

# Design und Herstellung von 3D-gedruckten Microfluidics für den Einsatz in der Zellkulturtechnik

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Anton Enders, M. Sc.

2023

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper  
Institut für Technische Chemie  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Janina Bahnemann  
Institut für Physik  
Universität Augsburg

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Sascha Beutel  
Institut für Technische Chemie  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 12.10.2022

*„Wenn es aus der Hundehütte bellt, ist es meistens der Hund und nicht das Zebra.“*

*Sandra Ciesek*

## Kurzfassung

Die transiente Transfektion wird genutzt, um genetisches Material in Säugerzellen zu transportieren. Die Besonderheit liegt darin, dass die genetische Information nicht in das Genom der Wirtszellen integriert wird. Dadurch können mit diesem Transfektionsverfahren innerhalb weniger Tage kleine Proteinmengen produziert werden. Allerdings wird die eingebrachte genetische Information bei der Zellteilung nicht kopiert und auf die Tochterzellen verteilt, sodass sie mit der Zeit verloren geht. Diese Transfektionsmethode wird daher eingesetzt, wenn nur geringe Proteinmengen schnell hergestellt werden müssen, beispielsweise in vorklinischen Untersuchungen der Biopharmazeutikaentwicklung oder im akademischen Umfeld.

In dieser Arbeit wurde ein mikrofluidisches System entwickelt, das die Schritte der transienten Transfektion automatisiert. Dafür wurden die unterschiedlichen Elemente des Gesamtsystems – ein Mikromischer, eine Inkubationseinheit und ein Spiralseparator zur Zellseparation – einzeln entwickelt, mittels hochauflösendem 3D-Druck hergestellt und charakterisiert.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene Mikromischerdesigns aus der Literatur mittels 3D-Druck hergestellt und miteinander verglichen. Hierbei wurde die Effektivität der Mischer in Bezug auf ihre Länge bzw. ihr Volumen bei unterschiedlichen Flussraten bewertet und untersucht, ob die Mischer einen Einfluss auf die Viabilität der CHO-Zellen (chinesische Hamsteroovarienzellen) haben.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein mikrofluidischer Spiralseparator entwickelt und charakterisiert, um die Zellen nach der Transfektion von den toxischen Transfektionschemikalien zu trennen. Das entwickelte System erlaubt durch eine Pumpe an einem der zwei Ausgänge der Separationsspirale das Einstellen der Separationseffizienz von über 95 % bei Zellkonzentrationen von bis zu  $20 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ .

Im dritten Teil der Arbeit wurde zunächst ein kleineres mikrofluidisches Transfektionssystem entwickelt, in dem ca. 5 mL Zellsuspension transfiziert werden konnte. In dem System wurden die Zellen mit DNA und dem Transfektionsdetergens PEI (Polyethylenimin) mit einem integrierten Mikromischer durchmischt und anschließend für eine bestimmte Zeit inkubiert, bis die transfizierten Zellen in neues Medium überführt wurden. Ziel war es, die optimale Inkubationszeit zu bestimmen. In einem weiteren Schritt wurde ein kontinuierliches Gesamtsystem mit einem Mikromischer, einer Inkubationseinheit und einem Spiralseparator entwickelt, welches computergesteuert CHO-Zellen transfizieren kann. In ersten Transfektionsversuchen konnten mit dem System Transfektionseffizienzen erzielt werden, die mit der klassischen, manuell durchgeführten Methode vergleichbar sind.

**Schlagwörter:** Mikrofluidik; Transiente Transfektion; Tierzellkultivierung; Mikromischer; Zellrückhaltung; 3D-Druck

## Abstract

Transient Transfection is used to transport genetic material into mammalian cells. The distinguishing feature of transient transfection is that the genetic material does not integrate into the genome of the host cell line. Therefore, this transfection method can be used to produce small quantities of proteins in a matter of days. However, the imported genetic information does not get copied during cell proliferation and gets lost over time. Consequently, this transfection method is used to quickly produce small quantities of protein, for instance, in pre-clinical studies in biopharmaceutical development or academic research.

In this work, a microfluidic system was developed to automate the steps of transient transfection. The single modules of the system – micromixer, incubation platform and cell separator – were designed and manufactured using 3D printing technology and characterized.

In the first part of this work, different micromixer designs were adapted for 3D printing from literature and compared to one another. The effectivity of the mixers was evaluated for different flow rates with regard to the length and volume of the mixers. Moreover, the influence of the micromixer on cell viability was determined.

In the second part of this work, a microfluidic spiral separator was developed to separate the cells from the toxic transfection detergent PEI (polyethylenimine) after transfection. By using a second pump at the spiral outlet, the separation efficiency could be controlled at cell concentrations of up to  $20 \cdot 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ .

In the third part of this work, a smaller transfection system was developed for transfection of approximately 5 mL of cell suspension for optimization of the incubation time. In this system, cells were mixed with DNA and the transfection detergent PEI using an integrated micromixer and then incubated for a specified time until the transfected cells were transferred to fresh medium. Secondly, a continuous transfection system was developed consisting of a micromixer, an incubation platform, and a spiral separator to automatically transfect CHO (chinese hamster ovary) cells. In initial transfection experiments, the system was able to achieve transfection efficiencies comparable to the standard, manually performed method.

**Keywords:** Microfluidics; Transient Transfection; Mammalian Cell Culture; Micromixers; Cell Retention; 3D Printing

# Inhaltsverzeichnis

Zitat .....	II
Kurzfassung.....	III
Abstract .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
1. Einleitung .....	1
2. Zielsetzung .....	2
3. Theoretischer Hintergrund.....	3
3.1 Transiente Transfektionsverfahren.....	3
3.1.1 Chemische Transfektionsverfahren.....	5
3.1.2 Transfektion mittels Polyethylenimin .....	5
3.2 Mikrofluidische Systeme und <i>Inertial Microfluidics</i> .....	8
3.2.1 Lab-on-a-Chip Systeme in der Biotechnologie .....	10
3.2.2 <i>Inertial Microfluidics</i> .....	12
3.2.3 Mikrofluidische Transfektionssysteme.....	16
3.3 3D-Druck miniaturisierter und mikrofluidischer Systeme .....	17
4. Experimenteller Teil.....	29
4.1 3D-gedruckte mikrofluidische Mischer – eine Vergleichsstudie der Durchmischung verschiedener Mischereinheiten .....	30
4.2 3D-gedruckter mikrofluidischer Spiralseparator zur kontinuierlichen, pulsationsfreien und kontrollierbaren Zellrückhaltung von CHO-Zellen.....	48
4.3 Entwicklung eines kontinuierlichen mikrofluidischen Systems zur transienten Transfektion von CHO-Zellen.....	67
4.3.1 Transiente Transfektion mittels Batch-Transfektionssystem .....	67
4.3.2 Semi-kontinuierliches Transfektionssystem.....	69
5. Zusammenfassung und Ausblick.....	76
6. Material und Methoden .....	80
6.1 Materialien.....	80
6.2 Methoden.....	82
6.2.1 3D-Design .....	82

6.2.2	3D-Druck und Aufarbeitung.....	82
6.2.3	Zellkulturtechniken.....	82
6.2.4	Transiente Transfektion.....	84
7.	Literaturverzeichnis.....	88
8.	Abbildungsverzeichnis .....	94
9.	Tabellenverzeichnis.....	96
	Danksagung.....	97
	Betreute Abschlussarbeiten .....	98
	Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge .....	98
	Lebenslauf .....	101

Zusätzlich auf der CD verfügbar: Programmcode des Steuerungsskripts für Pumpen und Ventile

## Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
CAD	Computergestütztes Design (engl.: <i>computer-aided design</i> )
CAR-T	<i>chimeric antigen receptor</i> T-Zellen
CFD	Numerische Strömungsmechanik (engl.: <i>computational fluid dynamics</i> )
CHO	Zelllinie aus Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters (engl.: <i>chinese hamster ovary</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein (engl.: <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
engl.	Englisch
FEM	Finite-Elemente-Methode
HEK	Zelllinie humaner Embryonennierenzellen (engl.: <i>human embryonic kidney</i> )
HeLa	Zelllinie menschlicher Epithelzellen eines Zervixkarzinoms von Henrietta Lachs
LDH	Laktatdehydrogenase
PEI	Polyethylenimin
RNA	Ribonukleinsäure
STL	3D-Dateiformat, Abkürzung für Stereolithographie
UV	Ultraviolett
z. B.	zum Beispiel



# 1. Einleitung

Bei der Entdeckung einzelner Zellen als Bausteine des Lebens und der Welt der Mikroorganismen hätten sich Wissenschaftler wie Robert Hook, Antonie van Leeuwenhoek, Jan Swammerdam oder Marcello Malpighi [1] wahrscheinlich nicht träumen lassen, dass die Menschen einmal das Erbgut ebendieser entdecken und manipulieren könnten. Doch gerade dadurch hat die Menschheit nicht nur verstanden, wie das Leben auf kleinster Ebene funktioniert, sondern auch, wie man nützliche Produkte in diesen Zellen gezielt produzieren kann.

Das beeinflusst – meist unbewusst – unser aller Leben tagtäglich. Von Enzymen in Wasch- und Spülmitteln über Lebensmittel wie Käse in unseren Kühlschränken bis hin zu Medikamenten treffen wir immer wieder direkt oder indirekt auf die Produkte der Biotechnologie.

Für die Proteinproduktion werden vor allem Produktionszelllinien verwendet. Dabei kann es sich um Bakterien wie *Escherichia coli*, Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, oder aber auch Säugerzellen handeln. Die Zelllinien sind besonders gut erforscht, bieten eine hohe Produktivität und Sicherheit. Doch die gewünschten Produkte, beispielsweise stärkeabbauende Enzyme für Waschmittel, werden nicht natürlich von diesen Organismen hergestellt. Hierfür muss zuerst das passende Gen, das dieses Enzym kodiert, in den Produktionsorganismus eingefügt werden.

Für manche Biopharmazeutika, beispielsweise für Antikörper in Krebs- oder Immuntherapien, ist die Produktion häufig nur in Säugerzellen möglich. Durch diese können die richtigen posttranslationalen Modifikationen stattfinden, sodass ein biologisch aktiver Wirkstoff entsteht. Das spiegelt sich auch in der Marktbetrachtung wider: Säugerzellen machen den Großteil der Produktionszelllinien für Biopharmazeutika aus. Im Zeitraum von 2015-2017 wurden 79 % der neu zugelassenen Biopharmazeutika in Säugerzelllinien hergestellt [2]. Ein weiteres Anwendungsfeld sind Zellen als Therapeutikum: In der CAR-T-Zelltherapie sollen die Zellen des Immunsystems mit einem Rezeptor ausgestattet werden, der Krebstumore erkennt. Dadurch soll das Immunsystem der Patienten den Krebs bekämpfen können [3].

In der Produktentwicklung müssen vor allem für Biopharmazeutika noch vor den klinischen Erprobungsphasen zahlreiche Wirkstoffkandidaten untersucht werden. Handelt es sich bei den Wirkstoffen um Proteine, müssen für deren Produktion viele unterschiedliche Gene in die Zellen eingebracht werden und die entstandenen Proteine untersucht werden. Um teure Zellkulturmedien und Arbeitskraft zu sparen, wird in der Industrie vor allem auf Miniaturisierung, Automatisierung und Parallelisierung gesetzt. Dies sind auch die Stärken der Mikrofluidik: kleine Kanalsysteme werden eingesetzt, um bestehende Laborschritte zu automatisieren, miteinander zu kombinieren oder durch die einzigartige mikrofluidische Umgebung neu zu erfinden. Daher bietet sich großes Potential für den Einsatz mikrofluidischer Systeme in der Zellkulturtechnik, um die hohen Entwicklungskosten zu senken und die Erforschung neuer Biopharmazeutika zu beschleunigen.

## 2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines 3D-gedruckten mikrofluidischen Systems zur kontinuierlichen transienten Transfektion von CHO (Chinesische Hamsteroovarien)-Zellen. Dadurch soll der manuelle Aufwand der transienten Transfektion reduziert und neue Möglichkeiten der Transfektion durch den kontinuierlichen Betrieb ermöglicht werden. Dies soll in Zukunft die Einbindung in kontinuierliche Bioprozesse ermöglichen, die durch höhere Produktivität und geringere Herstellungskosten attraktiv für die Biopharmaindustrie sind. Zusätzlich soll die Reproduzierbarkeit der Transfektion durch die Automatisierung mit dem mikrofluidischen System erhöht werden. Das System soll es dadurch ermöglichen, flexibel und kostengünstig kleine Proteinmengen herzustellen.

Zunächst soll ein Konzept zur Übertragung des klassischen Laborprotokolls für transiente Transfektionen auf einen automatisierten Ablauf erarbeitet werden. Dann sollen die einzelnen Ablaufschritte mittels mikrofluidischen Elementen realisiert werden. Hierbei sollen Designs aus der Literatur für diese Applikation angepasst, mittels hochauflösendem 3D-Druck gefertigt und mit CHO-Zellen auf die Eignung getestet werden. Nachdem die einzelnen Elemente separat getestet worden sind, sollen sie zu einem funktionalen Gesamtsystem zusammengesetzt und untersucht werden. Zusätzlich sollen die einzelnen Komponenten auch hinsichtlich ihrer Eignung für andere Einsatzbereiche in der Zellkulturtechnik betrachtet werden.

Zu den Untersuchungen zählen verschiedene Viabilitätstest, um den Einfluss der mikrofluidischen Strukturen auf das Wachstum der Zellen zu überprüfen, und Effektivitätstest, um die optimale Funktion der Einzelkomponenten und des Gesamtsystems zu gewährleisten. Zum Einsatz kommen hierfür mikroskopische Untersuchungen von Farbreaktionen, beispielsweise bei Mischuntersuchungen der Mikromischer, Computersimulationen (CFD; *computational fluid dynamics*) zum genaueren Verständnis der Vorgänge in Mikromischern und Fluoreszenzmikroskopie bei Separationsuntersuchungen. Letztendlich sollen die einzelnen Elemente, wenn möglich, auch praktisch mit CHO-Zellen untersucht werden.

Zur Analyse der Zellkonzentration und Viabilität werden Zellen mittels Trypanblau-Färbung mit einem CEDEX HiRes Zellzählgerät analysiert. Zusätzlich wird mit einem CEDEX Bio Gerät die LDH-Aktivität bestimmt, was Rückschlüsse auf den Zellstress erlaubt. Zur Analyse der Transfektionseffizienz wird ein Vektor mit einem *egfp*-Gen verwendet, sodass das produzierte eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden kann.

## 3. Theoretischer Hintergrund

### 3.1 Transiente Transfektionsverfahren

Die Produktion von Proteinen mit biotechnologischen Verfahren erfolgt häufig in Zellen, die diese Proteine in der Natur nicht produzieren. Die Produktionszelllinien weisen meistens eine erhöhte Produktivität auf, wodurch die produzierte Proteinmenge im Gegensatz zu der Produktion im Herkunfts-Organismus deutlich gesteigert werden kann. Beispielsweise wird bei der Produktion von Insulin für Diabetes-Patienten das menschliche Insulin seit der ersten Zulassung im Jahr 1982 (und heutzutage noch weiter optimierte Insulinvarianten) häufig in Pilz- oder Bakterienzellen produziert [4; 5]. Als anderes Beispiel werden menschliche Antikörper, die unter anderem in der Krebstherapie genutzt werden, in modifizierten Säugerzellen, wie z. B. CHO-Zellen hergestellt [2]. Daher werden Produktionsstämme vor der Produktion genetisch modifiziert, indem die DNA-Sequenz, die das gewünschte Protein codiert, in die Zellen eingebracht wird.

Die Gen-Injektionsverfahren, die bei Eukaryoten als Transfektion bezeichnet werden, werden in zwei Arten unterschieden: die stabile Transfektion und die transiente Transfektion. Bei der stabilen Transfektion wird das Zielgen in das Chromosom der Zellen integriert. Hierdurch wird auch bei einer Zellteilung das Fremdgen kopiert und bleibt in den Tochterzellen erhalten. Im Gegensatz dazu wird bei der transienten Transfektion das Zielgen in einem DNA-Vektor eingebracht. Dieser Vektor verbleibt im Zellkern neben den Chromosomen und wird nicht in das Genom integriert. Hierdurch wird der Vektor jedoch bei der Zellteilung nicht wie die Chromosomen kopiert und gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, was dazu führen kann, dass eine Tochterzelle keinen Vektor mehr beinhaltet und damit das Zielgen „verloren“ geht [6]. Die industriellen Produktionsprozesse verwenden daher alle die stabile Transfektion bei der Stammentwicklung, um eine möglichst konstante Proteinproduktion zu gewährleisten.

Bei der stabilen Transfektion ist jedoch ein Selektionsprozess nötig. Im ersten Schritt wird dem zu transfizierenden Vektor ein Selektionsmarker hinzugefügt, um die erfolgreich transfizierten Zellen zu identifizieren. Hierbei handelt es sich häufig um sogenannte Resistenzgene, die ein Überleben der transfizierten Zellen ermöglichen, wenn ein Giftstoff (z. B. ein Antibiotikum) im Zellkulturmedium enthalten ist. Die transfizierten Zellen werden danach in vielen parallelen Kultivierungen charakterisiert, um den besten Stamm zu identifizieren, der die gewünschte Proteinproduktionsrate und Wachstumscharakteristika aufweist. Dieser Selektionsprozess kann mehrere Monate dauern und ist dadurch sehr kostenintensiv [7].

Im Gegensatz dazu ist eine transiente Transfektion bereits ohne Selektion effektiv und weist gute Produktionsraten auf [7]. Um kleine Proteinmengen zu produzieren, ist eine transiente Transfektion gegenüber einer stabilen Transfektion daher häufig im Vorteil. Besonders in der Produktentwicklung, beispielsweise bei der Entwicklung eines neuen biopharmazeutischen Wirkstoffes, werden erst nur

geringe Mengen vieler verschiedener Proteine benötigt [8]. Ähnliche Anforderungen werden bei der Entwicklung personalisierter Wirkstoffe erwartet: dabei wird für wenige Patienten oder jeden einzelnen Patienten ein eigens modifiziertes Protein erstellt [9]. Die Produktionsmengen sind also gering, jedoch müssen zahlreiche unterschiedliche Produkte parallel hergestellt werden.

Transiente Transfektionsmethoden lassen sich in drei Gruppen einteilen: die viralen, physikalischen und chemischen Transfektionsmethoden [6]. Bei einer viralen transienten Transfektion wird die Eigenschaft von Viren genutzt, ihr Genom in eukaryotische Zellen einzuschleusen. Manche Viren können ihr Genom oder einzelne Gene fest in das Chromosom der Zielzelle integrieren. Häufig liegt das virale Genom aber außerhalb des Wirts-Genoms auf viralen Vektoren vor [10]. Durch die Modifikation des viralen Erbguts kann also ein beliebiges Gen in die Zielzelle importiert werden und somit eine transiente Transfektion erfolgen. Während diese Methoden sehr effektiv sein und Zelllinien transfizieren können, die bei anderen Transfektionsmethoden nur schlechte Ergebnisse erzielen, so ist ein Nachteil die aufwendige Herstellung der Viren, die dafür benötigt werden [6].

Die physikalischen Transfektionsmethoden basieren auf der Grundlage, die Membran der Zellen temporär zu öffnen und damit den Eintritt des fremden Erbguts zu ermöglichen [11]. In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Methoden mit unterschiedlichen Einsatzgebieten entwickelt, die dies ermöglichen. Eine Methode ist die Mikronadel-Injektion, bei der eine mikroskopisch kleine Nadel durch die Zellmembran gestochen wird und eine definierte Menge der DNA in die Zelle injiziert wird. Dadurch können präzise einzelne Zellen transfiziert werden, was zu einer hohen Effizienz führt. Außerdem kann auch das mitochondrielle Erbgut mittels dieser Methode verändert werden, indem nur in dieses Zellorganell injiziert wird [11]. Ein Nachteil der Mikronadel-Injektion ist allerdings der geringe Durchsatz, da nur eine Zelle mit einer Nadel gleichzeitig behandelt werden kann. Eine weitere Methode ist die *Gene-Gun* („Gen-Kanone“) [12]. Für diese Transfektionsmethode werden Gold-Nanopartikel mit DNA beschichtet und dann mit hoher Geschwindigkeit in eine Zellsuspension geschossen. Die Partikel durchdringen die Zellmembran und die Nukleinsäuren gelangen somit in die Zellen. Diese Methode setzt jedoch eine genaue Einstellung des Partikel-Nukleinsäure-Verhältnisses sowie der Partikelgeschwindigkeit voraus, um hohe Transfektionseffizienzen und geringe Zellschäden zu gewährleisten [13; 11]. Die verbreitetste physikalische Transfektionsmethode ist die Elektroporation [6]. Durch elektrische Impulse wird bei dieser Methode die Zellmembran für kurze Zeit gestört, sodass kleine Löcher entstehen, durch die Nukleinsäuren in die Zelle diffundieren können. Innerhalb weniger Sekunden bis Minuten verschließen sich die Löcher wieder von selbst. Die Elektroporation zeichnet sich durch hohe Effizienz und Schnelligkeit aus, führt jedoch häufig zu einer verringerten Zellviabilität [14]. Andere physikalische Methoden sind die Laser-vermittelte Transfektion [15], Sonoporation (mit Ultraschall) [16], Magnetofektion (mit Eisen-Nanopartikeln) [17] oder die mikrofluidische Cell-Squeezing Methode [11; 18].

### 3.1.1 Chemische Transfektionsverfahren

Chemische Transfektionsmethoden werden ebenfalls häufig eingesetzt und stellen die nicht-viralen Methoden dar, die am frühesten zur Transfektion von Säugerzellen eingesetzt wurden [19; 20]. Sie lassen sich nach dem Transfektionsreagenz in drei Gruppen unterteilen: Calciumphosphat, kationische Lipide und kationischen Polymere. Die Funktionsweise der chemischen Transfektion ist bei allen Reagenzien ähnlich: Die positiv geladenen Moleküle umhüllen in Komplexen die negativ geladenen Nukleinsäuren, sodass der Nukleinsäure/Transfektionsreagenz-Komplex von der negativ geladenen Zellmembran angezogen wird. Dadurch lagert der Komplex an die Membran an und wird dann von der Zelle mit unterschiedlichen, teilweise noch unbekanntenen Mechanismen aufgenommen [6]. Im Gegensatz zur viralen Transfektion sind die verwendeten Transfektionsreagenzien bedeutend günstiger und der Transfektionsprozess durch den Wegfall der Virusproduktion schneller. Im Vergleich zu physikalischen Transfektionsmethoden sind keine zusätzlichen Laborgeräte nötig. Zusätzlich ist das Vorgehen bei chemischen Transfektionsmethoden meist für den Anwender einfacher, da nur Chemikalien vermischt werden müssen [6].

Calciumphosphat war eines der ersten Reagenzien, das zur Transfektion von Säugerzellen eingesetzt wurde [21] und zeichnet sich durch den sehr geringen Preis aus. Allerdings ist der Einsatz vor allem durch die Störanfälligkeit durch Mediumbestandteile und die Notwendigkeit von Serum im Medium limitiert gewesen. Zusätzlich führt der Zusatz von Calciumphosphat bei Suspensionszellen, die häufig für die Produktion rekombinanter Proteine eingesetzt werden, zu Zellaggregation. Außerdem zeigen CHO-Zellen, die den größten Marktanteil in der Proteinproduktion aufweisen [2], nur geringe Transfektionseffizienzen bei der Transfektion mit Calciumphosphat [21].

Eine weitere Methode ist die Nutzung kationischer Lipide. Die Lipide lagern sich mit der DNA zusammen und formen kleine Fettkügelchen, sogenannte Liposome, in der die DNA eingeschlossen ist. Diese werden bei Kontakt mit der Zelle durch Endozytose aktiv aufgenommen [22]. Mittlerweise sind zahlreiche Lipide für die Transfektion kommerziell erhältlich und weisen hohe Transfektionseffizienzen in zahlreichen adhären und Suspensionszelllinien auf. Ein Nachteil der Methode sind die vergleichsweise hohen Kosten der Reagenzien, die vor allem bei größeren Kultivierungsskalen (im Liter Maßstab) den Einsatz kationischer Lipide zur Transfektion verhindern [23].

### 3.1.2 Transfektion mittels Polyethylenimin

Die derzeit am häufigsten eingesetzte chemische Transfektionsmethode ist die Nutzung des kationischen Polymers Polyethylenimin (PEI) [21]. PEI kann in unterschiedlichen Größen (meistens angegeben als Molekülmasse in Dalton) in linearer oder verzweigter Form eingesetzt werden. Da PEI auch in der chemischen Industrie zum Einsatz kommt, ist es vor allem im Vergleich zu kationischen Lipiden günstig [21]. Anders als Calciumphosphat ist mit PEI auch mit serumfreien Medien eine hohe Transfektionseffizienz möglich, während die Transfektionseffizienz bei der Transfektion mit Calciumphosphat ohne Serum deutlich erniedrigt ist [24]. Das Vermeiden von Serum während der

Transfektion ist vor allem durch die einfachere Proteinaufreinigung im Downstream-Processing von Vorteil [25]. Bei einigen Zelllinien (CHO DG44, HeLa und HEK293 [26]) hat sich lineares PEI mit einem Molekulargewicht von 25 kDa als beste Variante im Hinblick auf Transfektionseffizienz und Viabilität der Zellen gezeigt. Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit PEI als Transfektionsreagenz ausgewählt.

Polyethylenimine sind synthetische Polymere aus Ethylenimin, dessen Aminogruppe zu einer positiven Ladung des Polymers führt. Hierdurch bildet PEI zusammen mit der zu transferierenden DNA Polyplexe, ähnlich zu den Liposomen der kationischen Lipide, in denen die DNA vor äußeren Einflüssen und enzymatischem Abbau geschützt ist. Die Polyplexe werden bei Kontakt mit einer Säugerzelle spezifisch an Proteoglycane (Syndekan), welche Transmembranproteine sind, gebunden [26]. Daraufhin werden die Polyplexe mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen [27]. Die genauen Aufnahmemechanismen sind jedoch schwer nachzuweisen [27] und unterschiedliche Theorien, vor allem in Bezug auf den Transport der Polyplexe innerhalb der Zelle, bleiben umstritten [28]. Für die Endozytose von Polyplexen sind zwei Mechanismen nachgewiesen: der Clathrin- und der Caveolae-abhängigen Aufnahmeweg [26]. Welcher der Aufnahmewege stattfindet, ist von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich. Es können auch beide Aufnahmewege simultan ablaufen, wobei auch die Größe des PEI die Gewichtung der Aufnahmewege beeinflussen kann [29]. Nach der Bindung des Syndekans an den Polyplex verschließt sich die Plasmamembran um den Polyplex herum. Dies aktiviert Proteinkinase C, welche durch Phosphatpaltung an den Zytoplasmateil des Syndekans mittels Linkerproteinen Actinfilamente bindet. Die Actinfilamente ziehen daraufhin den Komplex aus Syndekan und Polyplex in die Zelle hinein [30]. Durch diese Einstülpung der Zellmembran entstehen Endosomen, in denen die PEI/DNA-Komplexe innerhalb des Zytoplasmas vorliegen. Aus den Endosomen muss die DNA allerdings in den Zellkern gelangen, damit durch die Transkription und anschließende Translation das Zielprotein produziert werden kann. Der Mechanismus des Transportes der DNA in den Zellkern ist allerdings bislang nicht geklärt.

Eine Hypothese ist der sogenannte *Proton-Sponge* Effekt. In der sauren Umgebung liegen die Stickstoffatome des PEI vollständig protoniert vor und  $H^+$  und  $Cl^-$  Ionen gelangen in die Endosomen, wodurch der osmotische Druck so lange ansteigt, bis die Endosomen platzen und der Polyplex freigesetzt wird [31]. Die Hypothese ist allerdings noch nicht experimentell nachgewiesen und wird von einigen Forschern angezweifelt, beispielsweise auf Grund des geringen Drucks oder des gleichbleibenden pH-Wertes innerhalb der Endosomen [21; 28; 32]. Die Migration der Polyplexe zur Membran des Zellkerns wird aktiv durch das Netzwerk aus Mikrotubuli vermittelt [33]. Der Aufnahmemechanismus in den Zellkern hingegen ist abermals ungeklärt [21]. Hypothesen bezüglich des Aufnahmemechanismus ziehen den Eintritt der DNA während des Aufbrechens der Kernmembran bei der Zellteilung [34] oder auch einen aktiven oder passiven Import unabhängig vom Zellzyklus in Betracht [35].

In zahlreichen Studien wurden unterschiedliche Einflussfaktoren der transienten Transfektion mittels PEI untersucht, um die Transfektionseffizienz, aber auch die Proteinproduktion zu verbessern. Hierzu zählen die chemische Struktur des PEI, das Verhältnis von PEI und DNA, der Aufbau des DNA-Vektors, die Polyplexbildung, die Zellkonzentration und der Zeitpunkt der Transfektion, sowie Bestandteile im Kulturmedium, die die Transfektion fördern, aber auch hindern können.

Für die Transfektion können unterschiedliche Arten des PEI genutzt werden. Im Allgemeinen wird zwischen linearem und verzweigtem PEI unterschieden, welches in unterschiedlichen Molekülgrößen bzw. Molekulargewichten von <1 bis über 1600 kDa erhältlich ist [36]. Die Transfektionseffizienz aber auch Zytotoxizität nehmen mit dem Molekulargewicht zu, sodass für die jeweilige Anwendung das optimale Molekulargewicht erst gefunden werden muss. Am häufigsten wird PEI mit einer Größe von 22-25 kDa eingesetzt [31; 36–38]. Zudem unterscheiden sich das lineare und verzweigte PEI hinsichtlich der Polyplexbildung mit der DNA, bei der die verzweigte Variante zu kleineren Partikeln führt, die besser von Zellen aufgenommen werden können. Allerdings erleichtert das lineare PEI das Austreten der DNA aus den gebildeten Endosomen innerhalb der Zelle und führt zu einer höheren Zellviabilität nach der Transfektion [39].

Zusätzlich zu den unterschiedlichen Größen und Arten des PEI sind auch chemische Modifikationen des Polymers bezüglich der Transfektionseffizienz untersucht worden. Ein Beispiel hierfür ist das Einführen von Polysacchariden in die Polymerkette. Die Modifikation mit Chitosan führt bei HeLa-, A549- und 293-T-Zellen zu einer geringeren Toxizität und einem verbesserten Abbau des freien PEI nach der Transfektion, verringert jedoch die Transfektionseffizienz [39; 40]. Dextran-modifiziertes PEI führte bei der Transfektion von HEK293 Zellen in serumfreiem Medium ebenfalls zu einer geringeren Zytotoxizität bei verringerter Transfektionseffizienz, in serumhaltigen Medium hingegen zu einer erhöhten Transfektionseffizienz im Vergleich zu unmodifiziertem PEI [41]. Pullulan-modifiziertes PEI wurde hingegen noch nicht zur Proteinproduktion in Suspensionszellen eingesetzt, führte aber bei der Transfektion von Leberzellen zu einer verringerten Toxizität [42] und erhöhten Transfektionseffizienz [43]. Auch weitere chemische Modifikationen mit Polyethylenglykol oder unterschiedlichen Aminogruppen konnten die Transfektionseffizienz und Zytotoxizität unterschiedlich beeinflussen [39].

Ein wichtiger Parameter zur Optimierung der Transfektion mit PEI ist das Verhältnis von Transfektionsreagenz zu DNA [44; 45]. Hierbei ist das Verhältnis der Stickstoffatome des PEI zu den Phosphatgruppen der DNA (N/P-Verhältnis) für die Bildung des Polyplexes äußerst wichtig und kann aus den eingesetzten Mengen nach Gleichung 1 [44] berechnet werden:

$$\frac{N}{P} = \frac{[PEI (\mu g) \cdot 7,75]}{[DNA(\mu g) \cdot 1]} \quad (1)$$

Ein höheres N/P-Verhältnis führt zu einer besseren Bindung von DNA zu PEI. Ab einem Verhältnis von 3,8 ist die DNA vollständig an PEI gebunden. Das optimale Verhältnis muss durch die Beeinflussung der Viabilität und der Transfektionsrate für unterschiedliche Zellen und Medienzusammensetzungen

experimentell ermittelt werden [21; 46]. Für CHO-K1-Zellen wurde ein optimales Verhältnis von ca. 20:1 gefunden [47].

Der zur Transfektion verwendete Vektor hat ebenfalls einen großen Einfluss auf die Transfektionseffizienz (durch die unterschiedlichen Vektorgrößen), aber auch auf die Proteinproduktion durch unterschiedliche Promotoren [48]. Um die nötige Vektor-DNA Konzentration zu verringern und damit die Kosten und den Aufwand der transienten Transfektion zu senken, kann sogenannte *Filler-DNA* eingesetzt werden. Rajendra *et al.* konnten mit dieser Methode die nötige Vektor-Menge um 67 % reduzieren und gleichzeitig nur eine um 25 % verringerte Produktmenge erhalten [49].

Zusätzlich zu Unterschieden bei PEI und DNA gibt es auch verschiedene Varianten der Polyplexbildung. In der Praxis haben sich zwei Methoden etabliert: die indirekte und die direkte Variante. Bei der indirekten Variante werden erst PEI und DNA zusammengegeben, damit sich die Polyplexe ausbilden können, und nach einer gewissen Inkubationszeit zu den Zellen gegeben. Bei der direkten Variante wird die DNA und das PEI direkt zur Zellsuspension gegeben, sodass sich die Polyplexe im Medium mit Zellen bilden. Bei der indirekten Variante kann der Salzgehalt und pH-Wert für die Polyplexbildung angepasst werden, da diese außerhalb der Zellsuspension stattfindet. Bei der direkten Variante ist der Ablauf allerdings vereinfacht und kann einfacher skaliert werden [50]. Eindeutige Ergebnisse, welche der beiden Polyplexbildungsmethoden zu einem besseren Transfektionsergebnis führt, sind derzeit noch nicht bekannt [21].

### 3.2 Mikrofluidische Systeme und *Inertial Microfluidics*

Die transiente Transfektion mit PEI soll im Rahmen dieser Arbeit mit einem mikrofluidischen System umgesetzt werden. Unter Mikrofluidik versteht man generell die Untersuchung und Manipulation kleinster Flüssigkeitsmengen im Milli- und Mikrolitermaßstab durch kleine Kanalsysteme mit einem Durchmesser unter einem Millimeter [51]. Der Ursprung dieses interdisziplinären Feldes liegt in chemischen Analyseverfahren [52]. Durch die Entwicklung von HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), Gaschromatographie und Kapillarchromatographie als chemische Analyseverfahren können mit kleinsten Probenmengen hochsensitiv quantitative Ergebnisse gewonnen werden. Diese Eigenschaften waren auch in anderen Bereichen der Chemie und Biochemie nützlich und führten zu der Miniaturisierung dieser und anderer Analysesysteme. Ein weiterer Einfluss in die Entwicklung mikrofluidischer Systeme entstand durch die Förderung von Forschungsprojekten durch DARPA (*Defense Advanced Research Project Agency*) des US-Verteidigungsministeriums, um biologische und chemische Kampfstoffe zu detektieren. Neben einer hohen Sensitivität stand in diesen Projekten die Miniaturisierung der Apparaturen zu tragbaren Geräten im Fokus. Des Weiteren ist mit dem Aufkommen der Genomforschung in den 1980er Jahren auch in der Molekularbiologie der Bedarf an höherem Durchsatz und verbesserter Präzision stark gestiegen, wodurch auch hier mikrofluidische Systeme entwickelt wurden, um diese Hürden zu meistern. Schlussendlich sind durch das Aufkommen der Mikroelektronik neue Fertigungsverfahren für kleinste Strukturen im großen Maßstab eingesetzt



worden. Diese Fertigungsverfahren wurden auch in der Entwicklung mikrofluidischer Systeme eingesetzt, um präzise Strukturen in Silizium- oder Glaschips zu ätzen [52].

Im Allgemeinen haben mikrofluidische Systeme einige Eigenschaften, die sie von anderen Labormethoden unterscheiden. Die geringe Größe der Systeme führt häufig dazu, dass das benötigte Volumen der Reagenzien aber auch der Proben bei Analysen im Vergleich zu klassischen Labormethoden sinkt. Zusätzlich erlaubt es eine direktere Kontrolle der Medienparameter, wenn Zellen im System kultiviert werden, da ein schneller Medienaustausch stattfinden kann. Das höhere Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis mikrofluidischer Systeme führt zu einem schnelleren Temperaturtransfer und einem schnelleren Gasaustausch [53].

Während in größeren Kanälen eine turbulente Strömung herrscht, liegt in mikrofluidischen Systemen durch die geringen Kanalgrößen meist eine laminare Strömungsumgebung vor. Durch geringe Fließgeschwindigkeiten und das große Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis dominieren viskose Kräfte. Daher liegt die charakteristische Reynolds-Zahl  $Re$  weit unter dem Schwellenwert 2300, wodurch die Strömung als laminar betrachtet werden kann. Dies bedeutet, dass die Strömungslinien parallel zueinander verlaufen (siehe Abbildung 1).

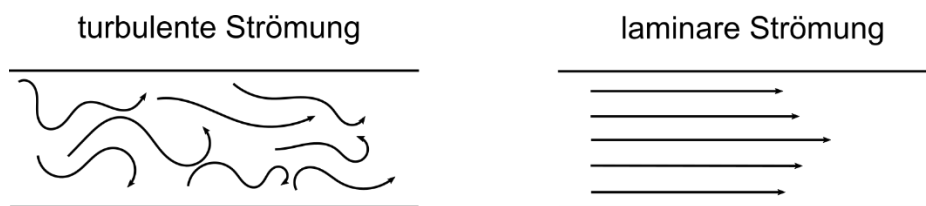


Abbildung 1: Darstellung der Strömungslinien innerhalb eines Kanals bei turbulenter Strömung und laminarer Strömung.

In mikrofluidischen Systemen führt dies dazu, dass eine Durchmischung von parallel verlaufenden Flüssigkeiten nur durch langsame Diffusionseffekte erfolgt oder aber spezielle Kanalstrukturen nötig sind, um eine effektive Durchmischung zu erzeugen. Andererseits können so stabile Konzentrationsgradienten innerhalb von Kanälen erzeugt werden [53]. Die laminare Strömung innerhalb mikrofluidischer Systeme wird zusätzlich zur gezielten Manipulation von Partikeln im Feld der *Inertial Microfluidics* genutzt, auf die später in diesem Kapitel eingegangen wird.

Im Bereich der Biochemie und Biotechnologie sind vor allem zwei Bereiche für den Einsatz mikrofluidischer Systeme von großer Bedeutung: *Lab-on-a-Chip* und *Organ-on-a-Chip* Systeme. In *Organ-on-a-Chip* Systemen werden Zellen in einem mikrofluidischen System kultiviert. Dabei werden funktionelle Einheiten menschlicher Organe aus den relevanten Zellarten nachgebildet, wodurch eine genaue Analyse der Zellen ermöglicht wird. Hierbei ist die direkte Kontrolle der Umgebungsparameter, wie beispielsweise die Temperatur oder Medienzusammensetzung im mikrofluidischen Umfeld von Vorteil. Das Ziel solcher Systeme ist die Nachahmung menschlicher Organe, um so Versuche beispielsweise zur Analyse von Medikamentensicherheit zu ermöglichen. Besonders in der Entwicklung

neuer Arzneimittel sollen *Organ-on-a-Chip*-Analysen daher zu präziseren Ergebnissen als Tiermodelle führen [54; 55].

### 3.2.1 Lab-on-a-Chip Systeme in der Biotechnologie

Die Umsetzung der transienten Transfektion mit einem mikrofluidischen System macht es nötig, dass die einzelnen Schritte des Laborprotokolls – Vermischen der Komponenten, Inkubation und anschließende Separation der Zellen vom Transfektionsmittel – auf einem System ablaufen. Solche mikrofluidischen Systeme werden auch als *Lab-on-a-Chip* Systeme bezeichnet. Durch die Kombination mehrerer Schritte auf einem System kann die Handhabung vereinfacht werden, was zu einer besseren Reproduzierbarkeit führt, und Prozesse können durch den Wegfall der manuellen Laborarbeiten vereinfacht werden. *Lab-on-a-Chip* Systeme werden klassischerweise auch zur Analytik eingesetzt und eröffnen die Möglichkeit, biologische Analysen außerhalb eines klassischen Labors durchzuführen. Somit kann mit diesen Systemen beispielsweise im Gesundheitswesen die Diagnostik direkt in der Praxis oder am Patientenbett (*Point of care*) durchgeführt werden und dadurch wichtige Laboruntersuchungen schneller stattfinden.

Zahlreiche biotechnologische Anwendungen wurden bereits als Lab-on-a-Chip realisiert, darunter DNA-Sequenzierungssysteme [56; 57], Systeme zum Zellaufschluss und anschließender Analyse der Zellbestandteile [58] und sogar Systeme zur Kultivierung und Überwachung von Zellen in mikrofluidischen Systemen [59; 60]. In all diesen Anwendungen wurden die Vorteile mikrofluidischer Systeme – Parallelisierung, Automatisierung, Reduzierung von Proben- und Chemikalienbedarf und präzisere, schnellere Steuerung von Temperatur und Medienzusammensetzung – genutzt, um die jeweilige Methode zu vereinfachen oder zu verbessern.

Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung eines beispielhaften *Lab-on-a-Chip* Systems.

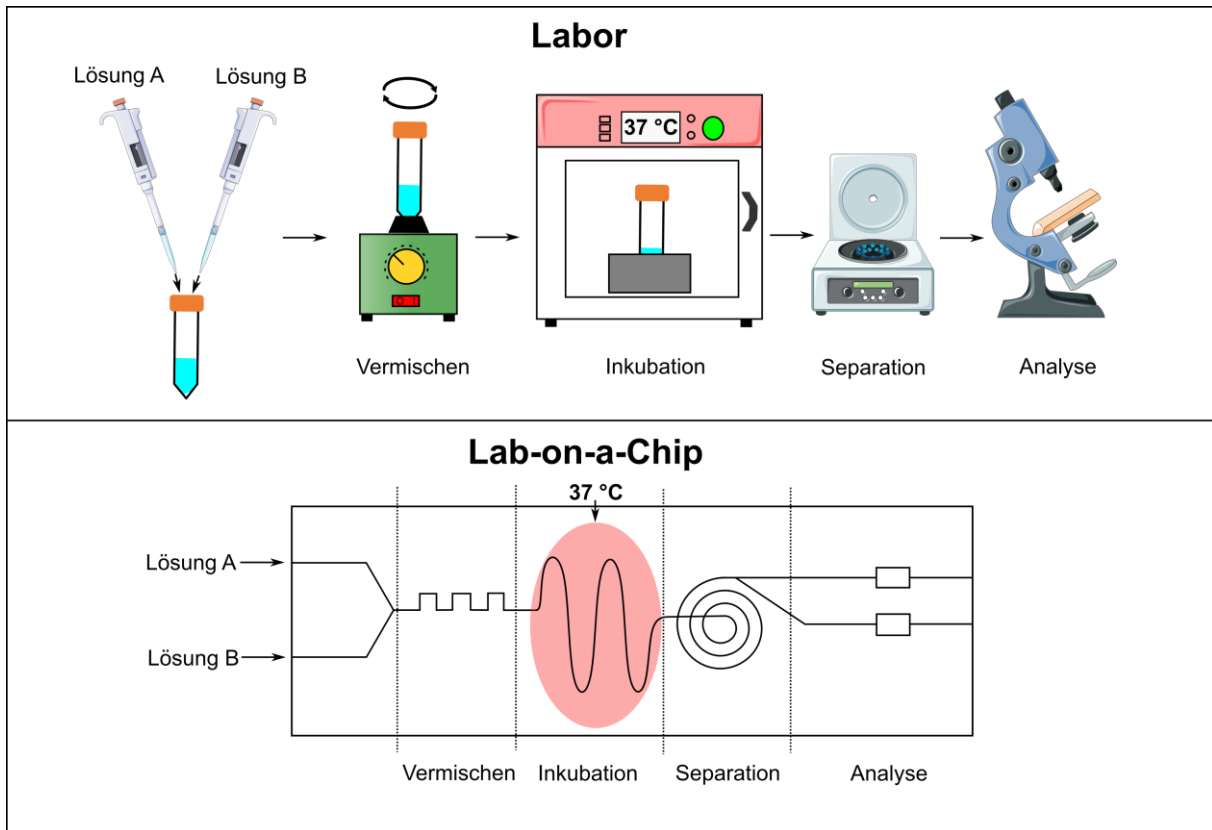


Abbildung 2: Schema eines Lab-on-a-Chip Systems im Vergleich zu den Schritten mit normalen Laborgeräten. Mit dem Lab-on-a-Chip System werden alle fünf Schritte in einem einzigen mikrofluidischen System integriert. Teile der Abbildungen aus [61].

In dieser Arbeit sollen drei Schritte mit einem mikrofluidischen System umgesetzt werden: Vermischen, Inkubation und Analyse.

Aufgrund der laminaren Strömung in mikrofluidischen Systemen wird die schnelle Vermischung von Flüssigkeiten in einem Kanal verhindert. Lediglich die Diffusion führt zu einem langsamen Stoffaustausch. Um die Vermischung zu beschleunigen, wurden verschiedene Mikromischer erfunden, welche sich nach ihrer Funktionsweise in aktive und passive Mikromischer unterscheiden lassen. Aktive Mikromischer nutzen externe Energiequellen, um die Flüssigkeiten im Kanal auch orthogonal zur Fließrichtung zu bewegen, was zu einer Stoffübertragung durch Konvektion führt. Für diese Mikromischer werden elektroosmotische Kräfte [62; 63], magnetohydrodynamische Kräfte [64] oder Ultraschall [65] genutzt. Der Vorteil aktiver Mikromischer ist das einfache Kanaldesign, da selbst in einem geraden Kanal eine schnelle Durchmischung stattfinden kann. Der Nachteil ist jedoch, dass zusätzliche Geräte benötigt werden. Außerdem kann beispielsweise Ultraschall zur Schädigung von Zellen führen. Passive Mikromischer nutzen keine externen Energiequellen, sondern komplexe Kanalstrukturen, um über verschiedene Methoden die Durchmischung zu verbessern. Hierbei kann die Strömung so modifiziert werden, dass Verwirbelungen entstehen [66], oder die Strömung gezielt aufgeteilt und alternierend wieder zusammengeführt werden, um die Diffusionsoberfläche zu vergrößern [67]. Mehr Informationen zu verschiedenen passiven Mikromischern und ein Vergleich verschiedener Mischersdesigns sind in der Veröffentlichung „3D Printed Microfluidic Mixers – A

Comparative Study on Mixing Unit Performance“ in Kapitel 4.1 zu finden. Ein Vorteil passiver Mikromischer ist der vereinfachte Aufbau, da keine zusätzlichen Geräte zur Durchmischung benötigt werden. Ein Nachteil dagegen ist die komplexe Kanalform, welche mit traditionellen Fertigungsverfahren zu einem hohen Aufwand führt. Da in dieser Arbeit allerdings 3D-Druck genutzt wird, ist dieser Nachteil vernachlässigbar, weil die Fertigung vollständig automatisiert abläuft.

Die Inkubation in mikrofluidischen Systemen, um beispielsweise eine chemische Reaktion ablaufen zu lassen, kann auf verschiedene Arten durchgeführt werden. Eine Möglichkeit ist das simple Stoppen der Pumpen für eine bestimmte Inkubationszeit [68]. Alternativ kann die Flüssigkeit im Inkubationsbereich aber auch durch das abwechselnde Drücken und Ziehen von Pumpen weiterhin bewegt werden. Dies kann zum Verkürzen der Inkubationszeit führen, da während der Reaktion eine weitere Durchmischung stattfindet [68]. Ist jedoch ein kontinuierlicher Einsatz des Systems erforderlich, werden meist lange Kanäle genutzt. Über die Kanallänge und die Fließgeschwindigkeit wird die Inkubationszeit festgelegt. Um unterschiedliche Inkubationszeiten auszugleichen, die durch das parabolische Strömungsprofil der laminaren Strömung entstehen, kann eine profilierte Kanalwand genutzt werden, um zu Verwirbelungen zu führen [69]. Falls nötig, kann außerdem ein Heizelement eingesetzt werden, um den Inkubationsbereich aufzuheizen, denn die geringen Kanalgrößen und dünnen Wandstärken von mikrofluidischen Systemen ermöglichen eine präzise Temperaturkontrolle innerhalb des Systems [56].

Im letzten Teil des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten mikrofluidischen Systems zur transienten Transfektion sollen die Zellen vom toxischen Transfektionsmittel separiert werden. Um einen kontinuierlichen Einsatz zu ermöglichen, kann die einzigartige Strömungsumgebung mikrofluidischer Systeme ausgenutzt werden, um die Zellen an bestimmten Positionen in den Kanälen zu fokussieren und dann gezielt abzutrennen. In der Literatur sind hierfür Systeme mit U-förmigen [70], schlangenförmigen [71] oder spiralförmigen Kanälen [72; 73] zu finden. Die Effekte, die zu dieser Fokussierung führen, werden im Bereich der *Inertial Microfluidics* erforscht. Im nächsten Kapitel werden die theoretischen Hintergründe erläutert, die zu diesem Effekt führen.

### 3.2.2 *Inertial Microfluidics*

Bis vor wenigen Jahren ist man häufig davon ausgegangen, dass die laminare Strömung im System ( $Re \ll 2300$ ) auch im Bereich einer schleichenden Strömung (Stokes' Strömung) liegt. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass die Reibungskräfte sehr viel größer sind als die Trägheitskräfte. Somit hat man die Trägheitskräfte der Flüssigkeiten und den Anteil der Beschleunigung der Flüssigkeit bei der Beschreibung der Flüssigkeit in der Navier-Stokes-Gleichung ignoriert [74]. Allerdings befinden sich mikrofluidische Systeme meist in einem Zwischenbereich (ca.  $1 < Re < 100$ ) [75], in dem nicht-lineare und unumkehrbare Bewegungen von Flüssigkeiten und Partikeln beobachtet werden können. Somit ist in diesem Bereich sowohl Trägheit, also auch die Viskosität weiterhin relevant. Da die Strömung allerdings immer noch laminar ist, ermöglicht sie die Kontrolle der Flüssigkeiten und Partikel in ihrer Bewegung. Somit können in mikrofluidischen Systemen innerhalb eines Kanals durch das

Zusammenspiel der Kanalstruktur, der Partikeleigenschaften, der Flüssigkeit und der Fließgeschwindigkeit Partikel fokussiert, transferiert oder Flüssigkeiten gezielt durchmischt werden.

Die erste Beobachtung eines fokussierenden Effektes in laminarer Strömung wurde 1961 von Segré und Silberberg in der Fachzeitschrift *Nature* veröffentlicht [76]. In dem Experiment wurde ein vertikal ausgerichtetes Rohr mit 1 cm Durchmesser mit einer Flüssigkeit mit hoher Viskosität nach unten durchströmt, die mit sphärischen Partikeln versetzt war. Während im oberen Teil die Partikelverteilung im Querschnitt des Rohres gleich war, so veränderte sich die Verteilung mit zunehmender Rohrlänge. Die Partikel drängten sich immer mehr in den Bereich zwischen dem Rohrmittelpunkt und der Rohrwand, sodass letztendlich eine kreisförmige Region mit der höchsten Partikelkonzentration entstand (siehe Abbildung 3). Es mussten also mehrere Kräfte auf die Partikel wirken, die zu einer Bewegung seitlich zur hauptsächlichen Fließbewegung (in dem Rohr von oben nach unten) führten. Später konnten zwei dominante Kräfte identifiziert werden: Die Wand-induzierte Auftriebskraft und die Schergradient-induzierte Auftriebskraft. Der Wand-induzierte Auftrieb führt durch die Interaktion der Kanalwand und der Partikel zu einem Abstoßen von der Wand zur Kanalmitte. Der Schergradient-induzierte Auftrieb hingegen führt zu einer Bewegung weg von der Kanalmitte, da dort die höchste Fließgeschwindigkeit herrscht, während die Fließgeschwindigkeit zur Kanalwand hin durch die Reibung zwischen Flüssigkeit und Wand abnimmt [74]. Die Auftriebskräfte können wie folgt mathematisch beschrieben werden:

Schergradient-induzierter Auftrieb:

$$F_L = f_{LS}\rho U_m^2 a^3 / H \quad (2)$$

$f_{LS}$  ist der Auftriebskoeffizient, der von der Scherrate, dem Schergradienten, lokalen Scherrate und der Reynoldszahl abhängig ist,  $\rho$  ist die Dichte der Flüssigkeit,  $U_m$  ist die maximale Geschwindigkeit der Flüssigkeit,  $a$  ist der Partikeldurchmesser und  $H$  der Kanaldurchmesser [77; 78].

Wand-induzierter Auftrieb:

$$F_L = f_{LW}\rho U_m^2 a^6 / H^4 \quad (3)$$

$f_{LW}$  ist hierbei der Auftriebskoeffizient, der nur schwach von der Krümmung der Geschwindigkeitsverteilung abhängig ist, allerdings quadratisch von der Scherrate von Partikel und Kanalwand [78; 79].

Wird statt eines runden Kanalquerschnitts ein quadratischer Querschnitt verwendet, so ändert sich die Anordnung der Partikel. Das Zusammenspiel der Auftriebskräfte führt hierbei zu vier stabilen Positionen, jeweils mittig in der Nähe der Kanalwände. Bei einem rechteckigen Kanalquerschnitt sammeln sich Partikel an nur zwei Positionen (siehe Abbildung 3) [74].

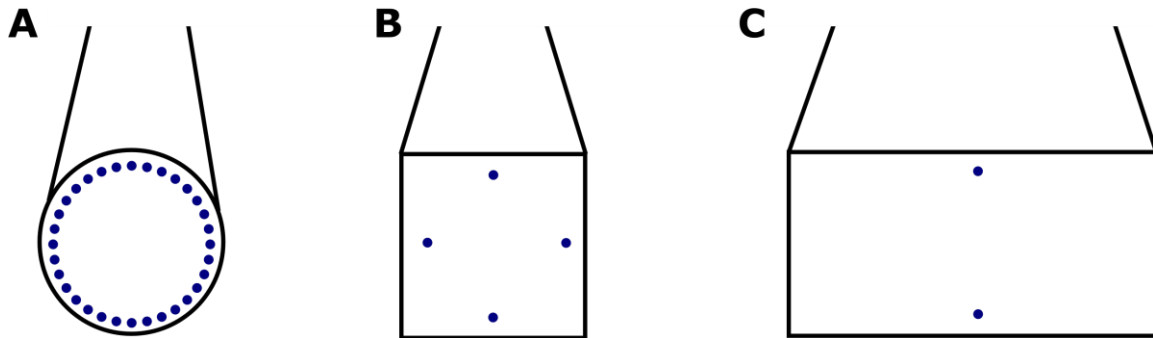


Abbildung 3: Partikel nehmen abhängig vom Kanalquerschnitt unterschiedliche stabile Positionen ein. A: Kreisförmiger Querschnitt: Ringförmiger Bereich. B: Quadratischer Querschnitt: vier punktuelle Positionen. C: Rechteckiger Querschnitt: zwei punktuelle Positionen. Grafik erstellt nach Amini et al. [74].

Die Position der Sammelpunkte lässt sich durch die Fließgeschwindigkeit bzw. die Reynoldszahl beeinflussen. Bei höheren Reynoldszahlen (bis ca. 150) verlagern sich die stabilen Positionen zu den Kanalwänden hin. Dies lässt sich wiederum durch das Zusammenspiel der entgegengesetzten Auftriebskräfte erklären: beide Auftriebskräfte (Wand-induziert und Schergradient-induziert) erhöhen sich mit steigendem  $Re$ , jedoch steigt der Schergradient-induzierte Auftrieb durch die Abhängigkeit des Auftriebskoeffizienten von  $Re$  stärker an (siehe Gleichung 2) [74]. Zusätzlich können bei rechteckigen Kanälen mit steigenden Fließgeschwindigkeiten zwei weitere stabile Positionen entstehen, sodass diese quadratischen Kanälen ähneln [74].

Einen weiteren Einfluss hat das Verhältnis der Partikelgröße zum Kanalquerschnitt. So verlagern sich mit größeren Partikeln die stabilen Positionen zur Kanalmitte. Dies lässt sich durch größere sterische Effekte erklären, mit dem Extremfall von Partikeln, die genau so groß sind wie der Kanaldurchmesser und daher nur in der Kanalmitte in dem Kanal fließen können.

Auch die Partikelkonzentration beeinflusst die stabilen Positionen. Hier hat vor allem die Interaktion von Partikeln durch Abstoßungseffekte einen negativen Einfluss, sodass sich neben den stabilen Positionen weitere Partikelströme bilden. Dies ist vor allem bei hohen Konzentrationen zu betrachten, wobei der Größenanteil der Partikel zu einer Kanallänge (Partikeldurchmesser pro Kanallänge) über 75 % betragen muss [75].

Um die komplizierten Zusammenhänge zwischen den verschiedenen physikalischen Parametern zu vereinfachen, haben Di Carlo *et al.* vereinfachte Formeln zum Design neuer *Inertial Microfluidics* Systeme aufgestellt. Innerhalb eines geraden Kanals kann somit die nötige Kanallänge  $L_f$  und Flussrate  $Q$  berechnet werden, die zur Fokussierung von Partikeln nötig ist. Die Formeln sind in Gleichung 4 und 5 dargestellt.

$$L_f = \frac{\pi \mu H^2}{\rho U_m a^2 f_L} \quad (4)$$

$L_f$  ist die Kanallänge,  $\mu$  die dynamische Viskosität,  $H$  die (breitere) Seite des Kanalquerschnitts,  $\rho$  die Dichte der Flüssigkeit,  $U_m$  die maximale Fließgeschwindigkeit,  $a$  der Partikeldurchmesser und  $f_L$  der Auftriebskoeffizient. Dieser liegt abhängig von dem Seitenverhältnis des Kanalquerschnitts ( $H/W$ ) zwischen 0,02 und 0,05 [75].

$$Q = \frac{2\pi\mu WH^3}{3\rho La^2 f_L} \quad (5)$$

$Q$  ist die Flussrate,  $W$  die kürzere Kanalseite und  $L$  die Kanallänge [75].

Durch die Krümmung des fokussierenden Kanals kann man zusätzlich die stabilen Positionen der Partikel beeinflussen, indem Dean Strömungen ausgenutzt werden. In Abbildung 4 ist ein Schaubild mit den wirkenden Kräften in einem gekrümmten Kanal dargestellt.

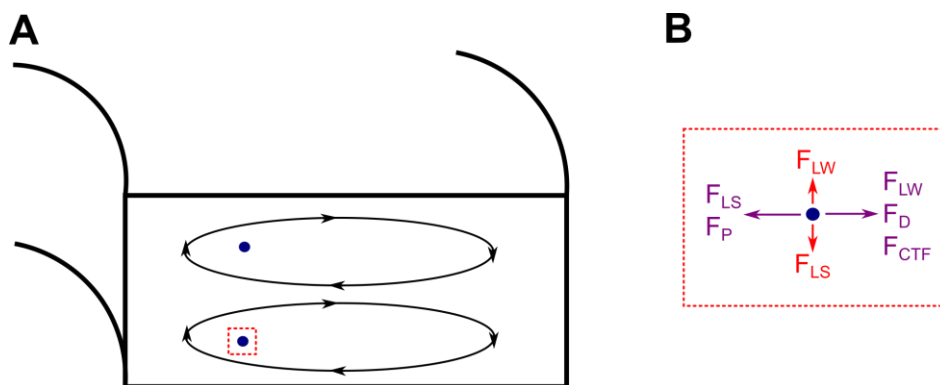


Abbildung 4: Darstellung der wirkenden Kräfte und der Dean-Strömungen in einem gekrümmten mikrofluidischen Kanal. A: Stabile Positionen (blaue Punkte) und Dean Strömungen (Ellipsen mit Pfeilen). B: Auf die Partikel wirkende Kräfte:  $F_{LW}$  (Wand-induzierte Auftriebskraft),  $F_{LS}$  (Schergradient-induzierte Auftriebskraft),  $F_{CTF}$  (Zentrifugalkraft),  $F_D$  (Deankraft),  $F_P$  (Druckkraft) [80].

Die Dean Strömungen, die durch den Trägheitseffekt der Flüssigkeit durch unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten im äußeren und inneren Kanalteil in einer Kurve ausgelöst werden, verlaufen rechtwinklig zur Hauptströmung im Kanal. Hierdurch erhöht sich also die Fließgeschwindigkeit im Kanalteil des größeren Radius, während an der Innenseite der Krümmung, also im Kanalteil des kleineren Radius, eine geringere Geschwindigkeit vorliegt. Dadurch werden die stabilen Positionen bei einem rechteckigen Kanalquerschnitt aus der Kanalmitte zur Innenseite der Krümmung verlagert [74]. Zusätzlich führen die Dean Strömungen zu einem weiteren Transportmechanismus neben den bereits genannten Auftriebskräften. Hierdurch werden bei gekrümmten Kanälen die stabilen Positionen schneller von den Partikeln eingenommen, sodass die Fokussierlänge  $L_f$  abnimmt [74; 75].

In dieser Arbeit wurde ein System zur Fokussierung von Zellen entwickelt, welches diese Auftriebskräfte und Sekundärströmungen in einem spiralförmigen, rechteckigen Kanal ausnutzt (siehe Kapitel 4.2). Beispiele für weitere Fokussierungssysteme für verschiedene Zellarten sind in der dazugehörigen Veröffentlichung dargestellt.

### 3.2.3 Mikrofluidische Transfektionssysteme

Es sind bereits mikrofluidische Systeme zur transienten Transfektion entwickelt worden. Allerdings wurden meist physikalische Transfektionsmethoden adaptiert. Zu chemischen Transfektionsverfahren sind nur wenige Publikationen vorhanden. Eine Suche nach den Stichworten „microfluidics transfection“ und „PEI“, „lipids“ und „calcium phosphate“ ergab in der Suchmaschine „Web of Science“ insgesamt nur 22 Treffer. Nur vier Veröffentlichungen beziehen sich auf die Transfektion mit PEI, von denen drei lediglich die Erstellung der Polyplexe behandeln und eine Publikation eine Analyse der Polyplexe beschreibt. Eine vollständige Umsetzung des gesamten Transfektionsprotokolls mit einem mikrofluidischen System ist noch nicht veröffentlicht.

Die Laser-induzierte Transfektion wurde von Breunig *et al.* auf einem mikrofluidischen System realisiert. In einem mikrofluidischen Kanal werden in diesem System Zellen mittels Pumpen über einen Bereich bewegt, in dem mit einem Femtosekundenlaser die Zellmembran permeabilisiert werden soll. Ziel des Systems ist ein erhöhter Durchsatz bei sehr hoher Transfektionseffizienz [81].

Zahlreiche mikrofluidische Systeme zur Elektroporation von Zellen wurden bereits vorgestellt. Im Allgemeinen sollen sie die Zellen weniger schädigen und eine höhere Transfektionseffizienz als herkömmliche Systeme ermöglichen [82; 83]. Auch eine Mikronadel-Injektion wurde bereits auf einer mikrofluidischen Plattform realisiert [84].

Ein mikrofluidisches System zur transienten Transfektion mittels kationischer Lipide (siehe Kapitel 3.1.1) wurde von Li *et al.* entwickelt. Mit dem System konnte eine erhöhte Transfektionseffizienz in humanen Suspensionszellen (beispielsweise im Blut) erreicht werden, die bei der herkömmlichen Methode mit lediglich 5 % gering ist. Hierfür wurde ein Tröpfchenmikrofluidik (*Droplet*) System entwickelt, in dem das kationische Lipid mit Zellen und DNA in kleinen Wassertropfen in Öl in einem serpentinenförmigen Kanal durch die entstehenden Scherkräfte durchmischt werden. Das System wurde so eingestellt, dass sich in einem Tropfen lediglich eine Zelle befand. Durch diese erhöhte Kontrolle gegenüber einer klassischen Transfektion in einem größeren Ansatz wurde die Transfektionseffizienz in den getesteten Zelllinien auf ca. 50 % verzehnfacht [85]. Die nötigen Lipide sind allerdings im Vergleich zu PEI, welches in dieser Arbeit eingesetzt werden soll, kostspieliger.

Im Bereich der chemischen Transfektion mit PEI gibt es bislang nur drei Systeme zur Polyplexbildung in einem mikrofluidischen System. Die somit erzeugten Polyplexe waren in allen Systemen kleiner und die Größenverteilung weniger gestreut als bei der Bildung der Polyplexe in größeren Ansätzen [86–88]. Die eigentliche Transfektion mittels PEI wurde allerdings noch nicht in einem mikrofluidischen System durchgeführt. Dadurch sind die weiteren Schritte der Transfektion noch nicht automatisiert worden. In dieser Arbeit soll hingegen der Transfektionsprozess vollständig in einem mikrofluidischen System integriert werden, um somit alle Prozessschritte zu automatisieren und eine Einbindung in kontinuierliche Prozesse zu ermöglichen.



### 3.3 3D-Druck miniaturisierter und mikrofluidischer Systeme

Im Zuge dieser Promotionsarbeit wurde ein mikrofluidisches System mittels 3D-Drucktechnologie hergestellt. Diese Fertigungstechnik ist erst seit wenigen Jahren im Bereich der Mikrofluidik im Einsatz und bietet durch einen hohen Automatisierungsgrad und große Flexibilität beim Design Vorteile gegenüber den herkömmlichen Fertigungsverfahren mikrofluidischer Systeme. In Abbildung 5 ist eine graphische Kurzzusammenfassung der Veröffentlichung dargestellt.

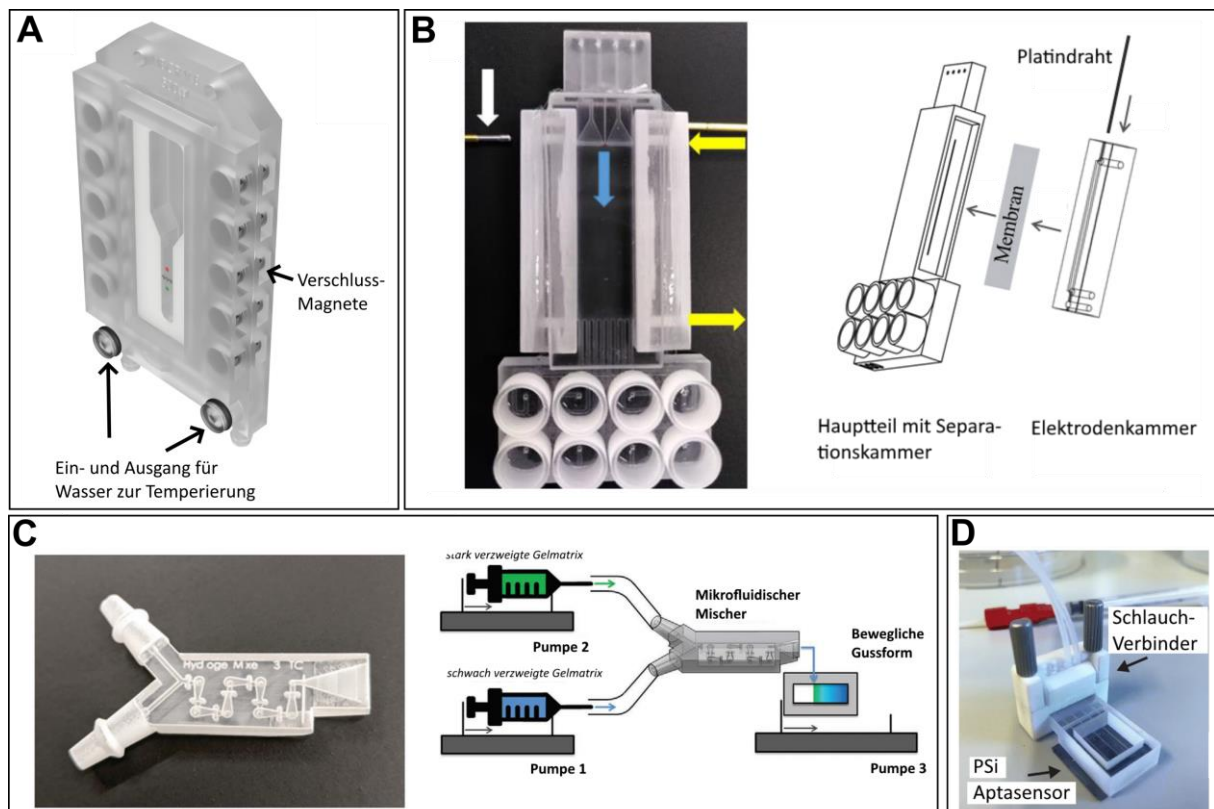


Abbildung 5: Die Flexibilität des 3D-Drucks ermöglicht das Erstellen verschiedener miniaturisierter und mikrofluidischer Systeme. A: Mikroblassensäulenreaktor zur Kultivierung von Mikroorganismen. B: Miniaturisierte Frei-Flusselektrophorese. C: Mikrofluidischer Mischer zur Erstellung von Hydrogelen. D: Mikrofluidisches System mit integriertem Aptasensor aus porösem Silizium.

Im folgenden Review „Von der Zellkultur zur Biosensorik – 3D-Druck miniaturisierter und mikrofluidischer Systeme“, erschienen in der Fachzeitschrift *Chemie in unserer Zeit*, wird ein Überblick über verschiedene 3D-Druckverfahren gegeben und beispielhaft auf einige aktuelle Entwicklungen mikrofluidischer Systeme mit unterschiedlichen Anwendungen eingegangen.

# Von der Zellkultur zur Biosensorik 3D-Druck miniaturisierter und mikrofluidischer Systeme

ANTON ENDERS | JANINA BAHNEMANN

*Additive Fertigungsverfahren haben die Entwicklung und Produktion im Maschinenbau revolutioniert. Auch die Biotechnologie nutzt bereits die Vorteile des 3D-Drucks in der Entwicklung verschiedenster Anwendungen.*

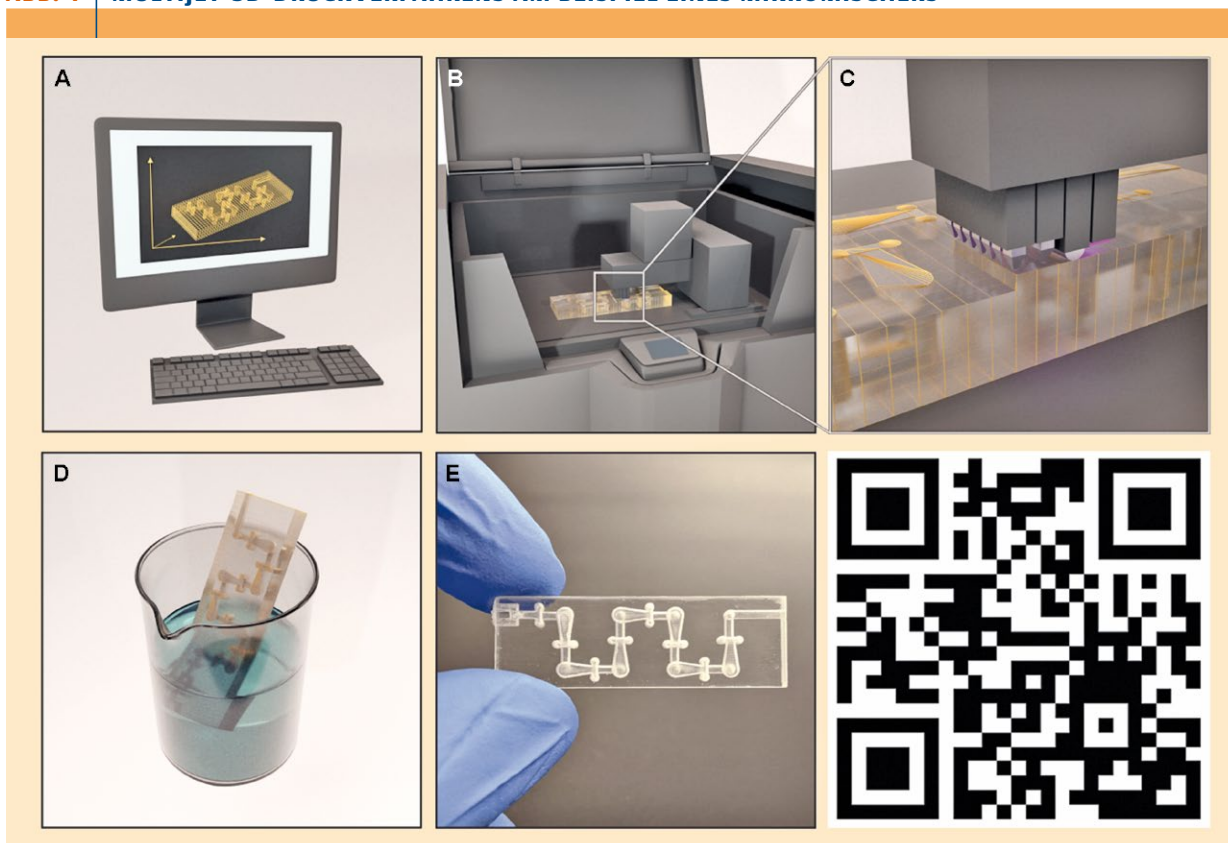
Seit der Erfindung der additiven Fertigung – auch bekannt unter der Bezeichnung *3D-Druck* – im Jahr 1983 durch den Amerikaner Charles W. „Chuck“ Hall, wurde die Prototypentwicklung in zahlreichen Industriezweigen revolutioniert. Während anfangs nur die schichtweise Aushärtung von Kunstharz, die Stereolithografie, als alleinige Fertigungs-

technik zur Verfügung stand, sind mittlerweile viele weitere 3D-Druckverfahren entwickelt worden. Durch die additive Fertigung mit Metallen wurden neue Designs in Luft- und Raumfahrt möglich, für die nicht nur die Entwicklung, sondern auch die Produktion mittels 3D-Druck durchgeführt wird. Mit dem Auslaufen erster Patente in den frühen 2000er Jahren wurde die additive Fertigung auch außerhalb der einschlägigen Industriebranchen populär, da fortan 3D-Drucker selbst für Privatpersonen erschwinglich wurden [1].

Zeitgleich mit der Entwicklung neuer Druckverfahren wurde auch die Präzision der Drucker immer weiter verbessert, so dass mittlerweile Strukturen im ein- bis zweistelligen Mikrometerbereich 3D-gedruckt werden können. Die Möglichkeit feine, komplexe, dreidimensionale Kanalsys-

**ABB. 1 | MULTIJET-3D-DRUCKVERFAHRENS AM BEISPIEL EINES MIKROMISCHERS**

**A:** Computer-Aided Design (CAD).  
**B:** Die CAD-Datei wird direkt an den 3D-Drucker gesendet, der das Modell schichtweise aufbaut. **C:** Detailansicht auf den Druckkopf, der Druckmaterial und Stützmaterial aufträgt. **D:** Durch Auflösen des Stützmaterials werden die innenliegenden Mikrokanäle freigelegt. **E:** Das fertige Modell. Der QR-Code verweist auf ein Video, das den Druckprozess veranschaulicht [11].



teme innerhalb weniger Stunden herzustellen, macht die 3D-Drucktechnologie äußerst attraktiv für die Fertigung von Mikrosystemen, zu denen auch mikrofluidische Systeme zählen.

Mikrofluidische Systeme sind im allgemeinen Kanalsysteme mit einem Kanaldurchmesser von weniger als einem Millimeter, die verschiedenste Prozessschritte auf kleinstem Raum miteinander kombinieren können. Die Einsatzbereiche solcher Systeme, die häufig auch als *Lab-on-a-Chip* bezeichnet werden, sind meistens in der Chemie, der Medizin oder Biotechnologie angesiedelt. Die Entwicklung mikrofluidischer Systeme verfolgt das Ziel, Probemengen, Reagenzien und Arbeitsfläche zu verringern, durch Parallelisierung den experimentellen Durchsatz (High-Throughput) zu erhöhen und gleichzeitig Arbeitszeit einzusparen [2].

Zahlreiche mikrofluidische Systeme finden in der Biotechnologie bereits Anwendung für die Aufarbeitung von Proteinen und Nukleinsäuren. Dabei ist vor allem der geringe Probenverbrauch und die hohe Reproduzierbarkeit durch die gute Kontrollierbarkeit der mikrofluidischen Umgebung von Vorteil. Es gibt zudem auch einige mikrofluidische Systeme, die im Bereich der Zellkulturtechnik für die Kultivierung oder Manipulation von Zellen eingesetzt werden. Dies ermöglicht zum einen die parallele Kultivierung und gleichzeitige Analyse von Säugetierzellen sowie einzelner Bakterien- oder Hefezellen [3, 4], aber auch bereits etablierte Prozesse und Laborarbeiten können durch Automatisierung und Standardisierung vereint und vereinfacht werden. Darüber hinaus sind mikrofluidische Systeme für die Analytik von großem Interesse, da durch diese viele Analyseschritte automatisiert nacheinander ablaufen können [5].

Am häufigsten werden mikrofluidische Systeme mit PDMS (Polydimethylsiloxan) in Gussverfahren hergestellt [6]. Hierdurch lassen sich feine Kanäle im Mikrometerbereich realisieren und gleichzeitig erlaubt das durchsichtige Polymer die mikroskopische Betrachtung des Systems. Vor allem für biologische Anwendungen kann je nach Anwendung die Durchlässigkeit des Materials für Sauerstoff ein weiterer Vorteil sein. Alternativ wird häufig auch Glas (meist über Ätzprozesse) als Material für die Herstellung mikrofluidischer Systeme verwendet [7], welches neben der Transparenz durch mechanische und chemische Stabilität überzeugt. Mit dem Aufkommen neuer, präziserer 3D-Druckverfahren ist in den letzten Jahren das Interesse an 3D-gedruckten mikrofluidischen Systemen aus verschiedensten 3D-Druckmaterialien rasant angestiegen [8].

Nachfolgend werden verschiedene mikrofluidische Systeme mit Einsatzbereichen in der Biotechnologie präsentiert, deren Entwicklung mittels hochauflösender 3D-Druckverfahren ermöglicht wurde. Hierbei werden nicht nur Anwendungen in der Zellkultur aufgezeigt, sondern auch der Nutzen solcher Systeme für analytische Zwecke, beispielsweise für den Nachweis von Bakterien und Proteinen mittels integrierter Biosensoren, veranschaulicht.

### 3D-Druck-Technologien

Alle 3D-Druckverfahren funktionieren nach dem gleichen Grundprinzip: Ein Modell wird durch das schichtweise Hinzufügen von Material nach und nach aufgebaut. Unterschiedliche Druckverfahren ermöglichen die Verwendung verschiedenster Druckmaterialien und weisen zudem in der Auflösung sowie der Druckgeschwindigkeit erhebliche Unterschiede auf. Während im kostengünstigen Fused-Deposition-Modeling-Verfahren (FDM) geschmolzenes Plastik aus einer Düse (ähnlich einer Heißklebepistole) aufgetragen wird, härtet beim Stereolithografieverfahren (SLA) ein Laser ein Photopolymer Schicht für Schicht aus. Mit dem SLA-Verfahren verwandt ist das Selektive Lasersintern (SLS): Auch hier zeichnet ein Laser eine Schicht nach, allerdings ist das Druckmaterial ein Pulver, das durch den Laser geschmolzen wird. Somit können nicht nur Kunststoffe, sondern auch Metalle als Druckmaterial dienen. Eine schöne Übersicht zu den verschiedenen Druckverfahren, auch im Kontext mit anderen Anwendungen im Bereich der Biotechnologie, wurde von Raddatz *et al.* veröffentlicht [1].

Das Multijet- oder Polyjetverfahren nutzt zusätzlich zu einem Modellmaterial auch ein Stützmaterial. Dieses wird in Hohlräume oder unter Überhänge eines Modells gedruckt und nach dem Druck entfernt – meistens durch Lösen in Wasser oder Schmelzen. Hierfür werden das Modellmaterial (wie beim SLA-Verfahren ein Photopolymer) und das Stützmaterial wie bei einem Tintenstrahldrucker aus zahlreichen Düsen Schicht für Schicht auf die Druckplattform aufgetragen. Nach jeder Schicht wird das Material mit einer UV-Lampe ausgehärtet. Dieses Druckverfahren ist besonders für die Herstellung von mikrofluidischen Systemen geeignet, da die hohe Druckauflösung und die Verwendung von Stützmaterial für eine besonders hohe Designfreiheit sorgen.

Die hohe Automatisierung des 3D-Druckprozesses vereinfacht die Entwicklung von neuen Prototypen enorm. Häufig reicht es aus, das gewünschte Design am Computer mittels Computer-Aided-Design-Software (CAD) zu erstellen, an den Drucker zu übersenden und nach Abschluss des Druckvorgangs minimale Aufarbeitungsschritte durchzuführen. Dadurch wird die Einstiegshürde in die (Mikro-)Systementwicklung gegenüber klassischen Fertigungsverfahren, die häufig sehr viel Handarbeit und Erfahrung erfordern, deutlich gesenkt. Auch bei der Herstellung mikrofluidischer Systeme hat der 3D-Druck gegenüber der herkömmlichen Fertigung für die Prototypenentwicklung große Vorteile. Bei herkömmlichen Fertigungstechniken, wie dem Gießen von Polydimethylsiloxan (PDMS), wird für die Erstellung eines neuen Modelldesigns eine neue Gussform benötigt. Die Form kann durch Fräsen gefertigt werden, was großes handwerkliches Geschick erfordert und nur von in Feinmechanik ausgebildeten Personen durchgeführt werden kann. Alternativ kann die Gussform über Lithographieverfahren [9] – bekannt aus der Halbleiterindustrie – oder auch mittels 3D-Druck [10] hergestellt werden. Das

eigentliche Gießen muss meistens in Reinraumlaboren durchgeführt werden. Zusätzlich ist es bei komplexen, dreidimensionalen Kanalstrukturen nötig, das gewünschte Modell in mehreren Schritten und verschiedenen Schichten zu gießen und diese nachträglich miteinander zu verbinden. Beim 3D-Druck können hingegen auch dreidimensionale Strukturen und Kanäle in einem Schritt gefertigt werden. Der allgemeine Ablauf des Multijet-3D-Druckverfahrens am Beispiel eines Mikromischers ist in Abbildung 1 dargestellt [11].

### Untersuchung des 3D-Druckmaterials auf Biokompatibilität

Die meisten Anwendungen additiver Fertigungsverfahren liegen im Bereich des Maschinenbaus und der Prototypen-

#### WAS MAN WISSEN MUSS

*3D-Drucker ermöglichen eine hohe Flexibilität in der Herstellung von Prototypen, die sowohl für industrielle als auch labortechnische Anwendungen im Bereich der Biotechnologie genutzt werden.*

*Durch die hohe Präzision neuer 3D-Druckverfahren können mikrofluidische Systeme mittels Multijet-Drucker einfacher und schneller entwickelt werden.*

*Durch die Verfügbarkeit biokompatibler Druckmaterialien ist die Herstellung und Anwendung maßgeschneiderter Kultivierungsgefäße möglich.*

*Die Designfreiheit beim 3D-Druck ermöglicht eine einfache Systemintegration verschiedener funktioneller Einheiten wie Mikromischer, Mikropumpen, Mikroventile und Zellseparatoren.*

*Die Einbindung von (Bio-)Sensoren in mikrofluidische Systeme kann die Sensorleistung steigern und die Entwicklung moderner, automatisierter, parallelisierter und transportabler Sensorensysteme ermöglichen (wie Point-of-Care Diagnostik).*

#### TAKE-HOME MESSAGE

*3D printers allow high flexibility in the production of prototypes, which are used for both industrial and laboratory applications in the field of biotechnology.*

*Due to the high precision of new 3D printing processes, microfluidic systems can be developed more easily and quickly using Multijet printers.*

*The availability of biocompatible printing materials enables the production and application of customized cultivation vessels.*

*The design freedom of 3D printing enables easy system integration of various functional units (such as micromixers, micropumps, microvalves, and cell separators).*

*The incorporation of (bio)sensors into microfluidic systems can increase sensor performance and enable the development of advanced, automated, parallelized, and portable sensor systems (such as point-of-care diagnostics).*

entwicklung. Jedoch sind in den letzten Jahren neue Anwendungsbereiche in den Fokus der Hersteller gekommen. Vor allem der Bereich der Dentalmedizin, in dem für jeden Patienten individuelle Prothesen erstellt werden müssen, bietet eine optimale Anwendung für 3D-Druckverfahren. Daher ist die Biokompatibilität – also die Verträglichkeit zwischen einem Material und lebendem Gewebe – in der Materialentwicklung für 3D-Drucker eine weitere wichtige Eigenschaft geworden, die auch für Anwendungen von 3D-gedruckten Modellen mit direktem Kontakt zu einem lebenden Gewebe oder Zellen unerlässlich ist. Durch den rasanten technologischen Fortschritt im Bereich des 3D-Drucks kommen zunehmend neue Materialien auf den Markt; eine umfangreiche Testung für biomedizinische und biotechnologische Anwendungen fehlt jedoch in den meisten Fällen.

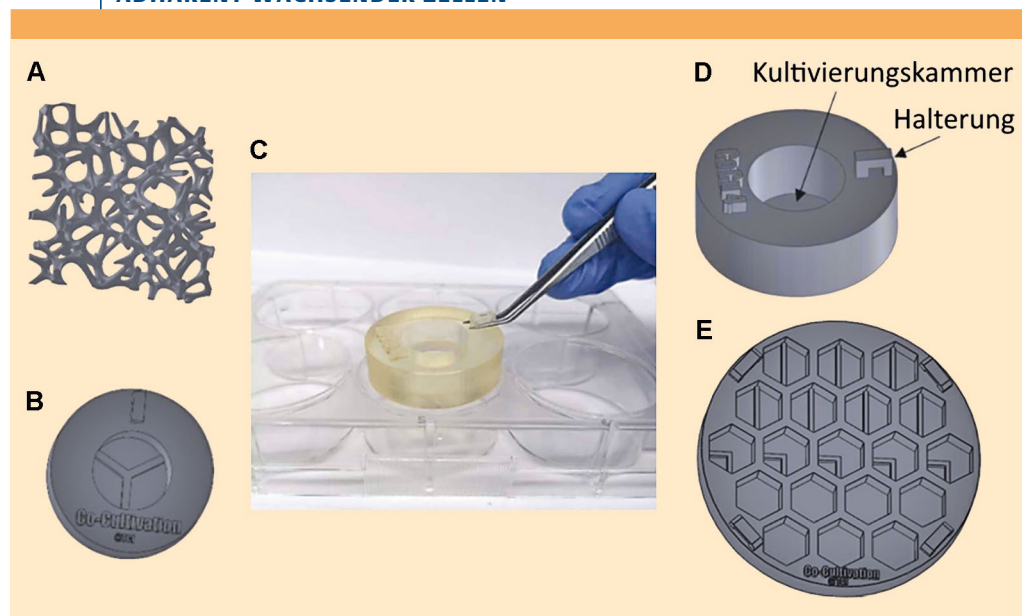
Siller *et al.* haben daher umfangreiche Biokompatibilitätstests für verschiedene 3D-Druckmaterialien für Multijetdrucker (Polyacrylate nach ISO Norm (EN ISO 10993-12 (2012)) mit mesenchymalen Stammzellen (MSC) durchgeführt [9, 10]. Zur Beurteilung der Biokompatibilität wurden Analysen zur Untersuchung der Zellviabilität (dem Anteil der lebenden Zellen an der gemessenen Gesamtzellzahl) nach Kontakt mit dem 3D-Druckmaterial durchgeführt. Zusätzlich wurde der Zustand der Zellen durch eine Zelltodanalyse (Apoptose- und Nekroseuntersuchung) mittels Durchflusszytometrie beurteilt. Durch diese Methode können eine Vielzahl von Zellen innerhalb kürzester Zeit hinsichtlich ihres „Gesundheitszustands“ analysiert werden. Die getesteten Materialien haben in diesen Untersuchungen nach ISO-Norm keine negativen Auswirkungen auf die Stammzellen gezeigt und lassen sich somit als biokompatibel einstufen. Für andere Zellen oder höhere Organismen sind diese Ergebnisse jedoch nicht ohne weiteres übertragbar [14] und erfordern je nach Anwendung eine neue Untersuchung.

Bei der Kultivierung adhärenter Zellen, die eine Bindung an eine Oberfläche oder eine Gelstruktur zum Zellwachstum benötigen, ist neben der Biokompatibilität auch das Anhaften der Zellen an der Materialoberfläche wichtig. Diese Zellen machen einen großen Anteil der Zellen in Menschen und Tieren aus, daher werden sie zum Beispiel zur Erforschung menschlicher Organbildung, bei Toxizitätsstudien in Organ-on-a-Chip-Systemen [15] oder für die Produktion viraler Vektoren zur Gentherapie [16] genutzt. Zur Untersuchung der Anhaftung haben Siller *et al.* kleine, 3D-gedruckte Kultivierungsgefäße erstellt, die eine Kultivierung der Zellen auf dem Druckmaterial und gleichzeitig (aufgrund der Transparenz des 3D-Druckmaterials) eine mikroskopische Betrachtung der Zellform ermöglichen. Ein Vergleich mit gleich großen und gleich geformten, kommerziell erhältlichen 24-Well-Kultivierungsplatten zeigte auch hierbei keine Unterschiede beim Zellwachstum und in der Zellform. Das 3D-Druckmaterial eignet sich daher auch für die Entwicklung von Kultivierungsgefäßen für adhärenente Stammzellen [13].

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das 3D-Druckmaterial genutzt, um maßgeschneiderte, miniaturisierte Kultivierungskammern zu entwickeln, die für Angiogenesestudien (Bildung von Blutgefäßen aus Stammzellen) verwendet werden können. Die Mechanismen der Gefäßbildung sind sowohl beim natürlichen Wachstum oder der Wundheilung, aber auch bei pathologischen Prozessen wie der Tumorbildung von Bedeutung. Das Besondere an diesen Kultivierungskammern ist eine kleine, 3D-gedruckte Barriere in der Mitte der Kammern, welche eine physische Separation von zwei verschiedenen Zelltypen bewirkt, jedoch gleichzeitig die Kultivierung der Zellen im selben Kulturmedium ermöglicht. Somit können beispielsweise zellspezifische Signalstoffe oder Wachstumsfaktoren über das Medium zwischen den beiden Zelltypen ausgetauscht werden, ohne dass die Zellen in direktem Kontakt miteinander stehen. Man spricht in diesem Fall auch von Ko-Kultivierung der Zellen. Eine solche Ko-Kultivierungskammer ist in Abbildung 2 dargestellt. Für die Studie wurden mesenchymale Stammzellen auf der einen Seite und Endothelzellen auf der anderen Seite der Kammer kultiviert. Mittels mikroskopischer Beobachtungen konnte festgestellt werden, dass die Endothelzellen bei der Ko-Kultivierung mit mesenchymalen Stammzellen röhrenförmige Zellformen ausbilden. Die Ausbildung dieser Zellform ist ein charakteristisches Merkmal der Angiogenese, welche durch angiogene Faktoren, die von den mesenchymalen Stammzellen freigesetzt werden, ausgelöst wird [17].

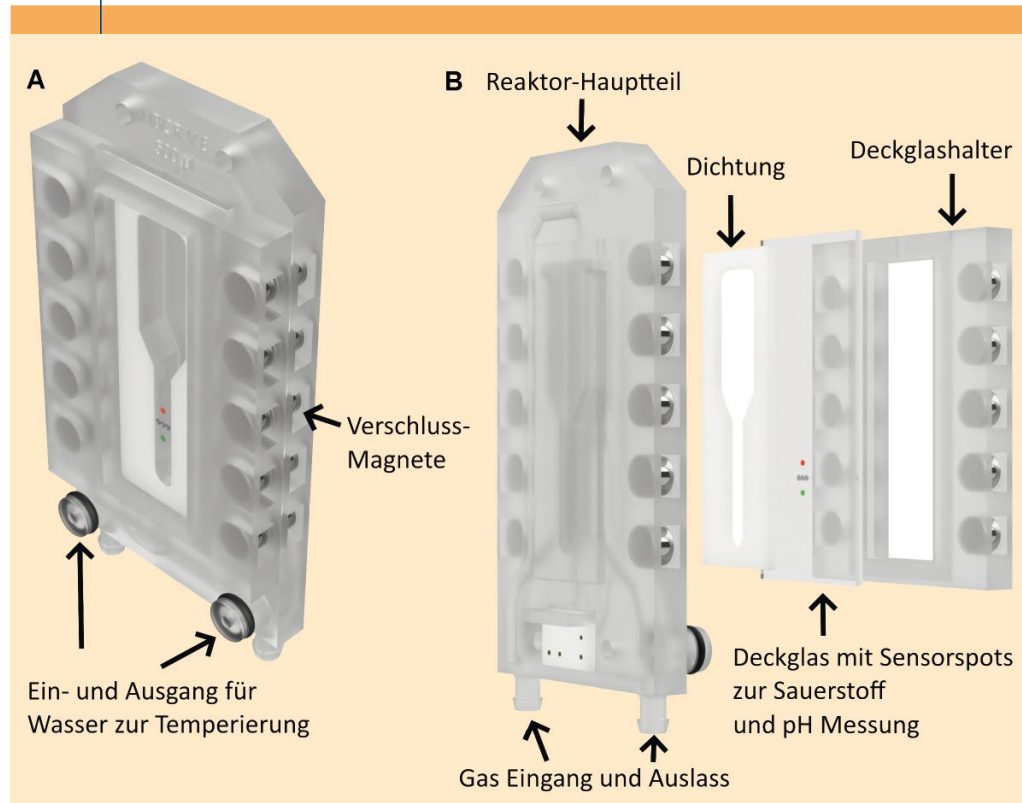
Einige Beispiele von maßgeschneiderten Kultivierungskammern, die mittels 3D-Druck hergestellt wurden, sind in Abbildung 2 gezeigt. Die 3D-gedruckten Systeme ermöglichen verschiedene Kultivierungsversuche, beispielsweise 3D-Zellkultivierungen mit individuellen Gerüststrukturen (2A) oder die Ko-Kultivierung von drei verschiedenen Zellarten (2B), was die Flexibilität und Vorteile des 3D-Drucks mit biokompatiblen Materialien betont.

**ABB. 2 | 3D-GEDRUCKTE KULTIVIERUNGSKAMMERN ZUR UNTERSUCHUNG ADHÄRENT WACHSENDER ZELLEN**



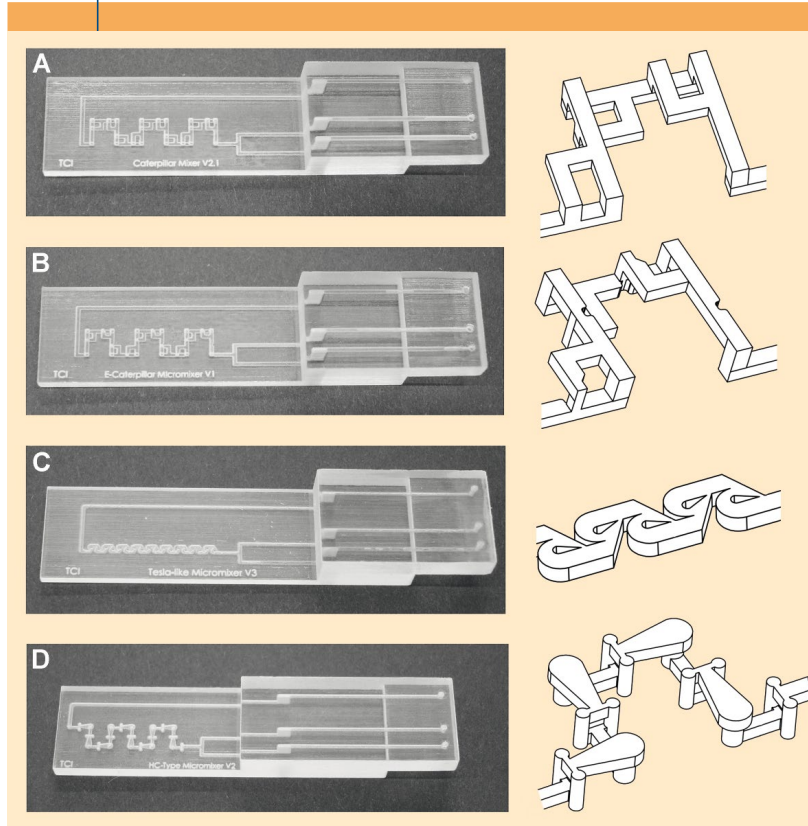
**A:** Gerüststruktur, die direkt mit Zellen besiedelt werden kann. **B:** Ko-Kultivierungskammer mit drei Abteilen, die eine physische Trennung der Zellen durch 3D-gedruckte Barrieren ermöglichen. **C:** Ko-Kultivierungskammer, die in handelsübliche 6-Well-Platten eingesetzt werden kann. **D:** Detailansicht der Kultivierungskammer aus C. **E:** Kultivierungskammer mit 19 separaten Wells für Screening-Versuche mit unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Modifiziert aus [9, 10].

**ABB. 3 | MIKROBLASENSÄULENREAKTOR**



**A:** Ansicht des zusammengesetzten Mikroblasensäulenreaktors. **B:** Explosionsansicht der Reaktoreinzelteile [18].

**ABB. 4 | MIT 3D-DRUCK GEFERTIGTE MIKROMISCHER**



**A: Caterpillar Mischer. B: Enhanced Caterpillar Mischer. C: Tesla-like Mischer. D: HC-Mischer. Rechts ist jeweils die isometrische Detailansicht der dreidimensionalen Mischerkanäle dargestellt [19].**

### Additive Fertigung von Mikrobioreaktoren

Durch den Einsatz biokompatibler Druckmaterialien eignet sich der 3D-Druck auch für die Entwicklung komplexer Bioreaktorgefäße, die beispielsweise zur Kultivierung von Suspensionszelllinien verwendet werden können. Diese Zellen benötigen im Gegensatz zu adhärennten Zellen keine Oberfläche zum Anwachsen und können daher einfacher und in höherer Zellzahl kultiviert werden. In der Entwicklung und Optimierung moderner Bioprozesse spielen ge-

ringe Kultivierungsvolumina eine immer wichtigere Rolle. Teure Kultivierungsmedien (zum Beispiel rund 70 Euro pro Liter für die Kultivierung von Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen – eine Zelllinie, die im industriellen Maßstab für die Herstellung von Biopharmazeutika verwendet wird) sowie der höhere Platzbedarf und Energieverbrauch größerer Kultivierungssysteme machen diese im Vergleich zu miniaturisierten, parallelisier- und automatisierbaren Systemen wirtschaftlich unattraktiv. Daher rücken miniaturisierte Bioreaktoren, die ganz individuell mittels 3D-Druck hergestellt werden können, zunehmend in den Fokus der Bioprozessentwicklung.

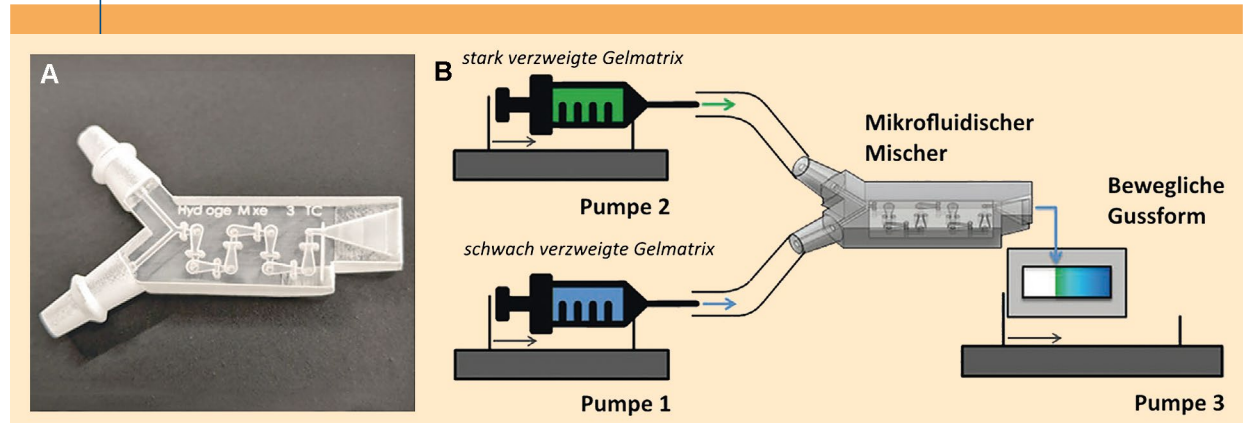
Ein Beispiel eines solchen 3D-gedruckten Mikrobioreaktors zeigt Abbildung 3. Dieser besteht aus einem 3D-gedruckten Hauptteil, der die Form des Reaktors vorgibt und Kanäle zur Reaktortemperatur beinhaltet, einem Deckglas mit Sensorspots sowie einem Anpressrahmen für das Deckglas. Die Reaktorbelegung erfolgt vom Reaktorboden aus, wodurch die Gasblasen durch das Kulturmedium aufsteigen und für eine Bewegung des Mediums sorgen. Dadurch kann auf einen separaten Rührer innerhalb des Reaktors verzichtet werden. Der Mikrobioreaktor bietet aufgrund des sehr geringen Reaktorvolumens (550  $\mu\text{L}$ ) die Vorteile eines schnellen Temperatur- und Massentransfers (Aufnahme von Sauerstoff in das Medium, Abgabe von  $\text{CO}_2$  aus dem Medium). Zudem ermöglicht er durch die integrierten Sensorspots Online-Messungen der Biomasse, der Sauerstoffkonzentration, des pH-Werts sowie Abgasmessungen ( $\text{O}_2$  und  $\text{CO}_2$ ) zur kontinuierlichen Überwachung und Regelung des Bioprozesses. Bei der Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* im 3D-gedruckten Mikrobioreaktor wurden Zelldichten von 13 g/L erreicht und Parameter (Wachstumsgeschwindigkeit und Produktbildungsrate) gemessen, die mit denen von Standardkultivierungen im 2,5 L-Bioreaktor gut vergleichbar sind [18].

### 3D-gedruckte Mikromischer

In der Studie von Enders *et al.* [19] wurden verschiedene passive Mikromischer hergestellt und die Mischleistung miteinander verglichen. In mikrofluidischen Systemen herrscht

**ABB. 5 | MISCHUNG VON HYDROGELBESTANDTEILEN**

**A: Mikrofluidisches System zur kontinuierlichen Mischung von Hydrogelbestandteilen. B: Versuchsaufbau: Zwei Spritzenpumpen drücken die Hydrogelbestandteile in den Mikromischer, aus dem das fertige Hydrogel in eine bewegliche Gussform gegossen wird [20].**



durch die kleinen Kanaldimensionen und die relativ geringen Flussraten (meist unter 1 mL/min) eine laminare Strömung; die Stromlinien verlaufen also parallel zueinander. Dies führt dazu, dass eine Vermischung von Flüssigkeiten in einem mikrofluidischen Kanal durch die laminare Strömung verhindert wird, lediglich die Diffusion sorgt für einen langsamen Stofftransport. Daher sind Mikromischer nötig, um verschiedene Stoffe in mikrofluidischen Systemen effektiv zu vermischen. Passive Mikromischer nutzen in der Regel komplexe, dreidimensionale Kanalstrukturen, um mehrere Flüssigkeiten miteinander zu vermischen. Durch Windungen der Kanäle oder das gezielte Aufteilen und anschließende Zusammenführen des Flüssigkeitsstromes soll eine möglichst schnelle Durchmischung her-

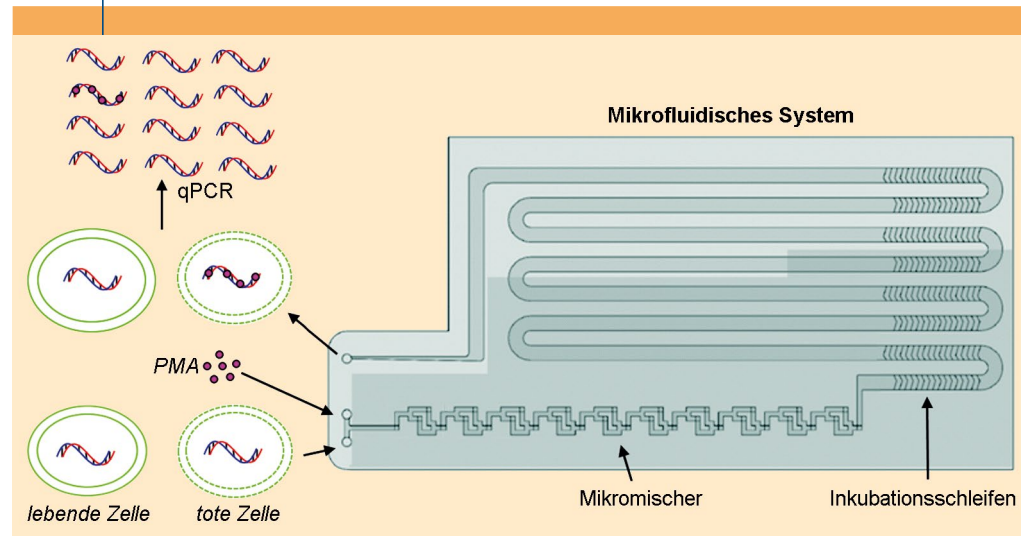
beigeführt werden. Mikromischer werden häufig in komplexere mikrofluidische Systeme eingebaut, um die homogene Durchmischung von Flüssigkeiten vor weiteren Arbeits- oder Analyseschritten zu gewährleisten.

Die schnelle und automatisierte Herstellung mittels 3D-Druck hat sich in dieser Studie als großer Vorteil erwiesen. Es wurden vier komplexe Mikromischer mit verschiedenen Kanalgeometrien hergestellt (Abbildung 4). Die Fertigung (vom 3D-Design zum fertigen Bauteil) dauerte nur wenige Stunden und es waren bis auf das Schmelzen und Herausspülen des wachsähnlichen Stützmaterials aus den Kanälen keine zusätzlichen manuellen Fertigungsschritte nötig. Insbesondere die schnelle Herstellung komplexer, dreidimensionaler Mikrokanäle ist ein großer Vorteil gegenüber traditionellen, mikrotechnischen Fertigungsprozessen.

Beim Vergleich der verschiedenen Mikromischer mittels optischer Mischexperimente und Computersimulationen konnte ein besonders geeignetes 3D-Design, der HC-Mischer, gefunden werden, das in einem großen Flussratenbereich ( $100\text{--}1000\ \mu\text{L min}^{-1}$ ) eine homogene Durchmischung in weniger als einer Sekunde erzielen konnte. Dieser Mikromischer besitzt ein geringes internes Kanalvolumen von lediglich  $16\ \mu\text{L}$ . Er kann bei der Fertigung mikrofluidischer Systeme mittels 3D-Druck direkt in das CAD-Design eingebunden werden und somit in vielen Mikrosystemen als integriertes, funktionelles Element zur Anwendung kommen.

Ein Beispiel einer praktischen Anwendung ist die Integration des HC-Mikromischer in ein 3D-gedrucktes mikrofluidisches System, wodurch ein Konzentrationsgradient in Hydrogelen erzeugt werden kann (Abbildung 5). Mit Hilfe dieses Systems kann beispielsweise das Wachstumsverhalten von Zellen in Abhängigkeit der Steifigkeit eines Hydrogels untersucht werden. So zeigen im Hydrogel ausgesäte

ABB. 6 | UNTERSCHIEDUNG VON LEBENDEN UND TOTEN BAKTERIEN



**Mikrofluidisches System zur Diskriminierung von lebenden und toten Bakterien in Wasserproben durch Inaktivierung der DNA toter Zellen mittels PMA (Propidiummonoazid) vor einer qPCR-Untersuchung [21].**

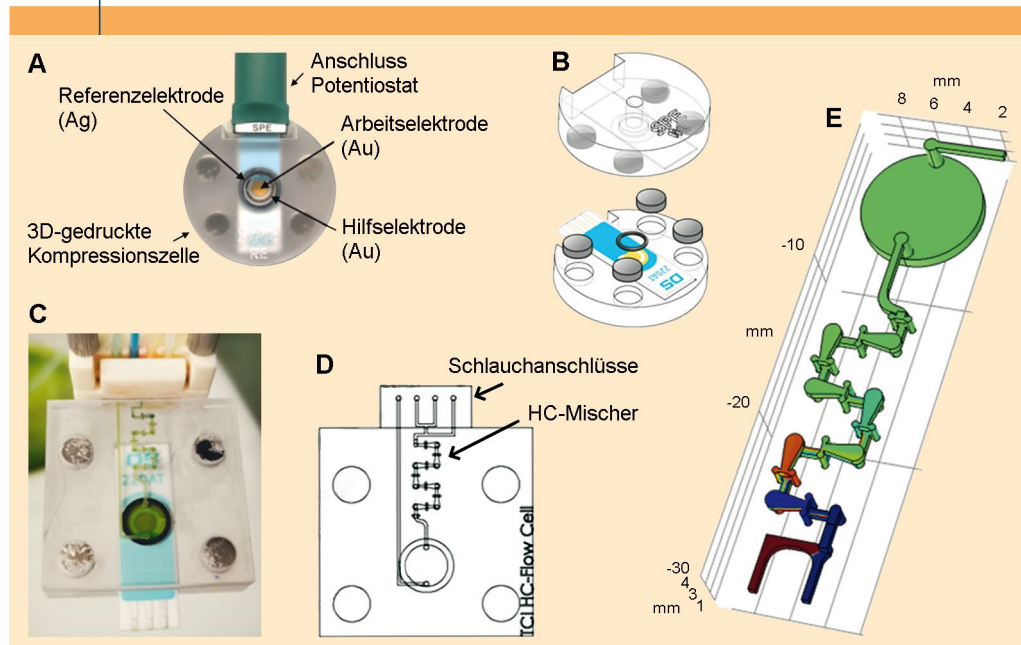
mesenchymale Stammzellen (MSC) und Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) Unterschiede in der Morphologie und dem Wanderungsverhalten auf, welche maßgeblich durch die Steifigkeit des Hydrogels beeinflusst werden [20].

Eine weitere Anwendung eines integrierten, 3D-gedruckten Mikromischer wurde von Zhu *et al.* [21] vorgestellt. Das mikrofluidische System ermöglicht eine präzise Vorbehandlung von mikrobieller DNA in Abwasserproben mit Propidiummonoazid (PMA) (Abbildung 6). In dem mikrofluidischen System wird PMA mit der Wasserprobe durchmischt. Das PMA bindet in einem Inkubationsabschnitt an freie DNA-Moleküle, die außerhalb lebender Bakterienzellen oder in toten Zellen vorliegen. Diese DNA-Moleküle werden bei der anschließenden Polymerasekettenreaktion (PCR) nicht vervielfältigt und sorgen daher nicht für falsch-positive Ergebnisse. Hierdurch kann der Nachweis und die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Mikroorganismen in Wasserproben mittels PCR ermöglicht und somit eine potenzielle bakterielle Kontamination von Trinkwasser überprüft werden.

### 3D-gedruckte Flusszelle mit integriertem Biosensor zur Detektion von *Escherichia coli*

Mikrofluidische Systeme werden zunehmend im Bereich der Analytik eingesetzt, um beispielsweise die Handhabung und die Leistung von Sensoren zu verbessern und Analyse-schritte zu automatisieren. Ein Beispiel hierfür sind die von Siller *et al.* entwickelten Durchflusszellen, in die ein elektrochemischer Biosensor eingebaut und die Detektion des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) ermöglicht wurde (Abbildung 7) [22]. Elektrochemische Biosensoren werden bereits im Gesundheitswesen, bei Umweltanalysen und Lebensmittelkontrollen eingesetzt. Beim Einsatz von Biosensoren bietet vor allem die hohe Selektivität des biolo-

**ABB. 7 | ELEKTROCHEMISCHER BIOSENSOR IN 3D-GEDRUCKTER DURCHFLUSSZELLE**



**A. Aufsicht des Aufbaus der Screen-printed Elektrode in 3D-gedruckter Halterung. B: Schematischer Aufbau der Halterungsteile mit austauschbarem Aufsatz. C: Aufbau der dynamischen Durchflusszelle mit integriertem Mikromischer. D: Schematische Darstellung der dynamischen Flusszelle. E: Ergebnis einer Strömungssimulation für die Untersuchung der Durchmischung in der dynamischen Durchflusszelle [22].**

gischen Erkennungselementes den großen Vorteil, dass beispielsweise verschiedene Erreger voneinander unterschieden werden können. Als Erkennungselemente werden zum Beispiel Antikörper, Lectine, Bakteriophagen oder Aptamere eingesetzt. Aptamere sind einzelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide, die über ihre 3D-Struktur spezifisch Zielmoleküle oder ganze Zellen binden können.

Der in die Durchflusszellen integrierte Biosensor (7 A+C) nutzt Aptamere, die auf der Goldoberfläche sogenannter *Screen-Printed* Elektroden (SPE) immobilisiert sind, um ganz spezifisch *E. coli*-Bakterien zu binden. Die erfolgte Bindung kann mittels Impedanzspektroskopie detektiert werden. Um die Handhabung des Biosensors sowie die Reproduzierbarkeit von Messungen zu verbessern, haben Siller *et al.* mikrofluidische Durchflusszellen mittels 3D-Druck entwickelt. Diese bestehen jeweils aus einem unteren Halterungsteil und einer oberen Abdeckung, während die Elektrode zwischen diesen beiden Teilen platziert wird. Die in Abbildung 7C gezeigte Durchflusszelle ist mit Schlauchanschlüssen über gesteuerte Pumpen direkt mit der Probenflüssigkeit und Waschlösungen verbunden, wodurch Mess- und Waschschriffe automatisiert und kontinuierlich hintereinander durchgeführt werden können. Um eine homogene Durchmischung der Probe vor dem Kontakt mit dem Biosensor zu ermöglichen, wurde in die Durchflusszelle ein Mikromischer integriert.

Mit diesem integrierten elektrochemischen Biosensorsystem konnte erfolgreich das Zielbakterium *E. coli* in verschiedenen Konzentrationen (von  $10^5$  bis  $10^8$  Zellen/mL)

detektiert werden. Zusätzlich wurde die Spezifität des Aptamer-basierten Biosensors nachgewiesen, indem Versuche mit anderen Bakterienarten (wie *Staphylococcus aureus* und *Salmonella typhimurium*) durchgeführt wurden und hierbei kein Signal gemessen werden konnte. Das Biosensorsystem lässt sich prinzipiell ganz flexibel auf die Messung anderer Analyten oder Mikroorganismen übertragen, indem andere biologische Erkennungselemente (etwa eine andere Aptamersequenz, die ein anderes Bakterium spezifisch bindet) verwendet werden.

### Integration von Aptamer-basierten Biosensoren für den Nachweis von Proteinen

Ein weiteres Beispiel, wie 3D-gedruckte Mikrosysteme die Anwendbarkeit und Leistung von Biosensoren verbessern können, zeigen Arshavsky-Graham *et al.* [23]. In dieser Arbeit wurde für die Biosensorentwicklung die Oberfläche eines oxidierten, porösen Silizium-

chips (PSi) mit Aptameren funktionalisiert, die an Histidin-markierte Proteine binden. Der Siliziumchip wurde anschließend in ein 3D-gedrucktes Mikrosystem eingebaut, das eine spezifische Fläche und Kanalhöhe auf dem Siliziumchip definiert und somit genaue Echtzeitmessungen ermöglicht (Abbildung 8).

Poröses Silizium ist ein Material mit einer schwammartigen Nanostruktur, das als optischer Wandler in biosensorischen Anwendungen eingesetzt wird. Es hat den Vorteil einer sehr großen internen Oberfläche, einer anpassbaren Nanostruktur und einer relativ einfachen Fertigung im Vergleich zu anderen optischen Biosensoren. Besonders vorteilhaft ist die Möglichkeit, markierungsfreie Echtzeitmessungen durchführen zu können, so dass die entsprechenden Proben weniger (oder teilweise gar nicht) vorbehandelt werden müssen. Durch die Bindung von Zielmolekülen – in diesem Beispiel Proteine – an die Aptamere, verändert sich das Reflektionsspektrum des Sensors. Die Veränderung kann mit einem normalen Spektrometer verfolgt werden.

In ihren Versuchen konnten Arshavsky-Graham *et al.* erfolgreich die Bindung von Proteinen an den integrierten Biosensor nachweisen und ebenfalls zeigen, dass der Sensor nach einer Messung regeneriert und direkt wiederverwendet werden kann. Zusätzlich zeigt der Aufbau mit dem 3D-gedruckten Mikrosystem eine deutlich erhöhte Sensitivität sowie eine bessere Selektivität im Vergleich zu traditionellen Messzellen. Die Sensorplattform ist auf einer motorisierten Plattform montiert, so dass mehrere Messungen



automatisiert und an verschiedenen Stellen auf dem Biosensor durchgeführt werden können. Durch den Austausch des Aptamers auf der Sensoroberfläche kann auch bei diesem System eine hohe Flexibilität bezüglich des gewünschten Zielmoleküls, das detektiert werden soll, ermöglicht werden.

### 3D-gedruckte Mikro-Free-Flow-Elektrophorese

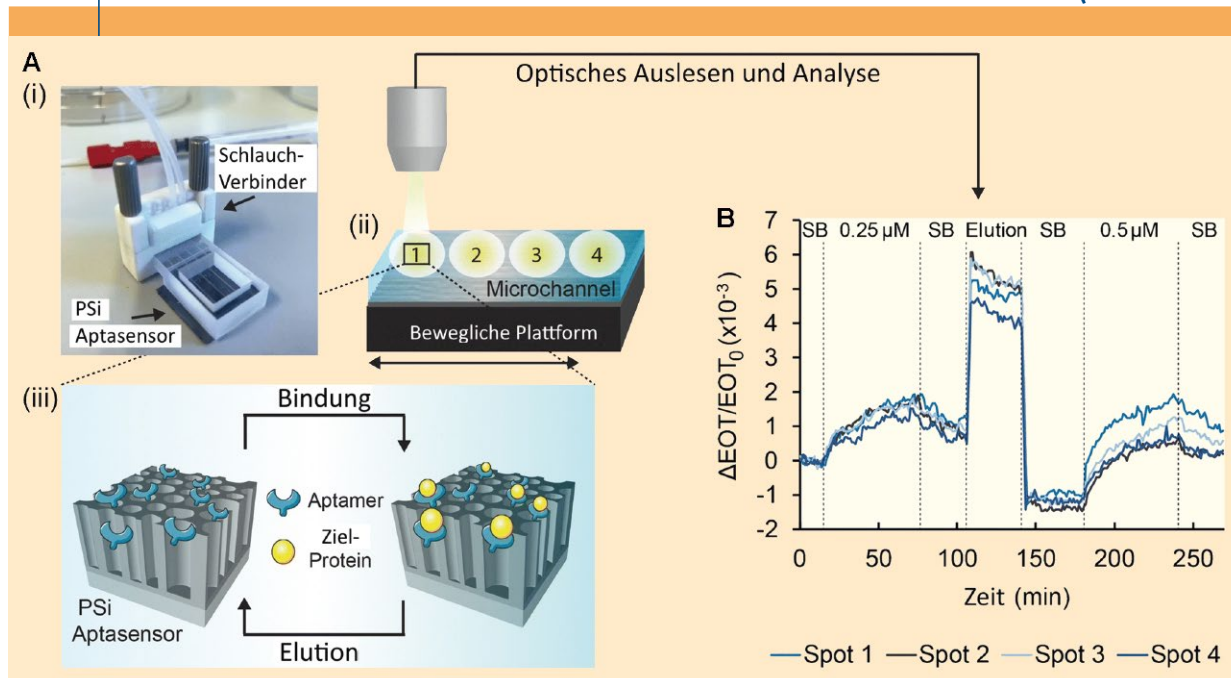
Zur Reinigung von Proteinen, Nukleinsäuren oder Zellen aus einem Gemisch, beispielsweise aus einem Bioprozess, wird häufig die Elektrophorese eingesetzt. Hierbei wandern elektrisch geladene Moleküle durch Anlegen einer Spannung in einer stationären Phase, etwa einem Agarosegel, zum positiven oder negativen Pol. Dieses Auftrennungsprinzip wird bei der Free-Flow-Elektrophorese leicht verändert. Statt einer gelartigen stationären Phase wird ein laminarer Flüssigkeitsstrom verwendet. Die Analyten werden durch Anlegen der Spannung senkrecht zur Flussrichtung nach abgelenkt. Mit mehreren Ausgängen am Ende der Durchflusskammer können somit die getrennten Analyten an den unterschiedlichen Seiten aufgefangen werden. Dadurch, dass die „stationäre“ Phase stetig fließt, ist ein kontinuierlicher Einsatz möglich. Abbildung 9 veranschaulicht die Unterschiede zwischen der klassischen Gelelektrophorese und der Free-Flow-Elektrophorese. In der Lite-

ratur wurde die Auftrennung von DNA, Proteinen und auch Zellen mittels Free-Flow-Elektrophorese-Systemen demonstriert.

Mit Hilfe von additiver Fertigung haben Preuß *et al.* ein mikrofluidisches Free-Flow-Elektrophorese-System erstellt (Abbildung 10) [24]. Durch die Verwendung von Multi-Jet-3D-Druck ist die Herstellung im Gegensatz zu anderen miniaturisierten Free-Flow-Elektrophorese-Systemen stark vereinfacht. Das System besteht aus drei Teilen und kann leicht „nachgebaut“ werden. Der Hauptteil beinhaltet Schlauchanschlüsse für Puffer und Analyten, die Separationskammer und den Probenauffang am Ende der Separationskammer. An den Seiten der Separationskammer sind jeweils eine Polycarbonatmembran und dahinter ein Platindraht als Elektrode eingebaut. Vor allem im Bereich der Separationskammer, die 100  $\mu\text{m}$  hoch ist, konnte die hohe Präzision und Reproduzierbarkeit des 3D-Drucks ausgenutzt werden.

In Experimenten wurde die Auftrennung von verschiedenen Farbstoffen (Rhodamin B, Pyronin Y und Sulforhodamin) sowie Aminosäuren (Glycin, Arginin und Glutamat) erfolgreich demonstriert. Durch die Möglichkeit des kontinuierlichen Einsatzes des Systems zur Auftrennung von Probestandteilen kann die miniaturisierte Free-Flow-Elektrophorese in Bioprozesse integriert werden und dadurch eine kontinuierliche Probenaufarbeitung ermöglichen.

**ABB. 8 | BIOSENSOREXPERIMENTE MIT EINEM INTEGRIERTEN APTAMER-BASIERTEM BIOSENSOR (APTASENSOR)**



**A: (i) 3D-gedrucktes mikrofluidisches System mit dem Aptasensor; (ii) Das System ist auf einer beweglichen Plattform montiert, so dass vier verschiedene Spots in den Mikrokanälen ausgelesen werden können; (iii) Schematische Darstellung der auf dem porösen Silizium gebundenen Aptamere, die das Zielprotein binden bzw. in einem Elutionsschritt die Bindung aufgeben (Sensorregeneration). B: Gemessene relative EOT (Effektive Optical Thickness) in Abhängigkeit der Zeit. Nach Aufnahme einer Baseline mit Selektionspuffer (SB) wurde eine 0,25  $\mu\text{M}$  Proteinlösung aufgetragen, was zu einem Anstieg der EOT führte. Durch einen Wasch- und Elutionsschritt konnte anschließend eine weitere Probe mit einer 0,5  $\mu\text{M}$  Proteinlösung aufgetragen und gemessen werden [23].**

ABB. 9 | FREE-FLOW-ELEKTROPHORESE UND GELELEKTROPHORESE

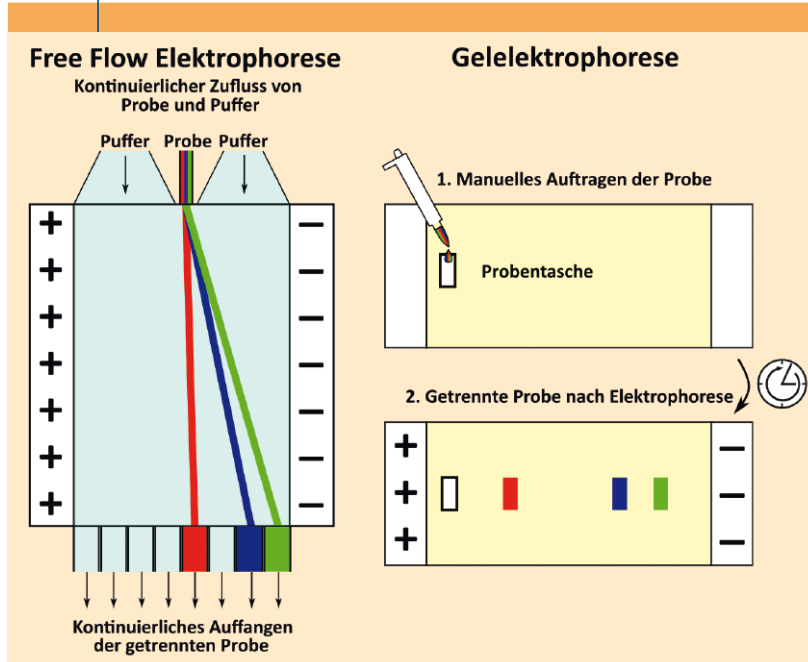
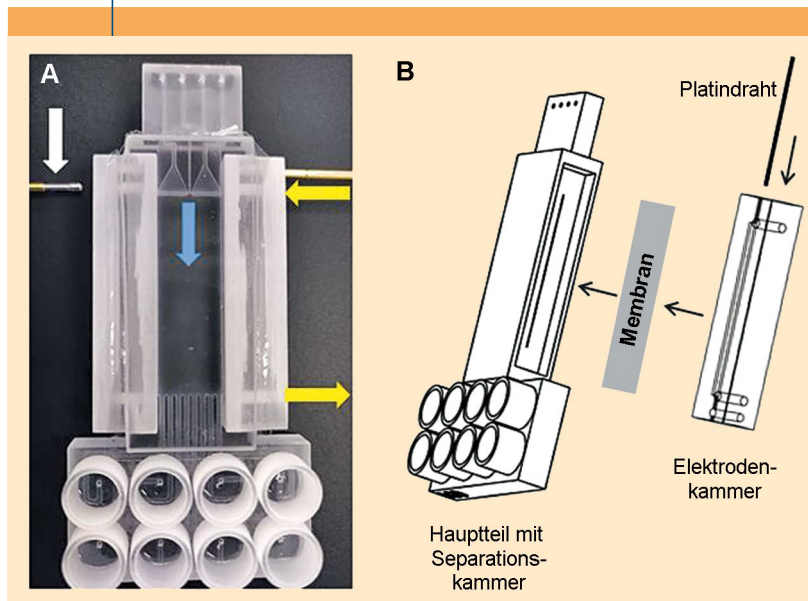


ABB. 10 | MICRO-FREE-FLOW-ELEKTROPHORESEKAMMER



A: Aufsicht auf die zusammengesetzte Kammer. Der blaue Pfeil zeigt den Fluss vom Separationspuffer. Die gelben Pfeile zeigen den Fluss des Elektrodenpuffers in der Elektrodenkammer. Der weiße Pfeil zeigt die Kontaktspitze eines Kabels, um die Spannung an die Platinelektrode anzulegen. B: Schema der einzelnen Teile der  $\mu$ FFE [24].

### 3D-gedrucktes System für die transiente Transfektion von Säugerzellen

Die Produktion biologischer Pharmazeutika erfolgt meist in Bakterien, Pilzen oder Säugerzellen, denen die DNA-Sequenz des zu produzierenden Gens stabil in das Chromosom integriert wurde. Bei einer transienten Transfektion wird genetisches Material meist als DNA-Vektor in den Zell-

kern von Säugerzellen eingebracht, um gezielt ein Protein (wie beispielsweise einen Antikörper) zu produzieren. Diese stabile Transfektion hat den Nachteil, dass ein zeitaufwendiges Screening der entstehenden Klone notwendig ist, um eine hohe Proteinproduktion zu gewährleisten. Bei der transienten Transfektion ist ein solcher Selektionsschritt nicht nötig; somit ist die Zeit bis zur Proteinproduktion deutlich kürzer, wodurch der Prozess deutlich flexibler auf die Herstellung verschiedener Proteine angepasst werden kann [25]. In Zukunft könnte die transiente Transfektion auch zur Produktion personalisierter Pharmazeutika genutzt werden, da hierdurch viele verschiedene Proteinvarianten produziert werden können.

Ein Ziel vieler mikrofluidischer Systeme ist die Integration und Automatisierung mehrerer Prozessschritte in einem System. Dies soll nicht nur den manuellen Aufwand verringern, sondern auch die Reproduzierbarkeit von Prozessen erhöhen und einen kontinuierlichen Betrieb ermöglichen. Das hat auch die Entwicklung eines mikrofluidischen Transfektionssystems zum Ziel.

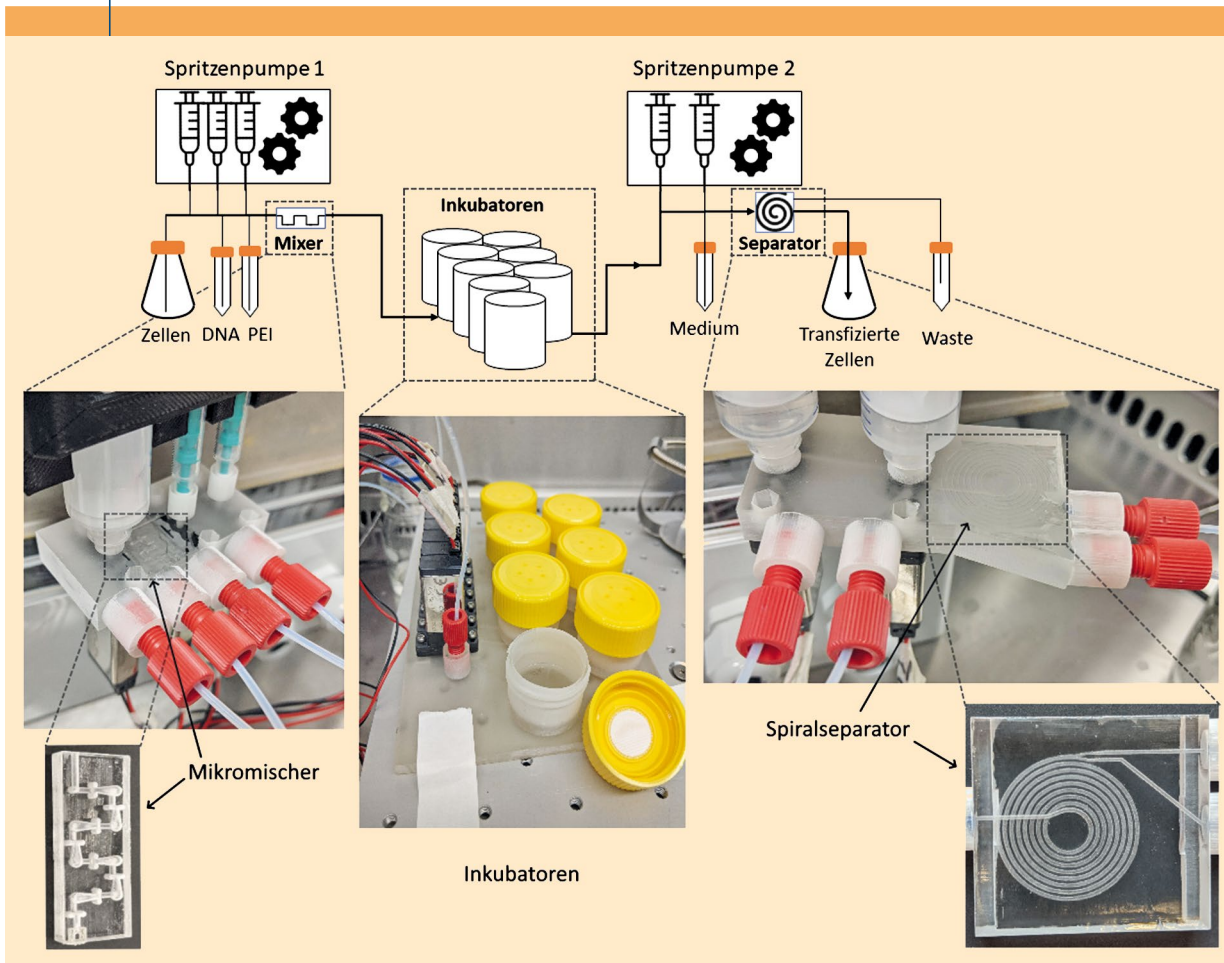
Das in Entwicklung befindliche mikrofluidische Transfektionssystem besteht aus drei funktionellen Elementen: Einer Misch-, einer Inkubations- und einer Separationseinheit (Abbildung 11). In der Mischeinheit wird die Zellsuspension mit dem Transfektionsreagenz und dem DNA-Vektor in einem Mikromischer in kürzester Zeit homogen durchmischt. Das Zellgemisch wird anschließend in ein Inkubationsgefäß gepumpt, wo es für eine definierte Inkubationszeit verbleibt. Nach der Inkubation wird die transfizierte Zellsuspension durch einen mikrofluidischen Spiralseparator direkt in ein Kultivierungsgefäß geleitet. Durch den Separator werden die Zellen kontinuierlich an einen Ausgang fokussiert und dadurch aufkonzentriert. Somit wird das toxische Transfektionsreagenz beim Überführen in das Kultivierungsgefäß durch gleichzeitige Zugabe von frischem Kultivierungsmedium stark verdünnt und die Zellviabilität gesteigert.

Die mikrofluidischen Elemente und die Inkubationseinheit des Transfektionssystems werden mittels 3D-Druck hergestellt. Hierdurch sind eine schnelle Systementwicklung sowie ein direkter Anschluss von Schläuchen und Pumpen über integrierte, 3D-gedruckte Verbindungen möglich. Das Transfektionssystem kann direkt an einen Bioreaktor angeschlossen werden, so dass die Zellen aus diesem Feed-Bioreaktor in dem gesteuerten System transfiziert werden und anschließend in einem Produktions-Bioreaktor das gewünschte Zielprotein herstellen. Aufgrund der Miniaturisierung könnten auch mehrere solcher Systeme an einen Bioreaktor angeschlossen und dadurch eine parallele (und flexible) Produktion verschiedener Proteine gleichzeitig ermöglichen.

### Ausblick

Der 3D-Druck leistet bereits einen wertvollen Beitrag im Bereich der Biotechnologie und ist heute aus vielen Forschungsbereichen kaum noch wegzudenken. Nicht nur für

**ABB. 11** KONTINUIERLICHES TRANSFEKTIONSSYSTEM UND DETAILANSICHTEN DER 3D-GEDRUCKTEN ELEMENTE



die schnelle Entwicklung von Prototypen, sondern auch in der Herstellung komplexer mikrofluidischer Systeme kommen zunehmend hochauflösende 3D-Drucker zum Einsatz. Der technologische Fortschritt und die Verfügbarkeit neuer, biokompatibler 3D-Druckmaterialien wird in Zukunft die Systementwicklung in biotechnologischen und biomedizinischen Laboren beschleunigen und die individuelle Herstellung komplexer, spezialisierter Versuchssysteme ermöglichen. Die Vorteile mikrofluidischer Systeme in Hinblick auf die Reproduzier- und Automatisierbarkeit können zusätzlich dazu führen, dass bestehende Analysemethoden deutlich verbessert und Point-of-Care Sensorsysteme für Patienten zugänglich gemacht werden können. Zudem konnten die hier vorgestellten Beispiele zeigen, dass die Systemminiaturisierung ein großes Potential für die Entwicklung und Etablierung kontinuierlicher, parallelisierter und automatisierter Prozesse bietet.

### Zusammenfassung

Mit Hilfe der 3D-Drucktechnologie lassen sich innerhalb kürzester Zeit verschiedenste Prototypen fertigen, die im Bereich der Biotechnologie zum Einsatz kommen. Durch die

hohe Präzision und die hochautomatisierte Drucktechnik können heute miniaturisierte und mikrofluidische Systeme mittels 3D-Druck hergestellt werden. Dies vereinfacht die Entwicklung und die Integration verschiedener mikrofluidischer Einheiten wie Mikromischer, was den Aufbau funktionaler mikrofluidischer Plattformen und Lab-on-a-Chip-Systemen fördert. Durch Verwendung biokompatibler Druckmaterialien lassen sich zudem individuelle Kultivierungssysteme und Durchflusszellen fertigen, die für die Kultivierung von Säugerzellen oder die Analyse biologischer Proben Anwendung finden.

### Summary

3D printing technology can be used to develop a wide variety of prototypes within a very short time, which are applied in the field of biotechnology. Due to the high precision and highly automated printing technology, miniaturized and microfluidic systems can nowadays be produced using 3D printing. This simplifies the development and integration of various microfluidic units (such as micromixers), which promotes the construction of functional microfluidic platforms and lab-on-a-chip systems. By using biocompatible printing

materials, it is also possible to manufacture individual cultivation systems and flow cells that are suitable for the cultivation of mammalian cells or the analysis of biological samples.

## Schlagwörter

Additive Fertigung, 3D-Druck, Mikrofluidik, Biotechnologie, Zellkultur, Mikrobioreaktoren, Biosensoren, Systemintegration.

## Literatur

- [1] L. Raddatz, J. Austerjost und S. Beutel, *Chem. Unserer Zeit* **2018**, 52, 42–50, <https://doi.org/10.1002/ciuz.201700802>.
- [2] S. Winkler, A. Grünberger und J. Bahnemann, *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **2021**, [https://doi.org/10.1007/10\\_2020\\_162](https://doi.org/10.1007/10_2020_162).
- [3] A. Burmeister und A. Grünberger, *Current opinion in biotechnology* **2020**, 62, 106–115, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.09.001>.
- [4] K. Rosenthal, V. Oehling, C. Dusny und A. Schmid, *FEMS microbiology reviews* **2017**, 41, 751–780, <https://doi.org/10.1093/femsre/fux044>.
- [5] J. El-Ali, P. K. Sorger und K. F. Jensen, *Nature* **2006**, 442, 403–411, <https://doi.org/10.1038/nature05063>.
- [6] D. T. Chiu, A. J. deMello, D. Di Carlo, P. S. Doyle, C. Hansen, R. M. Maceiczky und R. C. Wootton, *Chem* **2017**, 2, 201–223, <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2017.01.009>.
- [7] K. Rosenthal, F. Falke, O. Frick, C. Dusny und A. Schmid, *Micromachines* **2015**, 6, 1836–1855, <https://doi.org/10.3390/mi6121459>.
- [8] C. M. B. Ho, S. H. Ng, K. H. H. Li und Y.-J. Yoon, *Lab on a chip* **2015**, 15, 3627–3637, <https://doi.org/10.1039/c5lc00685f>.
- [9] H. Lorenz, M. Despont, N. Fahrni, J. Brugger, P. Vettiger und P. Renaud, *Sensors and Actuators A: Physical* **1998**, 64, 33–39, [https://doi.org/10.1016/S0924-4247\(98\)80055-1](https://doi.org/10.1016/S0924-4247(98)80055-1).
- [10] M. de Almeida Monteiro Melo Ferraz, J. B. Nagashima, B. Venzac, S. Le Gac und N. Songsasen, *Scientific reports* **2020**, 10, 994, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57816-y>.
- [11] J. Bahnemann, A. Enders und S. Winkler, *Basic Concepts on 3D Cell Culture*, SPRINGER NATURE, [S.l.], **2021**.
- [12] I. G. Siller, A. Enders, T. Steinwedel, N.-M. Epping, M. Kirsch, A. Lavrentieva, T. Scheper und J. Bahnemann, *Materials (Basel, Switzerland)* **2019**, 12, <https://doi.org/10.3390/ma12132125>.
- [13] I. G. Siller, A. Enders, P. Gellermann, S. Winkler, A. Lavrentieva, T. Scheper und J. Bahnemann, *Biomedical materials (Bristol, England)* **2020**, 15, 55007, <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab8e97>.
- [14] F. Zhu, T. Friedrich, D. Nugegoda, J. Kaslin und D. Wlodkowic, *Biomechanics* **2015**, 9, 61103, <https://doi.org/10.1063/1.4939031>.
- [15] Q. Wu, J. Liu, X. Wang, L. Feng, J. Wu, X. Zhu, W. Wen und X. Gong, *Biomedical engineering online* **2020**, 19, 9, <https://doi.org/10.1186/s12938-020-0752-0>.
- [16] J. C. M. van der Loo und J. F. Wright, *Human molecular genetics* **2016**, 25, R42–52, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv451>.
- [17] I. G. Siller, N.-M. Epping, A. Lavrentieva, T. Scheper und J. Bahnemann, *Materials (Basel, Switzerland)* **2020**, 13, <https://doi.org/10.3390/ma13194290>.
- [18] D. Vorländer, L. Frey, H. Ostsieker, J.-L. Lohse, D. Rasch, J.-H. Grosch, R. Krull und J. Bahnemann, *Rapid prototyping enables flexible process development via 3D-printed  $\mu$ -bubble column reactor for biotechnological application*, Hamburg, Germany, **27.05.2019**.
- [19] A. Enders, I. G. Siller, K. Urmann, M. R. Hoffmann und J. Bahnemann, *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2019**, 15, e1804326, <https://doi.org/10.1002/sml.201804326>.
- [20] A. Lavrentieva, T. Fleischhammer, A. Enders, H. Pirmahboub, J. Bahnemann und I. Pepelanova, *Macromolecular bioscience* **2020**, 20, e2000107, <https://doi.org/10.1002/mabi.202000107>.
- [21] Y. Zhu, X. Huang, X. Xie, J. Bahnemann, X. Lin, X. Wu, S. Wang und M. R. Hoffmann, *Environmental science : water research & technology* **2018**, 4, 956–964, <https://doi.org/10.1039/C8EW00058A>.
- [22] I. G. Siller, J.-A. Preuss, K. Urmann, M. R. Hoffmann, T. Scheper und J. Bahnemann, *Sensors (Basel, Switzerland)* **2020**, 20, <https://doi.org/10.3390/s20164421>.
- [23] S. Arshavsky-Graham, A. Enders, S. Ackerman, J. Bahnemann und E. Segal, *Mikrochimica acta* **2021**, 188, 67, <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04725-0>.
- [24] J.-A. Preuss, G. N. Nguyen, V. Berk und J. Bahnemann, *Electrophoresis* **2021**, 42, 305–314, <https://doi.org/10.1002/elps.202000149>.
- [25] L. Baldi, D. L. Hacker, M. Adam und F. M. Wurm, *Biotechnology letters* **2007**, 29, 677–684, <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9297-y>.

## Die Autoren



Anton Enders, Jahrgang 1994, studierte Life Science an der Leibniz Universität Hannover und erlangte dort 2017 seinen Masterabschluss. Derzeit arbeitet er als Postdoc am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover im Arbeitskreis von Frau Dr. Janina Bahnemann, wo er auch seine Dissertation angefertigt hat. Im Rahmen seines aktuellen Forschungsprojektes entwickelt er mikrofluidische Systeme für den Einsatz in der Zellkulturtechnik mit dem Fokus auf Online-Sensorik.



Janina Bahnemann, Jahrgang 1985, studierte Life Science an der Leibniz Universität Hannover und promovierte im Jahr 2014 an der Technischen Universität Hamburg-Harburg am Institut für Bioprocess- und Biosystemtechnik. Anfang 2015 ging sie als Postdoktorandin in die USA, wo sie für zwei Jahre am California Institute of Technology (Caltech) im „Institute for Environmental and Applied Sciences“ forschte. Seit 2017 ist Frau Bahnemann Habilitandin und Nachwuchsgruppenleiterin (gefördert durch das Emmy Noether-Programm der DFG) am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover und ist darüber hinaus von 2021 bis 2022 als Vertretungsprofessorin an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld beschäftigt. Ihre Forschungsschwerpunkte liegen im Bereich der Zellkultur- und Mikrosystemtechnik, der Systementwicklung mittels hochauflösender 3D-Drucktechnologie sowie der Entwicklung von Lab-on-a-Chip basierten Biosensoren, welche in enger Kooperation mit dem Technion in Israel (Prof. Ester Segal) und dem Caltech in den USA (Prof. Michael R. Hoffmann) stattfindet.

## Korrespondenzadresse

Dr. Janina Bahnemann  
Leibniz Universität Hannover  
Institut für Technische Chemie  
Callinstr. 5  
30167 Hannover  
E-Mail: [jbahnemann@iftc.uni-hannover.de](mailto:jbahnemann@iftc.uni-hannover.de)

## 4. Experimenteller Teil

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein mikrofluidisches System zur transienten Transfektion von CHO-Zellen entwickelt. Um die transiente Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) auf einem mikrofluidischen System zu realisieren, müssen die einzelnen Schritte in mikrofluidischen Elementen adaptiert werden. Hierzu zählt erst die Durchmischung von Zellen, DNA und Transfektionsreagenz zur Polyplexbildung. Danach beginnt eine Inkubationsphase, in der die Polyplexe in die Zellen importiert werden. Hierbei müssen die Zellen in einem Inkubatorelement weiterhin in Suspension gehalten werden, um die Nährstoffversorgung zu gewährleisten. Zuletzt werden die Zellen in einem Spiralseparator aufkonzentriert, um die PEI-Konzentration nach der Transfektion zu minimieren.

Die einzelnen Elemente des Gesamtsystems wurden zunächst einzeln entwickelt, bezüglich ihrer Funktion und Effektivität optimiert und am Ende in einem per Computer steuerbaren System vereint. Zusätzlich wurde die Separationsuntereinheit in Bezug auf den Einsatz zur Zellrückhaltung in Säugerzellkultivierungen weiterentwickelt. In den nächsten Abschnitten wird in Kapitel 4.1 zunächst die Entwicklung des Mikromischers dargestellt, in Kapitel 4.2 die Entwicklung des Spiralseparators beschrieben und letztendlich in Kapitel 4.3 das Gesamtsystem mit Mischer, Separator und Inkubationseinheit erläutert. Die Forschungen bezüglich des Mikromischers und des Spiralseparators sind bereits in Fachmagazinen publiziert worden.

## 4.1 3D-gedruckte mikrofluidische Mischer – eine Vergleichsstudie der Durchmischung verschiedener Mischereinheiten

Bei der transienten Transfektion müssen zuerst das Transfektionsreagenz mit der DNA und den Zellen vermischt werden. In mikrofluidischen Systemen ist dies durch den Einsatz von passiven Mikromischern möglich, deren Kanalstruktur zu einer effektiven und schnellen Durchmischung führen. Die Untersuchung verschiedener passiver Mikromischer bezüglich ihrer Effektivität wurde in der *peer-reviewed* Fachzeitschrift *Small* veröffentlicht. Abbildung 6 zeigt eine graphische Kurzzusammenfassung der Veröffentlichung.

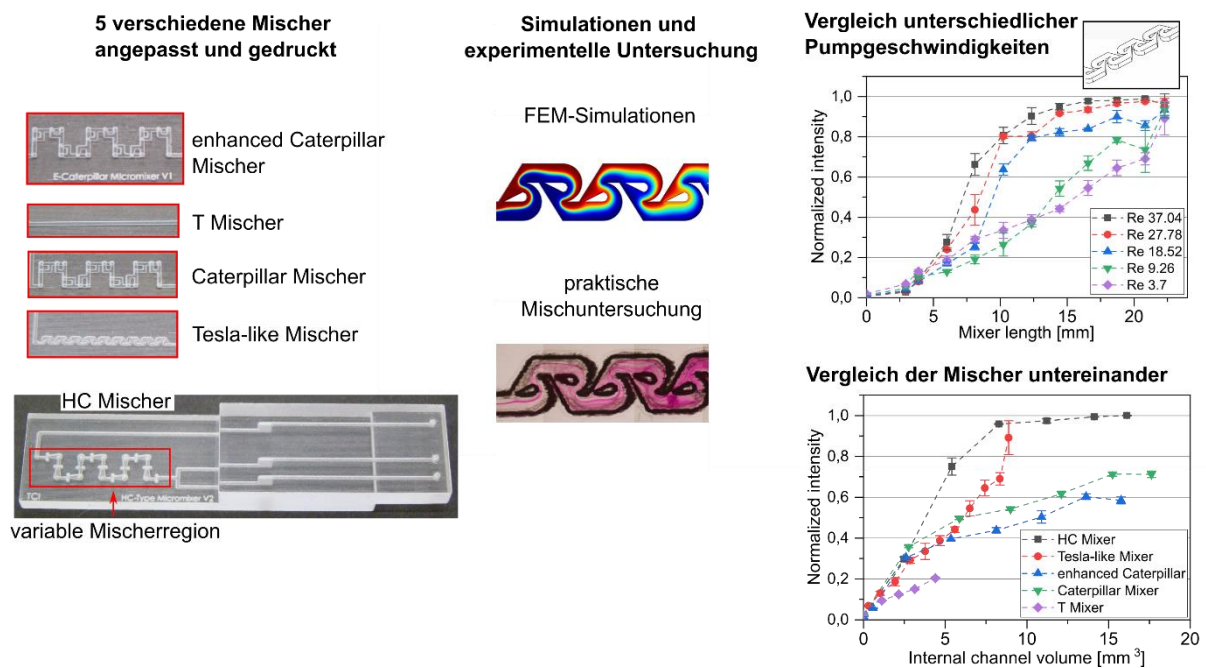


Abbildung 6: Graphische Kurzzusammenfassung der Veröffentlichung „3D Printed Microfluidic Mixers – A Comparative Study on Mixing Unit Performance“.

Die geringen Flussraten und kleinen Abmessungen in mikrofluidischen Systemen führen dazu, dass häufig eine laminare Strömung vorliegt, in der die Strömungslinien parallel verlaufen. In dieser Strömung führt nur die Diffusion zu einer Durchmischung mehrerer Flüssigkeiten in einem Kanal. Ist aber eine schnelle Durchmischung gewünscht, so müssen aktive oder passive Mikromischer eingesetzt werden. Aktive Mikromischer benötigen eine zusätzliche Energiequelle, die auf die Flüssigkeiten im mikrofluidischen System einwirkt (z.B. Ultraschall), während passive Mikromischer nur durch die Veränderung der Kanalstruktur zu einer effektiven Durchmischung führen. Die Komplexität mikrofluidischer Systeme mit passiven Mikromischern ist daher erheblich geringer. Daher wurden in dieser Studie fünf verschiedene Mischerdesigns aus der Literatur auf ähnliche Kanaldimensionen angepasst und erstmals mittels 3D-Druck hergestellt. In Simulationen und praktischen Mischuntersuchungen wurden die Mischer hinsichtlich ihrer Effektivität bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten (minimal  $Re = 3,7$ ; maximal  $Re = 37$ ) untersucht und miteinander verglichen. Die FEM-Simulationen (Finite-Elemente-Methode) wurden in COMSOL Multiphysics® durchgeführt.

Bei den praktischen Mischuntersuchungen wurden zwei farblose Lösungen aus Natriumhydroxid mit Phenolphthalein in den 3D-gedruckten Mikromischern durchmischt und die daraus resultierende Farbreaktion mikroskopisch ausgewertet. Hierbei wurde die Färbung mit zunehmender Durchmischung der Lösungen intensiver, was aus den aufgenommenen Bildern durch eine Helligkeitsanalyse an mehreren Orten im Mischer nachverfolgt wurde.

Die Ergebnisse der Simulationen und praktischen Untersuchungen sind sehr ähnlich und unterscheiden sich lediglich bei den geringsten Fließgeschwindigkeiten stärker. Generell führten in allen Mixern höhere Fließgeschwindigkeiten zu einer schnelleren Durchmischung. Beim Vergleich der Mixer untereinander konnte der Tesla-like-Mischer bei der höchsten Fließgeschwindigkeit am schnellsten zu einer vollständigen Durchmischung führen, der HC-Mischer war jedoch auch bei geringeren Fließgeschwindigkeiten in der Lage, die Flüssigkeiten homogen zu durchmischen. Zusätzlich zur Mischeffizienz wurde der Einfluss der Tesla-like- und HC-Mischer auf die Viabilität von CHO-K1-Zellen mittels einer Trypanblau-Färbung im Zellzählgerät CEDEX HiRes getestet. Bei allen getesteten Zellkonzentrationen ( $1 \cdot 10^6$ ,  $7 \cdot 10^6$  und  $10 \cdot 10^6$  Zellen pro mL) war kein signifikanter Einfluss nachweisbar.

Im folgenden Artikel „*3D Printed Microfluidic Mixers – A Comparative Study on Mixing Unit Performance*“ werden die Ergebnisse detailliert beschrieben und diskutiert.

# 3D Printed Microfluidic Mixers—A Comparative Study on Mixing Unit Performances

Anton Enders, Ina G. Siller, Katharina Urmann, Michael R. Hoffmann, and Janina Bahnemann\*

One of the basic operations in microfluidic systems for biological and chemical applications is the rapid mixing of different fluids. However, flow profiles in microfluidic systems are laminar, which means molecular diffusion is the only mixing effect. Therefore, mixing structures are crucial to enable more efficient mixing in shorter times. Since traditional microfabrication methods remain laborious and expensive, 3D printing has emerged as a potential alternative for the fabrication of microfluidic devices. In this work, five different passive micromixers known from literature are redesigned in comparable dimensions and manufactured using high-definition Multijet 3D printing. Their mixing performance is evaluated experimentally, using sodium hydroxide and phenolphthalein solutions, and numerically via computational fluid dynamics. Both experimental and numerical analysis results show that HC and Tesla-like mixers achieve complete mixing after 0.99 s and 0.78 s, respectively, at the highest flow rate (Reynolds number ( $Re$ ) = 37.04). In comparison, Caterpillar mixers exhibit a lower mixing rate with complete mixing after 1.46 s and 1.9 s. Furthermore, the HC mixer achieves very good mixing performances over all flow rates ( $Re$  = 3.7 to 37.04), while other mixers show improved mixing only at higher flow rates.

## 1. Introduction

The outstanding advantages of microfluidics have led to the development and application of countless microfluidic systems in the fields of chemistry and biology,<sup>[1–3]</sup> resulting in the publication of thousands of papers in the last decades. The small required sample volumes, low reagent consumption, and the highly controlled and reproducible environment, benefit various biological applications from nucleic acid and protein analysis<sup>[4,5]</sup> to drug development and drug delivery.<sup>[6,7]</sup> Additionally, numerous microfluidic systems for cell cultivation and cell

manipulation<sup>[8,9]</sup> have been reported, demonstrating capabilities, which would be far more complex to achieve, using traditional techniques.<sup>[10]</sup>


Despite the various applications demonstrated, the commercial use of microfluidics is still extremely limited.<sup>[11]</sup> One reason for this lack of commercialization is the complex fabrication of the devices.<sup>[12]</sup> The most common manufacturing technique is soft lithography, using polydimethylsiloxane (PDMS).<sup>[13]</sup> This technique is easier and faster than other fabrication techniques like photolithography<sup>[2]</sup> or micromachining,<sup>[14]</sup> but it still consists of multiple intricate steps, which require sophisticated instrumentation.<sup>[2]</sup> First, a master mold needs to be manufactured, incorporating the desired microfluidic design. PDMS is then cast onto the mold and peeled off after curing. In case of a 3D structure, this step needs to be repeated for each level in the 3D structure.<sup>[15]</sup> Finally, to seal the PDMS microfluidic chip, the PDMS has to be attached

to a substrate (e.g., glass) using plasma bonding.<sup>[2]</sup> During this fabrication process, each iteration in the design during the development phase requires a new master mold, which drastically increases the iteration time and cost.

With the development of high-definition 3D printing in the past years, this technique is emerging as a promising alternative to traditional manufacturing methods.<sup>[11]</sup> 3D printing is usually highly automated and requires a minimal amount of manual labor after printing, to eliminate support structures.<sup>[16]</sup> Compared to soft lithography, 3D printing is much faster, lowering the manufacturing time from days to hours for single prototypes and even allows for the fabrication of multiple devices at the same time. Another advantage is the ease of use for modern 3D printers. A 3D computer-aided design (CAD) model can be used directly with the printer, eliminating the barrier of long training sessions before high production quality can be achieved.<sup>[17]</sup> These advantages do not only lower the manufacturing costs of prototype devices, but also cut down the iteration time in the development phase, enabling research groups to design, print, and investigate microfluidic devices without access to advanced microfabrication facilities.<sup>[18]</sup> Additionally, the freedom in construction and the low iteration time enables faster and easier integration of the printed microfluidic chips with existing devices.<sup>[19]</sup>

A. Enders, I. G. Siller, Dr. J. Bahnemann  
Institute of Technical Chemistry  
Leibniz University Hannover  
Callinstr. 5, 30167 Hannover, Germany  
E-mail: jbahnemann@iftc.uni-hannover.de

Dr. K. Urmann, Prof. M. R. Hoffmann  
Department of Environmental Science and Engineering  
California Institute of Technology  
1200 E. California Blvd., Pasadena, CA 91125, USA

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/sml.201804326>.

DOI: 10.1002/sml.201804326



Mixing units are an integral part of many microfluidic devices, where solutions or reagents need to be mixed rapidly and efficiently. Only few mixer designs have been manufactured via different 3D printing technologies. Plevniak et al.<sup>[20]</sup> used stereo lithography (SL) to create a passive 3D micromixer, which allows self mixing of reagents with blood for point of care diagnostics. Lee et al.<sup>[21]</sup> report a micromixer with helical blades, suitable for mixing high viscosity fluids, fabricated via SL. Shalhan et al.<sup>[22]</sup> used an inexpensive SL-printer to rapidly fabricate a split-and-recombine mixer to show the potential to print clear microfluidic components with inexpensive hardware. A combined fabrication approach was reported by Rafeie et al., using wax 3D printing to create the master mold and PDMS casting to fabricate the final mixer.<sup>[23]</sup> However, most other micromixers were designed and reported before 3D printing was advanced enough for microfluidics, and therefore, manufactured using vastly different processes. As 3D printing offers new capabilities and different characteristics, there is a need to reevaluate the performances of mixer designs, when adapted to 3D printing.

In this work, five different micromixer designs were rescaled to similar dimensions with a constant overall length of 20 mm and the same dimensions of the main channel leading up to the mixing units. This allows for characterization of the mixing performance, considering the length of the mixer, in classical 2D microfluidic systems. Further comparison of the mixing performance by mixer volume allows for a more direct investigation of the path length necessary for fluids to be completely mixed. Furthermore, the mixer volume might be considered when using 3D printing for fully integrated 3D microfluidic systems. Mixers were fabricated using multijet printing with biocompatible printing material.<sup>[24]</sup> The performances of the mixers were compared with simulations and mixing experiments. The mixers were chosen for their high reported efficiency and to compare the different mixing mechanisms. The Tesla-like mixer uses the redirection of the flow to collide stream lines.<sup>[25]</sup> The Caterpillar mixer utilizes a split-and-recombine technique to create multiple fluid layers and therefore shortens the distance for particles moving by diffusion.<sup>[26,27]</sup> The enhanced Caterpillar mixer uses a similar design, but adds smaller recombination channels, therefore creating a higher velocity to collide the previously split streams.<sup>[27]</sup> The HC mixer splits and recombines fluid streams as well, but also uses H-shaped channel modules to influence the speed of the flow at different positions inside the channel to enhance mixing.<sup>[28]</sup> Additionally, a T-mixer was designed as a reference design with diffusion at the center being the only mixing effect.<sup>[29]</sup> To the best knowledge of the authors, this is the first work to manufacture and compare five microfluidic mixers in one study. The motivation of this work and future application of the 3D printed mixers is the efficient and gentle mixing of CHO-K1 (Chinese hamster ovary) suspension cells with DNA and transfection reagents for highly efficient and reproducible transient transfection. Passive micromixer designs were chosen as transfection efficiency and viable cell density were reported to decrease with higher shear stress in CHO-S suspension cells<sup>[30]</sup> and due to the generally low stress tolerance of CHO cells. To ensure that the channels cannot get blocked by the cells, with an average diameter of 16–24  $\mu\text{m}$ ,<sup>[31]</sup> the mixer designs were scaled accordingly.

The research community, developing microfluidic systems (involving mixing operations), will be able to adduce the results of this comparison and the extensive characterization of each mixer, to choose a suitable mixer type for their application. Additionally, for mixing of cellular systems, especially when using mammalian suspension cell lines, this study will provide helpful insights and guidelines.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Numerical Mixing Simulations

To quantify the mixing performance in the numerical mixing simulations, a cut plane was set after each mixer element and the following formula was employed:

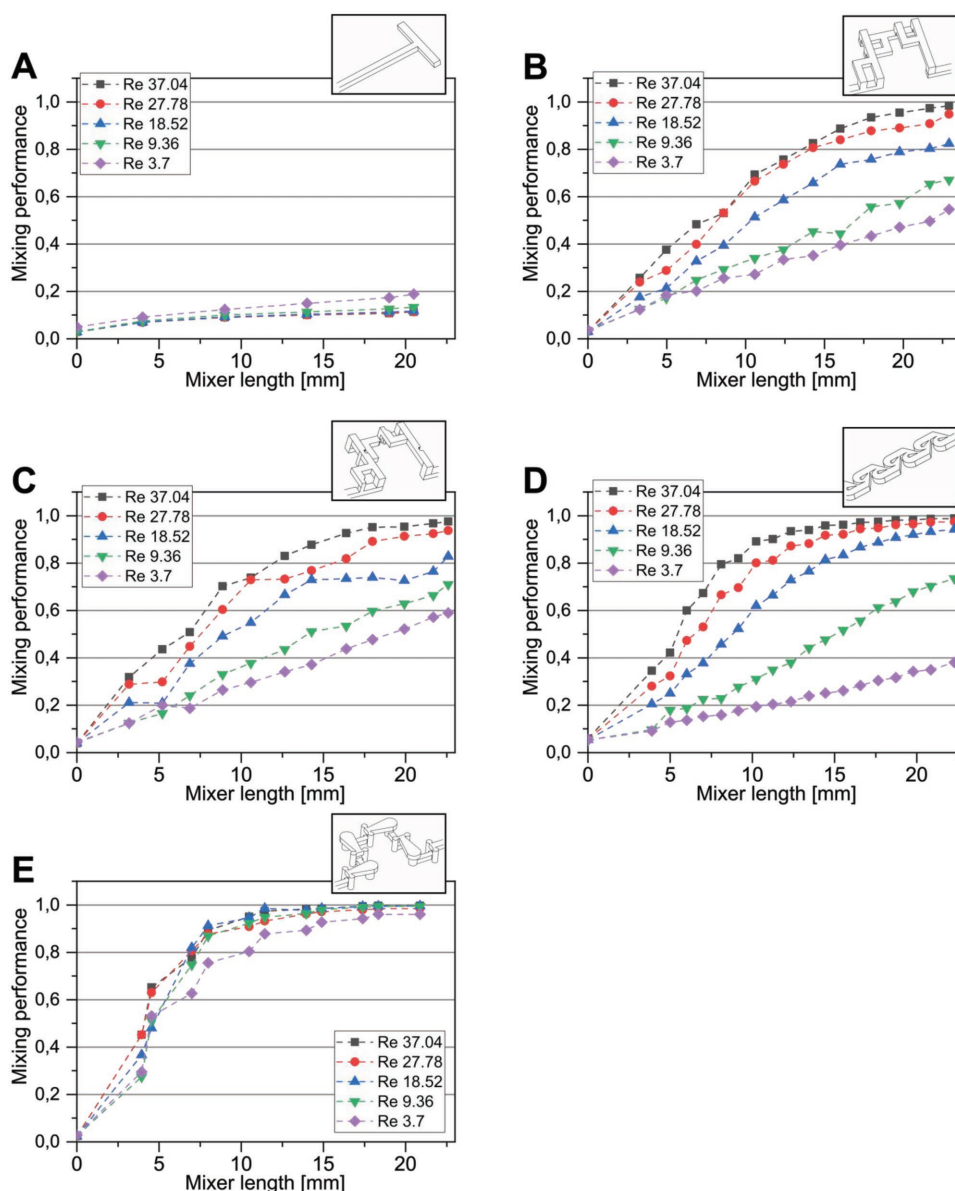
$$\eta = 1 - \left( \frac{\sigma}{\sigma_{\max}} \right) \quad (1)$$

where  $\eta$  is the mixing performance,  $\sigma$  is the standard deviation of the concentration of the solute species in the cut plane at a given measurement point, and  $\sigma_{\max}$  is the standard deviation of the concentration at the beginning of the mixer, where the fluids are not yet mixed.

**Figure 1** shows the mixing performance of each mixer at different flow rates. As expected, the mixing performance for the T-mixer is by far exceeded by the four designs incorporating mixing structures. The mixing performance of the Tesla-like mixer strongly depends on the flow speed and thus Reynolds number ( $Re$ ), with higher flow rates leading to faster and more thorough mixing. This can be explained by the mixing mechanism involving the collision of the separated fluid streams, which has a greater effect with an increased flow rate, as reported by Hong et al.<sup>[25]</sup> The mixing performance of both Caterpillar mixers behaves similarly to the Tesla-like mixer. This indicates a strong influence of colliding streamlines at the recombining parts of the mixers and a weaker effect of forming alternating fluid layers to reduce diffusion time. In contrast, the HC mixer performs very similar throughout all pump rates, which was reported previously.<sup>[28]</sup> This result points to folding, rotation, splitting, and recombination of the streams being the main forces of mixing in the HC design, independent from the  $Re$  number. All four mixers achieve complete mixing at the highest flow rate with  $Re = 37.04$ . As simulations cannot account for the roughness of the printed material and imperfections in channel structures, which are known to be introduced during the printing process,<sup>[18]</sup> practical mixing experiments were performed for validation.

### 2.2. Experimental Mixing

To experimentally determine the mixing performance of the five micromixers, sodium hydroxide (NaOH) and phenolphthalein solutions were mixed at five different flow rates. The reaction of phenolphthalein and NaOH changes the color of the fluids from colorless to red upon mixing. Therefore, the intensity of the red color increases with the amount of phenolphthalein and



**Figure 1.** Calculated mixing performances from simulation results as a function of the mixer length for each mixer. A) T-mixer, B) Caterpillar mixer, C) enhanced Caterpillar mixer, D) Tesla-like mixer, E) HC mixer. Dotted lines only aid visual clarity and do not represent intermediate values.

NaOH being mixed.<sup>[36]</sup> To determine the degree of mixing at a given place inside the mixer, normalized intensity was calculated as follows:<sup>[25]</sup>

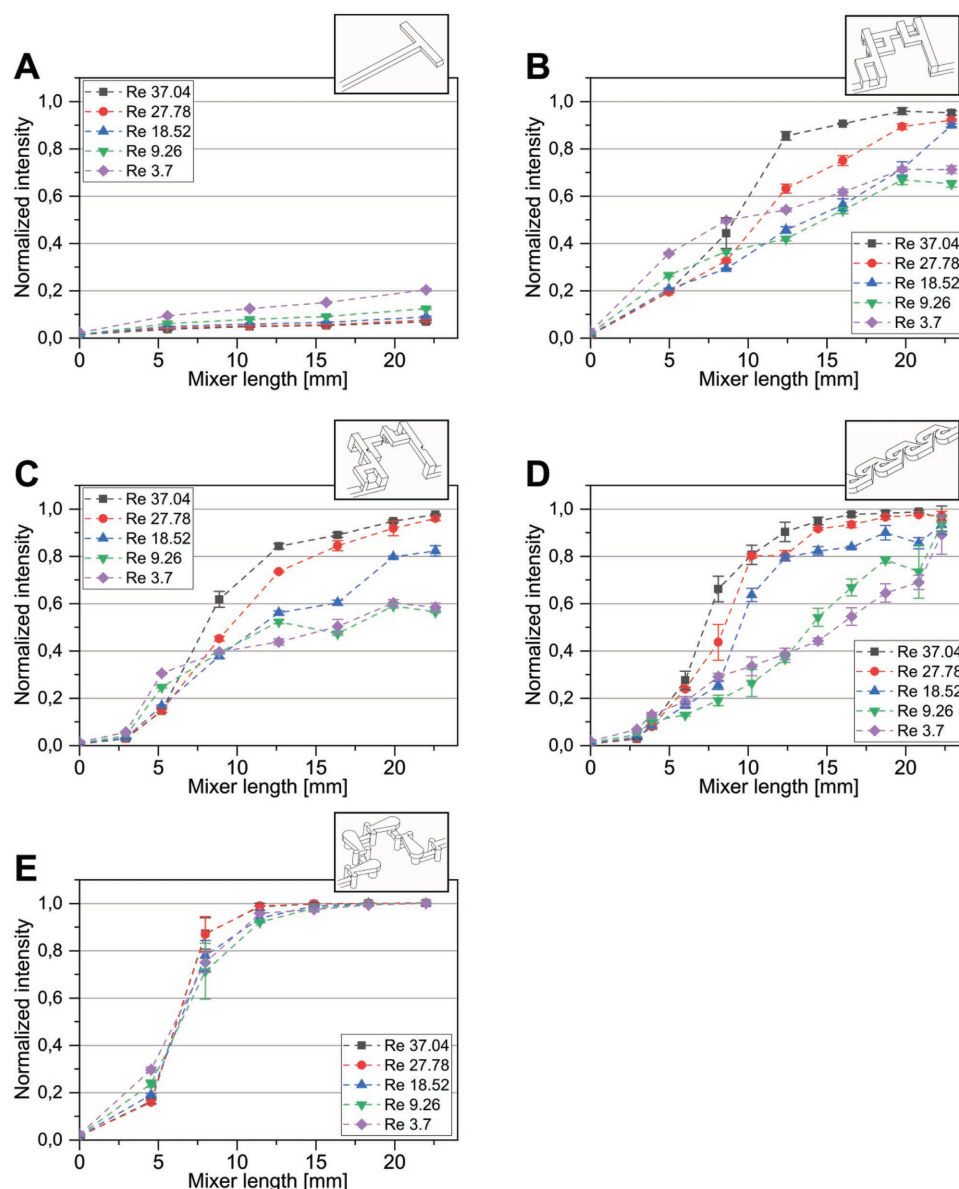
$$\bar{I} = \frac{\sum_{n=1}^N \frac{I_n - \bar{I}_{\text{ref}}}{I_{\text{max}} - \bar{I}_{\text{ref}}}}{N} \quad (2)$$

where  $\bar{I}$  is the normalized intensity,  $I_n$  the intensity measured at a pixel, and  $N$  the total number of pixels of the captured image.  $\bar{I}_{\text{ref}}$  represents the normalized intensity of the background, calculated with an image before any mixing occurs (96% EtOH only).  $I_{\text{max}}$  is the maximum intensity at the same place calculated from an image of completely mixed solutions pumped through each inlet.

The  $\bar{I}$  was calculated from the mean of three pictures for every flow rate (see Supporting Information). The flow rates were set in three different orders (descending, ascending, and random) to account for possible influence of the previous flow rate before taking the measurement. While the data shown in **Figure 2** is derived from a single printed device for each mixer type, mixers were printed multiple times with small alterations for improved handling and no differences in performance were observed (data not shown).

**Figure 2** shows the  $\bar{I}$  for all mixers at different measurement points inside the mixers. The error bars show the standard deviation, which was generally low with the maximum standard deviation being 0.11.

As expected, the relative intensities for all four mixer designs increase more rapidly than the simple T-mixer setup, indicating



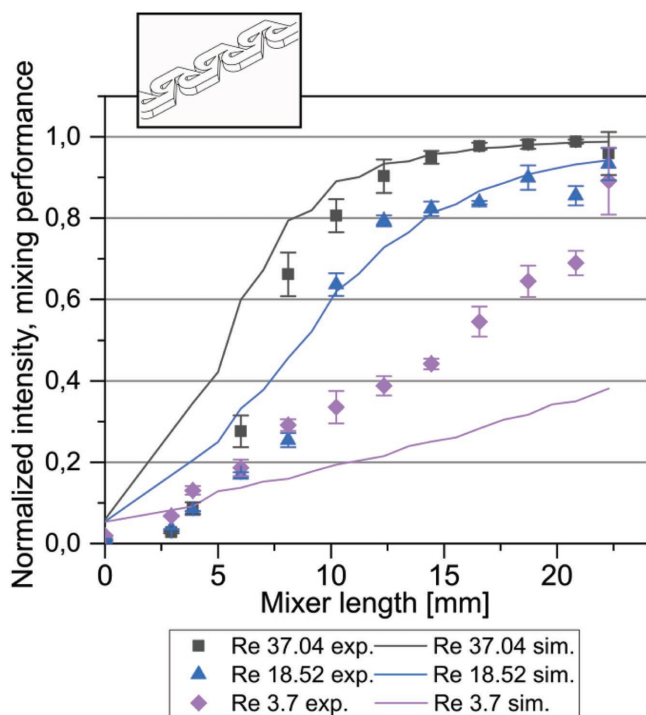
**Figure 2.**  $\bar{I}$  from the mixing experiments as a function of the mixer length. A) T-mixer, B) Caterpillar mixer, C) enhanced Caterpillar mixer, D) Tesla-like mixer, E) HC mixer. Error bars show the standard deviation, dotted lines only aid visual clarity and do not represent intermediate values.

a more efficient mixing. The T-mixer reaches a maximum relative intensity of 0.204 at the lowest flow rate (corresponding to  $Re = 3.7$ ). The maximum intensity decreases as the flow rate increases – as expected – with diffusion being the only force leading to the mixing of the two solutions.<sup>[29]</sup> This can be attributed to the decreasing thickness of the phase boundary between the two streams at increasing flow rates, as governed by the transverse diffusion.<sup>[32]</sup> On the other hand, the Tesla-like mixer reaches a relative intensity of 0.97 after 16 mm at the highest flow rate, with the degree of mixing decreasing with the flow rate similar to the simulation results. The Caterpillar and enhanced Caterpillar mixers behave similarly, with the highest intensities reached at the highest flow rate. Both mixers are very susceptible to the variation of flow rates, with the maximum intensity being only  $\approx 0.6$  at a flow rate of  $125 \mu\text{L min}^{-1}$  ( $Re = 9.26$ )

instead of  $>0.95$  at  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  ( $Re = 37.04$ ) at the end of the mixers. Again, this suggests the effect of colliding streams at the recombining regions having a greater effect on the mixing performance than the forming of fluid layers via splitting and recombining. The HC mixer reaches the maximum relative intensity at the shortest distance (10 mm), compared to the other mixers. The HC mixer's performance seems to be independent from the flow rate, which could be observed in the simulations.

To compare the mixing simulations with experimental results, data from three different flow rates of the Tesla-like mixer were plotted as a function of the mixer length in **Figure 3**. The four other mixers show similar results in this comparison (see Figure S2, Supporting Information).

In the first part of the mixer, the deviations of the experimental data and the simulation results show greater



**Figure 3.**  $\bar{I}$  from mixing experiments (symbols) and simulated mixing performance (lines) as a function of the mixer length of the Tesla-like mixer.

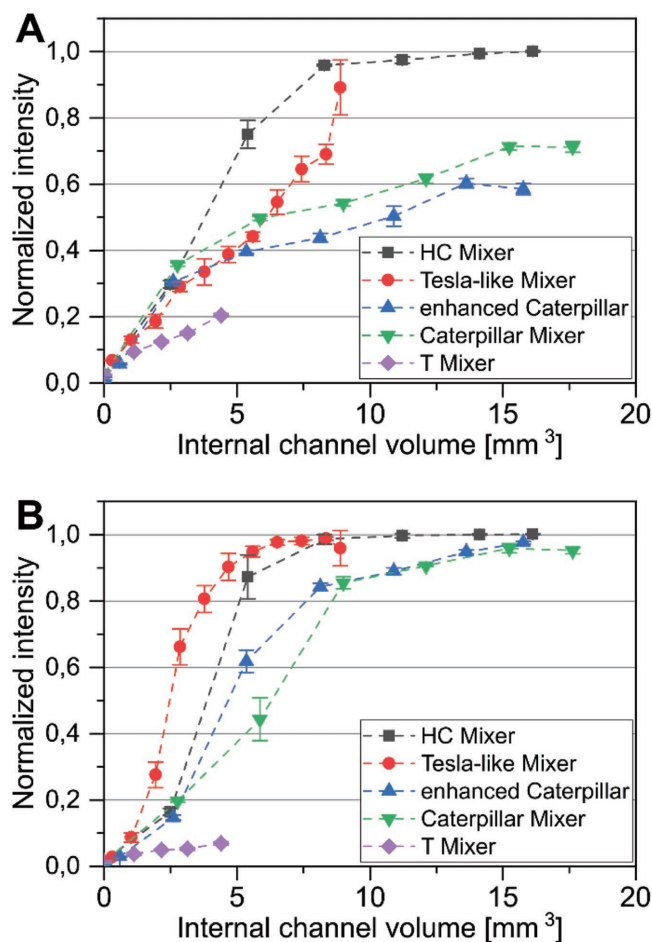
deviations. At higher flow rates, the deviations shrink dramatically after a third of the mixer length with the relative intensity and the simulated mixing performance showing very similar values. At the lowest flow rate (corresponding to  $Re = 3.7$ ), however, the calculated mixing performance stays well below the measured relative intensity. The deviations at lower  $Re$  may be a result of the roughness inside the 3D printed microchannels. Multijet printers apply print material in one direction in multiple printing lanes layer by layer, leading to smoother channels in the printing directions, while features perpendicular to the printing direction exhibit coarse edges. Rough channel walls disturb the laminar flow and lead to mixing.<sup>[33]</sup> However, the deviations at shorter mixer lengths might originate in the influence of the kinetics in the chemical reaction between NaOH and phenolphthalein, which could lead to a delay between the degree of mixing and the color intensity, and could not be considered in the simulation. This is supported by the fact that T-mixer experiments show lower normalized intensities at higher flow rates than the simulated mixing performances, while the mixing performance and  $\bar{I}$  is practically identical at lower flow rates (see Figure S2A, Supporting Information).

The different designs and structures of the tested mixers lead to different internal volumes, even at the same structure length. The internal channel volume represents the actual path length for fluids flowing through the mixers. Therefore, to adequately compare the mixers to each other, **Figure 4** shows  $\bar{I}$  as a function of the internal channel volume of the mixer sections.

The comparison reveals that the HC mixer is the only design to achieve complete mixing at the lowest  $Re$  (Figure 4A).

The Tesla-like mixer reaches a  $\bar{I}$  of 0.89 with a high standard deviation of 0.08. Both Caterpillar designs behave very similarly and reach a maximum relative intensity of 0.71 (Caterpillar mixer) and 0.6 (enhanced Caterpillar mixer), respectively. The T-mixer is the least effective, as expected, with a maximum intensity of 0.21. A similar trend was observed in the simulation results, with the HC mixer reaching a maximum intensity of 0.96 at the end of the mixer (15.96 mm<sup>3</sup>), while the other designs behave similarly to the T-mixer.

Generally, a short mixing time is preferred in many applications. The residence time inside a mixer decreases with an increase of the flow rate. At the highest flow rate of 500  $\mu\text{L min}^{-1}$  ( $Re = 37.04$ , Figure 4B), the differences in mixing performance of the T-mixer and the other mixers become more evident. The Tesla-like mixer achieves complete mixing after only 7.19 mm<sup>3</sup>, and the HC mixer after 9.47 mm<sup>3</sup>. The enhanced Caterpillar design shows a faster mixing rate and reaches complete mixing after 15.82 mm<sup>3</sup>, while the original Caterpillar mixer reaches a maximum relative intensity of 0.96 after 17.94 mm<sup>3</sup>. The T-mixer, however, only shows a maximum intensity of 0.069 at the end of the mixer (4.4 mm<sup>3</sup>). The simulations show similar results with the Tesla-like mixer reaching



**Figure 4.**  $\bar{I}$  as a function of the internal channel volume of the HC mixer, Tesla-like mixer, enhanced Caterpillar mixer, and T-mixer. A) At the lowest flow rate with  $Re = 3.7$ , and B) at the highest flow rate with  $Re = 37.04$ .

**Table 1.** Length of each mixer design where a relative intensity >0.95 was reached, which can be considered completely mixed. The lowest value of any mixer at the specific  $Re$  is highlighted in bold.

Design	$Re = 37.04$	$Re = 27.78$	$Re = 18.52$	$Re = 9.26$	$Re = 3.7$
	Length [mm]	Length [mm]	Length [mm]	Length [mm]	Length [mm]
T-mixer	–	–	–	–	–
Caterpillar mixer	19.78	–	–	–	–
enhanced Caterpillar mixer	22.59	22.59	–	–	–
Tesla-like mixer	16.56	20.84	–	–	–
HC mixer	<b>11.44</b>	<b>11.44</b>	<b>14.89</b>	<b>14.89</b>	<b>14.89</b>

complete mixing (mixing performance >0.98) after 7.24 mm<sup>3</sup> and the HC mixer after 11.48 mm<sup>3</sup>. However, when compared by length (see Figure 2), the HC mixer exceeds the mixing performance of the Tesla-like mixer with 10.55 mm instead of 16.51 mm to complete mixing.

Therefore, the fastest mixing was achieved with the Tesla-like mixer at the highest flow rate (500  $\mu\text{L min}^{-1}$ ,  $Re = 37.04$ ) with a complete mixture (relative intensity >0.98) after 0.78 s. The HC mixer showed completely mixed solutions after 0.99 s.

The Tesla-like mixer, based on a 2D design, has the advantage of an easier fabrication when using traditional manufacturing techniques, like PDMS molding. On the other hand, the HC mixer shows very good mixing performance over a vast range of  $Re$ . As 3D printing is highly automated and designed to enable easy fabrication of complex 3D structures, there is no difference in the fabrication of 2D or 3D designs. In subsequent preliminary experiments, CHO-K1 cell suspensions (concentrations between  $1 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  and  $10 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) were pumped through the HC mixer and Tesla-like mixer systems at  $Re = 9.26$  and the cell viability was determined using CEDEX AS20 cell counter (Innovatis, Bielefeld, Germany). The viability after each run remained greater than 99% for all samples, indicating that no significant cell damage was caused by the mixing structures (see Figure S3, Supporting Information). According to simulations, the peak wall shear stress was 20.2 dynes  $\text{cm}^{-2}$  (Tesla-like mixer) and 19.7 dynes  $\text{cm}^{-2}$  (HC mixer), respectively. Rawat and Gadgil reported that shear stresses of up to 220 dynes  $\text{cm}^{-2}$  lead to slightly lower cell growth, while 2000 dynes  $\text{cm}^{-2}$  lead to severe cell damage.<sup>[30]</sup> Additionally, even shear stress of 2 dynes  $\text{cm}^{-2}$  lowered the transfection efficiency,<sup>[30]</sup> thus shear stress should be kept at an absolute minimum to ensure reliable and efficient

transfection in the target application. Therefore, the HC mixer design is most suitable for efficient mixing of CHO-K1 cells and other biological applications, which require rapid sample mixing at low shear stress.

### 3. Conclusion

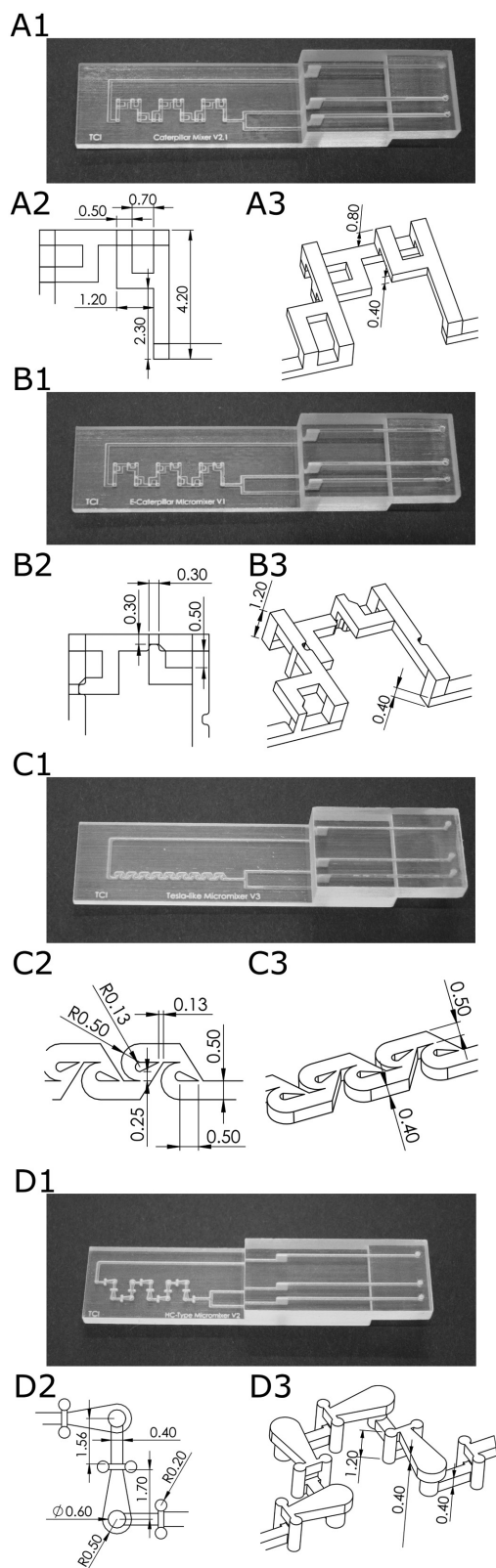
This study presents a comprehensive comparison of four different passive micromixers and a simple T-mixer, regarding their mixing performance. The mixing process was simulated using COMSOL multiphysics. Additionally, all mixers were fabricated using high-definition multijet 3D printing, and practical mixing experiments were performed. Unlike prior work, this study used similar dimensions for the mixer design and the same methods to compare the mixing efficiencies of the micromixers for  $Re$  between 3.7 and 37.04.

The results of the mixing experiments and simulations show similar results with larger deviations only at lower  $Re$ . However, the mixer length or volume at which solutions were completely mixed were very similar and only vary by a maximum of one mixer unit. The results of the mixing experiments are summarized in Tables 1 and 2.

The T-mixer design relies only on diffusion for mixing at low  $Re$ .<sup>[29]</sup> This process is slow and its performance decreases at higher flow rates, making this design unsuitable for mixing applications. The Caterpillar mixer and enhanced Caterpillar mixer are very similar in their performance. Both designs only achieve a thorough mixing of the solutions at the end of the mixers at the highest flow rates (corresponding to  $Re = 27.78$  and 37.04). The Tesla-like mixer shows superior mixing performance by far, especially when comparing the mixers by their volume. However, the mixing

**Table 2.** Internal volume of each mixer design where a relative intensity >0.95 was reached, which can be considered completely mixed. The lowest value of any mixer at the specific  $Re$  number is highlighted in bold.

Design	$Re = 37.04$	$Re = 27.78$	$Re = 18.52$	$Re = 9.26$	$Re = 3.7$
	Volume [mm <sup>3</sup> ]	Volume [mm <sup>3</sup> ]	Volume [mm <sup>3</sup> ]	Volume [mm <sup>3</sup> ]	Volume [mm <sup>3</sup> ]
T-mixer	–	–	–	–	–
Caterpillar mixer	15.24	–	–	–	–
enhanced Caterpillar mixer	15.77	15.77	–	–	–
Tesla-like mixer	<b>6.51</b>	8.35	–	–	–
HC mixer	8.29	<b>8.29</b>	<b>11.22</b>	<b>11.22</b>	<b>11.22</b>



**Figure 5.** Images of the printed mixer systems and CAD drawings of the designs with dimensions in mm. 1a) 3D printed Caterpillar mixer, 1b) CAD drawing of the repetitive Caterpillar mixer structure, 1c) CAD drawing of the Caterpillar design in an isotropic view, 2a) 3D printed

performance is highly dependent on the flow rate as well. On the other hand, the HC mixer shows a reliable mixing performance over all flow rates and even has the second shortest mixing volume to enable complete mixing at the highest flow rate. Additionally, there was no significant cell damage observed when pumping CHO-K1 cells through the HC and Tesla-like mixers.

In conclusion, the Tesla-like mixer and the HC mixer are the best designs to enable rapid mixing in 3D printed microfluidics, particularly with regard to biological applications with mammalian suspension cells. Although the resolution of commercially available 3D printers often lack the fidelity of traditional PDMS moldings, the existing mixer designs show high performance, even when scaled to bigger dimensions and fabricated via multijet printing (MJP) 3D printing.

#### 4. Experimental Section

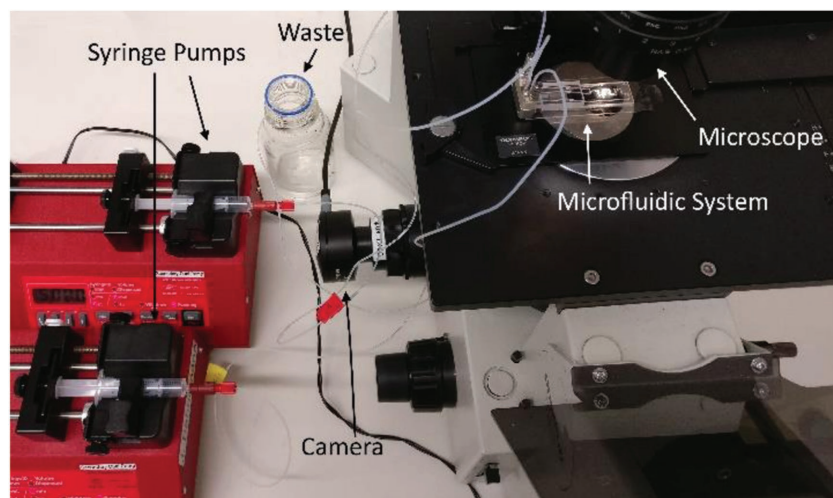
**Mixer Designs:** Four different passive mixer designs from literature were compared: the Tesla-like mixer,<sup>[25]</sup> the Caterpillar mixer,<sup>[26,27]</sup> the enhanced Caterpillar mixer,<sup>[27]</sup> and the HC mixer.<sup>[28]</sup> Additionally, a simple T-mixer was designed. These five passive mixers were rescaled to comparable dimensions, in terms of channel width and depth. The inlet channel, leading up to the mixer structures was 500  $\mu\text{m}$  wide and 400  $\mu\text{m}$  deep. The mixing section was 20 mm long with a variable number of mixing units. **Figure 5** shows the dimensions of the mixer structures and images of the 3D printed devices.

**Fabrication of Microfluidic Devices:** The microfluidic chips were printed using the 3D Systems (Rock Hill, USA) Projet MJP 2500 Plus multijet printer. The printer was set to “high definition,” providing a layer resolution of 32  $\mu\text{m}$  and a print resolution of 800  $\times$  900 dpi.<sup>[24]</sup> The printing material was Visijet M2R-CL (3D Systems, Rock Hill, USA), which forms a solid polyacrylate upon UV exposure during the printing process. The proprietary material contains 3-Hydroxy-2,2-dimethylpropyl 3-hydroxy-2,2-dimethylpropionate diacrylate, Tricyclodecane dimethanol diacrylate, and the polymerization initiator Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide. The multijet printing used Visijet M2 Sup support material (hydroxylated wax). After completion of the print, the products were cooled at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  for  $\approx 10$  min. Subsequently, the support material was removed with 3D Systems EasyClean units, consisting of a hot water vapor bath and an oil bath with EZRinse-C (3D Systems, Rock Hill, USA). The microfluidic channels were first flushed with EZRinse-C and then with ethanol (96%, Carl Roth GmbH and Co. KG, Karlsruhe, Germany) to dissolve and remove any wax and oil residues.

To enhance the visual clarity of the material and to simplify the experimental setup with the microscope, the printed chips were glued onto microscope slides (Menzel Gläser, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) with Norland optical adhesive 72 (Norland Products, Cranbury, USA).

**Experimental Setup:** For the mixing experiments, two syringe pumps (AL-1000, World Precision Instruments, Sarasota, USA) were used to pump phenolphthalein solution (1% in 96% ethanol, phenolphthalein was a product from Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Germany) and NaOH solution (0.1 M, NaOH produced by

enhanced Caterpillar mixer, 2b) CAD drawings with the detailed changes to the original Caterpillar design, 2c) CAD drawing of the enhanced Caterpillar design in an isotropic view, 3a) 3D printed Tesla-like mixer, 3b) CAD drawing of the repetitive Tesla-like mixer structures, 3c) isotropic view of the Tesla-like mixer design, 4a) 3D printed HC mixer, 4b) CAD drawing of the repetitive HC mixer structure, 4c) CAD drawing of the HC mixer design in an isotropic view.



**Figure 6.** Experimental setup of the practical mixing experiments.

Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Germany) in ethanol (96%), through one inlet of the chip, respectively. Phenolphthalein is a pH indicator, therefore the solutions change their color from transparent to red when mixed. This effect was used to determine the mixing performance.<sup>[35,36]</sup>

In order to investigate any effects of the flow rate on the mixing performance, five different flow rates were evaluated for each pump: 50, 125, 250, 375, and 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ . The corresponding  $Re$  in the channel leading up to the mixing structures were 3.7, 9.26, 18.52, 27.78, and 37.04, and was calculated as follows:

$$Re = \frac{\rho \cdot \bar{u} \cdot D_H}{\eta} \quad (3)$$

$$D_H = \frac{4 \cdot A}{U} \quad (4)$$

In Equation (3),  $\rho$  is the fluid density,  $\bar{u}$  is the area-averaged velocity,  $\eta$  is the dynamic viscosity, and  $D_H$  the hydraulic diameter, calculated using Equation (4) with the area of the cross-section of a channel  $A$  and the circumference  $U$ .

The mixing patterns were imaged using an inverted microscope (Olympus IX-50, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) at four times magnification with a CCD camera (Olympus SC30, Olympus Corporation, Tokyo, Japan). To determine the mixing performance, pictures were taken in grayscale and the mean intensity of each pixel inside the channel-portion of the image was determined. More details on the raw data analysis can be found in Figure S1 and Table S1 in the Supporting Information. The experimental setup is shown in **Figure 6**.

To connect the microfluidic devices to syringes, a Dolomite 4-way microfluidic connector and 4 mm top interface (purchased from The Dolomite Center Ltd., Royston, United Kingdom) was used with PTFE tubing (Bohlender GmbH, Grünsfeld, Germany; inner diameter of 1 mm, outer diameter of 2 mm) and female-to-male Luer assy as well as flangeless fittings (both products by IDEX Health and Science LLC, Middleboro, USA).

**Setup of the Numerical Mixing Simulations:** Mixing simulations were performed with COMSOL Multiphysics 5.2a (COMSOL Inc., Stockholm, Sweden) to compare the mixing performance of the five mixer designs. The fluid was assumed to be water, so the density was set to 1  $\text{g cm}^{-3}$  and the dynamic viscosity was set to  $1000 \times 10^6 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .<sup>[36]</sup> Steady, laminar flow was selected, with the inflow rates set to 50, 125, 250, 375, and 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ , respectively. Channel wall settings were set to “no slip” condition. Simulation runs with the different flow rates were performed for each mixer, analog

to the practical experiments. The concentration of the solute species was set to 0  $\text{mol m}^{-3}$  at one inlet and to 1  $\text{mol m}^{-3}$  at the second inlet. The diffusion coefficient of the solute species was set to  $10^9 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , which is a typical liquid diffusion constant.<sup>[36]</sup> To suppress numerical diffusion, the discretization of the concentration was set to cubic<sup>[37]</sup> and the crosswind diffusion type for free flow was set to Codina.<sup>[38,39]</sup>

The following partial differential equations were solved using COMSOL 5.2a:

$$\rho(\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = \nabla \cdot \left[ -p \mathbf{I} + \mu (\nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T) \right] + \mathbf{F} \quad (5)$$

$$\rho \nabla \cdot (\mathbf{u}) = 0 \quad (6)$$

$$\nabla \cdot (-D_i \nabla c_i) + \mathbf{u} \cdot \nabla c_i = R_i \quad (7)$$

$$N_i = -D_i \nabla c_i + u c_i \quad (8)$$

where  $\rho$  is the fluid density,  $\mathbf{u}$  is the velocity vector,  $p$  is the pressure,  $\mu$  is the dynamic viscosity,  $T$  is the temperature,  $\mathbf{F}$  is the volume force vector,  $D$  is the diffusion coefficient,  $c$  is the concentration,  $R$  is a reaction rate expression for the species, and  $N$  is the flux vector.

## Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the German Research Foundation (DFG) via the Emmy Noether Programme (346772917). Furthermore, the authors would like to thank Phil Oliver Thiel for his work as part of his bachelor's thesis.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## Keywords

3D printing, additive manufacturing, lab on a chip, microfluidics, micromixers

Received: October 17, 2018

Revised: November 18, 2018

Published online:

- [1] P. S. Dittrich, A. Manz, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 210.
- [2] G. M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, D. E. Ingber, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2001**, *3*, 335.
- [3] D. Weibel, G. Whitesides, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 584.
- [4] Y. Liu, C. D. Garcia, C. S. Henry, *Analyst* **2003**, *128*, 1002.

- [5] A. B. Theberge, F. Courtois, Y. Schaerli, M. Fischlechner, C. Abell, F. Hollfelder, W. T. S. Huck, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 5846.
- [6] Y. Zhang, H. F. Chan, K. W. Leong, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 104.
- [7] L. Y. Yeo, H.-C. Chang, P. P. Y. Chan, J. R. Friend, *Small* **2011**, *7*, 12.
- [8] K. Woodruff, S. J. Maerkl, *Sci. Rep.* **2016**, *1*, 1760.
- [9] A. Grünberger, W. Wiechert, D. Kohlheyer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *29*, 15.
- [10] S. Halldorsson, E. Lucumi, R. Gómez-Sjöberg, R. M. T. Fleming, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *63*, 218.
- [11] N. Bhattacharjee, A. Urrios, S. Kang, A. Folch, *Lab Chip* **2016**, *16*, 1720.
- [12] A. K. Au, W. Huynh, L. F. Horowitz, A. Folch, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 3862.
- [13] A. Folch, *Introduction to BioMEMSCRC* Press, Boca Raton, FL **2013**.
- [14] D. J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C. S. Effenhauser, A. Manz, *Science* **1993**, *261*, 895.
- [15] J. R. Anderson, D. T. Chiu, R. J. Jackman, O. Cherniavskaya, J. C. McDonald, H. Wu, S. H. Whitesides, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3158.
- [16] T. Femmer, I. Flack, M. Wessling, *Chem. Ing. Tech.* **2016**, *88*, 535.
- [17] R. D. Sochol, E. Sweet, C. C. Glick, S.-Y. Wu, C. Yang, M. Restaino, L. Lin, *Microelectron. Eng.* **2018**, *189*, 52.
- [18] N. P. Macdonald, J. M. Cabot, P. Smejkal, R. M. Guijt, B. Paull, M. C. Bredmore, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 3858.
- [19] A. K. Au, W. Lee, A. Folch, *Lab Chip* **2014**, *14*, 1294.
- [20] K. Plevniak, M. Campbell, M. He, in *38th Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. (EMBC)*, IEEE, August 16–20, **2016**, pp. 267–270.
- [21] W. Lee, D. Kwon, W. Choi, G. Y. Jung, A. K. Au, A. Folch, S. Jeon, *Sci. Rep.* **2015**, *1*, 3.
- [22] A. I. Shallan, P. Smejkal, M. Corban, R. M. Guijt, M. C. Bredmore, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 3124.
- [23] M. Rafeie, M. Welleweerd, A. Hassanzadeh-Barforoushi, M. Asadnia, W. Olthuis, M. E. Warkiani, *Biomicrofluidics* **2017**, *11*, 014108.
- [24] 3D Systems M2-RCL specifications, <https://de.3dsystems.com/materials/visijet-m2r-cl-mjp> (accessed: November 2018).
- [25] C.-C. Hong, J.-W. Choi, C. H. Ahn, *Lab Chip* **2004**, *4*, 109.
- [26] N. Schwesinger, T. Frank, H. Wurmus, *J. Micromech. Microeng.* **1996**, *6*, 99.
- [27] N. Rajabi, M. Hoffmann, J. Bahnemann, A.-P. Zeng, M. Schlüter, J. Müller, *J. Chem. Eng. Jpn.* **2012**, *45*, 703.
- [28] V. Viktorov, M. R. Mahmud, C. Visconte, *Chem. Eng. Res. Des.* **2016**, *108*, 152.
- [29] S. Dreher, N. Kockmann, P. Woias, *Heat Transfer Eng.* **2009**, *30*, 91.
- [30] J. Rawat, M. Gadgil, *Cytotechnology* **2016**, *68*, 2529.
- [31] X. Pan, C. Dalm, R. H. Wijffels, D. E. Martens, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 8101.
- [32] B. Bird, *Transport Phenomena*, 2nd ed., Wiley VCH, Weinheim, Germany **2007**, p. 513 ff.
- [33] B. Farshchian, A. Amirsadeghi, J. Choi, D. S. Park, N. Kim, S. Park, *Nano Convergence* **2017**, *4*, 4.
- [34] 3D Systems Projet 2500 Plus Specifications Sheet, <https://www.3dsystems.com/3d-printers/projet-mjp-2500-series/specifications> (accessed: January 2018).
- [35] R. H. Liu, M. A. Stremmer, K. V. Sharp, M. G. Olsen, J. G. Santiago, R. J. Adrian, H. Aref, D. J. Beebe, *J. Microelectromech. Syst.* **2000**, *9*, 190.
- [36] D. S. Kim, S. H. Lee, T. H. Kwon, C. H. Ahn, *Lab Chip* **2005**, *5*, 739.
- [37] A. Soleymani, E. Kolehmaninen, I. Turunen, *Chem. Eng. J.* **2008**, *135*, S219.
- [38] R. Codina, *Comput. Methods Appl. Mech. Eng.* **1993**, *110*, 325.
- [39] COMSOL Inc. Split and Recombine Mixer Benchmark, <https://www.comsol.de/model/split-and-recombine-mixer-benchmark-14031> (accessed: May 2018).





## Supporting Information

for *Small*, DOI: 10.1002/sml.201804326

3D Printed Microfluidic Mixers—A Comparative Study on  
Mixing Unit Performances

*Anton Enders, Ina G. Siller, Katharina Urmann, Michael R.  
Hoffmann, and Janina Bahnemann\**

Copyright WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69469 Weinheim, Germany, 2016.

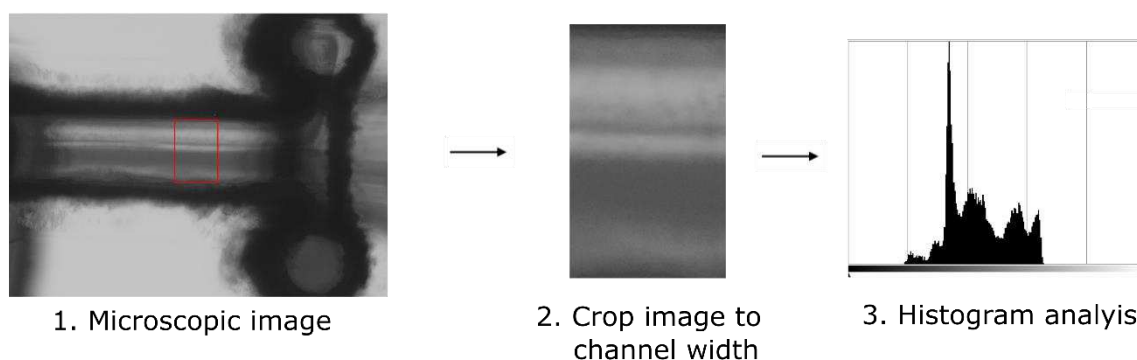
## Supporting Information

### 3D printed Microfluidic Mixers – a Comparative Study on Mixing Unit Performances

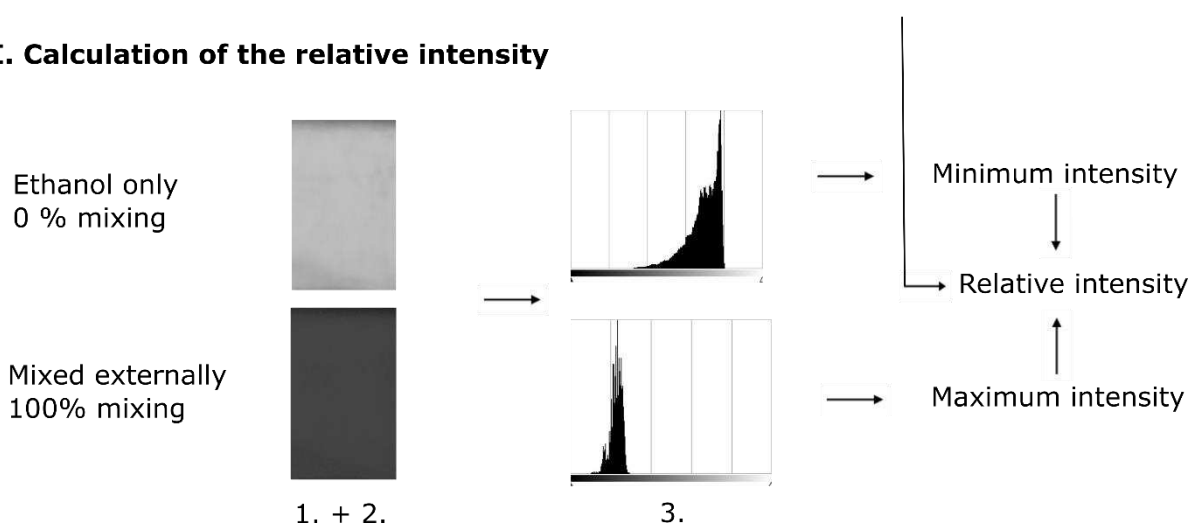
Anton Enders, Ina Siller, Katharina Urmann, Michael R. Hoffmann and Janina Bahnemann\*

#### 1. Color intensity measurement and calculation

##### I. Measuring color intensity at different $Re$



##### II. Calculation of the relative intensity



**Figure S1:** Schematic of the color intensity measurement and calculation of the relative intensity.

Microscope images of different mixer sections were taken to quantify the mixing performance. The images were cropped to the channel width and the mean color intensity was calculated

from the histogram using GIMP (GNU Image Manipulation Program 2.8.22, The GIMP-Team). To calculate the relative intensity, the minimum and maximum intensity were determined by pumping only ethanol (minimum intensity) and externally mixed solutions (maximum intensity) through the system and taking microscope images of the same mixer sections. Every flow rate was imaged three times at every measurement location. The flow rates were set in three different orders (descending, ascending and random) to account for possible influence of the previous flow rate before taking the measurement. **Table S1** shows sample values of the HC mixer after the third mixer unit.

**Table S1:** Determined intensity values for the calculation of the relative intensity  $\bar{I}$  at different Re from one measurement location in the HC mixer.

	$I_{mean}$	$I_{inverted}$	$I_{normalized}$	$\bar{I}$
Ethanol	181,07	73,93	0	0
$Re = 37.04$	66,73	188,27	114,33	0,99
$Re = 27.78$	66,37	188,63	114,7	0,99
$Re = 18.52$	72,43	182,57	108,63	0,94
$Re = 9.26$	74,27	180,73	106,8	0,92
$Re = 3.7$	69,93	185,07	111,13	0,96
Externally mixed	65,13	189,87	115,93	1

The mean intensity was determined from three cropped microscope images for every flow rate.

The values were inverted using Equation S1.

$$I_{inverted} = 255 - I_{mean} \quad (S1)$$

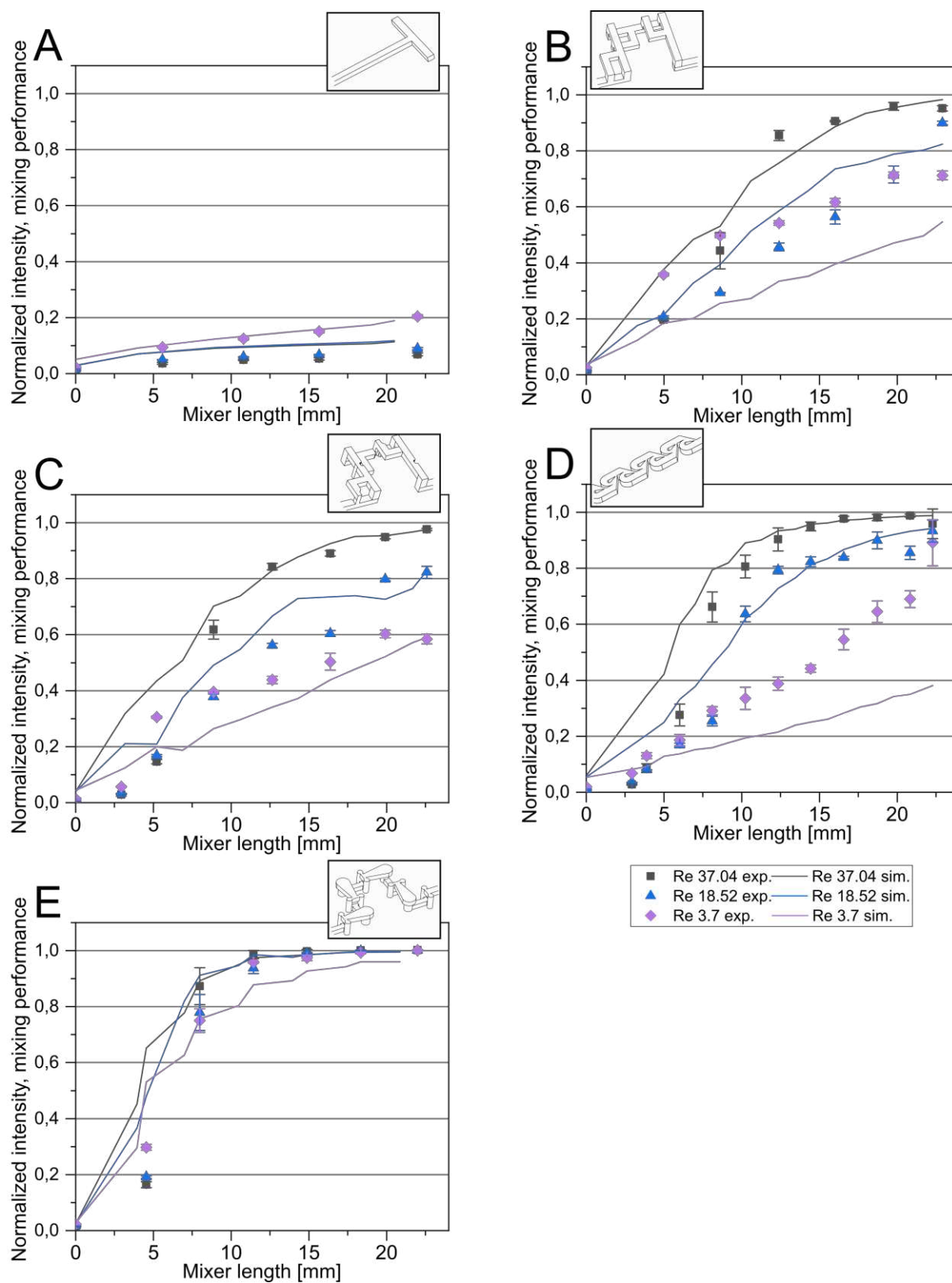
$I_{inverted}$  was normalized using Equation S2 to account for the background of the mixer channels.

$$I_{normalized} = I_{inverted} - I_{inverted, ethanol} \quad (S2)$$

The relative intensity  $\bar{I}$  was calculated using Equation S3.

$$\bar{I} = \frac{I_{normalized}}{I_{normalized, externally mixed}} \quad (S3)$$

## 2. Comparison of simulations and experimental data

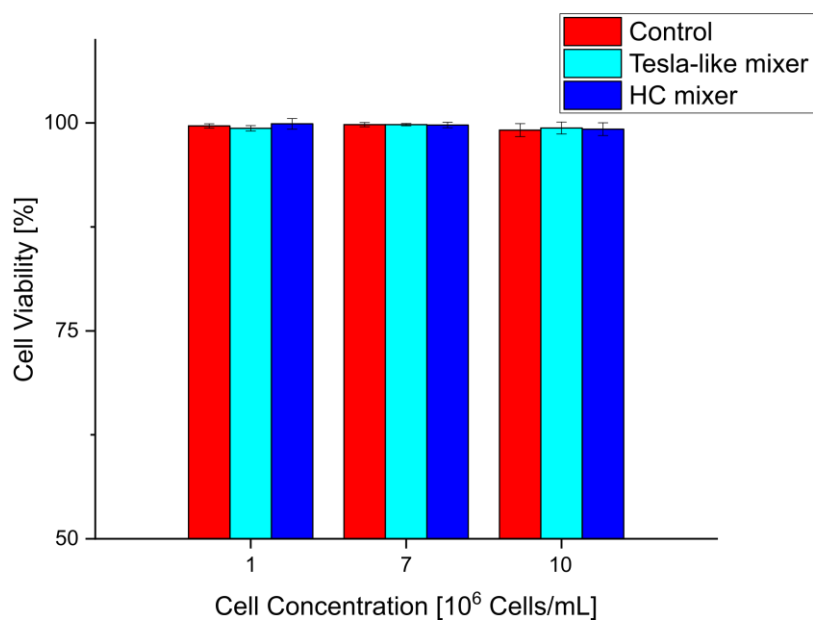


**Figure S2:** Comparison of simulated mixing performance (lines) and normalized intensity (dots) at different Re. A: T-mixer, B: Caterpillar mixer, C: enhanced Caterpillar mixer, D: Tesla-like mixer, E: HC mixer.

**Figure S2** shows additional graphs for the comparison of simulations and experimental results. As discussed in the paper, the simulations and experimental results generally show similar results with greater deviations in the first third of the mixer length. The T-mixer shows very similar normalized intensity and mixing performance at all flow rates. The channels of the T-mixer chip are probably very smooth with no turns or round corners in the mixer itself. The small deviations at higher flow rates might originate from the missing chemical reaction simulation of sodium hydroxide (NaOH) with phenolphthalein, which could lead to a delay between the degree of mixing and the color intensity. The Caterpillar mixer, enhanced Caterpillar mixer, HC mixer and Tesla-like mixer all show better alignment of experimental and simulated results at higher Re with greater deviations at lower Re and at lower mixer lengths. Therefore, data for the Tesla-like mixer was discussed in the paper representatively.

### 3. Shear stress influence on cell viability and concentration

In additional experiments, CHO-K1 cells were cultivated in CHOMACS CD Medium (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and pumped through the HC mixer and Tesla-like mixer systems at  $Re = 9.26$ . Cell viability was determined using CEDEX AS20 cell counter. The viability of the cells, directly after passing through the mixers (and a control with no mixing), is shown in **Figure S3**.



**Figure S3:** Cell viability after pumping the cells through the Tesla-like mixer (turquoise), HC mixer (blue) and without pumping the cells (Control, red). The cell concentrations tested were  $1 \cdot 10^6$ ,  $7 \cdot 10^6$  and  $10 \cdot 10^6$  cells  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>.

As discussed in the study, the cell viability was not significantly affected by passing the cells through the mixers at any tested concentration (Figure S3).

## 4.2 3D-gedruckter mikrofluidischer Spiralseparator zur kontinuierlichen, pulsationsfreien und kontrollierbaren Zellrückhaltung von CHO-Zellen

Die Separation der Zellen vom Transfektionsreagenz nach einer bestimmten Inkubationszeit kann potenziell zu einer verbesserten Viabilität der transfizierten Zellen führen. Hierdurch könnte wiederum die Proteinproduktion positiv beeinflusst werden. Für die Entwicklung des mikrofluidischen Transfektionssystems wurde daher die Separation von Zellen mit einem Spiralseparator untersucht. Zusätzlich zu der Anwendung im Transfektionssystem kann ein Separator bei Kultivierungen in Bioreaktoren als Zellrückhaltesystem eingesetzt werden. Dies eröffnet die Möglichkeit einer Perfusionskultivierung, bei der einem Rührkesselreaktor durchgängig neues Medium zugeführt und altes, verbrauchtes Medium entnommen wird. Statt die Zellen ebenfalls aus dem Reaktor herauszupumpen, werden diese mit einem Separator vom alten Medium abgetrennt und in den Reaktor zurückgeführt.

Die Entwicklung des mikrofluidischen Spiralseparators wurde in der *peer-reviewed* Fachzeitschrift *Micromachines* veröffentlicht. In Abbildung 7 ist eine graphische Kurzzusammenfassung der Veröffentlichung dargestellt.

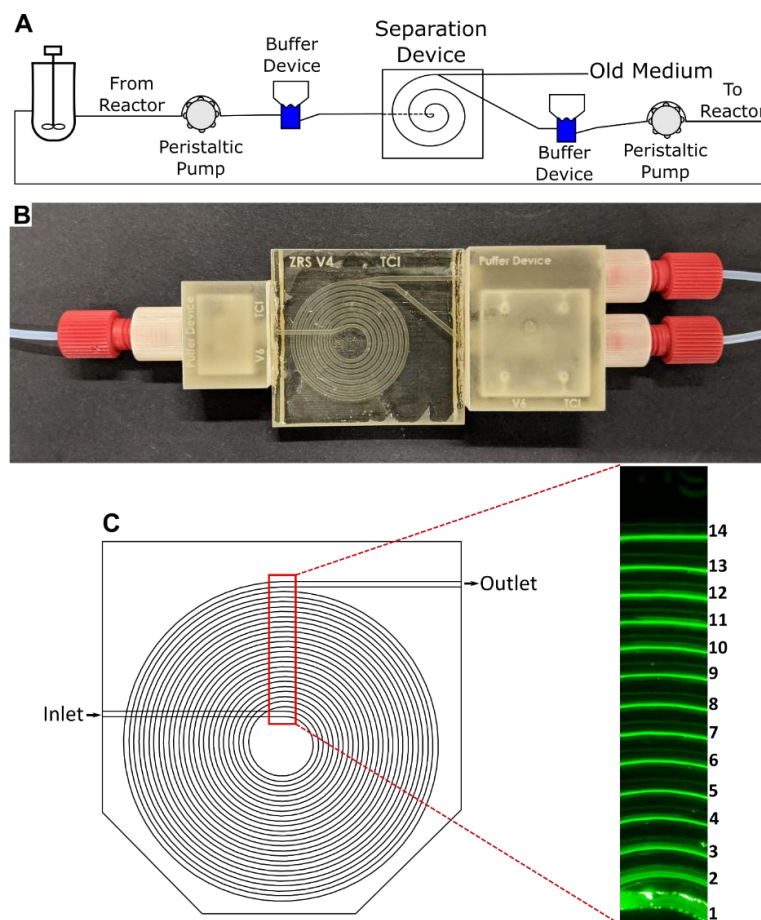


Abbildung 7: Graphische Kurzzusammenfassung der Veröffentlichung. A: Versuchsaufbau des Spiralseparators mit Pulsationsdämpfern als Zellrückhaltesystem. B: 3D-gedrucktes System mit Pulsationsdämpfern (rechts und links) und Spiralseparator (Mitte). C: Untersuchung der Fokussierung im Spiralseparator mittels Fluoreszenzpartikeln.



In dieser Studie wurde ein Zellrückhaltesystem entwickelt, das durch den Einsatz von zwei Pumpen die Kontrolle der Zellrückhaltung ermöglicht. Durch die Integration von 3D-gedruckten Pulsationsdämpfern kann das System mit Peristaltikpumpen kontinuierlich betrieben werden. Hierfür wurde zunächst eine Separationsspirale erstellt und mit Fluoreszenzpartikeln und CHO-K1 Zellen bei unterschiedlichen Zellkonzentrationen ( $5 \cdot 10^6$  bis  $20 \cdot 10^6$  Zellen pro mL) und Eingangsflussraten bezüglich der Separationseffizienz getestet. Dabei zeigte sich, dass bei höheren Flussraten und geringeren Zellkonzentrationen eine sehr hohe Separationseffizienz erzielt werden konnte. Durch die Veränderung der Flussraten am Spiralausgang, welche durch den Anschluss einer zweiten Pumpe ermöglicht wurde, konnte die Effizienz zusätzlich beeinflusst werden. Dadurch war selbst bei einer Konzentration von  $20 \cdot 10^6$  Zellen pro mL eine Zellrückhaltung von 95 % der Zellen möglich. Durch die Bestimmung der Zellverlustrate (in Zellen pro min) kann ein direkter Vergleich mit der Zellwachstumsrate im Bioreaktor erfolgen und so eine Kontrolle der Zellkonzentration ermöglicht werden.

Zusätzlich zur Separationsspirale wurden Pulsationspuffer entwickelt und charakterisiert. Es wurde demonstriert, dass die durch Peristaltikpumpen hervorgerufene Pulsation der Fließgeschwindigkeit durch die Puffer stark gedämpft werden konnte, um die zuverlässige Separation in der Spirale zu gewährleisten.

Die Ergebnisse werden im nachfolgenden Artikel „*3D Printed Microfluidic Spiral Separation Device for Continuous, Pulsation-Free and Controllable CHO Cell Retention*“ detailliert ausgeführt und diskutiert.

Article

# 3D Printed Microfluidic Spiral Separation Device for Continuous, Pulsation-Free and Controllable CHO Cell Retention

Anton Enders <sup>1</sup> , John-Alexander Preuss <sup>1</sup> and Janina Bahnemann <sup>1,2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Technical Chemistry, Leibniz University Hannover, 30167 Hannover, Germany; enders@iftc.uni-hannover.de (A.E.); preuss@iftc.uni-hannover.de (J.-A.P.)

<sup>2</sup> Cell Culture Technology, Faculty of Technology, Bielefeld University, 33615 Bielefeld, Germany

\* Correspondence: jbahnemann@iftc.uni-hannover.de

**Abstract:** The development of continuous bioprocesses—which require cell retention systems in order to enable longer cultivation durations—is a primary focus in the field of modern process development. The flow environment of microfluidic systems enables the granular manipulation of particles (to allow for greater focusing in specific channel regions), which in turn facilitates the development of small continuous cell separation systems. However, previously published systems did not allow for separation control. Additionally, the focusing effect of these systems requires constant, pulsation-free flow for optimal operation, which cannot be achieved using ordinary peristaltic pumps. As described in this paper, a 3D printed cell separation spiral for CHO-K1 (Chinese hamster ovary) cells was developed and evaluated optically and with cell experiments. It demonstrated a high separation efficiency of over 95% at up to  $20 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>. Control over inlet and outlet flow rates allowed the operator to adjust the separation efficiency of the device while in use—thereby enabling fine control over cell concentration in the attached bioreactors. In addition, miniaturized 3D printed buffer devices were developed that can be easily attached directly to the separation unit for usage with peristaltic pumps while simultaneously almost eradicating pump pulsations. These custom pulsation dampeners were closely integrated with the separator spiral lowering the overall dead volume of the system. The entire device can be flexibly connected directly to bioreactors, allowing continuous, pulsation-free cell retention and process operation.



**Citation:** Enders, A.; Preuss, J.-A.; Bahnemann, J. 3D Printed Microfluidic Spiral Separation Device for Continuous, Pulsation-Free and Controllable CHO Cell Retention. *Micromachines* **2021**, *12*, 1060. <https://doi.org/10.3390/mi12091060>

Academic Editor:  
Nam-Trung Nguyen

Received: 14 July 2021

Accepted: 27 August 2021

Published: 31 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** microfluidics; 3D printing; inertial microfluidics; continuous cultivation; cell retention; CHO cells

## 1. Introduction

Microfluidic systems in biology and biochemistry are often focused on combining several lab procedures into a single system, thereby creating a so-called lab-on-a-chip [1–3]. Significant attention has recently been given to adherent cell cultivation on microfluidic systems in the field of organ-on-a-chip, with the aim of furthering technological advances for medical testing and research [4–7]. The unique physical environment that is created inside microfluidic channels allows for a high degree of fluid control and facilitates interesting and frequently useful particle–fluid interactions—which can then be exploited for cell handling purposes. These interactions define the field of inertial microfluidics, which focuses on identifying and refining channel shapes and structures that transfer, mix, focus, and/or separate particles within microfluidic systems [8].

At certain flow rates, the flow inside the microfluidic channels is considered laminar (Reynolds number  $Re \ll 2000$ ), but the flow field still falls somewhere between the Stoke state and turbulent flow. Under these circumstances, particles in motion inside a confined channel experience numerous lift and drag forces [9]. The convergent interactions of these forces result in a small number of equilibrium positions where particles tend to converge

even within a straight channel—and the location of these equilibrium positions can be manipulated by changing (i.e., curving) the channel shape. These dynamics can then be exploited to finely sort or separate particles. Nawaz et al. [10] have designed a simple U-shaped channel in their hydrodynamic focusing device to achieve sub-micrometer precision in flow cytometry applications. Di Carlo et al. [11] have similarly used a sinusoidal (“snake-like”) channel to observe the self-ordering of particles and whole-blood cells inside the channel. To date, however, the most popular shape is the spiral channel—due in large part to its compact shape and stable flow field [9]. To cite one recent example, Warkiani et al. [12] successfully isolated circulating tumor cells from whole blood using a spiral microchannel, achieving a recovery rate of over 85%. In another example, Lee et al. used a spiral channel for cell cycle synchronization of human mesenchymal stem cells [13], demonstrating that an even more intricate form of sorting was possible using inertial microfluidics. Finally, in combination with the exploitation of dielectric properties, Wang et al. [14] have recently used a separation spiral to separate three different common microalgae cell types.

While most existing industrial bioprocesses are run in the fed-batch mode today, there are tremendous incentives to employ another cultivation strategy for new bioprocesses: continuous cultivation [15]. In a typical fed-batch process, cells grow and produce the protein until a maximum cell concentration is reached. Then the cellular death phase sets in, as the concentration first plateaus and then starts to actively decrease. Typically, the reactor is then harvested, and protein purification begins. With continuous cultivation, however, the cells stay inside the bioreactor and fresh medium is simply pumped in while the old medium is pumped out. As a result, using this method, the product expressed by the cells can be continuously harvested from the bioreactor [15,16]. Continuous bioprocesses thus offer the tantalizing promise of increased production flexibility and scaling, higher product quality, and lower overall cost of production when compared to fed-batch cultivations [16].

One of the primary advantages of using inertial microfluidics for cell sorting or separation is the inherent ability to facilitate precisely this sort of continuous operation while also reducing shear stresses [17]. Kwon et al. have demonstrated the usefulness of a spiral channel device for cell retention in CHO (Chinese hamster ovary) cultivation [18]. Their system boasted not only a high recovery rate, but also improved relative reliability (which is crucial for continuous use) when compared with other cell retention devices such as filter membranes.

Inertial focusing devices with multiple outlets usually operate with a fixed outlet flow rate ratio. Kwon et al. used different tubes at both outlets to manipulate fluidic resistance [18], therefore achieving an inner outlet (retentate outlet) flow rate up to 4.5 times higher than the outer outlet flow rate (permeate). However, this ratio cannot be changed during the operation of the separation device. This led to a change of flow rates at both outlets when changing the inlet flow rate—and this inflexibility prohibited the operator from regulating separation efficiency without changing the outlet flow rate, and vice versa.

In this paper, we describe a 3D printed microfluidic focusing device which can be used in both perfusion and chemostat CHO cell cultivation, wherein medium and product cells are taken continuously from the reactor in order to keep the growing cells at a given concentration. In contrast to other separation devices, by controlling the inlet and outlet flow rate with pumps, this device gives the user granular control over the number of cells taken out of the reactor—which makes it suitable for more dynamic process control and process development. To facilitate easier continuous use with peristaltic pumps, we also describe 3D printed buffer devices which minimize the pulsations created by the pump, and can be easily integrated with the separation spiral, leading to small system volume. The design presented here includes threaded ports commonly used in HPLC (high-performance liquid chromatography) applications, which create a secure connection with well-known, off-the-shelf parts. Additionally, the 3D printed designs can also be easily changed in CAD (computer-aided design) software or integrated into other systems to adapt to new processes.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Fabrication of Microfluidic Devices

All CAD models were designed in Solidworks 2020 (Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, France), and then 3D printed using the Projet 2500 plus MultiJet 3D printer (3D Systems, Rock Hill, SC, USA). The printer has a resolution of  $800 \times 900$  DPI in x and y directions and a layer height (z direction) of  $32 \mu\text{m}$ . The surface roughness (arithmetic average of roughness) of the printed parts were 9, 9 and  $2 \mu\text{m}$  (xyz) [19]. The printing material used was M2S-HT90 (3D Systems), which forms solid polyacrylate after being exposed to UV rays during the printing process. The support material used was M2-SUP (3D Systems). After completion of the print, the parts were cooled at  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  in a freezer for approximately 10 min, and then separated from the print platform. The printed parts were then placed in a hot water vapor bath (to melt the wax-like support material) for approximately 20 min. Afterwards, the parts were placed in a heated oil bath (paraffin oil at  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ ), and the channels were then flushed with warm oil and submerged in an ultrasonic bath with paraffin oil in order to dissolve any remaining residual support material. Finally, any potential lingering oil residues were removed using warm soap water (Fairy Ultra detergent, Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA) in yet another ultrasonic bath.

### 2.2. Separation Device Design

The separation spiral was developed using design guidelines and the design equation articulated by Di Carlo [8] to facilitate focusing of  $18 \mu\text{m}$  particles (or cells) at a flow rate of  $1000 \mu\text{L min}^{-1}$  (see Equation (1)). Additionally, the height of the spiral channel was  $200 \mu\text{m}$ , since prior experiments have demonstrated that this size can be reliably produced using the 3D printer [19,20].

$$Lf = \frac{\pi\mu H^2}{\rho U_m a^2 f_L} \quad (1)$$

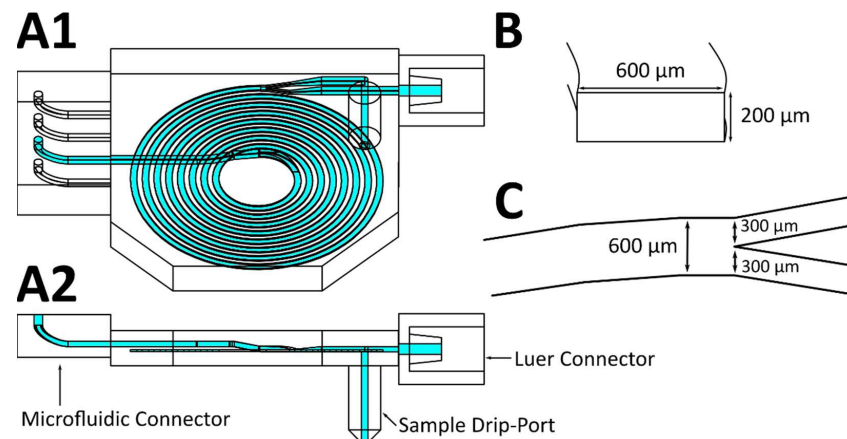
$Lf$  is the channel length required for focusing to equilibrium positions,  $\mu$  is the viscosity of the fluid (water;  $0.001 \text{ kg M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),  $H$  is the long side of the channel ( $600 \mu\text{m}$  width),  $\rho$  is the fluid density ( $1000 \text{ Kg m}^{-3}$ ),  $U_m$  is the maximum velocity ( $0.19375 \text{ m s}^{-1}$ , calculated with a flow rate of  $930 \mu\text{L min}^{-1}$  in a  $200 \mu\text{m}$  by  $600 \mu\text{m}$  channel multiplied by 1.5 to estimate the maximum velocity in the channel center [8]),  $a$  is the diameter of the particles or cells ( $18 \mu\text{m}$  [21]), and  $f_L$  is the lift factor ( $0.04$  estimate from Di Carlo [8]) [8]. The calculated separation channel is  $450 \text{ mm}$  long,  $200 \mu\text{m}$  deep, and  $600 \mu\text{m}$  wide. Figure 1 shows the resulting CAD (computer aided design) model of the separation spiral developed to focus CHO-K1 cells while offering control over the separation efficiency due to a second pump connected to one spiral outlet.

For initial experiments using fluorescent particles, the spiral channel used was  $830 \text{ mm}$  long, in order to compensate for foreseeable disturbances due to surface roughness. Rough edges on the channel wall could lead to disturbances of the laminar flow, therefore pushing the particles away from the equilibrium position. For the cell experiments, a length of  $372 \text{ mm}$  was chosen, based on the results obtained in previous experiments. A second outlet was also added to the design (see Figure 1) in order to allow for different flow rates and the separation of cells, thereby creating two outlets with a width of  $300 \mu\text{m}$  each. In experiments with pulsation buffers, a second inlet was added  $1.7 \text{ mm}$  in front of the end of the spiral; this inlet was used to add ink solution to the stream, in order to facilitate easier and more accurate observation of flow pulsations.

### 2.3. Buffer Device Design

Two different buffer devices were designed to eliminate flow pulsation by the peristaltic pumps. These devices were based on a buffer design idea generated by Kang et al., wherein needles were inserted into plastic syringes to act as pulsation buffers and bubble traps [22]. This buffer design was modified to be more compact and integrated, with added PTFE tube connectors for more rigid connections. The inlet pump (Ismatec REGLO Digital, Cole-Palmer GmbH, Wertheim, Germany) was connected to a smaller  $1 \text{ mL}$  buffer device,

while the outlet pump was connected to a larger 5 mL buffer device. The buffer devices were glued to the separator device using acrylate glue (UHU Sekundenkleber, Bolton Adhesives, Rotterdam, Netherlands).



**Figure 1.** CAD drawing of the spiral separator. (A1) Separator design used for cell retention testing (A2) side view of the design. Dolomite Microfluidic Connector (Dolomite Microfluidics, UK) on the left, slip-on luer connector for syringes on the right, sample collection port on the bottom. (B) Cut view of the spiral channel with a height of 200  $\mu\text{m}$  and width of 600  $\mu\text{m}$ . (C) Top view of the split at the end of the spiral channel into two 300  $\mu\text{m}$  wide outlet channels.

#### 2.4. Experimental Setup

In a first experiment, fluorescent particles with a size similar to CHO cells (CHO cell size approximately 18  $\mu\text{m}$  [21], Fluoresbrite YG Microspheres 20.0  $\mu\text{m}$ ; Polysciences, Warrington, PA, USA) were pumped through the spiral separator using a syringe pump (AL-1000, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) at 1000  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Four different concentrations were used: 0.5, 1, 2, and 5.56 (stock concentration)  $\times 10^6$  particles per mL. The flow was evaluated microscopically (Olympus IX-50, Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

To evaluate the performance of the separator that was designed to isolate CHO cells, four different cell concentrations (CHO-K1) were tested: 5, 10, 15, and 20  $\times 10^6$  cells per milliliter. Additionally, four different inlet flow rates were also tested to determine separation efficiency at different flow rates: 500, 700, 1000, and 1300  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Another factor that influences separation efficiency is the outlet ratio—and so to test relative outlet ratios, a syringe pump was connected to one outlet drawing with a set flow rate and eight different outlet ratios were deployed with each inlet flow rate. The syringe pump connected to the inlet was placed upright above a magnetic stirrer, with a stir bar placed inside the syringe to keep the cell solution homogenized during the experiment. The second syringe pump was connected directly to the separation spiral outlet. After each change in outlet flow rate, 250  $\mu\text{L}$  of cell suspension were discarded before collecting the sample to allow the flow inside the spiral to stabilize.

#### 2.5. CHO Cell Cultivation and Preparation

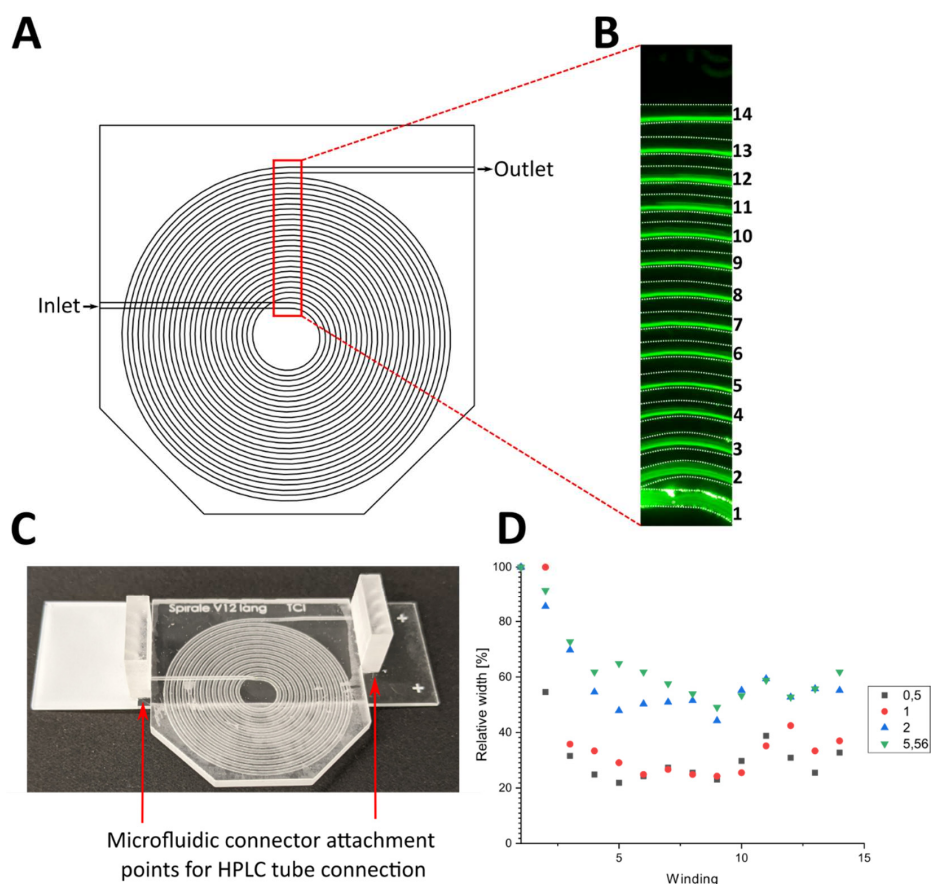
CHO-K1 cells were cultivated in CHO-TF cell culture medium (Xell AG, Nordrhein-Westfalen, Germany) in 125 mL, 250 mL, or 500 mL baffled Erlenmeyer shake flasks with vent caps (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany) at 37  $^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$  in humidified atmosphere on a shaker (MaxQ  $\text{CO}_2$  Plus, Thermo Fisher Scientific Inc., Bartlesville, OK, USA) at 120 rpm. Each passage was started with a concentration of 0.4  $\times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ , and cells were harvested at a concentration of 10  $\times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . If needed, the cells were first centrifuged and then resuspended to achieve higher concentrations. Following resuspension, the cells were shaken gently at 120 rpm in 50 mL reaction tubes (Fisher

Scientific GmbH, Germany) for 1 h, in order to disperse any cell aggregates that might have coalesced before the experiment began.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Inertial Focusing Using the Spiral Separator

To provide direct insight into the focusing mechanics of the spiral separator, fluorescent particles were pumped through the 3D printed device—at different flow rates, and in different concentrations—using a syringe pump. The flow of particles was observed under a fluorescence microscope at the design flow rate of  $1000 \mu\text{L min}^{-1}$  (see Figure 2). The spiral channel used in this experiment (see Figure 2A) was elongated to 830 mm in order to compensate for foreseeable eventual negative effects arising from the irregular print surfaces increasing the focusing distance. Figure 2B shows a microscopic image of  $0.5 \times 10^6$  particles per mL. To determine the position of the focused particle stream inside the channel, the fluorescence images were analyzed using ImageJ by determining the width of the channel and the width of the fluorescent stream. The number of bright pixels (higher than the brightness threshold of 71) along a vertical line was taken as the stream width. A graphical representation of the analysis is shown in the Supplementary Information (Figure S1). Figure 2C shows the printed separation spiral and Figure 2D the relative width of the particle stream inside the channel at each winding for the four different particle concentrations.

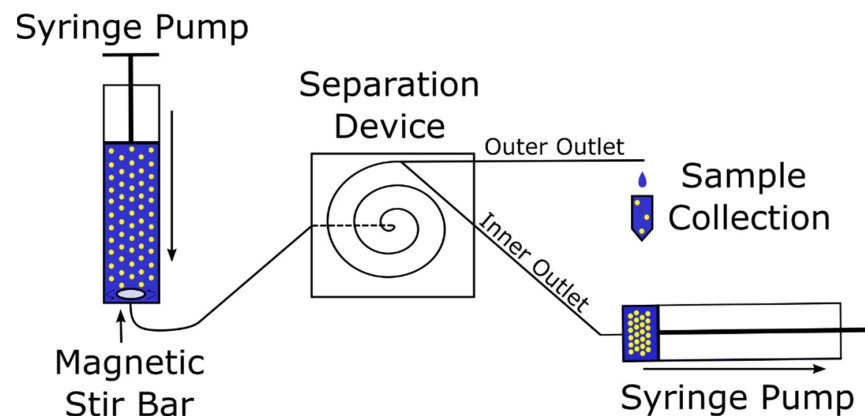


**Figure 2.** (A) Top view of the CAD drawing of the separator spiral. (B) Image of the fluorescent particle flow in the red region of A. Channel walls were highlighted with white dotted lines. Numbers on the right represent the number of the spiral winding. (C) Photo of the 3D printed spiral separator with microfluidic connector attachment points on the inlet and outlet. (D) Relative width of the fluorescent particle flow in relation to the channel width after each winding of the spiral at particle concentrations of 0.5, 1, 2 and  $5.56 \times 10^6$  particles per mL.

The particles initially flowed across the whole width of the channel (100%) at the spiral inlet, but they were observed to quickly focus near the inner channel wall. Lower particle concentrations of 0.5 and  $1 \times 10^6$  particles per mL revealed a sharper focused stream, with a relative width of 31 and 35% at the third winding, respectively. Higher concentrations of 2 and  $5.5 \times 10^6$  particles per mL resulted in broader streams, followed by a subsequent focusing with the smallest width of 50–60% after seven windings. Since the position of the particle flow did not change significantly after the seventh winding (372 mm channel length) of the spiral channel and the back pressure increases with the channel length, subsequent experiments were conducted using a shorter channel length of 372 mm. Since the fluorescent particles used in this experiment do not represent the different sizes of CHO cells expected in a real cultivation, where the cell size changes depending on the growth phase of the cell, the results are only a first proof of concept. The separation efficiency of the device has to be evaluated using real cells.

### 3.2. Focusing of CHO-K1 Cells

To evaluate the performance of the spiral separator, CHO-K1 cell solutions with four different concentrations were pumped through the separation device using a syringe pump. To manipulate the flow ratio of both outlet channels at the end of the spiral to control the separation efficiency, a second syringe pump was also deployed to withdraw from the inner outlet at eight different flow rates per inlet flow rate. The samples were taken from the outer outlet by collecting the droplets using a 1.5 mL collection tube. Subsequently, the cell concentration was analyzed using CEDEX HiRes. Figure 3 illustrates the experimental setup.



**Figure 3.** Schematic of the experimental setup to evaluate the separator performance. The inlet syringe pump is placed upright above a magnetic stirrer and a magnetic stir bar is placed inside the syringe to mix the cell solution during the experiment.

The cell concentration was multiplied by the flow rate to determine the cell loss rate, i.e., the number of cells being pumped out of the outer outlet per minute. This can be compared to a cell growth rate when the system is used with a bioreactor, in order to control the cell concentration inside the reactor. Additionally, the efficiency of the separation device was calculated by dividing the cell loss rate by the theoretical cell loss rate at the outlet flow rate without any separation effects (see Equation (2)).

$$efficiency (\%) = 100 - \left( \frac{cell\ loss\ rate}{OO\ Flow\ Rate \times input\ cell\ conc.} \right) \quad (2)$$

where *OO Flow Rate* is the flow rate at the outer outlet and *input cell conc.* is the cell concentration pumped into the separation device.

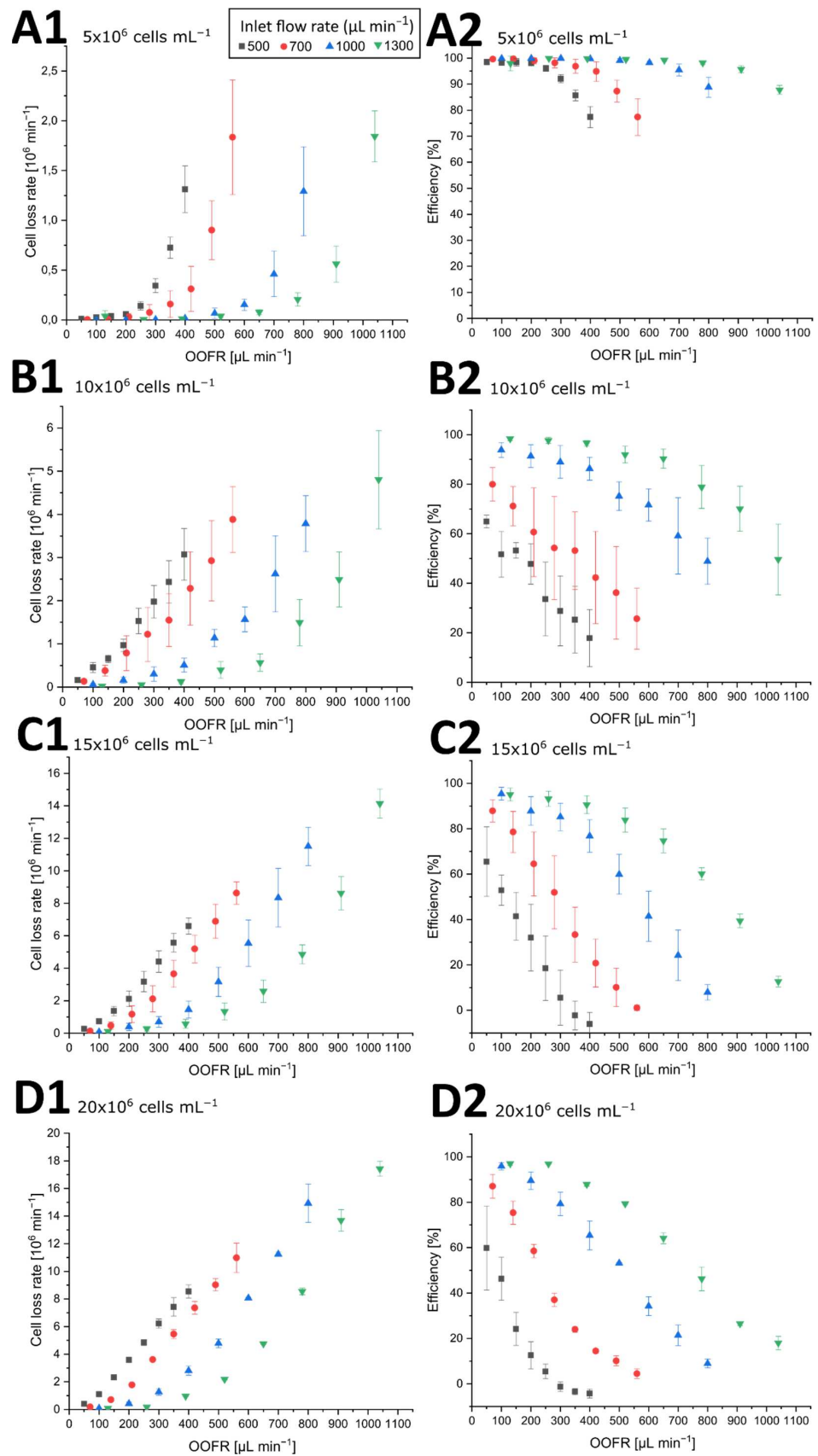
Figure 4 shows the cell loss rate and the efficiency of three biological replications as a function of the outer outlet flow rate at different input flow rates for four different cell concentrations.

At the concentration of  $5 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  (see Figure 4(A1,A2)), all inlet flow rates depicted a hockey stick curve. While at the lowest outer outlet flow rates (OOFR) cell loss rates were minimal, the cell loss rate increased at an outlet flow rate approximately half the inlet flow rate ( $0.14 \times 10^6$  cells  $\text{min}^{-1}$  at  $250 \mu\text{L min}^{-1}$  OOFR at  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  inlet flow rate;  $0.15 \times 10^6$  cells  $\text{min}^{-1}$  at  $350 \mu\text{L min}^{-1}$  OOFR at  $700 \mu\text{L min}^{-1}$  inlet flow rate;  $0.06 \times 10^6$  cells  $\text{min}^{-1}$  at  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  OOFR at  $1000 \mu\text{L min}^{-1}$  inlet flow rate;  $0.08 \times 10^6$  cells  $\text{min}^{-1}$  at  $650 \mu\text{L min}^{-1}$  OOFR at  $1300 \mu\text{L min}^{-1}$  inlet flow rate). Consequently, the efficiency of the separator declined at higher OOFRs, with efficiencies well over the 95% observed at low OOFRs of  $100\text{--}200 \mu\text{L min}^{-1}$ , but dropping to 77% at an inlet flow rate of  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  at OOFR of  $400 \mu\text{L min}^{-1}$ . Higher inlet flow rates showed higher separation efficiencies even at greater OOFRs, with 87% efficiency at an OOFR of  $1040 \mu\text{L min}^{-1}$ . Lower retention efficiencies led to greater standard deviations, with a maximum of 7.08% at an OOFR of  $560 \mu\text{L min}^{-1}$  at an inlet flow rate of  $700 \mu\text{L min}^{-1}$ . Similarly, the standard deviation of the cell loss rate increased with higher cell loss rates.

At a cell concentration of  $10 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  (see Figure 4(B1,B2)), the cell loss rate increased at lower outlet flow ratios and a stronger dependency of the inlet flow rate was observed. At an inlet flow rate of  $500 \mu\text{L min}^{-1}$ , the lowest cell loss rate of  $0.32 \times 10^6$  cells/min was at  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  OOFR. The cell loss rate then increased almost linearly with a higher OOFR to  $3.07 \times 10^6$  cells  $\text{min}^{-1}$  at  $400 \mu\text{L min}^{-1}$ . The increase of cell loss rate was similar at  $700 \mu\text{L min}^{-1}$  inlet flow rate. However, at the  $1000 \mu\text{L min}^{-1}$  inlet flow rate, the increase of the cell loss rate with OOFR was more nearly exponential—much like the increase at a cell concentration of  $5 \times 10^6$   $\text{mL}^{-1}$  with a loss rate of  $0.4 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  at OOFR of  $400 \mu\text{L min}^{-1}$ . Similar results were also observed with the  $1300 \mu\text{L min}^{-1}$  inlet flow rate. Consequently, the separation efficiency at lower inlet flow rates was significantly lower at  $10 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . However, at higher OOFRs, the efficiency dropped to 50% at both inlet flow rates of  $500$  and  $700 \mu\text{L min}^{-1}$ . Higher input flow rates also provided higher separation efficiencies at relatively high OOFRs, again like the separation efficiency at  $5 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . The standard deviations of the cell loss rate increased to a maximum of  $1.3 \times 10^6$  cells  $\text{min}^{-1}$  at an inlet flow rate of  $1300 \mu\text{L min}^{-1}$  with the cell loss rate, while the standard deviation of the efficiency was generally greater (maximum of 18%) than the deviations at an input cell concentration of  $5 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ .

At a cell concentration of  $15 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  (see Figure 4(C1,C2)), the effectiveness of the separation device at lower input flow rates decreased at lower OOFRs. The cell loss rates at input flow rates of  $500$  and  $700 \mu\text{L min}^{-1}$  grew almost linearly with the OOFR. At both the  $500$  and  $700 \mu\text{L min}^{-1}$  input flow rate, the effectiveness reached 0% and below 0% at the highest OOFRs. The negative effectiveness could potentially be explained by cells being repelled from the inner channel wall into the middle of the channel, therefore increasing the concentration at higher OOFRs, while the calculated theoretical cell loss rate assumed an even cell distribution in the channel. Higher input flow rates resulted in higher effectiveness at lower OOFRs, but also resulted in greater decreases in effectiveness at OOFR over  $500 \mu\text{L min}^{-1}$ . The standard deviation of the cell loss rate increased slightly with the cell loss rate to a maximum of  $1.79 \times 10^6$  cells  $\text{min}^{-1}$  at an inlet flow rate of  $1000 \mu\text{L min}^{-1}$ . The greatest standard deviation of the separation efficiency was 15%, while the largest deviation of the cell loss rate was  $1.8 \times 10^6$  cells  $\text{min}^{-1}$ .





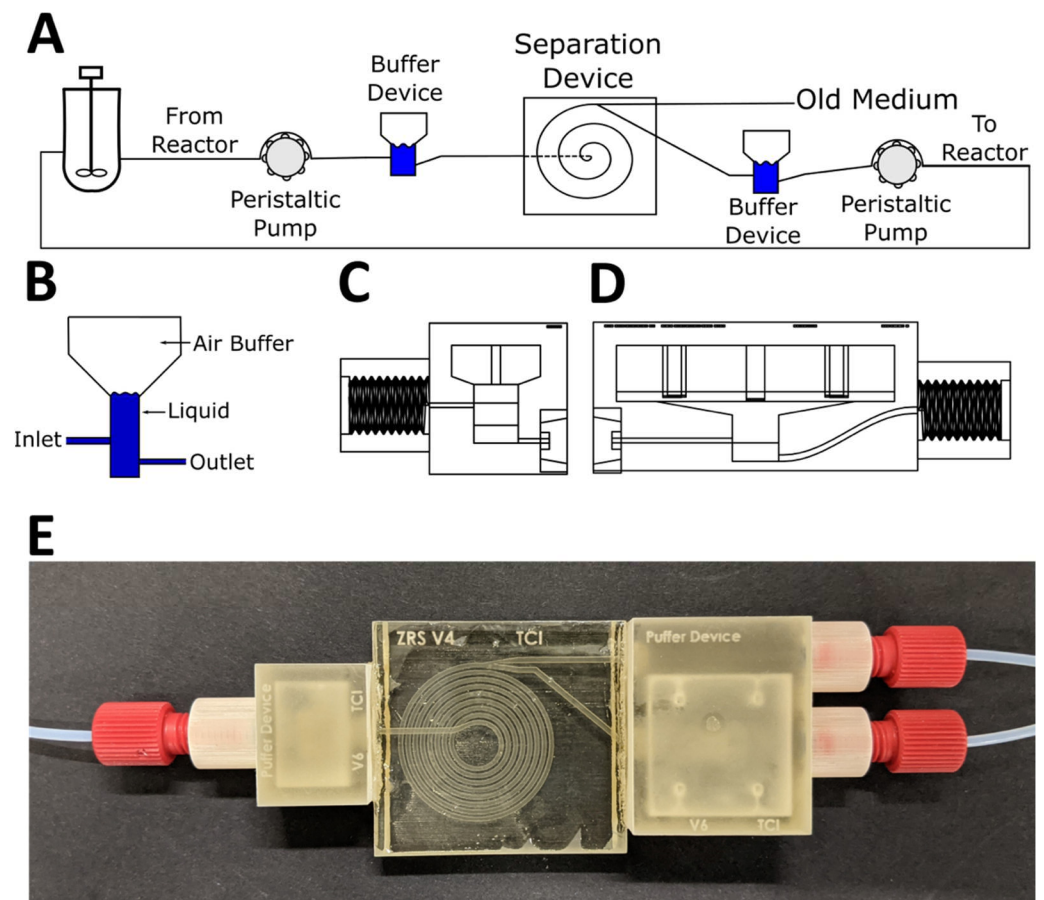
**Figure 4.** Cell loss rate and efficiency of the cell retention device at four different cell concentrations. Blue markers: inlet flow rate of  $500 \mu\text{L min}^{-1}$ ; orange markers:  $700 \mu\text{L min}^{-1}$ ; grey markers:  $1000 \mu\text{L min}^{-1}$ ; yellow markers:  $1300 \mu\text{L min}^{-1}$ . Error bars represent the standard deviation of three

biological replications. **(A1)** Cell loss rate ( $\times 10^6$  cells  $\text{min}^{-1}$ ) as a function of the outer outlet flow rate (OOFR;  $\text{mL min}^{-1}$ ) at different inlet flow rates with an inlet cell concentration of  $5 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . **(A2)** Separation efficiency as a function of the OOFR at different inlet flow rates with an inlet cell concentration of  $5 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . **(B1)** Cell loss rate ( $\times 10^6$  cells  $\text{min}^{-1}$ ) as a function of the OOFR at different inlet flow rates with an inlet cell concentration of  $10 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . **(B2)** Separation efficiency as a function of the OOFR at different inlet flow rates with an inlet cell concentration of  $10 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . **(C1)** Cell loss rate ( $\times 10^6$  cells  $\text{min}^{-1}$ ) as a function of the OOFR at different inlet flow rates with an inlet cell concentration of  $15 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . **(C2)** Separation efficiency as a function of the OOFR at different inlet flow rates with an inlet cell concentration of  $15 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . **(D1)** Cell loss rate ( $\times 10^6$  cells  $\text{min}^{-1}$ ) as a function of the OOFR at different inlet flow rates with an inlet cell concentration of  $20 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . **(D2)** Separation efficiency as a function of the OOFR at different inlet flow rates with an inlet cell concentration of  $20 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ .

At a concentration of  $20 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  (see Figure 4(D1,D2)) the cell loss rate almost increased linearly at lower input flow rates, but the increase was also steeper at higher input flow rates. The efficiency of the separation device dropped at lower OOFRs. At  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  input flow rate, the highest efficiency was 60% at  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  OOFR and dropped to just 5% at  $250 \mu\text{L min}^{-1}$  OOFR. This resulted in the cell loss rate rising linearly with OOFR at  $500 \mu\text{L min}^{-1}$ . Higher input flow rates showed a similar drop in efficiency as at  $15 \times 10^6$  cells  $\text{min}^{-1}$ . Only at  $1300 \mu\text{L min}^{-1}$  input flow rate was the efficiency still over 95% at an outlet flow rate of  $260 \mu\text{L min}^{-1}$ , which was also visible in the exponential increase of the cell loss rate with higher OOFR. Standard deviations were generally lower than at other inlet flow rates, with a maximum deviation of the efficiency of 18.5%.

In conclusion, the separation efficiency of the separator device could demonstrably be controlled by manipulating the inlet and/or outlet flow rate. This enabled the device to either be operated in a most effective state with almost complete cell retention (over 95% at  $20 \times 10^6$  cells  $\text{min}^{-1}$ ), or set to achieve a specific cell loss rate in order to facilitate steady cell concentrations within the bioreactor. However, the standard deviations of the biological replications were generally much greater than the instrument error (5%) of the CEDEX HiRes. Therefore, when using this system for cell concentration control in a bioreactor, the cell concentration has to be monitored to adjust the inlet and outlet flow rate to achieve the desired retention efficiency, especially when a higher cell loss rate and a lower retention efficiency is required.

The viability of the cells was determined using trypan blue staining in CEDEX HiRes. The cell viability after being pumped through the separation device was generally very similar to the viability prior to separation (above 98%). The viability of the very low cell concentration ("Old Medium" in the operational setup in Figure 5A) only began to decrease at very high separation efficiency rates ( $> 95\%$ ). This might be an artifact of the low cell concentration ( $1 \times 10^6$  cells  $\text{min}^{-1}$  and lower). Additionally, it is worth noting that these cells are discarded in the experimental setup. In an additional experiment with cells being pumped through the separation device and then cultivated for 48 h, trypan blue staining and LDH assays were performed. Cell viability was revealed to be 97.6% after 48 h with LDH activity of  $9.8 \text{ U mL}^{-1}$ . The reference culture showed similar values, with a viability of 98.8% and LDH activity of  $36.8 \text{ U mL}^{-1}$ .



**Figure 5.** (A) Example of an experimental setup with peristaltic pumps, buffer devices, and the cell separation device for use with a bioreactor. (B) Schematic side view of a buffer device, where the bottom part fills up with liquid while the trapped air works as a damper. (C) Side view of the smaller 1 mL buffer used behind the inlet pump with 1 mL air volume; flangeless fitting connector on the left, glue connection on the right side of the device. (D) Larger buffer device with a 5 mL air buffer used in front of the outlet pump; flangeless fitting connector at the right and glue connector at the left side of the device. Additional CAD views and dimensions are available in the Supplementary Information (Figure S2). (E) Top view of the 3D printed buffer devices and spiral separator fitted with PTFE tubes and flangeless fittings. The outer outlet channel (see “Old Medium” in (A)) is parallel to the outlet buffer device and not connected to the buffer itself. The spiral device was coated with nail polish to improve the translucency.

### 3.3. Buffer Devices to Eliminate Pulsation

The separation device described above was designed to be used in perfusion culture systems. This necessitates constant flow, in order to reduce the time cells spend in the separation system and tubing from and to the system and also to prevent cells from settling in the system and tubing. While in the separation experiments syringe pumps were used for their flow precision and low pulsation, these pumps cannot be used to achieve constant pumping. Therefore, peristaltic pumps were also explored.

Peristaltic pumps inherently create flow pulsations, due to their working principle. The previous results demonstrate that variations in flow rates have a great influence on separation efficiency. Accordingly, in an effort to lessen the pulsation effects created by peristaltic pumps, buffer devices—based on the idea of using plastic syringes as buffers and bubble traps described by Kang et al. [22]—were designed and printed. Similar pulsation dampeners are also available commercially (e.g., MasterFlex Pulse Dampener by Cole-Parmer, USA), but regrettably these lack size adaptability and are too large for use within microfluidic systems. Additionally, tubing is required to connect the devices,

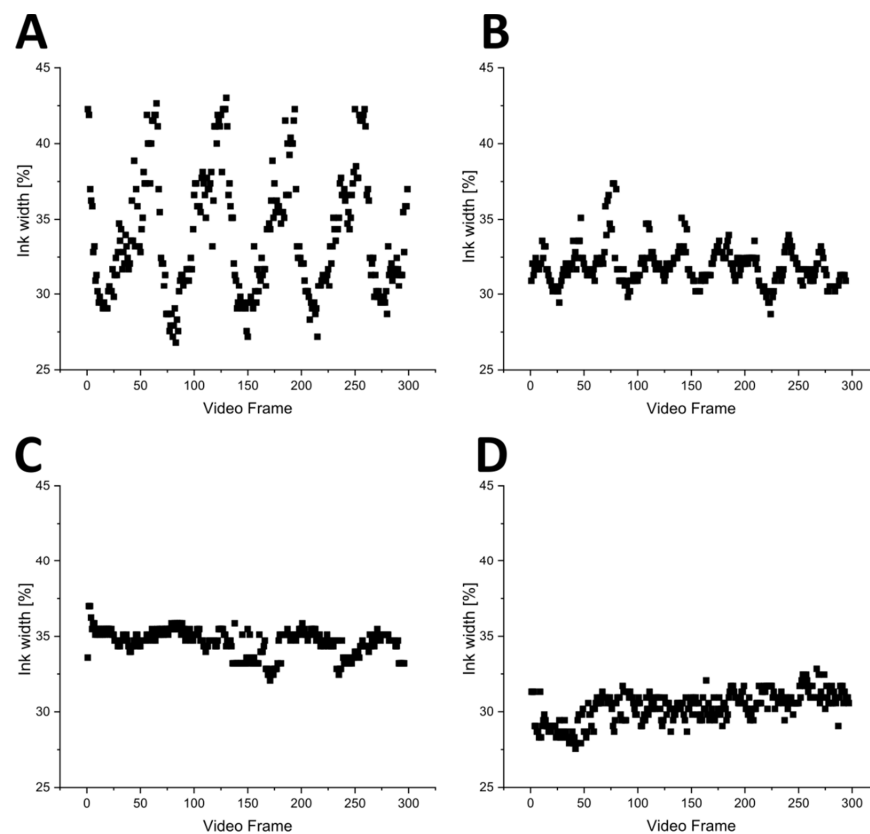
which increases the dead volume of the system and therefore the time spent in the system by CHO cells, where oxygen and nutrient supply is limited.

The air trapped inside the buffer volume of these buffer devices can be used to dampen the pulses of the peristaltic pumps: the air becomes pressurized when the buffer device is placed in front of the inlet of the separation spiral, because of the higher pressure in the spiral, and when placed behind the outlet of the spiral and in front of the second pump, the pump draws air out of the device and relative negative pressure is created inside the buffer device (which has the same dampening effect). The buffer devices used in this experiment were printed separately and glued to the spiral separator system, in order to keep it compact and limit the tubing required. The buffer devices and the resulting experimental setup is shown in Figure 5.

The effectiveness of these buffer devices was determined microscopically, by observing the flow of blue ink. An additional channel at the end of the spiral was used to add ink solution with a syringe pump, while water was pumped through the separation device. Twenty-second-long videos of the pulsating flow were then analyzed by determining the pixel brightness of the cross section at the end of the spiral of every frame in ImageJ. A brightness threshold of 163 was used to determine the width of the ink-filled area of the channel. A graphical representation of the analysis is shown in the Supplementary Information (Figure S3). The results are shown in Figure 6.

The results clearly illustrate the regular pulsation of the peristaltic pumps with the ink width pulsing between 27 and 44% without any pulsation devices (Figure 6A). With one pulsation device connected in front of the outlet peristaltic pump, the pulsation intensity was visibly minimized and the ink width pulses fell to between 29 and 37% (Figure 6B). When both pulsation devices were connected (one behind the inlet pump and the second in front of the outlet pump), no clear periodic pulses were visible in the data (see Figure 6C), and the ink width fell between 32 and 37%. Similarly, the reference experiment using syringe pumps instead of peristaltic pumps showed no clear pulsation, and the ink width similarly fell between 27 and 33% (Figure 6D). On the basis of these results, we conclude that the buffer devices were able to significantly reduce the pulsation induced by the peristaltic pumps. The slight difference in overall ink width between Figure 6C,D can perhaps be explained by a variation in flow rate, since the actual flow rate of the peristaltic pumps differs more from the set flow rate than the flow rate of syringe pumps.

Of particular note is the fact that the complete setup with buffer devices and separator spiral described herein did not leak even during extended use (up to 12 days with a constant flow rate of  $1 \text{ mL min}^{-1}$ )—while the aforementioned syringe design by Kang et al. [22] proved to be very unreliable, leaking from movement of the tubing and/or material wear after just a matter of hours. Additionally, by using acrylate glue (super glue) for assembly, the assembly of the system described herein requires only a few minutes. Due to the customized small buffer devices and direct connection of buffer devices and separator spiral, the dead volume within this system was calculated to be only 1.59 mL (in CAD software, considering the inlet buffer is filled completely, while only the bottom of the outlet device is filled, as observed).



**Figure 6.** (A) Ink width (%) in different video frames without pulsation devices. (B) Ink width (%) in different video frames with the outlet pulsation device attached. (C) Ink width (%) in different video frames with a pulsation device at the inlet and the outlet, respectively. (D) Ink width (%) in different video frames with syringe pumps for reference.

#### 4. Conclusions

This study presents a 3D printed cell separation device with optional additional 3D printed pulsation devices for use with peristaltic pumps. The experimental setup described herein allows the user to control the inlet and outlet flow rate in order to adjust the separation efficiency of the system during operation. The separation efficiency and cell loss rate were determined at four different cell concentrations ( $5, 10, 15,$  and  $20 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ), and at inlet flow rates of both  $500$  to  $1300 \mu\text{L min}^{-1}$ . Higher inlet flow rates led to an increased separation efficiency of over  $95\%$ , even at up to  $20 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  at outlet flow rates of up to  $260 \mu\text{L min}^{-1}$ . The separation device did not evidence any significant negative effect on cell viability. Additionally, pulsation buffer devices were also developed to enable the usage of peristaltic pumps within a continuous bioreactor setup. Effective dampening of the inherent pulsation created by peristaltic pumps was also successfully demonstrated, with results achieved that are comparable to those seen in systems using syringe pumps. All 3D printed parts can be easily connected, and allow for reliable connections to PTFE tubing with flangeless fittings. The complete device did not develop leaks even after 12 days of use, while the integration of dampening devices reduced the tube connections needed. Due to the use of 3D printing, modification of this design is readily achievable (e.g., for use at larger bioreactors or different tubing fixtures). In future experiments, the reliability of the system and controllability of the separation efficiency for longer cultivation periods up to multiple weeks must be proven. Then, this device or a similar design might allow the operator to set specific cell concentrations in perfusion culture cultivations, thereby optimizing the cell concentration to increase product yield more precisely. In additional experiments, the bioprocess can be optimized

by elongating the protein production phase due to cell retention and the control of the cell concentration in the bioreactor provided by this separation device.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/mi12091060/s1>, Figure S1: Analysis of the fluorescence microscope images, Figure S2: CAD views and inner dimensions of the 1 mL and 5 mL pulsation dampeners, Figure S3: Analysis of the microscopic images of the pulsation experiments, CAD files of pulsation dampeners.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.B., J.-A.P. and A.E.; methodology, J.-A.P. and A.E.; investigation, A.E.; data curation, A.E.; writing—original draft preparation, A.E.; writing—review and editing, A.E. and J.B.; visualization, A.E.; supervision, J.B.; project administration, J.B.; funding acquisition, J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by German Research Foundation (DFG) via the Emmy Noether Programme, grant number 346772917. The publication of this article was funded by the Open Access Fund of the Leibniz Universität Hannover.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are openly available in Research Data Repository of the Leibniz University of Hannover at <https://doi.org/10.25835/0098015> (accessed on 3 June 2021).

**Acknowledgments:** The authors like to thank Lena Schemmelmann and Phil-Oliver Thiel for their experimental support in design and validation of the separation spiral.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Ho, C.M.B.; Ng, S.H.; Li, H.; Yoon, Y.-J. 3D printed microfluidics for biological applications. *Lab Chip* **2015**, *15*, 3627–3637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mark, D.; Haeberle, S.; Roth, G.; Von Stetten, F.; Zengerle, R. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: Requirements, characteristics and applications. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1153–1182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Dittrich, P.S.; Manz, A. Lab-on-a-chip: Microfluidics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 210–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Azizipour, N.; Avazpour, R.; Rosenzweig, D.H.; Sawan, M.; Aiji, A. Evolution of Biochip Technology: A Review from Lab-on-a-Chip to Organ-on-a-Chip. *Micromachines* **2020**, *11*, 599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Liu, J.; Mosavati, B.; Oleinikov, A.V.; Du, E. Biosensors for Detection of Human Placental Pathologies: A Review of Emerging Technologies and Current Trends. *Transl. Res.* **2019**, *213*, 23–49. [[CrossRef](#)]
6. Mosavati, B.; Oleinikov, A.V.; Du, E. Development of an Organ-on-a-Chip-Device for Study of Placental Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8755. [[CrossRef](#)]
7. Bahnemann, J.; Enders, A.; Winkler, S. Microfluidic Systems and Organ (Human) on a Chip. In *Basic Concepts on 3D Cell Culture*, 1st ed.; Kasper, C., Egger, D., Lavrentieva, A., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2021; Volume 1, pp. 175–200.
8. Di Carlo, D. Inertial microfluidics. *Lab Chip* **2009**, *9*, 3038–3046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Gou, Y.; Jia, Y.; Wang, P.; Sun, C. Progress of Inertial Microfluidics in Principle and Application. *Sensors* **2018**, *18*, 1762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Nawaz, A.A.; Zhang, X.; Mao, X.; Rufo, J.; Lin, S.-C.S.; Guo, F.; Zhao, Y.; Lapsley, M.; Li, P.; McCoy, J.P.; et al. Sub-micrometer-precision, three-dimensional (3D) hydrodynamic focusing via “microfluidic drifting”. *Lab Chip* **2013**, *14*, 415–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Di Carlo, D.; Irimia, D.; Tompkins, R.G.; Toner, M. Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 18892–18897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Warkiani, M.E.; Khoo, B.L.; Wu, L.; Tay, A.K.P.; Bhagat, A.A.; Han, J.; Lim, C.T. Ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells from blood using spiral microfluidics. *Nat. Protoc.* **2015**, *11*, 134–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lee, W.C.; Bhagat, A.A.; Huang, S.; Van Vliet, K.J.; Han, J.; Lim, C.T. High-throughput cell cycle synchronization using inertial forces in spiral microchannels. *Lab Chip* **2011**, *11*, 1359–1367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Wang, Y.; Wang, J.; Cheng, J.; Zhang, Y.; Ding, G.; Wang, X.; Chen, M.; Kang, Y.; Pan, X. Serial Separation of Microalgae in a Microfluidic Chip Under Inertial and Dielectrophoretic Forces. *IEEE Sens. J.* **2020**, *20*, 14607–14616. [[CrossRef](#)]

15. Whitford, W.G. Single-Use Systems Support Continuous Bioprocessing by Perfusion Culture. In *Continuous Processing in Pharmaceutical Manufacturing*; Subramanian, G., Ed.; Wiley: Weinheim, Germany, 2014; pp. 183–226.
16. Croughan, M.S.; Konstantinov, K.B.; Cooney, C. The future of industrial bioprocessing: Batch or continuous? *Biotechnol. Bioeng.* **2015**, *112*, 648–651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Warkiani, M.E.; Tay, A.K.P.; Guan, G.; Han, J. Membrane-less microfiltration using inertial microfluidics. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, srep11018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kwon, T.; Prentice, H.; De Oliveira, J.; Madziva, N.; Warkiani, M.E.; Hamel, J.-F.P.; Han, J. Microfluidic Cell Retention Device for Perfusion of Mammalian Suspension Culture. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Wang, H.; Enders, A.; Preuss, J.-A.; Bahnemann, J.; Heisterkamp, A.; Torres-Mapa, M.L. 3D printed microfluidic lab-on-a-chip device for fiber-based dual beam optical manipulation. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 14584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Preuss, J.; Nguyen, G.N.; Berk, V.; Bahnemann, J. Miniaturized free-flow electrophoresis: Production, optimization, and application using 3D printing technology. *ELECTROPHORESIS* **2020**, *42*, 305–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Rawat, J.; Gadgil, M. Shear stress increases cytotoxicity and reduces transfection efficiency of liposomal gene delivery to CHO-S cells. *Cytotechnology* **2016**, *68*, 2529–2538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kang, Y.J.; Yeom, E.; Seo, E.; Lee, S.-J. Bubble-free and pulse-free fluid delivery into microfluidic devices. *Biomicrofluidics* **2014**, *8*, 014102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## Supplementary Information

# 3D Printed Microfluidic Spiral Separation Device for continuous, pulsation-free and controllable CHO Cell Retention

Anton Enders , John-Alexander Preuß and Janina Bahnemann

Figure S1 shows the analysis of the microscopic images of fluorescent beads in section 3.1.

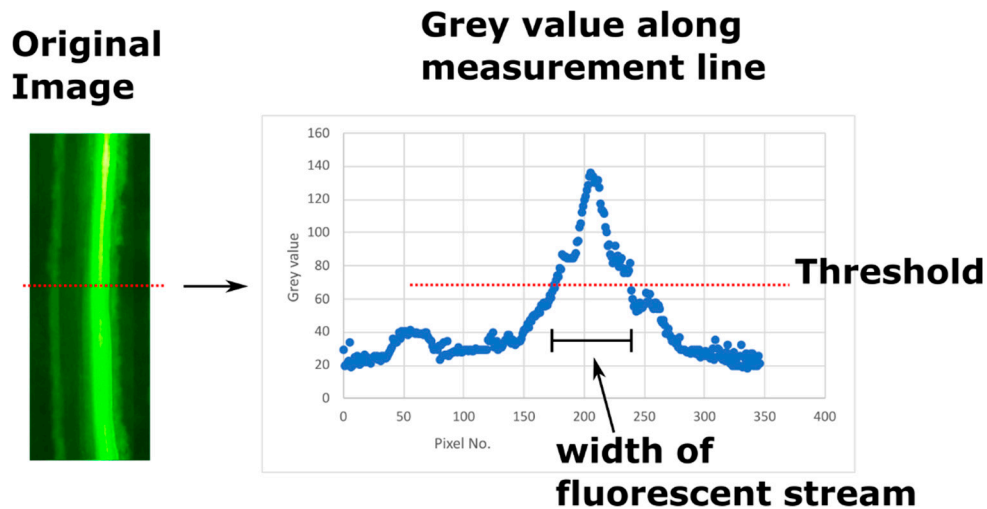


Figure S1: Analysis of the fluorescence microscope images. The analysis was performed in ImageJ by analysing the grey value (brightness) of each pixel along a measurement line. Grey values above a threshold of 71 were identified as bright fluorescent, which was the basis to determine the width of the fluorescent stream.



Figure S2 shows different views of the pulsation dampeners used in section 3.3.

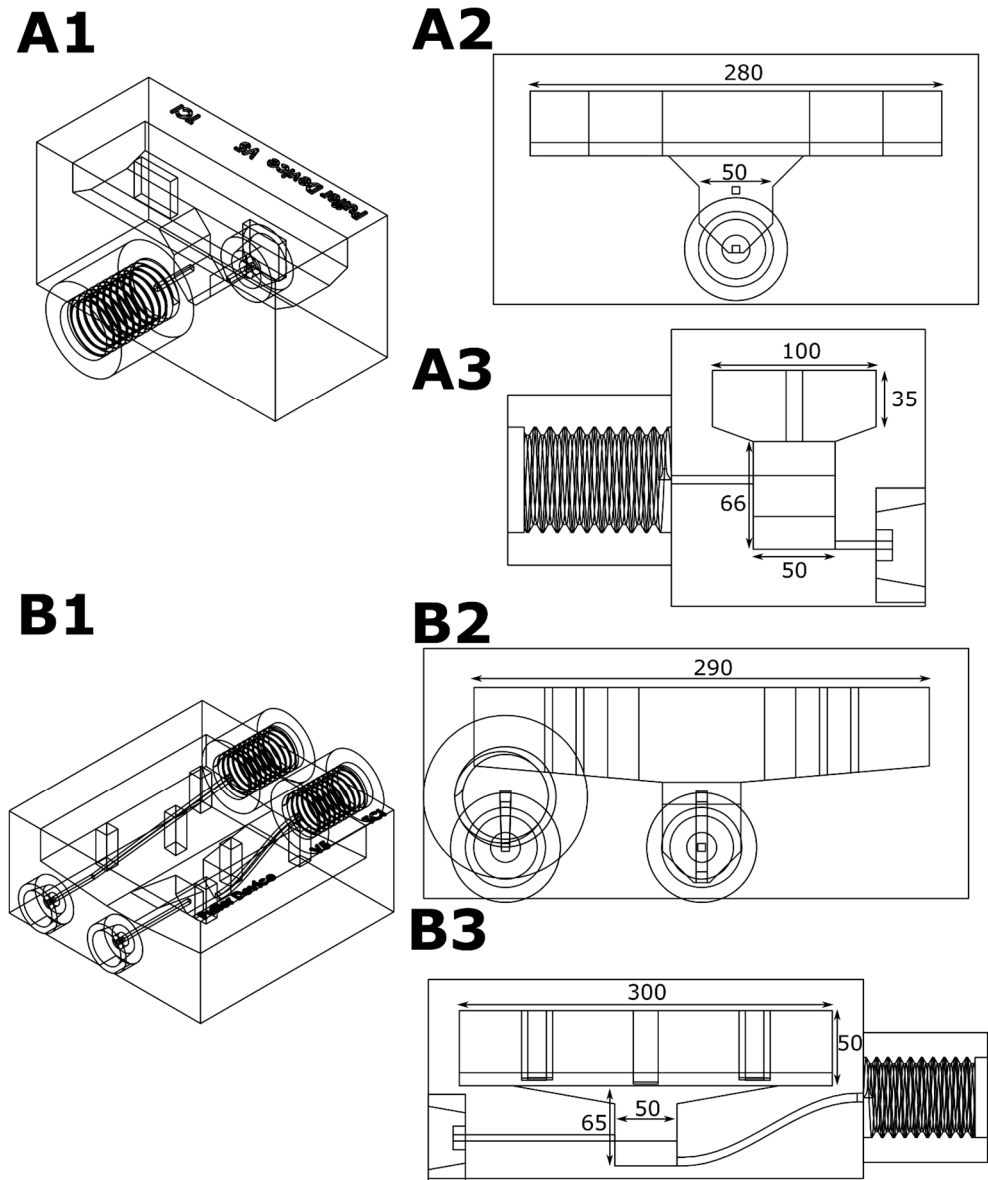


Figure S2: CAD views and inner dimensions of the 1 mL and 5 mL pulsation dampeners. All the dimensions are in micrometers ( $\mu\text{m}$ ). A1: 3D view of the 1 mL inlet pulsation dampener. To enhance structural integrity of the device, two columns are printed in the middle of the cavity. A2: Front view of the 1 mL dampener. A3: Side view of the dampener. B1: 3D view of the 5 mL outlet pulsation dampener. To enhance structural integrity of the device, six columns are printed in the cavity. B2: Front view of the dampener. B3: Side view of the dampener.

Figure S3 shows the analysis of the pulsation experiments from section 3.3.

**Original Image**

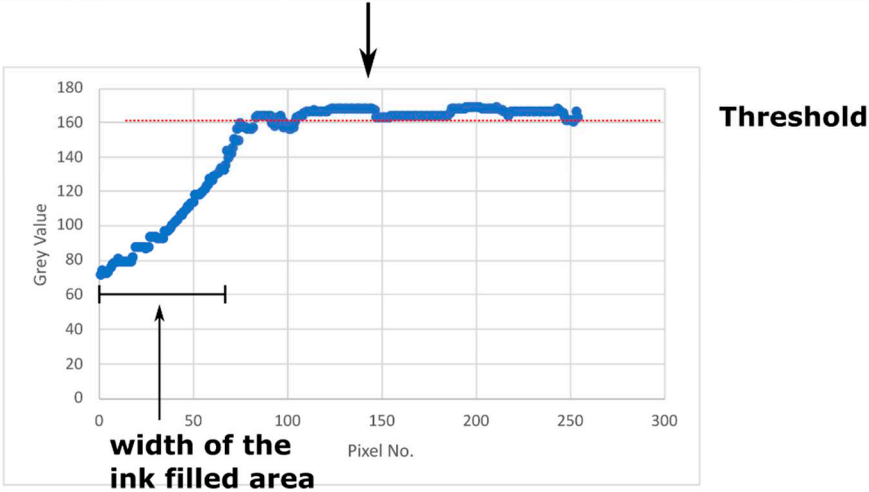
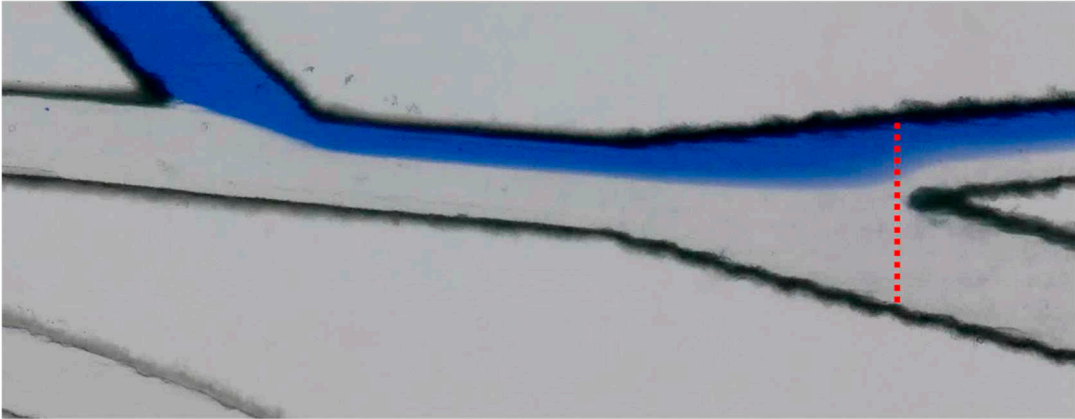


Figure S3: Analysis of the microscopic images of the pulsation experiments. Each frame of the 20 second long videos was analyzed using ImageJ by determining the grey value (brightness) of each pixel along the measurement line. A threshold of 160 was chosen to determine the bright part of the channel, while darker pixels indicated the ink filled part. Therefore, the width of the ink filled part was measured.

### 4.3 Entwicklung eines kontinuierlichen mikrofluidischen Systems zur transienten Transfektion von CHO-Zellen

In den vorigen Kapiteln wurde die Entwicklung der Mikromischer und einer Separationsspirale dargestellt, die im mikrofluidischen Transfektionssystem zum Einsatz kommen sollen. In diesem Kapitel wird die Entwicklung eines Batch-Transfektionssystems dargestellt, in dem die Transfektionseffizienz eines Mikromischers aus Kapitel 4.1 untersucht wird. Darauf basierend wurde das vollständige Transfektionssystem aus Mikromischer, Inkubationseinheit und Zellseparator entwickelt, welches die transiente Transfektion mittels PEI semi-kontinuierlich durchführen kann.

#### 4.3.1 Transiente Transfektion mittels Batch-Transfektionssystem

Die Untereinheiten zum Durchmischen und Separieren der Zellen wurden bereits in den vorigen Kapiteln untersucht. Um die Machbarkeit der Transfektion auf einem mikrofluidischen System zu demonstrieren, wurde zunächst nur die Durchmischung und Inkubation in einem Batch-System analysiert. Die Arbeiten wurden im Rahmen der Masterarbeit „Transiente Transfektion von Säugerzellen mittels mikrofluidischer Systeme“ von Michaela Dehne durchgeführt. Die Transfektion der CHO-K1-Zellen erfolgte mit 25 kDa linearem PEI. Es wurde der Vektor pEFP-N1 transfiziert, sodass die CHO-Zellen das grün fluoreszierende Protein (eGFP) produzieren. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt, bei der der Anteil der fluoreszierenden Zellen als transfizierte Zellen gezählt wurde. In der Arbeit wurde ein Vergleich zwischen der Transfektion nach dem herkömmlichen, manuell durchgeführten Laborprotokoll und im mikrofluidischen Batch-System gezogen. Zusätzlich wurde der Einfluss der Inkubationszeit auf die Transfektionseffizienz untersucht.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden die Zellen bei einer Zellkonzentration von  $20 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  mit  $64 \mu\text{g mL}^{-1}$  PEI und  $24 \mu\text{g mL}^{-1}$  DNA bei einem Volumenstrom von  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  in CHO-TF Medium transfiziert. Die Zellkonzentration und Viabilität der Zellen wurde während der Kultivierung vor und nach der Transfektion per computergesteuerter mikroskopischer Zellzählung und Trypanblaufärbung bestimmt.

Das Batch-Transfektionssystem bestand aus einer Spritzenpumpe, die die Zellsuspension, DNA und PEI-Lösung in einen HC-Mikromischer gepumpt hat. Das Transfektionsgemisch wurde aus dem Mischer in ein Auffanggefäß geleitet. Um die Agitation der Zellen während der unterschiedlichen Inkubationszeit zu gewährleisten, wurde das Gemisch nach der Durchmischung des gesamten Volumens wieder in die Spritze aufgezogen, wo sie mit einem Rührfisch durchgehend bewegt wurde. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 8 dargestellt.

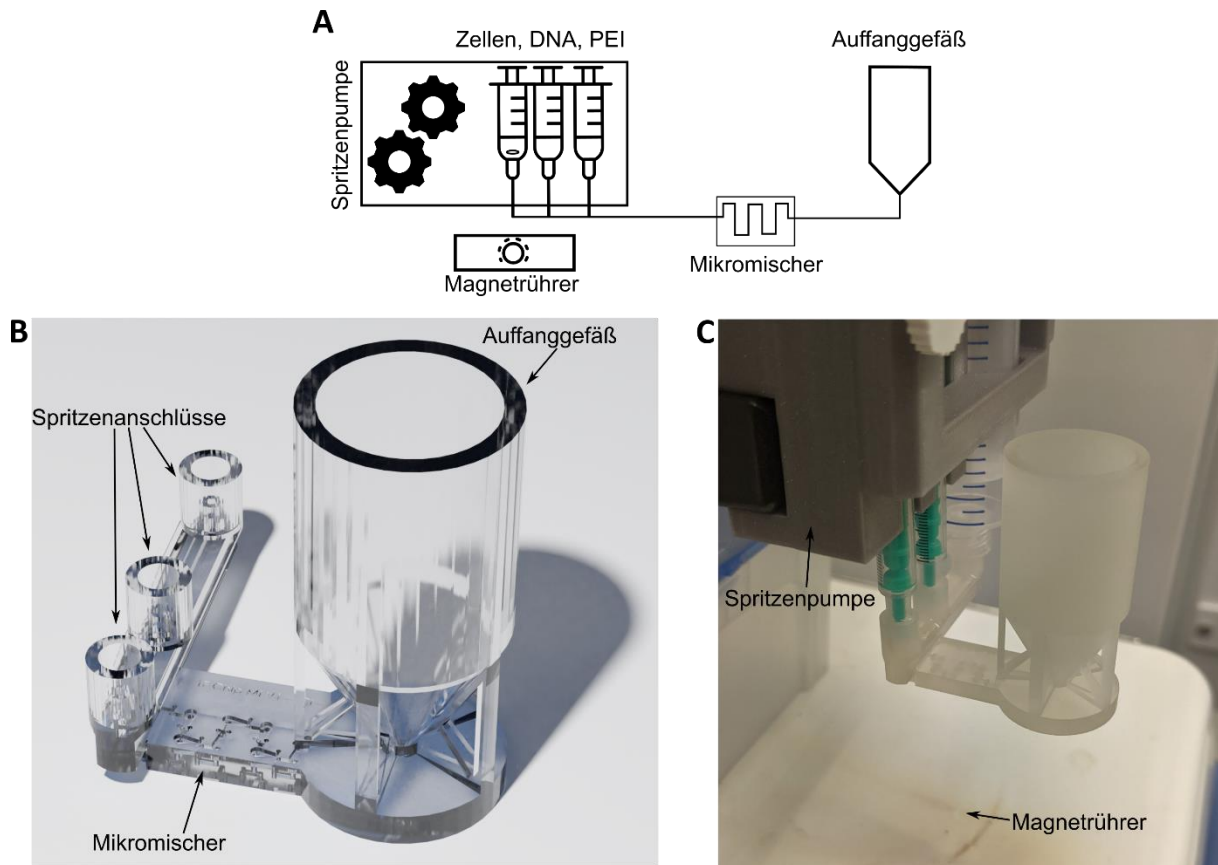


Abbildung 8: Aufbau des Batch-Transfektionssystems. A: Schematische Darstellung der Teile des Systems. B: 3D-Darstellung des gedruckten Systems. C: Foto des gedruckten Transfektionssystems.

Bei der manuellen Transfektion wurde zu der Zellsuspension in einem 15 mL Reaktionsgefäß zuerst die DNA- und dann die PEI-Lösung pipettiert und durch mehrfaches Invertieren durchmischt. Die Inkubation erfolgte auf einem Rotator, der das Reaktionsgefäß einmal pro Sekunde invertierte. Nach einer Inkubationszeit von 1-4 h wurde die Zellsuspension aus dem mikrofluidischen System bzw. dem Reaktionsgefäß in einen 125 mL Kultivierungskolben mit frischem Medium überführt, wobei eine Zellkonzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  eingestellt wurde.

Die ermittelte Transfektionseffizienz ist in Abbildung 9 gegen die Inkubationszeit aufgetragen.

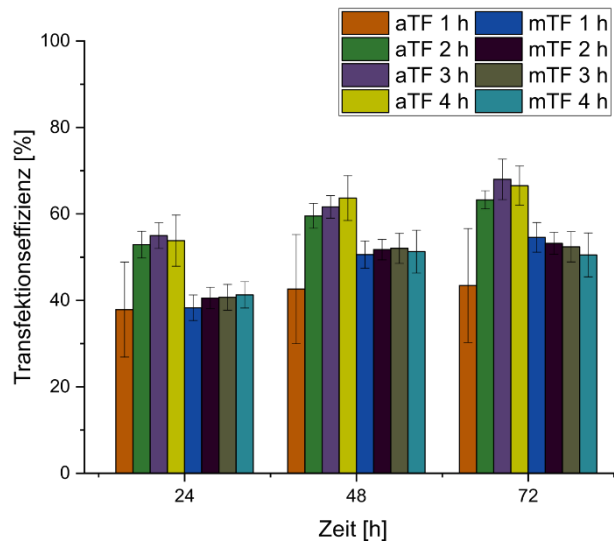


Abbildung 9: Transfektionseffizienz der Transfektion von CHO-K1 Zellen im mikrofluidischen Batch-System (aTF) und nach der herkömmlichen Labormethode (mTF) bei unterschiedlicher Inkubationszeit zwischen 1-4 h in Abhängigkeit zur Kultivierungszeit nach der Transfektion. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten.

Im Verlauf der Kultivierung nimmt die Transfektionseffizienz bei allen Proben zu. Zudem ist die Transfektionseffizienz der Proben der mikrofluidischen Transfektion mit 2-4 h Inkubationszeit ähnlich der Transfektionseffizienz der manuellen Transfektion nach 1-4 h Inkubationszeit. Die Transfektionseffizienz der mittels mikrofluidischem System transfizierten Zellen mit einer Inkubationszeit von 2-4 h liegen mit einem Maximum von ca. 68 % deutlich höher als die manuellen Transfektion mit einem Maximum von 54 %.

Zusätzlich wurde in der Arbeit festgestellt, dass die Viabilität der mittels mikrofluidischem System transfizierten Zellen (90-97 %) deutlich über der Viabilität der manuell transfizierten Zellen (70-80 %) liegt. Somit wurde demonstriert, dass die Polyplexbildung und anschließende Transfektion von CHO-Zellen mittels PEI im mikrofluidischen System möglich ist und im Vergleich zur klassischen Labormethode sogar bessere Transfektionsergebnisse erzielt werden konnten.

#### 4.3.2 Semi-kontinuierliches Transfektionssystem

Auf der Grundlage des Batch-Transfektionssystems wurde ein semi-kontinuierliches System konzipiert. In diesem System sollte zuerst die Vermischung von DNA, PEI und Zellsuspension im Mikromischer stattfinden, dann die Inkubation und anschließend die Separation der Zellen vom toxischen PEI im Spiralseparator automatisch gesteuert ablaufen.

Der Vermischungsschritt konnte mit dem im Batch-System verwendeten Mikromischer bereits kontinuierlich betrieben werden. Da die Inkubationszeit in den zuvor beschriebenen Experimenten ab ca. 2 h die höchste Transfektionseffizienz aufwies, war ein Durchfließen eines Kanals als Inkubationsschritt nicht möglich, da die Zellen sich entweder bei zu geringen Fließgeschwindigkeiten absetzen würden oder bei höheren Fließgeschwindigkeiten die nötige Kanallänge zu groß wäre. Daher wurde eine Inkubationseinheit entworfen, bei der die Inkubation in mehreren Gefäßen stattfindet. Somit

konnte eine geringe Varianz in der Inkubationszeit der Zellen gewährleistet werden, gleichzeitig war jedoch ein durchgehender Betrieb möglich. Um das Transfektionsgemisch auf die unterschiedlichen Inkubationsgefäße zu verteilen und wieder entnehmen zu können, wurden schaltbare 3/2-Wege-Magnetventile in das System integriert. Das letzte Element des Transfektionssystems, der Spiralseparator, war ohne Veränderungen kontinuierlich betreibbar. In Abbildung 10 ist das Transfektionssystem schematisch dargestellt.

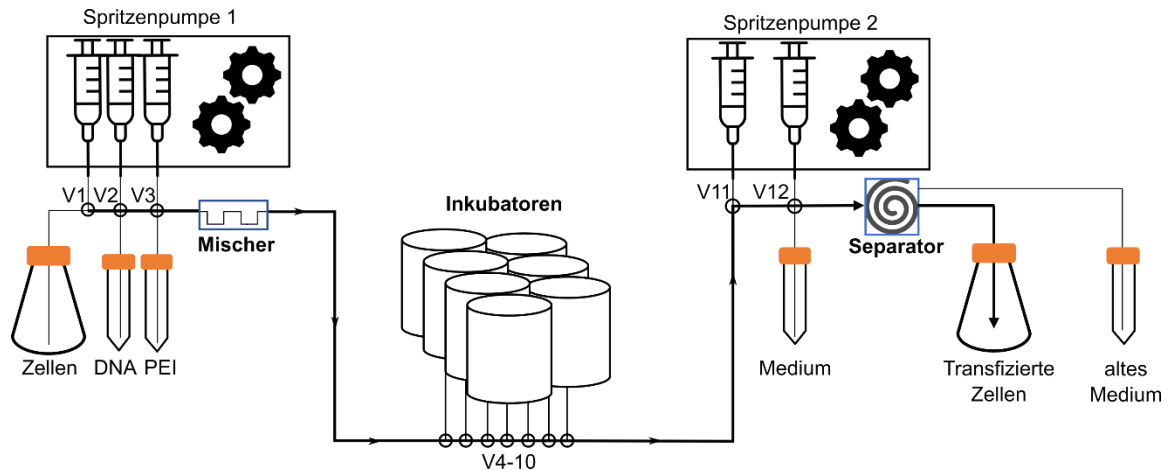


Abbildung 10: Schematische Darstellung des automatisierten Transfektionssystems.

Dem Konzept nach wurde die Zellsuspension von Spritzenpumpe 1 zusammen mit der PEI-Lösung und DNA durch den Mikromischer in ein Inkubationsgefäß gepumpt. Nach 2 h Inkubationszeit wurde das Transfektionsgemisch aus dem Inkubationsgefäß mit Spritzenpumpe 2 aufgezogen und anschließend durch den Spiralseparator gepumpt, in dem die transfizierten Zellen aufkonzentriert und dadurch vom alten Medium mit dem toxischen PEI getrennt wurden. Die transfizierten Zellen wurden am Ende in einem Kolben mit frischem Medium aufgefangen. Die automatisierte Steuerung der Pumpen und Ventile ist im Anhang im Kapitel 6.2.4 detailliert beschrieben. Zusätzlich ist in Kapitel 6.2.4 in Abbildung 17 ein weiterer, detaillierterer Schaltplan abgebildet.

Der Zweck der Inkubationsgefäße ist es, das Absetzen der Zellen zu verhindern und somit die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff durch das Medium zu ermöglichen. Aus vorigen Versuchen war bekannt, dass sich CHO-Zellen ohne Agitation bereits nach wenigen Minuten absetzen. Die entworfenen Inkubationsgefäße (siehe Abbildung 11 A) wurden zur Evaluation der Durchmischung mit 5 mL Zellsuspension ( $12 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) gefüllt und auf einem Schüttler bei 125 rpm für 30 Minuten platziert. Dann wurden Proben aus dem oberen Teil des Gefäßes (ca. 1 cm unter der Flüssigkeitsgrenze) und nahe dem Boden des Inkubators mit einer Pipette entnommen und die Zellkonzentration mit einem automatisierten Zellzählgerät bestimmt. Die Zellkonzentration im oberen Teil betrug  $12,4 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  und im unteren Teil  $12,2 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ . Daher kann geschlussfolgert werden, dass die Agitation in den Inkubationsgefäßen ausreicht, um das Absetzen der Zellen zu verhindern.

Auf der Basis des Konzeptes für das Transfektionssystem wurden die drei mikrofluidischen Teile des Systems – Mikromischer, Inkubationseinheit und Separator – mit CAD Software geplant und mittels Multijet 3D-Druck hergestellt. Die Komponenten sind in Abbildung 11 dargestellt.

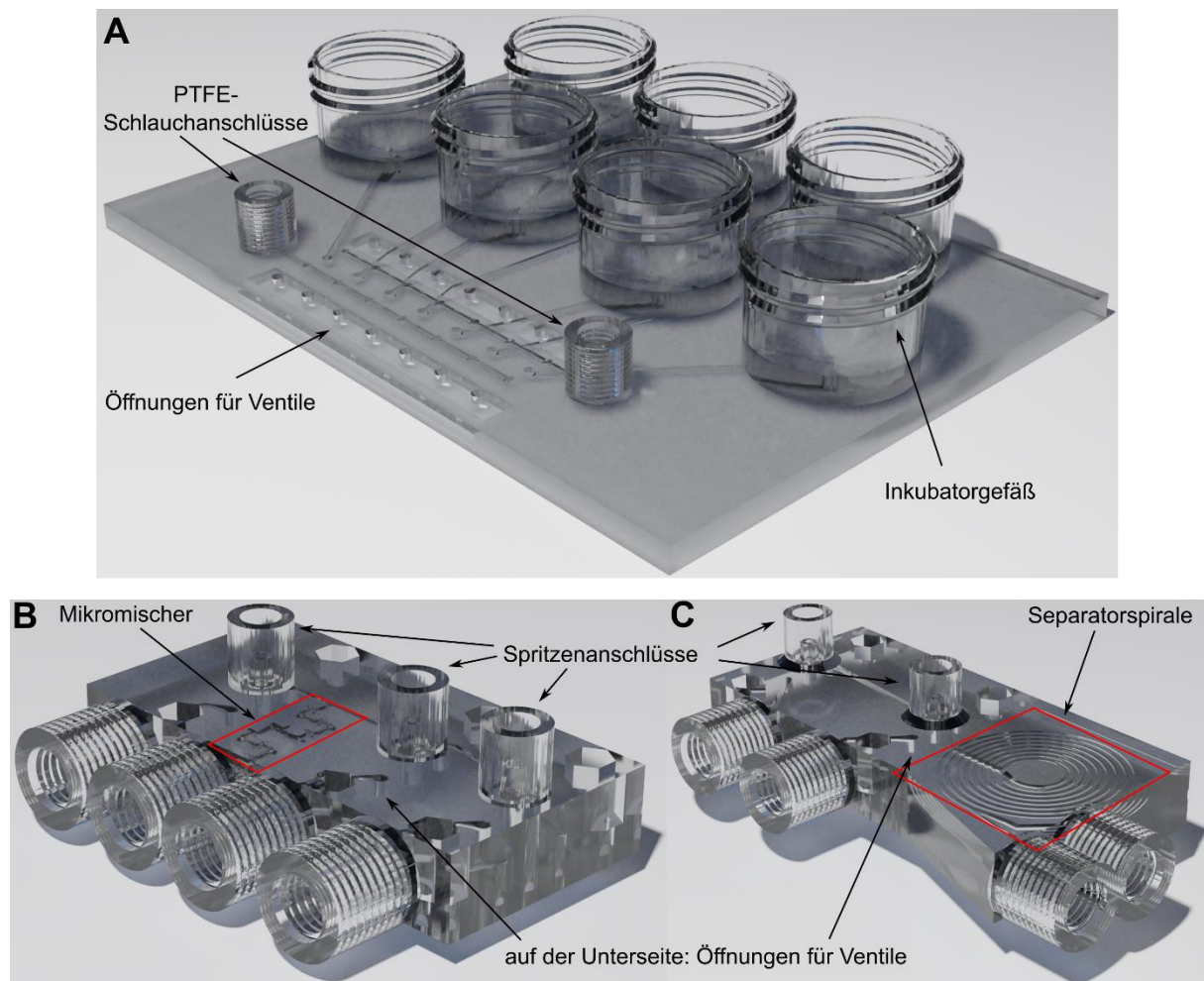


Abbildung 11: CAD Darstellungen der Komponenten des Transfektionssystems. A: Inkubationseinheit, B: Mischereinheit, C: Separationseinheit. Alle Komponenten werden mit PTFE-Schläuchen miteinander und mit Reservoirs bzw. Kultivierungskolben verbunden.

Die Komponenten des Gesamtsystems sind mit PTFE-Schläuchen, wie sie auch bei HPLC-Anwendungen zum Einsatz kommen, verbunden. Diese bieten durch den Schlauchdurchmesser von 0,7 mm ein geringes Totvolumen und können mittels Gewindeverbindungen direkt an den 3D-gedruckten Teilen befestigt werden. Außerdem ermöglicht die Verbindung, dass die Inkubationseinheit auf einem Schüttler angebracht werden kann. Das fertige System ist in Abbildung 12 dargestellt.

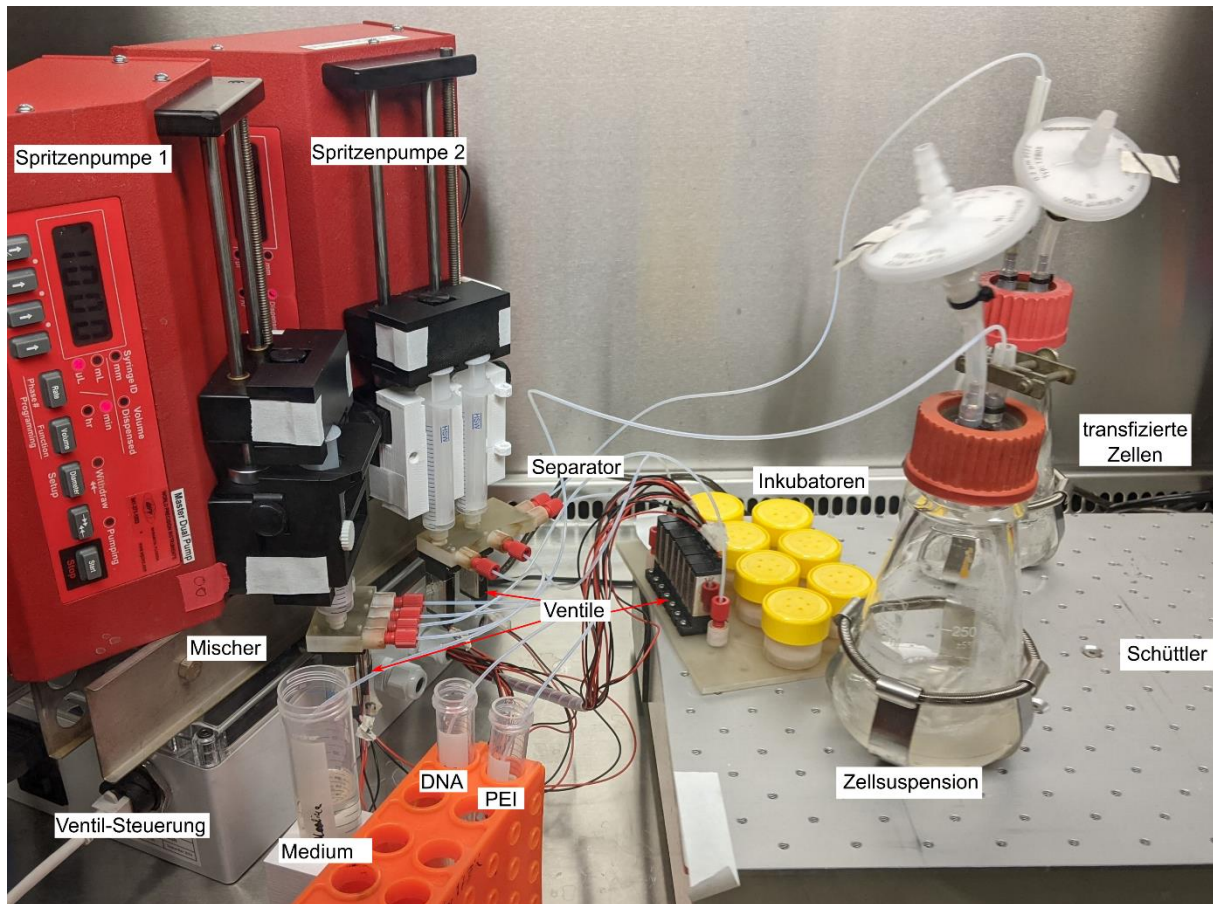


Abbildung 12: Foto des aufgebauten Gesamtsystems in einer Sterilbank.

Wie bereits in Kapitel 4.3.1 beschrieben, wurden transiente Transfektionen von CHO-K1-Zellen mittels PEI mit dem semi-kontinuierlichen System durchgeführt. Nach der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz, Zellkonzentration und Viabilität überwacht.

Die Transfektionseffizienz der durchgeführten Transfektionen im semi-kontinuierlichen System, der Verlauf der Zellkonzentration und die Viabilität sind in Abbildung 13 dargestellt. Um den Einfluss der einzelnen Komponenten beurteilen zu können, wurde zusätzlich zur Probenahme nach dem Durchlaufen des Gesamtsystems (Mischer, Inkubator und Separator) auch direkt aus den Inkubatoren Proben nach einer Inkubationszeit von 2 h entnommen.



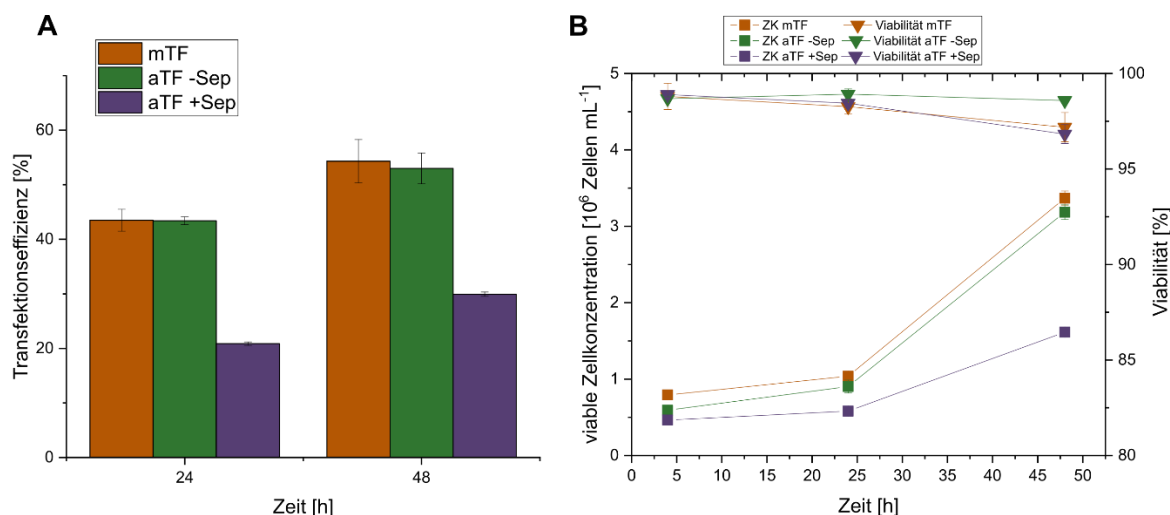


Abbildung 13: Ergebnisse der Transfektion von CHO-Zellen nach der herkömmlichen manuellen Labormethode (mTF), mittels mikrofluidischem System ohne Separation (aTF -Sep) und mit Separation (aTF +Sep). A: Transfektionseffizienz. B: Viable Zellkonzentration (ZK) (Quadrate in B) und Viabilität (Dreiecke in B).

Die Transfektionseffizienz betrug bei der manuellen Transfektion nach 48 h 54,3 %, bei der Transfektion im mikrofluidischen System in der Probe nach der Inkubation betrug sie 53 %. Nach dem Durchlaufen des Separators wurde lediglich eine Effizienz von 29,9 % gemessen. Auch im Verlauf der viablen Zellkonzentration zeigen sich Unterschiede zwischen den Proben: Während die Zellen nach der manuellen Transfektion und der Transfektion im System ohne Separation einen ähnlichen Wachstumsverlauf zeigen, so vermehren sich die Zellen nach der Separation von  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen mL<sup>-1</sup> nach 4 h auf  $0,58 \cdot 10^6$  Zellen mL<sup>-1</sup> nach 24 h und nur  $1,61 \cdot 10^6$  Zellen mL<sup>-1</sup>. Dies weist auf erhöhten Zellstress bei den Zellen, die den Separator durchlaufen haben, hin. Daher wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, um den Einfluss der einzelnen Komponenten des mikrofluidischen Systems auf die Zellviabilität zu untersuchen.

Für diese Untersuchung wurden nur Zellen (ohne DNA und PEI) durch das Transfektionssystem gepumpt und nach jedem Element (Mischer, Inkubator und Separator) Proben entnommen und für weitere 48 h kultiviert. Es wurde dabei die Verdopplungszeit, die Viabilität und die Lactatdehydrogenase-(LDH) Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

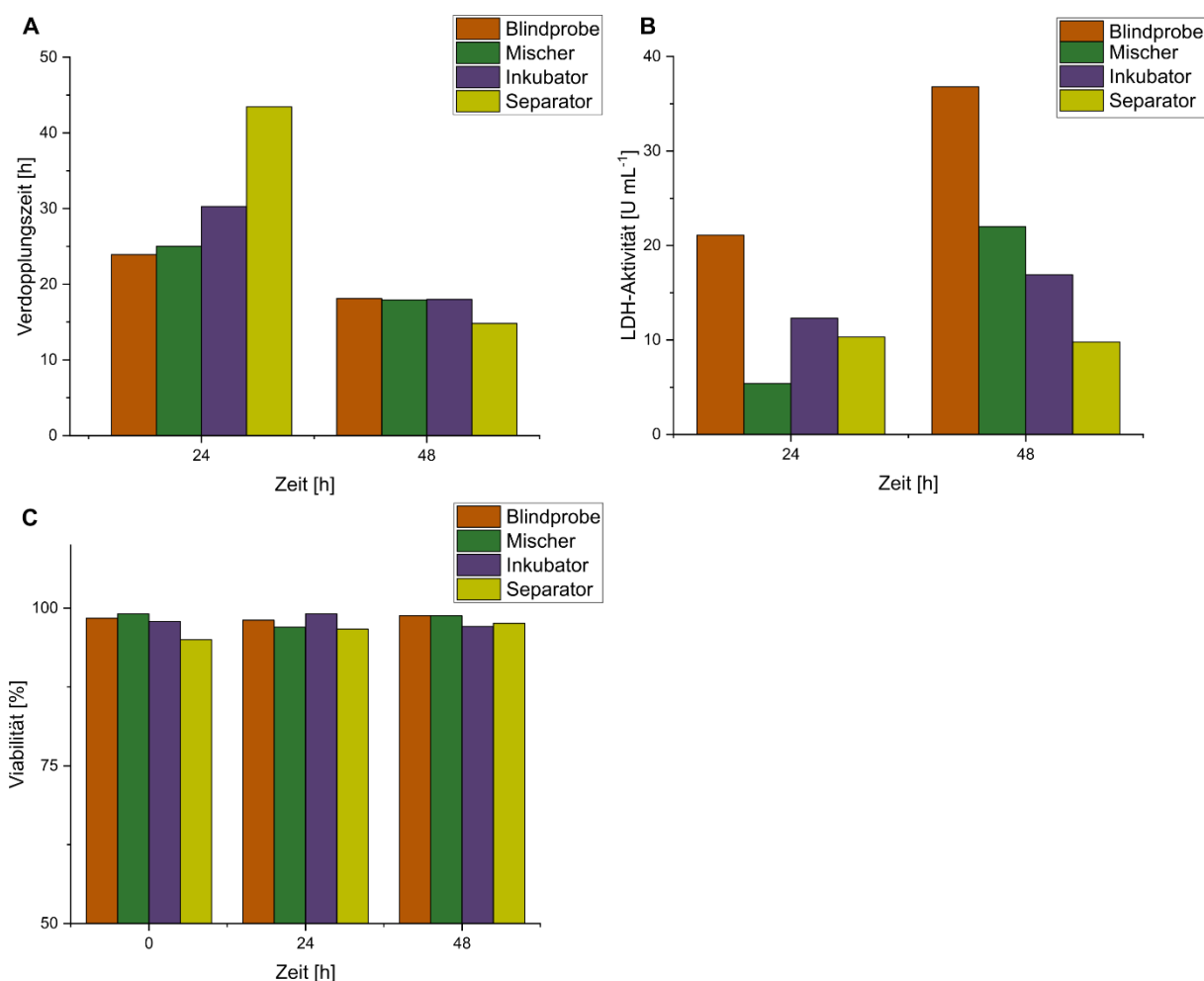


Abbildung 14: A: Verdopplungszeit, B: LDH-Aktivität und C: Viabilität der Zellen nach dem Durchlaufen unterschiedlicher Elemente des Transfektionssystems sowie einer Vergleichskultur (Blindprobe) nach einer weiteren Kultivierung für bis zu 48 h.

Während die Viabilität der Zellen sowie die LDH-Aktivität nicht auf einen erhöhten Zellstress durch die einzelnen Elemente des Transfektionssystems hinweisen, so ist die Verdopplungszeit in den ersten 24 h bei den Zellen, die das gesamte System (Mischer, Inkubator und Separator) durchliefen, im Vergleich zur Blindprobe erhöht. Allerdings ist bereits nach 48 h die Verdopplungszeit dieser Kultur etwas niedriger als die der anderen Proben. Eine eindeutige Schlussfolgerung ist hierdurch nicht abzuleiten. Die niedrigere Transfektionseffizienz beim Durchlaufen des Separators ist also nicht allein durch das Durchlaufen des Systems zu erklären. Die Kombination aus dem Stress der Zellen durch das Transfektionsmittel PEI und dem Durchlaufen der Separationsspirale inklusive der Schläuche und Ventile könnte allerdings weiterhin einen erhöhten Zellstress auslösen, der in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen wurde. Es wäre denkbar, dass die Zellmembran durch das Transfektionsmittel instabiler wird, wodurch der Stress durch den hohen Druck und die auf die Zelle wirkenden Kräfte im Kanal der Separationsspirale zu Schädigungen der Zellen führt.

Insgesamt ist es gelungen, ein automatisiertes mikrofluidisches System zur transienten Transfektion von CHO-Zellen zu entwickeln und eine erfolgreiche Transfektion zu demonstrieren. Durch die Verteilung der transfizierten Zellen auf mehrere Inkubatoren ist ein semi-kontinuierlicher Betrieb möglich. Da die

Pumpen- und Ventilsteuerung mit einem Computer automatisiert gesteuert wird, ist bis auf die Vorbereitung der PEI, DNA- und Zellsuspension kein weiterer manueller Schritt nötig.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Doktorarbeit war es, mikrofluidische Systeme für den Einsatz in der Zellkulturtechnik zu entwickeln und mittels 3D-Druck herzustellen. Hierbei wurde die Entwicklung auf ein mikrofluidisches System für die Transfektion von CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen konzentriert, welches ermöglichen sollte, kleine Proteinmengen flexibel herzustellen. Durch die Verwendung des Systems soll der manuelle Arbeitsaufwand verringert werden und gleichzeitig durch die Automatisierung Fehlerquellen und Abweichungen in der Durchführung der Transfektion verhindert werden. Als Transfektionsmittel wurde PEI (Polyethylenimin) gewählt, da es eine hohe Transfektionseffizienz bei gleichzeitig niedrigen Kosten bietet. Um die Methodik der transienten Transfektion umzusetzen, wurden drei Schritte in mikrofluidischen Elementen des Systems umgesetzt: Mischen, Inkubation und Separation.

Im ersten Teil (siehe Kapitel 4.1) wurden fünf verschiedene passive Mikromischer aus der Literatur für den 3D-Druck auf eine vergleichbare Kanalgröße adaptiert und miteinander verglichen: Der T-Mischer, der Tesla-like-Mischer, der F-Mischer, der *enhanced*-F-Mischer und der HC-Mischer. Die Effektivität der unterschiedlichen Designs wurde sowohl mit Simulationen mit der Finite-Elemente-Methode (in der Software COMSOL Multiphysics®) als auch mit praktischen Mischuntersuchungen bestimmt. Es wurden Flussraten zwischen  $100 \mu\text{L min}^{-1}$  und  $1000 \mu\text{L min}^{-1}$  untersucht (entspricht  $Re = 3,7$  bis  $Re = 37$  in der standardisierten MischergroÙe). Während die Durchmischung im T-Mischer bei solch geringen Reynoldszahlen lediglich durch die Diffusion stattfindet, zeigen der F-Mischer und der *enhanced*-F-Mischer ähnliche verbesserte Mischeigenschaften. Der Tesla-like-Mischer ist den drei vorigen Mixern nochmals deutlich überlegen und kann bei einem sehr viel geringeren internen Volumen für eine vollständige Durchmischung sorgen, sodass bereits nach 0,78 s ein homogenes Gemisch vorlag. Allerdings ist die Mischeffektivität sehr stark von der Flussrate abhängig, sodass bei geringeren Flussraten (unter  $Re = 18,5$ ) keine vollständige Durchmischung mehr stattfand. Der HC-Mischer konnte im Gegensatz dazu bei allen untersuchten Flussraten für eine vollständige Durchmischung sorgen und war auch bei höheren Flussraten mit einer vollständigen Durchmischung nach 0,98 s mit dem Tesla-like-Mischer vergleichbar. Durch den Vergleich der Mischer konnte für das Transfektionssystem der geeignete Mischer gefunden werden. Aber auch in anderen mikrofluidischen Systemen z.B. für die Erzeugung von Hydrogelen und in Aptamer-basierten Biosensoren kam der HC-Mischer auf Basis dieser Untersuchung bereits zum Einsatz [89; 90].

Im zweiten Teil wurde für die Separation der Zellen vom Transfektionsmedium ein 3D-gedruckter Spiralseparator entwickelt (siehe Kapitel 4.2). Dadurch sollen die Zellen nach einer festgelegten Inkubationszeit von dem toxischen Transfektionsmittel PEI getrennt werden. Der entwickelte Spiralseparator kann durch den Einsatz von zwei Pumpen – eine am Separator-Eingang und eine an einem der zwei Ausgänge – präzise eingestellt werden, um eine gewünschte Separationseffizienz zu erreichen. In einem ersten Versuch wurde die Fokussierung innerhalb der Separationsspirale mittels

fluoreszierender Partikel sichtbar gemacht. Um die Separationseffizienz für die Anwendung mit CHO-Zellen zu charakterisieren, wurden Zellsuspensionen mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen bei verschiedenen Eingangsflussraten untersucht. Generell nahm die Separationseffizienz, also der Anteil der durch die Spirale in einem Ausgang fokussierten Zellen, mit höherer Zellkonzentration und geringerer Eingangsflussrate ab. Zusätzlich nahm die Separationseffizienz mit steigender Ausgangsflussrate am äußeren Ausgang ab. Hierdurch konnte demonstriert werden, dass die Einstellung der Ausgangsflussraten die Separationseffizienz direkt beeinflussen kann. Auch bei der höchsten Zellkonzentration ( $20 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) konnte eine Separationseffizienz von über 95 % erreicht werden.

Um den Einsatz der Separationsspirale als Zellrückhaltesystem bei Kultivierungen zu ermöglichen, wurden Pulsationspuffer entwickelt und zusammen mit der Separationsspirale in einem kompakten System integriert. Dadurch können auch herkömmliche kontinuierlich betriebene Peristaltikpumpen eingesetzt werden, die durch Pulsationen im Fluss die Separation beeinflussen würden. Das Verstellen der Ausgangsflussrate durch die zweite Pumpe ermöglicht zudem eine direkte Kontrolle der Zellkonzentration im Reaktor, da bei Bedarf durch die Herabsetzung der Separationseffizienz eine bestimmte Zellzahl ausgetragen werden kann.

Im dritten Teil wurde ein erstes Transfektionssystem entwickelt, das ca. 5 mL Zellsuspension ( $20 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) im HC-Mikromischer mit PEI und DNA vermischt und dann für eine bestimmte Zeit in einer Spritze inkubiert (siehe Kapitel 4.3.2). Die Inkubationszeit wurde zwischen 1-4 h variiert und die Transfektion im mikrofluidischen System mit manuell durchgeführten Transfektionen nach Standard-Laborprotokoll verglichen. Hierfür wurde die genetische Information für das *enhanced green fluorescent protein (eGFP)* in die CHO-Zellen eingebracht und die Zellen mittels Durchflusszytometrie bis zu 72 h nach der Transfektion analysiert. Durch die Messung der Fluoreszenzintensität konnten somit direkt die Zellen nachgewiesen werden, die das *eGFP* exprimieren. Der Anteil der lebenden eGFP-produzierenden Zellen an der Gesamtheit der lebenden Zellen wurde daraufhin als Transfektionseffizienz definiert. In diesen Versuchen wurde nachgewiesen, dass die Transfektionseffizienz bereits nach einer Inkubationszeit von 2 h beinahe das Maximum erreicht. Zusätzlich konnte im Vergleich der beiden Transfektionsmethoden eine erhöhte Transfektionseffizienz von 68 % (72 h nach der Transfektion) im mikrofluidischen System gegenüber 54 % nach der manuellen Vorgehensweise erreicht werden.

Auf Grundlage dieses Batch-Transfektionssystems wurde ein semi-kontinuierliches System entworfen. Hierfür wurde eine neue Inkubationseinheit entwickelt. Um die zuvor ermittelte Inkubationszeit von 2 h für alle transfizierten Zellen zu gewährleisten, wurden nacheinander mehrere Inkubationsgefäße mit Ventilen angesteuert, in denen jeweils 5 mL der Zellsuspension für 2 h verweilen.

Das semi-kontinuierliche System wurde daraufhin aus den einzeln entworfenen und getesteten Komponenten zusammengebaut: Der Mikromischereinheit, der Inkubationseinheit und der

Separationseinheit. Magnetventile wurden eingesetzt, um zwischen dem Aufziehen und Abgeben der Zellsuspension, DNA und PEI-Lösungen zu wechseln sowie um die Inkubationsgefäße auf der Inkubationseinheit auszuwählen. Die Flüssigkeiten wurden mit einer Spritzenpumpe an der Mikromischereinheit, einer zweiten Spritzenpumpe an der Separationseinheit und einer Peristaltikpumpe hinter der Separationsspirale zur Kontrolle der Ausgangsgeschwindigkeit bewegt. Die Steuerung der Pumpen und Ventile erfolgte automatisiert über einen Computer.

In Transfektionsversuchen mit dem semi-kontinuierlichen System wurden sowohl aus den Inkubationsgefäßen als auch nach der Separation in der Separationsspirale Proben entnommen, um die Transfektionseffizienz im System genauer nachzuvollziehen. Dabei konnte eine Transfektionseffizienz von 54 % erreicht werden, was vergleichbar mit der zur Kontrolle durchgeführten manuellen Transfektion ist. Bei den Proben nach der Separation wurde hingegen nur eine Effizienz von 29,9 % erreicht. Daraufhin wurde der Einfluss der Separationsspirale auf die Zellviabilität und das Zellwachstum untersucht. Hierbei konnten allerdings keine eindeutigen negativen Effekte nachgewiesen werden, die den starken Unterschied der Transfektionseffizienzen aufgrund von Zellstress nachweisen würden.

In zukünftigen Versuchen sollte untersucht werden, ob die Variation von PEI-, DNA- oder Zellkonzentration die Transfektionsergebnisse positiv beeinflussen kann. Bisherige Optimierungen und damit entwickelte Methoden aus der Literatur beziehen sich lediglich auf die manuelle Transfektion, der Einfluss der Vermischung im Mikromischer wurde hingegen noch nicht genauer untersucht. Zusätzlich wäre hierbei die Untersuchung der Flussrate bedeutend, da die Komplexbildung der PEI-DNA-Komplexe im Mikromischer von ebendieser beeinflusst werden könnte.

Des Weiteren kann die Adaption des Systems für den Einsatz in einem Laborinkubator Vorteile bei der Transfektion, aber auch bei der Anwendung haben. Die in dieser Arbeit entworfenen Inkubationsgefäße können mit Deckeln mit integrierten Membranen verschlossen werden, sodass nur geringere Modifikationen im Schlauchsystem nötig sind. Beim Betrieb in einem Laborinkubator ist zum einen die Kultivierungstemperatur von 37 °C garantiert, wodurch ein positiver Einfluss auf die Zellviabilität möglich wäre, zum anderen eröffnen sich damit Möglichkeiten für einen längeren Einsatz des Systems für größere Transfektionsvolumina oder für eine mehrfache Retransfektion der gleichen Zellsuspension. Außerdem sollte untersucht werden, ob in dem Transfektionssystem auch andere Suspensionzelllinien, wie beispielsweise HEK-(*human embryonic kidney*) Zellen transfiziert werden könnten, die häufig zur Transfektion und Proteinproduktion eingesetzt werden. Das Transfektionssystem erlaubt hierbei auch den Einsatz in kontinuierlichen Produktionsprozessen. Auch ein Prozess mit verschiedenen Proteinprodukten, beispielsweise zum Screening mehrerer Biopharmazeutika-Kandidaten, wäre möglich, da das hier entwickelte System einen einfachen Wechsel des DNA-Vektors ermöglicht.

Neben dem Transfektionssystem kann die Separationsspirale mit Pulsationspuffern auch als Zellrückhaltesystem bei Kultivierungen eingesetzt werden. Hier liegt vor allem der Vorteil, dass die

Zellen kontinuierlich entnommen werden können. Zusätzlich hat die Zellrückhaltung mittels eines Filters den Nachteil, dass dieser nach einer gewissen Zeit verblockt, welches bei der Separationsspirale nicht der Fall ist. In zukünftigen Versuchen bietet es sich an den Langzeiteinsatz der Spirale zu überprüfen und die Möglichkeit der einstellbaren Zellrückhaltung im praktischen Prozess zu testen.

## 6. Material und Methoden

### 6.1 Materialien

Tabella 1: Liste der verwendeten Chemikalien.

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Druckermaterial M2R-CL	3D Systems Inc., USA
Druckermaterial M2S-HT90	3D Systems Inc., USA
Druckerstützmaterial M2-SUP	3D Systems Inc., USA
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Deutschland
Polyethylenimin (PEI), linear, 25 kDa	Polysciences Europe GmbH, Deutschland
Fairy Ultra Plus Konzentrat	Procter & Gamble, USA

Tabella 2: Liste der verwendeten Medien.

<b>Medium</b>	<b>Hersteller</b>
CHO-TF	Xell AG, Deutschland

Tabella 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Einmalspritzen „norm-ject“ und „inject“	Henke-Sass Wolf GmbH, Deutschland
Kanülen Sterican	B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Kultivierungskolben mit Schikanen	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen	BRAND GmbH + Co KG, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	Sarstedt AG, Deutschland
Reaktionsgefäße (15 und 50 mL)	Corning Inc., USA
Kryoröhrchen	Sarstedt AG, Deutschland
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 mL)	Corning Inc., USA
Falcon 70 µm Cell Strainer Nylon	Corning Inc., USA



Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
3D-Drucker MJP 2500 Plus	3D Systems Inc. USA
3/2-Wege-Ventile 6724 Art. Nr. 299252	Bürkert GmbH & Co. KG, Deutschland
Biologische Sicherheitswerkbank Thermo Scientific Safe 2020 und MSC Advantage	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Durchflusszytometer BD Accuri C6	BD Biosciences, USA
Inkubator Heracell 240	Thermo Fischer Scientific Inc., USA
Magnetrührer RCT Basic IKOMAG	IKA-Werke GmbH und Co. KG, Deutschland
Magnetrührer IKA Mini-MR	IKA-Werke GmbH und Co. KG, Deutschland
Mikrozentrifuge Heraeus Fresco	Thermo Scientific, USA
Pipettierhelfer Accu-Jet Pro	BRAND GmbH + Co KG, Deutschland
Tischzentrifuge 5702	Eppendorf AG, Deutschland
Zellzählgerät CEDEX HiRes Analyser	Roche Diagnostics International, Deutschland
Analysegerät CEDEX Bio	Roche Diagnostics International, Deutschland
Wasserbad WNB	Memmert GmbH + Co. KG, Deutschland
Spritzenpumpe AL-1000	World Precision Instruments, USA
Persaltikpumpe ISMATEC Reglo Difital	Cole-Parmer GmbH, Deutschland
Mikropipette Transferpette S	BRAND GmbH + Co KG, Deutschland
Autoklav I-50	Systemec GmbH, Deutschland

In dieser Arbeit wurde der Vektor pEGFP-N1 (GenBank Accession Nr. U55762) verwendet. Die Vektorkarte ist in Abbildung 15 dargestellt.

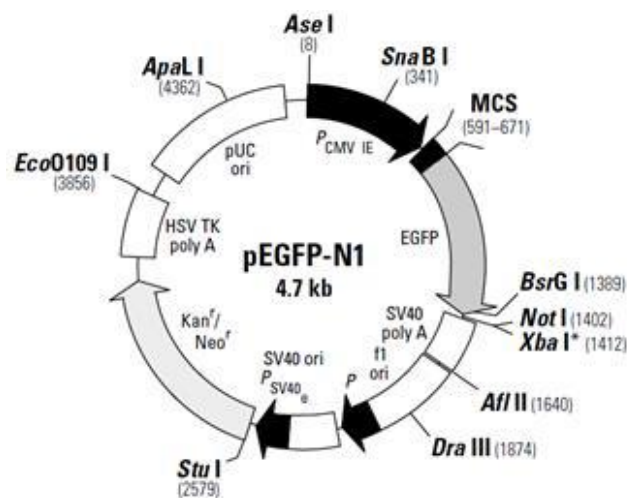


Abbildung 15: Vektorkarte pEGFP-N1.

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 3D-Design

Die Modelle der mikrofluidischen Systeme wurden mit Solidworks 2020 (Dassault Systèmes) designt. Die Spezifikationen der designten Prototypen sind dem Hauptteil dieser Arbeit in Kapitel 4 zu entnehmen.

### 6.2.2 3D-Druck und Aufarbeitung

Die zu druckenden Objekte werden als .stl Datei in die Software 3D Sprint geladen und anschließend dem Drucker übermittelt.

Nach dem Druck wird die Druckplattform aus dem Drucker für 10-20 min in einen Gefrierschrank gelegt. Dadurch werden die gedruckten Teile abgekühlt und lassen sich einfach von der Druckplattform lösen. Es folgt das Entfernen des Stützmaterials in zwei Schritten. Zunächst werden die gedruckten Objekte in die erste EasyClean-Unit mit Wasserdampf (Heizplatteneinstellung 6-7) für ca. 20 min (oder bis das gesamte Wachs geschmolzen ist) gelegt. Anschließend werden die Teile in die zweite EasyClean-Unit mit Paraffinöl gelegt (Heizplatteneinstellung 5), um feine Wachsreste zu entfernen. Nach ca. 5 Minuten werden die Objekte entnommen und in einem Seifenbad das Öl entfernt.

Bei kleineren Kanälen, die innerhalb des Objektes liegen, ist das Wachs durch die Cleaning-Units meistens noch nicht aus den Kanälen entfernt. Hierfür wird das Objekt nach der zweiten Unit in ein Ultraschallbad mit Paraffinöl bei 60 °C gelegt und für 20 Minuten mit Ultraschall behandelt. Anschließend wird mit Einmalspritzen und dem Öl aus dem Ultraschallbad das gelöste Wachs aus den Kanälen gespritzt. Es folgt die Reinigung mit Seifenwasser.

### 6.2.3 Zellkulturtechniken

#### **Kultivierung**

Die CHO-K1 Suspensionszellen werden in CHO-TF Medium kultiviert. Das Medium wird für die Kultivierung durch Zugabe von 8 mmol/L Glutamin vorbereitet. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit Kultivierungen im Maßstab von 1 mL bis 4 mL in 50 mL Kultivierungsröhrchen und 25 mL bis 50 mL in Schüttelkolben durchgeführt. Die Zellen werden in einem Heraeus-Inkubator bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert. Um die Versorgung der Zellen zu gewährleisten, werden die Zellen alle 3-4 Tage in frisches Medium mit einer Zellkonzentration von  $0,4 \cdot 10^6$  Zellen mL<sup>-1</sup> überführt.

#### **Kryokonservierung und Auftauen konservierter Zellen**

Für die Langzeitlagerung und um Arbeitszellbänke anzulegen, werden CHO-Zellen in 7,5 % (v/v) DMSO in kaltem Kulturmedium suspendiert, auf 1,25 mL-Kryoröhrchen verteilt und für etwa 24 h bei

-80 °C eingefroren. Im Anschluss werden die Zellen in flüssigem Stickstoff in Kryotanks gelagert. Die Zelldichte beträgt ca.  $7 \cdot 10^6$  Zellen pro Kryoröhrchen.

Die eingefrorenen Zellen werden für ca. 3 min in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut. Die Zellen werden anschließend in 10 mL CHO-TF Medium verdünnt und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Danach wird der Überstand verworfen und die Zellen in 25 mL Medium in Schüttelkolben kultiviert.

### **Steriles Arbeiten**

Sämtliche Arbeiten der Kultivierung und Transfektion werden in einer Sterilbank durchgeführt, um die Gefahr einer Kontamination zu verringern. Sämtliche eingebrachten Gegenstände werden vorher gründlich mit Isopropanol gereinigt. Falls möglich werden die verwendeten Gegenstände vorher mit gesättigtem Dampf bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von ca. 2 bar für 15 min autoklaviert.

Bei der Verwendung des mikrofluidischen Systems für die Transfektionen wurde das System vor der Transfektion in einem Metallcontainer autoklaviert und unter einer Sterilwerkbank zusammengesetzt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass alle Schlauchenden in sterile Gefäße platziert werden, um Kontakt mit anderen Oberflächen zu vermeiden, bis das eigentliche Transfektionsexperiment beginnt.

### **Zellzählung**

Die Zellzählungen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem Zählsystem CEDEX durchgeführt. Hierfür werden Zellen unverdünnt oder verdünnt in 1x PBS in die zugehörigen Gefäße pipettiert und vom Autosampler des CEDEX aufgenommen. Die Zellzählung erfolgt in dem System durch optische Zellzählung mit Hilfe eines Algorithmus. Gleichzeitig bestimmt das CEDEX mit einer Trypanblau-Totfärbung die Zellviabilität (den Anteil der lebenden, ungefärbten Zellen am Anteil der Gesamtzellzahl).

### **Medienanalyse mittels CEDEX Bio**

Die LDH-Aktivität der Zellen wird mit dem CEDEX Bio bestimmt. Hierfür werden ca. 500 µL der Zellsuspension für 5 min bei 300 x g abzentrifugiert und der Überstand in ein Probengefäß des Messgeräts pipettiert. Anschließend wird mit dem CEDEX Bio der LDH Assay durchgeführt.

### **Durchflusszytometrie**

Die Transfektionseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt, da das von den transfizierten Zellen produzierte eGFP nach Anregung mit dem FL1-A Detektor detektiert werden kann. Hierfür werden zunächst 300 µL Probe aus den Kultivierungskolben entnommen und durch ein 70 µm Zellsieb pipettiert, um Zellaggregate und Partikel zu entfernen. Pro Messung werden 10.000 Zellen gemessen. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wird zunächst in der Auftragung des Forward Scatters (FSC-A) und Side Scatters (SSC-A) die Population der lebenden Zellen ausgewählt. Darauf wurde in

der Auftragung der FL1-A Detektorintensität gegenüber FSC-A bei einer untransfizierten Blindprobe die untere Intensitätsgrenze festgelegt und anschließend bei den transfizierten Proben der Anteil der Zellen über dieser Intensitätsschwelle als transfiziert gezählt. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 16 eine Beispielauswertung dargestellt.

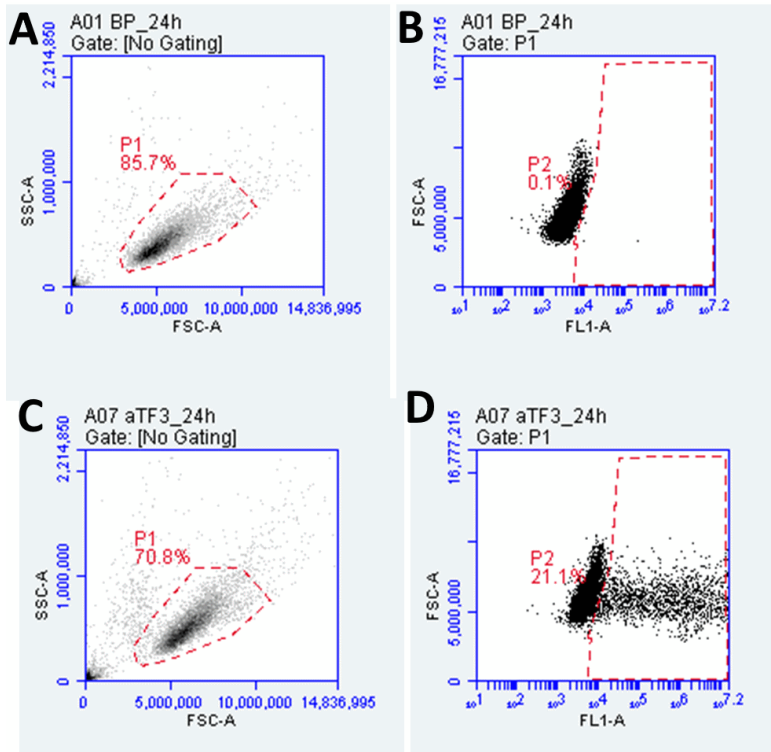


Abbildung 16: Beispielauswertung der Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Messung. A: Auswahl der Population der lebenden Zellen der Blindprobe anhand der höheren FSC- und niedrigeren SSC-Werte. B: Auswahl der Untergrenze der Intensität. C: Auswahl der lebenden Zellen in der Transfektionsprobe. D: Anteil der lebenden Zellen über der Intensitätsgrenze.

## 6.2.4 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion wurde in dieser Arbeit auf drei unterschiedliche Arten durchgeführt: Es wurde die herkömmliche (manuelle) Labormethode durchgeführt, die Transfektion mit dem Batch-Transfektionssystem (siehe Kapitel 4.3.1) und mit dem kontinuierlichen System (siehe Kapitel 4.3.2). Nachfolgend werden die Durchführungsschritte der einzelnen Methoden beschrieben.

### Allgemeine Vorbereitung

Bei der manuellen Labormethode wurde 24 h vor der Transfektion die CHO-Kultur auf  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  verdünnt. Für die Transfektion wurden die Zellen bei  $300 \times g$  abzentrifugiert und bei der Resuspension in neuem CHO-TF Medium eine Zellkonzentration von  $20 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  eingestellt. Die Zellen wurden für ca. 1 h in einem 15 mL Reaktionsgefäß auf einem Zellkulturschüttler mit 125 rpm bewegt, um letzte Zellaggregate aufzulösen. Bei der Transfektion wurden finale Konzentrationen von  $20 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ,  $24 \mu\text{g mL}^{-1}$  DNA und  $64 \mu\text{g mL}^{-1}$  PEI eingesetzt.

## **Manuelle Labormethode**

Die Volumina der zugegebenen DNA und PEI-Lösung hängen von der Konzentration der jeweiligen Stock-Lösung ab, sollte allerdings möglichst klein gehalten werden (Stock-Konzentrationen von PEI und DNA ca.  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Bei der Transfektion wurde zu der Zellsuspension zuerst die DNA und dann die PEI-Lösung dazugetrofft. Währenddessen wurde die Lösung weiterhin durch Einsatz eines Rührfisches bzw. durch Schwenken durchmischt. Die Inkubation erfolgte in einem 15 mL Reaktionsgefäß auf einem Rotator bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 1 mL der Lösung zu 24 mL CHO-TF gegeben und in einem Inkubator weiter kultiviert.

## **Batch-Transfektionssystem**

Beim Einsatz des Batch-Transfektionssystems wurden zunächst DNA, PEI und die Zellsuspension in Spritzen aufgezogen. In der 20 mL Spritze für die Zellsuspension wurde vorher der Stempel entfernt und mit einer autoklavierten Pinzette ein autoklavierter Rührfisch platziert. Dann wurde die Spritze mit einem autoklavierten Stopfen verschlossen und Zellsuspension in die Spritze überführt. Der Stempel wurde daraufhin wieder hineingedrückt, die Spritze auf dem Kopf gehalten und der Stopfen abgedreht. Die Luft wurde aus der Spritze entfernt. Mit einer 3D-gedruckten Halterung wurde der Stempel auf eine definierte Position gedrückt, um die korrekte Flüssigkeitsmenge einzustellen. Anschließend wurde der Stempel auf eine zweite Position aufgezogen, um ein definiertes Volumen Luft in die Spritze aufzuziehen, das dem Rührfisch genügend Platz bietet. Die PEI- und DNA-Lösungen wurden mit Kanülen aus 1,5 bzw. 2 mL Reaktionsgefäßen mit weiteren Halterungen in 3 mL Spritzen aufgezogen, um auch hier ein definiertes Volumen zu gewährleisten. Anschließend wurden alle Spritzen in einer Spritzenpumpe mit Dreifach-Spritzenhalterung platziert.

Die Spritzenpumpe wurde aufrecht über einem Magnetrührer aufgestellt und das autoklavierte Batch-Transfektionssystem an die Spritzen angeschlossen. Der Magnetrührer wurde auf eine niedrige Stufe eingestellt, um den Rührfisch in der Zellsuspensions-Spritze zu bewegen. Es wurden 9,6 mL Zellsuspension mit  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  herausgepumpt und anschließend 14 mL mit  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  aufgezogen. Dadurch ist die durch den Mikromischer durchmischte Flüssigkeit vollständig in der 20 mL Spritze und kann dort für eine bestimmte Inkubationszeit mit dem Rührfisch durchmischt werden. Nach definierten Inkubationszeiten wurde je 1 mL aus der Spritze zu 24 mL vorgewärmten CHO-TF-Medium gegeben und anschließend in einem Inkubator weiter kultiviert.

## **Semi-kontinuierliches Transfektionssystem**

Beim semi-kontinuierlichen Transfektionssystem wurden alle gedruckten Komponenten und Schläuche autoklaviert und in einer sterilen Werkbank zusammengebaut. Anschließend wurden eine 10 mL Spritze und zwei 1 mL Spritzen in einer Spritzenpumpe mit dreifach Spritzenaufsatz platziert und die Mischereinheit daran angebracht. Des Weiteren wurden zwei 10 mL Spritzen auf einer weiteren Spritzenpumpe mit passendem Aufsatz platziert und die Separationseinheit daran angeschlossen.

Anschließend wurde die Zellsuspension in einem Glas-Schüttelkolben, der über einen PTFE-Schlauch mit der Mischereinheit verbunden war, gefüllt und auf dem Schüttler platziert. Dann wurden DNA- und PEI-Lösung in 15 mL Reaktionsgefäßen zu der Mischereinheit gestellt und die jeweiligen Schläuche in die Gefäße mit einer autoklavierten Pinzette platziert. Zusätzlich wurde frisches CHO-TF Medium an die Separationseinheit angeschlossen, welches für eine erste Verdünnung genutzt wird. Daraufhin wurde das Computerprogramm der Ventil- und Pumpensteuerung gestartet. Es wurde zyklisch 2 mL der Zellsuspension mit  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  aufgezogen und dann wieder abgegeben. Die Ventile wurden so gesteuert, dass immer 4 mL der Suspension in eine Inkubationskammer flossen und danach die nächste Inkubationskammer angesteuert wurde. Zeitgleich wurde die zweite Spritzenpumpe an der Separationseinheit so gesteuert, dass sie aus den Inkubationseinheiten 2 mL mit  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  aufzieht und zeitgleich 2 mL frisches Medium aufzieht. Anschließend wurde beides zusammen durch den Spiralseparator mit insgesamt  $1000 \mu\text{L min}^{-1}$  gepumpt. Währenddessen lief die Peristaltikpumpe am äußeren Ausgang ebenfalls mit  $500 \mu\text{L min}^{-1}$ . Die transfizierten Zellen wurden in einem Erlenmeyerkolben aufgefangen und anschließend 1 mL Zellsuspension mit 24 mL CHO-TF verdünnt und in einem Laborinkubator kultiviert. Für die Probenahme nach der Mischereinheit wurde die Lösung in einem 15 mL Reaktionsgefäß aufgefangen und analog zur manuellen Vorgehensweise auf einem Rotator inkubiert, dann 1 mL der transfizierten Zellsuspension mit 24 mL frischem Medium verdünnt und kultiviert. Bei der Probenahme aus der Inkubationseinheit wurden 1 mL der transfizierten Zellsuspension mit einer Pipette entnommen und mit 24 mL frischem Medium verdünnt und anschließend kultiviert.

### Automatisierter Ablauf und Schaltplan der Ventile und Pumpen im semi-kontinuierlichen Transfektionssystem

Nachfolgend ist ein detaillierter Schaltplan des semi-kontinuierlichen Transfektionssystems inklusive COM, NO und NC Bezeichnungen der 3/2-Wege-Ventile abgebildet. Anschließend wird der Ablauf der Schaltung der Ventile und Pumpen erläutert.

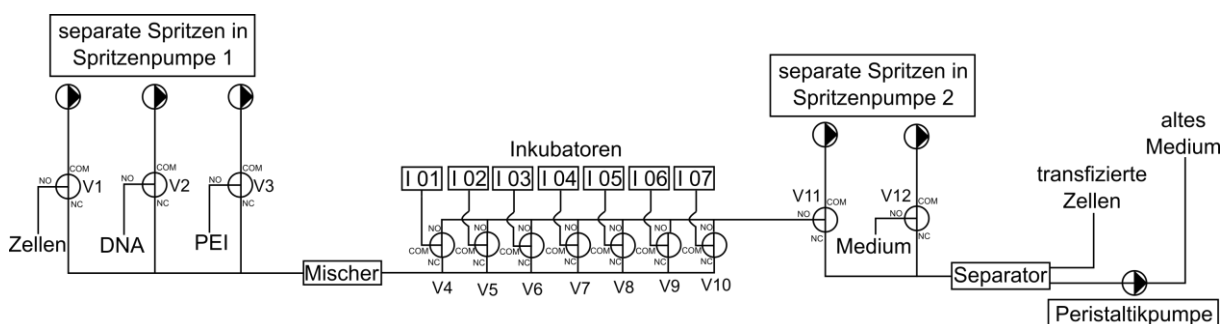


Abbildung 17: Schaltplan des semi-kontinuierlichen Transfektionssystems.

Die Zellsuspension, DNA und PEI werden zuerst von Spritzenpumpe 1 aufgezogen. Dann schalten die Ventile 1-3 um und Spritzenpumpe 1 pumpt die Lösungen durch den HC-Mikromischer in die Inkubationseinheit, auf der Ventile 4-10 so geschaltet werden, dass nur ein Inkubator offen zu dem

Zuführungskanal ist. Das Transfektionsgemisch gelangt somit in den ersten Inkubator. Ventile 1-3 schalten wieder um, sodass neue Zellsuspension, DNA und PEI-Lösung von Spritzenpumpe 1 aufgezogen werden können. Dieser Zyklus wird wiederholt, bis alle Inkubatoren mit je 5 mL Suspension gefüllt worden sind. Sobald die Inkubationszeit von 2 h abgelaufen ist, werden die Zellen aus den Inkubatoren mittels Spritzenpumpe 2 abgesogen. Hierfür werden in dem Zyklusteil, in dem Spritzenpumpe 1 Lösungen aufzieht, die Ventile 4-10 auf der Inkubationseinheit so geschaltet, dass nur der gewünschte Inkubator offen zum Abführungskanal ist. Sobald die Lösung vollständig aufgesogen wurde, werden die Ventile 11 und 12 umgeschaltet und die Spritzenpumpe 2 drückt das Transfektionsgemisch und frisches Medium durch den Spiralseparator in einen Kultivierungskolben. Um die Agitation der Zellen während der Inkubation zu gewährleisten, ist die Inkubationseinheit auf einem Schüttler befestigt. Die Steuerung der Pumpen und Ventile erfolgt automatisiert über einen angeschlossenen Computer. Sobald die Zellsuspension aus einem Inkubator von der Spritzenpumpe 2 vollständig aufgesogen wurde, wird dieser mit neuer Zellsuspension durch Spritzenpumpe 1 befüllt, sodass ein semi-kontinuierlicher Betrieb erfolgt.

### **Programmierung der Ventil- und Pumpensteuerung**

Die Steuerung der Ventile und Pumpen erfolgte durch einen angeschlossenen Computer. Die Pumpen wurden dabei über die serielle RS-232 Schnittstelle gesteuert, während die Ventile über einen Netzwerkanschluss gesteuert wurden. Die Steuerungsskripte in der Programmiersprache Python sind auf der beigelegten CD verfügbar.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] M. Jedrzejczak-Silicka, in: *New Insights into Cell Culture Technology* (Hrsg.: S. J. T. Gowder), InTech, **2017**.
- [2] G. Walsh, *Nature biotechnology* **2018**, *36*, 1136–1145, DOI: 10.1038/nbt.4305.
- [3] X. Wang und I. Rivière, *Molecular therapy oncolytics* **2016**, *3*, 16015, DOI: 10.1038/mto.2016.15.
- [4] N. A. Baeshen, M. N. Baeshen, A. Sheikh, R. S. Bora, M. M. M. Ahmed, H. A. I. Ramadan, K. S. Saini und E. M. Redwan, *Microbial cell factories* **2014**, *13*, 141, DOI: 10.1186/s12934-014-0141-0.
- [5] *FDA drug bulletin* **1982**, *12*, 18–19.
- [6] T. K. Kim und J. H. Eberwine, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2010**, *397*, 3173–3178, DOI: 10.1007/s00216-010-3821-6.
- [7] A. D. Bandaranayake und S. C. Almo, *FEBS letters* **2014**, *588*, 253–260, DOI: 10.1016/j.febslet.2013.11.035.
- [8] J. Zhu, *Update on Production of Recombinant Therapeutic Protein*, iSmithers Rapra Publishing, Shrewsbury, **2013**.
- [9] T. Litman, *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **2019**, *127*, 386–424, DOI: 10.1111/apm.12934.
- [10] C. S. Lee, E. S. Bishop, R. Zhang, X. Yu, E. M. Farina, S. Yan, C. Zhao, Z. Zheng, Y. Shu, X. Wu, J. Lei, Y. Li, W. Zhang, C. Yang, K. Wu, Y. Wu, S. Ho, A. Athiviraham, M. J. Lee, J. M. Wolf, R. R. Reid und T.-C. He, *Genes & diseases* **2017**, *4*, 43–63, DOI: 10.1016/j.gendis.2017.04.001.
- [11] *Nonviral vectors for gene therapy* (Hrsg.: L. Huang, D. Liu und E. Wagner), Academic Press, Amsterdam, **2015**.
- [12] T. M. Klein, E. D. Wolf, R. Wu und J. C. Sanford, *Nature* **1987**, *327*, 70–73, DOI: 10.1038/327070a0.
- [13] M. D. Eisenbraun, D. H. Fuller und J. R. Haynes, *DNA and cell biology* **1993**, *12*, 791–797, DOI: 10.1089/dna.1993.12.791.
- [14] J. J. Sherba, S. Hogquist, H. Lin, J. W. Shan, D. I. Shreiber und J. D. Zahn, *Scientific reports* **2020**, *10*, 3053, DOI: 10.1038/s41598-020-59790-x.
- [15] C. P. Yao, Z. X. Zhang, R. Rahmanzadeh und G. Huettmann, *IEEE transactions on nanobioscience* **2008**, *7*, 111–119, DOI: 10.1109/TNB.2008.2000742.
- [16] M. Tomizawa, F. Shinozaki, Y. Motoyoshi, T. Sugiyama, S. Yamamoto und M. Sueishi, *World journal of methodology* **2013**, *3*, 39–44, DOI: 10.5662/wjm.v3.i4.39.
- [17] F. Scherer, M. Anton, U. Schillinger, J. Henke, C. Bergemann, A. Krüger, B. Gänsbacher und C. Plank, *Gene therapy* **2002**, *9*, 102–109, DOI: 10.1038/sj.gt.3301624.



- [18] A. Sharei, N. Cho, S. Mao, E. Jackson, R. Pocevičiute, A. Adamo, J. Zoldan, R. Langer und K. F. Jensen, *Journal of visualized experiments : JoVE* **2013**, e50980, DOI: 10.3791/50980.
- [19] J. H. McCutchan und J. S. Pagano, *Journal of the National Cancer Institute* **1968**, *41*, 351–357.
- [20] E. T. Schenborn und V. Goiffon, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2000**, *130*, 147–153, DOI: 10.1385/1-59259-686-x:147.
- [21] S. Gutiérrez-Granados, L. Cervera, A. A. Kamen und F. Gòdia, *Critical reviews in biotechnology* **2018**, *38*, 918–940, DOI: 10.1080/07388551.2017.1419459.
- [22] J. Zabner, A. J. Fasbender, T. Moninger, K. A. Poellinger und M. J. Welsh, *The Journal of biological chemistry* **1995**, *270*, 18997–19007, DOI: 10.1074/jbc.270.32.18997.
- [23] *Animal Cell Culture* (Hrsg.: M. Al-Rubeai), Springer International Publishing, Cham, **2015**.
- [24] L. Guo, L. Wang, R. Yang, R. Feng, Z. Li, X. Zhou, Z. Dong, G. Gharthey-Kwansah, M. Xu, M. Nishi, Q. Zhang, W. Isaacs, J. Ma und X. Xu, *Saudi journal of biological sciences* **2017**, *24*, 622–629, DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.01.034.
- [25] P. Girard, L. Porte, T. Berta, M. Jordan und F. M. Wurm, *Cytotechnology* **2001**, *35*, 175–180, DOI: 10.1023/a:1013101927350.
- [26] V. Jäger, K. Büssow und T. Schirrmann, in: *Animal Cell Culture* (Hrsg.: M. Al-Rubeai), Springer International Publishing, Cham, **2015**, 27–64.
- [27] L. I. Selby, C. M. Cortez-Jugo, G. K. Such und A. P. R. Johnston, *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* **2017**, *9*, DOI: 10.1002/wnan.1452.
- [28] Y.-Y. Won, R. Sharma und S. F. Konieczny, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2009**, *139*, 88–93, DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.06.031.
- [29] K. von Gersdorff, N. N. Sanders, R. Vandenbroucke, S. C. de Smedt, E. Wagner und M. Ogris, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2006**, *14*, 745–753, DOI: 10.1016/j.ymthe.2006.07.006.
- [30] I. Kopatz, J.-S. Remy und J.-P. Behr, *The journal of gene medicine* **2004**, *6*, 769–776, DOI: 10.1002/jgm.558.
- [31] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix und J. P. Behr, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92*, 7297–7301, DOI: 10.1073/pnas.92.16.7297.
- [32] R. V. Benjaminsen, M. A. Matthebjerg, J. R. Henriksen, S. M. Moghimi und T. L. Andresen, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2013**, *21*, 149–157, DOI: 10.1038/mt.2012.185.
- [33] J. Suh, D. Wirtz und J. Hanes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 3878–3882, DOI: 10.1073/pnas.0636277100.
- [34] A. S. Tait, C. J. Brown, D. J. Galbraith, M. J. Hines, M. Hoare, J. R. Birch und D. C. James, *Biotechnology and bioengineering* **2004**, *88*, 707–721, DOI: 10.1002/bit.20265.

- [35] S. Grosse, G. Thévenot, M. Monsigny und I. Fajac, *The journal of gene medicine* **2006**, 8, 845–851, DOI: 10.1002/jgm.915.
- [36] M. Neu, D. Fischer und T. Kissel, *The journal of gene medicine* **2005**, 7, 992–1009, DOI: 10.1002/jgm.773.
- [37] S. Geisse, M. Jordan und F. M. Wurm, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2005**, 308, 87–98, DOI: 10.1385/1-59259-922-2:087.
- [38] C. Liu, B. Dalby, W. Chen, J. M. Kilzer und H. C. Chiou, *Molecular biotechnology* **2008**, 39, 141–153, DOI: 10.1007/s12033-008-9051-x.
- [39] A. P. Pandey und K. K. Sawant, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* **2016**, 68, 904–918, DOI: 10.1016/j.msec.2016.07.066.
- [40] T. H. Kim, S. I. Kim, T. Akaike und C. S. Cho, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2005**, 105, 354–366, DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.03.024.
- [41] D. Jiang und A. K. Salem, *International journal of pharmaceutics* **2012**, 427, 71–79, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.10.032.
- [42] J.-H. Kang, Y. Tachibana, W. Kamata, A. Mahara, M. Harada-Shiba und T. Yamaoka, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2010**, 18, 3946–3950, DOI: 10.1016/j.bmc.2010.04.031.
- [43] M. R. Rekha und C. P. Sharma, *Acta biomaterialia* **2011**, 7, 370–379, DOI: 10.1016/j.actbio.2010.07.027.
- [44] S. Yang, X. Zhou, R. Li, X. Fu und P. Sun, *Current protocols in chemical biology* **2017**, 9, 147–157, DOI: 10.1002/cpch.25.
- [45] W. T. Godbey, K. K. Wu und A. G. Mikos, *Journal of Controlled Release* **1999**, 60, 149–160, DOI: 10.1016/s0168-3659(99)00090-5.
- [46] F. Bollin, V. Dechavanne und L. Chevalet, *Protein expression and purification* **2011**, 78, 61–68, DOI: 10.1016/j.pep.2011.02.008.
- [47] D. J. Galbraith, A. S. Tait, A. J. Racher, J. R. Birch und D. C. James, *Biotechnology progress* **2006**, 22, 753–762, DOI: 10.1021/bp050339v.
- [48] C. H. Kim, Y. Oh und T. H. Lee, *Gene* **1997**, 199, 293–301, DOI: 10.1016/S0378-1119(97)00384-3.
- [49] Y. Rajendra, D. Kiseljak, S. Manoli, L. Baldi, D. L. Hacker und F. M. Wurm, *Biotechnology and bioengineering* **2012**, 109, 2271–2278, DOI: 10.1002/bit.24494.
- [50] C. Raymond, R. Tom, S. Perret, P. Moussouami, D. L'Abbé, G. St-Laurent und Y. Durocher, *Methods (San Diego, Calif.)* **2011**, 55, 44–51, DOI: 10.1016/j.ymeth.2011.04.002.
- [51] R. C. Lo, *J Bioprocess Biotechniq* **2012**, 02, DOI: 10.4172/2155-9821.1000e109.
- [52] G. M. Whitesides, *Nature* **2006**, 442, 368–373, DOI: 10.1038/nature05058.
- [53] D. B. Weibel und G. M. Whitesides, *Current opinion in chemical biology* **2006**, 10, 584–591, DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.10.016.

- [54] U. Marx, T. B. Andersson, A. Bahinski, M. Beilmann, S. Beken, F. R. Cassee, M. Cirit, M. Daneshian, S. Fitzpatrick, O. Frey, C. Gaertner, C. Giese, L. Griffith, T. Hartung, M. B. Heringa, J. Hoeng, W. H. de Jong, H. Kojima, J. Kuehnl, M. Leist, A. Luch, I. Maschmeyer, D. Sakharov, A. J. A. M. Sips, T. Steger-Hartmann, D. A. Tagle, A. Tonevitsky, T. Tralau, S. Tsyb, A. van de Stolpe, R. Vandebriel, P. Vulto, J. Wang, J. Wiest, M. Rodenburg und A. Roth, *ALTEX* **2016**, *33*, 272–321, DOI: 10.14573/altex.1603161.
- [55] C. Kasper, D. Egger und A. Lavrentieva, *Basic Concepts on 3D Cell Culture*, Springer International Publishing, Cham, **2021**.
- [56] R. G. Blazej, P. Kumaresan und R. A. Mathies, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 7240–7245, DOI: 10.1073/pnas.0602476103.
- [57] J. H. Aborn, S. A. El-Difrawy, M. Novotny, E. A. Gismondi, R. Lam, P. Matsudaira, B. K. McKenna, T. O'Neil, P. Streechon und D. J. Ehrlich, *Lab on a chip* **2005**, *5*, 669–674, DOI: 10.1039/b501104c.
- [58] J. Gao, X.-F. Yin und Z.-L. Fang, *Lab on a chip* **2004**, *4*, 47–52, DOI: 10.1039/b310552k.
- [59] P. J. Hung, P. J. Lee, P. Sabounchi, R. Lin und L. P. Lee, *Biotechnology and bioengineering* **2005**, *89*, 1–8, DOI: 10.1002/bit.20289.
- [60] R. Gómez-Sjöberg, A. A. Leyrat, D. M. Pirone, C. S. Chen und S. R. Quake, *Analytical chemistry* **2007**, *79*, 8557–8563, DOI: 10.1021/ac071311w.
- [61] Les Laboratoires Servier, *Servier medical art*, smart.servier.com.
- [62] S. Ebrahimi, A. Hasanzadeh-Barforoushi, A. Nejat und F. Kowsary, *International Journal of Heat and Mass Transfer* **2014**, *75*, 565–580, DOI: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2014.04.004.
- [63] A. Alizadeh, L. Zhang und M. Wang, *Journal of colloid and interface science* **2014**, *431*, 50–63, DOI: 10.1016/j.jcis.2014.05.070.
- [64] A. Affanni und G. Chiorboli, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2010**, *147*, 748–754, DOI: 10.1016/j.snb.2010.03.077.
- [65] Z. Yang, S. Matsumoto, H. Goto, M. Matsumoto und R. Maeda, *Sensors and Actuators A: Physical* **2001**, *93*, 266–272, DOI: 10.1016/S0924-4247(01)00654-9.
- [66] C.-C. Hong, J.-W. Choi und C. H. Ahn, *Lab on a chip* **2004**, *4*, 109–113, DOI: 10.1039/b305892a.
- [67] D. S. Kim, S. H. Lee, T. H. Kwon und C. H. Ahn, *Lab on a chip* **2005**, *5*, 739–747, DOI: 10.1039/b418314b.
- [68] M. Cretich, G. Di Carlo, C. Giudici, S. Pokoj, I. Lauer, S. Scheurer und M. Chiari, *Proteomics* **2009**, *9*, 2098–2107, DOI: 10.1002/pmic.200800651.
- [69] N. Rajabi, J. Bahnemann, T.-N. Tzeng, O. Platas Barradas, A.-P. Zeng und J. Müller, *Sensors and Actuators A: Physical* **2014**, *215*, 136–143, DOI: 10.1016/j.sna.2013.12.019.
- [70] A. A. Nawaz, X. Zhang, X. Mao, J. Rufo, S.-C. S. Lin, F. Guo, Y. Zhao, M. Lapsley, P. Li, J. P. McCoy, S. J. Levine und T. J. Huang, *Lab on a chip* **2014**, *14*, 415–423, DOI: 10.1039/c3lc50810b.

- [71] D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins und M. Toner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 18892–18897, DOI: 10.1073/pnas.0704958104.
- [72] W. C. Lee, A. A. S. Bhagat, S. Huang, K. J. van Vliet, J. Han und C. T. Lim, *Lab on a chip* **2011**, *11*, 1359–1367, DOI: 10.1039/c0lc00579g.
- [73] M. E. Warkiani, B. L. Khoo, L. Wu, A. K. P. Tay, A. A. S. Bhagat, J. Han und C. T. Lim, *Nature protocols* **2016**, *11*, 134–148, DOI: 10.1038/nprot.2016.003.
- [74] H. Amini, W. Lee und D. Di Carlo, *Lab on a chip* **2014**, *14*, 2739–2761, DOI: 10.1039/c4lc00128a.
- [75] D. Di Carlo, *Lab on a chip* **2009**, *9*, 3038–3046, DOI: 10.1039/b912547g.
- [76] G. Segré und A. Silberberg, *Nature* **1961**, *189*, 209–210, DOI: 10.1038/189209a0.
- [77] D. Di Carlo, J. F. Edd, K. J. Humphry, H. A. Stone und M. Toner, *Physical review letters* **2009**, *102*, 94503, DOI: 10.1103/PhysRevLett.102.094503.
- [78] D. R. Gossett, H. T. K. Tse, J. S. Dudani, K. Goda, T. A. Woods, S. W. Graves und D. Di Carlo, *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2012**, *8*, 2757–2764, DOI: 10.1002/sml.201200588.
- [79] B. P. Ho und L. G. Leal, *J. Fluid Mech.* **1974**, *65*, 365–400, DOI: 10.1017/S0022112074001431.
- [80] H. Ramachandraiah, S. Ardabili, A. M. Faridi, J. Gantelius, J. M. Kowalewski, G. Mårtensson und A. Russom, *Biomicrofluidics* **2014**, *8*, 34117, DOI: 10.1063/1.4884306.
- [81] H. G. Breunig, A. Batista, A. König und K. König, in: *Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XVII* (Hrsg.: D. L. Farkas, J. F. Leary and A. Tarnok), SPIE, **02.02.2019 - 07.02.2019**, 67.
- [82] S. Movahed und D. Li, *Microfluid Nanofluid* **2011**, *10*, 703–734, DOI: 10.1007/s10404-010-0716-y.
- [83] M. B. Fox, D. C. Esveld, A. Valero, R. Luttge, H. C. Mastwijk, P. V. Bartels, A. van den Berg und R. M. Boom, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2006**, *385*, 474–485, DOI: 10.1007/s00216-006-0327-3.
- [84] D. Huang, D. Zhao, J. Li, Y. Wu, L. Du, X.-H. Xia, X. Li, Y. Deng, Z. Li und Y. Huang, *Current drug delivery* **2019**, *16*, 164–170, DOI: 10.2174/1567201815666181017095044.
- [85] X. Li, M. Aghaamoo, S. Liu, D.-H. Lee und A. P. Lee, *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2018**, *14*, e1802055, DOI: 10.1002/sml.201802055.
- [86] C. G. Koh, X. Kang, Y. Xie, Z. Fei, J. Guan, B. Yu, X. Zhang und L. J. Lee, *Molecular pharmaceutics* **2009**, *6*, 1333–1342, DOI: 10.1021/mp900016q.
- [87] H. Debus, M. Beck-Broichsitter und T. Kissel, *Lab on a chip* **2012**, *12*, 2498–2506, DOI: 10.1039/c2lc40176b.
- [88] D. P. Feldmann, J. Heyza, C. M. Zimmermann, S. M. Patrick und O. M. Merkel, *Molecules (Basel, Switzerland)* **2020**, *25*, DOI: 10.3390/molecules25081994.

- [89] A. Lavrentieva, T. Fleischhammer, A. Enders, H. Pirmahboub, J. Bahnemann und I. Pepelanova, *Macromolecular bioscience* **2020**, *20*, e2000107, DOI: 10.1002/mabi.202000107.
- [90] I. G. Siller, J.-A. Preuss, K. Urmann, M. R. Hoffmann, T. Scheper und J. Bahnemann, *Sensors (Basel, Switzerland)* **2020**, *20*, DOI: 10.3390/s20164421.

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Strömungslinien innerhalb eines Kanals bei turbulenter Strömung und laminarer Strömung.....	9
Abbildung 2: Schema eines Lab-on-a-Chip Systems im Vergleich zu den Schritten mit normalen Laborgeräten. Mit dem Lab-on-a-Chip System werden alle fünf Schritte in einem einzigen mikrofluidischen System integriert. Teile der Abbildungen aus [61]. ....	11
Abbildung 3: Partikel nehmen abhängig vom Kanalquerschnitt unterschiedliche stabile Positionen ein. A: Kreisförmiger Querschnitt: Ringförmiger Bereich. B: Quadratischer Querschnitt: vier punktuelle Positionen. C: Rechteckiger Querschnitt: zwei punktuelle Positionen. Grafik erstellt nach Amini et al. [74]. ....	14
Abbildung 4: Darstellung der wirkenden Kräfte und der Dean-Strömungen in einem gekrümmten mikrofluidischen Kanal. A: Stabile Positionen (blaue Punkte) und Dean Strömungen (Ellipsen mit Pfeilen). B: Auf die Partikel wirkende Kräfte: $F_{LW}$ (Wand-induzierte Auftriebskraft), $F_{LS}$ (Schergradient-induzierte Auftriebskraft), $F_{CTF}$ (Zentrifugalkraft), $F_D$ (Deankraft), $F_P$ (Druckkraft) [80]. ....	15
Abbildung 5: Die Flexibilität des 3D-Drucks ermöglicht das Erstellen verschiedenster miniaturisierter und mikrofluidischer Systeme. A: Mikroblasensäulenreaktor zur Kultivierung von Mikroorganismen. B: Miniaturisierte Frei-Flusselektrophorese. C: Mikrofluidischer Mischer zur Erstellung von Hydrogelen. D: Mikrofluidisches System mit integriertem Aptasensor aus porösem Silizium. ....	17
Abbildung 6: Graphische Kurzzusammenfassung der Veröffentlichung „3D Printed Microfluidic Mixers – A Comparative Study on Mixing Unit Performance“.....	30
Abbildung 7: Graphische Kurzzusammenfassung der Veröffentlichung. A: Versuchsaufbau des Spiralseparators mit Pulsationsdämpfern als Zellrückhaltesystem. B: 3D-gedrucktes System mit Pulsationsdämpfern (rechts und links) und Spiralseparator (Mitte). C: Untersuchung der Fokussierung im Spiralseparator mittels Fluoreszenzpartikeln. ....	48
Abbildung 8: Aufbau des Batch-Transfektionssystems. A: Schematische Darstellung der Teile des Systems. B: 3D-Darstellung des gedruckten Systems. C: Foto des gedruckten Transfektionssystems. ....	68
Abbildung 9: Transfektionseffizienz der Transfektion von CHO-K1 Zellen im mikrofluidischen Batch-System (aTF) und nach der herkömmlichen Labormethode (mTF) bei unterschiedlicher Inkubationszeit zwischen 1-4 h in Abhängigkeit zur Kultivierungszeit nach der Transfektion. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten. ....	69
Abbildung 10: Schematische Darstellung des automatisierten Transfektionssystems. ....	70
Abbildung 11: CAD Darstellungen der Komponenten des Transfektionssystems. A: Inkubationseinheit, B: Mischereinheit, C: Separationseinheit. Alle Komponenten werden mit PTFE-Schläuchen miteinander und mit Reservoirs bzw. Kultivierungskolben verbunden. ....	71
Abbildung 12: Foto des aufgebauten Gesamtsystems in einer Sterilbank. ....	72
Abbildung 13: Ergebnisse der Transfektion von CHO-Zellen nach der herkömmlichen manuellen Labormethode (mTF), mittels mikrofluidischem System ohne Separation (aTF -Sep) und mit Separation	

(aTF +Sep). A: Transfektionseffizienz. B: Viable Zellkonzentration (ZK) (Quadrate in B) und Viabilität (Dreiecke in B).....	73
Abbildung 14: A. Verdopplungszeit, B: LDH-Aktivität und C: Viabilität der Zellen nach dem Durchlaufen unterschiedlicher Elemente des Transfektionssystems sowie einer Vergleichskultur (Blindprobe) nach einer weiteren Kultivierung für bis zu 48 h.....	74
Abbildung 15: Vektorkarte pEGFP-N1.....	81
Abbildung 16: Beispielauswertung der Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Messung. A: Auswahl der Population der lebenden Zellen der Blindprobe anhand der höheren FSC- und niedrigeren SSC-Werte. B: Auswahl der Untergrenze der Intensität. C: Auswahl der lebenden Zellen in der Transfektionsprobe. D: Anteil der lebenden Zellen über der Intensitätsgrenze. ....	84
Abbildung 17: Schaltplan des semi-kontinuierlichen Transfektionssystems. ....	86

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien. ....	80
Tabelle 2: Liste der verwendeten Medien. ....	80
Tabelle 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien. ....	80
Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte. ....	81



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Janina Bahnemann und Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper bedanken, dass ich am Institut für Technische Chemie promovieren durfte. Herzlichen Dank für die Bereitstellung des interessanten Themas, die angenehme, kollegiale Arbeitsatmosphäre und die freundliche Unterstützung während der Promotion. Vor allem bei Janina möchte ich mich für den kreativen Input bei neuen mikrofluidischen und zellkulturtechnischen Herausforderungen und gleichzeitig für die kreative Freiheit in der Herangehensweise an einzelne Fragestellungen bedanken. Ich bedanke mich bei PD Dr. Sascha Beutel für die Übernahme des weiteren Korreferendariats und bei PD Dr. Ulrich Krings für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bei der Prüfung.

Ein großes Dankeschön geht an die „alten“ Tierzellkultivierer und 3D-Drucker Experten. Herzlichen Dank an Jens Claßen, Florian Aupert und Tamanna Nagraik, die mich ursprünglich in ihr Reich der Zellkultur eingeführt haben und die Tricks und Kniffe der CHO-Kultivierung verrieten, und an Jonas Austerjost und Lukas Raddatz, die mich an die zahlreichen 3D-Drucker im Institut herangeführt haben.

Ein großer Dank gilt Throleif Hentrop für die Hilfe bei der Einbindung der Magnetventile. Außerdem möchte ich mich auch bei Martina Weiß, Martin Pähler, Friedbert Gellermann, Throsten Stempel, Kai Patzer, Christiane Hellwig und Ulla Dreschel bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle aus dem großartigen Arbeitskreis JBahnemann für die Unterstützung bei allen Fragen und natürlich vor allem an Taieb und John, die es schon das ganze Studium mit mir aushalten mussten. Vielen Dank auch an alle tatkräftigen 3D-Drucker und Tierzellkultivierer aus Labor 17. Natürlich bedanke ich mich auch bei ehemaligen und aktuellen Bewohnern des Büros 261 für die lustigen Zeiten innerhalb und außerhalb des Büros; Svenja, Kimia, Johanna, Chris, John, Tessa und Rieckje, es hat mir sehr viel Spaß gemacht! Vielen Dank auch an Ina, die zusammen mit mir den neuen Arbeitskreis mit Leben gefüllt hat, Michaela, die mit ihrer exzellenten Arbeit die Transfektionen vorangetrieben hat, und an Jana und Tobi, denen meine Separationsspirale in den Perfusionskultivierungen immer wieder Überraschungen bereithielt.

Nicht zuletzt will ich mich bei Clara und meiner Familie bedanken. Vielen Dank, Clara, dass du während der Promotionszeit zu mir gehalten hast. Meiner Familie möchte ich danken, da ich ohne sie nie die Chance bekommen hätte in der Forschung zu arbeiten und diese Promotion durchzuführen. Vielen Dank für all die Unterstützung im Studium und dass ihr immer an mich geglaubt habt!

# Betreute Abschlussarbeiten

## Bachelorarbeiten

Lena Schemmelmann - Design und Fabrikation mikrofluidischer Separatoren mittels 3D Druck (2018)

## Masterarbeiten

Jan Luca Lohse - 3D Design und 3D Fertigung von Mikrobioreaktoren für die Zellkultivierung (2018)

Michaela Dehne - Transiente Transfektion von Säugerzellen mittels mikrofluidischer Systeme (2020)

# Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

## Veröffentlichungen

Ling Chuang, **Anton Enders**, Sascha Offermann, Janina Bahnemann, Jakob Franke “3D-printed autoclavable plant holders to facilitate large-scale protein production in plants”, Engineering in Life Sciences (2022), *momentan im Review-Verfahren*

**Anton Enders**, John-Alexander Preuss and Janina Bahnemann “3D printed Microfluidic Spiral Separation Device for Continuous, Pulsation-Free and Controllable CHO Cell Retention”, micromachines (2021)

**Anton Enders** und Janina Bahnemann „3D-Druck miniaturisierter und mikrofluidischer Systeme“, Chemie in unserer Zeit (2021)

Sofia Arshavsky-Graham, **Anton Enders**, Shanny Ackerman, Janina Bahnemann, Ester Segal “3D-printed microfluidics integrated with optical nanostructured porous aptasensors for protein detection” Microchimica Acta volume 188 (2021)

Siller, Ina; **Enders, Anton**; Gellermann, Pia; Winkler, Steffen; Lavrentieva, Antonina; Scheper, Thomas; Bahnemann, Janina “Characterization of a customized 3D-printed cell culture system using clear, translucent acrylate that enables optical online monitoring” (2020)

Haoran Wang, **Anton Enders**, John Alexander Preuss, Alexander Heisterkamp, Janina Bahnemann, Maria Leilani Torres-Mapa „A 3D printed microfluidic lab-on-a-chip device for fiber-based dual beam optical manipulation” (2020)

Antonina Lavrentieva, Tabea Fleischhammer, **Anton Enders**, Hamidreza Pirmahboub, Janina Bahnemann, Iliyana Pepelanova “Fabrication of Stiffness Gradients of GelMA Hydrogels Using a 3D Printed Micromixer” Macromolecular Bioscience (2020)

Ina G. Siller, **Anton Enders**, Tobias Steinwedel, Niklas-Maximilian Epping, Marline Kirsch, Antonina Lavrentieva, Thomas Scheper and Janina Bahnemann “Real-Time Live-Cell Imaging Technology Enables High-Throughput Screening to Verify in Vitro Biocompatibility of 3D Printed Materials” MDPI Materials (2019)

**Anton Enders**, Ina G. Siller, Katharina Urmann, Michael R. Hoffmann and Janina Bahnemann “3D Printed Microfluidic Mixers—A Comparative Study on Mixing Unit Performances”, Small (2018)

### **Konferenzbeiträge**

Antonina Lavrentieva, Carola Schmitz, **Anton Enders**, Janina Bahnemann, Ekaterina Potekhina, Vsevolod Belousov, Sascha Dietrich, Iliyana Pepelanova “Fabrication of Gelatin-Methacryloyl (GelMA) hydrogels with stiffness gradients for in vitro models of physiological and pathological conditions”, 3D Cell Culture 2020: Models, Applications & Translation (DECHEMA), Freiburg

Sofia Arshavsky-Graham, Niklas-Maximilian Epping, **Anton Enders**, Thomas Scheper, Janina Bahnemann and Ester Segal “Integration of Porous Silicon-Based Optical Aptasensors in a 3D-Printed Microfluidic Platform for Protein Detection”  $\mu$ TAS 23<sup>rd</sup> International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (2019), Basel

**Anton Enders**, I. G. Siller, J.-A. Preuß, J. Bahnemann „Herstellung mikrofluidischer Systeme für die Biotechnologie mittels Multi Jet Modelling“, DECHEMA: Chemie hilft 3D-Druck (2019), Frankfurt

**Anton Enders**, Ina G. Siller, John-Alexander Preuß, Janina Bahnemann “Fabrication of microfluidic systems for use in biotechnology via 3D printing using MultiJet Printing technology”, Israelkonferenz (2019), Hannover

Haoran Wang, **Anton Enders**, Alexander Heisterkamp, Janina Bahnemann, Maria L. Torres-Mapa “Dual beam optical trapping in a 3D printed microfluidic system”, Israelkonferenz (2019), Hannover

T. Habib, C. Brämer, J. Ebbecke, **A. Enders**, S. Beutel, J. Bahnemann “3D-printed microfluidic chip for preparative chromatography” EuroMBR (2019), Braunschweig

Ina G. Siller, John-Alexander Preuß, Taieb Habib, **Anton Enders**, Katharina Urmann, Janina Bahnemann “Development of electrochemical and electromechanical aptasensors for bioprocess monitoring” Israelkonferenz (2019), Hannover

Sofia Arshavsky Graham, Niklas Maximilian Epping, **Anton Enders**, Leonid Galperin, Shanny Ackerman, Janina Bahnemann and Ester Segal “Integration of Porous Silicon Based Optical Aptasensors in a 3D-Printed Microfluidic Platform for Protein Detection” Israelkonferenz (2019), Hannover

Ina G. Siller, **A. Enders**, T. Steinwedel, J.-A. Preuß, J. Bahnemann “Biocompatibility studies of 3D-printed microfluidics” Lab-on-a-Chip and Microfluidics Europe (2018), Rotterdam

J.-A. Preuß, **A. Enders**, I. Siller, J. Bahnemann “Electrostatic Induction in 3D printed Microfluidic Devices” Lab-on-a-Chip and Microfluidics Europe (2018), Rotterdam

**Anton Enders**, Ina G. Siller, J.-A. Preuß, Janina Bahnemann “Comparative Study of 3D printed Microfluidic Mixers”, Lab-on-a-Chip and Microfluidics Europe (2018), Rotterdam

Ina G. Siller, **A. Enders**, S. Ahamed, T. Scheper, J. Bahnemann “Development of continuous microfluidic flow systems for transient transfection of CHO cells” Lab-on-a-Chip and Microfluidics (2017), San Diego USA

### **Buchkapitel**

Janina Bahnemann, **Anton Enders**, Steffen Winkler “Basic Concepts on 3D Cell Culture” – Kapitel: “Microfluidic systems and organ (human) on the chip” Springer Verlag (2021)

# Lebenslauf

## Zur Person

Name	Anton Enders
Anschrift	Am kleinen Felde 11 30167 Hannover
Geburtsdatum	15.1.1994
Geburtsort	Hildesheim

## Akademischer Werdegang

10/2012 bis 10/2015	Leibniz Universität Hannover, Bachelorstudiengang Life Science
20.01.2016	Bestandene Bachelorprüfung mit der Bachelorarbeit „Online Zelldichtebestimmung von <i>Pichia pastoris</i> Kultivierungen mittels in-situ Mikroskopie“ am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover
10/2015 bis 10/2017	Leibniz Universität Hannover, Masterstudiengang Life Science mit den Schwerpunkten Bioinformatik und Bioprozesstechnik
10/2017	Bestandene Masterprüfung mit der Masterarbeit „Design und Herstellung von 3D gedruckten Microfluidics für den Einsatz in der Zellkulturtechnik“ am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover
Ab 11/2017	Promotionsarbeit am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover

## Beruflicher Werdegang

11/2017 bis 03/2021	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover, DFG-Projekt im Emmy-Noether-Programm „Entwicklung von integrierten kontinuierlichen Fließsystemen für transiente Transfektion, Kultivierung und Überwachung von tierischen Zellen“
Seit 09/2021	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover, IGF-Projekt „VaMiSeP: Entwicklung einer variablen mikrofluidischen Sensorplattform zur Online-Prozessüberwachung miniaturisierter Bioreaktoren“