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)
PEG 2000	Polyethylenglykol 2000 (REF: S4797-250G-F)	Sigma-Aldrich Produktions GmbH (Steinheim am Albuch, Deutschland)
Penicillin/ Streptomycin (100 x)	REF: K952	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Petrolether	40 – 60 °C (REF: V800295)	Sigma-Aldrich Produktions GmbH (Steinheim am Albuch, Deutschland)
Polysorbat 20	Tween® 20 (REF: 142312.1611)	Illinois Tool Works, Inc. (Glenview, USA)
Saccharose	D(+)-Saccharose, $\geq$ 99,5 % (REF: 4621.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure (HCl)	1 mol/l - 1 N Lösung (REF: 01041.3000)	Bernd Kraft GmbH (Duisburg, Deutschland)
Trypsin-EDTA-Lösung (1 x)	0,25 % (w/v) Trypsin und 0,02 % (w/v) EDTA in PBS, w/o Ca^{2+}, w/o Mg^{2+} (REF: L 2163)	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
UV-Kleber	OM625	DELO GmbH & Co. KGaA (Windach, Deutschland)

Einweg- und Verbrauchsmaterial

Tabelle B.2: Verzeichnis des in dieser Arbeit eingesetzten Einweg- und Verbrauchsmaterials.

MATERIAL	HANDELSNAME / DETAILS	HERSTELLER / LIEFERANT
6-Well-Platten, Kunststoffboden	–	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)
96-Well-Platten, Glasboden	96 Well SensoPlate™, PS, Glass Bottom (REF: 655 892)	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)
96-Well-Platten, Kunststoffboden	CELLSTAR® 96 Well Cell Culture Plate, F-Bottom (REF: 655 160)	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)
Blutentnahme-röhrchen, EDTA	EDTA S-Monovette® (9 ml), mit Multifly®-Kanüle	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Deckgläser	18 mm x 18 mm	PARAM GmbH (Hamburg, Deutschland)
Dispenser-Tips	Combitips® advanced (10 ml & 50 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Doppelseitiges Klebeband, dick	VHB GPH-060GF (600 µm)	3M (St. Paul, USA)
Doppelseitiges Klebeband, dünn	468MP 200MP (130 µm)	3M (St. Paul, USA)
Dosiernadeln	Precision Tips (rot, 0,25 mm) mit 3 cc Dosierkartuschen	Nordson Deutschland GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
Einwegspritzen	SOFT-JECT® (10 ml & 50 ml)	Henke-Sass, Wolf GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Einweg-Spritzen-vorsatzfilter	PALL® Acrodisc® 32 mm Filter mit 0,2 µm Supor®-Membran	Pall Corporation (New York, USA)
Einweghandschuhe	Nitril	Adolf Würth GmbH & Co. KG (Künzelsau-Gaisbach, Germany)
Entsorgungsbeutel	Polypropylen	BRAND GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)
Filterspitzen	BRAND™ Filterspitzen (10 µl, 20 µL, 200 µl & 1.000 µl)	BRAND GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung von Tabelle B.2

MATERIAL	HANDELSNAME / DETAILS	HERSTELLER / LIEFERANT
Kryo-Röhrchen	VWR Low Temperature Freezer Vials, mit Stehrand (1,2 ml)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Küvetten	UVette®	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Mikroreaktions-gefäße	Eppendorf DNA LoBind Tubes® (1,5 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Objektträger, Glas	Natron-Kalk-Glas (1 mm x 26 mm x 76 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Objektträger, Polycarbonat	1,5 mm x 26 mm x 76 mm	Firmeneigene Spritzgussfertigung
PCR-Folien	MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)
Polycarbonat-Folie	Makrofol® DE 1-1CG (250 µm)	Covestro AG (Leverkusen, Deutchland)
PTFE-Schlauch	ID x AD = 0,5 mm x 1/16"	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Reinraum-Tupfer	Texwipe® Alpha® Polyester Knit Cleanroom Swabs	Illinois Tool Works, Inc. (Glenview, USA)
Reinraum-Wischtücher	Kimtech® Pure W4	Kimberly-Clark Corporation (Irving, USA)
Rohrnieten	Rohrnieten DIN 7340, Messing blank (1,5 mm x 0,2 mm x 3,5 mm)	Stamo Verbindungstechnik GmbH (Wuppertal , Deutschland)
Serologische Pipetten	ROTILABO® (5 ml, 10 ml & 25 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Silikonschlauch	ID x AD = 1 mm x 3 mm	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Wafer	150 mm Silizium (675 µm), einseitig poliert, natürliches Oxid	MEMC Electronic Materials Sdn Bhd (Petaling Jaya, Malaysia)
Zellkulturflaschen	CELLSTAR®, roter Schraubeckel (75 cm², 250 ml)	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung von Tabelle B.2

MATERIAL	HANDELSNAME / DETAILS	HERSTELLER / LIEFERANT
Zell-Zählslides	LUNA™	Logos Biosystems (Anyang, Südkorea)
Zentrifugen-röhrchen	Falcon® Tubes (15 ml)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Equipment

Tabelle B.3: Verzeichnis des in dieser Arbeit eingesetzten Equipments (Geräte, Anlagen & Sonstige).

EQUIPMENT	AUSFÜHRUNG / DETAILS	HERSTELLER / LIEFERANT
GERÄTE		
Analysewaage	AS Sartorius Competence CPA124S	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Aufrechtes Fluoreszenz-mikroskop	Modell: BX61, Kamera: XC50 (2.588 x 1.960) mit 0,5 x Kameraadapter, Mikroskopie-Software: Stream Motion 2.3.3, Farb-Filter ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$): FITC (475 nm/530 nm), Cy3 (545 nm/605 nm) & DAPI (358 nm/420 nm)	Olympus Corporation (Tokyo, Japan)
Aufrechtes Hellfeld-mikroskop	MX50	Olympus Corporation (Tokyo, Japan)
Automatischer Zellzähler	R1-SLI	Olympus Corporation (Tokyo, Japan)
Dispenser	Nordson EFD Ultimus™ I	Nordson Deutschland GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
Hand-Multimeter	U1282A	Keysight (Santa Rosa, USA)

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung von Tabelle B.3

EQUIPMENT	AUSFÜHRUNG / DETAILS	HERSTELLER / LIEFERANT
Hotplate & Rührer	IKA™ RCTbasic, mit Magnetrührstäbchen	IKA Werke GmbH & Co. KG (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Inverses Fluoreszenz-mikroskop	Modell: IX83, Kamera: DP80 (1.360 x 1.024) mit 1 x Kameraadapter, Mikroskopie-Software: cellSens Dimension 1.16, Farb-Filter ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$): EGFP (489 nm/511 nm), DsRED (556 nm/583 nm) & DAPI (358 nm/461 nm)	Olympus Corporation (Tokyo, Japan)
Inkubator	Binder CO_2-Inkubator, APT.line™, CB-Serie	Binder GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Kühl- und Gefrier-schränke	Probenlagerung bei + 4 °C bzw. - 20 °C	Robert Bosch GmbH (Stuttgart, Deutschland)
Kryokonser-vierungstank	BR2200	Cryo Diffusion S. A. S. (Lery, Frankreich)
Laborwaage	Excellence Precision Balances XS4002S	Mettler-Toledo AG (Schwerzenbach, Schweiz)
Messgerät pH-Wert und elektrische Leitfähigkeit	SevenMulti™ S50 Dual Meter (pH/Ionen)	Mettler-Toledo AG (Schwerzenbach, Schweiz)
Mikroplatten-Reader	SpectraMax® M3	Molecular Devices, LLC (San José, USA)
Nadel-Profilometer	DektakXT	Bruker Corporation (Billerica, USA)
Optisches Profilometer	Zeta-200	KLA Corporation (Milpitas, USA)
Oszilloskop	InfiniiVision MSOX6004A	Keysight (Santa Rosa, USA)
Pipettier-helfer	Integra PIPETBOY 2 Acu Pipet Aid	INTEGRA Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Plattform-Schüttler	Heidroph Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Raster-elektronen-mikroskop	GEMINI® SUPRA™ 55VP-Atlas	Carl Zeiss AG (Jena, Deutschland)

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung von Tabelle B.3

EQUIPMENT	AUSFÜHRUNG / DETAILS	HERSTELLER / LIEFERANT
Reflow-Ofen	RO250BF	Paggen Werkzeugtechnik GmbH (Starnberg, Deutschland)
Spritzenpumpe	neMESYS NEM-B003-02 C	CETONI GmbH (Korbußen, Deutschland)
Tisch-Raster elektronen-mikroskop	TM3000 Tabletop Microscope	Hitachi Corporation (Chiyoda, Japan)
Tisch-Zentrifuge	MiniSpin® plus (1,5 ml Tubes)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Ultraschallbad	SONOREX™ Digital 10 P	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)
UV-Kammer	UVP CL-1000 Ultraviolet Crosslinker	Analytik Jena US, LLC (Upland, USA)
Viskosimeter	SVM 3000 Stabinger Viskosimeter	Anton Paar GmbH (Graz, Österreich)
Vortex-Schüttler	Lab Dancer	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Wasserbad	–	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R (15 ml Tubes)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
ANLAGEN		
Anlage Dielektrikumsätzen	SPTS Omega®, Modul Synapse™	KLA Corporation (Milpitas, USA)
Anlage DRIE	SPTS Omega® Modul Rapier	KLA Corporation (Milpitas, USA)
CO_2-Laser-graviermaschine	LaserPro Spirit GLS	GCC (New Taipei City, China)
Diffusionsofen	E1200 HT 260-4	centrotherm international AG (Blaubeuren, Deutschland)
Laserdirektschreiber	DWL 2000	Heidelberg Instruments Mikrotechnik GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Plasmastripper	GaSonics® 9104, mit Wafer-Träger	Lam Research Corporation (Fremont José, USA)

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung von Tabelle B.3

EQUIPMENT	AUSFÜHRUNG / DETAILS	HERSTELLER / LIEFERANT
Sputter-Cluster-System	CS500SI	Von Ardenne GmbH (Dresden, Deutschland)
UV-Ablationslaser	GL compact	GFH GmbH (Deggendorf, Deutschland)
SONSTIGE		
Färbetrog	Glaskasten mit Deckel (9 cm x 7 cm x 6,5 cm), Färbeeinsatz aus rostfreiem Edelstahl	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG (Sondheim vor der Rhön, Deutschland)
Kühlrack	CoolRack® M15 (1,5 ml Tubes)	Corning, Inc. (New York, USA)
Laborabzug	–	WALDNER Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG (Wangen, Deutschland)
Mehrfachdispenser	Eppendorf Multipette® plus	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Mikrospritzen	Glas (5 ml & 10 ml)	SETonic GmbH (Ilmenau, Deutschland)
Nasschemiebank	Integriert: Spin-Coater, Lack- und HMDS-Hotplate, Überlaufspüler sowie Schleudertrockner	STANGL Reinraum- und Prozeßtechnik GmbH (Eichenau, Deutschland)
Pipettensatz	Eppendorf Research® plus (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl & 1.000 µl)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Sicherheitswerkbank	Claire® pro B-2-190	BERNER International GmbH (Elmshorn, Deutschland)
(Wafer-) Pinzetten	Edelstahl und/oder Kunststoff (verschiedene Ausführungen)	Rubis Outils SA (Stabio, Schweiz)

Software[1]

Tabelle B.4: Verzeichnis der in dieser Arbeit eingesetzten Computerprogramme.

PROGRAMM	KATEGORIE	ENTWICKLER
COMSOL Multiphysics® 5.6	Finite-Elemente-Simulation	COMSOL AB (Stockholm, Schweden)
CorelDRAW Graphics Suite 2017	Grafik-Software	Corel Corporation (Ottawa, Canada)
EAGLE 7.6	Layout- und Schaltplan-Editor zur Platinenerstellung	Autodesk, Inc. (San Rafael, USA) [223]
ImageJ (Fiji) 1.53c	Bildverarbeitung und -analyse (Open-Source)	Wayne Rasband (National Institutes of Health, NIH)
Inkscape 1.1.1	Vektorgrafik-Programm (Open-Source)	Inkscape-Community
KLayout 0.20.2	Erstellung und Betrachtung von Belichtungsmasken (Open-Source)	KLayout-Community
MATLAB R2017b	Lösung und grafische Darstellung von mathematischen Problemen	The MathWorks, Inc. (Massachusetts, USA) [224]
MyDEP 1.0.1	Tool zur Analyse der DEP-Antwort von dielektrischen Partikeln (Open Source)	Jonathan Cottet, Olivier Fabregue, Charles Berger, François Buret, Philippe Renaud & Marie Frénéa-Robin [225, 226]
SOLIDWORKS 2018	3D-CAD-Programm	Dassault Systèmes SE (Vélizy-Villacoublay, Frankreich)
Spyder 4.1.4 (Anaconda) & Python 3.8.3	Integrierte Entwicklungsumgebung für Programmierung in Python (Open-Source)	Spyder-Community & Python Software Foundation [227–229]

1 Bemerkung: Alle hier aufgeführten Programme wurden unter Microsoft Windows verwendet.

C

PARAMETER ZUR FEM-SIMULATION

Simulationen zur Vollblut-Aufbereitung

Tabelle C.1: Ausgewählte Parameter zu den Simulationen aus Abschnitt 10.2.

PARAMETER	WERT	EINHEIT	REFERENZ
PARTIKEL			
R	$3 \cdot 10^{-6}$	m	Tabelle 3.1 (CTC)
ρ_p	1.060	kg m^{-3}	Tabelle 3.1 (CTC)
MEDIUM			
ρ_m	1.012	kg m^{-3}	Abbildung 10.5 (Blutlysat)
η	$1,68 \cdot 10^{-3}$	Pa s	Abbildung 10.5 (Blutlysat)

Simulationen zur Einzelzell-Isolation

Tabelle C.2: Ausgewählte Parameter zu den Simulationen aus Abschnitt 14.2.

PARAMETER	WERT	EINHEIT	REFERENZ
PARTIKEL			
R	$5 \cdot 10^{-6}$	m	[197]
ρ_p	1.050	kg m^{-3}	[196]
$\varepsilon_p/\varepsilon_0$	2,5	1	[230]
σ_p	$4 \cdot 10^{-4}$	S m^{-1}	[110, 230, 231]
MEDIUM			
ρ_m	997	kg m^{-3}	Abbildung 10.5 (DI-Wasser)
η	$0,98 \cdot 10^{-3}$	Pa s	Abbildung 10.5 (DI-Wasser)
$\varepsilon_m/\varepsilon_0$	78	1	[230]
σ_m	$1,6 \cdot 10^{-4}$	S m^{-1}	Tabelle 8.2 (DEP-Puffer 1)
ISOLATOR			
$\varepsilon/\varepsilon_0$	$3,4 \cdot \varepsilon_0$	F m^{-1}	[232]
σ	$6,7 \cdot 10^{-16}$	S m^{-1}	[232]

D

ERGÄNZUNGEN ZUR REINRAUMFABRIKATION

Prozessparameter

Tabelle D.1: Prozessparameter zur Herstellung von Si-Chips nach Abbildung 8.1.

PROZESSSCHRITT	MATERIAL	PARAMETER/BEMERKUNGEN
(1) Thermische Oxidation	Diffusionsofen	Soll: 500 nm SiO_2
(2) Fotolithographie (1/2)	• Nasschemiebank • Laserdirektschreiber	1. Belacken 2. Belichten 3. Entwickeln Soll: 2,7 µm Fotolack
(3) Oxid-Ätzen	Dielektrikumsätzer	Soll: 500 nm Ätztiefe (Endpunkterkennung)
(4) Sauerstoffplasma (1/3)	Plasmastripper	Rezept „LackEOP“
(5) Fotolithographie (2/2)	• Nasschemiebank • Laserdirektschreiber	1. Belacken 2. Belichten 3. Entwickeln Soll: 2,7 µm Fotolack
(6) DRIE (1/2)	DRIE-Anlage	Soll: $\sim$ 350 µm Ätztiefe (entspricht 250 Ätzzyklen)
(7) Sauerstoffplasma (2/3)	Plasmastripper	Rezept „LackEOP“
(8) DRIE (2/2)	DRIE-Anlage	Soll: 28 $\pm$ 2 µm Ätztiefe (entspricht 40 Ätzzyklen)

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung von Tabelle D.1

PROZESSSCHRITT	MATERIAL	PARAMETER / BEMERKUNGEN
(9) Chip-Vereinzelung	(Wafer-) Pinzetten	Händisches Brechen entlang von Brechgräben
(10a) Reinigung	Nasschemiebank	Mehrmalige Spülen in Aceton & Isopropanol
(10b) Sauerstoffplasma (3/3)	Plasmastripper	Rezept „LackEOP“
(11) PEG-Eintrocknung	PEG-Lösung	Mehrmaliges Eintauchen von Si-Chips in PEG-Lösung mit anschließendem Eintrocknen an Raumluft

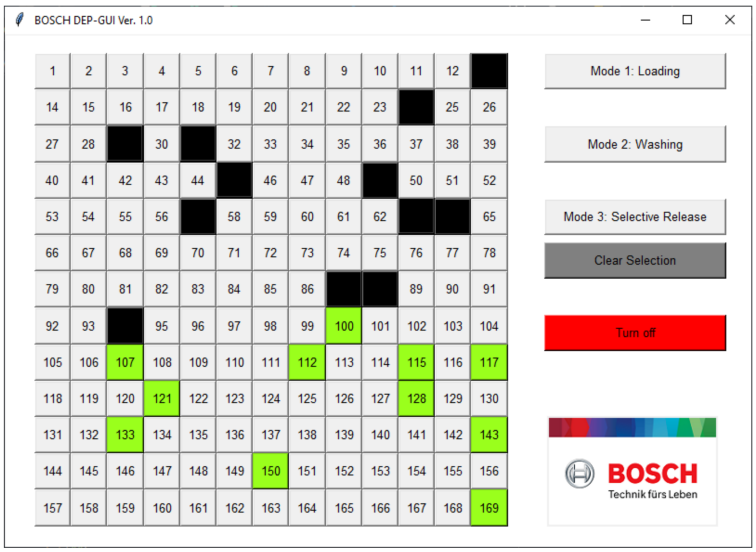
PEG-Eintrocknung

Bei der Nachbehandlung von Si-Chips musste berücksichtigt werden, dass eingetrocknetes Polyethylenglykol während der Vollblut-Aufbereitung im Prozessschritt der Zellvereinzelung wieder in Lösung übergeht. Um einen negativen Einfluss auf kernhaltige Zellen durch einen damit in Verbindung stehenden Anstieg der Osmolarität[1] innerhalb von Blutlysat auszuschließen, musste die insgesamt eingesetzte Menge an PEG limitiert werden. Unter der vereinfachenden Annahme, dass für eine Eintrocknung je Si-Chip effektiv maximal 100 µl PEG-Lösung verwendet und das darin befindliche PEG 2000 (2 mg mit $\sim$ 2.000 g/mol) zunächst vollständig in Mikrowannen eingetrocknet, im Anschluss jedoch ohne Dissoziation wieder in 100 µl Blutlysat als Sedimentationsvolumen aufgelöst wurden (Volumenänderungen und Verdünnungseffekte durch Diffusion seien vernachlässigbar), resultierte eine Nachbehandlung in einem Anstieg der Osmolarität um maximal ca. 10 mOsmol/l. Eine solche Lösung konnte, relativ zu physiologisch-isotonen Verhältnissen ($\sim$ 290 mOsmol/l), somit als lediglich leicht hyperton bewertet werden, womit negative Auswirkungen auf die Zellviabilität ausgeschlossen waren.

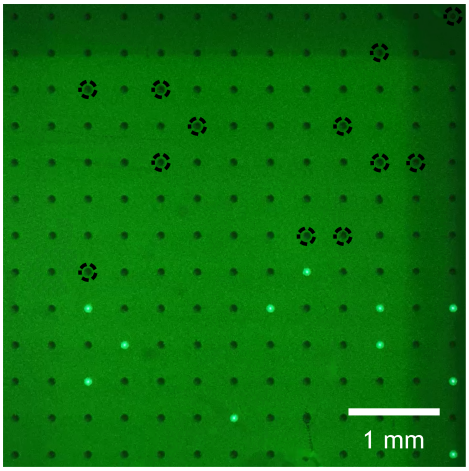
1 Bemerkung: Hierbei handelt es sich um die Anzahl der osmotisch aktiven, also in Lösung befindlichen und nicht durch die Plasmamembran einer Zelle frei permeablen, Partikel. Die Osmolarität wird in Einheiten von Osmol pro Liter bemessen (siehe auch [35] (Abschn. 8.3)).

E

GRAFISCHE BENUTZEROBERFLÄCHE



(a)



(b)

Abbildung E.1: (a) Mit dem Toolkit „Tkinter“ erstellte grafische Benutzeroberfläche zur Ansteuerung der (b) dreilagigen Elektrodenanordnung eines DEP-PCBs nach Abbildung 14.1. Im Detektionsbereich von Interesse (Ausschnitt der Größe 13 x 13) konnten via Betätigung von Buttons an einzelnen elektrifizierten Mikrowannen die Betriebsmodi (i) Beladung („Mode 1: Loading“), (ii) Medienwechsel („Mode 2: Washing“) und (iii) selektive Freigabe („Mode 3: Selective Release“) eingesetllt werden. Schwarze Kacheln deuteten dabei bereits freigegebene, grüne Kacheln noch freizugebende Elemente an, wobei zwischen zwei aufeinanderfolgenden Freigaben eine Totzeit eingestellt werden konnte.

LITERATUR

[1] Gilles R. Dagenais u. a. „Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study“. In: *The Lancet* 395.10226 (2020), S. 785–794. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32007-0.

[2] American Association for the Advancement of Science (AAAS). *The Lancet: Cancer now leading cause of death in high-income countries – while heart disease burden persists in low-income and middle-income countries*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.eurekalert.org/news-releases/864915.

[3] Statista. *Dossier Krebserkrankungen (Artikel-Nummer: did-21732-1, 2021)*. 2021. URL: https://de.statista.com/statistik/studie/id/21732/dokument/krebs-statista-dossier/.

[4] Freddie Bray, Mathieu Laversanne, Elisabete Weiderpass und Isabelle Soerjomataram. „The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide“. In: *Cancer* 127.16 (2021), S. 3029–3030. DOI: 10.1002/cncr.33587.

[5] *WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all*. World Health Organization (WHO), 2020.

[6] Daniel A. Haber und Victor E. Velculescu. „Blood-Based Analyses of Cancer: Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA“. In: *Cancer Discovery* 4.6 (2014), S. 650–661. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-1014.

[7] Marjorie Villien, Sébastien Clerc und Asma Siari. *Liquid Biopsy: From Isolation to Downstream Aplications (Report)*. Yole Développement, 2018.

[8] Florina S. Iliescu, Daniel P. Poenar, Fang Yu, Ming Ni, Kiat Hwa Chan, Irina Cima, Hayden K. Taylor, Igor Cima und Ciprian Iliescu. „Recent advances in microfluidic methods in cancer liquid biopsy“. In: *Biomicrofluidics* 13.4 (2019), S. 041503–1–041503–44. DOI: 10.1063/1.5087690.

[9] U. A. Pachmann, K. Hekimian, S. Carl, N. Ruediger, C. Rabenstein und K. Pachmann. „Comparing Sequential Steps For Detection Of Circulating Tumor Cells: More Specific Or Just Less Sensitive?“ In: *WebmedCentral CANCER* 2.2 (2011). DOI: 10.9754/journal.wmc.2011.001490.

[10] Katharina Pachmann. „Current and potential use of MAINTRAC method for cancer diagnosis and prediction of metastasis“. In: *Expert Review of Molecular Diagnostics* 15.5 (2015), S. 597–605. DOI: 10.1586/14737159.2015.1032260.

[11] Simfo GmbH. *maintrac® Untersuchungsauftrag Übersicht*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.maintrac.de/Service/untersuchungsauftrag/.

[12] Simfo GmbH. *maintrac® Untersuchungsauftrag Formular*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.maintrac.de/media/download/UA/maintrac_Untersuchungsauftrag_DE_oP_2023-09.pdf.

[13] Lukas Valihrach, Peter Androvic und Mikael Kubista. „Platforms for Single-Cell Collection and Analysis“. In: *International Journal of Molecular Sciences* 19.3 (2018). DOI: 10.3390/ijms19030807.

[14] Mariano Di Trapani, Nicolò Manaresi und Gianni Medoro. „DEPArray™ System: An Automatic Image-Based Sorter for Isolation of Pure Circulating Tumor Cells“. In: *Cytometry Part A* 93.12 (2018), S. 1260–1266. DOI: 10.1002/cyto.a.23687.

[15] N. Manaresi, A. Romani, G. Medoro, L. Altomare, A. Leonardi, M. Tartagni und R. Guerrieri. „A CMOS chip for individual cell manipulation and detection“. In: *IEEE Journal of Solid-State Circuits* 38.12 (2003), S. 2297–2305. DOI: 10.1109/JSSC.2003.819171.

[16] Klaus Pantel und Catherine Alix-Panabières. „Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure“. In: *Nature Reviews Clinical Oncology* 16 (2019), S. 409–424. DOI: 10.1038/s41571-019-0187-3.

[17] Laura Keller und Klaus Pantel. „Unravelling tumour heterogeneity by single-cell profiling of circulating tumour cells“. In: *Nature Reviews Cancer* 19.10 (2019), S. 553–567. DOI: 10.1038/s41568-019-0180-2.

[18] Zeina Habli, Walid AlChamaa, Raya Saab, Humam Kadara und Massoud L. Khraiche. „Circulating Tumor Cell Detection Technologies and Clinical Utility: Challenges and Opportunities“. In: *Cancers* 12.7 (2020). DOI: 10.3390/cancers12071930.

[19] Katharina Pachmann, Joachim H. Clement, Claus-Peter Schneider, Babette Willen, Oumar Camara, Ulrich Pachmann und Klaus Höffken. „Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer“. In: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 43.6 (2005), S. 617–627. DOI: 10.1515/CCLM.2005.107.

[20] Karl R. Aigner und Frederick O. Stephens. *Onkologie Basiswissen*. Springer, 2015. ISBN: 9783662485842. DOI: 10.1007/978-3-662-48585-9.

[21] Robert A. Weinberg. *The Biology of Cancer*. Taylor & Francis, 2013. ISBN: 9780429258794. DOI: 10.1201/9780429258794.

[22] Samir Kadić. „Entwicklung und Umsetzung eines Konzepts für die dielektrophoretische Isolation von Tumormaterial in einem Lab-on-a-Chip-System“. Magisterarb. Universität Ulm, 2018.

[23] Catharina Melzer, Juliane von der Ohe, Hendrik Lehnert, Hendrik Ungefroren und Ralf Hass. „Cancer stem cell niche models and contribution by mesenchymal stroma/stem cells“. In: *Molecular Cancer* 16.28 (2017). DOI: 10.1186/s12943-017-0595-x.

[24] Florina S. Iliescu, Wen Jing Sim, Hossein Heidari, Daniel P. Poenar, Jianmin Miao, Hayden K. Taylor und Ciprian Iliescu. „Highlighting the uniqueness in dielectrophoretic enrichment of circulating tumor cells“. In: *Electrophoresis* 40.10 (2019), S. 1457–1477. DOI: 10.1002/elps.201800446.

[25] Danfeng Lin u. a. „Circulating tumor cells: biology and clinical significance“. In: *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6.404 (2021). DOI: 10.1038/s41392-021-00817-8.

[26] Hyungseok Cho, Jinho Kim, Hanjung Song, Keun Yong Sohn, MinHyon Jeon und Ki-Ho Han. „Microfluidic technologies for circulating tumor cell isolation“. In: *The Analyst* 143.13 (2018), S. 2936–2970. DOI: 10.1039/C7AN01979C.

[27] Ellen Heitzer, Imran S. Haque, Charles E. S. Roberts und Michael R. Speicher. „Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology“. In: *Nature Reviews Genetics* 20 (2019), S. 71–88. DOI: 10.1038/s41576-018-0071-5.

[28] Abel Jacobus Bronkhorst, Vida Ungerer und Stefan Holdenrieder. „The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management“. In: *Biomolecular Detection and Quantification* 17 (2019). DOI: 10.1016/j.bdq.2019.100087.

[29] Ping Hu, Wenhua Zhang, Hongbo Xin und Glenn Deng. „Single Cell Isolation and Analysis“. In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4 (2016). DOI: 10.3389/fcell.2016.00116.

[30] Monika Pizon, Dorothea Schott, Ulrich Pachmann und Katharina Pachmann. „The number of tumorspheres cultured from peripheral blood is a predictor for presence of metastasis in patients with breast cancer“. In: *Oncotarget* 7.30 (2016), S. 48143–48154. DOI: 10.18632/oncotarget.10174.

[31] Nadine Rüdiger, Ernst-Ludwig Stein, Erika Schill, Gabriele Spitz, Carola Rabenstein, Martina Stauch, Matthias Rengsberger, Ingo B. Runnebaum, Ulrich Pachmann und Katharina Pachmann. „Chemosensitivity Testing of Circulating Epithelial Tumor Cells (CETC) in Vitro: Correlation to in Vivo Sensitivity and Clinical Outcome“. In: *Journal of Cancer Therapy* 4 (2013), S. 597–605. DOI: 10.4236/jct.2013.42077.

[32] Katharina Pachmann, Dorothea Zimon, Monika Pizon und Ulrich A. Pachmann. „Comparison of chemosensitivity testing of CETCs and spheroids in cancer patients with solid tumors.“ In: *Journal of Clinical Oncology* 32.15 (2014), S. 2598–2598. DOI: 10.1200/jco.2014.32.15_suppl.2598.

[33] Monika Pizon, Dorothea Schott, Ulrich Pachmann, Rainer Schobert, Marek Pizon, Marta Wozniak, Rafal Bobinski und Katharina Pachmann. „Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assays as a Model of Patient-Derived Xenografts from Circulating Cancer Stem Cells (cCSCs) in Breast Cancer Patients“. In: *Cancers* 14.6 (2022), S. 1476. DOI: 10.3390/cancers14061476.

[34] Markus Linnemann, Michael Kühl, Sinan Güler und Thorsten Holletz. *Biochemie für Mediziner: ein Lern- und Arbeitsbuch mit klinischem Bezug; mit 186 Tabellen*. Springer, 2005. ISBN: 9783540211761. DOI: 10.1007/3-540-34989-8.

[35] Ronald Pethig. *Dielectrophoresis: Theory, Methodology and Biological Applications*. John Wiley & Sons, Ltd, 2017. ISBN: 9781118671443. DOI: 10.1002/9781118671443.

[36] Sabine Schmitz und Christine Desel. *Der Experimentator: Zellbiologie*. Springer Spektrum, 2018. ISBN: 9783662561102. DOI: 10.1007/978-3-662-56111-9.

[37] Richard Skalak und Shu Chien. *Handbook of Bioengineering*. McGraw Hill, 1987. ISBN: 97800705778831.

[38] Bernadette F. Rodak und Jacqueline H. Carr. *Clinical Hematology Atlas*. Saunders, 2016. ISBN: 9780323322492.

[39] Ion Udroiu. *Estimation of erythrocyte surface area in mammals*. Cornell University, 2014. URL: https://arxiv.org/abs/1403.7660.

[40] Alvin Zipursky, Eric Bow, Rama S. Seshadri und Elizabeth J. Brown. „Leukocyte Density and Volume in Normal Subjects and in Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia“. In: *Blood* 48.3 (1976), S. 361–371. DOI: 10.1182/blood.V48.3.361.361.

[41] G. P. Downey, D. E. Doherty, B. Schwab 3rd, E. L. Elson, P. M. Henson und G. S. Worthen. „Retention of leukocytes in capillaries: Role of cell size and deformability“. In: *Journal of Applied Physiology* 69.5 (1990), S. 1767–1778. DOI: 10.1152/jappl.1990.69.5.1767.

[42] S.-Y. Wang, K. L. Mak, L. Y. Chen, M. P. Chou und C. K. Ho. „Heterogeneity of human blood monocyte: two subpopulations with different sizes, phenotypes and functions“. In: *Immunology* 77.2 (1992), S. 298–303.

[43] Geert W. Schmid-Schönbein, Yuan Y. Shih und Shu Chien. „Morphometry of Human Leukocytes“. In: *Blood* 56.5 (1980), S. 866–875. DOI: 10.1182/blood.V56.5.866.866.

[44] Gennady I. Ruban, Svetlana M. Kosmacheva, Natalia V. Goncharova, Dirk van Bockstaele und Valery A. Loiko. „Investigation of morphometric parameters for granulocytes and lymphocytes as applied to a solution of direct and inverse light-scattering problems“. In: *Journal of Biomedical Optics* 12.4 (2007). DOI: 10.1117/1.2753466.

[45] Nazila Norouzi, Heran. C. Bhakta und William H. Grover. „Sorting cells by their density“. In: *PLoS ONE* 12.7 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0180520.

[46] Yi Dong, Alison M. Skelley, Keith D. Merdek, Kam M. Sprott, Chunsheng Jiang, William E. Pierceall, Jessie Lin, Michael Stocum, Walter P. Carney und Denis A. Smirnov. „Microfluidics and Circulating Tumor Cells“. In: *The Journal of Molecular Diagnostics* 15.2 (2013), S. 149–157. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2012.09.004.

[47] Eric Ponder. *Hemolysis and related phenomena*. Grune & Stratton, 1971. ISBN: 978-0-8089-0672-8.

[48] André van Agthoven und David Jarrossay. „Neue Reagenzien und Methoden zur Lyse von Erythrozyten“. Pat. EP0955543B1. Immunotech S. A. 4. Mai 1999. URL: https://patents.google.com/patent/EP0955543B1/de.

[49] Emma E. van der Toom, James E. Verdone, Michael A. Gorin und Kenneth J. Pienta. „Technical challenges in the isolation and analysis of circulating tumor cells“. In: *Oncotarget* 7.38 (2016), S. 62754–62766. DOI: 10.18632/oncotarget.11191.

[50] Lecia V. Sequist, Sunitha Nagrath, Mehmet Toner, Daniel A. Haber und Thomas J. Lynch. „The CTC-Chip: An Exciting New Tool to Detect Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients“. In: *Journal of Thoracic Oncology* 4.3 (2009), S. 281–283. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181989565.

[51] Tobias M. Gorges u. a. „Enumeration and Molecular Characterization of Tumor Cells in Lung Cancer Patients Using a Novel In Vivo Device for Capturing Circulating Tumor Cells“. In: *Clinical Cancer Research* 22.9 (2016), S. 2197–2206. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1416.

[52] Fabio Fachin u. a. „Monolithic Chip for High-throughput Blood Cell Depletion to Sort Rare Circulating Tumor Cells“. In: *Scientific Reports* 7.1 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-11119-x.

[53] Giovanna Vona u. a. „Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells“. In: *The American Journal of Pathology* 156.1 (2000), S. 57–63. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64706-2.

[54] Lei Xu, Xueying Mao, Ahmet Imrali, Ferrial Syed, Katherine Mutsvangwa, Daniel Berney, Paul Cathcart, John Hines, Jonathan Shamash und Yong-Jie Lu. „Optimization and Evaluation of a Novel Size Based Circulating Tumor Cell Isolation System“. In: *PLOS ONE* 10.9 (2015), e0138032. DOI: 10.1371/journal.pone.0138032.

[55] Shannon L. Werner, Ryon P. Graf, Mark Landers, David T. Valenta, Matthew Schroeder, Stephanie B. Greene, Natalee Bales, Ryan Dittamore und Dena Marrinucci. „Analytical Validation and Capabilities of the Epic CTC Platform: Enrichment-Free Circulating Tumour Cell Detection and Characterization“. In: *Journal of Circulating Biomarkers* 4 (2015), S. 3. DOI: 10.5772/60725.

[56] Eric P. Kaldjian u. a. „The RareCyte© platform for next-generation analysis of circulating tumor cells: RareCyte platform CTC analysis“. In: *Cytometry Part A* 93.12 (2018), S. 1220–1225. DOI: 10.1002/cyto.a.23619.

[57] Liwen Yang u. a. „Implementing microwell slides for detection and isolation of single circulating tumor cells from complex cell suspensions“. In: *Cytometry Part A* 101.12 (2022), S. 1057–1067. DOI: 10.1002/cyto.a.24660.

[58] Abraham P. Lee, Michelle A. Digman, Dohyun Lee, Xuan Li, Ning Ma und Yue Yun. „Microfluidic label-free isolation and identification of cells using fluorescence lifetime imaging (flim)“. Pat. US20200238288A1. Pioneer Hi Bred International Inc. University of California. 13. Apr. 2020. URL: https://patents.google.com/patent/US20200238288A1/en?oq=US2020238288.

[59] Virginia VanDelinder und Alex Groisman. „Perfusion in Microfluidic Cross-Flow: Separation of White Blood Cells from Whole Blood and Exchange of Medium in a Continuous Flow“. In: *Analytical Chemistry* 79.5 (2007), S. 2023–2030. DOI: 10.1021/ac061659b.

[60] Sangjo Shim, Katherine Stemke-Hale, Jamileh Noshari, F. Frederick Becker und Peter R. C. Gascoyne. „Dielectrophoresis has broad applicability to marker-free isolation of tumor cells from blood by microfluidic systems“. In: *Biomicrofluidics* 7.1 (2013), S. 011808–1–011808–12. DOI: 10.1063/1.4774307.

[61] Z. Hugh Fan. *Circulating Tumor Cells: Isolation and Analysis*. John Wiley & Sons, 2016. ISBN: 9781119244530.

[62] Peter R. C. Gascoyne und Sangjo Shim. „Isolation of Circulating Tumor Cells by Dielectrophoresis“. In: *Cancers* 6.1 (2014), S. 545–579. DOI: 10.3390/cancers6010545.

[63] Sheng Yan, Jun Zhang, Dan Yuan und Weihua Li. „Hybrid microfluidics combined with active and passive approaches for continuous cell separation“. In: *ELECTROPHORESIS* 38.2 (2017), S. 238–249. DOI: 10.1002/elps.201600386.

[64] W. Jeffrey Allard, Jeri Matera, M. Craig Miller, Madeline Repollet, Mark C. Connelly, Chandra Rao, Arjan G. J. Tibbe, Jonathan W. Uhr und Leon W. M. M. Terstappen. „Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases“. In: *Clinical Cancer Research* 10.20 (2004), S. 6897–6904. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0378.

[65] Sabine Riethdorf, Linda O'Flaherty, Claudia Hille und Klaus Pantel. „Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients“. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 125 (2018), S. 102–121. DOI: 10.1016/j.addr.2018.01.011.

[66] J. F. Swennenhuis, G. van Dalum, L. L. Zeune und L. W. M. M. Terstappen. „Improving the CellSearch® system“. In: *Expert Review of Molecular Diagnostics* 16.12 (2016), S. 1291–1305. DOI: 10.1080/14737159.2016.1255144.

[67] Menarini Silicon Biosystems S.p.A. *CellSearch® Circulating Endothelial Cell Kit – Instructions For Use*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://documents.cellsearchctc.com/pdf/e631600001/e631600001_EN_CN.pdf.

[68] Menarini Silicon Biosystems S.p.A. *CellSearch® – Broschüre*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.cellsearchctc.com/sites/default/files/docs/cellsearch-brochure.pdf.

[69] Eppendorf SE. *Centrifuge 5910Ri – Bedienungsanleitung*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.eppendorf.com/product-media/doc/de/987972/Centrifugation_Operating-manual_Centrifuge-5910-Ri.pdf.

[70] Katya Hekimian, Ernst-Ludwig Stein, Ulrich Pachmann und Katharina Pachmann. „Demasking of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) on circulating epithelial tumor cells by Tween®20 treatment in breast cancer patients“. In: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 50.4 (2012), S. 701–708. DOI: 10.1515/CCLM.2011.812.

[71] Dorothea Schott, Monika Pizon, Erika Schill und Katharina Pachmann. „How Circulating Cancer Cells Disguise: the Role of Platelets“. In: *Current Oncology* (2021). DOI: 10.21203/rs.3.rs-892511/v1.

[72] Annachiara Mitrugno, Niamh Moran und Pat Metharom. „Platelets — Allies of Tumour Cells“. In: *The Non-Thrombotic Role of Platelets in Health and Disease*. Hrsg. von Steven W. Kerrigan und Niamh Moran. IntechOpen, 2015. Kap. 6. ISBN: 9789535122081. DOI: 10.5772/60681.

[73] Madeleine Gold, Katharina Pachmann, Alexander Kiani und Rainer Schobert. „Monitoring of circulating epithelial tumor cells using the Maintrac® method and its potential benefit for the treatment of patients with colorectal cancer“. In: *Molecular and Clinical Oncology* 15.201 (2021). DOI: 10.3892/mco.2021.2363.

[74] Matthias Mäurer, Katharina Pachmann, Thomas Wendt, Dorothea Schott und Andrea Wittig. „Prospective Monitoring of Circulating Epithelial Tumor Cells (CETC) Reveals Changes in Gene Expression during Adjuvant Radiotherapy of Breast Cancer Patients“. In: *Current Oncology* 28.5 (2021), S. 3507–3524. DOI: 10.3390/curroncol28050302.

[75] Greiner Bio-One GmbH. *SENSOPLATE MICROPLATE, 96 WELL, PS, F-BOTTOM – Customer Drawing*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://shop.gbo.com/en/row/files/22367873/655892.pdf.

[76] Sanjay M. Prakadan, Alex K. Shalek und David A. Weitz. „Scaling by shrinking: empowering single-cell 'omics' with microfluidic devices". In: *Nature Reviews Genetics* 18 (2017), S. 345–361. DOI: 10.1038/nrg.2017.15.

[77] Andre Gross, Jonas Schoendube, Stefan Zimmermann, Maximilian Steeb, Roland Zengerle und Peter Koltay. „Technologies for Single-Cell Isolation". In: *International Journal of Molecular Sciences* 16.8 (2015), S. 16897–16919. DOI: 10.3390/ijms160816897.

[78] Jolien Breukers, Caroline Struyfs, Sara Horta, Karin Thevissen, Karen Vanhoorelbeke, Bruno P. A. Cammue und Jeroen Lammertyn. „Integrated Microwell Array Technologies for Single Cell Analysis". In: *Handbook of Single-Cell Technologies*. Hrsg. von Tuhin Subhra Santra und Fan-Gang Tseng. Bd. 1. Springer, Singapore, 2022. Kap. 13, S. 311–341. ISBN: 9789811089527. DOI: 10.1007/978-981-10-8953-4_21.

[79] Julie Van Lent u. a. „Miniaturized single-cell technologies for monoclonal antibody discovery". In: *Lab on a Chip* 21.19 (2021). DOI: 10.1039/D1LC00243K.

[80] J. Christopher Love, Jehnna L. Ronan, Gijsbert M. Grotenbreg, Annemarthe G. van der Veen und Hidde L. Ploegh. „A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies". In: *Nature Biotechnology* 24.6 (2006), S. 703–707. DOI: 10.1038/nbt1210.

[81] Jinzhou Yuan und Peter A. Sims. „An Automated Microwell Platform for Large-Scale Single Cell RNA-Seq". In: *Scientific Reports* 6.33883 (2016). DOI: 10.1038/srep33883.

[82] Todd M. Gierahn, Marc H. Wadsworth, Travis Hughes, Bryan D. Bryson, Andrew Butler, Rahul Satija, Sarah Fortune, J. Christopher Love und Alex K. Shalek. „Seq-Well: portable, low-cost RNA sequencing of single cells at high throughput". In: *Nature Methods* 14 (2017), S. 395–398. DOI: 10.1038/nmeth.4179.

[83] Jens G. Lohr u. a. „Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer". In: *Nature Biotechnology* 32.5 (2014), S. 479–484. DOI: 10.1038/nbt.2892.

[84] Kiki Andree, Fikri Abali, Lisa Oomens, Fiona Passanha, Joska Broekmaat, Jaco Kraan, Pauline Mendelaar, Stefan Sleijfer und Leon Terstappen. „Self-Seeding Microwells to Isolate and Assess the Viability of Single Circulating Tumor Cells". In: *International Journal of Molecular Sciences* 20.3 (2019), S. 477. DOI: 10.3390/ijms20030477.

[85] J. R. Kovac und J. Voldman. „Intuitive, Image-Based Cell Sorting Using Optofluidic Cell Sorting". In: *Analytical Chemistry* 79.24 (2007), S. 9321–9330. DOI: 10.1021/ac071366y.

[86] Marsela Jorgolli u. a. „Nanoscale integration of single cell biologics discovery processes using optofluidic manipulation and monitoring". In: *Biotechnology and Bioengineering* 116.9 (2019), S. 2393–2411. DOI: 10.1002/bit.27024.

[87] Tomoaki Kurakazu, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, Yukiko T. Matsunaga, Hiroshi Kimura, Teruo Fujii, Yasuyuki Sakai und Shoji Takeuchi. „Selective retrieval of microparticles in microchambers using electrolytically generated bubbles for cell array applications“. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 159.1 (2011), S. 229–233. DOI: 10.1016/j.snb.2011.06.077.

[88] Tania Konry und Giovanni Ugolini. „Single Cell Isolation and Processing System With Reversible Well Shape“. Pat. US20210260576A1. Northeastern University Boston. 22. Feb. 2021. URL: https://patents.google.com/patent/US20210260576A1/en?oq=US20210260576A1.

[89] P. Vulto, G. Medoro, L. Altomare, G. A. Urban, M. Tartagni, R. Guerrieri und N. Manaresi. „Selective sample recovery of DEP-separated cells and particles by phaseguide-controlled laminar flow“. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 16.9 (2006), S. 1847–1853. DOI: 10.1088/0960-1317/16/9/013.

[90] Menarini Silicon Biosystems S.p.A. *VR™ NxT – Flyer*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://f.hubspotusercontent30.net/hubfs/304284/Flyers/VRnxt%20Flyer_web.pdf.

[91] Menarini Silicon Biosystems S.p.A. *DEPArray™ NxT – Broschüre*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://pdf.medicalexpo.com/pdf/menarini-silicon-biosystems/deparray-nxt/119231-186120.html.

[92] Alexandra B. Fuchs u. a. „Electronic sorting and recovery of single live cells from microlitre sized samples“. In: *Lab on a Chip* 6.1 (2006), S. 121–126. DOI: 10.1039/B505884H.

[93] Menarini Silicon Biosystems S.p.A. *DEPArray™ – System's Technical Specifications*. Zugriff: 23. März 2025. URL: http://dync.eu/imagedump/Literature_SB/DEPArray_TechSpecs.pdf.

[94] Stefan Haeberle und Roland Zengerle. „Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications“. In: *Lab on a Chip* 7.9 (2007), S. 1094–1110. DOI: 10.1039/b706364b.

[95] Daniel Mark, Stefan Haeberle, Günter Roth, Felix von Stetten und Roland Zengerle. „Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications“. In: *Chemical Society Reviews* 39.3 (2010), S. 1153–1182. DOI: 10.1039/B820557B.

[96] Henrik Bruus. *Theoretical Microfluidics*. Oxford University Press, Inc., 2007. ISBN: 9780199235087.

[97] Albert Folch. *Introduction to BioMEMS*. CRC Press, 2013. ISBN: 9780367864965. DOI: 10.1201/b12263.

[98] Jun Zhang, Sheng Yan, Dan Yuan, Gursel Alici, Nam-Trung Nguyen, Majid Ebrahimi Warkiani und Weihua Li. „Fundamentals and applications of inertial microfluidics: a review“. In: *Lab on a Chip* 16.1 (2016), S. 10–34. DOI: 10.1039/C5LC01159K.

[99] Ellis Meng. *Biomedical Microsystems*. CRC Press, 2011. ISBN: 9781420051223. DOI: 10.1201/9781439894521.

[100] Sébastien Clerc und Asma Siari. *Point-of-Need Testing: Application of Microfluidic Technologies (Report)*. Yole Développement, 2018.

[101] Jens Ducrée, Stefan Haeberle, Sascha Lutz, Sarah Pausch, Felix von Stetten und Roland Zengerle. „The centrifugal microfluidic Bio-Disk platform“. In: *Journal of Michromechanics and Microengineering* 17.7 (2007), S103–S115. DOI: 10.1088/0960-1317/17/7/S07.

[102] H.A. Stone, A.D. Stroock und A. Ajdari. „Engineering Flows in Small Devices: Microfluidics Toward a Lab-on-a-Chip“. In: *Annual Review of Fluid Mechanics* 36.1 (2004), S. 381–411. DOI: 10.1146/annurev.fluid.36.050802.122124.

[103] Kevin M. Koo, Eugene J. H. Wee, Yuling Wang und Matt Trau. „Enabling miniaturised personalised diagnostics: from lab-on-a-chip to lab-in-a-drop“. In: *Lab on a Chip* 17.19 (2017), S. 3200–3220. DOI: 10.1039/C7LC00587C.

[104] Bosch Healthcare Solutions GmbH. *Bosch Vivalytic*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.bosch-vivalytic.com/.

[105] Bosch Healthcare Solutions GmbH. *Labordiagnostik*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.bosch-healthcare.com/bereiche/labordiagnostik/#produkt.

[106] Philip V'kovski, Annika Kratzel, Silvio Steiner, Hanspeter Stalder und Volker Thiel. „Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2“. In: *Nature Reviews Microbiology* 19 (2021), S. 155–170. DOI: 10.1038/s41579-020-00468-6.

[107] Daniel Podbiel, Lorenz Boecking, Hannah Bott, Julian Kassel, Daniel Czurratis, Franz Laermer, Roland Zengerle und Jochen Hoffmann. „From CAD to microfluidic chip within one day: rapid prototyping of lab-on-chip cartridges using generic polymer parts“. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 30 (2020). DOI: 10.1088/1361-6439/aba5dd.

[108] Marc J. Madou. *Fundamentals of Microfabrication and Nanotechnology, Volume I: Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology*. CRC Press, 2011. ISBN: 9780429112485. DOI: 10.1201/9781439895344.

[109] Hywel Morgan und Nicolas G. Green. *AC Electrokinetics: colloids and nanoparticles*. Research Studies Press, Ltd, 2003. ISBN: 9780863802553.

[110] Barbaros Çetin und Dongqing Li. „Dielectrophoresis in microfluidics technology“. In: *Electrophoresis* 32.18 (2011), S. 2410–2427. DOI: 10.1002/elps.201100167.

[111] Ronald Pethig. „Review — Where Is Dielectrophoresis (DEP) Going?“ In: *Journal of The Electrochemical Society* 164.5 (2017), B3049–B3055. DOI: 10.1149/2.0071705jes.

[112] Thomas B. Jones. „Basic Theory of Dielectrophoresis and Electrorotation“. In: *IEEE Engineering in Medicinse and Biology Magazine* 22.6 (2003), S. 33–42. DOI: 10.1109/MEMB.2003.1304999.

[113] Herbert A. Pohl. „The Motion and Precipitation of Suspensoids in Divergent Electric Fields“. In: *Journal of Applied Physics* 22.7 (1951), S. 869–871. DOI: 10.1063/1.1700065.

[114] Herbert A. Pohl. *Dielectrophoresis: The Behavior of Neutral Matter in Nonuniform Electric Fields (Cambridge Monographs on Physics)*. Cambridge University Press, Ltd, 1978. ISBN: 9780521216579.

[115] Thomas B. Jones. *Electromechanics of Particles*. Cambridge University Press, Ltd, 1995. ISBN: 9780511574498. DOI: 10.1017/CBO9780511574498.

[116] Thomas B. Jones und Masao Washizu. „Multipolar dielectrophoretic and electrorotation theory“. In: *Journal of Electrostatics* 37.1–2 (1996), S. 121–134. DOI: 10.1016/0304-3886(96)00006-X.

[117] Georg Pesch. „On the dielectrophoretic particle retention in porous media“. Diss. Staats- und Universitätsbibliothek Bremen, 2018. URL: http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:gbv:46-00106404-11.

[118] Arthur von Hippel. *Dielectrics and Waves*. Artech House, 1994. ISBN: 9781580531221.

[119] Rassel Raihan, Fazle Rabbi, Vamsee Vadlamudi und Kenneth Reifsnider. „Composite Materials Damage Modeling Based on Dielectric Properties“. In: *Materials Sciences and Applications* 6.11 (2015), S. 1033–1053. DOI: 10.4236/msa.2015.611103.

[120] Liliya Batyuk und Natalya Kizilova. *Modeling of dielectric permittivity of the erythrocytes membrane as a three-layer model*. Kharkiv National Medical University Repository, 2018. DOI: 10.30525/978-9934-571-31-2_2.

[121] Nicolas G. Green und Hossein Nili. „Dielectrophoresis“. In: *Encyclopedia of Nanotechnology*. Hrsg. von Bharat Bhushan. Springer, Dordrecht, 2012. Kap. D, S. 534–543. ISBN: 9789048197514. DOI: 10.1007/978-90-481-9751-4_131.

[122] T. Prodromakis und C. Papavassiliou. „Engineering the Maxwell-Wagner polarization effect“. In: *Applied Surface Science* 255.15 (2009), S. 6989–6994. DOI: 10.1016/j.apsusc.2009.03.030.

[123] Peter R. C. Gascoyne und Jody V. Vykoukal. „Dielectrophoresis-Based Sample Handling in General-Purpose Programmable Diagnostic Instruments“. In: *Proceedings of the IEEE* 92.1 (2004), S. 22–42. DOI: 10.1109/JPROC.2003.820535.

[124] Marc J. Madou. *Fundamentals of Microfabrication and Nanotechnology, Volume III: From MEMS to Bio-MEMS and Bio-NEMS – Manufacturing Techniques and Applications*. CRC Press, 2011. ISBN: 9780429109218. DOI: 10.1201/9781439895245.

[125] Akihiko Irimajiri, Tetsuya Hanai und Akira Inouye. „A Dielectric Theory of "Multi-Stratified Shell"mlt Model with its Application to a Lymphoma Cell“. In: *Journal of Theoretical Biology* 78.2 (1979), S. 251–269. DOI: 10.1016/0022-5193(79)90268-6.

[126] A. Menachery und R. Pethig. „Controlling cell destruction using dielectrophoretic forces“. In: *IEE Proceedings - Nanobiotechnology* 152.4 (2005), S. 145–149. DOI: 10.1049/ip-nbt:20050010.

[127] Ying Huang, Ralph Hölzel, Ronald Pethig und Xiao-Bo Wang. „Differences in the AC electrodynamics of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies“. In: *Physics in Medicine and Biology* 37.7 (1992), S. 1499–1517. DOI: 10.1088/0031-9155/37/7/003.

[128] Joel Voldman. „Electrical Forces For Microscale Cell Manipulation“. In: *Annual Review of Biomedical Engineering* 8.1 (2006), S. 425–454. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095739.

[129] S. M. Rezaul Hasan und Aanan Khurma. „AC Dielectrophoresis Using Elliptic Electrode Geometry“. In: *Journal of Sensors* Volume 2011 (2011). DOI: 10.1155/2011/204767.

[130] Rodrigo Martinez-Duarte. „Microfabrication technologies in dielectrophoresis applications—A review“. In: *Electrophoresis* 33.21 (2012), S. 3110–3132. DOI: 10.1002/elps.201200242.

[131] Peter Gascoyne, Chulabhorn Mahidol, Mathuros Ruchirawat, Jutamaad Satayavivad, Piyajit Watcharasit und Frederick F. Becker. „Microsample preparation by dielectrophoresis: isolation of malaria“. In: *Lab on a Chip* 2.2 (2002), S. 70–75. DOI: 10.1039/b110990c.

[132] I-Fang Cheng, Victoria E. Froude, Yingxi Zhu, Hsueh-Chia Chang und Hsien-Chang Chang. „A continuous high-throughput bioparticle sorter based on 3D traveling-wave dielectrophoresis“. In: *Lab on a Chip* 9.22 (2009), S. 3193. DOI: 10.1039/b910587e.

[133] X.-B. Wang, Y. Huang, R. Hölzel, J. P. H. Burt und R. Pethig. „Theoretical and experimental investigations of the interdependence of the dielectric, dielectrophoretic and electrorotational behaviour of colloidal particles“. In: *Journal of Physics D: Applied Physics* 26.2 (1993), S. 312–322. DOI: 10.1088/0022-3727/26/2/021.

[134] Y. Huang und R. Pethig. „Electrode Design for Negative Dielectrophoresis“. In: *Measurement Science and Technology* 2.12 (1991), S. 1142–1146. DOI: 10.1088/0957-0233/2/12/005.

[135] Y. Huang, R. Holzel, R. Pethig und X.-B. Wang. „Differences in the AC electrodynamics of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies“. In: *Physics in Medicine & Biology* 37.7 (1992), S. 1499–1517. DOI: 10.1088/0031-9155/37/7/003.

[136] X.-B. Wang, Y. Huang, P. R. Gascoyne, F. F. Becker, R. Hoelzel und R. Pethig. „Changes in Friend murine erythroleukaemia cell membranes during induced differentiation determined by electrorotation“. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1193.2 (1994), S. 330–344. DOI: 10.1016/0005-2736(94)90170-8.

[137] Garsha Bahrieh. „Assessment of changes in the dielectric properties of multidrug resistant cancer cells by electrorotation technique“. Magisterarb. Middle East Technical University, 2014. URL: https://etd.lib.metu.edu.tr/upload/12617657/index.pdf.

[138] Song-I Han, Young-Don Joo und Ki-Ho Han. „An electrorotation technique for measuring the dielectric properties of cells with simultaneous use of negative quadrupolar dielectrophoresis and electrorotation“. In: *Analyst* 138.5 (2013), S. 1529–1537. DOI: 10.1039/C3AN36261B.

[139] Yalin Li, Yan Wang, Keming Wan, Mingxue Wu, Lei Guo, Xiaomin Liu und Gang Wei. „On the design, functions, and biomedical applications of high-throughput dielectrophoretic micro-/nanoplatforms: a review“. In: *Nanoscale* 13.8 (2021), S. 4330–4358. DOI: 10.1039/d0nr08892g.

[140] Peter R. C. Gascoyne und Jody Vykoukal. „Particle separation by dielectrophoresis“. In: *Electrophoresis* 23.13 (2002), S. 1973–1983. DOI: 10.1002/1522-2683(200207)23:13<1973::AID-ELPS1973>3.0.CO;2-1.

[141] F. F. Becker, X.-B. Wang, Y. Huang, R. Pethig, J. Vykoukal und P. R. C. Gascoyne. „The removal of human leukaemia cells from blood using interdigitated microelectrodes“. In: *Journal of Physics D: Applied Physics* 27.12 (1994), S. 2659–2662. DOI: 10.1088/0022-3727/27/12/030.

[142] F. F. Becker, X.-B. Wang, Y. Huang, R. Pethig, J. Vykoukal und P. R. C. Gascoyne. „Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity“. In: *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)* 92.3 (1995), S. 860–864. DOI: 10.1073/pnas.92.3.860.

[143] P. R. C. Gascoyne, X.-B. Wang, Y. Huang und F. F. Becker. „Dielectrophoretic Separation of Cancer Cells from Blood“. In: *IEEE Transactions on Industry Applications* 33.3 (1997), S. 670–678. DOI: 10.1109/28.585856.

[144] Shabnam A. Faraghat, Kai F. Hoettges, Max K. Steinbach, Daan R. van der Veen, William J. Brackenbury, Erin A. Henslee, Fatima H. Labeed und Michael P. Hughes. „High-throughput, low-loss, low-cost, and label-free cell separation using electrophysiology-activated cell enrichment“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114.18 (2017), S. 4591–4596. DOI: 10.1073/pnas.1700773114.

[145] A. Salmanzadeh, M. B. Sano, H. Shafiee, M. A. Stremler und R. V. Davalos. „Isolation of rare cancer cells from blood cells using dielectrophoresis“. In: 2012, S. 590–593. DOI: 10.1109/EMBC.2012.6346000.

[146] Hadi Shafiee, Michael B. Sano, Erin A. Henslee, John L. Caldwell und Rafael V. Davalos. „Selective isolation of live/dead cells using contactless dielectrophoresis (cDEP)“. In: *Lab on a Chip* 10.4 (2010), S. 438. DOI: 10.1039/b920590j.

[147] Sungyoung Choi und Je-Kyun Park. „Microfluidic system for dielectrophoretic separation based on a trapezoidal electrode array“. In: *Lab on a Chip* 5.10 (2005), S. 1161–1167. DOI: 10.1039/B505088J.

[148] I-Fang Cheng, Wei-Lun Huang, Tzu-Ying Chen, Chien-Wei Liu, Yu-De Lin und Wu-Chou Su. „Antibody-free isolation of rare cancer cells from blood based on 3D lateral dielectrophoresis“. In: *Lab on a Chip* 15.14 (2015), S. 2950–2959. DOI: 10.1039/C5LC00120J.

[149] Hui-Sung Moon, Kiho Kwon, Seung-Il Kim, Hyunju Han, Joohyuk Sohn, Soohyeon Lee und Hyo-Il Jung. „Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP)“. In: *Lab on a Chip* 11.6 (2011), S. 1118–1125. DOI: 10.1039/C0LC00345J.

[150] Ki-Ho Han und A. Bruno Frazier. „Lateral-driven continuous dielectrophoretic microseparators for blood cells suspended in a highly conductive medium“. In: *Lab on a Chip* 8.7 (2008), S. 1079–1086. DOI: 10.1039/B802321B.

[151] Hongjun Song, Jenna M. Rosano, Yi Wang, Charles J. Garson, Balabhaskar Prabhakarpandian, Kapil Pant, George J. Klarmann, Alan Perantoni, Luis M. Alvarez und Eva Lai. „Continuous-flow sorting of stem cells and differentiation products based on dielectrophoresis“. In: *Lab on a Chip* 15.5 (2015), S. 1320–1328. DOI: 10.1039/C4LC01253D.

[152] Peter R. C. Gascoyne, Sangjo Shim, Jamileh Noshari, Frederick F. Becker und Katherine Stemke-Hale. „Correlations between the Dielectric Properties and Exterior Morphology of Cells Revealed by Dielectrophoretic Field-Flow Fractionation“. In: *Electrophoresis* 34.7 (2013), S. 1042–1050. DOI: 10.1002/elps.201200496.

[153] Jody Vykoukal, Daynene M. Vykoukal, Susanne Freyberg, Eckhard U. Alt und Peter R. C. Gascoyne. „Enrichment of putative stem cells from adipose tissue using dielectrophoretic field-flow fractionation“. In: *Lab on a Chip* 8.8 (2008), S. 1386–1393. DOI: 10.1039/b717043b.

[154] Y. Huang, X.-B. Wang, F. F. Becker und P. R. C. Gascoyne. „Introducing dielectrophoresis as a new force field for field-flow fractionation“. In: *Biophysical Journal* 73.2 (1997), S. 1118–1129. DOI: 10.1016/S0006-3495(97)78144-X.

[155] X.-B. Wang, J. Vykoukal, F. F. Becker und P. R. C. Gascoyne. „Separation of Polystyrene Microbeads Using Dielectrophoretic/Gravitational Field-Flow-Fractionation“. In: *Biophysical Journal* 74.5 (1998), S. 2689–2701. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77975-5.

[156] Peter R. C. Gascoyne. „Dielectrophoretic-Field Flow Fractionation Analysis of Dielectric, Density, and Deformability Characteristics of Cells and Particles“. In: *Analytical Chemistry* 81.21 (2009), S. 8878–8885. DOI: 10.1021/ac901470z.

[157] Peter R. C. Gascoyne. „Isolation and Characterization of Cells by Dielectrophoretic Field-Flow Fractionation“. In: *Field-Flow Fractionation in Biopolymer Analysis*. Hrsg. von S. Kim R. Williams und Karin D. Caldwell. Springer, Wien, 2011. Kap. 16, S. 255–275. ISBN: 9783709101537. DOI: 10.1007/978-3-7091-0154-4_16.

[158] Peter R. C. Gascoyne, Jamileh Noshari, Thomas J. Anderson und Frederick F. Becker. „Isolation of Rare Cells from Cell Mixtures by Dielectrophoresis“. In: *Electrophoresis* 30.8 (2009), S. 1388–1398. DOI: 10.1002/elps.200800373.

[159] Nuttawut Lewpiriyawong und Chun Yang. „Dielectrophoresis Field-Flow Fractionation for Continuous-Flow Separation of Particles and Cells in Microfluidic Devices“. In: *Advances in Transport Phenomena 2011*. Hrsg. von L. Wang. Springer International Publishing, 2014. Kap. 2, S. 29–62. ISBN: 9783319017921. DOI: 10.1007/978-3-319-01793-8_2.

[160] Sangjo Shim, Katherine Stemke-Hale, Apostolia M. Tsimberidou, Jamileh Noshari, Thomas E. Anderson und Peter R. C. Gascoyne. „Antibody-independent isolation of circulating tumor cells by continuous-flow dielectrophoresis“. In: *Biomicrofluidics* 7.1 (2013), S. 011807–1–011807–12. DOI: 10.1063/1.4774304.

[161] Vishal Gupta, Insiya Jafferji, Miguel Garza, Vladislava O. Melnikova, David K. Hasegawa, Ronald Pethig und Darren W. Davis. „ApoStream™, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood“. In: *Biomicrofluidics* 6.2 (2012), S. 024133–1–024133–14. DOI: 10.1063/1.4731647.

[162] Joel Voldman. „Dielectrophoretic Traps for Cell Manipulation“. In: *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*. Hrsg. von Rashid Bashir und Steven T. Wereley. Bd. 4. Springer, Boston, 2006. Kap. 8, S. 159–186. ISBN: 9780387258454. DOI: 10.1007/978-0-387-25845-4_8.

[163] Hideaki Tsutsui, Edmond Yu, Sabrina Marquina, Bahram Valamehr, Ieong Wong, Hong Wu und Chih-Ming Ho. „Efficient Dielectrophoretic Patterning of Embryonic Stem Cells in Energy Landscapes Defined by Hydrogel Geometries“. In: *Annals of Biomedical Engineering* 38 (2010), S. 3777–3788. DOI: 10.1007/s10439-010-0108-1.

[164] Lingqian Chang u. a. „Dielectrophoresis-assisted 3D nanoelectroporation for non-viral cell transfection in adoptive immunotherapy“. In: *Lab on a Chip* 15.15 (2015), S. 3147–3153. DOI: 10.1039/C5LC00553A.

[165] Chun Hui Wu, Ri Fei Chen, Yu Liu, Zhen Ming Yu, You Wei Jiang und Xing Cheng. „A planar dielectrophoresis-based chip for high-throughput cell pairing“. In: *Lab on a Chip* 17.23 (2017), S. 4008–4014. DOI: 10.1039/C7LC01082F.

[166] Ciprian Iliescu, Guolin Xu, Wen Hao Tong, Fang Yu, Cătălin Mihai Bălan, Guillaume Tresset und Hanry Yu. „Cell patterning using a dielectrophoretic–hydrodynamic trap“. In: *Microfluidics and Nanofluidics* 19.2 (2015), 363––373. DOI: 10.1007/s10404-015-1568-2.

[167] Marina Kobayashi, Soo Hyeon Kim, Hiroko Nakamura, Shohei Kaneda und Teruo Fujii. „Cancer Cell Analyses at the Single Cell-Level Using Electroactive Microwell Array Device“. In: *PLOS ONE* 10.11 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0139980.

[168] Soo Hyeon Kim und Teruo Fujii. „Efficient analysis of a small number of cancer cells at the single-cell level using an electroactive double-well array“. In: *Lab on a Chip* 16.13 (2016), S. 2440–2449. DOI: 10.1039/C6LC00241B.

[169] Soo Hyeon Kim, Takatoki Yamamoto, Dominique Fourmy und Teruo Fujii. „Electroactive Microwell Arrays for Highly Efficient Single-Cell Trapping and Analysis“. In: *Small* 7.22 (2011), S. 3239–3247. DOI: 10.1002/smll.201101028.

[170] Soo Hyeon Kim, Maria Antfolk, Marina Kobayashi, Shohei Kaneda, Thomas Laurell und Teruo Fujii. „Highly efficient single cell arraying by integrating acoustophoretic cell pre-concentration and dielectrophoretic cell trapping“. In: *Lab on a Chip* 15.22 (2015), S. 4356–4363. DOI: 10.1039/C5LC01065A.

[171] Atsushi Morimoto u. a. „High-Density Dielectrophoretic Microwell Array for Detection, Capture, and Single-Cell Analysis of Rare Tumor Cells in Peripheral Blood“. In: *PLOS ONE* 10.6 (2015), e0130418. DOI: 10.1371/journal.pone.0130418.

[172] Meera Punjiya, Hojatollah Rezaei Nejad, Juanita Mathews, Michael Levin und Sameer Sonkusale. „A flow through device for simultaneous dielectrophoretic cell trapping and AC electroporation“. In: *Scientific Reports* 9.1 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-48198-x.

[173] Adam Rosenthal und Joel Voldman. „Dielectrophoretic Traps for Single-Particle Patterning“. In: *Biophysical Journal* 88.3 (2005), S. 2193–2205. DOI: 10.1529/biophysj.104.049684.

[174] Adam Rosenthal, Brian M. Taff und Joel Voldman. „Quantitative modeling of dielectrophoretic traps“. In: *Electrophoresis* 6.4 (2006), S. 508–515. DOI: 10.1039/b600280n.

[175] Nikhil Mittal, Adam Rosenthal und Joel Voldman. „nDEP microwells for single-cell patterning in physiological media“. In: *Lab on a Chip* 7.9 (2007), S. 1146–1153. DOI: 10.1039/B706342C.

[176] Rupert S. Thomas, Hywel Morgan und Nicolas G. Green. „Negative DEP traps for single cell immobilisation“. In: *Lab on a Chip* 9.11 (2009), S. 1534–1540. DOI: 10.1039/B819267G.

[177] Hyungsoo Kim u. a. „Single-neuronal cell culture and monitoring platform using a fully transparent microfluidic DEP device“. In: *Nature* 8.13194 (2018), S. 1–9. DOI: 10.1038/s41598-018-31576-2.

[178] Brian M. Taff, Salil P. Desai und Joel Voldman. „Electroactive hydrodynamic weirs for microparticle manipulation and patterning“. In: *Applied Physics Letters* 94.8 (2009), S. 084102. DOI: 10.1063/1.3085955.

[179] Zhen Zhu, Olivier Frey, Diana Silvia Ottoz, Fabian Rudolf und Andreas Hierlemann. „Microfluidic single-cell cultivation chip with controllable immobilization and selective release of yeast cells“. In: *Lab Chip* 12.5 (2012), S. 906–915. DOI: 10.1039/C2LC20911J.

[180] Marta Lombardini, Massimo Bocchi, Laura Rambelli, Luca Giulianelli und Roberto Guerrieri. „Horizontal nDEP cages within open microwell arrays for precise positioning of cells and particles“. In: *Lab on a Chip* 10.9 (2010), S. 1204–1207. DOI: 10.1039/B923567A.

[181] Massimo Bocchi, Laura Rambelli, Andrea Faenza, Luca Giulianelli, Nicola Pecorari, Enri Duqi, Jean-Charles Gallois und Roberto Guerrieri. „Inverted open microwells for cell trapping, cell aggregate formation and parallel recovery of live cells“. In: *Lab on a Chip* 12.17 (2012), S. 3168. DOI: 10.1039/c2lc40124j.

[182] T. Müller, G. Gradl, S. Howitz, S. Shirley, T. Schnelle und G. Fuhr. „A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles“. In: *Biosensors and Bioelectronics* 14.13 (1999), S. 247–256. DOI: 10.1016/S0956-5663(99)00006-8.

[183] Michael Kirschbaum, Christian R. Guernth-Marschner, Solène Cherré, Albora de Pablo Peña, Magnus S. Jaeger, Richard A. Kroczek, Thomas Schnelle, Torsten Mueller und Claus Duschl. „Highly controlled electrofusion of individually selected cells in dielectrophoretic field cages“. In: *Lab on a Chip* 12.3 (2012), S. 443–450. DOI: 10.1039/C1LC20818G.

[184] Stefan Fiedler, Stephen G. Shirley, Thomas Schnelle und Günter Fuhr. „Dielectrophoretic Sorting of Particles and Cells in a Microsystem“. In: *Analytical Chemistry* 70.9 (1998), S. 1909–1915. DOI: 10.1021/ac971063b.

[185] Zhou Tianyi. „Development of A Multi-Electrode Array (MEA) Based on Active Recruiting of Cells and Formation of Mechanically Confined Neural Networks“. Diss. Lehigh University, 2016. URL: https://preserve.lib.lehigh.edu/islandora/object/preserve%3Abp-10370228.

[186] Cheng-Hsin Chuang, Yao-Wei Huang und Yao-Tung Wu. „System-level biochip for impedance sensing and programmable manipulation of bladder cancer cells“. In: *Sensors* 11.11 (2011), S. 11021–11035. DOI: 10.3390/s111111021.

[187] Cheng-Hsin Chuang, Yao-Wei Huang und Yao-Tung Wu. „Dielectrophoretic chip with multilayer electrodesand micro-cavity array for trapping and programmably releasing single cells“. In: *Biomedical Microdevices* 14 (2012), S. 271–278. DOI: 10.1007/s10544-011-9603-x.

[188] Cheng-Hsin Chuang, Ching-Hua Wei, You-Ming Hsu und Jian-Tang Lu. „Multilayer Electrodes DEP Chip for Single-cell Level Impedance Measurement“. In: *2007 2nd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*. Bd. 2. 2007, S. 821–825. DOI: 10.1109/NEMS.2007.352144.

[189] Brian M. Taff und Joel Voldman. „A Scalable Addressable Positive-Dielectrophoretic Cell-Sorting Array“. In: *Analytical Chemistry* 77.24 (2005), S. 7976–7983. DOI: 10.1021/ac0513616.

[190] Brian M. Taff und Joel Voldman. „A SCALABLE ROW/COLUMN-ADDRESSABLE DIELECTROPHORETIC CELL-TRAPPING ARRAY“. In: *9th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. Bd. 9. 2005.

[191] Thomas P. Hunt, David Issadore und R. M. Westervelt. „Integrated circuit/microfluidic chip to programmably trap and move cells and droplets with dielectrophoresis“. In: *Lab on a Chip* 8.1 (2008), S. 81–87. DOI: 10.1039/B710928H.

[192] K.W. Current, K. Yuk, C. McConaghy, P.R.C. Gascoyne, J.A. Schwartz, J.V. Vykoukal und C. Andrews. „A high-voltage integrated circuit engine for a dielectrophoresis-based programmable micro-fluidic processor“. In: *2005 International Conference on MEMS,NANO and Smart Systems*. 2005, S. 153–158. DOI: 10.1109/ICMENS.2005.15.

[193] Ronald Pethig. „Review Article — Dielectrophoresis: Status of the theory, technology, and applications“. In: *Biomicrofluidics* 4.2 (2010), S. 022811–1–022811–35. DOI: 10.1063/1.3456626.

[194] Hywel Morgan und Nicolas G. Green. „Dielectrophoresis“. In: *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*. Hrsg. von Dongqing Li. Springer-Verlag, New York, 2015. Kap. D. ISBN: 9781461454885. DOI: 10.1007/978-3-642-27758-0_319-2.

[195] Leibniz-Institut DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. *HCT116 (ACC 581)*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-581.

[196] Polysciences Europe GmbH. *Datenblatt Fluoresbrite® YG Microspheres*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.polysciences.com/media/amasty/amfile/attach/dsDlqe2RzMR3wLji7pCfcQwtJiRqw2ld.pdf.

[197] Polysciences Europe GmbH. *Fluoresbrite® YG Microspheres 10.0 µm*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.polysciences.com/german/fluoresbrite-yg-microspheres-100m-43708.

[198] N. G. Green, A. Ramos und H. Morgan. „Numerical solution of the dielectrophoretic and travelling wave forces for interdigitated electrode arrays using the finite element method“. In: *Journal of Electrostatics* 56.2 (2002), S. 235–254. DOI: 10.1016/S0304-3886(02)00069-4.

[199] D. Podbiel, F. Laermer, R. Zengerle und J. Hoffmann. „Fusing MEMS technology with lab-on-chip: nanoliter-scale silicon microcavity arrays for digital DNA quantification and multiplex testing“. In: *Microsystems & Nanoengineering* 6.82 (2020). DOI: 10.1038/s41378-020-00187-1.

[200] Multi Leiterplatten GmbH. *Spezifikationen Serien-Leiterplatten*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.multi-circuit-boards.eu/produkte/leiterplatten/serien.html.

[201] Sabine Schmitz. *Der Experimentator: Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2011. ISBN: 9783827425720. DOI: 10.1007/978-3-8274-2573-7.

[202] SAMTEC Inc. *Z-Ray® Hochgeschwindigkeits-Kompressionsinterposer*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.samtec.com/de/connectors/high-speed-board-to-board/compression-interposers/zray.

[203] D. Podbiel, R. Zengerle und J. Hoffmann. „An analytical model for void-free priming of microcavities“. In: *Microfluidics and Nanofluidics* 24.16 (2020). DOI: 10.1007/s10404-020-2318-7.

[204] Samir Kadić, Tianxing Du, Astrid Lux, Aaron Dörr, Michael Knapp, Jochen Hoffmann, Anne Serout, Steffen Strehle und Franz Lärmer. „Hoch-sensitive und vollautomatisierte Quantifizierung von zirkulierenden epithelialen Tumorzellen aus Vollblut“. In: *MikroSystemTechnik Kongress 2021: Mikroelektronik / Mikrosystemtechnik und ihre Anwendungen — Innovative Produkte für zukunftsfähige Märkte*. 2021. ISBN: 978-3-8007-5656-8.

[205] Samir Kadić, Michael Knapp, Jochen Hoffmann, Anne Serout, Steffen Strehle und Franz Lärmer. „Let it Sediment – A Novel Microfluidic Sample Preparation Strategy for the Unbiased Analysis of Single Nucleated Cells from Whole Blood“. In: *µTAS 2024 Montréal Canada*. 2024.

[206] H.Uwe Wolf, Werner Lang und Rolf Zander. „Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemiglobin method. II. Standardisation of the method using pure chlorohaemin“. In: *Clinica Chimica Acta* 136.1 (1984), S. 95–104. DOI: 10.1016/0009-8981(84)90251-1.

[207] Heinz-Helmut Perkampus. *UV-VIS-Spektroskopie und ihre Anwendungen*. 1986. ISBN: 978-3-642-70517-5. DOI: 10.1007/978-3-642-70516-8.

[208] Do Hyun Kang, Hong Nam Kim, Pilnam Kim und Kahp-Yang Suh. „Poly(ethylene glycol) (PEG) microwells in microfluidics: Fabrication methods and applications“. In: *BioChip Journal* 8.4 (2014), S. 241–253. DOI: 10.1007/s13206-014-8401-y.

[209] G. Schwoch und H. Passow. „Preparation and properties of human erythrocyte ghosts“. In: *Molecular and Cellular Biochemistry* 2.2 (1973), S. 197–218. DOI: 10.1007/BF01795474.

[210] Samir Kadić, Pavel Takana, Michael Dreschmann, Thomas Buck, Aaron Dörr, Anne Serout, Jochen Hoffmann, Steffen Strehle und Franz Lärmer. „Precision Meets High Throughput – Contactless Single-Cell Sorting Using an Electrically Passive Microwell Array“. In: *µTAS 2021 Palm Springs California Hybrid (In-Person & Virtual): The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. Bd. 25. 2021. ISBN: 978-1-73341-903-1.

[211] Reda Abdelbaset, Marwan Abouelalla, Yehya H. Ghallab, Hamdy Abdelhamid und Yehea Ismail. „An electro-kinetic platform based on printed circuit Board technology for identification and characterization of biological cells“. In: *Microelectronic Engineering* 209 (2019), S. 20–27. DOI: 10.1016/j.mee.2019.02.001.

[212] Giovanni De Gasperis, Xiao-Bo Wang, Jun Yang, Frederick F. Becker und Peter. R. C. Gascoyne. „Automated electrorotation: dielectric characterization of living cells by real-time motion estimation“. In: *Measurement Science and Technology* 9.3 (1998), S. 518–529. DOI: 10.1088/0957-0233/9/3/029.

[213] Jun Yang, Ying Huang, Xujing Wang, Xiao-Bo Wang, Frederick F. Becker und Peter R. C. Gascoyne. „Dielectric Properties of Human Leukocyte Subpopulations Determined by Electrorotation as a Cell Separation Criterion“. In: *Biophysical Journal* 76.6 (1999), S. 3307–3314. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77483-7.

[214] Xujing Wang, Jun Yang und Peter R. C. Gascoyne. „Role of peroxide in AC electrical field exposure effects on Friend murine erythroleukemia cells during dielectrophoretic manipulations“. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1426.1 (1999), S. 53–68. DOI: 10.1016/s0304-4165(98)00122-6.

[215] A. Ramos, H. Morgan, N. G. Green und A. Castellanos. „Ac electrokinetics: a review of forces in microelectrode structures“. In: *Journal of Physics D: Applied Physics* 31.10 (1998), S. 2338–2353. DOI: 10.1088/0022-3727/31/18/021.

[216] I. Johnson und M. Spence, Hrsg. *The Molecular Probes™ Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th Edition*. Thermo Fisher Scientific Inc., 2010.

[217] Miltenyi Biotec GmbH. *CD326 (EpCAM) Antibody, anti-human*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.miltenyibiotec.com/BE-en/products/cd326-epcam-antibody-anti-human-hea-125.html#gref.

[218] Miltenyi Biotec GmbH. *REA Control Antibody (S), human IgG1, REAfinity™*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.miltenyibiotec.com/BE-en/products/rea-control-antibody-s-human-igg1-reafinity-rea293.html?countryRedirected=1#gref.

[219] Thermo Fisher Scientific Inc. *Invitrogen™ CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C34554.

[220] Sigma-Aldrich Produktions GmbH. *Fluorescein Natriumsalz*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sial/f6377.

[221] Thermo Fisher Scientific Inc. *Invitrogen™ Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate - 10 mg/mL Solution in Water*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/H3570.

[222] Sigma-Aldrich Produktions GmbH. *Propidiumiodid-Lösung*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sial/p4864?gclid=EAIaIQobChMIr-K-3L3J9QIVmOJ3Ch3EXwLlEAAYASAAEgL1M_D_BwE.

[223] Autodesk Inc. *EAGLE*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.autodesk.de/products/eagle/overview.

[224] The MathWorks Inc. *MATLAB*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://de.mathworks.com/products/matlab.html.

[225] Jonathan Cottet, Olivier Fabregue, Charles Berger, François Buret, Philippe Renaud und Marie Frénéa-Robin. *MyDEP: a new computational tool for dielectric modeling of particles and cells*. Version 1.0.1. DOI: 10.5281/zenodo.1321928. URL: https://mydepsoftware.github.io/.

[226] Jonathan Cottet, Olivier Fabregue, Charles Berger, François Buret, Philippe Renaud und Marie Frénéa-Robin. „MyDEP: a new computational tool for dielectric modeling of particles and cells“. In: *Biophysical Journal* 116.1 (2018), S. 12–18. DOI: 10.1016/j.bpj.2018.11.021.

[227] *Anaconda-Distribution*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.anaconda.com/open-source.

[228] Spyder-Community. *Spyder-IDE*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.spyder-ide.org/.

[229] Python Software Foundation. *Python*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.python.org/.

[230] Bashar Yafouz, Nahrizul Adib Kadri und Fatimah Ibrahim. „Dielectrophoretic Manipulation and Separation of Microparticles Using Microarray Dot Electrodes“. In: *Sensors* 14.4 (2014), 6356—6369. DOI: 10.3390/s140406356.

[231] Jasper Giesler, Georg R. Pesch, Laura Weirauch, Marc-Peter Schmidt, Jorg Thöming und Michael Baune. „Polarizability-Dependent Sorting of Microparticles Using Continuous-Flow Dielectrophoretic Chromatography with a Frequency Modulation Method“. In: *Micromachines* 11.1 (2019), S. 38. DOI: 10.3390/mi11010038.

[232] MIT Material Property Database. *Polyimide*. Zugriff: 23. März 2025. URL: https://www.mit.edu/~6.777/matprops/polyimide.htm.

VERZEICHNIS DER WICHTIGSTEN ABKÜRZUNGEN

Einheiten

ABKÜRZUNG	BESCHREIBUNG
% (v/v)	Volumen-zu-Volumen-Prozent
% (w/v)	Gewichts-zu-Volumen-Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
h	Hour (dt. Stunde)
kHz	Kilohertz
l	Liter
M	Molar
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
Pa	Pascal
rpm	Revolutions per minute (dt. Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde

Sonstige

ABKÜRZUNG	BESCHREIBUNG
3D	Dreidimensional
µTAS	Micro Total Analysis System
AC	Alternating Current (dt. Wechselstrom)
AD	Außendurchmesser
AHD	Alkaline Haematin Detergent
AR	Androgenrezeptor
BF	Bright Field (dt. Hellfeld)
BHCS	Bosch Healthcare Solutions GmbH
BSA	Bovine Serum Albumin (dt. Albumin aus Rinderserum)
bzw.	Beziehungsweise
Ca^{2+}	Calcium-Ion
ca.	Circa
Cadherin	Calcium adhering
CAD	Computer-Aided Design
CD326	Cluster of Differentiation 326 (EpCAM)
CD45	Cluster of Differentiation 45
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CK	Cytokeratin
Cl^-	Chlorid-Ion
CLK	Clock (dt. Uhr bzw. Taktsignal)
CM	*Clausius-Mossotti*
CMOS	Complementary Metal-Oxide-Semiconductor
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CTC	Circulating Tumor Cell (dt. zirkulierende Tumorzelle)
ctDNA	Circulating Tumor DNA (dt. zirkulierende Tumor-DNA)
DAC	Digital-to-Analog Converter
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Direct Current (dt. Gleichstrom)
DEP	Dielektrophorese
DEP-FFF	Dielektrophorese-unterstützte Field Flow Fractionation
d. h.	Das heißt
DI-Wasser	Deionisiertes Wasser
DIG	Direct Immersion Gold (PCB-Endoberfläche)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung

ABKÜRZUNG	BESCHREIBUNG
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
DRIE	Deep Reactive Ion Etching (dt. reaktives Ionentiefätzen, auch als „Bosch-Prozess“ bekannt)
DxC	Diagnostics Cartridge (dt. Diagnose-Kartusche)
DxU	Diagnostics Unit (dt. Diagnose-Einheit)
ED	Elektrische Doppelschicht
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EH	Erythrozytenhäutchen („Ghosts“)
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EMW	Elektrifizierte Mikrowanne
ENIG	Electroless Nickel Immersion Gold (PCB-Endoberfläche)
EOF	Elektroosmotischer Fluss
EP	Elektrophorese
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
EPISPOT	EPithelial ImmunoSPOT
ER	Estrogenrezeptor
EV	Extrazelluläres Vesikel
evtl.	Eventuell
EZ	Einheitszelle
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum (dt. Fetales Kälberserum)
FDA	Food and Drug Administration
FEM	Finite-Elemente-Methode
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
Flash	Digitaler Speicherbaustein
FPGA	Field Programmable Gate Array
FR4	Flame Retardant 4
FTDI	Future Technology Devices International
GND	Ground (dt. Erdung)
GSM	Global System for Mobile Communications

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung

ABKÜRZUNG	BESCHREIBUNG
GUI	Graphical User Interface
H_2O	Wasser
H_3O^+	Oxonium-Ion
Hb	Hämoglobin
HbO_2	Oxygeniertes Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HCO_3^-	Hydrogencarbonat-Ion
HDI	High Density Interconnect
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HiCN	Hämiglobincyanid
HMDS	Hexamethyldisilazan
I²C	Inter-Integrated Circuit
IC	Integrated Circuit
ID	Innendurchmesser
IFC	Integrated Fluidic Circuit
IMDM	Iscove Modified Dulbecco Medium
ITO	Indium Tin Oxide (dt. Indiumzinnoxid)
K^+	Kalium-Ion
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
$KHCO_3$	Kaliumhydrogencarbonat
KOH	Kalilauge
LCM	Laser Capture Microdissection
LED	Light Emitting Diode
LoC	Lab-on-a-Chip
LSC	Laser Scanning Cytometry
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting
MEMS	Microelectromechanical System
Mg^{2+}	Magnesium-Ion
MW	*Maxwell-Wagner*
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
Na^+	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
nDEP	Negative Dielektrophorese

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung

ABKÜRZUNG	BESCHREIBUNG
NGS	Next-Generation Sequencing
NH_3	Ammoniak
NH_4^+	Ammonium-Ion
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
NIH	National Institutes of Health
OET	Optoelectronic Tweezers
OH^-	Hydroxid-Ion
OT	Optical Tweezers
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PC	Polycarbonat
PCB	Printed Circuit Board
(qRT-) PCR	(Quantitative Echtzeit-) Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Partial Differential Equation
pDEP	Positive Dielektrophorese
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PI	Polyimid bzw. Propidiumiodid
PMIC	Power management integrated circuit
PMMA	Polymethylmethacrylat
PO_4^{3-}	Phosphat-Ion
PoC	Point-of-Care
pp	Peak-to-Peak (dt. Spitze-zu-Spitze)
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PSA	Prostataspezifisches Antigen
PSMA	Prostataspezifisches Membranantigen
PTFE	Polytetrafluorethylen
PWM	Pulsweitenmodulation
RAM	Random-Access Memory
RBC	Red Blood Cell (dt. rotes Blutkörperchen bzw. Erythrozyt)
REF	Referenznummer (Hersteller oder Lieferant)

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung

ABKÜRZUNG	BESCHREIBUNG
REM	Rasterelektronenmikroskop
RFID	Radio-Frequency Identification
RMS	Root-Mean-Square (dt. quadratischer Mittelwert bzw. Effektivwert)
RNA	Ribonucleic Acid (dt. Ribonukleinsäure)
ROM	Read-Only Memory
ROT	Elektrorotation
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RTI	Respiratory Tract Infection
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
SER	Serielle Datenübertragung
Si	Silizium
Si_3N_4	Siliziumnitrid
SiO_2	Siliziumdioxid
SO_4^{2-}	Sulfat-Ion
s. o.	Siehe oben
sRGB	Standard-RGB (Rot-Grün-Blau)
STI	Sexually Transmitted Infection
s. u.	Siehe unten
TEMP	Temperatur (-sensor)
tiff	Tagged Image File Format
TPU	Thermoplastisches Polyurethan
twDEP	Travelling-Wave DEP
UART	Universal Asynchronous Receiver Transmitter
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
USB	Universal Serial Bus
UV	Ultraviolett
vgl.	Vergleiche
VIS	Visible (dt. sichtbar)
VLSI	Very Large Scale Integration
VR	Volume Reduction

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung

ABKÜRZUNG	BESCHREIBUNG
VRI	Viral Respiratory Infections
w/o	Without (dt. ohne)
WBC	White Blood Cell (dt. weißes Blutkörperchen bzw. Leukozyt)
WGA	Whole Genome Amplification
z. B.	Zum Beispiel

VERZEICHNIS DER WICHTIGSTEN SYMBOLE

Allgemeine Symbole

SYMBOL	BESCHREIBUNG	EINHEIT
GRIECHISCH		
λ_{ex} & λ_{em}	Wellenlängen beim Anregungs- und Emissionsmaximum	m
Ω_Z	Winkelgeschwindigkeit bei zentrifugal-betriebenen Mikrofluidiksystemen	rad s^{-1}
LATEINISCH		
A	(Körper-) Fläche	m^2
$\overline{F}_{ext}$	Vektor aller in Summe auf ein Partikel wirkenden externen Kräfte	N
m_p	Masse eines Partikels	kg
R	Charakteristische Größe eines allgemeinen Körpers bzw. (Außen-) Radius eines sphärischen Partikels	m
t	Zeit	s
V	(Körper-) Volumen	m^3

Mathematische Symbole

SYMBOL	BESCHREIBUNG	EINHEIT
NOTATION		
$\underline{\underline{\underline{\underline{a}}}}^{(m)}$	Tensor m-ter Stufe	–
$\underline{\overline{a}}$	Vektor (= Tensor der Stufe $m = 1$)	–
$\underline{a}$	Komplexe Zahl	–
$a!$	Fakultät, $a! = a \cdot (a-1) \cdot \ldots \cdot 3 \cdot 2 \cdot 1$	–
$a!!$	Doppelfakultät, $a!! = \begin{cases} a \cdot (a-2) \cdot \ldots \cdot 6 \cdot 4 \cdot 2, & \text{für } a \text{ gerade} \\ a \cdot (a-2) \cdot \ldots \cdot 5 \cdot 3 \cdot 1, & \text{für } a \text{ ungerade} \end{cases}$	–
$\hat{\mathrm{e}}_x$, $\hat{\mathrm{e}}_y$ & $\hat{\mathrm{e}}_z$	Kartesische Einheitsvektoren in x-, y- & z -Richtung	m
i	Imaginäre Einheit, $\mathrm{i} = \sqrt{-1}$	1
Im $[\ldots]$	Imaginärteil von ...	–
Re $[\ldots]$	Realteil von ...	–
$\overline{r}$	Kartesischer Ortsvektor, $\overline{r} = \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} = (x, y, z)^{\mathrm{T}}$	m
$\ll$ & $\gg$	Vergleichszeichen „sehr viel kleiner als“ & „sehr viel größer als“	–
$\sim$	Ungefähr	–
$\approx$	Ungefähr gleich	–
$\equiv$	Per Definition gleich	–
$\propto$	Proportional zu	–
OPERATOR		
$\lvert \ldots \rvert$	Betrags-Operator	–
$\langle \ldots \rangle$	Zeitmittelungs-Operator (RMS-Wert)	–
$\cdot$	Skalarprodukt für kartesische Vektoren	–
$\times$	Kreuzprodukt für kartesische Vektoren	–
*	Komplexe Konjugation	–
∇	Nabla-Operator, $\nabla = \begin{pmatrix} \frac{\partial}{\partial x} \\ \frac{\partial}{\partial y} \\ \frac{\partial}{\partial z} \end{pmatrix} = \left(\frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial}{\partial y}, \frac{\partial}{\partial z} \right)^{\mathrm{T}}$	m^{-1}
$\frac{\partial f}{\partial x_m}$	Partielle Ableitung der Funktion f nach dem m-ten Argument x_m	–

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung

SYMBOL	BESCHREIBUNG	EINHEIT
$\frac{\mathrm{d}}{\mathrm{d}t}$	Zeitliche Ableitung	–
$\nabla\cdot$	Divergenz-Operator	m^{-1}
$\nabla\times$	Rotations-Operator	m^{-1}
Δ	Laplace-Operator, $\Delta = \nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}$	m^{-2}

Strömungsmechanik in Mikrofluidiksystemen

SYMBOL	BESCHREIBUNG	EINHEIT
GRIECHISCH		
Δp	Hydraulische Druckdifferenz zwischen In- und Outlet eines Mikrofluidikkanals, $\Delta p = p_{\text{in}} - p_{\text{out}}$	Pa
η	Dynamische Viskosität	Pa s
ρ_{m}	Massendichte umgebendes Medium	kg m^{-3}
ρ_{p}	Massendichte Partikel	kg m^{-3}
LATEINISCH		
$\overline{f}_V$	Vektor einer äußeren Gesamt-Volumenkraft je Einheitsvolumen	N m^{-3}
$\overline{F}_{\text{A}}$	Vektor der statischen Auftriebskraft	N
$\overline{F}_{\text{G}}$	Vektor der Gewichtskraft	N
$\overline{F}_{\text{Sed}}$	Vektor der Sedimentationskraft	N
$\overline{F}_{\text{Stokes}}$	Vektor der *Stokes*-Kraft	N
g	Erdbeschleunigungskonstante, $g = 9{,}806\ \text{m/s}^2$	m s^{-2}
h	Kanalhöhe	m
l	Kanallänge	m
l_0	Charakteristische Kanaldimension (Definition der Reynolds-Zahl)	m
p	Hydraulischer Druck	Pa
Q	Volumenstrom	m^3 s^{-1}
Re	Reynolds-Zahl	1
$\overline{v}$	Vektor der Fluidgeschwindigkeit	m s^{-1}
v_0	Charakteristische Strömungsgeschwindigkeit (Definition der Reynolds-Zahl)	m s^{-1}
$\overline{v}_{\text{p}}$	Vektor der Partikelgeschwindigkeit	m s^{-1}
$\overline{v}_{\text{rel}}$	Vektor der Relativgeschwindigkeit zwischen Fluid und Partikel	m s^{-1}
$\overline{v}_{\text{Sed}}$	Sedimentationsgeschwindigkeit Partikel	m s^{-1}
w	Kanalbreite	m

Partikelmanipulation per Dielektrophorese: Theorie und praktische Anwendung

SYMBOL	BESCHREIBUNG	EINHEIT
GRIECHISCH		
α	Polarisationsfaktor	$\mathrm{C\,V^{-1}\,m^{-1}}$
δ_{mem}	Dicke Plasmamembran	m
$\varepsilon'(\omega)$	Frequenzabhängiger Realteil der absoluten komplexen Permittivität	$\mathrm{F\,m^{-1}}$
$\varepsilon''(\omega)$	Frequenzabhängiger Imaginärteil der absoluten komplexen Permittivität	$\mathrm{F\,m^{-1}}$
ε_0	Elektrische Feldkonstante, $\varepsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12}\ \mathrm{F/m}$	$\mathrm{F\,m^{-1}}$
ε_{r}	Relative Permittivität eines Dielektrikums	1
ε	Absolute reelle Permittivität (= DC-Permittivität)	$\mathrm{F\,m^{-1}}$
$\varepsilon_{\mathrm{ED}}$	Absolute reelle Permittivität elektrische Doppelschicht	$\mathrm{F\,m^{-1}}$
ε_{m}	Absolute reelle Permittivität umgebendes Medium	$\mathrm{F\,m^{-1}}$
ε_{p}	Absolute reelle Permittivität Partikel	$\mathrm{F\,m^{-1}}$
$\varepsilon_{\mathrm{mem}}$	Absolute reelle Permittivität Plasmamembran	$\mathrm{F\,m^{-1}}$
$\varepsilon_{\mathrm{cyt}}$	Effektive absolute reelle Permittivität des Zellinneren	$\mathrm{F\,m^{-1}}$
$\underline{\varepsilon}(\omega)$	Frequenzabhängige absolute komplexe Permittivität	$\mathrm{F\,m^{-1}}$
$\underline{\varepsilon}_{\mathrm{ED}}(\omega)$	Frequenzabhängige absolute komplexe Permittivität elektrische Doppelschicht	$\mathrm{F\,m^{-1}}$
$\underline{\varepsilon}_{\mathrm{m}}(\omega)$	Frequenzabhängige absolute komplexe Permittivität umgebendes Medium	$\mathrm{F\,m^{-1}}$
$\underline{\varepsilon}_{\mathrm{p}}(\omega)$	Frequenzabhängige absolute komplexe Permittivität Partikel	$\mathrm{F\,m^{-1}}$
$\underline{\varepsilon}_{\mathrm{mem}}(\omega)$	Frequenzabhängige absolute komplexe Permittivität Plasmamembran	$\mathrm{F\,m^{-1}}$
$\underline{\varepsilon}_{\mathrm{cyt}}(\omega)$	Effektive frequenzabhängige absolute komplexe Permittivität des Zellinneren	$\mathrm{F\,m^{-1}}$
ρ	Elektrische Raumladungsdichte	$\mathrm{C\,m^{-3}}$
σ	Elektrische Leitfähigkeit	$\mathrm{S\,m^{-1}}$
σ_{ED}	Elektrische Leitfähigkeit elektrische Doppelschicht	$\mathrm{S\,m^{-1}}$

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung

SYMBOL	BESCHREIBUNG	EINHEIT
σ_m	Elektrische Leitfähigkeit umgebendes Medium	$\mathrm{S\,m^{-1}}$
σ_p	Elektrische Leitfähigkeit Partikel	$\mathrm{S\,m^{-1}}$
σ_mem	Elektrische Leitfähigkeit Plasmamembran	$\mathrm{S\,m^{-1}}$
σ_cyt	Effektive elektrische Leitfähigkeit des Zellinneren	$\mathrm{S\,m^{-1}}$
τ	Relaxationszeit/Zeitkonstante	s
τ_α	Relaxationszeit der α-Dispersion	s
$\tau_\alpha^{(\mathrm{ED})}$	Relaxationszeit der elektrischen Doppelschicht	s
$\tau_\beta = \tau_\mathrm{MW}$	Relaxationszeit der β-Dispersion (= Relaxationszeit der *Maxwell-Wagner*-Grenzflächenpolarisation)	s
τ_D	*Debye*-Relaxationszeit	s
$\tau_\mathrm{MW}^{(\mathrm{cyt})}$	Relaxationszeit der Grenzfläche zwischen Zellinnerem und Plasmamembran	s
$\tau_\mathrm{MW}^{(\mathrm{mem})}$	Relaxationszeit der Grenzfläche zwischen Plasmamembran und Medium	s
ϕ	Elektrostatisches Potential	V
ω	(Betriebs-) Kreisfrequenz, $\omega = 2\pi f$	$\mathrm{rad\,s^{-1}}$
$\omega_{\mathrm{xo},1}$	Untere (erste) DEP-Crossover-Kreisfrequenz	$\mathrm{rad\,s^{-1}}$
$\omega_{\mathrm{xo},2}$	Obere (zweite) DEP-Crossover-Kreisfrequenz	$\mathrm{rad\,s^{-1}}$
Ω_ROT	Elektrorotations-Winkelgeschwindigkeit	$\mathrm{rad\,s^{-1}}$
LATEINISCH		
$\overline{B}$	Vektor der magnetischen Flussdichte	$\mathrm{V\,s\,m^{-2}}$
c_mem	Spezifische Kapazität Plasmamembran	$\mathrm{F\,m^{-2}}$
$\overline{D}$	Vektor der elektrischen Flussdichte	$\mathrm{C\,m^{-2}}$
$\overline{d}^{(n)}$	Abstandsvektor des elektrischen Multipol-Moments n-ter Ordnung	m
$\underline{\overline{E}}$	Allgemeiner komplexwertiger Vektor der elektrischen Feldstärke, $\underline{\overline{E}} = \overline{E}_\mathrm{R} + \mathrm{i}\overline{E}_\mathrm{I}$	$\mathrm{V\,m^{-1}}$
$\overline{E}_\mathrm{R}$	Realteil des komplexen elektrischen Feldstärkevektors	$\mathrm{V\,m^{-1}}$
$\overline{E}_\mathrm{I}$	Imaginärteil des komplexen elektrischen Feldstärkevektors	$\mathrm{V\,m^{-1}}$
$\lvert\nabla E^2\rvert$	Feldinhomogenität der DEP-Kraft	$\mathrm{V^2\,m^{-3}}$
$\overline{F}_\mathrm{DEP}^{(n)}$	Vektor der multipolaren DEP-Kraft n-ter Ordnung	N

Tabelle wird fortgesetzt...

...Fortsetzung

SYMBOL	BESCHREIBUNG	EINHEIT
$\overline{F}_{\mathrm{DEP}}$	Vektor der (Gesamt-) DEP-Kraft	N
$\overline{F}_{\mathrm{EP}}$	Vektor der *Coulomb*-Kraft auf ein elektrisch geladenes Partikelchen (Elektrophorese)	N
f	(Betriebs-) Frequenz, $f = \frac{\omega}{2\pi}$	Hz
$f_{\mathrm{xo},1}$	Untere (erste) DEP-Crossover-Frequenz	Hz
$f_{\mathrm{xo},2}$	Obere (zweite) DEP-Crossover-Frequenz	Hz
$\underline{f}_{\mathrm{CM}}^{(n)}$	Komplexer *Clausius-Mossotti*-Faktor n-ter Ordnung	1
g_{mem}	Spezifischer Leitwert Plasmamembran	S m^{-2}
$\overline{j}$	Vektor der elektrischen Stromdichte	A m^{-2}
L	Charakteristische Systemgröße	m
n	Ordnung von induziertem Multipol-Moment, multipolarer DEP-Kraft und multipolarem DEP-Drehmoment, $n \in \mathbb{N} = \{1, 2, 3, \ldots\}$	1
N	Dipol-Dichte (= Anzahl Dipole pro Volumen)	m^{-3}
$\underline{\overline{\overline{p}}}^{\,(n)}$	Komplexer Tensor des elektrischen Multipol-Moments n-ter Ordnung	C m
$\overline{P}$	Vektor der elektrischen Polarisation	A s m^{-2}
q	Elektrische Ladung	C
$\overline{T}_{\mathrm{DEP}}^{(n)}$	Vektor des multipolaren DEP-Drehmoments n-ter Ordnung	N m
U	Betriebsspannung	V
$\underline{Z}$	Komplexe Impedanz	Ω
$\underline{Z}_{\mathrm{ED}}$	Komplexe Impedanz elektrische Doppelschicht	Ω
$\underline{Z}_{\mathrm{m}}$	Komplexe Impedanz Medium	Ω
$\underline{Z}_{\mathrm{mem}}$	Komplexe Impedanz Plasmamembran	Ω
$\underline{Z}_{\mathrm{cyt}}$	Effektive komplexe Impedanz des Zellinneren	Ω

„Egal, Hauptsache: Hände, Beine!“

— Ein guter, alter Freund...

DANKSAGUNG

Nichts passiert einfach von alleine. Und so kommt selbst die kleinste Aufgabe selten ohne die Unterstützung anderer aus. In meinem Fall haben mich während der Entstehung dieser Arbeit im Zeitraum von September 2018 bis März 2024 unzählige Menschen begleitet und auf die verschiedensten Art und Weisen unterstützt. All diesen Menschen möchte ich hiermit von Herzen für deren Aufopferung, Zeit und Geduld danken, denn ohne Sie hätte ich diese intensive Phase niemals überstanden.

Ich danke Dr. Sonja Knies und Dr. Jochen Hoffmann, welche mir die Tür in die Welt der Industrieforschung bei Bosch eröffnet haben. Sie haben vermutlich nicht geahnt, dass sie mein Leben dadurch vollkommen auf den Kopf stellen sollten. Jochen: Dir sei von Herzen weiterhin nicht nur für sämtlichen fachlich-strategischen, sondern auch für unseren privaten Austausch, der mich immer wieder auf sehr erfrischende Perspektiven gebracht hat, gedankt.

Dr. Anne Serout möchte ich herzlich dafür danken, dass sie mir während meiner Promotionszeit in allen Belangen den Rücken freigehalten und an mich geglaubt hat. Anne: Mit Sicherheit war es häufig ein Auf und Ab, doch glaube und hoffe ich, dass wir am Ende zusammen immer die beste Lösung für alle gefunden haben. Vielen Dank für deine ehrliche und zielführende Art, die uns an sehr vielen Stellen entscheidend vorangrebracht hat!

Dr. Jochen Feichtinger und Dr. André Kretschmann sei vielmals für das entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit gedankt, nicht nur meine Doktorarbeit, sondern ebenfalls meinen Beruf im Umfeld des Healthcare- und Mikrosystemtechnik-Bereichs in der Forschung bei Bosch durchführen zu dürfen. Dies hat mich nicht nur persönlich enorm weiterentwickelt, sondern wird meiner Familie und mir in Zukunft zweifellos noch sehr viel ermöglichen! Jochen, André: Ich hoffe, ihr nehmt es mir nicht Übel, dass wir ab und zu durchaus auch in energischere Diskussionen geraten konnten. Ich bin sehr dankbar für alles!

Obwohl uns berufliche Umstände bald getrennt haben, möchte ich mich auch bei Dr. Christoph Faigle von Herzen für die Betreuung während meiner Anfangszeit bei Bosch bedanken – insbesondere während meiner Masterarbeit! Ich bin sehr froh und dankbar, dass wir uns kennenlernen durften. Brudi: Ich habe Vieles von dir gelernt und danke dir für alles!

Mein Dank und größter Respekt geht weiterhin an Dr. Franz Lärmer, welcher sich bereit erklärt hat, die Betreuung meiner Doktorarbeit bei Bosch zu übernehmen. Es war eine unbeschreibliche Erfahrung mit dir, Franz, und ich bezweifle ernsthaft, ob mir jemals wieder ein Mensch deines Formats über den Weg laufen wird! Vielen

herzlichen Dank für deine Unterstützung, die vielen fruchtbaren Diskussionen und die Korrektur dieser Arbeit! Es war mir eine sehr große Ehre, mit dir zusammenarbeiten zu dürfen!

Ein ganz besonderer Dank geht an alle (ehemaligen) Doktorandinnen und Doktoranden sowie Orga-Teams bei Bosch, die mich auf dieser langen Reise begleitet und unterstützt haben. Vor allem danke ich Hannah Bott, Tabea Hein, Anne Hoffmann, Faris Janjoš, Janik Kärcher, Manuel Loskyll, Astrid Lux, Jan Müller, Luise Nagel, Daniel Podbiel, Robert Šag, Carina Schüßler, Fabian Sturm, Héloïse Vincent, Miloš Vujadinović und Stefanie Wagner. Mir hat das Miteinander mit euch und die vielen gemeinsamen Aktivitäten, die auch außerhalb des Berufslebens stattgefunden haben, sehr viel Spaß gemacht! Vielen herzlichen Dank euch allen zusammen und alles Gute auf euren weiteren Wegen!

Selbstverständlich richtet sich meine Danksagung auch an alle Studentinnen und Studenten sowie Praktikantinnen und Parkitkanten, die mir in den letzten Jahren bei Bosch begegnet sind. Mein größter Dank geht an Tianxing Du, Patrick Häubi und Pavel Takana. Es war eine sehr aufregende und lehrreiche Zeit mit euch, die ich nie vergessen werde! Vielen herzlichen Dank für die unzähligen Stunden der Diskussionen und Gespräche, fachlich wie auch privat. Ich bin mit euch sehr gewachsen!

Ein herzliches Dankeschön gebührt natürlich auch allen Kolleginnen und Kollegen bei Bosch (vor allem im Healthcare-Team sowie in den Abteilungen CR/ATM und CR/ATC), die mir mit ihrer Expertise und Erfahrung in sehr vielen Situationen weitergeholfen haben. Hierzu gehören unter anderen Andrea Anger, Dr. Yvonne Beyl, Thomas Buck, Dr. Martina Budde, Dr. Michael Ćurčić, Dr. Michael Dreschmann, Dieter Elbe, Sarona Frank, Katharina Frenzel, Peter Frey, Dr. Simon Genter, Dr. Ulrich Hasenkox, Heidrun Heidebreck, Dr. Gabriele Kirschbaum, Nils Kummer, Ulrich Kunz, Dr. Sonja Küllmer, Dr. Ronny Leonhardt, Marcus Liebler, Dr. Anja Lippert, Dr. Katrin Luckert, Tanja Maucher, Sabine Nagel, Manuela Neumann, Dr. Daniel Pantel, Dr. Sebastian Pilsl, Dr. Ingo Ramsteiner, Dr. Franziska Rohlfing, Dr. Michael Stumber, Dr. Anke Timm und Dr. Eva Weimer.

Experimentelle Untersuchungen wären in dieser Arbeit ohne die Unterstützung des MED-Teams in Renningen nicht denkbar gewesen. Dieses half uns unzählige Male – auch sehr spontan – mit der Abnahme von Blut aus. Aus diesem Grund sei dem Betriebsarzt Herrn Dr. med. Uwe Steiner und seinem Team ein großes Dankeschön ausgesprochen!

Eine wichtige Konstante für mich waren stets Dr. Aaron Dörr, Alicia Geier, Dr. Christian Grumaz, Michael Knapp, Dr. Stefan Noll, Oliver Peters und Dr. Bernd Scheufele. Ich bin euch sehr dankbar, dass ihr während meiner Promotionszeit (und auch danach) da wart und stets ein offenes Ohr für mich hattet. Ich wüsste ehrlich nicht, was ich ohne euch gemacht hätte. Ich danke euch allen sehr!

Bei dieser Gelegenheit möchte ich mich ebenfalls bei zahlreichen Angestellten der Fa. Gegenbauer (bzw. Apleona) und Fa. Köter sowie bei vielen Angestellten des Mitarbeiterrestaurants und Facilitymanagements am Bosch-Standort in Renningen be-

danken. Ihr habt mir den Aufenthalt in vielerlei Hinsicht angenehmer gemacht. Danke dafür!

Ich möchte mich außerdem auch bei Prof. Dr. Peter Unger und Prof. Dr.-Ing. Karsten Seidl bedanken, die sich freundlicherweise als Zweit- und Drittgutachter dieser Arbeit bereit erklärt haben.

Abschließend möchte ich allen voran Prof. Dr.-Ing. Steffen Strehle herzlich dafür danken, dass er sich meiner als Doktorvater angenommen hat! Steffen: Du konntest mich auch in den schwierigsten Zeiten mit weisem Rat und aufbauenden Worten positiv stimmen und stets auf den Boden der Klarheit bringen. Dass in Wirklichkeit der Weg das Ziel der Reise war, habe ich durch dich verstanden. So klein dein Beitrag am Ganzen für dich womöglich erscheinen mag, so viel hat er mir auf jeden Fall bedeutet. Ich danke dir nicht nur sehr für die Planung und Korrektur der Arbeit, sondern für alles, was du mir mitgegeben hast!

Diejenigen, die mir nicht nur diese Arbeit, sondern weiterhin alles andere im Leben überhaupt erst ermöglicht haben, sind meine Freunde und meine Familie. Ich bin unendlich dankbar, dass mir ein solches Glück zuteil steht, euch zu haben. Ich danke und liebe euch und werde ebenso immer für euch da sein!

Ganz besonders möchte ich mich noch zutiefst bei allen geliebten Menschen entschuldigen, welche in den letzten Jahren meiner Arbeit zum Opfer gefallen sind. Leider ist mir bewusst, dass sich viele von euch vernachlässigt gefühlt und gezwungen gesehen haben, getrennte Wege einzuschlagen. Ihr sollt bitte wissen: Ich habe es niemals persönlich gemeint und freue mich darauf, euch im Leben früher oder später wieder zu begegnen!

Vielen Dank an alle, hvala vam svima!

In Liebe,

Euer Samir

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Samir Kadić, die von mir vorgelegte Arbeit

„Mikrofluidische Komponenten für die Vollblut-Aufbereitung und Einzelzell-Isolation in der Liquid Biopsy“

selbstständig verfasst zu haben.

Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Arbeiten anderer entnommen sind, habe ich als entnommen kenntlich gemacht. Sämtliche Quellen und Hilfsmittel, die ich für diese Arbeit benutzt habe, sind angegeben. Die Arbeit hat mit gleichem Inhalt bzw. in wesentlichen Teilen noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Langenau, 23. März 2025

Samir Kadić

PUBLIKATIONSLISTE

JOURNAL-ARTIKEL

- Michael Knapp, Samir Kadić, Astrid Lux, Nils Paust, Roland Zengerle und Jochen Hoffmann. „Highly efficient isolation and multistep analysis of tumor cells from whole blood“. In: *Lab on a Chip* (2025). DOI: 10.1039/D4LC00759J.
- Marek Kapitz, Stefan aus der Wiesche, Samir Kadić und Steffen Strehle. „An experimental test of the Mocikat-Herwig theory of local turbulent heat transfer measurements on cold objects“. In: *Heat and Mass Transfer* 58 (2021), S. 1041–1055. DOI: 10.1007/s00231-021-03158-y.

KONFERENZBEITRÄGE

- Héloïse Vincent, Samir Kadić, Martina Budde, Franz Lärmer, Anne Serout und Karsten Seidl. „Isolierung von zirkulierenden Tumorzellen aus Liquid Biopsies: Entwicklung und Simulation eines neuartigen elektrifizierten mikrofluidischen Chips“. In: *microTEC Südwest Clusterkonferenz 2025*. 2025.
- Héloïse Vincent, Samir Kadić, Martina Budde, Franz Lärmer, Anne Serout und Karsten Seidl. „Isolation of Circulating Tumor Cells from Liquid Biopsies: Introduction and Simulation of a Novel Electrified Microfluidic Chip“. In: *EACR 2024 Lyon*. 2024.
- Michael Knapp, Samir Kadić, Nils Paust, Roland Zengerle und Jochen Hoffmann. „Highly Efficient Isolation and Multistep Analysis of Tumor Cells from Whole Blood“. In: *µTAS 2024 Montréal Canada*. 2024.
- Samir Kadić, Michael Knapp, Jochen Hoffmann, Anne Serout, Steffen Strehle und Franz Lärmer. „Let it Sediment – A Novel Microfluidic Sample Preparation Strategy for the Unbiased Analysis of Single Nucleated Cells from Whole Blood“. In: *µTAS 2024 Montréal Canada*. 2024.
- Michael Knapp, Marvin Heyer, Samir Kadić, Astrid Lux, Franz Lärmer, Nils Paust, Roland Zengerle und Jochen Hoffmann. „Quantifizierung zirkulierender Tumorzellen aus Vollblut mittels Silizium-Mikrochips“. In: *MikroSystemTechnik Kongress 2023: Mikroelektronik / Mikrosystemtechnik und ihre Anwendungen – Nachhaltigkeit und Technologiesouveränität*. 2023. ISBN: 978-3-8007-6203-3.
- Michael Knapp, Matthias Ege, Samir Kadić, Astrid Lux, Franz Lärmer, Nils Paust, Roland Zengerle und Jochen Hoffmann. „Quantification of Circulating Tumor Cells from Whole Blood using Silicon Microchips“. In: *ACTC 2023 Skiathos*. 2023.
- Anne Serout, Samir Kadić, Carina Schüßler, Michael Stumber, Bernd Scheufele und Franz Lärmer. „µ-Total Analysis System für Anwendungen in der Onkologie“. In: *microTEC Südwest Clusterkonferenz 2022: Das Netzwerktreffen der Mikrosystemtechnik*. 2022.

- Anne Serout, Daniel Podbiel, Hannah Bott, Samir Kadić, Jochen Hoffmann und Franz Lärmer. „Rapid Prototyping Platform for µ-Total Analysis Systems“. In: *MikroSystemTechnik Kongress 2021: Mikroelektronik / Mikrosystemtechnik und ihre Anwendungen — Innovative Produkte für zukunftsfähige Märkte*. 2021. ISBN: 978-3-8007-5656-8.

- Samir Kadić, Tianxing Du, Astrid Lux, Aaron Dörr, Michael Knapp, Jochen Hoffmann, Anne Serout, Steffen Strehle und Franz Lärmer. „Hoch-sensitive und vollautomatisierte Quantifizierung von zirkulierenden epithelialen Tumorzellen aus Vollblut“. In: *MikroSystemTechnik Kongress 2021: Mikroelektronik / Mikrosystemtechnik und ihre Anwendungen — Innovative Produkte für zukunftsfähige Märkte*. 2021. ISBN: 978-3-8007-5656-8.

- Samir Kadić, Pavel Takana, Michael Dreschmann, Thomas Buck, Aaron Dörr, Anne Serout, Jochen Hoffmann, Steffen Strehle und Franz Lärmer. „Precision Meets High Throughput – Contactless Single-Cell Sorting Using an Electrically Passive Microwell Array“. In: *µTAS 2021 Palm Springs California Hybrid (In-Person & Virtual): The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. Bd. 25. 2021. ISBN: 978-1-73341-903-1.

PATENTE

- Astrid Lux, Michael Knapp und Samir Kadić. „Method and device for unmasking biological cells via plasmin activation“. Pat. WO2025002764A1. Robert Bosch Gmbh. 29. Juni 2023. URL: https://patents.google.com/patent/WO2025002764A1.
- Franz Lärmer, Jochen Feichtinger, Jochen Hoffmann, Samir Kadić, Christian Grumaz, Michael Knapp und Astrid Lux. „Microfluidic device and method for depleting leukocytes in a sample“. Pat. WO2024235855A2. Robert Bosch Gmbh. 12. Mai 2023. URL: https://patents.google.com/patent/WO2024235855A2.
- Anke Timm, Samir Kadić, Christian Grumaz, Sebastian Pilsl, Michael Knapp und Astrid Lux. „Combined cell-specific labelling and enrichment of biomarkers“. Pat. WO2024083474A1. Robert Bosch Gmbh. 19. Oktober 2022. URL: https://patents.google.com/patent/WO2024083474A1.
- Anne Hoffmann, Christian Grumaz, Hannah Bott, Samir Kadić, Franz Lärmer und Sebastian Pilsl. „Method for quantifying a nucleic acid solution and microfluidic analysis device“. Pat. WO2024012839A1. Robert Bosch Gmbh. 13. Juli 2022. URL: https://patents.google.com/patent/WO2024012839A1.
- Samir Kadić, Janik Kärcher, Tianxing Du, Britta Schulze und Franz Lärmer. „Microfluidic system having an ion exchanger mixed-bed resin“. Pat. WO2023247280A1. Robert Bosch Gmbh. 22. Juni 2022. URL: https://patents.google.com/patent/WO2023247280A1.
- Samir Kadić, Thomas Buck, Franz Lärmer, Michael Dreschmann, Jochen Hoffmann und Anne Serout. „Method and device for trapping at least one nucleated cell using at least one electrode for a microfluidic device“. Pat. WO2022223566A1. Robert Bosch Gmbh. 20. April 2022. URL: https://patents.google.com/patent/WO2022223566A1.
- Samir Kadić, Tianxing Du, Franz Lärmer, Jochen Hoffmann und Anne Serout. „Process for detecting nucleus-containing cells in a sample liquid of a patient using a microfluidic device and microfluidic device“. Pat. WO2022223593A1. Robert Bosch Gmbh. 20. April 2021. URL: https://patents.google.com/patent/WO2022223593A1.
- Ingo Ramsteiner und Samir Kadić. „Apparatus and method for analyzing biological particles“. Pat. DE102021201147A1. Robert Bosch Gmbh. 8. Februar 2021. URL: https://patents.google.com/patent/DE102021201147A1.
- Samir Kadić, Christoph Faigle und Tino Frank. „Device for trapping target cells in a blood vessel“. Pat. DE102020202271A1. Robert Bosch Gmbh. 21. Februar 2020. URL: https://patents.google.com/patent/DE102020202271A1.
- Samir Kadić und Christoph Faigle. „Microfluidic channel element for improved separation of target particles from non-target particles within a medium on the basis of dielectrophoresis“. Pat. DE102020202274A1. Robert Bosch Gmbh. 21. Februar 2020. URL: https://patents.google.com/patent/DE102020202274A1.

- Samir Kadić, Julian Kassel und Daniel Czurratis. „Positioning device for positioning a workpiece on a surface and method for positioning a workpiece on a surface“. Pat. DE102019212234A1. Robert Bosch Gmbh. 15. August 2019. URL: https://patents.google.com/patent/DE102019212234A1.
- Samir Kadić, Jochen Hoffmann und Christoph Faigle. „Microfluidic device and analysis unit for a microfluidic device“. Pat. WO2020144105A1. Robert Bosch Gmbh. 8. Januar 2019. URL: https://patents.google.com/patent/WO2020144105A1.
- Samir Kadić und Christoph Faigle. „Device for dielectrophoretic capture of particles“. Pat. WO2020007703A1. Robert Bosch Gmbh. 4. Juli 2018. URL: https://patents.google.com/patent/WO2020007703A1.
- Samir Kadić und Christoph Faigle. „Device for the simultaneous dielectrophoretic capture of several particles of different types“. Pat. DE102018210993A1. Robert Bosch Gmbh. 4. Juli 2018. URL: https://patents.google.com/patent/DE102018210993A1.
- Samir Kadić und Christoph Faigle. „Electrode assembly for a microfluidic device, in particular for a microfluidic flow cell, and method“. Pat. WO2020002541A1. Robert Bosch Gmbh. 29. Juni 2018. URL: https://patents.google.com/patent/WO2020002541A1.

AKADEMISCHER LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN



Vor- und Nachname	Samir Kadić
Geburtsort	Ulm

AUSBILDUNG

09/2018 – 10/2021	Doktorand, Robert Bosch GmbH Renningen (Zentrum für Forschung und Vorausentwicklung) Abschluss: Dr.-Ing. (Abschlussnote: Summ cum laude) Titel der Dissertation: „Mikrofluidische Komponenten für die Vollblut-Aufbereitung und Einzelzell-Isolation in der Liquid Biopsy“
09/2015 – 07/2018	Studium Elektrotechnik, Universität Ulm Abschluss: Master of Science (Abschlussnote: 1,2) Vertiefungsrichtung: Mikro-, Nano- und Optoelektronik Titel der Masterarbeit: „Entwicklung und Umsetzung eines Konzepts für die dielektrophoretische Isolation von Tumormaterial in einem Lab-on-a-Chip-System“
10/2012 – 09/2015	Studium Elektrotechnik, Universität Ulm Abschluss: Bachelor of Science (Abschlussnote: 1,3) Titel der Bachelorarbeit: „Entwicklung eines miniaturisierten Strömungssensors“
09/2003 – 06/2012	Schüler, Robert-Bosch-Gymnasium Langenau Abschluss: Abitur Kernfächer: Mathematik, Physik, Deutsch, Englisch und Spanisch

BERUFSERFAHRUNG

10/2021 – heute	Forschungsingenieur, Robert Bosch GmbH Renningen (Zentrum für Forschung und Vorausentwicklung)

Verantwortlichkeiten im Portfolio Healthcare-Solutions:
- Technologieentwicklung und -bewertung
- Technical Lead

Langenau, 23. März 2025

Samir Kadić