

**Erschließung der Mikrofluidsegmenttechnik für die  
umwelttoxikologische Untersuchung der synergistischen Wirkung  
potentieller Schadstoffkombinationen auf Mikro- und  
Kleinstorganismen**

---

# **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Ilmenau

von Diplom-Ingenieurin

**Anette Funfak**

geboren am 08. Januar 1979 in Plauen



---

## **Promotionskommission**

### **Vorsitzender:**

Prof. Dr. T. Klar

### **Gutachter:**

Prof. Dr. W. Bodemer

PD Dr. habil. A. Schober

Prof. Dr. J. M. Köhler

### **Mitglieder:**

Prof. Dr. T. Klar

Prof. Dr. W. Bodemer

PD Dr. habil. A. Schober

Prof. Dr. J. M. Köhler

PD Dr. habil. E. Zienicke

Dr. G. A. Groß

### **Tag des Rigorosums:**

15.06.2010

### **Tag der Verteidigung:**

15.06.2010

---

---

---

---

*It is a mistake to think  
you can solve any major problems  
just with potatoes.*

Douglas Adams, Life, the Universe, and Everything

*Für meine Eltern und meine Freunde*

---

---

---

## Zusammenfassung

Das Ziel der Promotionsarbeit bestand in der Entwicklung eines Mikrofluidsystems unter Anwendung der Methode des segmentierten Flusses zur Untersuchung der synergistischen Kombinationswirkung von potentiellen Umweltschadstoffen auf ausgewählte Modellorganismen. Dabei wurde die Einbringung verschiedener Modellorganismen ins Mikrofluidsystem, die Optimierung ihrer Kultivierbarkeit in den Mikro- bis Nanoliter großen Fluidsegmenten, die Erzeugung und Adressierung von mehrdimensionalen Konzentrationsfeldern, die Integration von Analyseeinheiten und Biosensoren sowie die Einzelwirkung von Chemikalien und die Kombinationswirkung binärer Stoffgemische untersucht.

Zur Klärung der Frage, welche Organismen für das Handling im Mikrofluidsystem geeignet sind, wurden zuerst Versuche mit Mehrzellern (Zebrafisch *Danio rerio*, Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*), prokaryotischen (Darmbakterium *Escherichia coli*) und eukaryotischen Einzellern (Hefe *Saccharomyces cerevisiae*), Humanzellen (HeLa-Zellen) sowie Grünalgen (*Chlorella vulgaris*) in den Mikrofluidsegmenten durchgeführt. Die optimalen Kultivierungsstrategien und die bestmögliche individuelle Anpassung an das Mikrofluidsystem konnte für die meisten der getesteten Modellorganismen durch Variation der Nährmedien, Kultivierungsbedingungen, dem Einsatz unterschiedlicher Schlauchgrößen- und materialien sowie durch eine an den Organismus angepasste Mikrofluidsegment-Generierung gefunden werden. Nach Auswahl der für das Mikrofluidmodell passenden toxikologischen Endpunkte (Wirkkriterien): Wachstum, Autofluoreszenz (EZFS), pH-Wert und GFP (green fluorescent protein)-Fluoreszenz, gelang deren simultane Analyse durch die kombinierte Integration eines optimierten Mikrodurchflussphotometers- und fluorimeters. Dadurch konnte ein kontinuierliches Monitoring der Mikrofluidsegmente zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten ermöglicht werden. Die Erfassung des segmentinternen pH-Wertes gelang durch die Integration von optisch aktiven Polymerbeads und deren fluorimetrischer Intensitätsanalyse. Die Segmenterzeugung in Silizium-Glas basierten Chips<sup>a</sup> gestaltete sich in Hinblick auf die schadstoffabhängige Oberflächenmodifizierung (Silanisierung der Kanalstruktur) als schwierig. Erst mit dem Einsatz von kommerziell erhältlichen PTFE (Polytetrafluorethylen)- und PEEK (Polyetheretherketone)-

---

<sup>a</sup> Herstellung IPHT Jena, <http://www.ipht-jena.de>.

Bauteilen<sup>b</sup> als Segmentierungsmodule gelang die problemlose Adressierung von Konzentrationsfeldern bei der Fluidsegmenterzeugung. Durch die Integration eines pulsationsfreien Spritzenpumpensystems (Cetoni GmbH) in das Mikrofluidsystem konnten die hoch aufgelösten Konzentrationseinstellungen in Reaktionsräumen mit Volumen von wenigen Mikro- und Nanolitern realisiert werden. Die Durchführung von toxikologischen Screenings der Einzel- und Kombinationswirkung ausgewählter Modellsubstanzen konnte über eigens geschriebene und speziell angepasste Steuerungs- und Auswertungsprogramme realisiert werden. Die Programme ermöglichten die Erzeugung und die Detektion ein- und zweidimensionaler Konzentrationsfelder in den Mikrofluidsegmenten.

Die Einbringung des Vertebraten *Danio rerio* in die Mikrofluidsegmente konnte im Vergleich zu den anderen untersuchten Modellorganismen nicht durch die spritzenpumpengesteuerte Injektion der Zellsuspension in eine inerte Trägerflüssigkeit realisiert werden. Für diesen Modellorganismus führte das abwechselnde Ansaugen der Probensuspension und der Trägerflüssigkeit zur erfolgreichen Integration der Zebrafischeier in die Mikrofluidsegmente. Für den Modellorganismus Zebrafisch gelangen erste phenotypische Screenings der Wirkung einer Modellsubstanz und deren Kombinationswirkung auf ausgewählte Endpunkte der embryonalen Entwicklung [1]. Die Endpunktbestimmung konnte über eine Methode der Bildanalyse anhand von Auflichtmikroskopie direkt in den Mikrofluidsegmenten realisiert werden.

Mit dem Einsatz von GFP-exprimierenden HeLa-Zellen gelangen erste Studien zur Untersuchung der Wirkung von Modellsubstanzen auf das Expressionsverhalten der Zellen. Sie ebnet den Weg für zukünftige Studien zur Erfassung der Wirkung von Umweltstress auf die Proteinsynthese von Humanzellen und der Aufklärung ihrer Wirkmechanismen in Mikro- und Nanofluidsegmenten.

Der Modellorganismus *Escherichia coli* erwies sich im Mikrofluidsystem als der am einfachsten handhabbare Modellorganismus und wurde deshalb zur Etablierung des Mikrofluidsystems für die toxikologischen Screenings von Einzel- und Kombinationswirkung ausgewählt. Die Erzeugung und Auswertung von hoch aufgelösten Dosis-Wirkungsbeziehungen von Umweltschadstoffen, Nanomaterialien und deren binärer Gemische konnte am Darmbakterium *E. coli* modellhaft untersucht werden. Es konnten Datensätze zur Einzelwirkung und Kombinationswirkung binärer Mischungen der Verbindungsklassen Vinylpyrrolidon, Sulfoxide, Phenole, Schwermetalle, Tenside, Metallnanopartikel und einem antibakteriellen

---

<sup>b</sup> Upchurch Scientific, <http://www.upchurch.com>; Bohlender, <http://www.bohlender.de>.

Decapeptid anhand der Endpunkte Wachstum, Autofluoreszenzsignal der Bakterien (EZFS) sowie der Änderung der Fluoreszenzintensität von pH-sensitiven Mikrobeads für den Modellorganismus gewonnen werden. Die Untersuchung der Einzelwirkungsscreenings ergaben gut reproduzierbare stoffspezifische Dosis-Wirkungsbeziehungen mit sigmoidalem Kurvenverlauf [2]. Durch die Integration von pH-sensitiven Mikrobeads gelang die Ermittlung des segmentinternen pH-Wertes während der zeit- sowie konzentrationsabhängigen Kultivierung von *E. coli* in Mikrofluidsegmenten [3].

Mit der Anpassung des Mikrofluidsystems zur Erzeugung von zweidimensionalen Konzentrationsfeldern in Mikrofluidsegmenten konnte die Untersuchung der Wirkung von binären Schadstoffgemischen ermöglicht werden. Vorwiegend synergistische und additive Wirkungsweisen wurden für die Kombinationswirkung der einzelnen Stoffgemische gefunden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Substanzen einer Verbindungsklasse nicht immer zwingend zu der erwarteten ähnlichen Wirkungsweise führen. Für subtoxisch wirkende Substanzen konnte eine Verstärkung der Hemmwirkung im binären Gemisch gefunden werden. Ein Vergleich der Wirkung unterschiedlicher Substanzen gelang durch die Bestimmung der minimalen Inhibierungskonzentration (MIC) und der mittleren effektiven Konzentration (EC50) aus den Dosis-Wirkungsbeziehungen der Einzelsubstanzen. Gute Reproduzierbarkeiten konnten für die Kombinationsmodelle binärer Mischungen gefunden werden.

Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Einbringung und Kultivierung unterschiedlicher Modellorganismen in Nano- und Mikrofluidsegmenten möglich ist, sondern auch die semiautomatische, kontinuierliche Erzeugung und Analyse von mehrdimensionalen Parameterfeldern. Damit wurde die Automatisierung von stark miniaturisierten hoch aufgelösten Einzel- und Kombinationswirkungs-Screenings möglich. Mit dem aktuellen Stand der Arbeit ist es noch nicht möglich. Die Aufklärung von Wirkmechanismen mit der segmentbasierten Mikrofluidik, deren Untersuchung auch für Standardverfahren eine Herausforderung darstellt, war hingegen nicht Gegenstand dieser Arbeit. Die Integration von Mikrobeads in die Mikrofluidsegmente gelang mit geringem Aufwand und ermöglichte die interaktionsfreie Analyse segmentinterner, toxikologischer Endpunkte. Die Vorteile der Mikrofluidtechnik und der Methode des segmentierten Flusses bieten nicht nur gute Möglichkeiten für die Miniaturisierung von Ökoteils und der Durchführung von hoch aufgelösten Hochdurchsatz-Screenings zur Untersuchung der Kombinationswirkung von Umweltschadstoffen, sondern sie liefern auch neue Einblicke in das Antwortverhalten von biologischen Systemen in stark volumenbeschränkten Umgebungen.

## Abstract

The aim of this work was the development of a microfluidic system using the segmented flow method for the investigation of synergistic effects of chemical mixtures to various model organisms. For that purpose the introduction of the different model organisms in the microfluidic system were investigated and the optimized cultivation conditions were adapted for the single organisms within the nano- and microfluid segments. Furthermore mono- and multidimensional fields of concentration were addressed in a high number of generated segments and analyzed by specially developed micro flow-through sensor and the integration of biosensors in the segments. At last, dose-response relationships of single model substances and their binary mixtures were investigated.

To answer the question, which model organism will be suitable for the handling in the microfluidic system, the applicability of various model organisms such as multicellular organisms (the zebrafish *Danio rerio* and the nematode *Caenorhabditis elegans*), procaryotic (the bacteria *Escherichia coli*) and eucaryotic (the yeast *Saccharomyces cerevisiae*) protozoa, human cells (the HeLa-cells) and green algae (the *Chlorella vulgaris*) were investigated for integration and cultivation in the microfluid segments. The optimal cultivation conditions and the best possible individual adaptation to the microfluidic system were achieved for most of the model organisms by optimizing the cultivation medium, cultivation conditions and using of different tube materials as well as sizes and an organism adapted segment generation.

The simultaneous analyses of the selected best applicable toxicological endpoints, growth (cell density), auto-fluorescence (ECFS), pH and green fluorescent protein (GFP) was realized by the combined integration of an optimized micro flow-through photometer and fluorometer. With this experimental approach, the continuously monitoring of the microfluid segments at different cultivation points in time became possible. Optically active polymer particles (sensorbeads) were integrated in the microfluid segments to perform in vitro analysis of pH changes. Any change in fluorescence signal of the sensorbeads was analyzed by the micro flow-through fluorometer.

The generation of segments inside silicon-glass chips<sup>a</sup> caused problems because of the necessary specific surface modification like different silanisations of the channel surface

---

<sup>a</sup> IPHT Jena, <http://www.ipht-jena.de>.

appropriate to the different model substances. Eventually, the application of commercial available segment-generator polymer components<sup>b</sup> provided a simple fine-tuning of concentration fields during the segment generation. The integration of nearly pulsation-free syringe pumps<sup>c</sup> within the microfluid system allowed high-resolved concentration settings in reaction chambers with volumes of few nano- and microliters. The processing of toxicological screenings for single substances and binary mixtures was realized by specially written and adjusted LabVIEW-programs for the control and analyses. Using these prerequisites, the generation and analyses of 1- and 2-dimensional concentration fields was possible within the microfluid segments.

Instead of segment generation through injection as it was done for the other model organisms; as to the vertebrate *Danio rerio*, the uptake in the microfluidic system was realized by syringe pump controlled alternating suction of sample suspension and carrier liquid. Initial phenotype screenings of a single model substance and the binary mixture were arranged for selected toxicological endpoints [1]. The image analysis of the endpoints was done within the microfluid segments by the integration of reflected-light microscopy.

The successful handling of DOX-induced GFP-expressing HeLa-cells in microfluid segments was proven. The first toxicological tests for a single model substance were carried out describing the influence on the expression characteristics of the cells. The results offered a promising way for the selective analyses of environmental stress-activated changes in protein synthesis inside nano- and microfluid segments.

The model organism *Escherichia coli* proved to be the best suited and the most easily integrable organism for the microfluid system. Therefore, *E. coli* was chosen to establish the microfluidic segment-based system for high-resolved toxicological screenings on different model substances and their binary mixtures. Hence, the performance of dose-response relations for various pollutants, nanomaterials and the binary mixtures had been proven exemplary with the bacterium *E. coli*. Data sets for single and combined effects were obtained for the chemical groups vinylpyrrolidones, sulfoxides, phenols, heavy metals, surfactants, metal nanoparticles and an antibacterial deca-peptide by choosing growth, auto-fluorescence (ECFS) of the bacteria and change of fluorescence signal of pH sensitive sensorbeads as toxicological endpoints. Highly reproducible and substance-specific dose-response relations were found [2]. With the integration

---

<sup>b</sup> Upchurch Scientific, <http://www.upchurch.com>; Bohlender, <http://www.bohlender.de>.

<sup>c</sup> Cetoni GmbH, <http://www.cetoni.de>.

of sensorbeads inside the microfluid segments, time- and concentration-resolved measurements of the segment-internal pH during the cultivation of *E. coli* were realized [3].

The adjustment of the microfluidic system for the generation of 2-dimensional concentration fields inside the microfluid segments allowed the investigation of the effects caused by the binary mixtures of the model substances. Predominantly synergistic and additive interactions were found for the individual binary mixtures. Furthermore, the results indicated that substances belonging to the same chemical group did not in any case lead to the supposed similar mode of action. An enhancement of the inhibition was found for substances used in subtoxic concentrations in the binary mixtures. The evaluation of MIC (minimal inhibition concentration)- and EC (effective concentration)-values by the dose-response functions for the single substances allowed the comparison between effect levels for different model organisms. The modelling of the combined effects of binary mixtures showed good reproducibility.

The presented segment-based microfluidic system was not only suitable for the integration and cultivation of selected model-organisms. It was also adapted for the semi-automated continuous generation and analyses of multidimensional parameter fields. With this strategy, the automatization of ultraminiaturized and highly resolved high-throughput screenings for single and combined effects of different model substances was possible. However, it could not yet experimentally shown what and how effect mechanism(s) would act; the task that is in principle difficult to achieve also in this type of microfluidic experiments. The simple introduction of sensorbeads within the microfluid segments allowed the interaction free monitoring of selected segment-internal toxicological endpoints.

The advantages of the microfluidic technology and the segmented flow method offer not only best solutions for the miniaturization of ecotoxicological tests and the performance of highly resolved High-Throughput Screenings, it also provides new insights to response pattern for biological systems in strongly reduced environments.

## Publikationen zur Dissertation / List of publications

### 2010

**A. Funfak**, J. Cao, A. Knauer, K. Martin and J. M. Köhler (2010), Analysis of synergistic effects of noble metal nanoparticles and a phenolic uncoupler using microdroplet-based two-dimensional screening, *Environmental Science and Technology*, submitted.

### 2009

**A. Funfak**, R. Hartung, J. Cao, K. Martin, K-H. Wiesmüller, O. S. Wolfbeis, and J. M. Köhler (2009), Highly resolved dose-response functions for drug-modulated bacteria cultivation obtained by fluorometric and photometric flow-through sensing in microsegmented flow, *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 142(1): 66-72.

**A. Funfak**, J. Cao, O. S. Wolfbeis, K. Martin, J. M. Köhler (2009), Monitoring cell cultivation in microfluidic segments by optical pH sensing with a micro flow-through fluorometer using dye-doped polymer particles, *Microchimica Acta*, 164 (3): 279 – 286.

### 2008

J. Lerchner, A. Wolf, H.-J. Schneider, F. Mertens, E. Kessler, V. Baier, **A. Funfak**, M. Nietzsch, M. Krügel (2008), Nano-calorimetry of small-sized biological samples, *Thermochimica Acta*, 477: 48–53.

### 2007

**A. Funfak**, A. Brösing, M. Brand and J. M. Köhler (2007), Micro fluid segment technique for screening and development studies on *Danio rerio* embryos, *Lab Chip*, 7(9):1132-8.

**A. Funfak**, M. Fischlechner, E. Donath, J. M. Köhler (2007), Fluorescence-Labelled Polymer Beads for Chemical Monitoring of Nanoliter Fluid Segments, Spring National Meeting Houston, TX.



---

## Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Motivation -----  | 1         |
| 1.2      | Umweltschadstoffe und Umweltmonitoring-----                                     | 3         |
| 1.3      | Konzepte und Modelle der Kombinationswirkung von Substanzgemischen -----        | 7         |
| 1.4      | Grundlagen der segmentbasierten Mikrofluidik -----                              | 10        |
| 1.5      | Applikationsfelder der segmentbasierten Mikrofluidik -----                      | 14        |
| 1.6      | Miniaturisierung von Ökotests -----   | 20        |
| 1.7      | Zielstellung-----   | 21        |
| 1.8      | Aufgaben-----   | 22        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden</b>  | <b>23</b> |
| 2.1      | Mikrofluidsystem-----   | 23        |
| 2.2      | Erzeugung von Konzentrationsgradienten in Mikrofluidsegmenten -----             | 29        |
| 2.3      | Toxikologische Endpunkte und Mikrobeads -----                                   | 30        |
| 2.4      | Bakterien im Mikrofluidsegment-----   | 32        |
| 2.4.1    | Eingesetzte Chemikalien, Nährmedien und Synthesevorschriften-----               | 32        |
| 2.4.2    | Einbringung und Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> -----                  | 36        |
| 2.4.3    | Toxizitätstests-----  | 36        |
| 2.5      | Hefe im Mikrofluidsegment -----   | 39        |
| 2.5.1    | Einbringung und Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -----          | 40        |
| 2.5.2    | Wachstumsstudien und Toxizitätstests-----                                       | 40        |
| 2.6      | Grünalgen im Mikrofluidsegment-----   | 41        |
| 2.6.1    | Kultivierung und Einbringung von <i>Chlorella vulgaris</i> -----                | 42        |
| 2.7      | Humanzellen im Mikrofluidsegment -----  | 43        |
| 2.7.1    | Eingesetzte Chemikalien, Nährmedien und Probenmischungen -----                  | 44        |
| 2.7.2    | Kultivierung und Einbringung von HeLa-Zellen -----                              | 45        |
| 2.7.3    | Toxizitätstests-----  | 47        |
| 2.8      | Mehrzeller im Mikrofluidsystem-----   | 48        |
| 2.8.1    | Eingesetzte Chemikalien, Nährmedien und Pufferlösungen-----                     | 49        |
| 2.8.2    | Einbringung und Kultivierung von <i>Caenorhabditis elegans</i> -Embryonen ----- | 50        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.8.3    | Einbringung und Kultivierung von <i>Danio rerio</i> -Embryonen                                      | 51        |
| 2.8.4    | Toxizitätsstudie am Zebrafisch  | 52        |
| 2.9      | Referenzversuche in Mikrotiterplatten   | 53        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse und Diskussion</b>  | <b>54</b> |
| 3.1      | Konzentrationseinstellung in Mikrofluidsegmenten  | 54        |
| 3.1.1    | Erzeugung von Blocksequenzen  | 54        |
| 3.1.2    | Kontinuierliche Erzeugung von Konzentrationsgradienten für das Einzelwirkungsscreening              | 56        |
| 3.1.3    | Kontinuierliche Erzeugung 2-dimensionaler Parameterfelder für die Kombinationsanalyse               | 58        |
| 3.2      | Entwicklung der Modellorganismen im Mikrofluidsegment   | 61        |
| 3.2.1    | Modellorganismus <i>E. coli</i>   | 61        |
| 3.2.2    | Modellorganismus <i>S. cerevisiae</i>   | 64        |
| 3.2.3    | Modellorganismus <i>C. elegans</i>  | 67        |
| 3.2.4    | Modellorganismus <i>D. rerio</i>  | 68        |
| 3.3      | Autofluoreszenzanalyse in Mikrofluidsegmenten anhand des Modellorganismus <i>Chlorella vulgaris</i> | 70        |
| 3.4      | Einzelwirkungsscreenings  | 72        |
| 3.4.1    | Modellorganismus <i>E. coli</i>   | 72        |
| 3.4.2    | Modellorganismus <i>S. cerevisiae</i>   | 83        |
| 3.4.3    | Modellorganismus <i>Danio rerio</i>   | 86        |
| 3.5      | Erfassung der Stoffwechselaktivität durch ins Mikrofluidsegment integrierte optische pH-Sensorbeads | 90        |
| 3.5.1    | Kalibrierung  | 90        |
| 3.5.2    | Segmentinterne pH-Erfassung in Wachstumsstudien und Toxizitätstests                                 | 93        |
| 3.6      | Antwortverhalten von DOX-induzierten HeLa-Zellen und Vitalitätsstudien im Mikrofluidsegment         | 98        |
| 3.6.1    | Signalerfassung DOX-induzierter HeLa-Zellen   | 98        |
| 3.6.2    | Vitalitätsstudien   | 101       |
| 3.7      | Kombinationsscreenings binärer Gemische im Mikrofluidsegment am Modellorganismus <i>E. coli</i>     | 105       |
| 3.7.1    | Binäres Gemisch von Metallnanopartikeln und Xenobiotika   | 106       |
| 3.7.2    | Binäres Gemisch von Metallnanopartikeln und Schwermetall  | 119       |
| 3.7.3    | Binäres Gemisch von Phenol und Schwermetall   | 120       |

---

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.7.4    | Binäres Gemisch von Phenolen-----   | 122        |
| <b>4</b> | <b>Schlussfolgerungen</b>   | <b>124</b> |
| 4.1      | Thesen-----   | 130        |
| <b>5</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>   | <b>133</b> |
| <b>6</b> | <b>Anhang</b>   | <b>142</b> |
| 6.1      | Versuchsprotokolle und Programme-----   | 142        |
| 6.1.1    | LabVIEW-Programme für die Konzentrationseinstellung im Mikrofluidsegment--<br>-----   | 142        |
| 6.1.2    | Protokoll: Untersuchung des Einflusses des synthetischen Nährmediums auf die<br>optischen Eigenschaften von Metallnanopartikeln-----  | 144        |
| 6.1.3    | Protokoll: Herstellung der Zellsuspension-----  | 145        |
| 6.1.4    | PCR-Protokoll-----  | 146        |
| 6.1.5    | Protokoll: Kultivierung von <i>E. coli</i> in Mikrofluidsegmenten:<br>Versuchsbedingungen für die Erzeugung von 1- und 2-dimensionalen<br>Konzentrationsfeldern mit Rampenprogrammen----- | 147        |
| 6.1.6    | LabVIEW-Programme zur Auswertung von 1- und 2-dimensionalen<br>Segmentsequenzen-----  | 153        |
| 6.1.7    | Protokoll: Wachstumsstudien und Toxizitätstests an <i>S. cerevisiae</i> in<br>Mikrofluidsegmenten-----  | 159        |
| 6.1.8    | Protokoll: Segmentierung und Verteilung von <i>Chlorella vulgaris</i> -----   | 160        |
| 6.1.9    | Protokoll: Versuch mit DOX-induzierten HeLa-Zellen-----   | 161        |
| 6.1.10   | Protokoll: Zellfärbung mit Live/Dead <sup>®</sup> Cell Stain Kit (P. Kiesel)-----   | 162        |
| 6.1.11   | Protokoll: Toxizitätstests anhand von HeLa-Zellen-----  | 163        |
| 6.1.12   | Protokoll: Isolierung <i>C. elegans</i> Embryonen aus Adulttieren-----  | 165        |
| 6.1.13   | Protokoll: Referenzversuche in Mikrotiterplatten-----   | 166        |
| 6.1.14   | Protokoll Silanisierung-----  | 167        |
| 6.2      | Standardmethoden und Geräte-----  | 168        |
| 6.2.1    | Differentielles Zentrifugales Sedimentationssystem (DCS)-----   | 168        |
| 6.2.2    | UV/VIS-Spektrometrie-----   | 169        |
| 6.2.3    | Dunkelfeldmikroskopie-----  | 169        |
| 6.2.4    | Rasterelektronenmikroskopie-----  | 169        |
| 6.2.5    | Transmissionselektronenmikroskopie-----   | 170        |
| 6.3      | Blockweise Konzentrationseinstellung in Mikrofluidsegmentsequenzen-----   | 171        |
| 6.4      | 2D-Konzentrationseinstellung in Mikrofluidsegmentsequenzen-----   | 172        |

---

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 6.5    | Korrektur des durch additive Überlagerung der Farbstoffspektren bedingten Konzentrationsfehlers-----          | 175 |
| 6.6    | Abhängigkeit der Grenzflächenspannung von der Zelldichte -----  | 177 |
| 6.7    | Kalibrierungskurven für HPTS/p-HEMA-Mikrobeads im Segment -----   | 178 |
| 6.8    | Referenzversuche in Erlenmeyerkolben: pH-Wert Messung während der Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> ----- | 179 |
| 6.9    | Sauerstoffsensitive Mikrobeads und Gaspermeabilität der Polymerschläuche -----                                | 180 |
| 6.10   | Dichteanpassung in Mikrofluidsegmenten -----  | 182 |
| 6.11   | Referenzversuche in Kulturflaschen: Wirkung von CuCl <sub>2</sub> auf HeLa-Zellen-----                        | 183 |
| 6.12   | Referenzversuche in Kulturflaschen: Wirkung von B21 auf HeLa-Zellen -----                                     | 184 |
| 6.13   | Größenverteilung Metallnanopartikel-DCS Messung -----   | 185 |
| 6.14   | Konzentrationsberechnung für Metallnanopartikel -----   | 187 |
| 6.15   | Einfluss von synthetischem Medium auf die Absorptionsbanden von Metallnanopartikeln-----                      | 189 |
| 6.16   | Abkürzungsverzeichnis -----   | 190 |
| 6.17   | Wissenschaftliche Veröffentlichungen-----   | 192 |
| 6.17.1 | Zeitschriften-Beiträge-----   | 192 |
| 6.17.2 | Vorträge-----   | 193 |
| 6.17.3 | Poster -----  | 193 |
| 6.18   | Lebenslauf-----   | 195 |
| 6.19   | Danksagung-----   | 197 |
| 6.20   | Selbstständigkeitserklärung-----  | 200 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation

In den vergangenen Jahren sind sehr viele Substanzen auf ihre Umweltwirkung untersucht und zahlreiche umweltschädliche Chemikalien identifiziert worden. Mit der Entwicklung eines besseren Umweltbewusstseins und einer strengen Umweltgesetzgebung fand auch eine wesentliche Verbesserung von Industrieanlagen und Transportmitteln statt und der Umgang mit Agrar-, Industrie- und Haushaltschemikalien ist immer verantwortungsbewusster geworden. Der Einsatz vieler als giftig bekannter oder neu als giftig erkannter Stoffe wurde eingeschränkt oder gänzlich unterbunden. Dennoch sind von den 100000 chemischen Substanzen, die sich europaweit kommerziell im Einsatz befinden, nur ca. 3000 auf ihre gesundheitlichen Folgen untersucht. Dazu kommt, dass jährlich mehr als 1000 neue Verbindungen in den Handel kommen und in den meisten Fällen auch in Kontakt mit der Umwelt gelangen [4-8]. Die 2006 verabschiedete EU-Chemikalienverordnung REACH zur Registrierung, Evaluierung und Autorisierung von chemischen Substanzen macht ebenfalls die bestehende Notwendigkeit der Erfassung und Bewertung von Umweltchemikalien durch umfangreiche Tests deutlich<sup>a</sup>. Trotz der modernen Umweltdiagnostik, die häufig den Nachweis von Chemikalien in sehr niedrigen Konzentrationen erlaubt, ist es schwierig Informationen über die Wirkungen von Substanzen im Niedrigdosisbereich zu erhalten. Mag die Einzelwirkung von Substanzen im Niedrigdosisbereich auch als eher unkritisch angesehen werden, bleibt die Frage nach der Kombinationswirkung solcher Substanzen und Umweltchemikalien im Allgemeinen offen [9-11].

Obwohl Mensch und Umwelt täglich einem multiplen Gemisch an Umweltchemikalien ausgesetzt sind, erfolgt die Risikoabschätzung und die Risikobewertung immer noch für Einzelsubstanzen [12,13]. Die Untersuchung und Bewertung der Kombinationswirkung von Chemikalien ist ein sehr junges Forschungsgebiet, welches noch am Anfang steht. Die Frage nach der Kombinationswirkung rückt aber verstärkt ins Blickfeld der Öffentlichkeit und erste Forderungen zur Berücksichtigung von Kombinationswirkungen bei der Risikobewertung werden laut<sup>b</sup>. Das weist auf die Präsenz und Aktualität dieser Thematik hin.

---

<sup>a</sup> Bündnis 90 Die Grünen, Positionspapier Chemie und Umweltgesundheit: Umweltkrank durch Chemikalien?, 16/229, 08/2009,

[http://www.gruene-bundestag.de/cms/publikationen/dokbin/298292.reader\\_chemie\\_und\\_umweltgesundheit.pdf](http://www.gruene-bundestag.de/cms/publikationen/dokbin/298292.reader_chemie_und_umweltgesundheit.pdf)

<sup>b</sup> PAN Germany, Warum Risikobeurteilungen auch für Mischungen von Stoffen notwendig sind, Langfassung, 2005,

Die Erhebung von repräsentativen Datensätzen zu synergistischen bzw. kompensatorischen Wirkungen von Umweltfaktoren auf Organismen ist sehr komplex und gestaltet sich schwierig. Problematisch für die praktische Lösung des Problems, also für die Beurteilung der Wirkung von Schadstoffkombinationen, bleibt die Größe des mehrdimensionalen Parameterfeldes, welches in die entsprechenden Untersuchungen einbezogen werden muss. Die Komplexität des Problems macht wissenschaftliche Untersuchungen im Rahmen der konventionellen Laborpraxis kompliziert und stellt hohe Anforderungen an die bereits existierenden Standardmethoden [14-16].

Miniaturisierte High-Throughput Technolgien könnten eine Schlüsselrolle für die schnelle, sensitive und reproduzierbare Analyse von Kombinationswirkungen spielen. Das Potential der Mikroreaktionstechnik und der Methode des segmentierten Flusses für eine schnelle und stark volumenreduzierte Adressierung von mehrdimensionalen Konzentrationsfeldern zur Analyse von Kombinationswirkungen potentieller Umweltschadstoffe soll in dieser Promotionsarbeit untersucht werden.

## 1.2 Umweltschadstoffe und Umweltmonitoring

Holdgate beschrieb in seinem Buch "A perspective of environmental pollution" (Cambridge University Press, 1997) die **Umweltverschmutzung** als das vom Menschen verursachte Einbringen von Energie oder Substanzen in die Umwelt, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Gefährdung der menschlichen Gesundheit, von Ressourcen und Ökosystemen, Gebäuden und Erholungsgebieten oder der legitimen Nutzung der Umwelt führt. Erkannt wurde die mit der wirtschaftlichen Entwicklung einhergehende Umweltproblematik um 1975, was zu einem neuen Umweltbewusstsein und zur heutigen Umweltgesetzgebung führte. Fast alle Substanzen besitzen das Potential sich schädigend auszuwirken, wenn sie "im Übermaß oder zur falschen Zeit am falschen Ort vorhanden sind" [7]. Das ständig wachsende Umweltbewusstsein und die ansteigende Anwendung synthetisch hergestellter Chemikalien führte zu der verstärkten Forderung nach Aufklärung der Öffentlichkeit über Schadstoffe in Lebensmitteln, Trinkwasser, Luft und Boden [17,18]. Hinter der Bezeichnung **Xenobiotika** (griech.: dem Leben fremde Stoffe) versteht man "**man-made chemicals**", also Substanzen die naturfremd sind und durch menschliches Zutun in die Umwelt gelangen [19,20]. Die Einteilung von Umweltschadstoffen erfolgt in **primäre und sekundäre Schadstoffe**. Während die primären Schadstoffe nach Emission in die Umwelt eine direkte Wirkung verursachen, kann es bei den sekundären Schadstoffen erst durch chemische Prozesse zur schädigenden Wirkung kommen. So wirken Umweltschadstoffe direkt und indirekt auf die Umwelt. Zu den "**klassischen**" **Umweltschadstoffen** zählen *Schwermetalle* wie z.B. Zink, Kupfer, Blei, Chrom, *anorganische Schadstoffe* wie z.B. Cyanide, Brom, Stickoxide (NO<sub>x</sub>), Schwefeloxide (SO<sub>x</sub>), *aromatische Kohlenwasserstoffe* wie z.B. Benzole, *organische Halogenverbindungen* (chlorierte Kohlenwasserstoffe wie z.B. Chlorphenole und polychlorierte Biphenyle [PCB], chlorhaltige Pestizide, Dioxine und Furane, Fluorchlorkohlenwasserstoffe [FCKWs]) oder andere organische *Verbindungen* wie Phenole, Cyclohexan, Benzin, Erdöl, CH<sub>4</sub> und Terpene [6,7].

In dem UN/ECE-Übereinkommen über weiträumige, grenzüberschreitende Luftverunreinigungen wurde 1998 das Protokoll über **persistente organische Verbindungen (POP)** unterzeichnet, mit dem Ziel die Herstellung und den Einsatz bestimmter POPs einzuschränken oder zu verbieten. Die zahlreichen Vertreter dieser Schadstoffgruppe haben gemein, dass sie nur sehr langsam abgebaut werden, sich in der Umwelt anreichern, dort über Jahrzehnte verbleiben und eine hohe Bioakkumulation vorwiegend im Fettgewebe aufweisen. Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften können sie auf atmosphärischem Wege über weite

Strecken transportiert werden. Zu den POP's zählen z.B. chlorierte Verbindungen wie die Pestizide Aldrin, DDT, Toxaphen oder Chlordan, Industriechemikalien wie PCB und deren unerwünschte Nebenprodukte wie die Dioxine<sup>a</sup> [6,21].

Neben dem großen Nutzen der "man-made chemicals" für die Menschheit, darf ihr Einfluss auf Mensch und Natur nicht außer Acht gelassen werden. So erlangten z.B. die Nebenprodukte von Industriechemikalien, die Dioxine, traurige Berühmtheit bei dem bisher größten Chemieunfall in Europa. Ein Reaktor der chemischen Fabrik Icmesa nahe der italienischen Gemeinde Seveso setzte eine Wolke der Substanz 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (bekannt als: Sevesodioxin) frei, welche 1800 Hektar Land vergiftete. Pflanzen- und Tiersterben sowie das Auftreten schwerer Chlorakne beim Menschen waren die Folgen. Die Katastrophen von Seveso, Bhopal und Sandoz zeigen, wie wichtig Umweltmonitoring, Risikobewertung und Prävention sind.

Die verstärkte Emission neuer Synthesestoffe, aber auch die Weiterentwicklung analytischer Methoden führten zur Erfassung von "**neuen Schadstoffen**" (emerging pollutants), welche in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus der Umweltforschung rückten. Unter den Begriff der neuen Schadstoffe fallen verschiedene Substanzgruppen wie z.B. Arzneimittelwirkstoffe, Dioxin ähnliche PCB's, endokrin wirksame Substanzen, Moschusduftstoffen, Organophosphorflammschutzmittel, perfluorierte Verbindungen, Antibiotika und Platin. Für diese Substanzgruppen fehlen häufig die Daten für eine Risikoabschätzung und EU-weite Umwelt-Monitoringprogramme für deren Erfassung<sup>b</sup> [22]. Auch das stark ansteigende Interesse an der Nanotechnologie und damit an **Nanomaterialien** und deren Produkten führen seit jüngster Zeit zu Diskussionen über mögliche Risiken. Nanomaterialien sind inzwischen neben dem Einsatz in Lacken und Medikamenten auch in kosmetischen Produkten, Lebensmitteln und Bedarfsgegenständen zu finden. In Kosmetika werden Nanomaterialien z.B. in Form von Titandioxid- und Zinkoxid-Nanopartikeln als UV-Filter in Sonnencremes, Biokomposite in Zahncremes sowie Nanokapseln und Fullerene in Hautpflegeprodukten eingesetzt. Große Diskussionen sind über den Einsatz von Nanomaterialien in Lebensmitteln entfacht. Der Einsatz von **Nanopartikeln** (Partikel deren räumliche Ausdehnung in allen drei Raumrichtungen Abmessungen unter 100 nm aufweist) zur Entwicklung von "Novel Foods" mit veränderten Aussehen, Geschmack und Konsistenz wird von den EU-Gesundheitspolitikern mit Vorsicht

---

<sup>a</sup> Bayrisches Landesamt für Umwelt;

[http://www.lfu.bayern.de/analytikstoffe/fachinformationen/analytik\\_org\\_stoffe\\_pop/index.htm](http://www.lfu.bayern.de/analytikstoffe/fachinformationen/analytik_org_stoffe_pop/index.htm)

<sup>b</sup> Umweltbundesamt; <http://www.umweltbundesamt.at/umweltschutz/umweltanalytik/schadstoff/empoll/>

gesehen, ist aber in den USA bereits für einige Produkte zugelassen. Weitere Einsatzgebiete von Nanomaterialien liegen in der Verpackungs- und Textilindustrie. Silber-Nanopartikel werden z.B. in Schuhsohlen und in Bekleidungstextilien aufgrund der antimikrobiellen Wirkung und als schmutzabweisende Oberflächen eingesetzt. Über die gesundheitlichen Risiken von Nanopartikeln und die Wirkung von in die Umwelt gelangenden Nanomaterialien ist noch wenig bekannt<sup>cde</sup> [23-27].

Am 1.07.2007 trat das neue europäische Chemikalienrecht **REACH** in Kraft mit dem Ziel der Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe. Bis 2012 sollen 30000 von 100000 Substanzen bewertet und dem Verbraucher zum verbesserten Schutz durch Datentransparenz erkenntlich gemacht werden<sup>f</sup>. Die **SIN-Liste** (Substitute It Now) umfasst bereits 356 Substanzen (Stand Oktober 2009), welche auf Grundlage der EU-Chemikalienrichtlinie als höchst bedenklich gelten. Die Substanzen auf dieser Liste sollen so schnell wie möglich durch "sichere" Alternativen ersetzt werden<sup>g</sup>.

Mit diesen neuen Regelungen werden **Umweltmonitoringprogramme** in der Zukunft immer mehr an Bedeutung gewinnen. Ziel von Biomonitoring und Human-Biomonitoring ist die Erfassung von Schadstoffen und deren Wirkung. Damit sollen Messergebnisse bereitgestellt werden, auf deren Grundlage eine Bewertung erfolgen kann<sup>h</sup>. Die Basis der klassischen **Risikobewertung** bilden Gefährdungsidentifizierung, die Erstellung von Dosis-Wirkungsbeziehungen und die Expositionsbewertung. Die Interpretation und Integration der Daten führt zur Risikocharakterisierung. Das Risiko ist demnach eine Funktion von Gefährdungsidentifizierung und Exposition.

Die Untersuchung der Effekte einer Substanz wird anhand von biologischen Parametern, den so genannten **toxikologischen Endpunkten**, ermittelt. Als statistische Werte zur Beschreibung der Toxizität eines bestimmten Stoffes dienten bislang die **LD50** (Letale Dosis)- und **LC50** (Letale Konzentration)-Werte. In heutigen Toxizitätsstudien wird vermehrt die Dosis einer

---

<sup>c</sup> EU-Gesundheitspolitiker mahnen zur Vorsicht in Sachen Nano-Food, 22.03.2009; <http://www.europarl.europa.eu>

<sup>d</sup> BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung), Kommunikation über Nanotechnologie aktiver gestalten, 23/2006, <http://www.bfr.bund.de/cd/8247>

<sup>e</sup> BfR, Nanotechnologie-Einsatz, Trends und Risiken, 09/2006, <http://www.bfr.bund.de/cd/7720>

<sup>f</sup> REACH: Die neue Chemikalienpolitik in Europa, Verbraucherinfo, BfR, 2007, [http://www.bfr.bund.de/cm/238/reach\\_die\\_neue\\_chemikalienpolitik\\_in\\_europa.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/238/reach_die_neue_chemikalienpolitik_in_europa.pdf)

<sup>g</sup> CHEMSEC, <http://www.sinlist.org>

<sup>h</sup> Bündnis Grüne, Positionspapier zum stoffbezogenen Umweltmonitoring, 2007, [http://www.oekochemie.tu-bs.de/ak-umweltchemie/startseite/doc/arbeitskreise/Positionspapier\\_AK\\_Umweltmonitoring.pdf](http://www.oekochemie.tu-bs.de/ak-umweltchemie/startseite/doc/arbeitskreise/Positionspapier_AK_Umweltmonitoring.pdf)

Substanz gesucht, die noch keine schädliche Wirkung hervorruft (**NOAEL**, no observed adverse effect level o. lowest observed adverse effect level). Aufgrund des hohen zeitlichen und materiellen Aufwandes solcher Ermittlungen, wird dafür verstärkt auf mathematische Extrapolationsverfahren zurückgegriffen. Bei der Übertragbarkeit der aus Ökotoxikationsversuchen gewonnenen Dosisangaben auf den Menschen, muss überprüft werden, inwieweit diese Dosen dieselben oder ähnliche Wirkungen verursachen. Das neue europäische Chemikalienrecht (REACH) fordert flexiblere Bewertungsstrategien anstelle des bisher existierenden starren Prüfsystems<sup>i</sup> [16,28,29]. Bei der Auswahl der Modellsubstanzen für die Anwendung im Mikrofluidsystem, wurde sich für Substanzen entschieden, für die bereits eine Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten zur Verfügung steht. Damit sollte eine einfachere Etablierung des Modellsystems für Ökotoxikationsversuche und eine gute Vergleichbarkeit mit bereits vorhandenen Ergebnissen ermöglicht werden. Weiterhin wurden für die einfache Integration der Methode bevorzugt hydrophile Substanzklassen eingesetzt. Damit konnte die Komplexität der Untersuchungen reduziert und eine vereinfachte Durchführbarkeit ermöglicht werden. Es wurden Modellsubstanzen aus den Verbindungsklassen Phenole, Sulfoxide, Tenside, Polyvidone aber auch Stimulanzien wie Coffein und Adrenalin sowie ein antibakterielles Peptid-Amid eingesetzt. Toxikologische Untersuchungen der Effekte von Nanopartikeln in Mikrofluidsystemen und in mikrofluidsegmentgestützten Verfahren sind rar. Ebenfalls sind die Forschungen zur Toxikologie von Nanomaterialien mit konventionellen Methoden erst in jüngster Zeit intensiviert wurden. Mit der Untersuchung von Silber- und Goldnanopartikeln in Mikrofluidsegmenten werden sich zusätzliche und neue Erkenntnisse zur ökotoxikologischen Wirkung von Nanopartikeln auf biologische Systeme in stark miniaturisierten Reaktionssystemen versprochen. Dabei sollten die Vorteile der Methode des segmentierten Flusses gegenüber konventionellen ökotoxikologischen Standardmethoden hinsichtlich der Erzeugung von hoch aufgelösten Konzentrationsfeldern und der Reduzierung von biologischen Systemen genutzt werden.

---

<sup>i</sup> GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit), Informationspapier, Human-Biomonitoring-Verfahren der Risikobewertung von Umweltchemikalien, 2007, [http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/infostelle-humanbiomonitoring/pdf/Verfahren\\_Risikobewertung.pdf](http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/infostelle-humanbiomonitoring/pdf/Verfahren_Risikobewertung.pdf)

### 1.3 Konzepte und Modelle der Kombinationswirkung von Substanzgemischen

Das Interesse an der Kombinationswirkung von Substanzgemischen ist gegenwärtig nicht nur in der Toxikologie stetig angestiegen, sondern hat vermehrt Anklang in der Öffentlichkeit gefunden. Längst wurde nachgewiesen, dass das Zusammenspiel mehrerer Substanzen in subtoxischen Dosen durchaus toxische Wirkungen hervorrufen kann. Trotz dieser Erkenntnisse ist die Erfassung und Bewertung von Kombinationswirkungen immer noch mangelhaft. Die Risikobewertung in der Toxikologie zur Abschätzung von gesundheitlichen Risiken für den Menschen erfolgt fast ausschließlich über die Erhebung der Expositionsdaten von Einzelchemikalien [30].

Zur Beschreibung von Kombinationswirkungen haben sich in der Toxikologie zwei Vorhersagekonzepte durchgesetzt. Die Konzepte der **Konzentrationsadditivität** (dose additivity nach Loewe und Muischnek, 1926 [31]) und der **unabhängigen Wirkung** (independence nach Bliss, 1939 [32]) werden als allgemein begründet angesehen [33]. Im Falle der *Konzentrationsadditivität* werden ähnliche Wirkungsmechanismen und Wirkungsweisen der kombinierten Substanzen angenommen. Das Konzept beruht auf der Annahme, dass sich bei Ersatz einer Substanz A durch eine Substanz B der Effekt nicht ändert, d.h. die Addition der Konzentrationen beider Substanzen denselben Effekt auslösen. Die Eignung dieses Konzeptes konnte nicht nur für ähnlich wirkende Chemikalien, sondern auch für Chemikalien mit nicht ähnlichen Wirkungsmechanismen demonstriert werden [34]. Das Konzept der *unabhängigen Wirkung* geht dagegen von der Annahme unähnlicher Wirkung in einem Stoffgemisch und damit von der Auslösung gemeinsamer Effekte durch Interaktion der Substanzen an unterschiedlichen Wirkorten und über unabhängige Wirkketten aus. Beim Konzept der *Konzentrationsadditivität* werden Effektkonzentrationen betrachtet. Hier ist es notwendig, die Dosis-Wirkungsbeziehungen der Einzelsubstanzen zu kennen, wogegen beim Konzept der *unabhängigen Wirkung* die Effekte betrachtet werden und damit die Erfassung von Dosis-Wirkungsverläufen der Einzelsubstanzen nicht zwingend notwendig ist. Die prinzipielle Tauglichkeit beider Konzepte konnte experimentell belegt werden, dennoch ist das Verständnis von ähnlicher und unähnlicher Wirkung weitgehend unklar [35]. Es gibt unterschiedliche Vorstellungen über das Wirken von Substanzen. Nach Berenbaum wird von ähnlicher Wirkung der in der Umwelt auftretenden Chemikalien als Regelfall ausgegangen und die unähnliche Wirkung als Spezialfall der *Konzentrationsadditivität* angesehen [36-38]. Nach Streffer et al. dagegen wird das Auftreten von ähnlicher Wirkung als Regelfall angezweifelt und die primäre Bedeutung dem Konzept der

*unabhängigen Wirkung* zugesprochen [39]. Die Einteilung von Chemikalien in Gruppen nach ähnlicher oder unähnlicher Wirkung gestaltet sich immer noch schwierig, da ungenügend Informationen über die Spezifität ihre Wirkungsmechanismen vorliegen.

Als ein drittes Konzept zur Beschreibung von Kombinationswirkungen gilt die **Effektsummation** (effect (response) additivity). *Effektsummation* beschreibt die arithmetische Summe der Einzeleffekte als rationale Erwartung für den Gesamteffekt. Diese Betrachtungsweise zeigt erhebliche Mängel und wird allenfalls als Spezialfall zu erwarten sein<sup>a</sup>. Neben den unterschiedlichen Konzepten im Forschungsfeld der Kombinationswirkungsanalyse kommt die uneinheitliche Terminologie als erschwerender Faktor bei der Ergebniskommunikation hinzu. Eine erwartete Mischungstoxizität aus den Einzeleffekten wird als **Summation** (auch: Additivity, Independence, Zero Interaction) bezeichnet. Die Abweichung von den Erwartungswerten aus den Einzeleffekten in Form einer Wirkungsverstärkung wird als **Synergismus** (auch: Enhancement, Potentiation, Synergism, Superadditivity) und einer Wirkungsabschwächung als **Antagonismus** (auch: Non-Interaction, Antagonism, Potentiation, Subadditivity, No Addition) bezeichnet [40,41]. In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Modellen zur Beschreibung von Kombinationwirkungen [42,43]. Beispiele die sich auf das Konzept der *unabhängigen Wirkung* stützen sind Effect Multiplication [44,45] und Joint Independent Action [46]. Isobolographie [31], Toxic Unit Summation [47], Additivity Index [48] und Simple Similar Action [32] beziehen sich auf das Konzept der *Konzentrationsadditivität*. Das Verfahren der Isobolographie ist aufgrund seiner illustrativen Form immer noch von Bedeutung bei der Analyse von Kombinationswirkungen, beschränkt sich aber ausschließlich auf die Beschreibung von binären Gemischen (s. Kapitel 3.7).

Die Unterscheidung von **einfacher** und **komplexer Mischung** spielt eine entscheidende Rolle für die Kombinationswirkungsanalyse. Während eine *einfache Mischung* eine Anzahl von bis zu 10 Chemikalien (z.B. Pestizidmischung) beschreibt, kann eine *komplexe Mischung* bis zu Eintausend Chemikalien (z.B. Trinkwasser, Arbeitsplatzatmosphäre) umfassen. Für die zwei Klassifizierungen von chemischen Mischungen sind unterschiedliche Gefahrenbewertungen entwickelt worden [49].

---

<sup>a</sup> PAN Germany, Warum Risikobeurteilungen auch für Mischungen von Stoffen notwendig sind, Stellungnahme des Pestizid Aktions-Netzwerkes e.V. (PAN Germany) zu Kombinationswirkungen von Pestiziden, Langfassung, 2005, [http://www.pan-germany.org/download/stellungnahme-kombi\\_wirk\\_kurz.pdf](http://www.pan-germany.org/download/stellungnahme-kombi_wirk_kurz.pdf)

Mit der in dieser Dissertation beschriebenen Auslegung der Methode des segmentierten Flusses für die Untersuchung von Kombinationswirkungen auf unterschiedliche Modellorganismen sollte ein neuer, effizienterer Weg zur Datenerfassung im Nanolitermaßstab für die Bewertung von Chemikaliengemischen beschrieben werden. Die Anpassung der Methode erfolgte zunächst für binäre Substanzgemische, wobei die hierbei gewonnenen Ergebnisse die Basis für zukünftige Analysen von komplexeren Mischungen bilden sollen. Das entwickelte Mikrofluidsystem soll der Unterstützung konventioneller Standardmethoden durch die Lieferung zusätzlicher Informationen über Effektkonzentrationen aber auch mit neuen Erkenntnissen im Antwortverhalten stark vereinzelter biologischer Systeme dienen.

## 1.4 Grundlagen der segmentbasierten Mikrofluidik

Das Interesse an Emulsionen, also fein verteilten Gemischen von nicht mischbaren Flüssigkeiten, ist seit Rayleighs Untersuchungen zum Kapillar-Phänomen an Düsen [50] stetig gestiegen und wurde 1934 von Taylor (Taylor Dispersion) etabliert [51]. Ein Teilgebiet der Mikrofluidik, welches diese Phänomene nutzt, ist die "digitale" **segmentbasierte Mikrofluidik** (engl.: segmented flow aber auch droplet-based microfluidics, plug-based microfluidic). Grundidee dieses Verfahrens ist der Einsatz vieler einzelner, voneinander abgetrennter Reaktionsräume, die so genannten **Mikrofluidsegmente** (engl.: microfluid segments, droplets, microdroplets, plugs), mit sehr kleinen Reaktionsvolumina für biologische, biochemische und chemische Untersuchungen.

Die Anwendung des Prinzips des kontinuierlichen, segmentierten Fluss wurde bereits 1954 in den von L. Skeggs entwickelten Autoanalyzern realisiert, welche nach ihrer Markteinführung 1957 bedeutende Fortschritte in der medizinischen Labortechnik brachten und vermehrt industrielle Abnehmer fanden [52]. Basis der neuartigen Analyse bildete die Teilung eines kontinuierlichen Probenstromes in einzelne Probenkompartimente durch Injizierung von Luftblasen. Damit konnte der Probendurchsatz erheblich gesteigert werden. Die **ASCF** (Air-Segmented Continuous Flow)-Technik stand mit der um 1974 eingeführten **FI** (Flow Injection)-Technik in Konkurrenz, deren Prinzip auf einem nicht segmentierten, kontinuierlichen Probendurchsatz basierte. Im Gegensatz zur FI-Technik ermöglichte die ASCF-Technik eine Minimierung der longitudinalen Dispersion. Keine der beiden Methoden konnte sich als die universelle Methode hervorheben. Das führte zur Entwicklung verschiedener Hybrid-Techniken, wie zum Beispiel die **MCF** (Monosegmented Continuous Flow)-Technik oder die **ASFI** (Air-Segmented Flow Injection)-Technik [53].

Neben dem Einsatz von **Gas/Flüssig-Zweiphasensystemen** (nach R.F. Ismagilov et al. werden auf diese Weise generierten Segmente als "slugs" bezeichnet) in der segmentbasierten Mikrofluidik steht der Einsatz von **Flüssig/Flüssig-Zweiphasensystemen** (Bezeichnung nach R.F. Ismagilov et al. "plugs") [54]. Die Erzeugung der diskreten Reaktionsvolumen erfolgt hierbei durch Injektion von wässrigen Lösungen oder Suspensionen in inerte Trägerflüssigkeiten. Solche nichtmischbaren Phasen sind zum Beispiel Wasser/Öl oder Wasser/Perfluorierte Alkane.

Die Stärke der segmentbasierten Mikrofluidik liegt in der Unterbindung von Dispersionseffekten, welche in homogenen Phasen auftreten, der Erzeugung einer großen Anzahl von monodispersen Reaktionsräumen im Nano- und Mikroliterbereich, den hohen

Oberflächen/Volumen-Verhältnissen, den kurzen Wärme- und Massetransferzeiten sowie den aus den kurzen Diffusionszeiten resultierenden, hohen Prozeßgeschwindigkeiten [55-57]. Die in der Mikrofluidik auftretenden laminaren Strömungsverhältnisse (Reynoldszahlen in der Mikrofluidik: meistens  $Re < 1$  [58]) der homogenen Phase führen zu einer schlechten Durchmischung in den Mikrofluidsystemen. Entsprechend sind die Integration von Mischungsstrecken oder Verfahren wie die hydrodynamische Fokussierung notwendig. Der Einsatz heterogener Phasensystemen (Zwei- oder Mehrphasensysteme) erlaubt dagegen eine schnelle Durchmischung. Ursache dafür ist ein rezirkulierender Fluss, welcher durch Scherkräfte, hervorgerufen durch Ausgleichströmungen aufgrund der Aufrechterhaltung der Phasengrenzen, induziert wird [59]. Durch die vollständige Einbettung der Mikrofluidsegmente in den Trägerstrom bietet die Methode außerdem eine Unterdrückung von Verdunstungs- und Benetzungseffekten, welche bei offenen Mikrofluidsystemen sowie Nano- und Mikrotiterplatten ein Problem darstellen [55].

Eine wichtige Rolle bei der Erzeugung von **Mikrofluidsegmenten** spielen die Viskositätskräfte, die Oberflächen/Grenzflächen-Chemie und die Kanalgeometrien. In den letzten Jahren wurden verschiedene Techniken zur Erzeugung von Segmentsequenzen eingeführt. In Shia-Yen Teh, 2008, werden Techniken wie die **T-Verbindung** (engl.: T-junction) als einfachstes Mikrofluid-Bauteil, die **Fluss-Fokussierung** (engl.: Flow-focusing) und **DEP**- (dielectrophoresis) sowie **EWOD**- (electrowetting on dielectric) basierende Techniken vorgestellt [56]. Grundsätzlich wird zwischen zwei Formen von Bauteilen unterschieden: die kanal- (engl.: **channel based**) und die flächenbasierenden (engl.: **surface based**). Zur Erzeugung und Manipulation von Segmenten werden unterschiedliche Kontrollmechanismen wie Druck, Flussrate, Viskosität, elektrische Kraft, Zentrifugalkraft und akustischen Wellen (SAW) eingesetzt.

Die kanalbasierenden Techniken arbeiten meistens druckgetrieben, während die flächenbasierenden Techniken durch **SAW** und **EWOD**-Verfahren kontrolliert werden können. Die Nachteile der flächen-basierenden Techniken liegen in der schnellen Verdunstung der geringen Probenvolumina und der geringen Langzeitstabilität der hydrophilen und hydrophoben Oberflächen. Abhängig von dem heterogenen Phasensystem (z.B. Wasser/Öl, Öl/Wasser, Gas/Flüssigkeit etc.), der Geometrie und dem Material des Mikrofluidsystems, der verwendeten Trägerphase und der eingesetzten Frequenzen können unterschiedliche Größen an Segmenten erzeugt werden, deren Volumen von wenigen Nanolitern bis in den Mikroliterbereich reichen. [59-63]. Der Einsatz von **Tensiden** spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Segmenterzeugung, da eine Kontrolle der Flüssig/Flüssig-Grenzflächen möglich wird. Das von

Taylor 1934 vorgestellte “**Tipstreaming**“-Phänomen kann z.B. durch entsprechende Tensidkonzentrationen beeinflusst werden und führt durch Anreichern der Trägerphase mit Tensiden zur Freisetzung von Tensid-beladenen Segmente aus der Spitze der injizierten Probenflüssigkeit [51,64].

Für die Herstellung von Mikrofluidbauteilen werden verschiedene Materialien eingesetzt, wobei gängige Materialien z.B. Silizium, Silizium-Glas, Glas-Kapillaren und Kunststoffe wie PMMA und PDMS sind. Eine drastische Minimierung der **Benetzbarkeit** von Kanaloberflächen kann durch die **Hydrophobisierung** der Flächen mit Agenzien wie Silanen oder PTFE-Schichten erreicht werden und führt zu einer störungsfreieren Segmenterzeugung und zu einem verbesserten Segmenttransport der Segmente durch die Mikrofluidkanäle [65,66]. Verfahren zur Hydrophilierung von Kanalflächen stellen die Behandlung der Oberflächen mit Sauerstoffplasma oder die Beschichtung mit Polyvinylalkohol (PVA) dar. Für die Durchführung von parallel laufenden Hochdurchsatz-Experimenten in Mikrofluidsegmenten ist die gezielte Segmentsteuerung durch Operationen wie Fusion (engl.: **droplet fusion**), Splitten (engl.: **droplet splitting**), Einfangen (engl.: **droplet trapping**) und Sortierung (engl.: **droplet sorting**) entscheidend. Verschiedene Verfahren der Segmentsteuerung werden eingehend in Köhler et al., 2004, [67], Teh et al., 2008, [56], Liu et al., 2007, [68] und Baroud et al., 2007, [69] beschrieben.

Die auf dem Markt befindlichen Mikrofluidsegment-Technologien reichen von Bauteilen zur Segmenterzeugung (**Dolomite**, UK)<sup>a</sup> bis zu vollautomatisierten Autoanalysern für chemische, pharmazeutische, Wasser-, Boden- und Lebensmittelanalysen (**Burkhard Scientific**, UK)<sup>b</sup> sowie für PCR (Polymerasekettenreaktion)-Technologien zur Erforschung von Krankheiten (**RainDance Technologies**, MA)<sup>c</sup>. Eine umfassende Recherche ergab, dass noch keine standardisierten, automatisierten Geräte auf Basis der Mikrofluidsegment-Technologie für die Miniaturisierung von Ökoteests auf dem Markt sind. Es bietet sich an, die in dieser Arbeit beschriebene Grundlagenforschung zur Miniaturisierung von Ökotest in Mikrofluidsegmenten in ein marktreifes Produkt zu verwandeln. Eine entsprechende Zielstellung wäre, konventionelle ökotoxikologische Standardverfahren und die Standardverfahren auf Basis von Nano- und Mikrotiterplatten mit zusätzlichen und neuen Erkenntnissen, gewonnen aus hoch aufgelösten Screeninguntersuchungen in Mikrofluidsegmenten, zu unterstützen.

---

<sup>a</sup> <http://www.dolomite-microfluidics.com>

<sup>b</sup> <http://www.burkardscientific.co.uk>

<sup>c</sup> <http://www.raindancetechnologies.com>

Für die in dieser Dissertation durchgeführten Versuche wurden Silizium-Glas-Doppelinjektor Chips (IPHT Jena) und kommerziell erhältliche Kunststoffbauteile (T-Verbindungen und 7-Port Manifolds) zur Erzeugung von Flüssig/Flüssig-Zweiphasensystemen (die hier erzeugten **“Droplets“** werden als **Mikrofluidsegmente** bezeichnet) eingesetzt (s. Kapitel 2.1).

## 1.5 Applikationsfelder der segmentbasierten Mikrofluidik

Die Anzahl der Veröffentlichungen zu neuen segmentbasierten Mikrofluidsystemen und deren Anwendungsfeldern ist in den letzten fünf Jahren drastisch angestiegen<sup>a</sup>. Der Einsatz von Mikrofluidsegmenten zur Klärung von chemischen, biologischen und biochemischen Fragestellungen ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Aufgrund der biologischen Orientierung der in der Dissertation beschriebenen Anwendung der segmentbasierten Mikrofluidik, liegt der thematische Schwerpunkt dieses Kapitels verstärkt auf diversen biologischen und biochemischen Applikationen. Die chemischen Anwendungsfelder sollen der Vollständigkeit halber genannt, aber nicht näher erläutert werden.

Der Einsatz von heterogenen Phasen in der Mikrofluidik erlaubt parallelisierte und serielle Hochdurchsatz-Screenings (HTS) bei geringstem Materialverbrauch. Die schnelle Durchmischung in den einzelnen Reaktionskompartimenten (Segmenten) aufgrund geringer Diffusionszeiten und der Möglichkeit der Durchmischung durch chaotische Advektion sowie die kurzen Wärmetransferzeiten und das große Oberflächen/Volumen-Verhältnis legt den Einsatz der Mikrofluidsegment-Technik zur Untersuchung unterschiedlichster chemischer Reaktionen und biologischer Abläufe nahe. In der Literatur werden die chemischen Synthesen von verschiedenen **organischen Molekülen** [70-72], von **Nanopartikeln** [73-75] und **Polymerpartikeln** [76-81] und die Untersuchung **chemischer Reaktionskinetiken** [82,83] in Mikrofluidsegmenten beschrieben.

In Song (2006) und Teh et al. (2008) wird ein Einblick in die verschiedenen Forschungsrichtungen der segmentbasierten Mikrofluidik gegeben [54,56]. Neben den chemischen Anwendungsfeldern werden in diesen Veröffentlichungen verschiedene biologische und biochemische Arbeiten wie die Aufklärung von **Enzymkinetiken**, der Nachweis von **Einzelmolekülen**, die Untersuchung von **Einzelzell-Antworten**, die Amplifizierung von DNA und RNA (**PCR-, RT-PCR-Assays**) und die Untersuchung der **Proteinkristallisation** in Mikrofluidsegmenten vorgestellt.

Zwischen 2005 und 2009 stiegen die Veröffentlichungen über den Einsatz von Segmenten zur Zellkultivierung von **Pro- und Eukaryoten**, zur Kultivierung von **Säugetier- und Humanzellen** und zur Integration und Kultivierung von **Multizell-Organismen** (Invertebraten und

---

<sup>a</sup> web of science, Suchwörter "droplet based microfluidic", "segmented flow" zwischen 1990-2009.

Vertebraten) mit dem Ziel, segmentbasierte Hochdurchsatz-Screenings anhand komplexer Organismen zu realisieren.

Ein frühes Anwendungsfeld des segmentierten Flusses ist die Darstellung, Untersuchung und Aufklärung von **Enzymkinetiken** sowie die Untersuchung von **Proteinexpression**. In Hsieh YS et al., 1993 wird z.B. der Einsatz einer kanalbasierten “stopped-flow“ ASCF-(Luft-Segmentierten Kontinuierlichen Flusses) Technik zur enzymatischen Bestimmung von Glucose in Weinproben mit Glucose-Oxidase (Trinder-Reaktion) beschrieben [84]. Die Darstellung von in-vitro Evolution durch die Schaffung von künstlichen Kompartimenten gelang durch die Anwendung von Tensid stabilisierten Wasser-in-Öl Emulsionen und ist in Tawfik D.S. et al., 1998 erklärt [85]. Die vorgestellte Methode zeigt einen Weg, Genotyp und Phänotyp für spezifisch ausgewählte Gene auf molekularer Ebene zu verbinden und ermöglichte damit die Selektion von katalytischen Proteinen während der Produktbildung. Die Darstellung der Luciferin-Luciferase Enzymreaktion in Tropfen mit Volumen zwischen 0.1 µl und 1 µl konnte durch den Einsatz eines flächenbasierten Mehrelektroden-Arrays zur Manipulation separater Flüssig-Flüssigtropfen gezeigt werden [86].

Die Entwicklung von zellbasierten Enzymassays in Mikrofluidsegmenten ist ein weiteres Schlüsselthema in der segmentbasierten Mikrofluidik. In Hübner et al., 2007 wird z.B. die Expression des Enzyms Alkaline Phosphatase im Periplasma von *Escherichia coli* nach Einkapselung der Bakterienzellen in Mikrofluidsegmenten (hier als microdroplets bezeichnet) beschrieben [87-89]. Die Schaffung von Bioreaktoren mit Volumen im Piko- und Femtoliter Bereich ermöglichte die gezielte Integration von Einzelzellen in Segmenten und die Durchführung von ersten enzymatischen Einzelzell-Assays. Die chemische und physikalische Manipulation der Zellen in den stark volumenreduzierten Bioreaktoren bietet eine Möglichkeit der Untersuchung der in den Zellen zu geringen Mengen vorkommenden Signal-Molekülen [90]. Diese Möglichkeit wurde auch in Joensson et al., 2009 für die Durchführung von Hochdurchsatz-Screenings (HTS) mit Biomarkern<sup>b</sup> gekoppelten Humanzellen aufgegriffen [91]. Die fluorimetrische Analyse des Substratumsatzes der mit einem Antikörper-Enzym Komplex gekoppelten Zellen bei einer Durchsatzrate von 500 - 1500 Segmenten pro Sekunde konnte gezeigt werden. Weitere Arbeiten zu Enzymkinetiken und Enzymexpression von Molekülen, Zellorganellen und Zellen in Mikrofluidsegmenten können den Veröffentlichungen von Song et

---

<sup>b</sup> Biomarker sind physiologische und / oder biochemische Größen, die auf Stoffeinwirkungen oder physikalische Einflüsse reagieren. Sie können auf den verschiedenen Organisationsebenen eines Organismus (Molekül, Zelle, Gewebe, Organ) als Maß für die Exposition quantifiziert werden.

[http://www.htw-dresden.de/~webchem/prak\\_an/Versuch\\_18\\_Biomarker.pdf](http://www.htw-dresden.de/~webchem/prak_an/Versuch_18_Biomarker.pdf)

al., 2003, [82], Aharoni et al., 2005, [92], Leemhuis et al., 2005, [93], Dittrich, 2005, [94], Huebner et al, 2007, [87], Frenz et al., 2008, [95] und Srisa-Art, 2008, [96] entnommen werden.

Für die Messung von Enzymkinetiken und Enzymexpression in Mikrofluidsegmenten werden spektrophotometrische Detektoren, Fluoreszenzmikroskope, Fluoreszenzspektroskope und in jüngster Zeit konfokale Fluoreszenzspektroskopie (CFS) für die Erfassung von Einzelmolekülsignalen eingesetzt [97]. Die Kontrolle der Grenzflächenchemie spielt eine bedeutende Rolle bei den biochemischen Analysen in Mikrofluid-Systemen. In Roach et al., 2005, wird die Unterdrückung von nicht spezifischer Proteinabsorption an der Grenzfläche Wasser-/Trägerphase durch den Einsatz von in der Trägerphase angereicherten hydrophoben Tensiden beschrieben. Damit wird ein Weg zur Kontrolle von unerwünschten Grenzflächeneffekten bei der Untersuchung von Enzymkinetiken gezeigt [98].

Mit der Integration von Einzelzellen in die Segmente ging die Frage nach der Kultivierbarkeit einher. In Martin et al., 2003 und Grodrian et al., 2004 wird der Einsatz von Segmenten mit Volumen im Nanoliterbereich zur Separierung und Kultivierung monoklonaler Zellpopulationen beschrieben [99,100]. Innerhalb eines dreiwöchigen Kultivierungszeitraumes konnten Reinkulturen von natürlich langsam wachsenden und selten vorkommenden Arten gewonnen werden. Es schlossen sich Untersuchungen zur Anwendung der Methode für die schnelle und frühzeitige Identifizierung von Bakterieninfektionen und das Screening von Bakterienresistenzen gegenüber antibiotischer Wirkstoffe an. In Boedicker et al., 2008 ist die stochastische Bestimmung des Zellwachstums unterschiedlicher *S. aureus*-Stämme im Blutplasma in Abhängigkeit verschiedener antibiotischer Wirkstoffe innerhalb von 50 nl Segmenten aufgezeigt [101]. Ein gesamtes Set an mikrobiologischer Einzelzellprozessierung in Segmenten, beginnend mit der Isolierung aus Zellgemischen und der Inkubation von isolierten Zellen über die Durchführung parallel laufender funktionaler Tests bis zur Identifizierung von Einzelzellen, wird in Liu et al., 2009 vorgestellt [102]. Die Möglichkeiten und Vielfältigkeiten der segmentbasierten Mikrofluidik für die Analysen von Umweltproben, die Untersuchung des menschlichen Mikrobioms und die Bedeutung der Methode für die medizinische Diagnostik gehen aus diesen Arbeiten hervor. Die Eignung der segmentbasierten Mikrofluidik für die Kultivierung und Manipulation von Säugetier- und Humanzellen sowie der Realisierung von segmentbasierten Zytotoxizitätstests ist in Clausell-Tormos et al., 2008, [103], Brouzes et al., 2009, [104] und Hufnagel et al., 2009, [105] dargelegt. RainDance Technologie, Inc. bietet

bereits neben Hochdurchsatz DNA- und Enzym-Assays auch mikrotropfenbasierte Lösungen für Einzelzellanalysen an<sup>c</sup>.

Die Miniaturisierung von Hochdurchsatz-Genanalysen trägt zur Aufhebung der Limitierungen in der angewandten Genetik aufgrund von Kreuzwechselwirkung und Konkurrenzreaktionen (competing chemistry) bei parallel durchgeführten Reaktionen sowie der zeitintensiven Prozessführung bei und leistet damit einen wichtigen Beitrag für die klinische Diagnostik. Es wurden zwei Arten von miniaturisierten PCR-Chips entwickelt: Mikrokammer PCR-Chips [106,107] und kontinuierlich arbeitende Durchfluss-PCR-Chips [108-110]. Demgegenüber stehen die segmentbasierten Techniken [111]. Im Vergleich zu Durchfluss-PCR-Chips hat die Anwendung der segmentbasierten Mikrofluidik für die Umsetzung von schnellen PCR-Techniken aufgrund der geringeren Probleme mit Oberflächenkompatibilität und der Unterdrückung von Dispersionseffekten großes Interesse in der Forschung gewonnen [112]. Die unterschiedlichsten Mikrofluidbasierten PCR-Geräte wurden bereits entwickelt und erfolgreich getestet. In Curcio et al., 2003 wird z.B. eine segmentbasierte kontinuierlich arbeitende PCR-Technik auf der Basis von Teflon-Kapillarschläuchen vorgestellt [113]. Die mit PCR-Mix beladenen Segmente mit Volumen von 300 nl werden durch die in einem Wasserbad mit unterschiedlichen Temperaturzonen gelagerten Kapillaren geschleust und nach einer Reaktionszeit von 45 min über laserinduzierte Fluoreszenz analysiert. Ein segmentbasierter PCR-Chip auf Silizium/Glas-Basis für die DNA-Amplifizierung in 100 nl Segmenten ist in Wang et al., 2005 beschrieben [114]. Die einzelnen Segmente wurden hier nach einer Prozesszeit von nur 15 Minuten aus dem Chip ausgeschleust und die PCR-Produkte mit Gelelektrophorese analysiert. In Felbel et al., 2008 werden Konzepte und der Einsatz eines Silizium/Glas-basierten Mikrodurchfluss-Chip-Thermocyclers für die Durchführung von RT-PCR vorgestellt [115,116]. Der Einsatz eines mikrofluidischen segmentbasierten Schlauchreaktors für PCR und RT-PCR wird in Hartung et al., 2009 beschrieben [117]. In einem über asymmetrisch angeordnete Kupferheizblöcke geführten FEP-Schlauch wurden 100 nl Segmente gefördert. Die Segmente waren mit PCR-Mix für die Amplifizierung von Lambda-DNA (PCR), von mRNA aus HPV-infizierten menschlichen SiHa-Zellen (RT-PCR) und von Masernvirus-mRNA aus Glioma (C6/SSPE)-Zellen (RT-PCR) beladen. Die Produktbildung konnte im Anschluss an die Amplifizierung mittels eines integrierten Durchfluss-Fluorimeters bzw. nach Ausschleusen der Segmente durch Gelelektrophorese analysiert werden. Die Prozesszeit für die Amplifizierung

---

<sup>c</sup> [www.raindancetechnology.net/news-events/pr\\_081112b.asp](http://www.raindancetechnology.net/news-events/pr_081112b.asp)

von Lambda-DNA lag für diese Versuche bei 24 Minuten und vergleichbarer Sensitivität mit herkömmlichen RT-PCR Protokollen.

Ein wichtiger Prozess zur Aufklärung von Proteinstrukturen sowie der Funktion von Proteinmolekülen und -komplexen ist die Proteinkristallisation. Die Kristallisation einer großen Anzahl von Proteinen in hoher Qualität gestaltet sich mit den konventionell eingesetzten Mikrobatch-Methoden immer noch schwierig. Auch ist das fundamentale Verständnis noch nicht ausreichend, um die optimalen Kristallisationsbedingungen vorherzusagen. Die Methode des segmentierten Flusses bietet dagegen eine Möglichkeit, Hochdurchsatz-Screenings von Proteinkristallisations-Experimenten durchzuführen. In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Kristallisation von Proteinen in Mikrofluidsegmenten beschrieben. Die Verfahren "Sparse Matrix-Screening" und "Gradient-Screening" dienen der Identifizierung der optimalen Zusammensetzung der Kristallisationsreagenzien und der optimalen Reagenzienkonzentration für die Proteinkristallisation. Während beim "Sparse Matrix-Screening" Kristallisationsreagenzien in unterschiedlicher Zusammensetzung mit dem Protein in die Segmente eingebracht werden, wird beim "Gradient-Screening" ein Konzentrationsgradient der Kristallisationsreagenzien in den Segmenten durch Variation der Flussraten erzeugt. Ein anderes Kristallisationsverfahren ist die Verdampfungsdiffusion. Dafür werden Segmente erzeugt, die alternierend Protein/Fällungsmittel und Salzlösung enthalten. Zwischen den Segmenten befindet sich eine wasserpermeable Trägerflüssigkeit. Die Proteinkristallisation erfolgt innerhalb von wenigen Stunden durch Diffusion des Wasserdampfes in das Segment mit höherem osmotischem Druck (z.B. konzentrierte Salzlösung). Analysiert werden die Proteinkristalle durch Röntgenbeugung [54,118-121].

Die Integration und Kultivierung von Mehrzellern in Mikrofluidsegmenten ist ein junges Forschungsfeld in der segmentbasierten Mikrofluidik. In Köhler et al., 2005 wurde erstmals die Integration von Multizell-Organismen in Mikrofluidsegmente beschrieben [122]. Die Einbringung einzelner *C. elegans* (Fadenwurm)-Embryonen in Flüssig/Flüssig-Zweiphasensysteme konnte gezeigt werden. Eigene Arbeiten zur Integration und Kultivierung des Vertebraten *Danio rerio* (Zebrafisch) schlossen sich an. Neben der vollständigen embryonalen Entwicklung der Zebrafischeier in luftstabilisierten Segmenten mit Volumen zwischen 2 µl und 11 µl konnten erste toxikologische Studien für eine Modellsubstanz und deren Kombination gezeigt werden [1]. In nachfolgenden Publikationen werden erste zellbasierte Hochdurchsatz-Assays für Multizell-Organismen beschrieben. In Clausell-Tormos et al., 2008 konnte neben der Einkapselung von Säugetier-Zellen auch die Integration und die Kultivierung von *C. elegans*-Embryonen bis zur zweiten Generation in Segmenten mit Volumen im Piko- und

Nanoliterbereich gezeigt werden [103]. Ebenfalls ein segmentbasiertes Mikrofluidsystem für individuelle *C. elegans*-Assays wird in Shi et al., 2008 beschrieben [123]. Das Mikrofluidsystem kombiniert die Segmenterzeugung in einer T-Verbindung und die anschließende Immobilisierung der Segmente in einem Segment-Array. Damit gelang die Einkapslung einzelner *C. elegans*-Embryonen in eine große Anzahl von Segmenten und die Charakterisierung der Wurmmobilität nach Stimulierung mit einem Neurotoxin. Auch hier zeigt sich, dass die segmentbasierte Mikrofluidik einen neuen Weg für parallelisierte Hochdurchsatz-Screenings mit 1000fach geringerem Assay-Volumen und bis zu 500fach höherem Probendurchsatz im Vergleich zu Nano- und Mikrotiterplatten bietet. Die mögliche Anwendung konzentriert sich momentan noch verstärkt auf klinische Diagnosen, Pharmascreenings und Life-Science-Applikationen. Der Einsatz der segmentbasierten Mikrofluidik zur Miniaturisierung von zeit- und volumenintensiven Ökotoxtests besonders im Hinblick auf die Untersuchung der Kombinationswirkung binärer und vor allem multipler Gemische ist kaum bis gar nicht untersucht. Diese Dissertation untersucht die Anpassung der segmentbasierten Mikrofluidik für die Übertragung und Durchführung konventioneller toxikologischer Standardmethoden für aquatische Testsysteme in stark volumenreduzierten Zweiphasensystemen.

## 1.6 Miniaturisierung von Ökoteests

Die Automatisierung der Pipettierstrecken und der Einsatz von Pipettierrobotern ermöglichte die Durchführung von Hochdurchsatz-Screenings in der Pharmaindustrie. Der Einsatz von 384-, 1536- und vereinzelt sogar 3456- und 9600-well Nano- und Mikrotiterplatten sind der heutige Standard bei pharmakologischen Screenings. Die Entwicklung neuer Technologien ermöglichte die stetige Reduktion der benötigten Probenvolumen von 100  $\mu\text{l}$  über 20  $\mu\text{l}$  bis zu wenigen Nanolitern Probevolumen [124]. Damit stehen komplexe, mikroskalierte Laboranordnungen für die parallelisierte Synthetisierung und Analyse einer großen Anzahl neuer organischer Verbindungen zur Verfügung [125]. Einen Nachteil dieser Methodik stellt allerdings der große technische Aufwand dar.

Die Adaption von Nano- und Mikrotiterplatten fand auch Einzug in der Ökotoxikologie. Besonders in der aquatischen Ökotoxikologie bietet sich der Einsatz von stark miniaturisierten Techniken an. Die Durchführung der verschiedenen Assays findet hier meistens in 96-well-Nano- und Mikrotiterplatten statt. Die Probenvolumina reichen von wenigen Mikrolitern bis zu einigen hundert Mikrolitern [126,127]. Ein großes Problem ist hierbei die schnelle Verdunstung der geringen Probenvolumina und damit auch eine mögliche Querverschleppung der Proben [54].

## 1.7 Zielstellung

Das Ziel der Promotionsarbeit bestand in dem modularen Aufbau eines Mikrofluidsystems unter Anwendung der Methode des segmentierten Flusses zur Charakterisierung der synergistischen Kombinationswirkung von potentiellen Umweltschadstoffen auf ausgewählte Modellorganismen. Für die Miniaturisierung von Ökoteests mit Hilfe des segmentierten Flusses sollten zuerst die Organismen aus unterschiedlichen Organismenklassen auf ihre Integrationsfähigkeit in das Mikrofluidsystem untersucht werden. Dabei bestand die Zielstellung darin, die Kultivierbarkeit von bis auf die Zelle oder das Ei reduzierten biologischen Modellen in Mikro- bis Nanoliter großen Mikrofluidsegmenten zu charakterisieren. Für die ausgewählten Spezies sollten semiautomatische Screeningabläufe zur Untersuchung der Einzel- und Kombinationswirkung von Umweltschadstoffen entwickelt und optimiert werden. Damit sollte die Erzeugung von ein- und mehrdimensionalen Konzentrationsfeldern ermöglicht, eine erste Einschätzungen des Gefährdungspotentials sowie Schlussfolgerungen für eindimensionale Parameterfelder und Parameterkombinationen als Modelle für komplexere Umweltverhältnisse getroffen werden. Für eine simultane Detektion von spezifischen toxikologischen Endpunkten sollten Mikrodurchflusssensoren in das Mikrofluidsystem integriert und optimiert werden.

Der experimentelle Aufbau sollte so ausgelegt werden, dass eine große Anzahl an unterschiedlichen Reaktionsräumen zeit- und kostengünstig, volumenreduziert und mit der Adressierung eines multidimensionalen Parameterfeldes erzeugt und detektiert werden kann. Damit sollte die Wirkung von Einzelsubstanzen und deren Kombination auf ein stark vereinfachtes Biosystem mit Hilfe des Potentials der Mikrofluidtechnik erforscht werden. Anstelle der weit verbreiteten Mikrotiterplatten sollten für den Versuchsaufbau Mikrokanalreaktoren zur Segmentierung verwendet werden.

Der Einsatz von Mikrofluidsegmenten sollte im Vergleich zu den konventionellen ökotoxikologischen Methoden die Bewertung einer großen Anzahl von Tests bei Einsatz minimaler Schadstoffmengen ermöglichen. Die Frage nach der schnelle Verfügbarkeit von Informationen innerhalb der komplexen Thematik der synergistischen Kombinationswirkung, der Gewinnung von ergänzenden und neuen Erkenntnissen in diesem Forschungsgebiet sowie der Modellgebung für miniaturisierte Ökoteests in Mikrofluidsegmenten war Gegenstand der Untersuchung.

## 1.8 Aufgaben

Aus den unter Abschnitt 1.7 beschriebenen Zielstellungen des Promotionsvorhabens ergeben sich nun nachfolgend aufgelistete Aufgaben:

- Auswahl und Anpassung der Mikrofluidkomponenten für den Aufbau des Laborsystems.
- Auswahl von geeigneten Modellorganismen.
- Auswahl der zu untersuchenden Stoffsysteme.
- Aufbau des Mikrofluidsystems sowie Anpassung an den jeweiligen Modellorganismus.
- Anpassung der Kultivierungsbedingungen für ein optimales Wachstum der Modellorganismen im Mikrofluidsegment und für optimale Detektion der Endpunkte (Wirkkriterien).
- Überprüfung des Wachstumsverhaltens der Modellorganismen.
- Festlegung der zu untersuchenden toxikologischen Endpunkte auf phänotypischer und genotypischer Ebene.
- Auswahl möglicher Biosensoren für die in situ Messung der Endpunktbestimmung.
- Auswahl und Integration von Mikrodurchflussdetektoren für die multiple Endpunktbestimmung im Mikrofluidsegment.
- Erstellen von Algorithmen für die Adressierung von ein- und zweidimensionalen Konzentrationsfeldern zur Untersuchung von Einzel- und Kombinationswirkungen in Mikrofluidsegmenten
- Ausarbeitung von Analyseprogrammen.
- Abschätzung des Potentials der Methode für verschiedene Stoffsysteme und Organismen.
- Etablierung der Methode für High-Throughput-Screenings zur Untersuchung von Kombinationswirkungen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Mikrofluidsystem

Ziel war der Aufbau einer Versuchsanordnung für die Integration und Kultivierung verschiedener Testorganismen sowie die Analyse unterschiedlicher Endpunkte. Dafür sollte das Mikrofluidsystem und die Detektionsstrecke an die unterschiedlichen Versuchsbedingungen angepasst werden. Für den Aufbau des Laborsystems wurden zuerst unterschiedliche Mikroreaktoren für die Generierung von Segmentsequenzen ausgewählt. Die Wahl fiel zu Beginn auf photolithographisch und nasschemisch hergestellte Glas/Silizium-Chips<sup>a</sup>. Es wurden ein Double-Twin-Injektor Chip mit einem Gesamtvolumen von ca. 1,5 µl und ein Doppel-Injektor Chip mit einem Gesamtvolumen von ca. 2 µl eingesetzt<sup>b</sup>. Beide Mikrokanalchips hatten einen mäanderförmigen Hauptkanal, in welchen zwei bzw. vier Injektionskanäle mündeten (Abb. 2-1 a,b). Die Hydrophobisierung der Kanäle gelang mit 10% Octadecyltrichlorosilan (ODT) in Heptan (s. Anhang 6.1.14). Mit beiden Reaktoren konnte die Segmentierung von Zellkulturen sowie die Zudosierung zu den einzelnen Segmenten gut realisiert werden. Bei Durchführung von Toxizitätstest zeigten sich für einige der eingesetzten Testsubstanzen Reaktionen mit der Silanschicht der Kanäle. Dies führte zu einer Störung des Segmenttransportes im Kanal sowie einer Zerstörung der Segmentsequenzen. Beim Einsatz von Sensorbeads kam es zu Prozessunterbrechungen durch Verstopfungen im Injektionskanal. Da sich besonders in Hinblick auf die Untersuchung von Kombinationswirkungen von Substanzgemischen eine Optimierung des Silanisierungsprozesses als zu zeitintensiv abzeichnete, wurden kommerziell erhältliche PTFE (Polytetrafluorethylen, Teflon<sup>®</sup>)- und PEEK (Polyetheretherketone)-Komponenten zur Erzeugung der Segmentsequenzen eingesetzt.

Zur Erzeugung von Segmentsequenzen und eindimensionalen Konzentrationsfeldern wurden T- und Kreuz-Stücke aus PTFE mit Kanaldurchmessern von 0,5 mm und Gesamtvolumen von 2,9 µl sowie 3,8 µl (Abb. 2-1 d, e) eingesetzt<sup>c</sup>. Für die Untersuchung von

---

<sup>a</sup> Layout und Herstellung der Chips durch das Institut für Photonische Technologien, IPHT Jena.

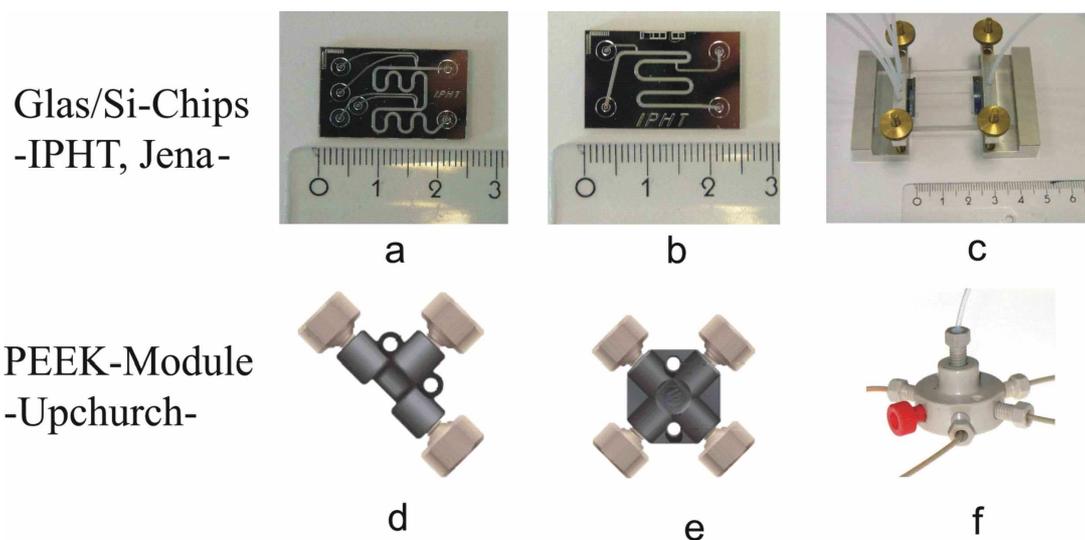
<http://www.ipht-jena.de>

<sup>b</sup> **Double-Twin Injektor Chip:** Kanallänge Hauptkanal 7,2 mm, Kanallänge Injektorkanal: 6,3 mm, Ätztiefe: 130 µm, Mantelweite (MW): 300 µm. **Double Injektor Chip:** Kanallänge Hauptkanal: 6,4 mm, Kanallänge Injektorkanal: 1,7 mm, Ätztiefe: 150 µm, Mantelweite (MW): 30 µm.

<sup>c</sup> [www.bestatechnik.de](http://www.bestatechnik.de)

Kombinationswirkungen wurde ein 7-Port Manifold aus PEEK mit 1 mm Kanaldurchmesser und einem Gesamtvolumen von 42  $\mu\text{l}$  integriert (Abb. 2-1 f).

Der Einsatz von polymerbasierten Segmentierungsmodulen ermöglichte eine einfache und schnelle Erzeugung von Segmentsequenzen. Das Auftreten von Verstopfungen und Adsorption an den Kanalwänden konnte damit größtenteils beseitigt bzw. minimiert werden. Problemlos gestaltete sich auch der Anschluss der Verbindungsschläuche an die Module. Dichtungslecks an den Kopplungsstellen traten nicht mehr auf. Dies ermöglichte einen schnellen Wechsel der Module und im Problemfall einen jederzeit möglichen Eingriff in den Segmentierungsprozess.



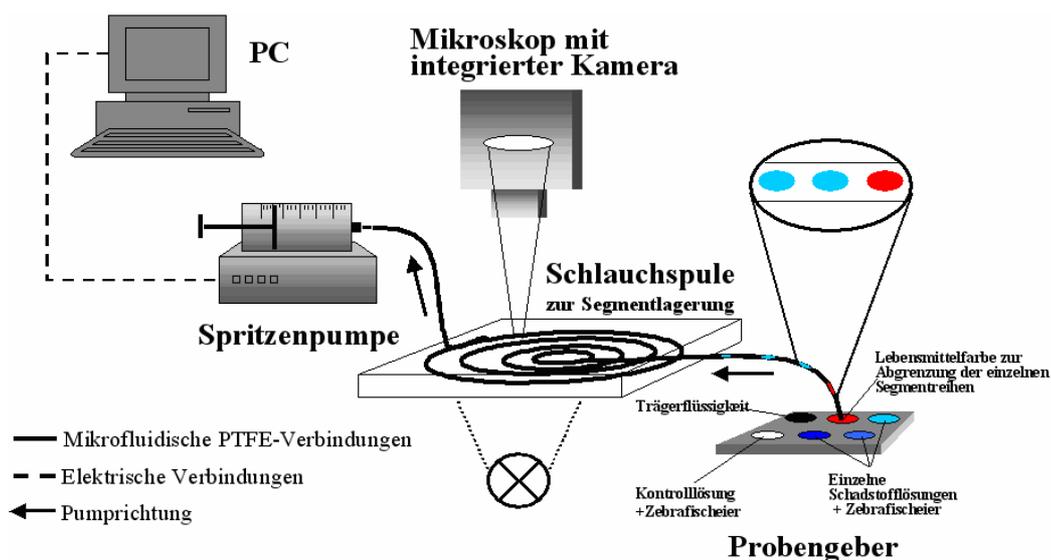
**Abb. 2-1:** Glas/Silizium-Chips und Kunststoffmodule für die Erzeugung von Mikrofluidsegmenten. **a)** Mischer-Injektor 1.1 (Double twin Injektor) **b)** Doppel-Injektor **c)** Chiphalterung für Mischer-Injektoren **d)** T-Stück, **e)** Kreuz-Stück, **f)** 7-Port Manifold.

Der Gesamtaufbau des modularen Mikrofluidsystems setzte sich aus Segmentierungs-, Injektions-, Detektions- und Lagerungseinheiten zusammen, welche mit PTFE- bzw. im Detektionsbereich mit transparenten FEP (Fluorethylenpropylen)-Schläuchen verbunden wurden. Für die untersuchten Ein- und Mehrzeller, Humanzellen und den Invertebraten konnte der gleiche modulare Aufbau mit denselben Schlauchdimensionen (Außendurchmesser 1,6 mm, Innendurchmesser 0,5 mm) eingesetzt werden. Die Versuche mit dem Modellorganismus Zebrafisch (*Danio rerio*) erforderten aufgrund der Größe ihrer Eier und Embryonen eine komplette Umstrukturierung des Aufbaus.

### ***Mikrofluidsystem I: Modellorganismus *Danio rerio****

Die Versuchsanordnung (s. Abb. 2-2) bestand aus einer rechnergesteuerten Spritzenpumpe (TSE Systems), PMMA (Polymethylmethacrylat)-Spulen für die Lagerung der Segmente in PTFE-Schläuchen, einem Probengeber und einem Lichtmikroskop mit integrierter Kamera

(Motic B1 Series). Die Segmenterzeugung erfolgte durch alternierendes Ansaugen von Probensuspension und Trägermedium, wobei ein Ende des Ansaugschlauches in das Probenreservoir getaucht und die Probensuspension mit einer 2,5 ml Glasspritze (ILS) angesaugt wurde. Die erzeugten Segmentsequenzen wurden in PTFE-Schläuchen (Bohlander GmbH) von 1 m Länge, 1,2 mm Innen- und 1,8 mm Außendurchmesser gelagert. Die fluidische Ansteuerung erfolgte durch eine PC-kontrollierte Spritzenpumpe (TSE) und eine in LabVIEW™ (National Instruments) programmierte Steuersoftware. Die embryonale Entwicklung von *Danio rerio* in den einzelnen Mikrofluidsegmenten konnte über die Integration eines optischen Lichtmikroskopes mit integrierter Kamera (Motic, 320x240 Pixel) realisiert werden. Mit der gegebenen Auflösung der Kamera war es möglich, die einzelnen embryonalen Entwicklungsstadien direkt durch den Schlauch zu verfolgen. Die Kamera könnte also auch für automatisierte Prozesse eingesetzt werden. Für die Aufnahme der Bilder wurde eine kommerziell erhältliche Bildaufnahmesoftware (Motic Image 2000) verwendet.



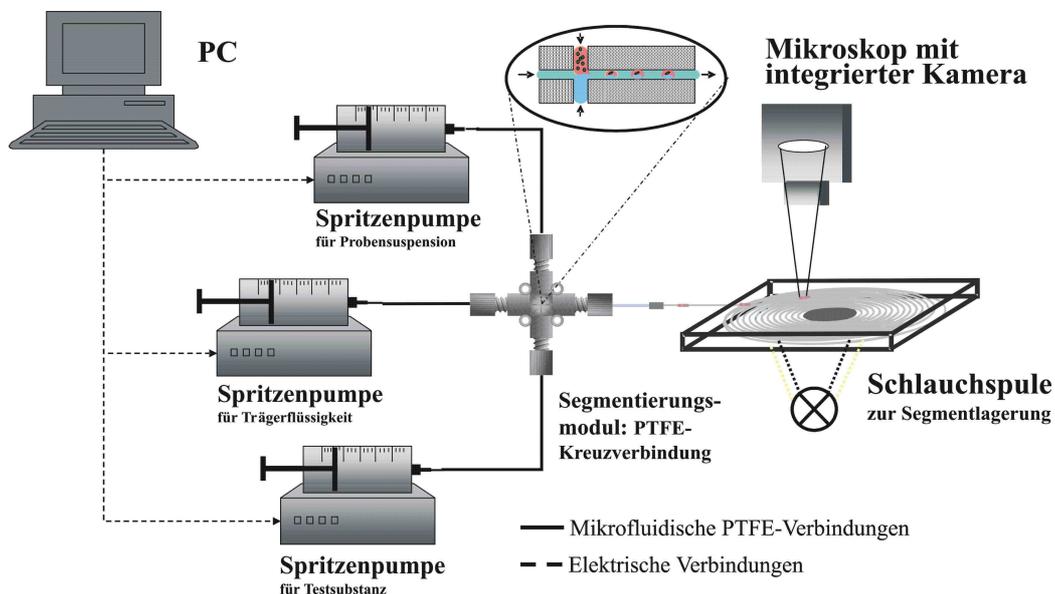
**Abb. 2-2:** Mikrofluidische Anordnung zur Erzeugung von Segmentsequenzen und Bildanalyse für den Modellorganismus *Danio rerio*.

### ***Mikrofluidsystem II: Ein- und Mehrzeller, Humanzellen und Invertebraten***

Für die Versuche zur Segmentierung und Analyse von *E. coli*, *S. cerevisiae*, *C. vulgaris*, HeLa-Zellen und *C. elegans* konnte ein einheitlicher Versuchsaufbau eingesetzt und optimiert werden. Die Versuche mit dem Invertebraten *C. elegans* erfolgte mit Spritzenpumpen der Firma TSE. Die Untersuchung der Entwicklung des Fadenwurms im Segment konnte ebenfalls durch Bildanalyse ermöglicht werden. Dafür wurde wie bereits für die Zebrafischeier beschrieben ein Lichtmikroskop mit integrierter Kamera verwendet (Abb. 2-3). Für alle anderen Testorganismen

wurde eine spezielle Detektorstrecke entwickelt, mit der simultan photometrische und fluorimetrische Messungen realisiert werden konnten. Als Detektoren wurden Transmissionsmesszellen (Photometer) und Fluoreszenzmesszellen (Fluorimeter) eingesetzt. In den ersten Versuchen mit den HeLa-Zellen erfolgte die Erfassung des Fluoreszenzsignals noch durch die Integration eines Fluoreszenzmikroskops (Axioplan, Zeiss). Das Fluoreszenzsignal wurde in ein Glasfaserkabel eingekoppelt und zum Detektor (Photomultiplier MP-953, Perkin Elmer) geleitet. Das geringe Signal-Rausch-Verhältnis und die daraus resultierende schlechte Auflösung sowie der komplexe und nichtflexible Versuchsaufbau führten zur Weiterentwicklung dieser Analysemethode im Rahmen einer Diplomarbeit, in welcher ein Mikrodurchflussfluorimeter speziell für die kontinuierliche Fluoreszenzmessung von Segmentsequenzen entwickelt und optimiert wurde [128].

Weiterhin wurden die Mikrodurchflussphotometer optimiert. Die erste Generation von Photometern war mit Schlitzenblenden ausgestattet. Dies erlaubte nur eine axiale Fokussierung des Anregungslichtes auf die Probe. Dadurch kam es durch seitlich gestreutes Anregungslicht zum Intensitätsverlust. In den optimierten Photometern wurde die Fokussierung des Lichtes über Lochblenden realisiert, welche eine axiale und radiale Begrenzung ermöglichten. Damit konnte ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis erzielt werden.



**Abb. 2-3:** Mikrofluidische Versuchsanordnung für den Fadenwurm *C. elegans*

Weiterhin zeigten die Gehäuse der Sensoren der ersten Generation mit geraden Schlauchkanälen eine hohe Störempfindlichkeit gegenüber mechanischer Bewegung und Umgebungslicht. Durch den Einsatz von mäanderförmigen Kanalverläufen (Abb. 2-5 a) wurden diese Störgrößen beseitigt bzw. deutlich verringert. Weiterhin gewährleistete diese Kanalstruktur

eine gute Durchmischung der Segmente während des Transportes. In die optimierten Sensorgehäuse wurden drei photometrische Messkanäle integriert. Definierte Blendenbohrungen ermöglichten die gezielte Lichteinkopplung durch den Schlauch direkt in das Segment. Aufgrund der zeitlich abnehmenden Lichtemission durch Temperaturerhöhung der Anregungsquellen (LEDs) wurden sowohl für das Fluorimeter als auch für die Photometer Lichtleistungsregelungen eingebaut, welche einen konstanten Lichtstrom auch während langer Messungen gewährleisteten.

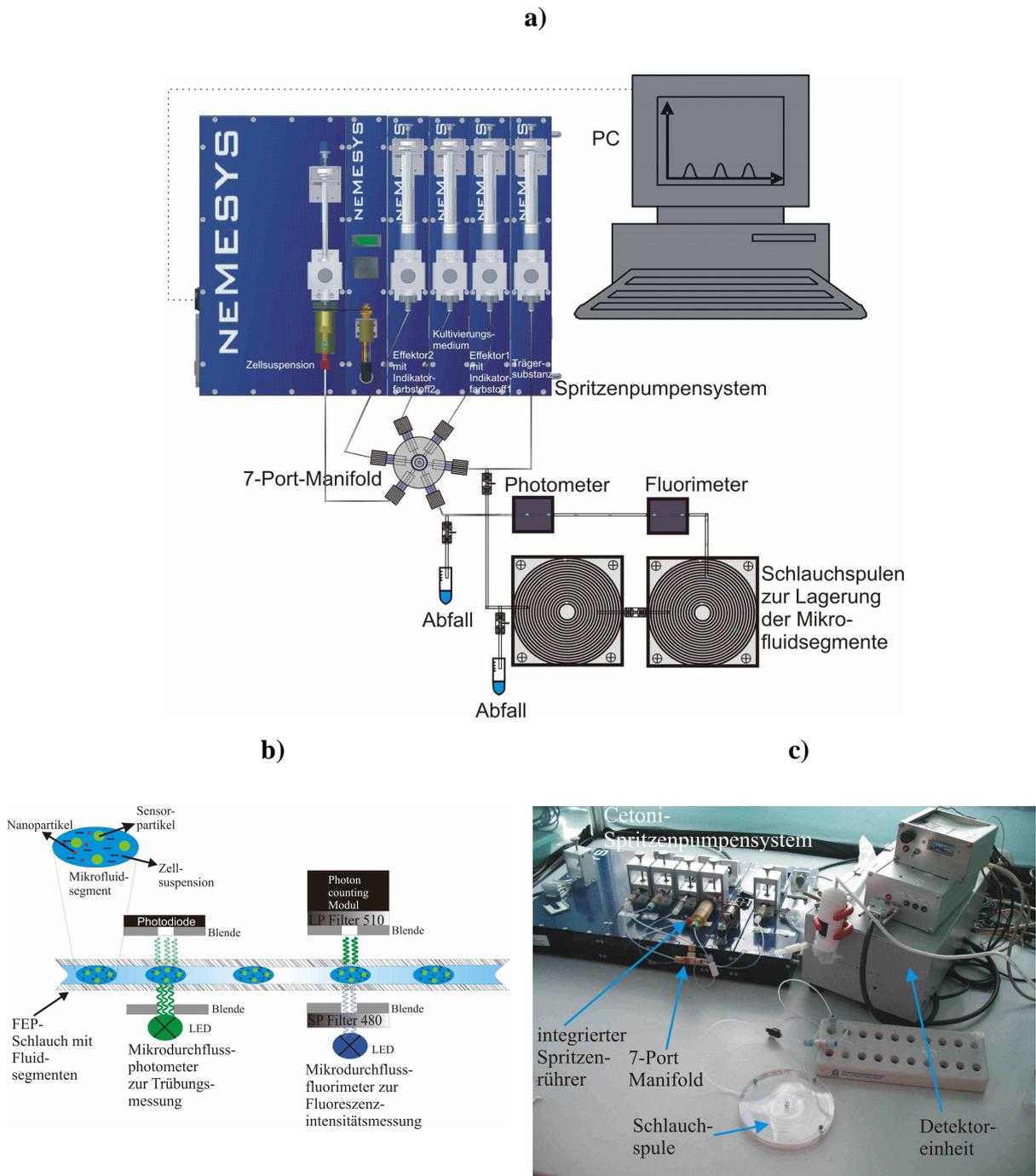
Für die Erzeugung von hochgenauen ein- und zweidimensionalen Konzentrationsgradienten in den Mikrofluidsegmenten wurden die durch zu starke Pulsation ungenauen TSE-Spritzenpumpen durch ein pulsationsfreies Mehrkanalspritzenpumpensystem (neMESYS, Cetoni GmbH) ersetzt, welches eine hochpräzise Dosierung bis in den Nanoliterbereich ermöglichte.

Anfangs wurde eine homogene Verteilung der Zellsuspension in den Segmenten über die Integration von kleinen Magnetrührern in der Zellsuspensionsspritze realisiert, welche durch unmittelbar über der Spritze rotierende Dauermagnete bewegt wurden. Eine gleichmäßige Durchmischung konnte damit allerdings nicht erreicht werden, da es zu Zelldichteschwankungen in den Randzonen kam. Mit dem Einbau des Spritzenrührermoduls neMIX (Cetoni GmbH, Weiterentwicklung der am IBA-Heiligenstadt entwickelten „Minispinnerflasche“) in das Mehrkanalspritzenpumpensystem neMESYS (Cetoni GmbH) konnte eine homogene Verteilung der Zellsuspension in den Segmenten erreicht werden.

Anhand der beschriebenen Optimierungen wurde ein Mikrofluidsystem aufgebaut, in welchem unterschiedliche Organismen in die Mikrofluidsegmente eingebracht und kultiviert, ein- und zweidimensionale Konzentrationsfelder erzeugt sowie eine multiple Endpunktbestimmung durchgeführt werden konnten. In Abb. 2-4 ist das Mikrofluidsystem für die Erzeugung von Segmentsequenzen zur Untersuchung von Einzel- und Kombinationswirkungen verschiedener Modellsubstanzen dargestellt.

Zur Erzeugung der Segmente diente ein 7-Port-Manifold Modul (Upchurch), welches durch PTFE-Schläuche 1,6 mm (1/16“) Außen- und 0,5 mm Innendurchmesser, Bohlender GmbH) mit dem rechnergesteuerten Mehrkanalspritzenpumpensystem neMESYS mit sechs Dosiereinheiten verbunden war. Es wurden Glasspritzen (ILS) der Größe 5000 µl für die Probensuspension, 2500 µl für das Trägermedium und 500 µl für die Effektorlösungen eingesetzt.

Das Monitoring der Mikrofluidsegmente bzgl. verschiedener Screeningparameter erfolgte direkt im transparenten FEP-Schlauch mit gleichen Dimensionen wie der Teflon®-Schlauch (Abb. 2-4 a).

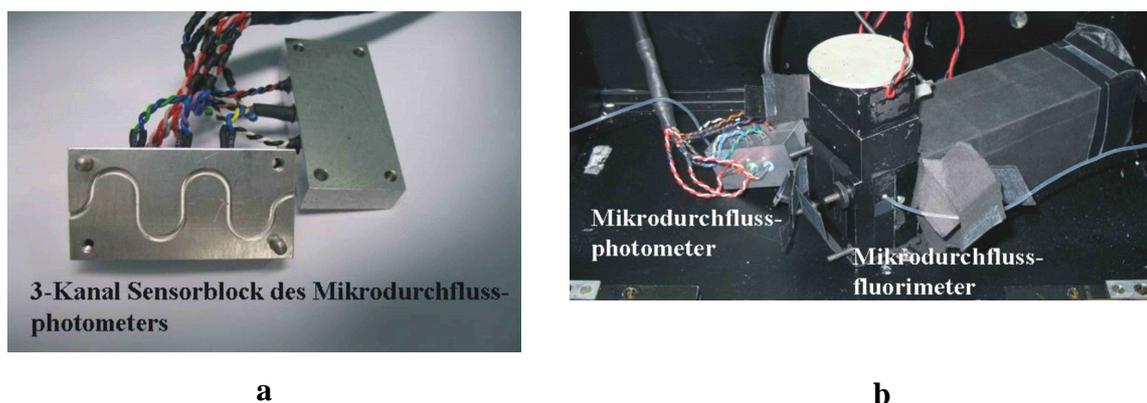


**Abb. 2-4:** Aufbau des Mikrofluidsystems für die Erzeugung und Charakterisierung von Mikrofluidsegmenten. **a)** Schema der Versuchsanordnung mit Segmentierungs- und Detektionseinheit. **b)** Schema der simultanen Messung des Wachstums und der Fluoreszenzintensität während der Kultivierung der Zellen im Mikrofluidsegment. **c)** Foto der Versuchsanordnung.

Zwei integrierte Mikrodurchflusssensorsysteme ermöglichten das simultane Monitoring von Trübungs- und Fluoreszenzsignalen (Abb. 2-4 b). Der Sensorblock des Photometers ermöglichte die parallele Messung von drei unterschiedlichen Wellenlängenbereichen (Abb. 2 5 a). Es kamen LEDs mit Emissionsmaxima bei 470 nm (Nichia), 505 nm und 610 nm (Agilent) zum Einsatz. Als Detektoren wurden Photodioden (Typ SFH 206K, Siemens) eingesetzt. Für die Trübungsmessung zur Bestimmung des Zellwachstums lieferte der Messkanal mit 505 nm die

besten Resultate. Zur Überprüfung der Schadstoffkonzentration im Segment wurden Indikatorfarbstoffe mit Absorptionsmaxima bei 505 nm (Cochenillerot A) bzw. 610 nm (Indigokarmin) eingesetzt.

Zur Detektion des Fluoreszenzsignals wurde ein Mikrodurchflussfluorimeter integriert (Abb. 2-5, b). Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit einem 3 W Power-LED-Modul (CML Innovative Technologies) mit einer Emissionswellenlänge von 470 nm. Ein 480 nm Kurzpassfilter (Laser Components GmbH) entfernte den langwelligen Anteil des emittierten Lichtes. Zur Fokussierung diente eine Blende mit einem 1 mm Spalt.



**Abb. 2-5:** Mikrodurchflusssensoren für das Monitoring von Mikrofluidsegmenten im Schlauch **a)** Kanalstruktur Sensorblock des Photometers mit mäanderförmiger Schlauchführung und drei photometrischen Messkanälen. **b)** Reihenschaltung von Mikrodurchflussphotometer und Mikrodurchflussfluorimeter zur simultanen Messung von Trübungs- und Fluoreszenzsignalen.

Orthogonal zur Fluoreszenzanregung befand sich ein Linsensystem zur Optimierung der Lichtausbeute, ein 510 nm Langpassfilter (Laser Components) zur Eliminierung des Streulichtes sowie ein hochempfindlicher Detektor (Photomultiplier, Perkin Elmer).

Zur Lagerung der erzeugten Mikrofluidsegmente wurden Schlauchspulen aus PMMA eingesetzt, auf welche jeweils ca. 2 m PTFE-Schlauch aufgewickelt werden konnte und zur Speicherung von etwa 600 Segmenten diente. Die Einstellung der Konzentrationen in den Segmenten erfolgte durch Variation der Volumenströme mittels einer in LabVIEW™ programmierten Steuersoftware.

## 2.2 Erzeugung von Konzentrationsgradienten in Mikrofluidsegmenten

Zur Einstellung der Effektorkonzentrationen im Mikrofluidsegment wurde eine Steuersoftware für die Spritzenpumpen mit LabVIEW erstellt, welche durch die gezielte Flussratensteuerung einzelner Volumenströme beliebige Konzentrationsverläufe ermöglichte. Abhängig vom Anwendungsfall konnten **Block-** sowie **Rampenprogramme** für die

semikontinuierliche und kontinuierliche Erzeugung von Segmentsequenzen zur Untersuchung der Wirkung von Einzelsubstanzen und Substanzgemischen eingestellt werden (Anhang 6.1.1).

Die Anwendung von **Blockprogrammen** ermöglichte die Erzeugung einzelner, durch das Trägermedium voneinander getrennter Segmentblöcke, wobei innerhalb eines Blockes die Konzentrationen der Schadstoffe konstant blieben. Zwischen den einzelnen Segmentblöcken wurde die Effektorkonzentration mit 10 %-Abstufung für das Screening der Einzelwirkung (6.1.1, Abb. 6-1, a-1, a-2) und mit 25 % Abstufung für das Screening der Kombinationswirkung für 5 Kombinationen variiert (6.1.1, Abb. 6-1, b-1).

Der Einsatz von **Rampenprogrammen** ermöglichte die schnelle Einstellung kleinster Konzentrationsabstufungen im Segment. Durch kontinuierliche Änderung der Volumenströme konnten nahezu stufenlose, hoch aufgelöste Konzentrationsverläufe realisiert werden. Die Konzentrationen variierten hierbei zwischen den Segmenten (6.1.1, Abb. 6-1, c-1, c-2).

Zur Untersuchung der Kombinationswirkung binärer Stoffgemische konnten komplexe Konzentrationsverläufe zur vollständigen Deckung des 2D-Parameterfeldes programmiert werden (Anhang 6.1.1, Abb. 6-1, d-1, d-2).

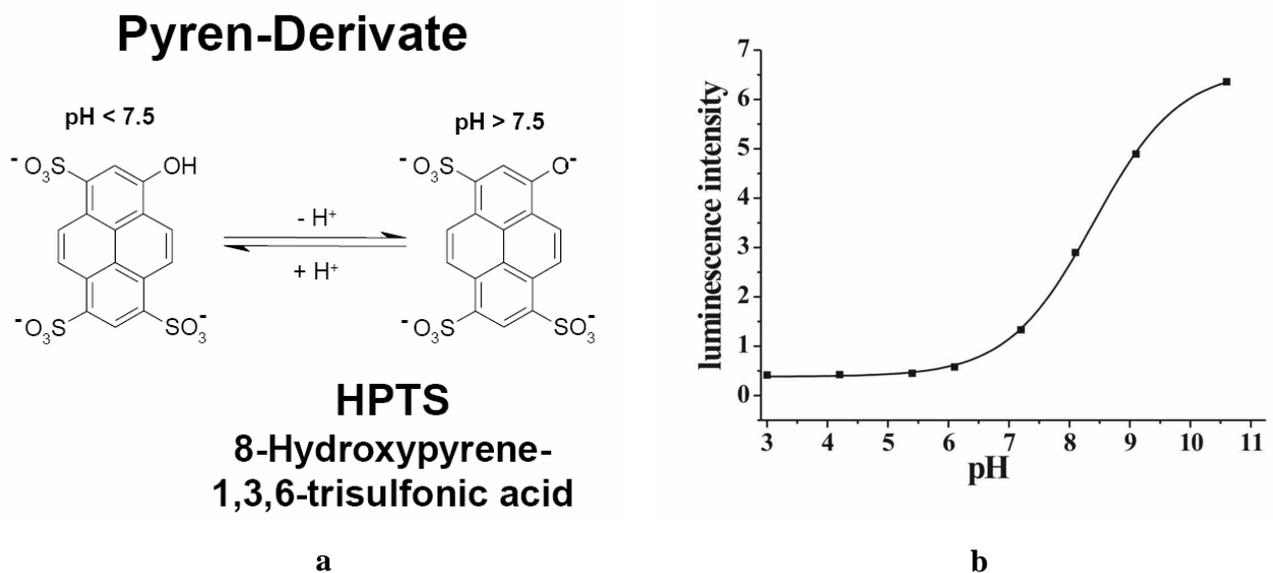
Der Vorteil der blockweisen Konzentrationseinstellung liegt in der sehr genauen Zuordnung der einzelnen Konzentrationen zu den jeweiligen Segmentblöcken und erlaubt statistische Analysen einer Konzentrationsreihe. Diese Methode ist aber sehr zeitintensiv und wächst mit der geforderten Anzahl der Abstufungen.

### 2.3 Toxikologische Endpunkte und Mikrobeads

Ökotoxikologische Endpunkte beschreiben Veränderungen der Eigenschaften biologischer Systeme unter Einwirkung von Chemikalien. Welche Endpunkte für die jeweilige Untersuchung herangezogen werden, ist abhängig von der Wirkung der jeweiligen Substanz und der Expositionssituation [129]. Für die Beschreibung der Effekte auf die pro- und eukaryotischen Organismen wurden die Endpunkte Wachstum, Stoffwechselaktivität und endogenes zelluläres Fluoreszenzsignal der Zellen (EZFS) festgelegt. Die Veränderung im exprimierten GFP-Signal wurde für die HeLa-Zellkultur als toxikologischer Endpunkt herangezogen. Die Bestimmung dieser Endpunkte konnte über photometrisch und fluorimetrisch arbeitende Detektoren realisiert werden.

Die Untersuchung der Stoffwechselaktivität der Organismen erfolgte anhand des Indikators pH-Wert, welcher über ins Mikrofluidsegment integrierte Mikrobeads detektiert wurde. Der Einsatz solcher Mikrobeads für die Messung von Indikatoren umweltrelevanter und biologischer

Abläufe stellt eine neue Möglichkeit innerhalb alternativer, nicht-invasiver Analysetechniken dar. Bei den Mikrobeads handelt es sich um inerte Polymerpartikel, auf deren Oberfläche, Indikatormoleküle (Fluoreszenzfarbstoffe) über kovalente Bindungen immobilisiert sind [130]. Die in diesen Versuchen eingesetzten HPTS/p-HEMA-(8-Hydroxypyren-1,3,6-Trisulfonate auf Polyhydroxyethylmethacrylat [131]) Mikrobeads mit einer Emissionswellenlänge von HPTS bei 510 nm nach Anregung bei 428 nm als auch 470 nm ermöglichten die segment-interne pH-Wert Analyse (Abb. 2-6, a). Das Intensitätssignal des Fluoreszenzfarbstoffes ist pH-anhängig. Die Mikrobeads weisen eine nahezu lineare Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals vom pH-Wert im stoffwechselrelevanten pH-Bereich auf und sind deshalb gut für biologische Messungen geeignet (Abb. 2-6, b).



**Abb. 2-6:** HPTS/p-HEMA Mikrobeads **a)** Dissoziationsgleichgewicht in Abhängigkeit des pH-Wertes. **b)** Fluoreszenzsignal von HPTS/p-HEMA Mikrobeads in Abhängigkeit des pH-Wertes. Quelle: Dipl.-Chem. P. Schrenkhammer, Institut für Analytische Chemie, Universität Regensburg

Die Integration von HPTS/p-HEMA Mikrobeads mit Durchmessern von 3  $\mu\text{m}$  in die Mikrofluidsegmente ermöglichte die in situ Messung des pH-Wertes während der Stoffwechselaktivität der Testorganismen. Zur Minimierung von Clusterbildungen und der Intensivierung des Fluoreszenzsignals der Mikrobeads wurden diese vor der Zudosierung ins Mikrofluidsegment in einer DMSO/PVP(10%/5%)-Lösung unter Ultraschallbehandlung gequellt. Anschließend erfolgte die Injizierung der Mikrobeads mit der Zellsuspension in die Mikrofluidsegmente.

Für den Zebrafisch *Danio rerio* wurden verschiedene phänotypische Entwicklungsmerkmale als toxikologische Endpunkte festgelegt. Es wurden letale (Koagulation, Absterben des Embryos), subletale (Gastrulation, Augenanlage, Herzschlagfrequenz, Blutzirkulation,

Pigmentierung, Schwanzablösung und Schlupf) und teratogene (Deformationen) Endpunkte untersucht. Für den Invertebraten *C. elegans* wurde der erfolgte Schlupf zur L1-Larve als toxikologischer Endpunkt bestimmt. Die Erfassung der Endpunkte erfolgte über Bildanalyse direkt im Schlauch.

## 2.4 Bakterien im Mikrofluidsegment

*Escherichia coli* zählt zu der Gruppe der säurebildenden, gram-negativen, stäbchenförmigen Bakterien, welche sich durch Geißeln fortbewegen. Die *E. coli* Bakterien sind in der Lage, sowohl aeroben als auch anaeroben Stoffwechsel zu betreiben [132]. In der Forschung ist *E. coli* ein beliebter Modellorganismus, der unter anderem einfach zu kultivieren ist, eine sehr kurze Generationszeit von ca. 20 min bei optimalen Bedingungen aufweist und dessen Genom vollständig bekannt ist. Das Darmbakterium *E. coli* hat sich für die Handhabung in Mikrofluidsegmenten als best geeigneter Modellorganismus erwiesen und wurde aus diesem Grund für die Evaluierung von Einzelwirkungs- und Kombinationswirkungsscreenings ausgewählt. In Mikrosystemen wird *E. coli* u.a. zur Untersuchung von Stoffwechselaktivitäten und für die Identifizierung von antimikrobiellen Substanzen eingesetzt [133].

### 2.4.1 Eingesetzte Chemikalien, Nährmedien und Synthesevorschriften

#### *Chemikalien*

Die verwendeten Chemikalien wurden in p.a. Qualität von den Firmen bezogen und ohne vorherige Aufreinigung eingesetzt (s. Tabelle 2-1).

**Tabelle 2-1:** Auflistung der eingesetzten Chemikalien für die Versuche mit *E. coli*

| Bezeichnung Chemikalie | Abkürzung/<br>Summenformel  | Firma                         |
|------------------------|---|-------------------------------|
| Polyethylenglykol      | PEG/C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>  | Carl Roth (Karlsruhe)         |
| Polyvinylpyrrolidon    | PVP/(C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO) <sub>n</sub>   | Merck (Darmstadt)             |
| Dimethylsulfoxid       | DMSO/C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS   | Merck (Darmstadt)             |
| Coffein                | ---/C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>                                  | AppliChem (Darmstadt)         |
| 2,4-Dichlorphenol      | DCP/C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> O   | Merck (Darmstadt)             |
| Cochenillerot A        | ---/C <sub>20</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S <sub>3</sub> | VWR International (Darmstadt) |
| Indigokarmin           | ---/C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>   | Fluka Analytical              |

---

|                                      |   |                       |
|--------------------------------------|---|-----------------------|
| Perfluormethyldecalin                | PP9/C <sub>11</sub> F <sub>20</sub>                             | F2 Chemicals Ltd (UK) |
| Zitronensäure-Phosphat-Puffer        | Herstellung und Angaben s. Literatur [128]                      |                       |
| Borsäure-Puffer                      | Herstellung und Angaben s. Literatur [128]                      |                       |
| 2,4-Dinitrophenol                    | DNP/C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | Acros Organics        |
| Kupferchlorid                        | ---/CuCl <sub>2</sub>   | Merck (Darmstadt)     |
| Silbernitrat                         | ---/AgNO <sub>3</sub>   | Merck (Darmstadt)     |
| 25%ige Ammoniaklösung                | ---/NH <sub>4</sub> OH  | Merck (Darmstadt)     |
| D(+)-Glucose /Dextrose               | ---/C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>               | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Salpetersäure                        | ---/HNO <sub>3</sub>  | Merck (Darmstadt)     |
| Natriumhydroxid                      | ---/NaOH  | Merck (Darmstadt)     |
| Tetrachlorogold(III)-säure-Trihydrat | ---/HAuCl <sub>4</sub>  | Carl Roth (Karlsruhe) |
| L(+)-Ascorbinsäure                   | ---/C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>                | Merck (Darmstadt)     |
| Ammoniumchlorid                      | ---/NH <sub>4</sub> Cl  | Merck (Darmstadt)     |

---

### *Synthese Decapeptid*

Das Peptid-Amid KKVVFVKVFK-NH<sub>2</sub> wurde durch Festphasensynthese unter Verwendung der Fmoc/tBu-Chemie und Rink Amid MBHA Polystyren Resin hergestellt (EMC microcollection, [134]). Die Reinheit des Peptides betrug > 90 %.

### *Nanopartikelsynthese, Charakterisierung und Referenzmethode*

Die **Synthese von Silbernanopartikeln** erfolgte nach Kvittek et al., 2005 [135,136]. Als Reduktionsmittel wurde Glucose verwendet. Vor der Herstellung der AgNP erfolgte eine Reinigung der Reaktionsgefäße mit 25 %iger Salpetersäure und destilliertem Wasser (Aqua dest.). Es wurden zwei Lösungsansätze hergestellt.

**Lösung 1:** 9,6 mg AgNO<sub>3</sub> wurden in 24,98 ml Aqua dest. gelöst und mit 17 µl 25 %iger Ammoniaklösung versetzt. **Lösung 2:** 100,2 mg D(+)-Glucose wurde in 25 ml Aqua dest. gelöst.

Nach Sterilfiltration (Rotilab Spritzenfilter, 0,22 µm, Carl Roth) der Lösungen 1 und 2 wurde der pH-Wert beider Lösungen durch Zugabe von 0.1 M NaOH (Lösung 1: pH = 12,56 [Ausfällungen beobachtet] und Lösung 2: pH = 12,3) eingestellt. Aufgrund von Ausfällungen, die durch die pH-Wert Änderungen auftraten, erfolgt nach Kvittek et al. für Lösung 1 eine erneute Filtration (Rotilab Spritzenfilter, 0,22 µm, Carl Roth). Es wurden zwei verschiedene

Chargen an Nanopartikeln hergestellt: **Charge 1:** Filtration der Lösung 1 nach pH Einstellung, **Charge 2:** Keine Filtration der Lösung 1 nach pH Einstellung.

Die beiden Lösungen wurden in einem mit Al-Folie umwickelten 100 ml Kolben zusammengeführt, wobei Lösung 1 vorgelegt wurde. Anschließend wurden beide Lösungen unter 5- bis 10-minütigem Rühren vermischt. Die dadurch erhaltenen Nanopartikeldispersionen zeigten eine **gelbe Färbung** für **Charge 1** und eine **braune Färbung** für **Charge 2**. Ursache dafür sind Unterschiede im Wachstumsprozess der Partikelkeime.

Die **Synthese von Goldnanopartikeln** erfolgte durch die Reduktion von Tetrachloroaurat mit Ascorbinsäure als Reduktionsmittel. Dafür wurde zu 2 ml 1 mM  $\text{HAuCl}_4$ , 0,1 ml 0,1 M Ascorbinsäure unter schütteln zugegeben. Anschließend erfolgte eine Verdünnung mit 5 ml partikelfreiem destilliertem Wasser.

Der Einfluss des synthetischen Mediums auf die optischen Eigenschaften der Gold- und Silbernanopartikel wurde mit UV/VIS-Spektroskopie untersucht. Die Zusammensetzung der Mischungen von Partikellösung und Medium in den UV-Küvetten entsprach den realen Bedingungen im Mikrofluidsegment. Die Absorptionsspektren der kolloidalen Partikellösung wurden direkt nach der Vermischung sowie nach 24- und 48-stündiger Kultivierung bei 37°C gemessen. Parallel dazu wurden Referenzversuche mit Aqua dest. durchgeführt. Die Zusammensetzung der Versuchsansätze und die Versuchsbedingungen sind im Anhang 6.1.2 dargestellt.

Die Charakterisierung der Nanopartikel erfolgte mit Hilfe der differentiellen zentrifugalen Sedimentation (DCS), UV/VIS-Spektralphotometrie, Durchlicht-Dunkelfeldmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie (REM). Mit der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erfolgte die Aufnahme von Zellen mit und ohne Zugabe von Nanopartikeln. Die Beschreibung der Geräte und Verfahren sind dem Anhang 6.2 zu entnehmen.

### ***Nährmedien***

**Tabelle 2-2:** LB-Lennox

| Zusammensetzung | Konzentration |
|-----------------|---------------|
| LB-Lennox       |               |
| Pepton          | 10 g/l        |
| Hefeextrakt     | 5 g/l         |
| Natriumchlorid  | 5 g/l         |

**Tabelle 2-3:** synthetisches Medium in Anlehnung [137]

| Zusammensetzung                    | Konzentration |
|------------------------------------|---------------|
| Synthetisches Medium               |               |
| $K_2HPO_4$                         | 0,56 g/90 ml  |
| $KH_2PO_4$                         | 0,3 g/90 ml   |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$               | 0,012 g/90 ml |
| $NH_4Cl$                           | 0,1 g/90 ml   |
| +                                  |               |
| 10ml Glucose<br>(steril filtriert) | 0,1 g/l       |

### 2.4.2 Einbringung und Kultivierung von *Escherichia coli*

Für die Versuche wurde der *Escherichia coli*-Stamm RV308 (zur Verfügung gestellt vom Hans-Knöll Institut (HKI), Jena) eingesetzt. Zur Herstellung der Vorkultur im Glaskolben wurde ein Komplexmedium (LB-Lennox) mit der *E. coli*-Kultur beimpft und für 24 h bei 37°C unter Rühren inkubiert. Die Kultur wurde anschließend auf LB-Agarplatten übertragen und erneut unter gleichen Bedingungen inkubiert.

Die Herstellung der Testkultur erfolgte durch das Abimpfen einer einzelnen *E. coli* Kolonie von der Agarplatte mittels Impföse und Überführung sowie 24-stündiger Kultivierung sowohl in einem mit Vollmedium (LB-Lennox) als auch in einem mit Minimalmedium (synthetischem Medium) gefüllten Erlenmeyerkolben. Die Testkulturen wurde nach Zellzahlermittlung mittels Thoma-Zählkammer durch Verdünnung mit dem entsprechenden Nährmedium unter Zugabe eines Indikatorfarbstoffes aus der Vorkultur hergestellt und in die Spritzen überführt.

Die Polyethylenglykollösung (PEG) diente beim Verfahren der blockweisen Segmentierung zur Dichteanpassung. Durch den Einsatz von Rührern bestand in nachfolgenden Experimenten dazu keine Notwendigkeit mehr. Die Anfangszellichten und die Zusammensetzung der Zellsuspensionen für die einzelnen Segmentierungsverfahren sind im Anhang 6.1.3 zusammengestellt.

### 2.4.3 Toxizitätstests

Für die Durchführung von Ökotoxizitätstests in Mikrofluidsegmenten wurden verschiedene Verfahren getestet. Erste Erfolge bei der Übertragung von ökotoxikologischen Standardverfahren für Einzelwirkungs- und Kombinations-Screenings konnten mit dem Verfahren der **blockweisen Segmenterzeugung** erzielt werden. Mit diesem Verfahren wurden jeweils 13 Segmentblöcke á 20 bis 25 Segmenten für die Untersuchung der Einzelwirkung von Chemikalien und 17 Segmentblöcke für die Untersuchung der Kombinationswirkung binärer Gemische generiert.

Der erste und der letzte Block wurden für beide Varianten als Negativkontrolle (nur Nährmedium, keine Zellen und kein Wirkstoff) und der zweite Segmentblock als Positivkontrolle (nur Zellen, kein Wirkstoff) eingestellt. In den dazwischen liegenden Segmentblöcken wurde die Konzentration des Wirkstoffes für die Einzelwirkungs-Screening sukzessive um 10 % erhöht, während für die Kombination von zwei Wirkstoffen die Konzentrationen in jeweils 25 % Schritten zwischen den Blöcken miteinander kombiniert

wurden (s. Kapitel 2.2, *blockweise Segmentierung*). Die Größe der erzeugten Segmente betrug 600 bis 800 nl. Damit ergab sich eine durchschnittliche Anfangszellichte von 9 bis 12 Zellen pro Segment.

Die Einstellung der Konzentration in den Mikrofluidsegmenten zwischen den einzelnen Blöcken konnte durch die gezielte Flussratensteuerung der Fluide ermöglicht werden. Die Variation der Segmentzusammensetzung erfolgte durch Änderung der Volumenströme der (des) Wirkstoffe(-s) und eines Verdünnungsfluids (Nährmedium: hier LB-Medium) bei konstanter Flussrate der Zellsuspension, wodurch eine konstante Segmentgröße mit gleicher Zellanzahl und variabler Wirkstoffkonzentration gewährleistet wurde. Dafür wurden die Flussraten von Nährmedium und den Wirkstoffen zwischen 0 und 4  $\mu\text{l}/\text{min}$  variiert. Die Flussraten für Zellsuspension und Trägerflüssigkeit (PP9) wurden konstant bei 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  und 10 bzw. 40  $\mu\text{l}/\text{min}$  gehalten. Daraus ergab sich eine Gesamtflussrate von 16 bzw. 46  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Als Indikator für das Wachstum der Bakterienkultur wurde die optische Dichte (Trübung) bei 610 nm in den Mikrofluidsegmenten mittels Mikrodurchfluss-Photometern ermittelt.

Zur Erstellung von Dosis-Wirkungskurven für den jeweiligen Wirkstoff und dessen Kombination wurden die Mittelwerte der Einzelblöcke herangezogen. Die EC50-Werte für die Einzelsubstanzen wurden mit Hilfe gefitteter Kurvenfunktionen ermittelt. Damit konnten toxikologische Studien zur Wirkung von DCP, DMSO, PVP, Coffein und Adrenalin sowie deren binäre Gemische mit den Blockprogrammen realisiert werden.

Die Untersuchung der Effekte von Wirkstoffen auf molekularer Ebene wurde über ein spezielles PCR (Polymerase-Kettenreaktion)-Protokoll realisiert (s. Anhang 6.1.4).

Bei der blockweisen Segmentierung wurde die reale Wirkstoffkonzentration im Mikrofluidsegment mit Hilfe eines Indikatorfarbstoffes (Cochenillerot A, 0,005 % Masse), welcher zuvor dem Wirkstoff beigemischt und dadurch nach der Segmentierung zu gleichem Anteil im Segment verteilt wurde, indirekt über photometrische Messung ermittelt. Die Konzentration des Schadstoffes konnte aus dem Extinktionssignal bestimmt werden ( $C_{\text{Schadstoff}} \sim C_{\text{Indikator}} \sim \text{Extinktion}$ ). Dazu wurde eine photometrische Kalibration durchgeführt, bei welcher die Extinktion in Mikrofluidsegmenten mit bekannten Farbstoffkonzentrationen (Flussraten Segmentierung: 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  Farbstoff, 40  $\mu\text{l}/\text{min}$  Träger, Flussrate Messung: 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) bestimmt wurde. Die Detektion des Farbstoffes erfolgte bei einer Wellenlänge von 505 nm mit einem Mikrodurchflussphotometer. Unberücksichtigt blieben dabei evtl. auftretende Adsorptionseffekte an der Kanalwand und evtl. Diffusion der Schadstoffe in die Trägerphase. Es wurde davon ausgegangen, dass aufgrund der ausgewählten inerten Trägerphase (PP9) und der Schadstoffklassen solche Effekte ausbleiben. Die vollständige Einbettung der

Mikrofluidsegmente in die Trägerphase sollte zudem eine Adsorption der Wirkstoffe an der Kanalwand nach erfolgter Exposition unterbinden. Damit konnte die über den Indikatorfarbstoff ermittelte Wirkstoffkonzentration als reale Konzentration angenommen werden.

Für die **kontinuierliche Konzentrationsänderung** (Rampenprogramme) wurde die Ermittlung der realen Konzentration aufgrund der Größe der Segmentfelder nicht durchgeführt, sondern nur die Konzentrationseinstellung über die Indikatorfarbstoffe überwacht. Die in den Ergebnissen angegebenen Konzentrationen sind deshalb als Soll- und nicht als Ist-Konzentrationen zu verstehen.

Die kontinuierliche Konzentrationsabstufung für Einzel- und Kombinations-Screenings zwischen den einzelnen Mikrofluidsegmenten konnte durch gezielte Verdünnung der Effektorkonzentration mit Nährmedium (hier: synthetisches Medium) eingestellt werden. Die dafür verwendeten Programme sind in Kapitel 2.2, *Rampenprogramme* beschrieben.

Segmentsequenzen mit einer Größe von bis zu 200 Segmenten wurden für die Erstellung **eindimensionaler** Konzentrationsfelder unterschiedlicher Testsubstanzen innerhalb eines Zeitfensters von 15 min erzeugt. Die ersten 20 Segmente bildeten dabei die Positivkontrolle (nur Zellen, kein Wirkstoff). Dafür wurden die Flussraten vom synthetischen Medium und der Wirkstofflösung gegenläufig variiert. Für eine einheitliche Verteilung der Zellen und Mikrobeads in den Mikrofluidsegmenten wurde die Flussrate der Zellsuspension konstant gehalten. Die durchschnittliche Zellzahl bei Versuchsbeginn wurde mit durchschnittlich 18 Zellen pro Segment eingestellt (s. Anhang 6.1.5).

Für die Detektion der optischen Dichte (Trübung) und der Autofluoreszenz der Zellen in den Mikrofluidsegmenten wurde mit einer Gesamtflussrate von 38  $\mu\text{l}/\text{min}$  gearbeitet. Die simultane Messung von Trübung und Fluoreszenzintensität erfolgte mittels eines Mehrkanal-Mikrodurchflussphotometers und eines Mikrodurchflussfluorimeters.

Die kontinuierliche Erzeugung von **2-dimensionalen** Segmentsequenzen erfolgte durch spezielle LabVIEW-Programme (s. Kapitel 2.2, *Rampenprogramme*). Es wurden 66 Kombinationen der Konzentrationen beider Wirkstoffe durchgeführt, wobei jede Kombination 6 bis 7 Segmente umfasste. Die erste Stufe diente als Positivkontrolle, da hier das Zellwachstum ohne Wirkstoffkombination untersucht wurde. Die durchschnittliche Größe der generierten Mikrofluidsegmente betrug 500 nl. Die Detektion von optischer Dichte und Autofluoreszenzsignal der Zellen erfolgte für alle zweidimensionalen Segmentsequenzen mit einer Flussrate von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Die Versuchsbedingungen wie Probenzusammensetzung,

Flussraten, Segmentvolumen, Anzahl der Segmente und Detektionsparameter für die Erzeugung ein- und zweidimensionaler Konzentrationsfelder sind im Anhang 6.1.5 zusammengestellt.

Die Auswertung der Messdaten für beide Verfahren erfolgte ebenfalls über eigens geschriebene LabVIEW-Programme. Eine Beschreibung der Auswerteverfahren ist dem Anhang 6.1.6 zu entnehmen. Die isobolische Darstellung der zweidimensionalen Screenings wurde durch die Erstellung von XYZ Random Matrizen (Software: OriginPro) aus den gemittelten Daten ermöglicht. Die EC50-Werte konnten für ausgewählte Isobolen (Linien gleicher Wirkung auf Dosis-Ebene<sup>d</sup>) ermittelt und den EC50-Werten der Einzelsubstanzen gegenübergestellt werden. Damit konnten ein- und zweidimensionale toxikologische Studien zur Wirkung von Phenolen, Metallnanopartikeln, Schwermetallen, eines antibakteriellen Peptides und deren binärer Gemische durchgeführt werden.

Die Analyse der Segmente erfolgte für die Experimente mit Blockprogrammen und Rampenprogrammen direkt nach der Segmentierung und nach jeweils 24h Kultivierung über einen Zeitraum von bis zu 3 Tagen. Die Mikrofluidsegmente wurden während der Kultivierung bei 37°C und 80% Luftfeuchte gelagert.

## 2.5 Hefe im Mikrofluidsegment

*Saccharomyces cerevisiae* (auch Bäckerhefe) ist ein einzelliger, eukaryotischer Organismus und zählt zur Klasse der Saccharomyceten. Die Zellen haben einen Durchmesser von 5-10 µm und sind rund bis oval [132]. Die Fortpflanzung erfolgt durch Knospung mit einer Verdopplungszeit von ca. 90 min im Vollmedium und ca. 140 min im synthetischen Medium. Bäckerhefen spielen wegen des einfach zu manipulierenden Genoms, der schnellen Verdopplungszeiten, der nicht Pathogenität, des wandlungsfähigen DNA-Transformationssystems und wegen des einfachen Umgangs eine bedeutende Rolle in der Molekularbiologie [138]. *S. cerevisiae* kann wie *E. coli* sowohl aeroben als auch anaeroben Stoffwechsel (fakultativ anaerob) betreiben.

---

<sup>d</sup> Symposium, Kombinationseffekte in der Arbeitswelt, Johannes-Gutenberg Universität, Mainz 6.11.2004, [http://www.dkfz-heidelberg.de/biostatistics/report/mainz04\\_konietzo3.pdf](http://www.dkfz-heidelberg.de/biostatistics/report/mainz04_konietzo3.pdf)

### 2.5.1 Einbringung und Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Für experimentelle Zwecke wird *S. cerevisiae* in Vollmedien (Komplexmedium), aber auch in Minimalmedien (synthetische Nährmedien) bei ca. 30°C kultiviert. Beide Arten von Nährmedien wurden bei der Kultivierung von Hefen in Mikrofluidsegmenten eingesetzt. In den durchgeführten Arbeiten wurde der *S. cerevisiae* Stamm DSM 70443 (zur Verfügung gestellt vom HKI Jena) eingesetzt. Wie bereits für die Bakterienkultur in Kapitel 2.4.2 beschrieben, wurden die Vorkulturen durch Überimpfen von einzelnen Hefekolonien in die Flüssigmedien YM (Komplexmedium) und YNB (synthetisches Medium) hergestellt. Die Hefekulturen wurden während der Kultivierung bei 25°C für 48 h unter Rühren inkubiert.

**Tabelle 2-4:** Zusammensetzung der Komponenten Vollmedium (YM) und synthetisches Medium (YNB)

| Zusammensetzung<br>YM-Flüssigmedium<br>(Vollmedium) | Konzentration |
|---|---------------|
| Hefeextrakt (Roth GmbH)                             | 4 g/l         |
| Malzextrakt (Roth GmbH)                             | 10 g/l        |
| Dextrose (Roth GmbH)                                | 4 g/l         |
| Synthetisches Medium                                | Konzentration |
| YNB   |               |
| mit Ammoniumsulfat<br>(MP Biomedicals, LLC)         | 6,7 g/l       |

### 2.5.2 Wachstumsstudien und Toxizitätstests

Für die Versuche mit Hefezellen im Mikrofluidsegment wurden das synthetische Medium YNB mit Ammoniumsulfat und das Vollmedium YM eingesetzt. Die Wachstumskurven für die Kultivierung von Hefe in beiden Nährmedien konnten in Mikrofluidsegmentsequenzen untersucht werden. Die schnelle Sedimentation der Zellen bedingt durch ihre Größe und das mögliche Auftreten von Zellverbänden erforderte den Einsatz von Rührsystemen für eine homogene Verteilung in den Segmenten. Das Wachstum der Zellen wurde unter Einsatz verschiedener Rührsysteme (Spritzenrührersystem Cetoni GmbH, Magnetrührer in Spritze) und ohne Einsatz von Rührsystemen während der Segmenterzeugung untersucht.

Durch gezielte kontinuierliche Flussratenänderung von Nährmedium, Zellsuspension und Trägermedium (PP9) konnten Segmentsequenzen von bis zu 200 Segmenten erzeugt werden.

Die Gesamtflussrate für die Segmentierung und die Detektion betrug 50 µl/min. Es wurden Segmentvolumina zwischen 400 und 600 nl erzeugt.

Die Untersuchung der Wirkung von 2,4-Dinitrophenol (s. Kapitel 2.4.1, *Chemikalien*) und einem Decapeptid (s. Kapitel 2.4.1, *Decapeptid*) auf das Wachstum der Hefezellen im Segment wurde im Vollmedium YM durchgeführt. Spezielle Programme realisierten die kontinuierliche Konzentrationseinstellung in den Mikrofluidsegmenten (s. Anhang 6.1.1, Abb. 6-1, c-1). Hierbei wurden Segmentsequenzen mit bis zu 400 Segmenten und Volumen zwischen 500 und 600 nl erzeugt.

Das Wachstum der Hefezellen im Mikrofluidsegment wurde für die Wachstumsstudien wie auch für die Toxizitätstests direkt nach der Segmentierung ( $t = 0h$ ) und über einen Zeitraum von bis zu sechs Tagen mit Mikrodurchfluss-Photometern ermittelt. Die Inkubationstemperatur betrug 25°C.

Die Zusammensetzung der Zellsuspensionen und Probenlösungen sowie die Versuchsbedingungen für die Wachstums- und Toxizitätstests sind in Anhang 6.1.7 zusammengefasst.

## 2.6 Grünalgen im Mikrofluidsegment

*Chlorella vulgaris* ist eine kugel- bis ellipsoidförmige Grünalge (Stamm Chlorophyta) ohne Geißeln mit einem Durchmesser von 5-10 µm. Grünalgen spielen eine wichtige Rolle in der Biotechnologie, aber auch in der Ökotoxikologie [139]. Die hohe Empfindlichkeit von *Chlorella* gegenüber Schadstoffen, vor allem aber gegenüber Schwermetallen, machte sie zu einem geeigneten Umweltorganismus, für welchen standardisierte Richtlinien der Algentests entwickelt wurden.

Die Zellen der meisten Organismen weisen eine natürliche Fluoreszenz (endogene zelluläre Autofluoreszenz) auf. Zu den typischen Vertretern von Chromophoren, die verantwortlich für die Fluoreszenzerscheinung in Zellen sind, gehören sowohl Coenzyme wie Flavine, NAD(P)H als auch aromatische Aminosäuren wie Tryptophan. Von den photosynthetischen Chromophoren ist das Chlorophyll (speziell Chlorophyll a und b) ein Hauptverursacher von Autofluoreszenz in Pflanzen [140]. In der Forschung wird die Autofluoreszenz einerseits als sensitiver Indikator von Stoffwechselfunktionen sowie zur Differenzierung von Geweben genutzt, erweist sich aber störend für die Erfassung spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe oder dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) [141]. Für toxikologische Untersuchungen anhand von Grünalgen wird neben dem

Wachstum der Algen die Autofluoreszenz erfasst, um Aufschlüsse über den Einfluss von Umweltfaktoren auf den Photosyntheseapparat zu gewinnen [5].

### 2.6.1 Kultivierung und Einbringung von *Chlorella vulgaris*

Mit diesen Versuchen sollten die Integration und die Verteilung von *Chlorella vulgaris* in Mikrofluidsegmenten untersucht werden. Die Erfassung der Zellen konnte über die Messung des Autofluoreszenzsignals der Algen ermöglicht werden. Die Studien bilden die Grundlagen für die zukünftige Etablierung von Toxizitätstests mit Grünalgen in Mikrofluidsegmenten. Damit soll es möglich werden, die Wirkung verschiedenster Umweltschadstoffe auf die Photosyntheseaktivität der Grünalgen zu untersuchen.

Der *Chlorella vulgaris* Stamm wurde von der TU Karlsruhe, Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik zur Verfügung gestellt. Die Vorkultur der Algen wurde in IGV-Medium (s. Tabelle 2-5) bei 25°C und leichtem Schütteln (Shaker S-4, neoLab<sup>®</sup>, 50 U/min) herangezogen. Eine dauerhafte, gleichförmige Beleuchtung der Algenkultur konnte durch den Einsatz einer Starklichtleuchte (Brennenstuhl, 24W Leistung, 1800 cd Lichtstärke) ermöglicht werden. Die Testkultur wurde durch Verdünnen mit IGV-Medium auf die gewünschte Anfangszellichte von  $10^6$  bis  $10^7$  Zellen/ml eingestellt.

Die Verteilung der Algen innerhalb einer Mikrofluidsegmentsequenz wurde in Abhängigkeit von unterschiedlichen Rührsystemen (Spritzenrührersystem NeMix Cetoni GmbH, Magnetrührer in Spritze) untersucht. Dafür wurde das Autofluoreszenzsignal der Algen im Mikrofluidsegment fluorimetrisch ausgelesen. Die Flussraten für die Segmentierung wurden auf 40µl/min für den Trägerstrom und 3 bis 5 µl/min für die Zellsuspension und das Nährmedium eingestellt. Die Gesamtflussrate für die Segmenterzeugung und das Monitoring der Segmente lag bei 46 bis 50 µl/min. Es wurden Segmentsequenzen mit bis zu 200 Segmenten und einem durchschnittlichen Segmentvolumen zwischen 500 nl und 600 nl erzeugt. Die Umdrehungsgeschwindigkeit der Cetoni-Spritzenröhreinheit wurde mit 1100 U/min festgelegt. Im Anhang 6.1.8 sind die Versuchsbedingungen für die Versuche mit Spritzenröhreinheit und einem Rührer in der Spritze zusammengestellt.

**Tabelle 2-5:** Zusammensetzung IGV-Medium

| Nährstoff  | Konzentration             |
|--|---------------------------|
| KNO <sub>3</sub>   | 0,5 g/l                   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0,34 g/l                  |
| MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O  | 0,5 g/l                   |
| FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O  | 0,014 g/l                 |
| Titriplex <sup>®</sup> II  | 0,05 g/l                  |
| Spurenelementen-Lösung I: 0,1 ml/l   |                           |
| ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O  | 0,74 g auf 100 ml Wasser  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>   | 0,057 g                   |
| CoSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O  | 0,238 g                   |
| CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O  | 0,236 g                   |
| MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O  | 4,100 g                   |
| Spurenelementen-Lösung II: 0,1 ml/l  |                           |
| (NH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4H <sub>2</sub> O oder | 0,092 g auf 100 ml Wasser |
| Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O                                    | 0,2464 g                  |
| MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O   | 3,1072 g                  |
| dann pH-Einstellung auf pH 6,7 mit 1 M NaOH oder 1M HCL.                                 |                           |

## 2.7 Humanzellen im Mikrofluidsegment

Der Einsatz von regulierten Gen-Expressions Systemen und deren Beobachtung durch nicht-invasive Bildgebungsverfahren bieten fundamentale Einblicke in komplexe, biologische Prozesse und erlauben Langzeitstudien der Gen-Funktionen individueller Organismen [142].

Mit dem Einsatz von HeLa-Zellen<sup>e</sup> sollte die Eignung von Mikrofluidsegmenten für zukünftige Studien zur Regulation auf Genebene untersucht werden. Die Integration von Zellexpressionssystemen bietet die Möglichkeit, Einflüsse von toxischen Substanzen auf die Proteinsynthese spezifisch nachzuvollziehen.

HeLa-Zellen sind menschliche Epithelzellen eines Gebärmutterhalskrebses. Das Besondere an der hier eingesetzten Zelllinie ist das integrierte Tet-On-Genexpressionssystem. Dieses System (in HeLa-Zellen eingebrachte Plasmid-Vektoren) nutzt einen Tet-on-Transaktivator (Fusionsprotein-rtTA), welcher nur bei Anwesenheit des Antibiotikums Doxycyclin (DOX) an einen Tet-Operator<sup>f</sup> (Tet Response Element-TRE) binden kann und damit den Minimalpromotor<sup>g</sup>

<sup>e</sup> Erste menschliche Zellen, die im Labor kultiviert werden konnten; die Gebärmutterkrebszelllinie entstammt einer Gewebeprobe der Henrietta Lacks; 1952 wurde die HeLa-Zelllinie angelegt und seitdem weitgehend ununterbrochen kultiviert; Quelle: Zeit online, <http://www.zeit.de/2006/52/M-HeLa-Zellen?page=all>

<sup>f</sup> Ein Operon ist eine Funktionseinheit von DNA, die aus Promotor, Operatoren und Strukturgenen besteht [143]

Cypionka, H. *Grundlagen der Mikrobiologie*; 3. ed.; Springer Verlag: Berlin Heidelberg New York, 2005.

( $P_{tet}$ ) aktiviert. Erst dann wird ein bestimmtes Gen (“Gene of interest“, hier Expression des grün fluoreszierende Protein (GFP)) exprimiert [144-146].

Zusätzlich wurde die Eignung eines grün fluoreszierenden Fluoreszenzfarbstoffes (Live/Dead® Cell Stain Kit) für die Vitalitätsbestimmung der HeLa-Zellen in Mikrofluidsegmenten getestet. Die Färbung der Zellen basiert hier auf der Reaktion eines reaktiven Fluoreszenzfarbstoffes mit den zellulären Aminen ( $-NH_2$ ) [147]. Bei nekrotischen Zellen ist der Farbstoff in der Lage, die Zellmembran zu durchdringen und mit den freien Aminen im Inneren der Zelle und an der Zelloberfläche zu reagieren. Die Reaktion von Fluoreszenzfarbstoff und Oberflächenaminen findet auch bei gesunden Zellen statt, zeichnet sich aber aufgrund der schwachen Bindung durch eine geringe, matte Fluoreszenzerscheinung aus. Diese ist leicht von der Fluoreszenzerscheinung geschädigter Zellen zu unterscheiden [148].

Die zukünftigen Einsatzgebiete dieser Variante könnten im ökotoxikologischen Bereich, sowie im medizinischen Bereich liegen. Vorstellbar wäre hier zum Beispiel das Screening von zytotoxischen Effekten einzelner Substanzen oder Substanzgemischen auf vereinzelte Tumorzellpopulationen in Mikrofluidsegmenten.

### 2.7.1 Eingesetzte Chemikalien, Nährmedien und Probenmischungen

Die verwendeten Chemikalien wurden in p.a. Qualität von den Firmen bezogen und ohne vorherige Aufreinigung eingesetzt.

**Tabelle 2-6:** Auflistung der eingesetzten Chemikalien für die Versuche mit HeLa-Zellen

| Bezeichnung Chemikalien                       | Abkürzung/Summenformel              | Firma  |
|---|-------------------------------------|--|
| Perfluormethyldecalin                         | PP9/ $C_{11}F_{20}$                 | F2 Chemicals Limited (UK)  |
| Kupfer(II)-chlorid(wasserfrei)                | ---/ $CuCl_2$                       | Merck (Darmstadt)  |
| Cochinillerot A                               | ---/ $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$ | VWR (Darmstadt)  |
| Polyvinylpyrrolidon                           | PVP/ $(C_6H_9NO)_n$                 | Merck (Darmstadt)  |
| Dihydropyrimidine-derivat                     | B21/ $C_{22}H_{20}BrN_3O_5S$        | Herstellung S. Singh, ZMN, Mikrofluidik u. Biosensorik, TU Ilmenau |
| Saccharose                                    | ---/ $C_{12}H_{22}O_{11}$           | Merck (Darmstadt)  |
| Live/Dead®Fixable Dead Cell Stain Kit, L23101 | ---                                 | Invitrogen   |
| Tetradecan                                    | ---/ $C_{14}H_{30}$                 | Merck  |

<sup>§</sup> Unter einem Promotor versteht man eine DNA-Sequenz, welche die spezifische Wechselwirkung mit DNA-bindenden Proteinen und damit die regulierte Expression eines Gens ermöglicht [143] Cypionka, H. *Grundlagen der Mikrobiologie*; 3. ed.; Springer Verlag: Berlin Heidelberg New York, 2005.

## 2.7.2 Kultivierung und Einbringung von HeLa-Zellen

Die HeLa-Zelllinie (Hela-M2-eGFP/luc) wurde vom ZSG Mannheim, Abteilung Molekularbiologie<sup>h</sup> bereitgestellt. Die Kultivierung der Zellen wurde in einem externen Labor am Deutschen Primatenzentrum Göttingen (DPZ), Abteilung Infektionspathologie<sup>i</sup> nach Standardprotokollen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung im DMEM-Medium (Zusammensetzung s. Tabelle 2-7) durchgeführt.

Für die Versuche mit **DOX-induzierten Zellen** wurden die HeLa-Zellen vor Versuchsbeginn mit der optimalen Konzentration an DOX von 200 ng/ml<sup>j</sup> angeschaltet (GFP wird exprimiert, d.h. grüne Fluoreszenzerscheinung). Die Ablösung der adhärent wachsenden Zellen vom Boden der Kultivierungsflaschen konnte durch 10-minütige Behandlung mit 1,5 ml einer Trypsin/EDTA-Mischung erreicht werden. Die Zellen wurden anschließend mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend in 8,5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 15 ml Falcon-Tubes überführt und für 5 Minuten bei 23 °C und 150 g zentrifugiert. Die Zellzahl wurde mit Thoma-Zählkammern ermittelt (Protokoll s. Anhang 6.1.9).

Für die **Vitalitätsstudien mit nicht DOX-induzierten HeLa-Zellen** wurden die Zellen vor der Einbringung ins Mikrofluidsystem mit dem zu untersuchenden Wirkstoff für 30 min behandelt und anschließend mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff (Cell Stain Kit) gefärbt (Standardprotokoll s. Anhang 6.1.10). Danach wurden die Zellen mit PBS Puffer gewaschen und darin überführt. Das Färben der Zellen wurde außerhalb des Mikrofluidsystems durchgeführt, da nach dem Färben ein Waschschrift notwendig ist, welcher zu diesem Zeitpunkt noch nicht in den Mikrofluidsegmenten durchgeführt werden konnte.

Die Zusammensetzung von Nährmedium und eingesetzter Komponentenmischungen kann Tabelle 2-7 entnommen werden.

Zur Vermeidung von Sedimentation der Zellen während der Injizierung in die Mikrofluidsegmente (für diese Versuche standen noch keine geeigneten Rührsysteme zur Verfügung) wurden verschiedene Medien für eine mögliche Dichteanpassung untersucht<sup>k</sup>. Dafür

---

<sup>h</sup> Schönig K., ZSG Mannheim, Abteilung Molekularbiologie; Prof. Bujard, EMBO, Heidelberg.

<sup>i</sup> Leitung Prof. Bodemer; Kultivierung und Versuchsdurchführung Petra Kiesel, Abteilung Infektionspathologie, DPZ Göttingen.

<sup>j</sup> Ergebnis Minimumtest (Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit der DOX-Konzentration) durchgeführt von P. Kiesel.

<sup>k</sup> Arbeiten am DPZ von P. Kiesel durchgeführt.

wurde das Absetzverhalten der HeLa-Zellen in 10 %iger, 30 %iger und 60 %iger Saccharoselösung sowie in Lymphoprep<sup>1</sup> nach 2h und 16h überprüft.

**Tabelle 2-7:** Zusammensetzung von Pufferlösungen und Nährmedium für die Kultivierung und Probenaufbereitung von HeLa-Zellen<sup>m</sup>

|                          | Komponenten   | Konzentration |
|--------------------------|---|---------------|
| PBS-Puffer               | NaCl  | 7,72 g        |
|                          | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  | 2,14 g        |
|                          | KaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0,4 g         |
|                          | Auf 800 ml mit Aqua dest. auffüllen.  |               |
| Zellkulturmedium<br>DMEM | DMEM  | 445 ml        |
|                          | (Dulbecco's Modified Eagle Medium),<br>standardisiertes<br>Nährmedium             |               |
|                          | FCS (fötale Kälberserum)  | 25 ml         |
|                          | Penicillin/Streptomycin   | 5 ml          |
|                          | ohne und mit Zusatz von Phenolrot   |               |
| Trypanblau-Lösung        | NaCl  | 0,9 g         |
|                          | Trypanblau  | 0,5 g         |
|                          | Auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen.  |               |
| Trypsin/EDTA-Mischung    | Trypsin   | 0,05 %        |
|                          | EDTA  | 0,02 %        |
|                          | (Ethylendiamintetraessigsäure)<br>In PBS, ohne Ca <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> |               |

Um eventuell auftretende Hintergrundsignale ausschließen zu können, wurde die Eigenfluoreszenz der eingesetzten Medien und Probenlösungen fluorimetrisch analysiert. Dafür wurden Zellmedium DMEM mit und ohne Zusatz von Phenolrot (DMEM+Phen/DMEM), PBS-Puffer, 60 % Saccharoselösung, 0,001 % sowie 0,005 % Cochenillerot A-Lösung segmentiert und die normierte Intensität ermittelt.

Die Probensuspension für die Versuche mit DOX-induzierten und nicht DOX-induzierten HeLa-Zellen setzte sich aus den in PBS aufgenommenen Zellen mit einer Anfangszelldichte von  $8 \times 10^4$  Zellen/ml und 0,001 % Cochenillerot A zusammen. Für die Erzeugung der Segmente wurden die Flussraten der Probenlösungen mit 5  $\mu$ l/min und des Trägermediums PP9 mit 40  $\mu$ l/min eingestellt. Die Messflussrate lag bei 30  $\mu$ l/min. Die Analyse des Fluoreszenzsignals von GFP und Fluoreszenzfarbstoff (Invitrogen) erfolgte direkt nach der Segmentierung. Die

<sup>1</sup> Separationsmedium, welches als Dichtegradient verwendet wird, Dichte entspricht 30%iger Saccharoselösung

<sup>m</sup> Die Pufferlösungen und die Medien wurden vom Deutschen Primatenzentrum (DPZ) Göttingen, Abteilung Infektionspathologie zur Verfügung gestellt.

Größe der Segmente wurde mit 590 nl bis 690 nl bestimmt. Damit wurde eine Zellzahl von durchschnittlich 51 Zellen pro Segment vorgelegt. Die Segmentsequenzen umfassten zwischen 50 bis 100 Einzelsegmente.

In Tabelle 2-8 sind die einzelnen Versuchsansätze für die Arbeiten mit DOX-induzierten und nicht DOX-induzierten HeLa-Zellen zusammengestellt.

**Tabelle 2-8:** Zusammenstellung der Versuchsansätze zur Erfassung der GFP-Exprimierung und Vitalität (Fluoreszenzfarbstoff) von HeLa-Zellen im Mikrofluidsegment

| DOX-induzierte Zellen   | Nicht DOX-induzierte Zellen   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unbehandelte Zellen (Bezeichnung: Z_DOX)</li> <li>• Behandelte Zellen, d.h. 5 min Einfrieren bei <math>-80^{\circ}\text{C}</math> und 5 min Tauen bei <math>+70^{\circ}\text{C}</math> (Bezeichnung: Z_DOX_Beh)</li> <li>• Behandelte Zellen, d.h. 5 min Einfrieren bei <math>-80^{\circ}\text{C}</math> und 5 min Tauen bei <math>+70^{\circ}\text{C}</math>, gefärbt mit Live/Dead Cell Stain Kit (Bezeichnung: Z_DOX_Beh_F).</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unbehandelte Zellen (Bezeichnung: Z_n)</li> <li>• Unbehandelte Zellen, gefärbt mit Live/Dead Cell Stain Kit (Bezeichnung: Z_n_F)</li> <li>• Behandelte Zellen, d.h. 5 min Einfrieren bei <math>-80^{\circ}\text{C}</math> und 5 min Tauen bei <math>+70^{\circ}\text{C}</math>, gefärbt mit Live/Dead Cell Stain Kit (Z_b_F).</li> </ul> |

### 2.7.3 Toxizitätstests

Die Wirkung von Kupfer(II)-chlorid auf das Genexpressionssystem der DOX-induzierten HeLa-Zellen und die Wirkung eines Dihydropyrimidin-Derivates (B21) auf die Vitalität von nicht DOX-induzierten HeLa-Zellen wurde in Mikrofluidsegmenten untersucht. Die Zusammensetzung der Probenansätze und die Versuchsbedingungen sind in Anhang 6.1.11 dargestellt.

Die Konzentrationseinstellung erfolgte für beide Versuchsansätze vor der Segmentierung. Die HeLa-Zellen wurden für 30 min mit B21 und DMSO behandelt sowie für 24h unter Zugabe von  $\text{CuCl}_2$  bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Die Segmentvolumen lagen zwischen 500 und 1000 nl. Die Ermittlung der Fluoreszenzintensität erfolgte direkt nach der Segmentierung. Die Testsubstanz B21 wurde aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit in DMSO gelöst. Deshalb wurde neben einer unbehandelten Zellpopulation, die Behandlung mit DMSO als Referenzmessung mitgeführt. Für die Versuche mit  $\text{CuCl}_2$  und B21 wurden Referenzversuche in Kulturflaschen durchgeführt<sup>n</sup> (s. Anhang 6.1.11).

<sup>n</sup> Arbeiten von P. Kiesel am DPZ Göttingen durchgeführt.

## 2.8 Mehrzeller im Mikrofluidsystem

Die Integration von Multizellorganismen in Mikrofluidsystemen stellt eine neue Herausforderung für zukünftige, miniaturisierte High-Throughput-Screenings (HTS) dar. Wissenschaftliche Arbeiten mit Vielzellern in Mikrofluidsegmenten sind nur vereinzelt zu finden, haben aber in den letzten 3 Jahren mehr an Bedeutung gewonnen [1,103,123].

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und der Zebrafisch *Danio rerio* sind in der Forschung weit verbreitete Modellorganismen. Für diese Arbeiten wurden sie als Vertreter der Gruppen Invertebraten (wirbellose Organismen) und Vertebraten (Wirbeltiere) ausgewählt. *C. elegans* ist ein weit verbreiteter, im Boden und Wasser vorkommender Fadenwurm (Nematode). Der Einsatz des Invertebraten *C. elegans* als Modellorganismus erstreckt sich von Genforschung über molekulare und zelluläre Analysen bis hin zu ökologischen und ökotoxikologischen Untersuchungen [149-151]. Der Fadenwurm bietet neben der vollständigen Entschlüsselung seines Genoms, der einfachen Kultivierung im Labor, dem kurzen Entwicklungszyklus<sup>a</sup>, der hohen Replikationsrate (300 Embryonen pro Adulttier innerhalb des gesamten Lebenszyklus von 2-3 Wochen) eine geringe Größe von 50 x 30 µm<sup>2</sup> für das Embryo und 1 mm x 65 µm für das Adulttier [152].

Der Zebrafisch *Danio rerio* gehört zur Familie der Karpfenfische und ist ein bekannter Modellorganismus aus der Gruppe der Vertebraten. Die Größe (800 bis 1000 µm Fischeier, 5-6 cm Adulttiere), der im Vergleich zu anderen Wirbeltieren schnelle Entwicklungszyklus<sup>b</sup>, die Transparenz und die Anzahl (bis zu 300 Eiern pro Weibchen) der gelaichten Eier sowie die leichte genetische Manipulierbarkeit führten zu der Popularität des Zebrafisches sowohl in der biomedizinischen, molekularbiologischen Forschung als auch in der Toxikologie [154-156].

Frühe Arbeiten mit *C. elegans* zeigten die einfache Handhabung bei der Einbringung der Embryonen in Mikrofluidsegmente ohne Zerstörung [157,158]. Nach bestem Wissen lagen zu Beginn der Promotionsarbeit keine wissenschaftlichen Arbeiten mit *Danio rerio* als

---

<sup>a</sup> Die Entwicklung von *C. elegans* verläuft vom Embryonenstadium über die Larvenstadien L1(6-12 h), L2(17-20 h), L3 (26-30 h) und L4 (34-40 h) bis zum Adultstadium nach 43-50 h. [152] Jorgensen, E. M.; Mango, S. E. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, 3, 356-369.

<sup>b</sup> Die phänotypische Entwicklung des Zebrafisches kann aufgrund seiner Transparenz gut verfolgt werden. Nach 18 h kann bereits die Augenanlage beobachtet werden, nach 24 h haben sich die meisten Organe entwickelt. Der Schlupf der Zebrafischlarve erfolgt nach 48 h. [153] Kimmel, C. B.; Ballard, W. W.; Kimmel, S. R.; Ullmann, B.; Schilling, T. F. *Developmental Dynamics* **1995**, 203, 253-310.

Modellorganismus in Mikrofluidsegmenten vor. Erst in jüngster Zeit wird auch der Zebrafisch als Testorganismus in Mikrofluidsystemen eingesetzt [159-161].

Das Potential des segmentierten Flusses für Vielzeller könnte eine attraktive Alternative gegenüber toxikologischen und pharmazeutischen Standardmethoden darstellen. Ziel war die Anpassung und Optimierung des Mikrofluidsystems für einen Invertebraten und einen Vertebraten sowie die Durchführung erster toxikologischer Studien in Mikrofluidsegmenten.

### 2.8.1 Eingesetzte Chemikalien, Nährmedien und Pufferlösungen

Die verwendeten Chemikalien wurden in p.a. Qualität von den Firmen bezogen und ohne vorherige Aufreinigung eingesetzt (s. Tabelle 2-9). Die Zusammensetzung der Nährmedien, Nähragar und Pufferlösungen sind in Tabelle 2-10 aufgelistet.

**Tabelle 2-9:** Auflistung der eingesetzten Chemikalien für die Versuche mit *C. elegans* und *Danio rerio*

| Bezeichnung Chemikalie   | Abkürzung/Summenformel  | Firma   |
|--------------------------|---|---|
| Perfluormethyldecalin    | PP9/C <sub>11</sub> F <sub>20</sub>   | F2 Chemicals Ltd (UK)   |
| Natriumdodecylsulfat     | SDS/C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S  | Merck (Darmstadt)   |
| Kupfer(II)chlorid        | CuCl <sub>2</sub>   | Merck (Darmstadt)   |
| Cochenillerot A          | ---/C <sub>20</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S <sub>3</sub> | Wusitta   |
| Natriumhypochloritlösung | ---/NaOCl/H <sub>2</sub> O  | Neolab (Aktives Chlor ca. 12-13 %, NaClO ca. 13-14 %, NaCl max. 11,5 %) |

**Tabelle 2-10:** Zusammensetzung Nährmedien, Agar und Pufferlösungen

| Bezeichnung        | Zusammensetzung  | Konzentration |
|--------------------|--|---------------|
| E3 Medium          | NaCl   | 5 mM          |
|                    | KCl  | 0,17 mM       |
|                    | CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O                               | 0,33 mM       |
|                    | MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                               | 0,33 mM       |
|                    | Methylenblau   | 0,00001 %     |
| Hypochlorit-Lösung | Gelöst in Aqua dest.   |               |
|                    | 2,5 ml KOH   | 5 mM          |
|                    | 6 ml Natriumhypochloritlösung<br>Auf 50 ml mit Aqua dest. auffüllen. |               |
| Wouts-Agar         | Bactotryptan   | 1,6 g         |
|                    | Bacto Yeast  | 1 g           |
|                    | NaCl   | 0,5 g         |
|                    | Auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen.                                 |               |
| M9-Puffer          | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O                | 6 g           |
|                    | NaCl   | 5 g           |
|                    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                      | 3 g           |
|                    | MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                               | 0,125 g       |
|                    | Auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen.                                 |               |

## 2.8.2 Einbringung und Kultivierung von *Caenorhabditis elegans*-Embryonen

Die Kultivierung und Isolierung von *C. elegans* erfolgte in Anlehnung an die Protokolle der Arbeitsgruppe Schnabel, TU Braunschweig<sup>c</sup>. Als Nahrungsquelle diente eine *Escherichia coli* Kultur (Stamm OP50, Wildtyp), welche in DYT-Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert und anschließend auf Wout-Agarplatten ausgestrichen und erneut für 3 Tage bei 25°C inkubiert wurde. Danach erfolgte das Animpfen der Agarplatten mit 1 x 1cm x 1 mm großen quadratisch-prismatischen Elementen aus einer *C. elegans* Dauerlarvenplatte<sup>d</sup>. Zur Gewinnung von eiertragenden Adulttieren wurden die Platten anschließend bei 25 °C über einen Zeitraum von drei Tagen inkubiert. Das Ablösen der Adulttiere von den Platten erfolgte mit M9-Puffer (physiologischer Puffer).

Zur Isolierung der Embryonen aus den Adulttieren wurden die Zellbestandteile der Adulttiere durch Aufnahme in Hypochloritlösung (5 ml für 5 Platten) unter 2-minütigen Schütteln aufgelöst (s. Anhang 6.1.12). Die gewonnen Embryonen wurden mehrmals sorgfältig mit M9-Puffer gespült. Zur Herstellung der Probensuspension wurden die Embryonen in M9-Puffer aufgenommen und mit Cochenillerot A angefärbt.

Die Einbringung der Embryonen in die Mikrofluidsegmente wurde durch gleichzeitiges Injizieren von Trägerflüssigkeit (PP9) und Embryonensuspension mit Flussraten von 20 µl/min und 10 µl/min ermöglicht. Die Initialdichte der Embryonen wurde so gewählt, dass statistisch nur ein, zwei oder kein Embryo pro Segment zu finden war. Segmentsequenzen mit bis zu 50 Segmenten und einem durchschnittlichen Segmentvolumen von 200 nl wurden erzeugt. Die Entwicklung des Embryos bis zum Schlupf der L1-Larve wurde nach 4 h und 17 h Kultivierung bei 25 °C beobachtet. Dafür wurden die einzelnen Segmente unterm Mikroskop untersucht und die Entwicklung des Embryonen mit Bildgebungssoftware analysiert.

---

<sup>c</sup> Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Schnabel, Abteilung Developmental Genetics, TU Braunschweig <http://www.ifg.tu-bs.de/Schnabel/ce-home.html>.

<sup>d</sup> Zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Schnabel, TU Braunschweig. Die Dauerlarven entwickeln sich bei geringem Futterangebot oder hoher Populationsdichte aus der L2-Larve und können mehrere Monate überdauern [162] Hope, I. A. *C. elegans: A Practical Approach*; Oxford University Press: Oxford, 1999.

### 2.8.3 Einbringung und Kultivierung von *Danio rerio*-Embryonen

#### *Gewinnung der Zebrafischeier und Herstellung der Probensuspensionen*

Die Zebrafische wurden vom Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden zur Verfügung gestellt. Die Haltung der Zebrafischpopulation (*Danio rerio*) erfolgte unter den in Brand et al. beschriebenen Laborbedingungen bei  $26 \pm 1$  °C [163]. Das Aufsammeln der Zebrafischeier konnte durch ins Aquarium eingesetzte Laichbecken ermöglicht werden. Anschließend wurden die Zebrafischeier in E3-Puffer (physiologischer Puffer) aufgenommen und in Petrischalen überführt. Vor der Integration in die Mikrofluidsegmente erfolgte die Sortierung der Zebrafischeier nach ihrem Entwicklungsstadium.

Der Probengeber (Petrischalen) wurde mit den Proben<sup>e</sup>, den Kontrolllösungen<sup>f</sup>, dem Trägermedium (PP9) und einem Indikatorfarbstoff (Cochenillerot A) bestückt.

Aufgrund des membranschädigenden Potentials von SDS und  $\text{CuCl}_2$  wurden diese als zu testende Substanzen ausgewählt. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ebenfalls ein bekanntes Reizmittel und wegen des Einflusses auf die Grenzflächenspannung für das angewendete System interessant [164].

Die einzelnen Konzentrationsstufen (0,21 µg/ml bis 132 µg/ml) der Modellsubstanz SDS wurden durch Verdünnen einer Stammlösung von 400 µg/ml hergestellt. Für die Kombination von SDS mit  $\text{CuCl}_2$  wurden zuerst 50 µl einer 3,3 M Kupfer(II)-chloridlösung zu 40 ml (0,0041 mM) einer jeden SDS-Konzentration pipettiert. Für eine zweite Kombination wurden jeweils 500 µl 3,3 M  $\text{CuCl}_2$  zu 50 ml (0,033 mM) SDS-Lösung gegeben. Anschließend wurden zu den Wirkstofflösungen jeweils 10 Zebrafischeier in einem embryonalen Alter von 2 h gegeben. Nur die Kontrolllösungen enthielten 20 Eier. Die Segmentierung erfolgte unmittelbar im Anschluss.

---

<sup>e</sup> Mit unterschiedlichen Konzentrationen an den zu testenden Substanzen behandelte Zebrafischeier

<sup>f</sup> Unbehandelte Zebrafischeier in E3-Puffer

### ***Erzeugung der Segmentsequenzen***

Zur Vermeidung von Druckgefällen wurde zu Beginn der Segmentierung der gesamte Schlauch mit dem Trägermedium PP9 gefüllt. Die einzelnen Segmentsequenzen wurden mittels Stop-Flow Methode (6.1.1, e) durch alternierendes Ansaugen von definierten Proben- und Trägervolumen mit einer Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  erzeugt. Dafür wurde der Schlauch abwechselnd zwischen Probensuspension und Trägermedium bewegt. Zur Stabilisierung der Segmente wurden zwischen den einzelnen Segmenten Luftblasen integriert. Die Segmentsequenzen für die einzelnen Wirkstoffkonzentrationen und die Kombinationen umfassten je 10 Segmente mit einem Ei pro Segment. Die Kontrollsequenzen umfassten jeweils 10 Segmente mit ebenfalls einem Ei pro Segment. Die Größe der Segmente variierte von 1,8 mm (2  $\mu\text{l}$ ) bis 10 mm (11  $\mu\text{l}$ ). Auf einer PMMA-Spule konnten zwischen 20 und 30 Segmente gelagert werden.

#### **2.8.4 Toxizitätsstudie am Zebrafisch**

In den Toxizitätsstudien wurden insgesamt ca. 260 Segmente untersucht. Um eine Aussage über die Wirkung der eingesetzten Modellsubstanzen zu treffen, wurden allgemeine und teratogene Endpunkte ausgewählt. Es konnten letale (Koagulation, Absterben des Embryos), subletale (Gastrulation, Augenanlage, Herzschlagfrequenz, Blutzirkulation, Pigmentierung, Schwanzablösung und Schlupf) und teratogene (Deformation) Endpunkte untersucht werden. Dafür wurde ein Lichtmikroskop (40fache Vergrößerung) eingesetzt. Um umfangreiche Daten über morphologische Änderungen in der Entwicklung der Zebrafischembryonen zu erhalten, wurden die Entwicklungsstadien eines jeden Embryos wenige Zeit nach Einbringung ins Segment (Alter 4 bis 6 h) und mit einem Alter der Zebrafische von 27 bis 28 h, 52 bis 58 h sowie 76 bis 78 h betrachtet<sup>g</sup>. Aufgrund des Auftretens von Koagulation<sup>h</sup> in den Kontrollen wurden alle Daten auf die Kontrolle normiert. Zwischen den Beobachtungszeitpunkten wurden die Schlauchspulen bei  $28 \pm 1$  °C gelagert. Obwohl gezeigt werden konnte, dass ein merklicher Verlust durch Verdunstung der Träger- und wässrigen Phase durch den Schlauch erst bei sehr langen Versuchszeiten (mehr als 8 Tage) auftritt, wurde eine relative Feuchte der Umgebungsluft von ca. 80 % während der Inkubation der Zebrafischembryonen eingestellt [165].

---

<sup>g</sup> Zeitpunkte für die als Endpunkte festgelegten Entwicklungsmerkmale d

<sup>h</sup> Die Koagulation (das Absterben des Embryos) wird in der Auswertung als Überlebensrate angegeben.

## 2.9 Referenzversuche in Mikrotiterplatten

Für die Modellorganismen *E. coli* und *S. cerevisiae* wurden Referenzversuche in 96-Well Mikrotiterplatten (Volumen pro Well 300  $\mu$ l) durchgeführt. Untersucht wurde die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen an AuNP, AgNO<sub>3</sub>, DNP, DCP, Peptid Amid und DMSO. Die Zusammensetzung der Probensuspensionen in den Referenzversuchen wurde den Versuchen in Mikrofluidsegmenten weitgehend nachempfunden (s. Anhang 6.1.13). Die Effekte von bis zu fünf Verdünnungen aus den Stammlösungen der aufgeführten Wirkstoffe wurden auf das Wachstum der Zellkulturen innerhalb eines Kultivierungszeitraumes von 48 h ermittelt. Dafür wurde die optische Dichte (Trübung) bei 600 nm mit Hilfe eines UV/VIS Spektralphotometers gemessen.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

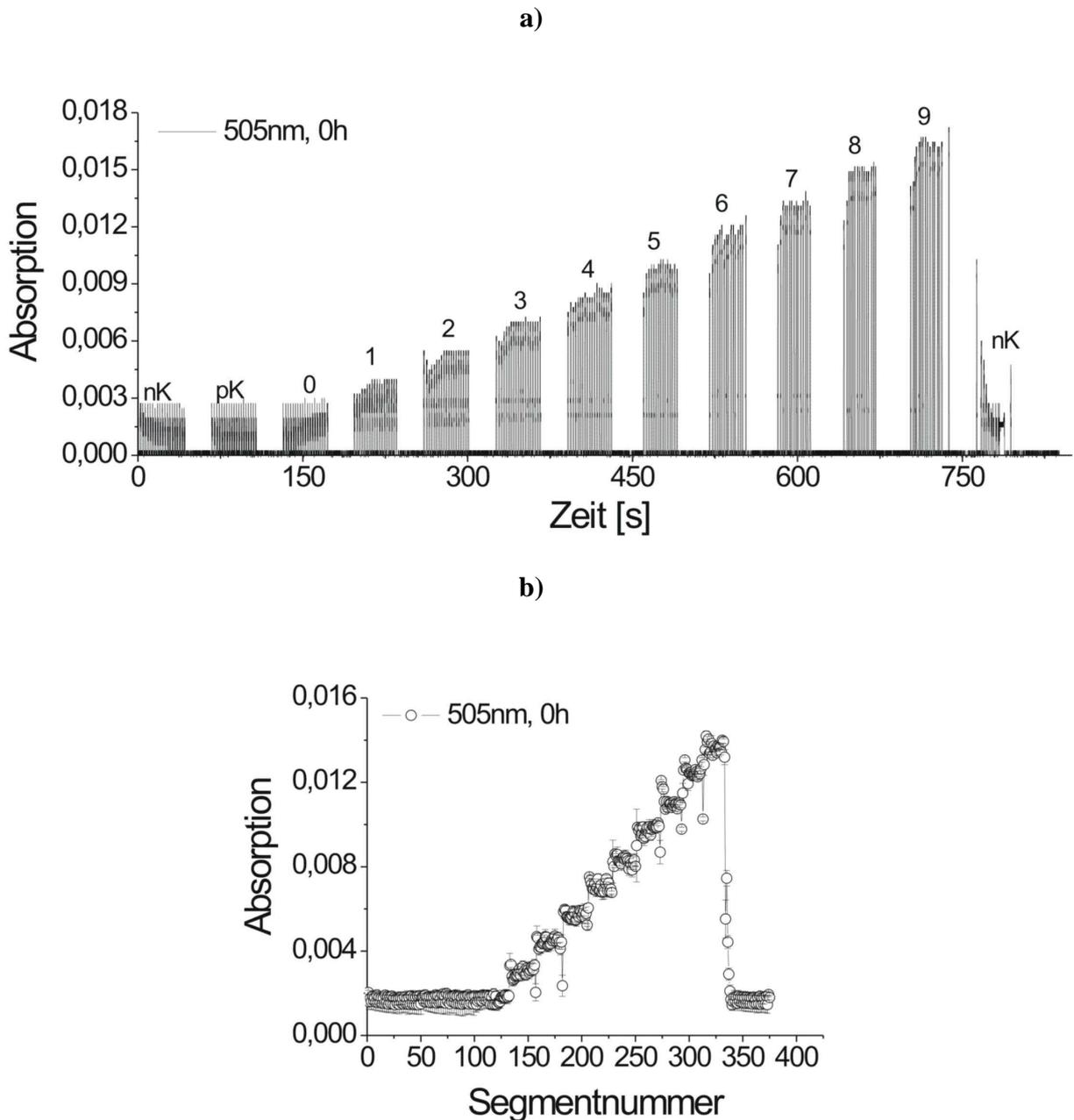
### 3.1 Konzentrationseinstellung in Mikrofluidsegmenten

Da eine direkte Messung der Wirkstoffkonzentrationen im Mikrofluidsegment nicht realisierbar war, wurden die Wirkstofflösungen mit toxisch unbedenklichen Indikatorfarbstoffen (Lebensmittelfarbstoff) in geringer Konzentration versetzt, so dass eine indirekte Ermittlung der Konzentrationsverteilung der Testsubstanzen in den Mikrofluidsegmenten durch photometrische Messung der Farbstoffabsorption möglich wurde. Die photometrische Analyse der Farbstoffabsorption wurde zur indirekten Ermittlung der Konzentrationsverteilung der Testsubstanzen im Mikrofluidsegment eingesetzt. Es wurde davon ausgegangen, dass die Verteilung der eingesetzten Testsubstanzen äquivalent zu der Verteilung des Farbstoffes ist. Die Zusammensetzung der Träger- und wässrigen Phase wurde so gewählt, dass eine Extraktion der Testsubstanzen in die Trägerflüssigkeit ausgeschlossen werden konnten.

#### 3.1.1 Erzeugung von Blocksequenzen

Ziel der blockweisen Konzentrationseinstellung war die stufenweise Variation der Wirkstoffkonzentration in den Mikrofluidsegmenten (s. auch Kapitel 2.2). Mit dieser Methode sollte ebenfalls eine exakte Zuordnung der einzelnen Konzentrationen zu den jeweiligen Segmenten gewährleistet werden.

In Abb. 3-1, a ist die Konzentrationseinstellung in den einzelnen Mikrofluidsegmenten beispielhaft dargestellt. Innerhalb der einzelnen Segmentblöcke traten nur geringe Schwankungen der Absorptionswerte auf (s. Abb. 3-1, b). Es zeigten sich eine gewisse Trägheit des Systems (Übergang Positivkontrolle,  $pK \rightarrow 0$  und  $9 \rightarrow$  Negativkontrolle,  $nK$ , s. Abb. 3-1, a). Hauptverursacher waren kleinste Gasblasen im Mikrofluidsystem, welche größtenteils durch Ausgasung entstehen. Das führte zu einer zeitweise verstärkten Kompressibilität des Mikrofluidsystems und zu einem geringfügigen Rückstrom der Injektionsflüssigkeiten. Aufgrund der geringen Flussraten der Proben während der Konzentrationseinstellung kam es zu einem zeitlichen Versatz hauptsächlich zu Beginn der Konzentrationseinstellung und bei größeren Konzentrationssprüngen. Bei dem Einsatz von Testsubstanzen mit höheren Viskositäten zeigte sich dieser Fehler deutlich durch das Verwischen der Konzentrationsstufen (s. Anhang 6.3 PVP, DMSO). Für die Versuchsreihen mit niedrigviskosen Testsubstanzen konnten vergleichbar gute Konzentrationseinstellungen erzielt werden (s. Anhang 6.3 DCP, Coffein).



**Abb. 3-1:** Graphische Darstellung der Absorptionswerte des Indikatorfarbstoffes Cochenillerot A nach erfolgter Konzentrationseinstellung in einer Mikrofluidsequenz. **a)** Photometrische Messdaten der Mikrofluidsegmente (Messwellenlänge 505 nm, pK: Positivkontrolle<sup>a</sup>, nK: Negativkontrolle<sup>b</sup>). **b)** Gemittelte Absorptionswerte innerhalb der Mikrofluidsegmente.

Die Erzeugung von Blocksequenzen bot die Möglichkeit, bei Gewährleistung einer genauen Konzentrationszuordnung zu den Segmentblöcken, unterschiedliche Wirkstoffkonzentrationen auf ihre Effekte zu untersuchen.

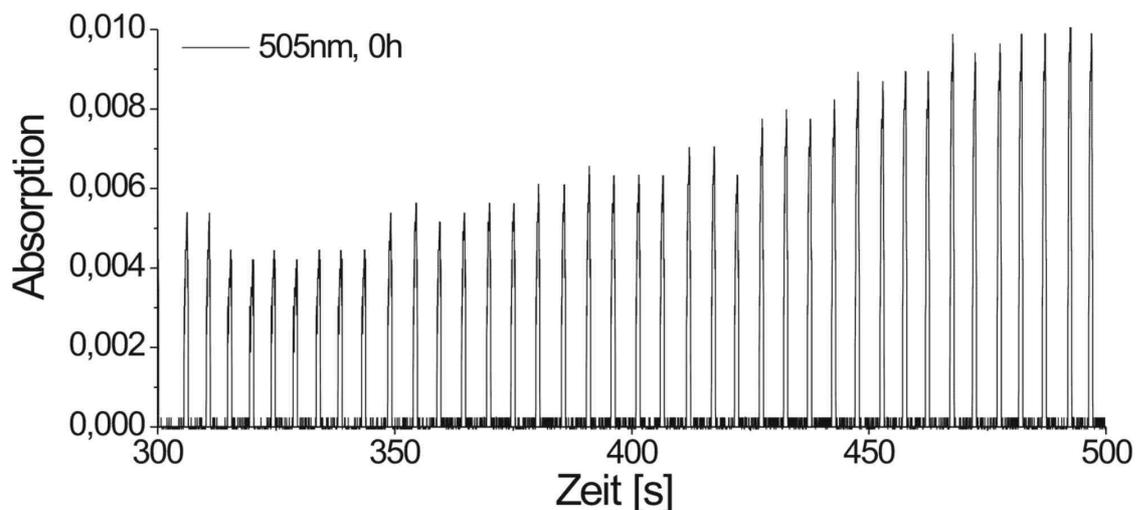
<sup>a</sup> Die Positivkontrolle enthält nur Zellen im Kulturmedium, aber keinen Wirkstoff.

<sup>b</sup> Die Negativkontrolle enthält nur Kulturmedium und Farbstoff.

Fehler durch mögliche Fusionierung von benachbarten Segmenten oder Teilung von Einzelsegmenten konnten mit dieser Methode minimiert werden. Für die Erzeugung hochaufgelöster Konzentrationsfelder mit Konzentrationsabstufungen  $< 5\%$  erwies sich diese Methode als ungeeignet, da mit steigender Genauigkeit die Messzeiten und der Speicherplatzbedarf zur Lagerung der Segmente ebenfalls anstieg.

### 3.1.2 Kontinuierliche Erzeugung von Konzentrationsgradienten für das Einzelwirkungsscreening

Für hochaufgelöste Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Testsubstanzen wurden kontinuierliche Konzentrationsänderungen (Rampenverläufe) zwischen den Mikrofluidsegmenten eingesetzt. Dafür erfolgte eine stetige Variation der Wirkstoffkonzentration in der Segmentsequenz. Über die photometrische Messung der Absorption des Indikatorfarbstoffes Cochenillerot A konnten indirekt Aussagen über die Verteilung des Wirkstoffes und die Segmentqualität (Periodizität, Größenverteilung) getroffen werden (s. Abb. 3-2).

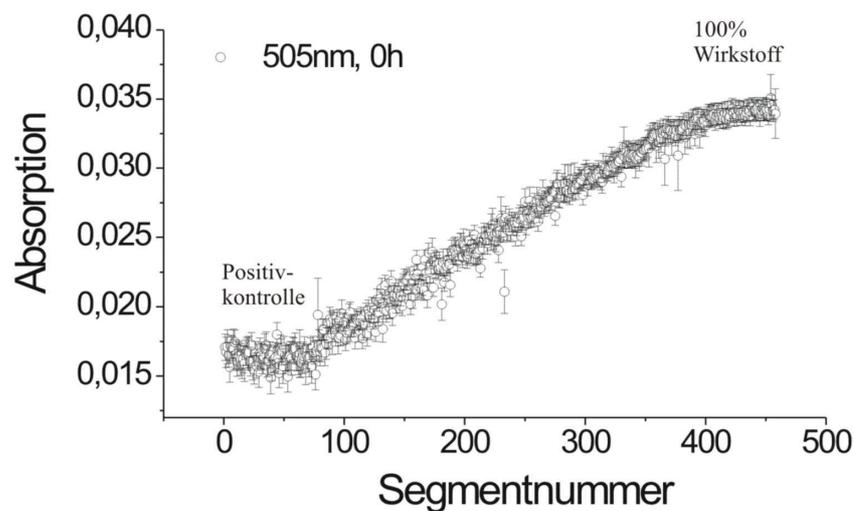


**Abb. 3-2:** Kontinuierliche Erzeugung von Konzentrationsgradienten in Mikrofluidsegmenten, Ausschnitt des photometrischen Messsignals des Indikatorfarbstoffes Cochenillerot A einer Segmentsequenz für eine Messwellenlänge von 505 nm.

Für die Untersuchung verschiedener Testsubstanzen wurden Segmentsequenzen mit 240 bis 500 Segmenten innerhalb von 15 bis 30 Minuten erzeugt und analysiert. Dabei wurde ein dreiphasiger Konzentrationsverlauf eingestellt. Zu Beginn (Anlaufphase) wurden ca. 13 bis 20

Segmente als Positivkontrolle<sup>c</sup> generiert. Am Ende (Auslaufphase) wurden ebenfalls ca. 13 bis 20 Segmente mit maximaler Wirkstoffkonzentration erzeugt. Dazwischen wurde die Wirkstoffkonzentration kontinuierlich (linear) auf das Maximum von 100 % Wirkstoff erhöht, wie in Abb. 3-3 beispielhaft dargestellt ist.

Die Ausgasung der Proben konnte durch Senkung der Umgebungstemperatur des Mikrofluidsystems auf 5 bis 10°C und die Regelung der Spritzentemperatur auf 4 °C stark verringert werden. Zusätzlich sorgte die Entgasung der Wirkstofflösungen<sup>d</sup> durch Ultraschallbehandlung vor Einbau der Spritzen ins System zu einer Minimierung der Gasblasenbildung. Durch die Befüllung der Schläuche mit einer konstanten Gesamtflussrate während des gesamten Segmentierungsprozesses konnten starke Druckschwankungen vermieden werden. Dadurch konnten gut reproduzierbare, hoch aufgelöste eindimensionale Konzentrationsfelder innerhalb kürzester Zeit erzeugt werden. Im Vergleich zur blockweisen Segmenterzeugung führen Segmentfusion und -teilung bei dieser Methode zu einem Fehler bei der Segmentzuordnung.



**Abb. 3-3:** Kontinuierliche Erzeugung von Konzentrationsgradienten in Mikrofluidsegmenten, Absorptionswerte des Indikatorfarbstoffes für eine Segmentserie von etwa 500 Segmenten, Offset bei pK bedingt durch Zellsuspension.

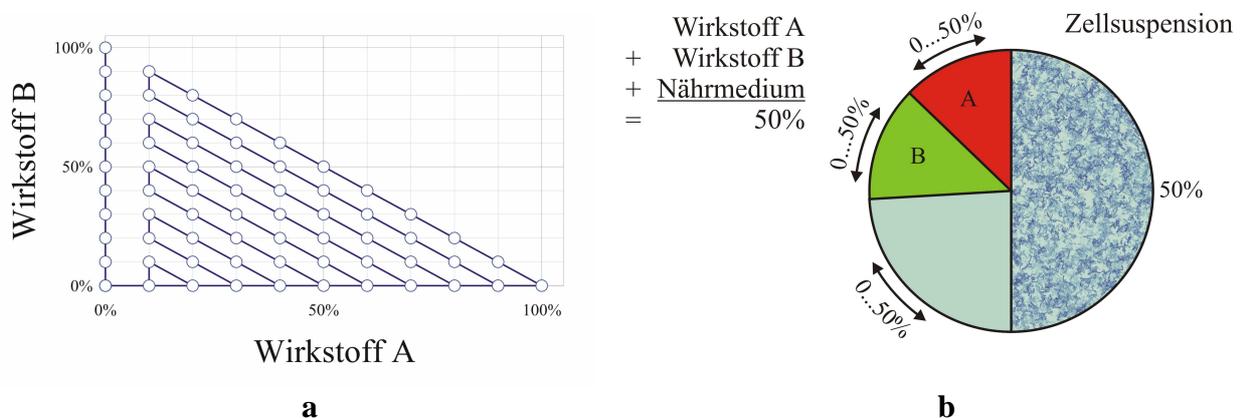
Die Methode der kontinuierlichen Segmenterzeugung bietet neben dem Screening von fein abgestuften Parameterfeldern neue statistische Bewertungsmöglichkeiten innerhalb ökotoxikologischer Testverfahren.

<sup>c</sup> Positivkontrolle: kein Wirkstoff, nur Zellen im Nährmedium.

<sup>d</sup> Aufgrund von zu erwartender Zellschädigung konnte die Zellsuspension nicht durch Ultraschallbehandlung entgast werden.

### 3.1.3 Kontinuierliche Erzeugung 2-dimensionaler Parameterfelder für die Kombinationsanalyse

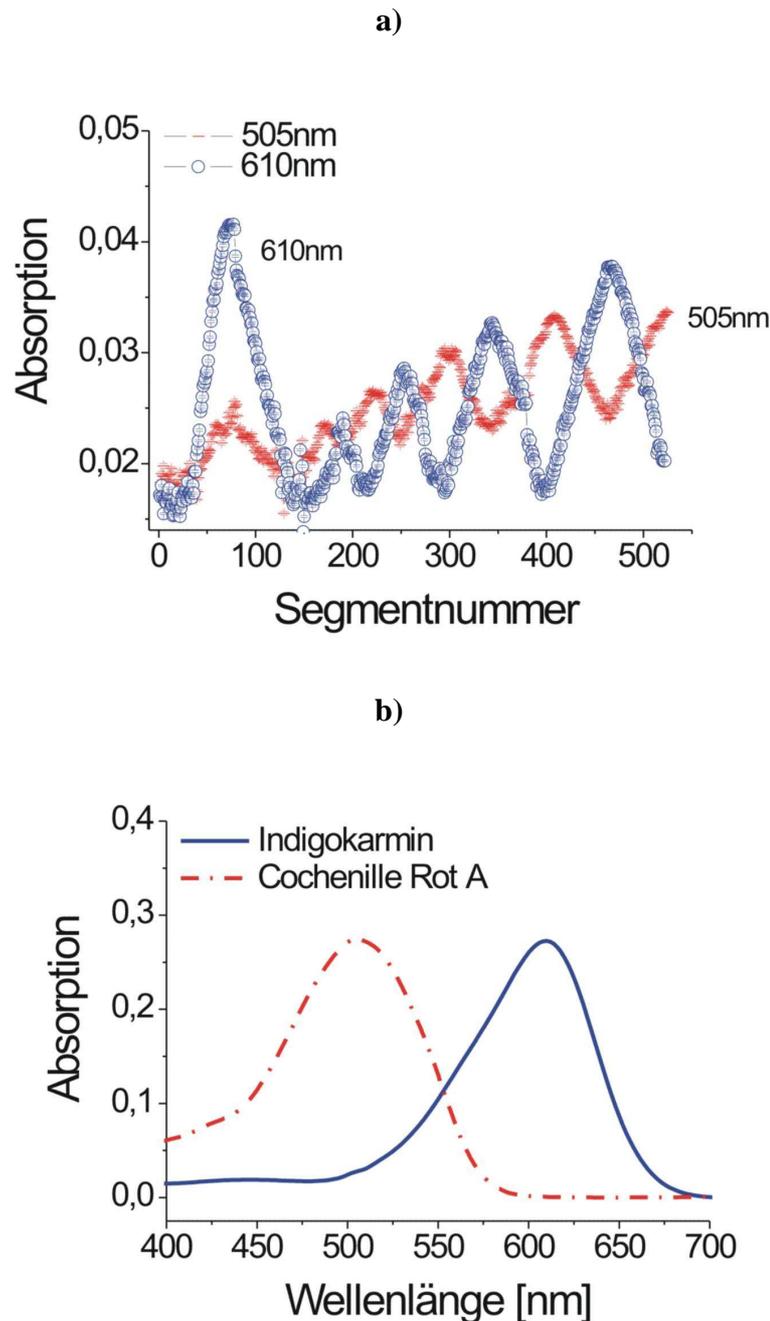
Zur Untersuchung der Kombinationswirkung von binären Mischungen wurden Segmentsequenzen mit 400 bis 500 Segmenten erzeugt. Eine 66-Stufen Kombination mit 6 bis 8 Segmenten pro Kombination wurde für die zweidimensionale Konzentrationseinstellung verwendet. Das  $\frac{n^2+n}{2}$  Design konnte durch die kontrollierte Variation von Testsubstanz A, Testsubstanz B und synthetischem Medium bei konstantem Anteil an Zellsuspension in den Mikrofluidsegmenten erstellt werden (s. Abb. 3-4).



**Abb. 3-4:** Erzeugung zweidimensionaler Konzentrationsfelder. **a)** Kombination zweier Wirkstoffe nach dem  $\frac{n^2+n}{2}$  Design. **b)** Zusammensetzung der Mikrofluidsegmente für binäre Mischungen.

Das Modell der Konzentrationsadditivität [31] wurde für die Auswertung der Kombinationswirkung unabhängig von der Wirkweise der Testsubstanzen zugrunde gelegt. Die Darstellung der Messdaten erfolgte über Isobologramme. Die EC50-Werte konnten aus den Dosis-Wirkungskurven der Einzelsubstanzen mit Hilfe geeigneter Kurven-Fits berechnet werden. Mit dem Begriff “Synergismus“ wurden Effekte der binären Mischung beschrieben, die sich stärker als aus dem Ansatz der Konzentrationsadditivität erwartet, zeigten.

Die Konzentrationseinstellung konnte über die Indikatorfarbstoffe Indigokarmin und Cochenillerot A ermittelt werden. In Abb. 3-5, a sind die wirkstoffproportionalen photometrischen Messsignale für eine Kombinationssequenz beispielhaft dargestellt. Es konnten für die Wiederholungsversuche der einzelnen Testsubstanzen gut reproduzierbare 66-Stufen-Kombinationen erzeugt werden (s. Anhang 6.4).

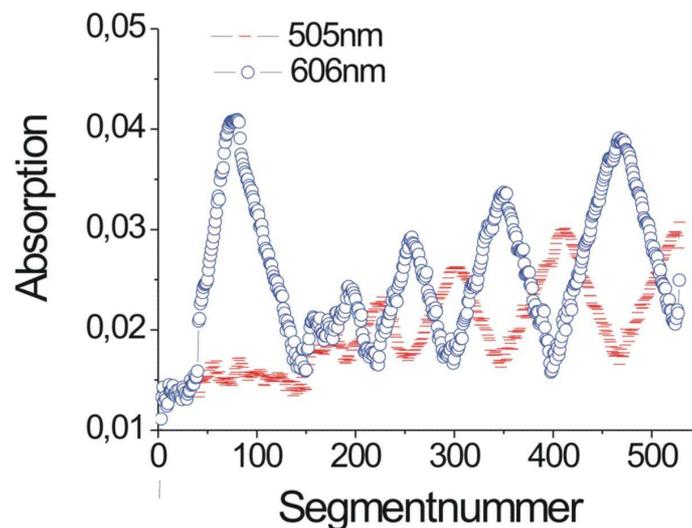


**Abb. 3-5:** Durch Absorptionsmessung ermittelte Konzentrationseinstellung in Mikrofluidsegmenten bei der Untersuchung der Kombinationswirkungen binärer Gemische. **a)** Photometrische Messsignale der Indikatorfarbstoffe Cochenillerot A (Detektion bei 505 nm) und Indigokarmin (Detektion bei 610 nm) zur Bestimmung der Wirkstoffkonzentrationen im Mikrofluidsegment bei binärer Wirkstoffkombination. **b)** Absorptionsspektren der Indikatorfarbstoffe.

Die beiden Lebensmittelfarbstoffe Indigokarmin und Cochenillerot A eignen sich hervorragend als Indikatorfarbstoffe aufgrund der Biokompatibilität, der rel. gut voneinander getrennten Absorptionsspektren und der nicht auftretenden chemischen Wechselwirkungen in der Mischung. Die Nachteile dieser Farbstoffe lagen in der leichten Abbaubarkeit durch einige Organismen, wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae* und der teilweisen Überlagerung ihrer

Absorptionsbanden. Die geringfügige Absorption von Indigokarmin im Detektionsbereich von Cochenillerot A bei 505 nm führte durch additive Überlagerung (Superposition) zu einer Beeinflussung des Messsignals, so dass die detektierten Werte für Cochenillerot auch von der Indigokarminkonzentration abhingen (s. Abb. 3-5, b). Weiterhin konnte eine geringe chemische Beeinflussung der Testsubstanzen auf die Absorptionseigenschaften der Farbstoffe beobachtet werden (s. auch Diskussion Kapitel 3.4.1). Eine Möglichkeit, solche Effekte zu berücksichtigen und eine Korrektur des photometrischen Überlagerungsfehlers durchzuführen, ist in Anhang 6.5 aufgezeigt<sup>e</sup>.

In Abb. 3-6 ist ein so korrigierter Absorptionsverlauf für die Indikatorfarbstoffe Cochenillerot A und Indigokarmin nach der Verteilung im Mikrofluidsegment dargestellt.



**Abb. 3-6:** Korrigierte Absorptionsmessung für die 2-dimensionale Konzentrationseinstellung.

Da die Konzentrationsänderung zwischen den Stufen kontinuierlich und nicht sprunghaft erfolgte und die Konzentrationsänderung 10 % pro Stufe nicht überstieg, ergab sich ein methodenbedingter Fehler für jede Konzentrationsstufe von  $\pm 5 \%$ .

Mit diesem Konzentrationsverlauf konnten zweidimensionale Konzentrationsfelder mit einer Größe von bis zu 500 Segmenten innerhalb eines Zeitfensters von ca. 30 min für binäre Mischungen erzeugt und detektiert werden. Damit konnten Aussagen über die Wirkung verschiedener binärer Mischungen mit einer hohen statistischen Genauigkeit gewonnen werden.

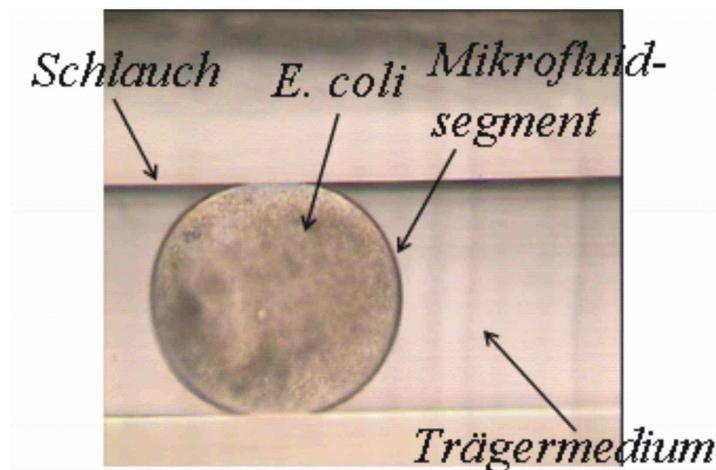
<sup>e</sup> OPTIMI-Projekt, erarbeitet durch S. Schneider und J. Cao

### 3.2 Entwicklung der Modellorganismen im Mikrofluidsegment

Die Schwerpunkte der Untersuchung lagen hier auf der Suche nach Methoden zur schadlosen Einbringung der Testorganismen *E. coli*, *S. cerevisiae*, *C. elegans* und *D. rerio* in Mikrofluidsegmente und den optimalen Kultivierungsbedingungen im Segment. Im Vordergrund der Arbeiten standen die Fragen nach den geeigneten Nährmedien für die Kultivierung im Segment, dem Einfluss von Zellen und Nährmedium auf die Grenzflächenspannung zwischen Trägerflüssigkeit und Segment sowie dem Wachstumsverhalten und der Sauerstoffversorgung im Segment.

#### 3.2.1 Modellorganismus *E. coli*

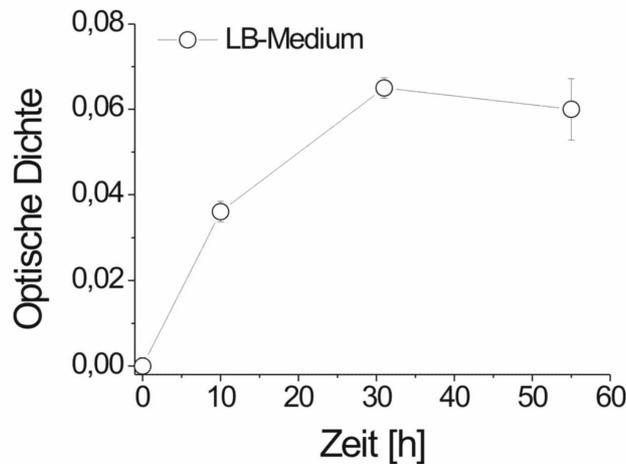
Für die Kultivierung des Darmbakteriums *E. coli* wurden die Nährmedien LB-Lennox (Komplexmedium) und ein synthetisches Medium eingesetzt (s. Kapitel 2.4.1). Mit beiden Medien gelang die Kultivierung von *E. coli* im Mikrofluidsegment. In Abb. 3-7 ist das Wachstum von *E. coli* im Mikrofluidsegment nach 24 h Kultivierung im LB-Medium dargestellt.



**Abb. 3-7:** *Escherichia coli* Population nach 24 h Kultivierung im Mikrofluidsegment (Komplexmedium LB-Lennox).

Im Komplexmedium wurden optische Dichten (Trübung) von  $0,035 \pm 0,014$  nach 24 h Kultivierung der Bakterien im Mikrofluidsegment gefunden (s. Abb. 3-8). Es konnten gut reproduzierbare Ergebnisse aus den einzelnen Versuchsreihen gewonnen werden. In frühen Versuchen mit LB-Medium standen keine Rührsysteme zur Verfügung. Die homogene Verteilung der Zellen wurde durch Dichteanpassung ermöglicht. Hier kam es aber zu

Interaktionen zwischen Zellen und eingesetzten Substanzen zur Dichteanpassung, welche zu geringeren optischen Dichten im Vergleich zu den Versuchen ohne Dichteanpassung führten.



**Abb. 3-8:** Wachstumskurve für eine im Mikrofluidsegment kultivierte *E. coli*-Kultur (LB-Medium, Volumen Segmente: 480 nl, Anfangszelldichte: 20000 Zellen/ml)<sup>f</sup>.

In Abb. 3-9 ist die Wachstumskurve einer *E. coli*-Kultur im Mikrofluidsegment und synthetischem Medium dargestellt.

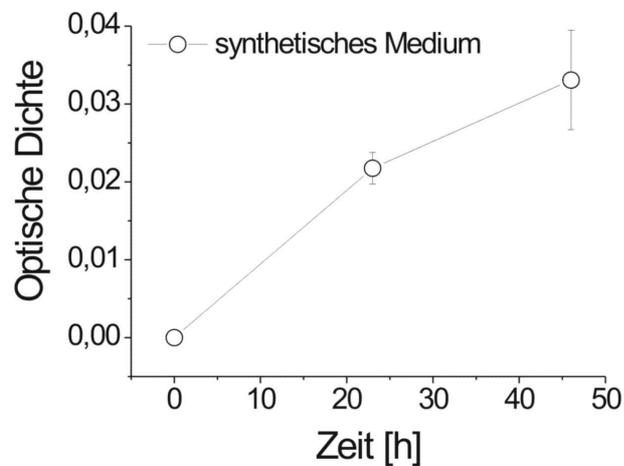
Die optischen Dichten im synthetischen Medium wurden mit  $0,023 \pm 0,015^g$  nach 24 h Kultivierung im Segment ermittelt. Im Vergleich zur Kultivierung der Bakterienkultur im Komplexmedium und Mikrofluidsegment zeigte sich für die Versuche im Minimalmedium ein schwächeres Wachstum. Diese Ergebnisse bestätigten die Erkenntnisse aus anderen Kultivierungs- und Testmethoden [166]. Während sich bei der Kultivierung von *E. coli* in dem Komplexmedium LB-Lennox bereits für geringe Zelldichten (ca. 10 Zellen/Segment) ein starkes Wachstum im Segment für alle durchgeführten Versuche zeigte, musste beim Einsatz des synthetischen Mediums mit einer ca. 10fach höheren Zelldichte angeimpft werden, um ein Wachstum der Bakterienkultur im Segment zu ermöglichen. Weiterhin wurden im synthetischen Medium unterschiedliche Wachstumsverläufe beim Animpfen mit gleicher Zelldichte beobachtet. Es zeigte sich ein normales Anwachsen der Zellen nach 24 h und Eintreten der Sättigung nach 45 h aber auch ein verzögertes Wachstum, wobei erst nach 24 h ein starkes Anwachsen erfolgte und in einigen Versuchen kein Wachstum der Kultur im Segment.

Obwohl das Komplexmedium für eine schnelle Kultivierung im Mikrofluidsegment mit hohen Zelldichten am besten geeignet ist, konnte es für die Wirkstoffscreenings nicht eingesetzt

<sup>f</sup> Versuchsdurchführung J. Cao, FG Physikalische Chemie/MRT, TU Ilmenau

<sup>g</sup> Standardabweichung ermittelt aus Wiederholungsversuchen, bei denen ein Wachstum nach 24 h auftrat.

werden, da der große Nachteil des Komplexmediums in der hohen Eigenfluoreszenz und dem hohen Gehalt an Proteinen liegt.



**Abb. 3-9:** Wachstumskurve für eine im Mikrofluidsegment kultivierte *E. coli*-Kultur (Synthetisches Medium, Segmentvolumen:  $580 \text{ nl} \pm 18 \text{ nl}$ , Anfangszelldichte:  $200000 \text{ Zellen/ml}$ ).

Proteine sind grenzflächenaktive Substanzen und reduzieren die Grenzflächenspannung in Phasensystemen. Bei der Kultivierung von *E. coli* im Komplexmedium kam es aus diesem Grund zu einer verstärkten Segmentfusionierung und -teilung während des mit der Detektion verbundenen Transports und der Lagerung der Mikrofluidsegmente. Verstärkt wurde dieser Effekt durch das Wachstum der Bakterienkultur. Der Einfluss der Zelldichte auf die Grenzflächenspannung ist in Anhang 6.6 dargestellt. Auch mit Erhöhung des Abstandes zwischen den einzelnen Segmenten einer Segmentsequenz konnten Segmentfusionen nicht vollständig vermieden werden.

Die Anwendung von Tensiden in der Trägerphase ermöglicht eine Stabilisierung von Zwei-Phasen-Systemen [95]. Davon wurde in diesen Arbeiten abgesehen, da eine zellschädigende Wirkung der Tenside nicht ausgeschlossen werden konnte.

Das Eigenfluoreszenzsignal des Komplexmediums erzeugte ein starkes Hintergrundsignal, welches sich störend auf die Erfassung der Messsignale auswirkte und die Auflösung verschlechterte. Zusätzlich führte das Auftreten von Fluoreszenzlöschung des Mediums zu Schwierigkeiten bei der Kalibrierung (Diskussion s. Kapitel 3.5.1).

Mit dem Einsatz des synthetischen Mediums, welches nur Glucose als Nährstoffquelle enthält, gelang eine drastische Reduzierung von Segmentfusion und -teilung. Da das Medium keine Eigenfluoreszenz aufwies, konnte eine störungsfreie Fluoreszenzmessung mit hoher Auflösung in den Mikrofluidsegmenten durchgeführt werden. Im Gegensatz zum

Komplexmedium war es für eine erfolgreiche Detektion des Zellwachstums im synthetischen Medium notwendig, mit höheren Anfangszellichten zu arbeiten.

Für beide Nährmedien wurde weder eine verstärkte Anlagerung der Zellen an der Phasengrenze, noch ein Übergang in die Trägerphase beobachtet.

Eine Aussage zur Sauerstoffversorgung der Zellen im Mikrofluidsegment über die Schlauchwand und das Trägermedium konnten mit diesen Versuchen nicht getroffen werden. Da *E. coli* fakultativ anaeroben Stoffwechsel betreibt, war das gute Wachstum kein Zeichen für eine ausreichende Sauerstoffversorgung im Segment.

Der Einsatz von Mikrobeads ermöglichte die in situ Messung stoffwechselrelevanter Parameter im Mikrofluidsegment. Die Sauerstoffversorgung im Mikrofluidsegment wird im Kapitel 3.5.2 eingehend diskutiert.

### 3.2.2 Modellorganismus *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von Hefe (*S. cerevisiae*) im Mikrofluidsegment erfolgte im Komplexmedium YM und im Minimalmedium YNB mit Ammoniumsulfat. In beiden Medien war die Kultivierung von Hefe erfolgreich, wobei ein stärkeres Wachstum für das Komplexmedium gefunden wurde (s. Kapitel 3.2.1). In Abb. 3-10 ist die Hefe *S. cerevisiae* nach Kultivierung im Mikrofluidsegment dargestellt.

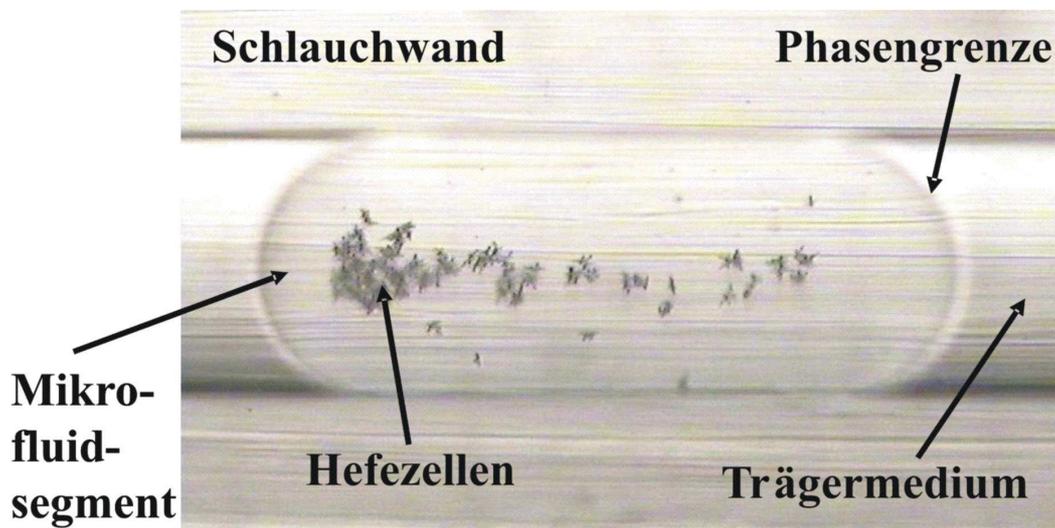
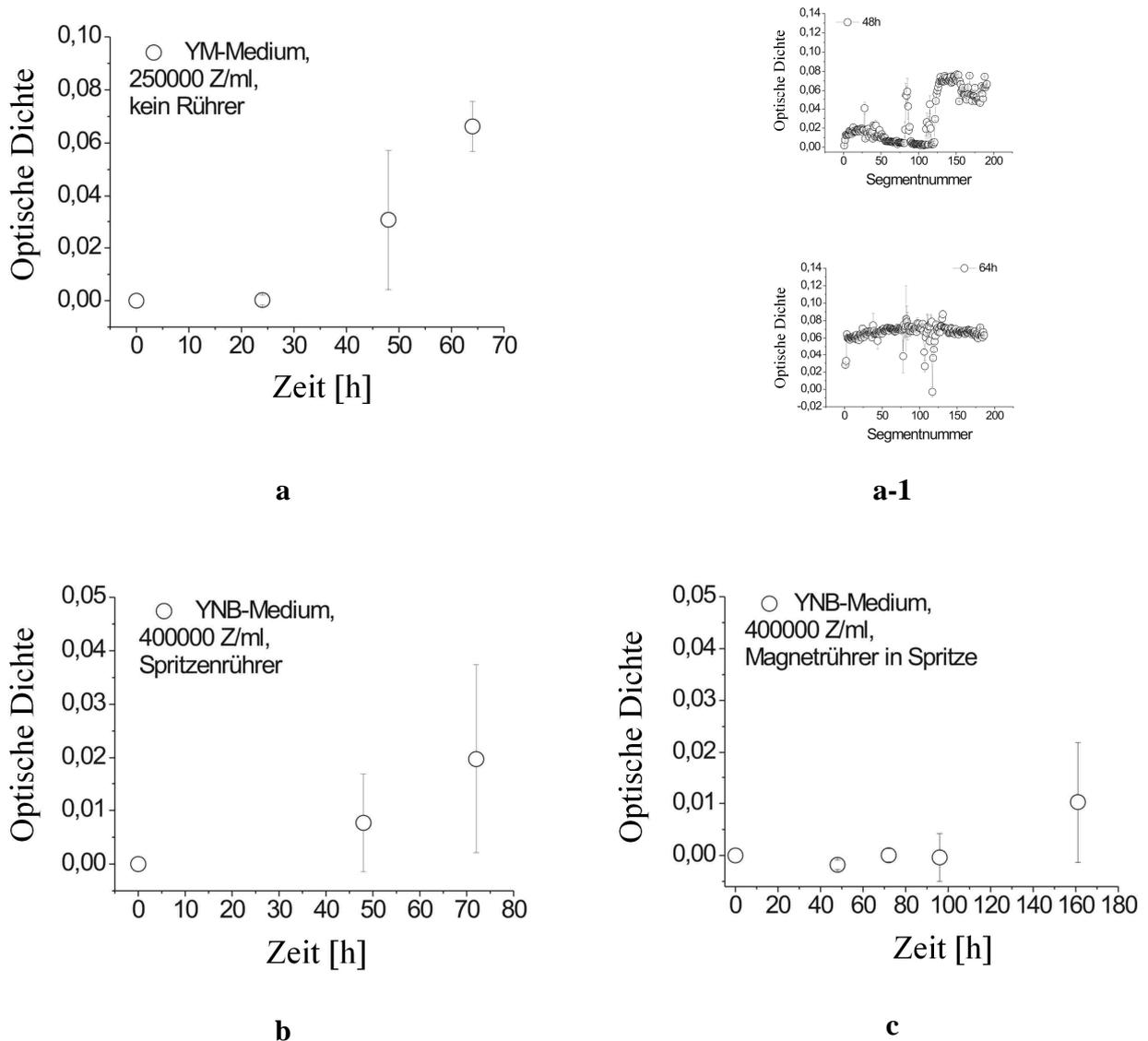


Abb. 3-10: *S. cerevisiae* im Minimalmedium YNB nach 24stündiger Kultivierung im Mikrofluidsegment.

Im Vergleich mit dem Modellorganismus *E. coli* traten Fusionen oder Teilungen von benachbarten Segmenten bei der Kultivierung von Hefe in beiden Nährmedien weit weniger stark auf und konnten über ausreichende Segmentabstände stark vermindert werden. Der

Nachteil des Komplexmediums lag erneut in der hohen Eigenfluoreszenz. Aus diesem Grund wurde in allen Versuchen mit YNB gearbeitet. Neben der Auswahl des Nährmediums war die homogene Verteilung der Hefezellen im Mikrofluidsegment entscheidend für die Kultivierung und die anschließenden Toxizitätstests. Die schnelle Sedimentation der Hefezellen in der Spritze aufgrund ihrer Größe sowie deren häufiges Vorliegen in Zellverbänden machten den Einsatz von Rührsystemen notwendig. Es wurde das Wachstum der Zellen unter Einsatz eines Magnetrührers in der Spritze, eines kommerziell erhältlichen Spritzenrührersystems (Cetoni GmbH) sowie das Wachstum ohne Rührer untersucht (s. Abb. 3-11).



**Abb. 3-11:** Wachstum von *S. cerevisiae* im Mikrofluidsegment unter Einsatz unterschiedlicher Rührsysteme **a)** kein Rührer, YM-Medium, Segmentanzahl: 220, Segmentgröße: 580 nl  $\pm$  35 nl. **a-1)** Bild oben: Optische Dichte der Segmentsequenz ohne Rührer nach 48 h Kultivierung in YM. Bild unten: Optische Dichte der Segmentsequenz ohne Rührer nach 64 h Kultivierung in YM. **b)** Spritzenrührer Cetoni, YNB Medium, Segmentanzahl: 430, Segmentvolumen: 460 nl  $\pm$  125 nl. **c)** Magnetrührer in Spritze, YNB-Medium, Segmentanzahl: 440, Segmentvolumen 800 nl  $\pm$  1 nl.

Das Wachstum von Hefe ohne den Einsatz eines Rührsystems ist in Abb. 3-11, a dargestellt. Es zeigte sich eine inhomogene Verteilung in Form eines unregelmäßigen Anwachsens der Zellen nach 48 h Kultivierung im Segment (Abb. 3-11, a-1). Erst nach einer dreitägigen Kultivierung konnte ein gleichmäßigeres Anwachsen in den Segmenten gefunden werden (Abb. 3-11, a-2).

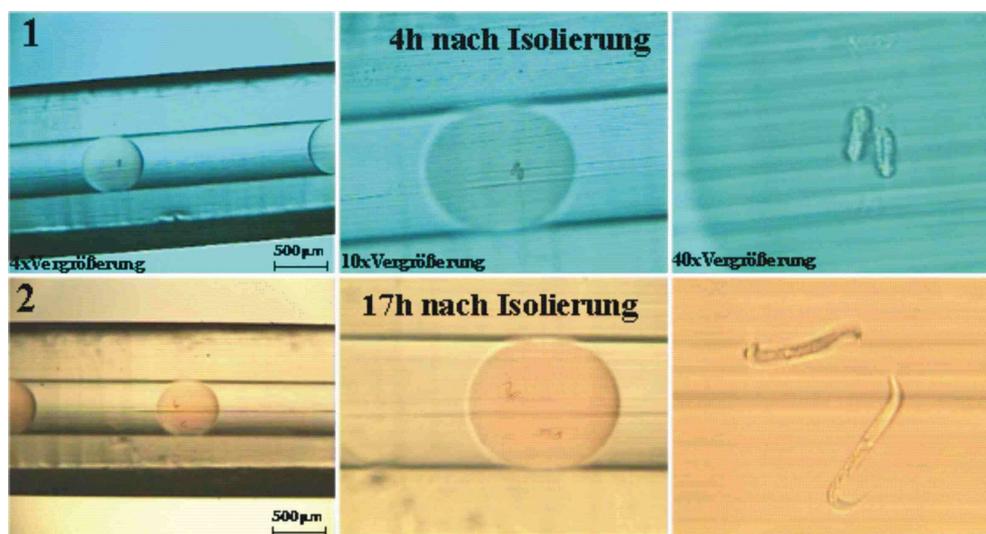
Durch den Einsatz der beiden Rührsysteme konnte ein Anwachsen der Zellen in annähernd jedem Segment einer Sequenz ermöglicht werden. Die Messungen unterlagen dennoch stärkeren Schwankungen, die einerseits auf Inhomogenitäten im Wachstum, aber auch auf die Segmentanalyse zurückzuführen sind. Während die Bakterienkultur nach dem Wachstum nahezu homogen verteilt im Segment vorlag, bildete die Hefekultur Zellverbände, welche Schwankungen im photometrischen Messungssignal verursachten. An einer Optimierung des Verfahrens wird noch gearbeitet.

Mit dem Einsatz des Magnetrührers in der Spritze zeigte sich erst nach 160 h ein Wachstum der Hefezellen im Segment mit einer optischen Dichte, die bereits nach 48 h Kultivierung in den Versuchen mit dem Spritzenrührersystem gemessen wurde. Ursache könnte ein durch den Magnetrührer verursachter höherer Scherstress auf die Zellen sein.

Auch in diesen Versuchen konnte ein stärkeres Wachstum der Zellen in den Mikrofluidsegmenten durch Einsatz eines Komplexmediums gefunden werden. Die hohe Eigenfluoreszenz dieses Mediums machte es aber nötig, das bzgl. des Wachstums ineffizientere Minimalmedium für die Toxizitätsstudien zu wählen. Eine homogene Verteilung der Hefezellen konnte durch den Einsatz des Spritzenrührersystems erreicht werden.

### 3.2.3 Modellorganismus *C. elegans*

Das Ziel der Versuchsreihen anhand des Fadenwurms *C. elegans* war es, neben der bereits gezeigten einfachen Einbringung, auch die Kultivierbarkeit der Embryonen im Mikrofluidsystem nachzuweisen. Der Fadenwurm durchläuft während seiner Entwicklung zum Adulttier innerhalb von 50 h vier Larvenstadien. Es konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung bis zum Schlupf der L1-Larve sowie ein Überleben einige Stunden nach Schlupf im Mikrofluidsegment möglich ist. In Abb. 3-12 ist die Entwicklung von *C. elegans* Embryonen im Mikrofluidsegment dargestellt.



**Abb. 3-12:** Mikroskopische Aufnahmen der Entwicklung von *C. elegans* Embryonen im Mikrofluidsegment. 1) Entwicklungsstadium *C. elegans* direkt nach Einbringung ins Segment, Aufnahmen bei unterschiedlichen Vergrößerungen. 2) Schlupf der L1-Larve 17 h nach Isolierung und Kultivierung im Segment, Aufnahmen bei unterschiedlichen Vergrößerungen.

In fast allen untersuchten Mikrofluidsegmenten konnte der Schlupf von lebensfähigen L1-Larven gefunden werden. Der Großteil der Larven zeigte die typischen Lokomotionsbewegungen des Fadenwurms.

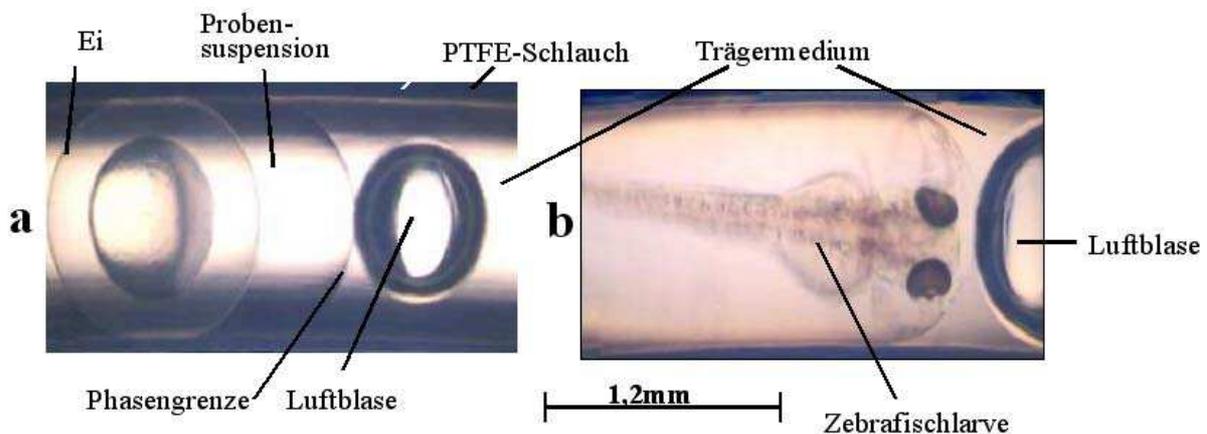
Weiterhin konnte mit den Versuchen gezeigt werden, dass es essentiell wichtig ist, mit einer synchronen Population zu arbeiten, um gleiche Entwicklungsstadien der Embryonen zu Versuchsbeginn garantieren zu können. Trotz verschiedener optimierter Kultivierungsprotokolle gelang eine vollständige Synchronisierung der Nematodenpopulation nicht. Deshalb lag der zeitintensivere Teil der Arbeit in der Sortierung der Embryonen nach ihrem Entwicklungsstadium.

Auch standen zu diesem Zeitpunkt noch keine automatisierten Bildanalyzesysteme für die Anwendung in Mikrofluidsegmentsequenzen zur Verfügung, so dass die phänotypischen

Screenings semiautomatisch und mit großem Aufwand erfolgten. Erst in den letzten zwei Jahren sind "Lab-on-Chip" Plattformen entwickelt wurden, welche semiautomatisierte und vollautomatisierte Entwicklungs- und Verhaltensstudien am Nematoden *C. elegans* möglich machen [123,149,167]. Die Pilotarbeiten mit *C. elegans* bildeten die Grundlage für die Versuche mit dem Vertebraten *Danio rerio*.

### 3.2.4 Modellorganismus *D. rerio*

In den Arbeiten zur Integration und Kultivierung von *Danio rerio* Embryonen konnte eine normale Entwicklung bis zum Schlupf der Zebrafischlarve nach drei Tagen trotz eines nicht auszuschließenden Stresseinflusses während der Einbringung und Segmentierung sowie ohne zusätzliche Sauerstoffanreicherung gezeigt werden (Abb. 3-13).



**Abb. 3-13:** Mikroskopische Aufnahmen von Zebrafischembryonen im Mikrofluidsegment. **a)** Embryo im Multizellstadium. **b)** Geschlüpfte Zebrafischlarve mit bereits gefüllter Schwimmblase.

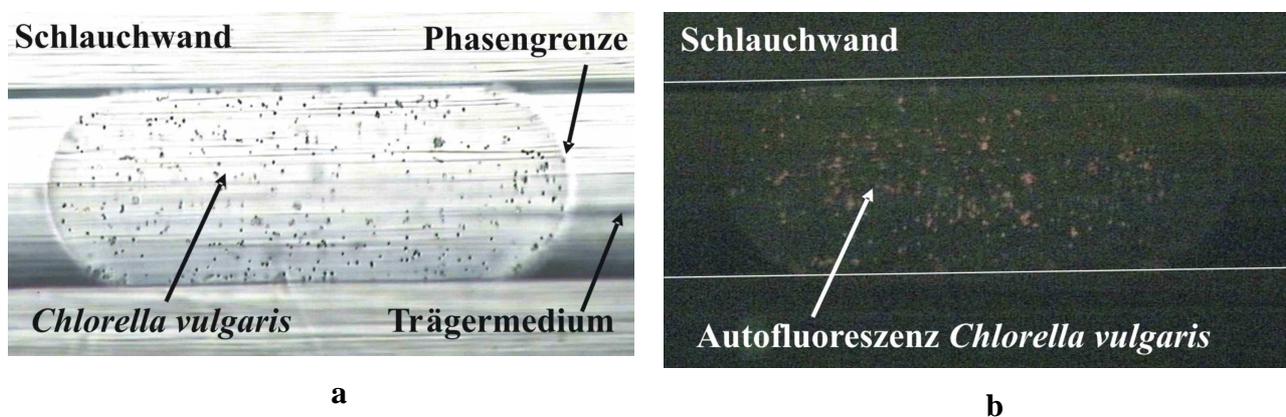
Der ausgewählte PTFE-Schlauch mit einem Innendurchmesser von 1,2 mm zeigte sich für die Einschleusung der Zebrafischeier, ohne übermäßigen Stress und ohne sichtbare Schädigungen, als gut geeignet. Eine weitere Minimierung des Stresseinflusses auf Membran und Embryo konnte durch die Einstellung einer niedrigen Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  erreicht werden.

Die Sauerstoffversorgung während der Entwicklung des Embryos erfolgte durch die zur Stabilisierung der Segmente eingeschlossenen Gasvolumina (Luft) sowie durch den durch die gaspermeablen Eigenschaften von Schlauchwand und Trägermedium (Perfluoralkan) diffundierenden Sauerstoff. Es zeigte sich, dass ein Überleben der geschlüpften Fischlarven für weitere zwei bis drei Tage im Mikrofluidsegment ohne zusätzliche Sauerstoffversorgung möglich war. Die Größe der Segmente beeinflusste nicht die Entwicklung der Embryonen, jedoch war aufgrund der Größe der geschlüpften Fischlarven eine Segmentlänge von mindestens

5 mm, d.h. eines Segmentvolumens von mindestens 6  $\mu\text{l}$ , erforderlich, um die Fischlarve nach dem Schlupf nicht einzuengen. Die Überführung der Fischlarven aus den Segmenten in Aufzuchtbecken nach fünf Tagen im Mikrofluidsystem zeigte eine Entwicklung der meisten Zebrafischlarven ohne sichtbare Schädigung. Ausnahmen bildeten die Larven aus den Segmenten mit einem Volumen kleiner 6  $\mu\text{l}$ . Hier wurden Jungfische gefunden, welche eine Deformation am hinteren Teil der Schwanzflosse und im Rückenflossenbereich aufwiesen. Grund für diese Erscheinung kann mechanischer Stress bei der Einbringung, aber auch der Unterschied im gesundheitlichen Befinden der einzelnen Fischgelege sein.

### 3.3 Autofluoreszenzanalyse in Mikrofluidsegmenten anhand des Modellorganismus *Chlorella vulgaris*

Die Übertragung toxikologischer Standardverfahren für den Umweltorganismus *Chlorella vulgaris* sollte mit der Methode des segmentierten Flusses realisiert werden. Das Wachstum und die Autofluoreszenz der Grünalgen wurden als toxikologische Endpunkte gewählt und sollten photometrisch und fluorimetrisch in den Mikrofluidsegmenten analysiert werden. Es konnte eine einfache Einbringung der Grünalge in die Segmente ohne Schädigung der Zellen gezeigt werden (Abb. 3-14).



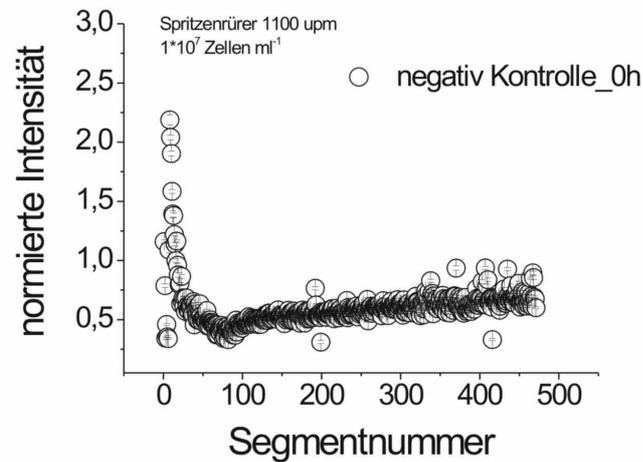
**Abb. 3-14:** *Chlorella vulgaris* im Mikrofluidsegment **a)** Mikroskopbild Hellfeld, **b)** Mikroskopbild, Autofluoreszenzsignal von *Chlorella vulgaris* (510-560 nm Anregung, 590 nm Emission).

Die Verteilung der Grünalgen in den Segmentsequenzen wurde über die Messung des Fluoreszenzsignals bestimmt. Mit einer Mindestzellzahl von 1000 Zellen pro Segment konnten Fluoreszenzanalysen durchgeführt werden. Der Einsatz eines Spritzenrührers (Cetoni GmbH) ermöglichte eine gleichmäßigere Verteilung der Grünalgen im Mikrofluidsegment (Abb. 3-15). Bei einer Umdrehungsrate von 1100 U/min<sup>h</sup> wurde eine Anlaufphase von 50 bis 100 Segmenten beobachtet, die für das Einpegeln der Zelldichte auf einen konstanten Wert notwendig waren. Unter Berücksichtigung des Scherstress auf die Algen, könnte eine Erhöhung der Rührrate zu einer verbesserten Verteilung führen.

Ein Wachstum der Algen im Mikrofluidsegment konnte für die PTFE-Schläuche mit Wanddicken von 550 µm nicht gezeigt werden. Die Gas-Permeabilität der Schläuche reichte nicht aus, um die Grünalgen mit ausreichend CO<sub>2</sub> zu versorgen (s. auch Diskussion Kapitel

<sup>h</sup> Die Umdrehungsrate von 1100 upm führte bei *S. cerevisiae* zu einer guten Verteilung und optimalem Wachstum der Zellen im Mikrofluidsegment.

3.5.2, *Sauerstoffsensitive ptTFPP-Mikrobeads*). Nach 48stündiger Kultivierung der Zellen bei 25 °C ohne zusätzliche CO<sub>2</sub>-Begasung wurde keine Veränderung in der optischen Dichte (Trübung) und eine Verringerung des Autofluoreszenzsignals in den Segmenten gemessen.



**Abb. 3-15:** Autofluoreszenzsignal von Grünalgen in einer Mikrofluidsegmentsequenz mit ca. 500 Segmenten. Segmentvolumen: 578 nl  $\pm$  88 nl, Segmentanzahl pro Segment: ca. 5780 Zellen.

In weiterführende Versuche von J. Cao konnte eine erfolgreiche Kultivierung von *Chlorella vulgaris* in FEP-Schläuchen mit Wanddicken von 200  $\mu$ m gezeigt werden. Die Anpassung von Mikrodurchflussphotometer und Fluorimeter ermöglichten die ersten Toxizitätstests anhand der Grünalgen im Mikrofluidsegment<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> J. Cao, A. Funfak, R. Meier, O. Wolbeis, K. Martin, J.M. Köhler, Microtoxicological screenings in micro fluid segments with fluorescence micro beads, 9. Dresdner Sensor-Symposium, 7. bis 9. Dezember, 2009, Dresden.

### 3.4 Einzelwirkungsscreenings

Dosis-Wirkungsbeziehungen für die Modellorganismen *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Danio rerio* wurden für unterschiedliche Testsubstanzen untersucht. Es konnten gut reproduzierbar arbeitende Prozessprotokolle zur Erzeugung und Auswertung hoch aufgelöster Mikrofluidsegmentsequenzen erstellt werden.

#### 3.4.1 Modellorganismus *E. coli*

##### *Charakterisierung des Systems*

Mit dem Einsatz von Indikatorfarbstoffen sollte die Konzentrationseinstellung des Wirkstoffes im Mikrofluidsegment qualitativ und quantitativ ermittelt werden. Es wurde davon ausgegangen, dass die Verteilung des Farbstoffes in gleicher Weise wie die Verteilung des Wirkstoffes im Mikrofluidsegment erfolgt.

Für die Bestimmung der realen Wirkstoffkonzentrationen im Segment wurden Kalibrierungskurven für Cochenillerot A erstellt (Abb. 3-16). Die lineare Abhängigkeit von Absorption und Farbstoffkonzentration ermöglichte Rückschlüsse auf die Konzentrationsverteilung des Wirkstoffes im Segment. Es wurde weiterhin eine chemische Beeinflussung der Farbstoffabsorption durch die Testsubstanzen gefunden (Abb. 3-16, Dreieck-Symbol), die eine von der Testsubstanz abhängige Kalibrierung notwendig machte.

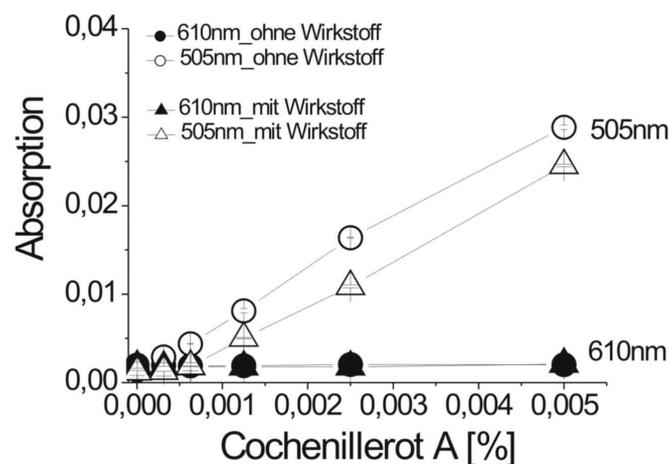
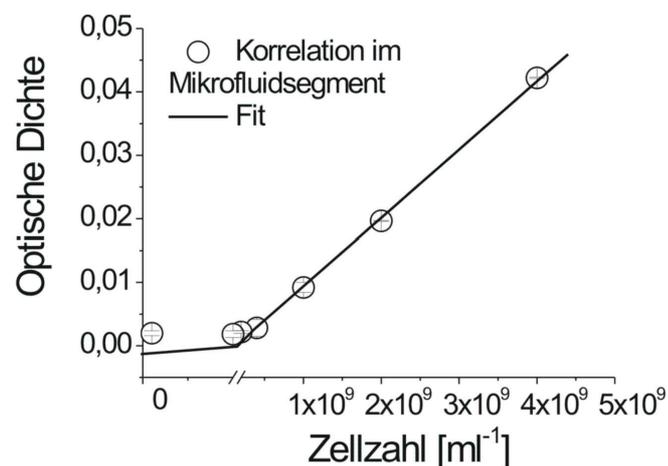


Abb. 3-16: Kalibrierungskurve von Cochenillerot A im Mikrofluidsegment mit und ohne Zusatz eines Wirkstoffes.

Die Bestimmung der optischen Dichte (Trübung) ist ein Standardverfahren in der Ökotoxikologie für die Erstellung von Wachstumskurven. Mit der Integration von Mikrodurchflussphotometern war es möglich, das Wachstum der Modellorganismen über die Messung der optischen Dichte direkt, d.h. mittels Detektion durch die Schlauchwandung hindurch, zu untersuchen.

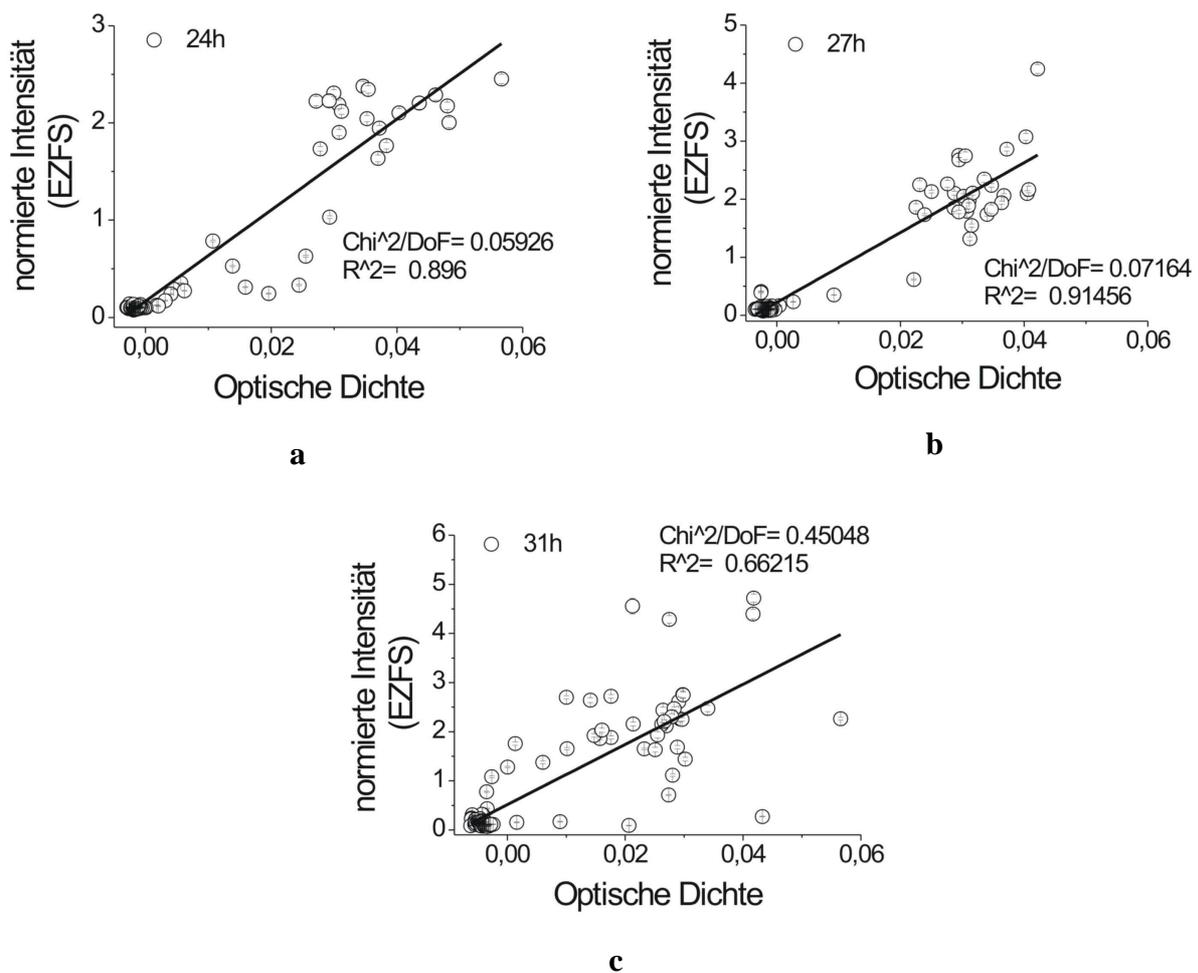
Zur Charakterisierung des Detektors wurde die im Segment gemessene Extinktion mit der eingesetzten Zelldichte für den Modellorganismus *E. coli* korreliert. Für Zelldichten größer  $5 \times 10^8$  Zellen/ml konnte ein linearer Zusammenhang gefunden werden. Die Sensitivität des Sensors wurde durch die nicht optimalen Bedingungen, wie Schlauchgeometrie, kurzer optischer Weg, Blendengeometrie, Schlauchmaterial und Streuung in den Schlauchwänden limitiert (s. Kapitel 2.1).



**Abb. 3-17:** Korrelation der Optischer Dichte mit der Zelldichte im Mikrofluidsegment.

Mit der Optimierung des Mikrodurchflussphotometers (s. Kapitel 2.1) konnten Messungen mit einem größeren Signal/Rausch-Verhältnis durchgeführt werden. Damit wurde die Detektion von Zelldichten ab  $10^7$  Zellen/ml möglich. Trotzdem stellte die fluorimetrische Messung eine weitaus sensitivere Methode dar. Für die Untersuchung der Wirkung binärer Gemische wurde die photometrische Messung deshalb nur als Kontrollmessung mitgeführt.

Die Beziehung zwischen Wachstum und Autofluoreszenz von *E. coli* im Segment zeigte in allen Versuchen eine erhebliche Streuung, dennoch konnte eine deutliche Korrelation für verschiedene Messzeitpunkte gefunden werden (Abb. 3-18). Es konnte gezeigt werden, dass die Autofluoreszenz der Bakterien mit dem Wachstum ansteigt. Mit der fluorimetrischen Messung des endogenen zellulären Fluoreszenzsignals können Aussagen über die Vitalität der Bakterienzellen gewonnen werden.

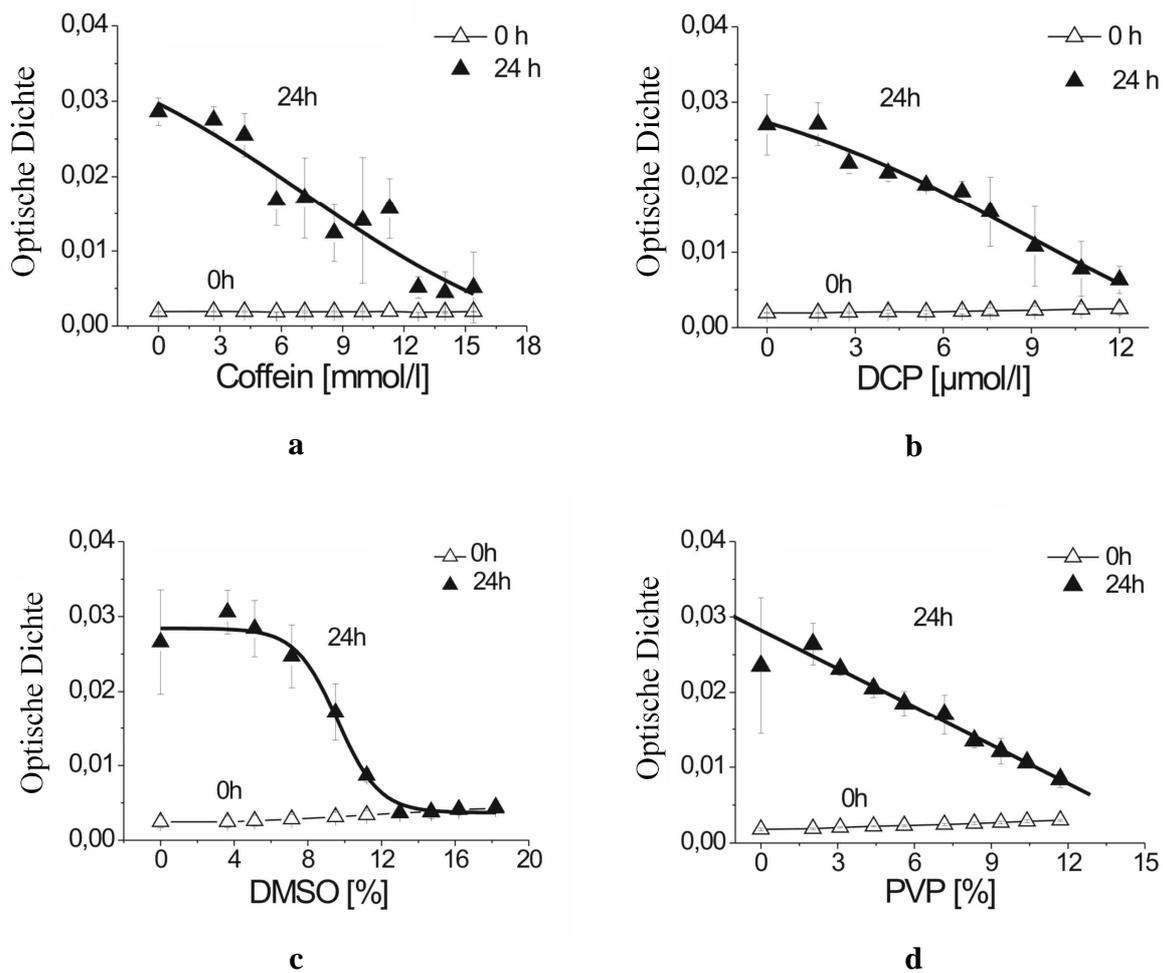


**Abb. 3-18:** Korrelationsplots für Wachstum und EZFS während der Kultivierung von *E. coli* im Mikrofluidsegment. a) Plot nach 24 h Kultivierung. b) Plot nach 27 h Kultivierung. c) Plot nach 31 h Kultivierung.

### Einzelwirkungsscreenings

Mit dem Verfahren der blockweisen und der kontinuierlichen Segmenterzeugung konnten spezifische und gut reproduzierbare Dosis-Wirkungsbeziehungen für die Testsubstanzen DNP, DCP, Coffein, DMSO, PVP und ein Decapeptid gefunden werden.

In Abb. 3-19 sind die Dosis-Wirkungskurven für die Testsubstanzen Coffein, 2,4-DCP, DMSO und PVP dargestellt. Die zu unterschiedlichen Substanzklassen gehörenden Einzelsubstanzen zeigten charakteristische, konzentrationsabhängige Effekte für die jeweilige Einzelsubstanz. Während für PVP, DMSO und Coffein eine annähernd lineare Degradation des Wachstums gefunden wurde, zeigte sich für DMSO ein sigmoidaler Kurvenverlauf. Die mittleren effektiven Konzentrationen (EC<sub>50</sub>-Werte) für die Konzentration an Testsubstanz, die 50 % des Bakterienwachstums hemmt, repräsentierten die Ergebnisse des Toxizitätstests (s. Tabelle 3-1). Sie konnten über entsprechende Fits aus den Dosis-Wirkungskurven ermittelt werden.



**Abb. 3-19:** In Mikrofluidsegmenten ermittelte Dosis-Wirkungsbeziehung für vier verschiedene Testsubstanzen am Modellorganismus *E. coli*, Segmentanzahl: 260, Segmentvolumen: 600 bis 800 nL, LB-Medium. **a)** Effekte von Coffein auf das Wachstum von *E. coli* im Segment. **b)** Effekte von DCP auf das Wachstum von *E. coli* im Segment. **c)** Effekte von DMSO auf das Wachstum von *E. coli* im Segment. **d)** Effekte von PVP auf das Wachstum von *E. coli* im Segment.

Für Coffein wurde ein EC<sub>50</sub>-Wert von 7 mM ermittelt. Coffein ist für seine vielfältigen physiologischen Effekte bekannt und wurde bereits auf seine bakterielle Aktivität untersucht [168]. In Ramanaviciene et al. wird ein direkter antibakterieller Effekt von Coffein auf *E. coli* nachgewiesen [169]. Hier wurde eine mittlere effektive Konzentration von 0,1 % (ca. 1 mM) gefunden, welche zumindest größenordnungsmäßig in Übereinstimmung mit dem im Mikrofluidsegment ermittelten Wert steht.

Für die Wirkung von DCP als einen Vertreter der Chlorophenole, Umweltschadstoffe die in vielfältiger Weise als Biozide Anwendung finden, auf das Wachstum von *E. coli* wurde ein EC<sub>50</sub> von 10  $\mu$ M ermittelt. Die Referenzversuche in Mikrotiterplatten zeigten Effektkonzentrationen größer 100  $\mu$ M DCP (Abb. 3-20, a).

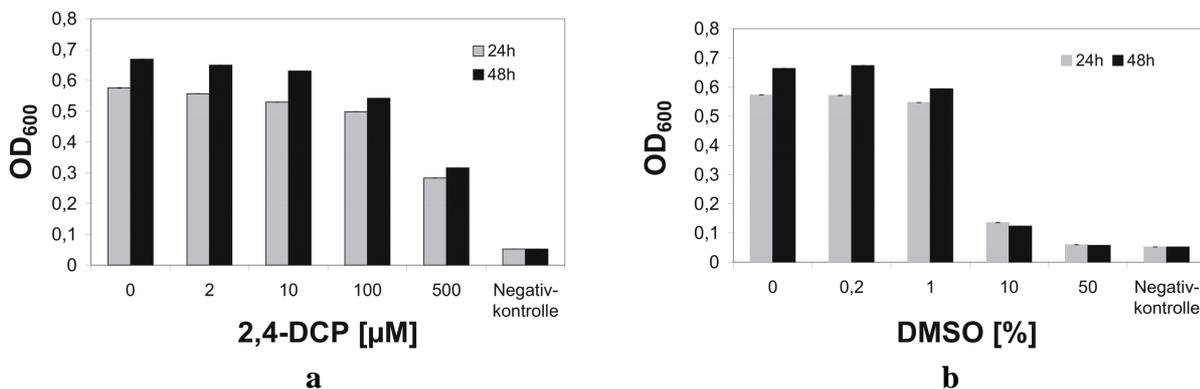
Die Wirkung von Chlorophenolen wurde in verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten beschrieben. Es ist bekannt, dass sie als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung den

Energiestoffwechsel von Mikroorganismen inhibieren [170]. In der Literatur werden EC50-Werte für 2,4-DCP von 12,61 mg/l (ca. 77  $\mu$ M) für den Testorganismus *E. coli* und mit 830  $\mu$ M für Fibroblasten L929 Zellen angegeben [171,172].

**Tabelle 3-1:** Mit Mikrofluidsequenzen ermittelte EC50-Werte für die Toxizität von Coffein, DCP, DMSO und PVP auf *E. coli*

| Chemikalien | EC50 für 24 h Kultivierung in LB-Medium |
|-------------|---|
| Coffein     | 7,3 mmol/l $\pm$ 1,11                   |
| DCP         | 10,11 $\mu$ mol/l $\pm$ 0,94            |
| DMSO        | 9,03 % $\pm$ 0,99                       |
| PVP         | 8,34% $\pm$ 0,94                        |

Der EC50-Wert für DMSO wurde aus den Versuchen in Mikrofluidsegmenten mit 9 % ermittelt. DMSO wird mit Konzentrationen bis zu 5 % zur Zellkonservierung eingesetzt und sollte in diesem Konzentrationsbereich untoxisch wirken. Die Referenzversuche in Mikrotiterplatten bestätigten die Ergebnisse aus den Mikrofluidsegmenten. Es wurde eine starke Inhibierung des Wachstums von *E. coli* bei einer DMSO-Konzentration von 10 % gefunden (Abb. 3-20, b). In der Literatur werden verschiedene Effekte von DMSO für unterschiedliche Konzentrationen beschrieben [173,174]. Auch hier konnte eine gute Übereinstimmung der Effektkonzentrationen mit denen aus den Versuchen in Segmenten gefunden werden.

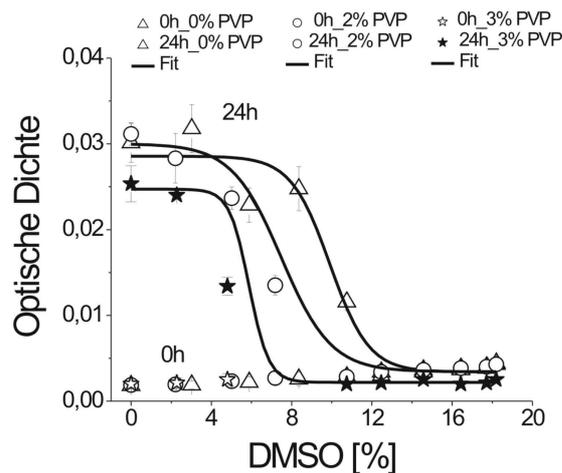


**Abb. 3-20:** Dosis-Wirkungsbeziehungen für DCP und DMSO, ermittelt aus Referenzversuchen in Mikrotiterplatten, Probenanzahl: 12, LB-Medium. **a)** Effekte von 2,4-DCP auf das Wachstum von *E. coli*. **b)** Effekte von DMSO auf das Wachstum von *E. coli*.

Vinylpyrrolidone finden u.a. Anwendung als Antiseptikum. Für das im Segment untersuchte PVP konnte ein EC50-Wert von 8 % bestimmt werden. PVP und DMSO haben demnach eine ähnlich starke Hemmwirkung auf das Wachstum von *E. coli*. In Müller et al. werden für zwei unterschiedliche Polyvinylpyrrolidone Effektkonzentrationen zwischen 7 % und 9 % für *E. coli*

angegeben [175]. Die durchgeführten Arbeiten zeigen auch, dass PVP im Vergleich zu anderen Antiseptika eine schwächere Hemmwirkung aufweist.

Zusätzlich zur Untersuchung der Einzelwirkung der Testsubstanzen wurde die Kombinationswirkung des binären Gemisches PVP und DMSO im Mikrofluidsegment untersucht. Es zeigte sich, dass die Zugabe von PVP zu einer mit DMSO behandelten *E. coli* Kultur eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven in Richtung geringerer Effektkonzentration verursachte (Abb. 3-21). Es wurde eine verstärkte Inhibierung des Wachstums von *E. coli* mit steigender PVP-Konzentration gefunden. Die Erstellung von zweidimensionalen Konzentrationsfeldern mit der Methode der blockweisen Segmenterzeugung lieferte erste Einblicke in die Wirkung binärer Gemische auf einen ausgewählten Modellorganismus. Für die Erzeugung großer Parameterräume erwies sich die blockweise Segmenterzeugung jedoch als zu zeitintensiv, verbunden mit einem großen Speicherplatzbedarf der Segmente.

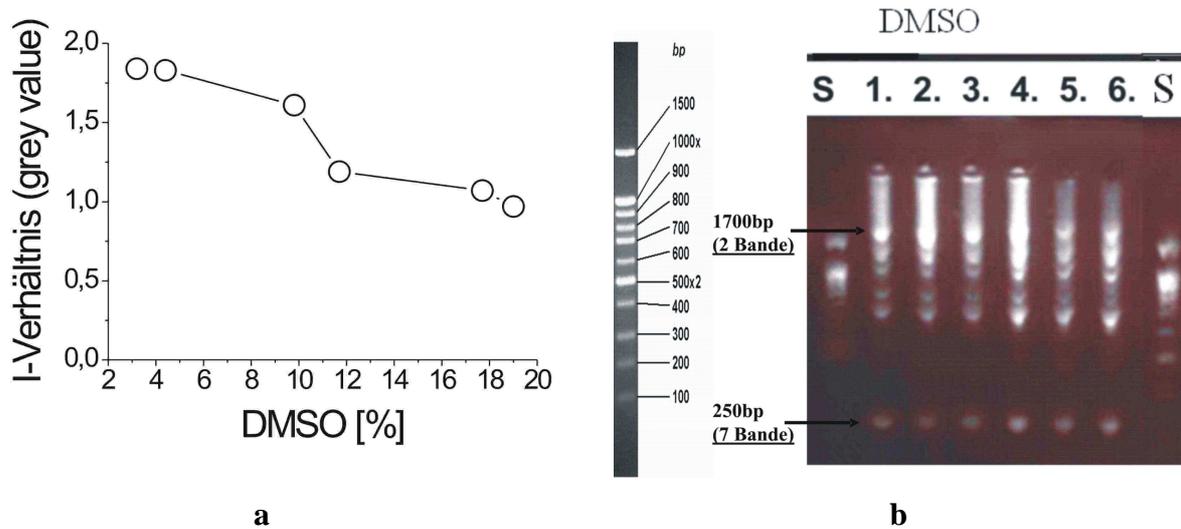


**Abb. 3-21:** Kombinationswirkung des binären Gemisches von DMSO und PVP auf das Wachstum von *E. coli* im Mikrofluidsegment. Symbol Dreieck: Dosis-Wirkungskurve für DMSO, Symbol Kreis: Dosis-Wirkungskurve für DMSO unter Zugabe von 2 % PVP, Symbol Stern: Dosis-Wirkungskurve für DMSO unter Zugabe von 3 % PVP.

Für das Einzelwirkungsscreening von DMSO wurde eine DNA-Analyse nach 24 h Kultivierung im Segment durchgeführt. Die einzelnen Segmentblöcke konnten gut voneinander getrennt in Eppendorf cups überführt und die DNA-Sequenzen direkt aus den Bakterienzellen mit PCR amplifiziert werden.

Die Änderung in der Amplifikatmenge in Abhängigkeit der DMSO-Konzentration wurde über das Verhältnis der 2ten (1700bp) zur 7ten (250bp) Bande der amplifizierten DNA-Sequenzen ausgedrückt (Abb. 3-22). In den hier durchgeführten ersten Versuchen konnte eine Abhängigkeit des Intensitätsverhältnisses von der DMSO-Konzentration gefunden werden. In Hakura et al.

wird die konzentrations- und zeitabhängige Mutagenität von DMSO auf einen ausgewählten *E. coli* Stamm beschrieben [173].



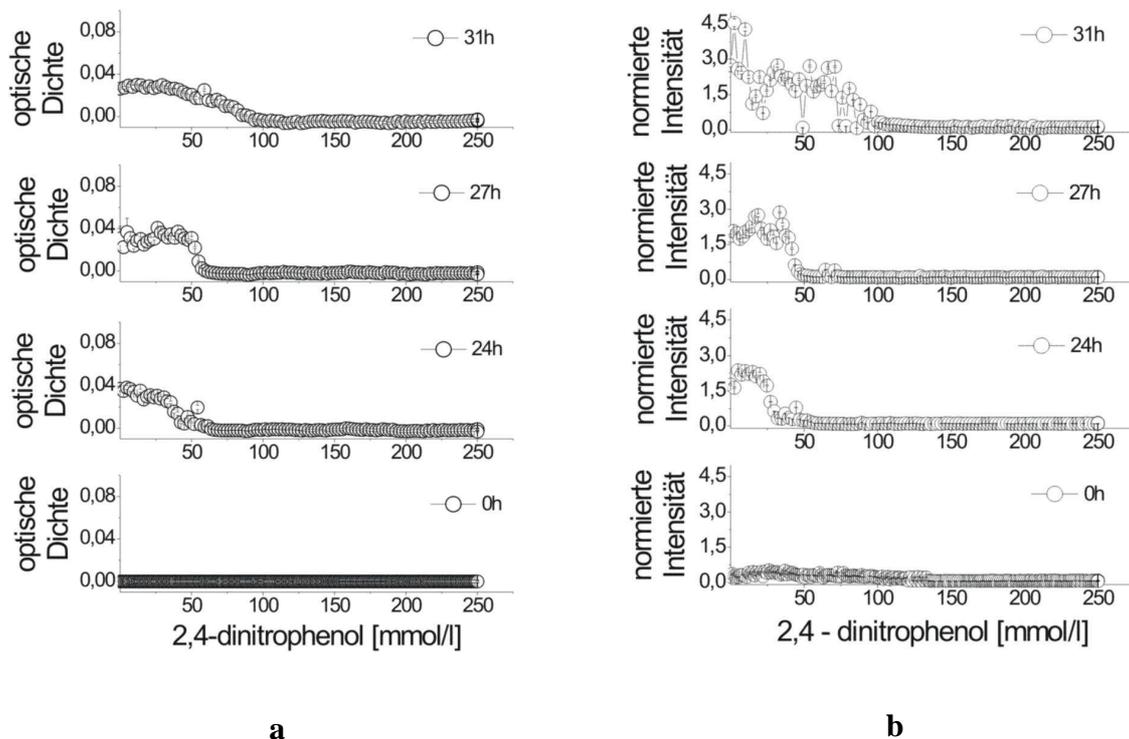
**Abb. 3-22:** Amplifikation von DNA-Sequenzen aus den im Mikrofluidsegment kultivierten *E. coli* Zellen: **a)** Intensitätsverhältnis der 2ten(1700 bp) zur 7ten(250bp)-Bande in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration. **b)** Gelelektrophorese der mit DMSO behandelten *E. coli* Proben; S: 100bp plus 1,5kbp Standard von Genaxxon, 1: 3,2 % DMSO, 2: 4,4 % DMSO, 3: 9,8 % DMSO, 4: 11,7 % DMSO, 5: 17,2 % DMSO, 6: 19% DMSO, S: 100bp plus 1,5kbp Standard.

Eine Kopplung von toxikologischen Screenings in Mikrofluidsegmenten mit Mikrodurchfluss-Schlauch-PCR Analysen könnte für zukünftige Toxizitätstests die Grundlage für ein vielversprechendes Analysesystem für eine multiple Endpunktbestimmung auch auf Genebene darstellen.

Die Wirkung von 2,4-Dinitrophenol und dem Decapeptid (KKVVFVKVFK-NH<sub>2</sub>) auf das Wachstum und die endogene zelluläre Autofluoreszenz (EZFS) von *E. coli* wurden untersucht. Mit der kontinuierlichen Segmenterzeugung konnten hoch aufgelöste Dosis-Wirkungsbeziehungen für beide Testsubstanzen ermittelt werden. Die simultane Messung der Optischen Dichte (Trübung) und des Fluoreszenzsignals in Segmentsequenzen konnte mit Mikrodurchflussphotometer und Mikrodurchflussfluorimeter für unterschiedliche Kultivierungszeitpunkte ermöglicht werden. Es wurden für beide Testsubstanzen gut reproduzierbare Dosis-Wirkungskurven gefunden.

Für den Wirkstoff DNP konnten sigmoidale Kurvenverläufe für die Endpunkte Wachstum und EZFS nach 24 h, 27 h und 31 h Kultivierung von *E. coli* in Mikrofluidsegmenten gefunden werden (Abb. 3-23). Es zeigte sich eine gute Korrelation der Ergebnisse für Wachstum und EZFS. Für geringe DNP-Konzentrationen von bis zu 10 µM wurde keine Hemmung des Wachstums und der Stoffwechselaktivität in Bezug auf die Positivkontrolle gefunden. Eine kontinuierliche Zunahme der Inhibierung von Wachstum und der Stoffwechselaktivität zeigte

sich für DNP-Konzentrationen größer als  $10 \mu\text{M}$ , wobei es für DNP-Konzentrationen von ca.  $50 \mu\text{M}$  zur stärksten Inhibierung im Rahmen der Messgenauigkeit kam.



**Abb. 3-23:** Wirkung von 2,4-Dinitrophenol auf das Wachstum und die Stoffwechselaktivität von in Mikrofluidsegmenten kultivierten *E. coli* Kulturen, Segmentanzahl: 200, Segmentvolumen: 300 nl, Synthetisches Medium. **a)** Konzentrationsabhängige Änderung der Zelldichte (OD) von *E. coli* für einen Kultivierungszeitraum von 31 h (Optische Dichte der Positivkontrollen: 0h: 0; 24 h: 0,04; 27 h u. 31 h: 0,03). **b)** Konzentrationsabhängige Änderung der Autofluoreszenz von *E. coli* (Intensitätswerte der Positivkontrollen: 0h: 0,29; 24 h u. 27 h: 2,11; 35 h: 2,49)

Die Screenings nach 27 h und 31 h Kultivierung zeigten eine Erhöhung der Effektkonzentrationen für das Wachstum und die Autofluoreszenz. Ursache dafür war das Auftreten einer zweiten Wachstumsphase der *E. coli* Kultur für Konzentrationen zwischen  $50 \mu\text{M}$  und  $60 \mu\text{M}$  nach 27 h sowie  $50 \mu\text{M}$  und  $100 \mu\text{M}$  nach 31 h Kultivierung im Mikrofluidsegment. Erklärungen für eine erneute Wachstumsphase von Bakterienstämmen nach der Behandlung mit Testsubstanzen fallen entsprechend der Literatur unterschiedlich aus. Eine Erklärung für das erneute Anwachsen von *E. coli* bei DNP-Konzentrationen, die bereits nach 24 h stark inhibierend wirkten, könnte die Ausbildung einer Subkultur sein, die toleranter gegen höhere DNP-Konzentrationen ist. Resistenzen treten gehäuft beim Wildtyp auf, da hier eine große Anzahl an Genotypen vorhanden ist, mit welchen die Population schneller auf Umwelteinflüsse in Form von spontanen Mutationen reagiert kann [176]. Der Nachweis der Existenz solcher Subkulturen kann durch die Ausbringung der betroffenen Segmente und die erneute Kultivierung der *E. coli*-Kultur auf Agar-Platten ermöglicht werden. Erneut

durchgeführte Einzelwirkungsscreening der Stoffwechselantwort können dann Aufschluss über Resistenzen geben.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die zweite Wachstumsphase könnte die Verschleppung von Bakterienzellen und eine Änderung der Effektorkonzentration während des Screenings sein. Die Untersuchung zur Verschleppung im Mikrofluidsegment während der Detektion und beim Transport der Segmente im Schlauch lieferte keine eindeutigen Ergebnisse<sup>j</sup>.

In Gage et al. wird die Adaption an DNP durch einen *E. coli* Stamm beschrieben [177]. Hier wurden in ersten Messungen Inhibierungsraten des Wachstums von 45 % bei 0,5 mM DNP gefunden. Anschließende Messungen zeigten ein erneutes Wachstum der Kultur für diese DNP-Konzentration.

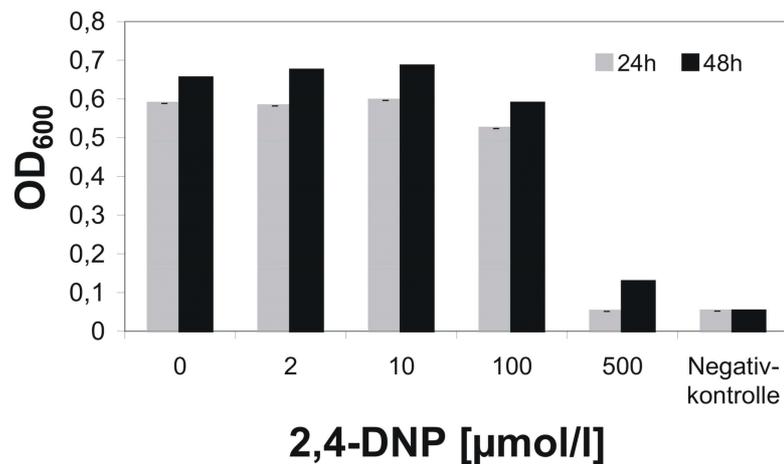
In den Referenzmessungen in Mikrotiterplatten konnten ebenfalls Dosis-Wirkungsbeziehungen mit einem sigmoidalen Kurvenverlauf für DNP gefunden werden (Abb. 3-24). Eine vollständige Inhibierung des Wachstums von *E. coli* konnte erst für eine DNP-Konzentration von 500  $\mu$ M ermittelt werden. Vergleichbare kritische Effektorkonzentrationen werden in der Literatur für die Wirkung von DNP auf *E. coli* angegeben [177,178].

Im Vergleich zu den Versuchen wurden in den Mikrofluidsegmenten 5 bis 10-mal höhere minimale Inhibierungskonzentrationen festgestellt. Dies könnte ein Hinweis auf im Mikrofluidsegment vorkommende Stressfaktoren wie z.B. anaerober Stoffwechsel und Nährstofflimitierung sein. Quellen für den zusätzlichen Stress auf die Bakterienkultur könnten das im Vergleich zur MTP über 500fach kleinere Kultivierungsvolumen und die begrenzte Sauerstoffpermeabilität der Schläuche sein (s. Diskussion Kapitel 3.5.2).

Die Versuche in Mikrotiterplatten ergaben ebenfalls eine zweite Wachstumsphase nach 48 h Kultivierung. Da die Verhältnisse in den MTPs näher an den in der Literatur beschriebenen liegen, kann die Wachstumsphase durch die Adaption an DNP durch *E. coli* erklärt werden.

---

<sup>j</sup> Ergebnisse Versuche J. Cao, FG Physikalische Chemie/MRT, TU Ilmenau.

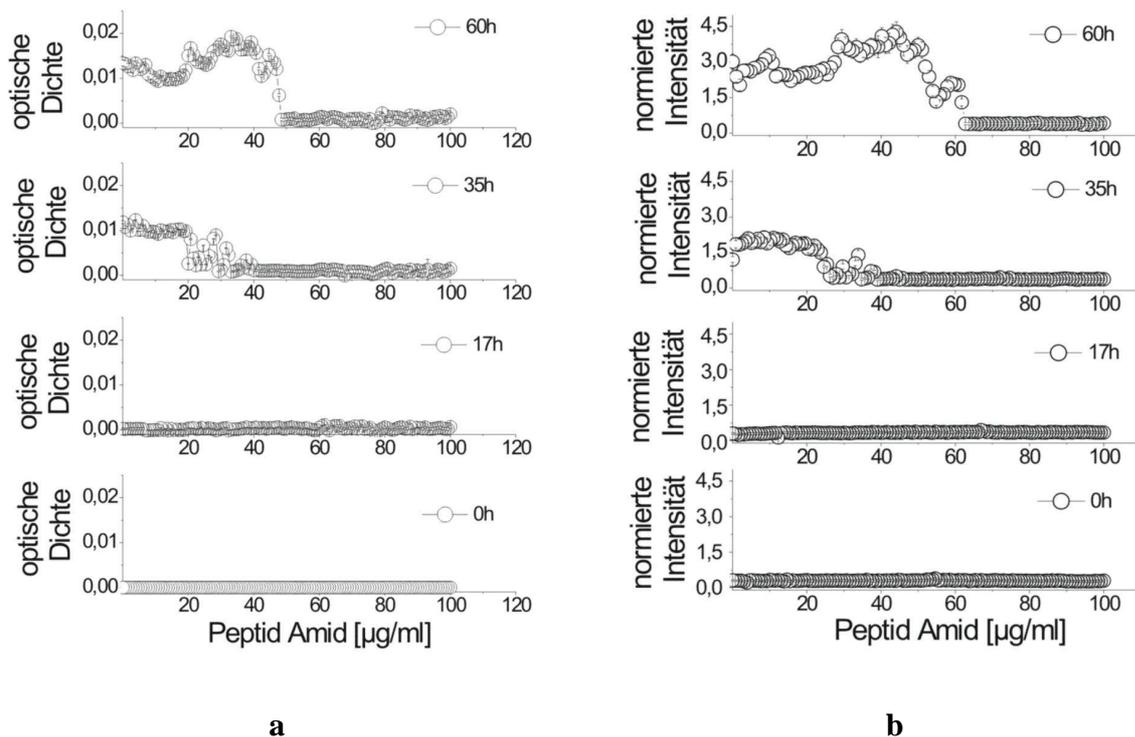


**Abb. 3-24:** Dosis-Wirkungsbeziehung für DNP auf das Wachstum von *E. coli* nach 24 h und 48 h Kultivierung in Mikrotiterplatten, Probendurchsatz: 12, Probenvolumen: 1ml, Synthetisches Medium.

Die Wirkung des antibakteriellen Decapeptides KKVVFVKFK-NH<sub>2</sub> auf Wachstum und EZFS von *E. coli* in Mikrofluidsegmenten wurde innerhalb eines Kultivierungszeitraumes von 60 h untersucht. Während sich nach 17 h Kultivierung keine signifikante Änderung in Wachstum und Fluoreszenzintensität zeigte, konnte nach 35 h eine hoch aufgelöste Dosis-Wirkungsbeziehung ermittelt werden.

Hohe Zelldichten konnten für geringe Peptidkonzentrationen bis zu 20 µg/ml gefunden werden, welche vergleichbar mit Zelldichten aus den Positivkontrollen sind (Abb. 3-25, a). Für Peptidkonzentrationen zwischen 20 µg/ml bis 40 µg/ml konnte ein kontinuierlicher Abfall der Zelldichte mit zunehmender Konzentration gefunden werden, welcher bei 40 µg/ml die größte Hemmwirkung auf das Wachstum von *E. coli* im Mikrofluidsegment zeigte. Für Konzentrationen größer als 40 µg/ml konnte keine Änderung der Bakterienzeldichte nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der Wirkung des Decapeptides nach 60 h Kultivierung im Mikrofluidsegment zeigte sich, wie bereits bei der Testsubstanz DNP gefunden, eine zweite Wachstumsphase und eine geringe Verschiebung der minimalen Hemmkonzentration. Die Ergebnisse für die Messung der Autofluoreszenz von *E. coli* korrelierten gut mit denen der Trübungsmessung (Abb. 3-25, b). Auch hier wurde ein erneuter Anstieg der Intensität nach 60 h Kultivierung beobachtet. Für Konzentrationen größer 60 µg/ml konnte nach 60 h Kultivierung keine Änderung der Stoffwechselaktivität gefunden werden. Die Ursachen solcher Wachstumsphasen könnten in einer Adaptation liegen, wie bereits für die Testsubstanz DNP diskutiert wurde.

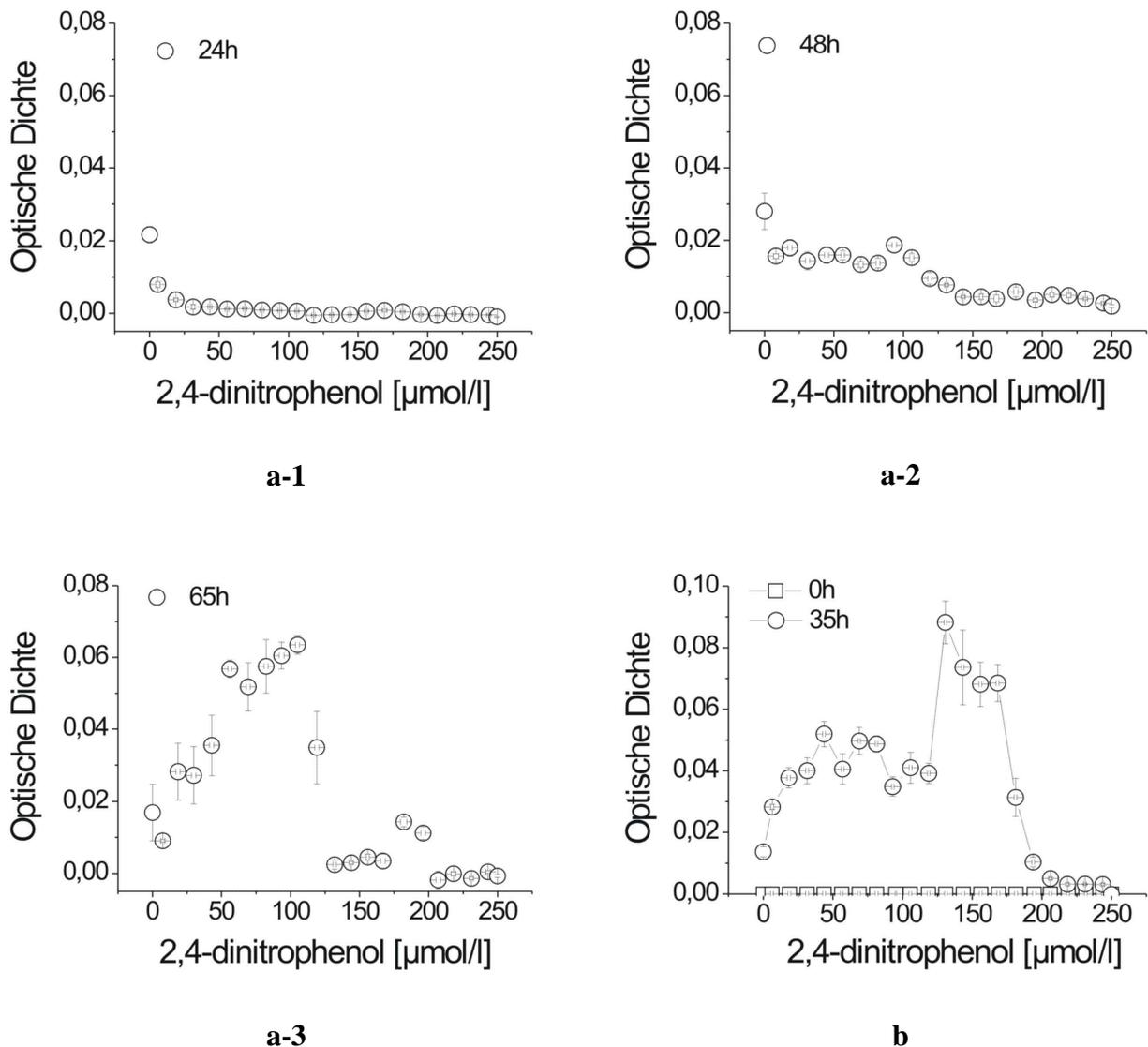


**Abb. 3-25:** Antibakterielle Wirkung des Decapeptides KKVVFVKVFK-NH<sub>2</sub> auf Wachstum und Stoffwechselaktivität von *E. coli* für die Kultivierung in Mikrofluidsegmenten, Segmentanzahl: 200, Segmentvolumen: 600 nL, Synthetisches Medium **a)** Konzentrationsabhängige Änderung des Wachstums (OD) von *E. coli* (Optische Dichte Positivkontrolle: 0 h: 0; 17 h: 0; 35 h u. 60 h: 0,01). **b)** Konzentrationsabhängige Änderung der Autofluoreszenz von *E. coli* (Intensitätswerte der Positivkontrolle: 0 h: 0,31; 17 h: 0,30; 35 h: 1,20; 60 h: 3,01).

In Hong et al. wird für das KSL-Peptide (entspricht dem hier verwendeten Decapeptid) eine minimale Inhibierungskonzentration von 3,12 µg/ml für *Escherichia coli* ATCC 2592 angegeben, welche um ein 10faches niedriger liegt als in den Versuchen in Mikrofluidsegmenten [179]. Da allein schon das Wissen hinsichtlich des Wirkungsmechanismus von Peptiden nicht ganz geklärt ist, wird es schwierig die Frage zu begründen, warum die Wirkung des im Mikrofluidsegment untersuchten Peptides eine anderen Größenordnung als in der Literatur gefunden, aufweist. Bereits die verwendeten Puffermedien sowie die gewählten *E. coli*-Stämme, die Populationsdichten und die Wachstumsphasen der Bakterien können unterschiedliches Antwortverhalten zur Folge haben. Mit diesen Versuchen konnte eindeutig die inhibierende Wirkung des Decapeptides auf *E. coli* nachgewiesen werden.

### 3.4.2 Modellorganismus *S. cerevisiae*

Die Wirkung von DNP und dem Decapeptid KKVVFKVKFK-NH<sub>2</sub> auf eukaryotische Zellen wurde anhand des Wachstums von *S. cerevisiae* in Mikrofluidsegmentsequenzen untersucht. Für 2,4-DNP wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen für Versuche ohne und mit Einsatz von Rührsystemen zur Segmenterzeugung ermittelt. In Abb. 3-26 sind die Dosis-Wirkungskurven für DNP dargestellt.



**Abb. 3-26:** Dosis-Wirkungskurven für 2,4-DNP während der Kultivierung von *S. cerevisiae* in Mikrofluidsegmentsequenzen. **a)** Segmenterzeugung ohne Rührsystem, Segmentanzahl: 200, Segmentvolumen: 570 nl ± 140 nl, YM-Medium. **a-1)** Wachstum von Hefe nach 24 h Kultivierung. **a-2)** Wachstum von Hefe nach 48 h Kultivierung. **a-3)** Wachstum von Hefe nach 65 h Kultivierung. **b)** Segmenterzeugung mit Magnetrührer, Segmentanzahl: 400, Segmentevolumen: 500 nl ± 160 nl, YM-Medium.

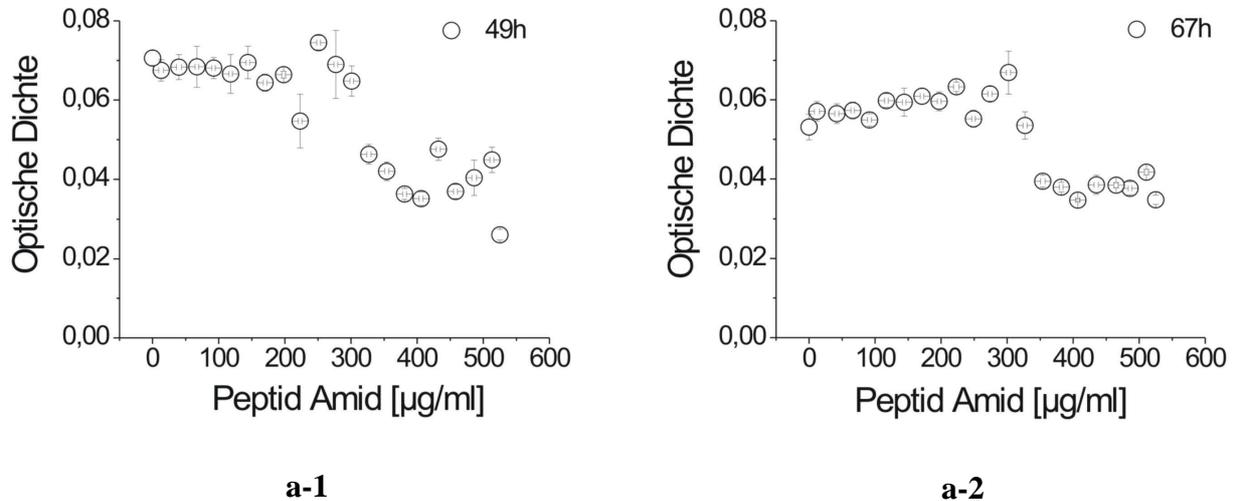
Nach 48 h konnte für die Versuche ohne Einsatz eines Rührsystems bei der Segmenterzeugung ein konzentrationsabhängiges Wachstum für *E. coli* im Mikrofluidsegment mit einer minimalen Effektkonzentration von ca. 150  $\mu\text{M}$  DNP gefunden werden.

Nach 65 h Kultivierung im Segment zeigte sich für DNP-Konzentrationen zwischen 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  ein verstärktes Anwachsen der Hefezellen von bis zu 50 % im Vergleich zur Kontrolle.

Diese Ergebnisse konnten in den Versuchen mit Magnetrührer bereits nach 35 h Kultivierung im Segment bestätigt werden. Damit konnten für die eukaryotischen Hefen und die prokaryotischen *E. coli* Zellen ähnliche Größenordnungen an Effektkonzentrationen für DNP ermittelt werden. Es konnte nicht explizit geklärt werden, ob der Grund für die erhöhten Wachstumsbereiche in der Wirkung von DNP oder an der Verteilung der Zellen im Segment lag.

Die Referenzversuche in Mikrotiterplatten bestätigen die Ergebnisse aus den Versuchen in Segmenten (Abb. 3-29, a). Es konnten aber keine verstärkten Wachstumsbereiche für die untersuchten DNP-Konzentrationen gefunden werden.

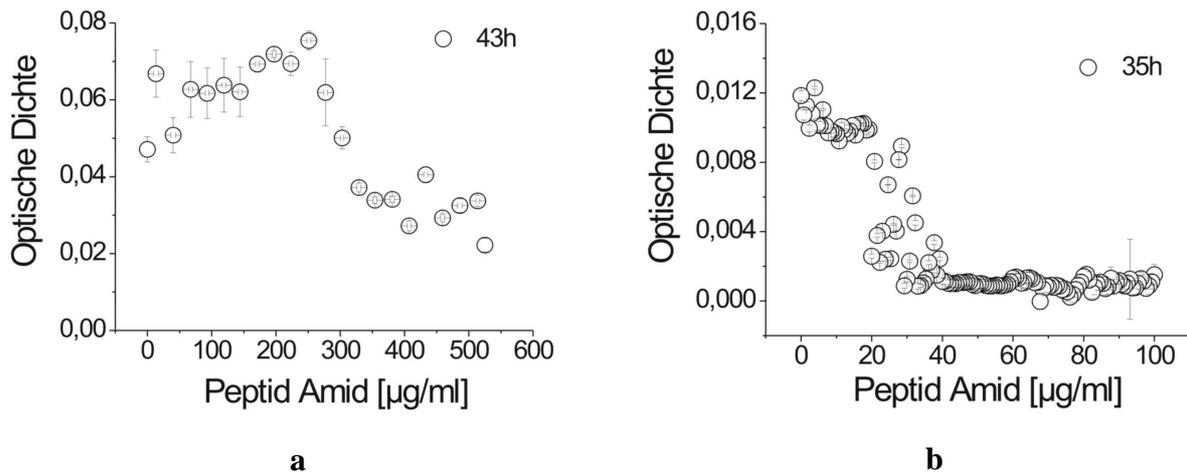
Die Wirkung des Decapeptides auf das Wachstum von Hefe in Mikrofluidsegmenten ist in Abb. 3-27 dargestellt.



**Abb. 3-27:** Dosis-Wirkungskurven des Decapeptides KKVVFVKVFK-NH<sub>2</sub> ermittelt für die Kultivierung von *S. cerevisiae* in Mikrotiterplatten. Segmentanzahl: 200, Segmentvolumen: 590 nl  $\pm$  85 nl, Ohne Rührsystem, YM-Medium. **a-1)** Konzentrationsabhängiges Wachstum von Hefe nach 49 h Kultivierung im Segment. **a-2)** Konzentrationsabhängiges Wachstum von Hefe nach 67 h Kultivierung im Segment.

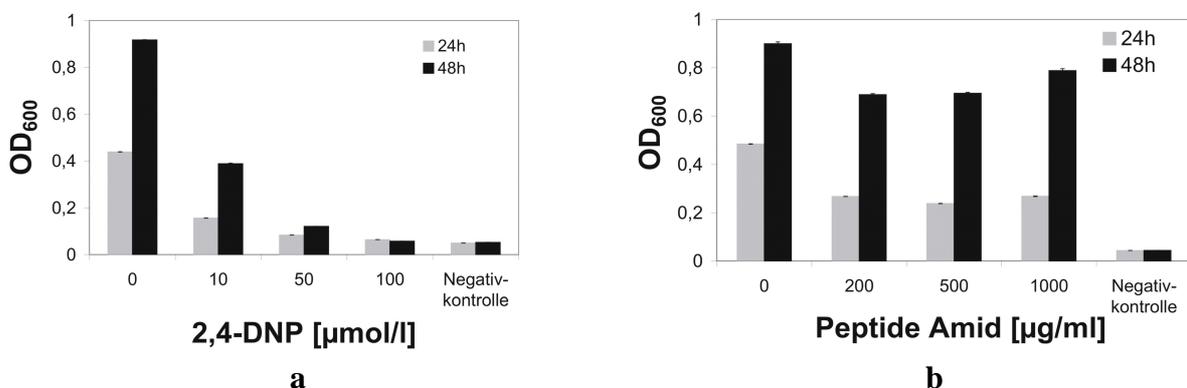
Im Vergleich zur Wirkung von DNP konnte nach 49 h und 67 h Kultivierung von Hefe im Segment keine starke Inhibierung des Zellwachstums für das Dekapeptid beobachtet werden. Für Peptidkonzentrationen größer 300  $\mu\text{M}$  zeigte sich eine leichte Inhibierung des Wachstums im Vergleich zur Positivkontrolle. Während für die Prokaryontenzellen eine Inhibierung des

Wachstums bereits für geringe Konzentrationen des Decapeptides beobachtet werden konnte, zeigten die Untersuchungen an den eukaryotischen Hefezellen nur für eine 100fach höhere Peptidkonzentration leichte Inhibierungen und damit nahezu untoxische Effekte auf das Wachstum (Abb. 3-28). Der Einsatz von Mikrofluidsegmenten ermöglichte das schnelle und stark volumenreduzierte Wirkscreening einer antibakteriellen Testsubstanz auf unterschiedliche Zelltypen.



**Abb. 3-28:** Vergleich der Wirkung des Decapeptides KKVVFVKVKFK-NH<sub>2</sub> auf das Wachstum von pro- und eukaryotischen Zellen im Mikrofluidsegment. **a)** Wirkung des Decapaptides auf das Wachstum von *S. cerevisiae* im Segment. **b)** Wirkung des Decapaptides auf das Wachstum von *E. coli* im Segment.

Die Referenzversuchen in MTP für das Peptid untermauerten die im Mikrofluidsegment ermittelten Ergebnisse (Abb. 3-29, b). Hier wurde für Peptidkonzentrationen bis 1000  $\mu\text{g/ml}$  nur eine leichte Inhibierung des Wachstums von Hefe im Vergleich zur Positivkontrolle gefunden. Damit konnte die Eignung des Decapeptides als Antibiotikum bestätigt werden.



**Abb. 3-29:** Dosis-Wirkungskurven für 2,4-DNP (a) und Decapeptid KKVVFVKVKFK-NH<sub>2</sub> (b) Ermittlung bei der Kultivierung von *S. cerevisiae* in Mikrotiterplatten. Probenanzahl: 12, Probenvolumen: 1 ml, YM-Medium.

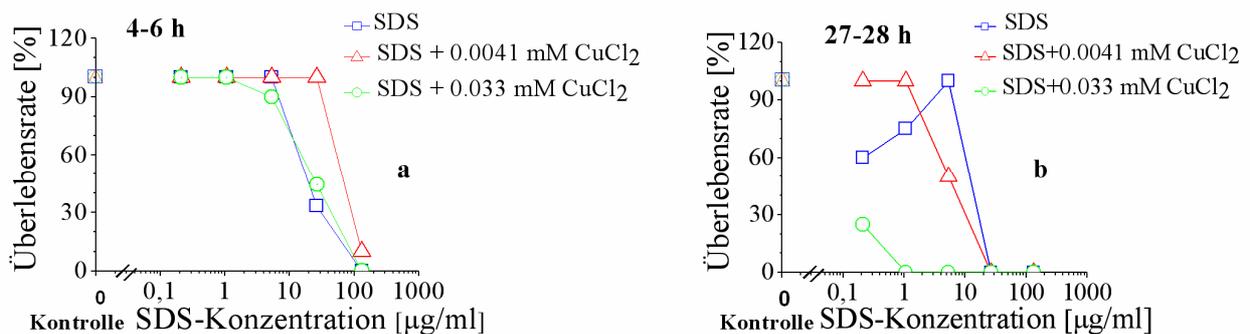
Wie bereits in den Wachstumsstudien für *S. cerevisiae* (s. Kapitel 3.2.2) gezeigt, ist der Einsatz eines effektiven Rührsystems für die homogene Verteilung der Hefezellen im Segment essentiell.

### 3.4.3 Modellorganismus *Danio rerio*

Der letale Endpunkt Koagulation (graphisch als Überlebensrate dargestellt) wurde bei Zugabe verschiedener SDS-Konzentrationen und deren Kombinationen mit Kupfer(II)-chlorid zu einem frühen embryonalen Entwicklungsstadium, Alter 4 h bis 6 h, und mit einem Embryonalalter von 27 h bis 28 h ermittelt (Abb. 3-30).

Ein Embryo wurde als koaguliert bezeichnet, wenn es abgestorben, also die Zellen denaturiert vorlagen. Der Embryo erscheint nicht länger transparent, sondern weiß.

Zu Beginn der Untersuchung konnten für geringe SDS-Konzentrationen bis zu 5,28 µg/ml weder für SDS als Einzelsubstanz noch für die Kombinationen mit 0,0041 mM CuCl<sub>2</sub> und 0,033 mM CuCl<sub>2</sub> eine Wirkung auf die Entwicklung der Zebrafischembryonen im Vergleich zu den Kontrollen gefunden werden (Abb. 3-30, a). Für höhere SDS-Konzentrationen zeigte sich dagegen eine hemmende Wirkung auf die Entwicklung bis zur vollständigen Koagulation bei der höchsten SDS-Konzentration für alle drei Varianten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mit Zunahme der SDS-Konzentration sich der hemmende Einfluss beider Kombinationen gegenüber der Einzelsubstanz verstärkte.



**Abb. 3-30:** Wirkung von SDS und SDS in Kombination mit CuCl<sub>2</sub> auf die Überlebensrate der Zebrafischembryonen im Segment in einem frühem sowie fortgeschrittenem Entwicklungsstadium. **a)** Überlebensrate der Embryonen mit einem Alter von 4 bis 6 h. **b)** Überlebensrate der Embryonen mit einem Alter von 27 bis 28 h.

Mit einem Embryonalalter von 27 h bis 28 h wies die Kombination mit der höchsten Konzentration an Kupferionen für die meisten SDS-Konzentrationen bereits keine Entwicklung der Zebrafischembryonen mehr auf (Abb. 3-30, b). Die überwiegende Anzahl der Embryonen

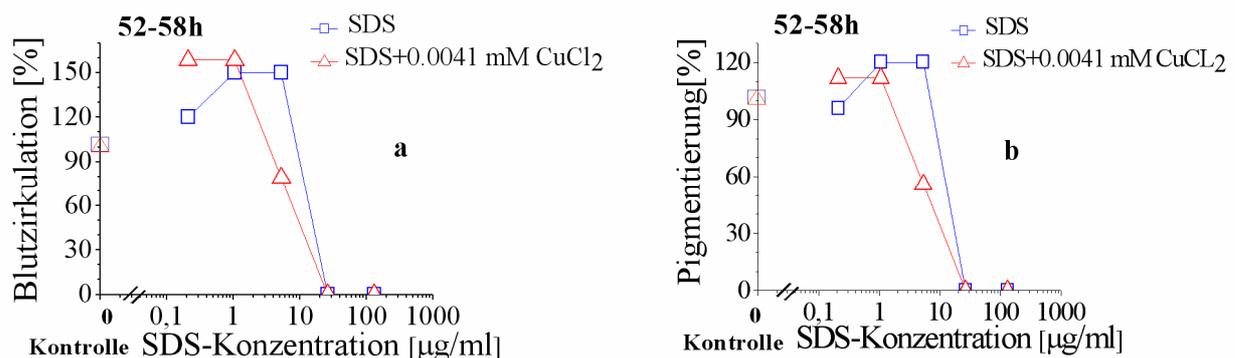
war koaguliert. Deshalb wurde bei der Betrachtung der übrigen physiologischen Endpunkte nur SDS und die Kombination mit 0,0041 mM CuCl<sub>2</sub> berücksichtigt.

Für die Behandlung der Embryonen mit der Einzelsubstanz SDS zeigte sich für geringe Konzentrationen ein mit steigender Konzentration positiverer Effekt, wogegen die Kombination mit einer Konzentration von 0,0041 mM CuCl<sub>2</sub> für geringe SDS-Konzentrationen keinen Effekt im Vergleich zu den Kontrollen aufwies. Für höhere Konzentrationen an SDS konnte eine zunehmende Koagulation der Embryonen gefunden werden, wobei sich für die höchsten SDS-Konzentrationen ein Absterben aller Embryonen für beide Fälle zeigte.

Neben Gastrulation, Augenanlage, Schwanzablösung und Herzschlagfrequenz sind sowohl Blutzirkulation als auch Pigmentierung wichtige, routinemäßig gemessene subletale Endpunkte, da sie verschiedene Kriterien für eine objektive Beschreibung der Abweichung von der Normalentwicklung ermöglichen [18,180].

Die meisten der ausgewählten Endpunkte können bereits 36 h nach Befruchtung beobachtet werden. Da aber ein konstanter Herzschlag erst mit einem Alter des Embryos von 48 Stunden erreicht wird, wurde in diesen Versuchen ein Beobachtungszeitpunkt von 52 h bis 58 h festgelegt.

Der für niedrige SDS-Konzentrationen ohne und mit Zusatz von 0,0041 mM CuCl<sub>2</sub> gefundene positive Einfluss auf die Entwicklung der Zebrafischembryonen im Vergleich zu den Kontrollen konnte besonders bei den Endpunkten Pigmentierung und Blutzirkulation beobachtet werden (Abb. 3-31).



**Abb. 3-31:** Wirkung von SDS und SDS in Kombination mit 0,0041 mM CuCl<sub>2</sub> auf die physiologischen Endpunkte Blutzirkulation (a) und Pigmentierung (b) für ein Embryoalter von 52 bis 58 h.

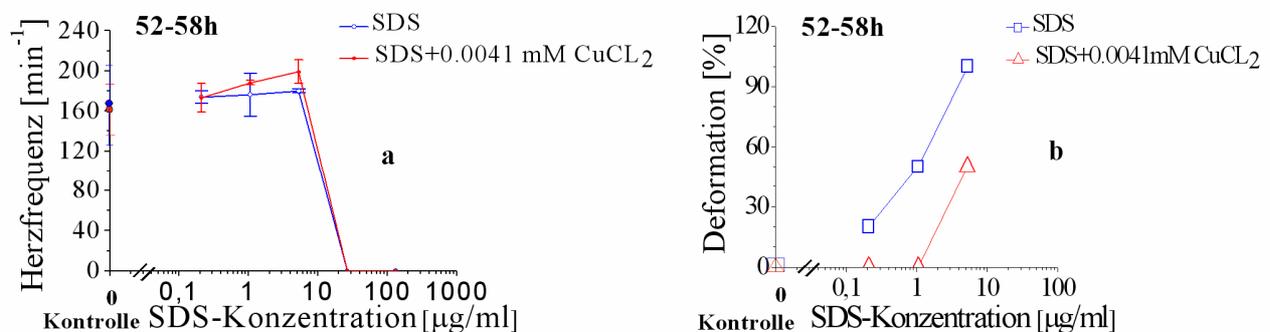
Ursache dafür könnte der antibakterielle Charakter des Kupfer(II)-chlorids in der Segmentumgebung sein.

Die Erhöhung der SDS-Konzentration führte zu einer Zunahme der Inhibierung der Embryonenentwicklung, wobei die Kombination von SDS und  $\text{CuCl}_2$  eine deutlich stärkere Wirkung als SDS allein aufwies.

Es wurden ebenfalls Effekte von SDS auf den teratogenen Endpunkt Deformation und die gemessene Herzschlagfrequenz gefunden (Abb. 3-32). Während für geringe Konzentrationen der Einzelsubstanz SDS vergleichbare Frequenzen wie in den Kontrollen ermittelt wurden, konnte bei Zugabe von Kupferionen zu niedrigen SDS-Konzentrationen eine geringfügige Erhöhung der Herzschlagfrequenz gemessen werden.

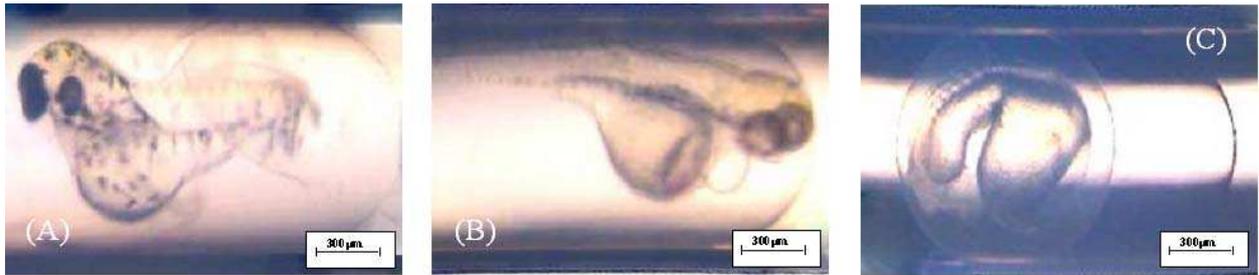
Für SDS-Konzentration bis  $10 \mu\text{g/ml}$  ohne und mit Zusatz von  $\text{CuCl}_2$  wurden Herzschlagfrequenzen zwischen 160 und 200 Schläge pro Minute gemessen, eine Größenordnung, die in der Literatur für normal entwickelte Zebrafischembryonen angegeben wird [181].

In ökotoxikologischen Standardverfahren werden verschiedene Arten von teratogenen Endpunkten betrachtet [182]. In den durchgeführten Versuchen wurden nur diejenigen Deformationen ausgewählt, die gut mit den gegebenen optischen Bedingungen der Versuchsanordnung beobachtet werden konnten. Diese wurden dann unter den Oberbegriff Deformation zusammengefasst.



**Abb. 3-32:** Wirkung von SDS und SDS in Kombination mit  $\text{CuCl}_2$  auf den allgemeinen subletalen Endpunkt Herzschlagfrequenz (a) und den teratogenen Endpunkt Deformation (b) bei einem Embryoalter von 52 bis 58 h.

Es zeigte sich ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen Erhöhung der Konzentration von SDS und dem vermehrten Auftreten von Deformationen (Abb. 3-32, b). Für die höchsten SDS-Konzentrationen wurden aufgrund des frühen Koagulierens der Embryonen keine Deformationen gefunden. Für die Kombinationswirkung mit Kupferchlorid zeigten sich nur bei einer SDS-Konzentration von  $5,28 \mu\text{g/ml}$  Deformationen in der embryonalen Entwicklung mit einem prozentual geringeren Anteil als der durch SDS verursachte. In Abb. 3-33 ist eine Zusammenstellung der beobachteten Deformationsformen dargestellt.



**Abb. 3-33:** Beobachtete Deformationen von Zebrafischembryonen im Mikrofluidsegment. **a)** Fehlbildung von Kopf, Augen und Schwanz, 5,28 µg/ml SDS. **b)** Herzdeformation, 0,21 µg/ml SDS + 0,0041 mM CuCl<sub>2</sub>. **c)** Fehlende Kopfanlagerung, 0,21 µg/ml SDS + 0,0041 mM CuCl<sub>2</sub>.

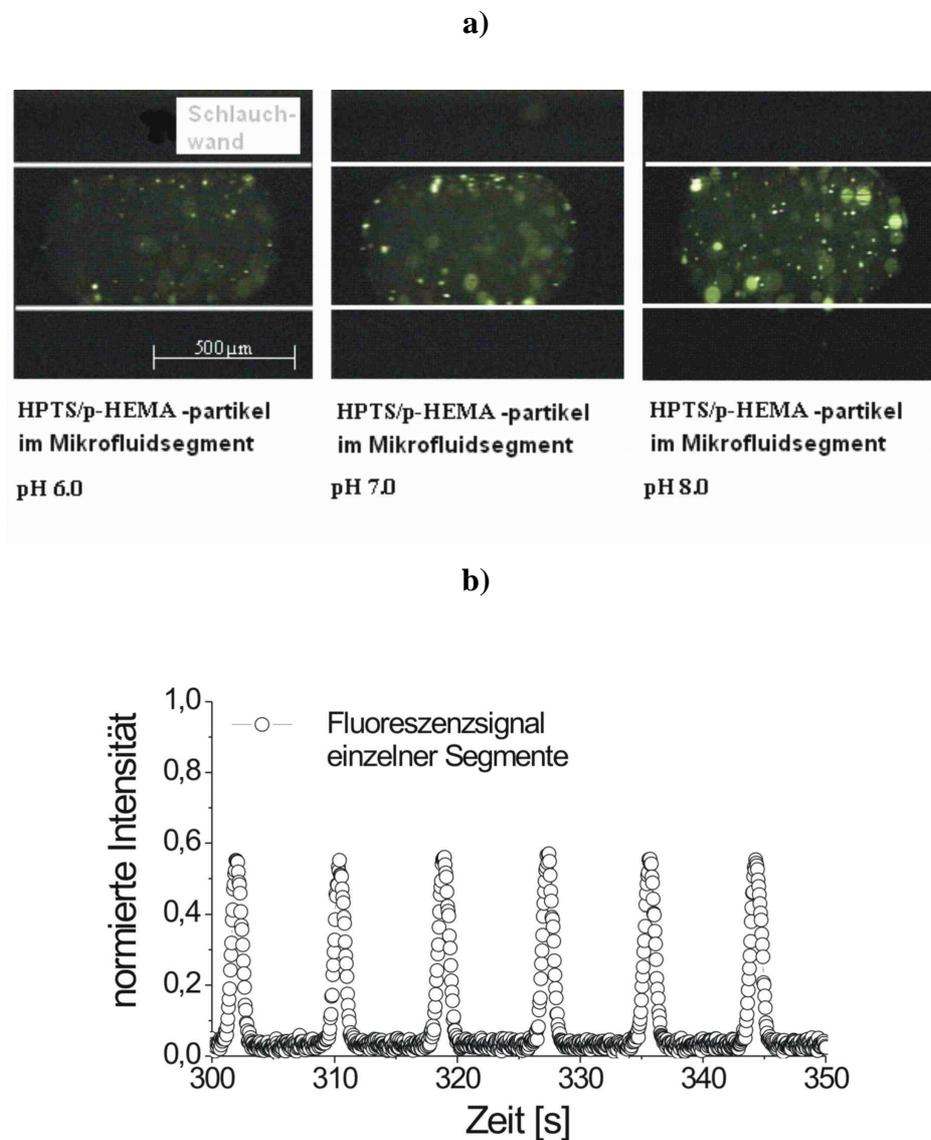
Die hier durchgeführten Versuche zeigten, dass es möglich ist, einen komplexen Organismus wie den Vertebraten *Danio rerio* nicht nur in ein Mikrofluidsystem ohne Schädigung einzubringen, sondern auch eine Entwicklung bis zum Schlupf in speziell definierten Mikrofluidsegmenten zu gewährleisten. Daneben war es möglich, eine phänotypische Prozessierung der embryonalen Entwicklung bei Einwirkung einer Modellsubstanz und deren Kombinationswirkung zu ermöglichen. Damit wurde die Grundlage für weiterführende Forschungen zu Mehrzellern in Mikrofluidsystemen und eine Optimierungsgrundlage für zukünftige biologische Multiparameter-Screenings geschaffen.

### 3.5 Erfassung der Stoffwechselaktivität durch ins Mikrofluidsegment integrierte optische pH-Sensorbeads

#### 3.5.1 Kalibrierung

Mit der Integration von Mikrobeads in die Mikrofluidsegmente konnte die segmentinterne Analyse von Stoffwechselindikatoren wie z.B. pH- oder  $pO_2$ -Wert ermöglicht werden.

Es konnte eine einfache Einbringung der Mikrobeads in die Segmente ohne Verstopfung der Segmentmodule und das Abwandern der Beads in die Trägerphase gezeigt werden (Abb. 3-34, a).



**Abb. 3-34:** Fluoreszenzintensität von HPTS/p-HEMA-Mikrobeads in Mikrofluidsegmenten. **a)** Fotos von Mikrobeads in Segmenten mit unterschiedlichen Pufferlösungen. Anstieg der Fluoreszenzintensität mit steigendem pH-Wert. **b)** Ausschnitt des Intensitätssignals von Mikrobeads in einer Segmentsequenz.

Innerhalb von wenigen Minuten konnten bis zu 100 Segmente mit einer homogenen Verteilung der Mikrobeads erzeugt und analysiert werden (Abb. 3-34, b). Die Detektionsgrenze für das Intensitätssignal wurde mit 500 Beads à 500 nl Segment ermittelt. Für eine Dichte an Mikrobeads von größer 2000 pro Segment konnten Fluoreszenzintensitäten mit einem hohem Signal/Rauschverhältnis gemessen werden.

Zur Charakterisierung der Mikrobeads wurden pH- und zeitabhängige Kalibrationen im Komplexmedium und synthetischem Medium für den Testorganismus *E. coli* durchgeführt.

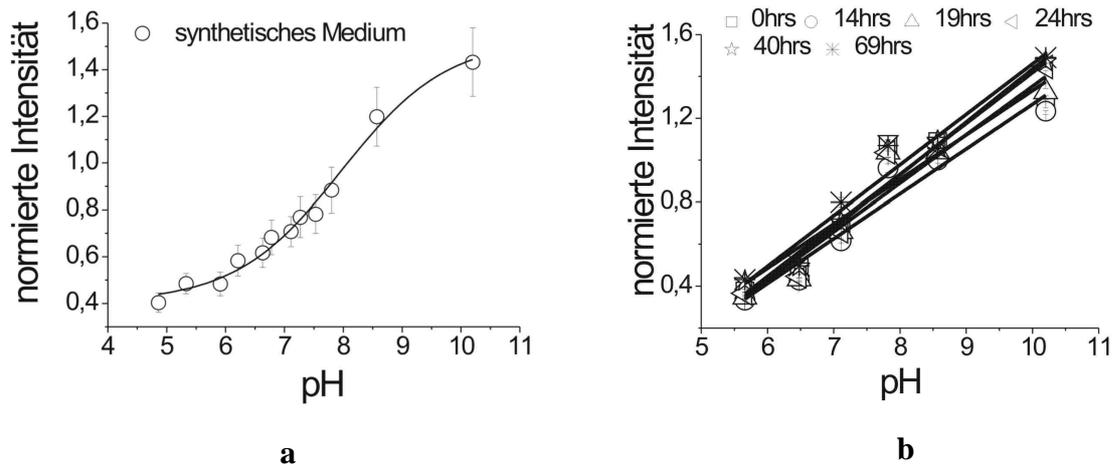
In der Diplomarbeit von J. Cao wurde die pH-Wert-Entwicklung während des Wachstums von *E. coli* im Segment und DYT-Medium mit dem Einsatz von HPTS/p-HEMA Partikeln untersucht [128]. Die pH- und zeitabhängigen Kalibrierungskurven für das Komplexmedium DYT sind in Anhang 6.7 aufgezeigt<sup>a</sup>. Es konnte eine lineare pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der Beads im Segment und reiner Pufferlösung für einen stoffwechselrelevanten pH-Wert Bereich (pH-Wert von 6 bis 10) gefunden werden (s. Anhang 6.7, Abb. 6-15, a). Für die zeitabhängige Kalibration der Mikrobeads im DYT-Medium wurden eine Abnahme der Intensität und ein nicht lineares Verhalten der Kalibrierungskurven während der Inkubation der Segmente bei 37 °C gefunden (s. Anhang 6.7, Abb. 6-15, b).

Die gemessene Fluoreszenzintensität lag um ein Vielfaches höher als die Fluoreszenzintensität aus den Versuchen in Pufferlösung. Die Ursache lag hauptsächlich in der hohen Eigenfluoreszenz des Komplexmediums, die durch komplexe Bestandteile des Mediums wie z.B. Peptone und Peptide verursacht werden. Für die Lagerung der Segmente bei 37 °C konnte eine Fluoreszenzlöschung des Nährmediums beobachtet werden, welche zu größeren Ungenauigkeiten und Abweichungen bei der Messung führten.

Der Einsatz des synthetischen Mediums, welches nur Glucose als Kohlenstoffquelle enthielt, ermöglichte die Fluoreszenzmessung im Segment ohne Überlagerung der Messwerte durch ein hohes Hintergrundsignal (Abb. 3-35, a). Für die Lagerung der Segmente über einen Zeitraum von 70 h bei 37°C konnten lineare Kalibrierungskurven für einen pH-Bereich von 6 bis 10 ermittelt werden (Abb. 3-35, b).

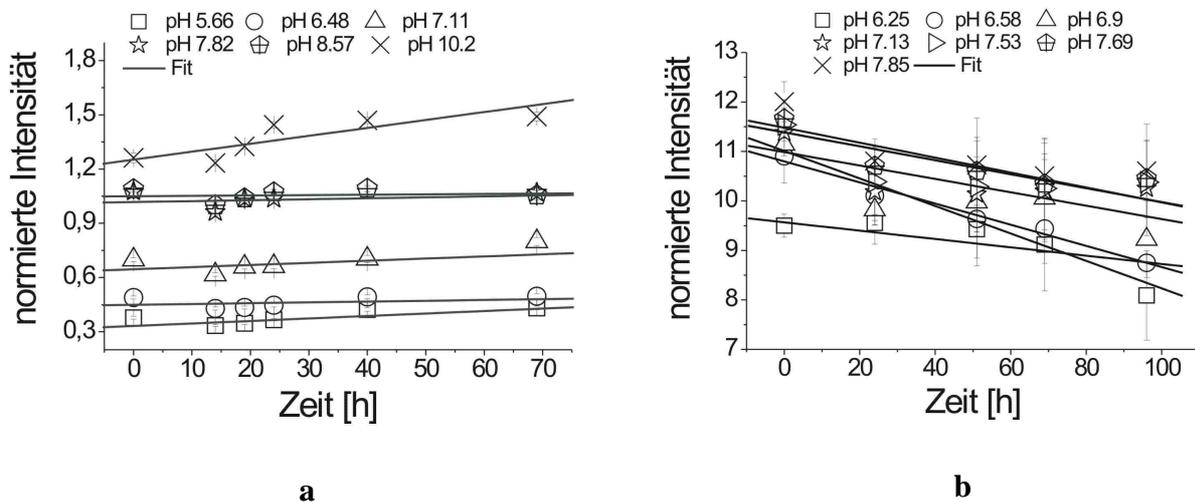
---

<sup>a</sup> Ergebnisse J. Cao.



**Abb. 3-35:** Kalibrierungskurven für pH-sensitive Mikrobeads im Mikrofluidsegment.  $4 \times 10^6$  Beads/ml, 2000 Beads pro Segment **a)** pH-abhängige Kalibrierungskurve für Mikrobeads im synthetischen Medium. **b)** Kalibrierungskurven für Mikrobeads inkubiert bei  $37^\circ\text{C}$  im synthetischen Medium über einen Zeitraum von 70 h.

Der Vergleich von zeitabhängiger Kalibrierung im synthetischen Medium und Komplexmedium bei  $37^\circ\text{C}$  ist in Abb. 3-36 dargestellt. Für die Mikrobeads im synthetischen Medium konnten nahezu konstante Intensitätswerte für verschiedene pH-Werte über einen Zeitraum von 70 h gefunden werden (Abb. 3-36, a). Die Messung im Komplexmedium DYT zeigte eine Abnahme der Intensitätswerte über die Zeit (Abb. 3-36, b).



**Abb. 3-36:** Kalibrierungskurven der pH-sensitiven Mikrobeads im Mikrofluidsegment. **a)** Zeitabhängige Kalibrierung für Mikrobeads im synthetischen Medium. **b)** Zeitabhängige Kalibrierung für Mikrobeads im Komplexmedium DYT.

Die pH-Wert Messung von Mikrobeads im Komplexmedium konnte durch Kalibrierung ermittelt werden, zeigte sich aber aufgrund der zu hohen Rauschsignale ungeeignet für die Messung kleiner pH-Wertänderungen.

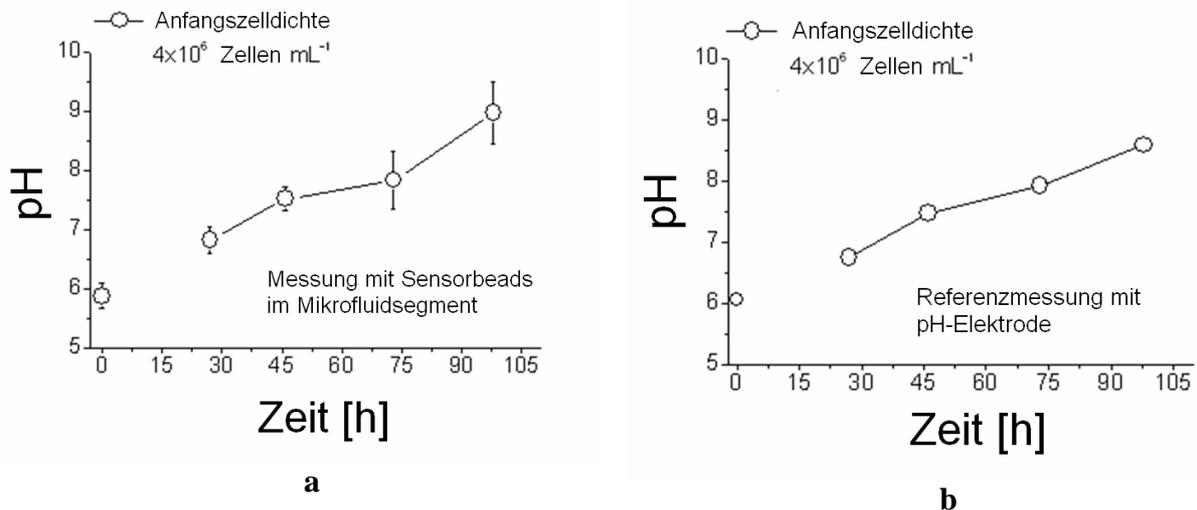
### 3.5.2 Segmentinterne pH-Erfassung in Wachstumsstudien und Toxizitätstests

#### Wachstumsstudien

Der segmentinterne pH-Wert konnte über die Fluoreszenzintensität von pH-sensitiven Mikrobeads durch Kalibrierung ermittelt werden. Damit gelang es, den physiologischen Parameter pH-Wert während der Kultivierung von *E. coli* im Mikrofluidsegment zu messen.

Die Kalibrierung der Intensität von Mikrobeads für die Toxizitätstests gestaltete sich schwieriger, da komplexere chemische Zusammensetzungen in den Segmenten vorherrschten. Hier wurde keine Berechnung des pH-Wertes durchgeführt, sondern Aussagen über die durch die physiologische Aktivität verursachte Änderung des segmentinternen pH-Wertes direkt über die Änderung im Fluoreszenzsignal ermittelt.

In Abb. 3-37 ist die zeitabhängige pH-Entwicklung bei der Kultivierung von *E. coli* im Segment und die Referenzmessung in Falcon-Tubes für das Komplexmedium DYT dargestellt. Für die Messung im Segment mit Komplexmedium konnte ein Anstieg des pH-Wertes mit der Zeit gefunden werden (Abb. 3-37, a). Diese Ergebnisse korrelierten gut mit den Ergebnissen aus den Referenzmessungen in 15 ml Falcon-Tubes (Abb. 3-37, b).

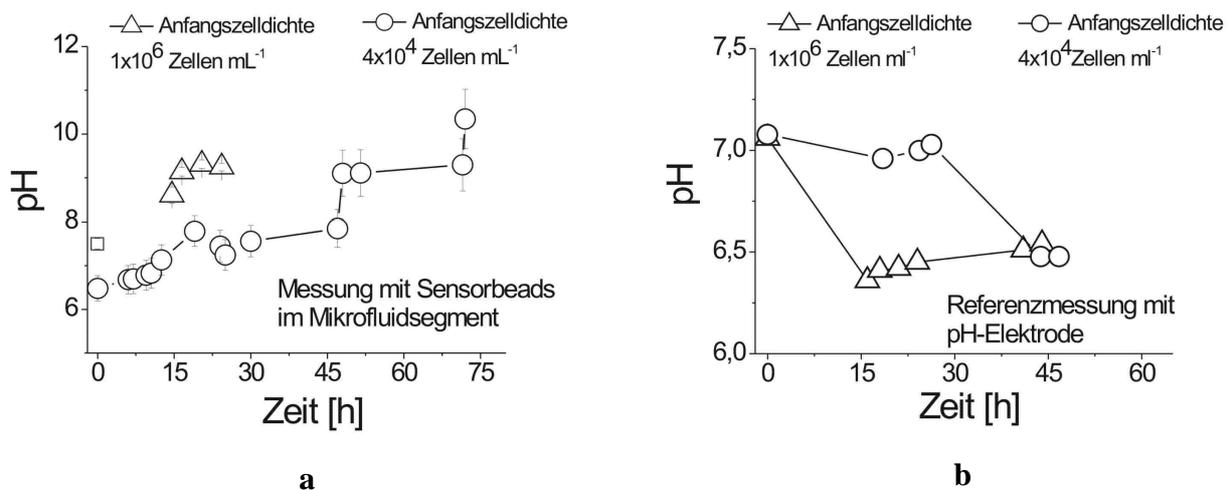


**Abb. 3-37:** Untersuchung der Stoffwechselaktivität von *E. coli* im Komplexmedium DYT **a)** pH-Wertentwicklung während der Kultivierung einer *E. coli* Kultur im Mikrofluidsegment, Startzelldichte  $4 \times 10^6$  Zellen/ml, Mikrodurchflussfluorimeter **b)** pH-Wertentwicklung während der Kultivierung einer *E. coli* Kultur in 15 ml Falcon-Tubes, Startzelldichte  $4 \times 10^6$  Zellen/ml, pH-Elektrode.

Die Decarboxylierung von Aminosäuren zu basischen Aminen wird in der Literatur als eine Erklärung für den Anstieg des pH-Wertes während der Kultivierung von *E. coli* im Komplexmedium angegeben [133]. Die Ergebnisse zeigten, dass mit dem Komplexmedium DYT trotz starker Beeinflussung des Fluoreszenzsignals gute und mit den Referenzmessungen

vergleichbare Resultate erzielt werden konnten. Im Vergleich mit den Versuchen im synthetischen Medium ist ein höherer Aufwand für die Kalibration bei der Messung nötig, die abhängig von unterschiedlichen Einflussgrößen, wie Eigenfluoreszenz des Mediums oder zeitabhängige Fluoreszenzlöschung, sind.

Daneben wurde die pH-Entwicklung während der Kultivierung von *E. coli* im synthetischen Medium für zwei verschiedene Startzellichten im Segment und in 15 ml Falcon-Tubes als Referenzmethode untersucht (Abb. 3-38).



**Abb. 3-38:** Untersuchung der Stoffwechselaktivität von *E. coli* im synthetischen Medium. **a)** pH-Wertentwicklung während der Kultivierung von *E. coli* im Mikrofluidsegment für eine Startzellichte  $4 \times 10^4$  Zellen/ml und  $1 \times 10^6$  Zellen/ml, Mikrodurchflussfluorimeter. **b)** pH-Wertentwicklung während der Kultivierung einer *E. coli* Kultur in 15 ml Falcon-Tubes, Startzellichte  $4 \times 10^6$  Zellen/ml und  $1 \times 10^6$  Zellen/ml, pH-Elektrode.

Für eine Startzellichte von 18 Zellen/Segment konnte ein leichter pH-Anstieg während der ersten 16 h der Kultivierung im Segment gefunden werden (Abb. 3-38, a). Danach folgte ein geringfügiger Abfall des pH-Wertes innerhalb eines Kultivierungszeitraumes von 16 h bis 30 h. Nach 30 h Kultivierung zeigte sich ein erneuter Anstieg des pH-Wertes.

Die Entwicklung des pH-Wertes für eine Startzellichte von 450 Zellen/Segment zeigte einen Anstieg innerhalb der ersten 16 h Kultivierung im Segment, welcher sich in dem nachfolgenden Kultivierungszeitraum auf einen konstanten Wert einstellte.

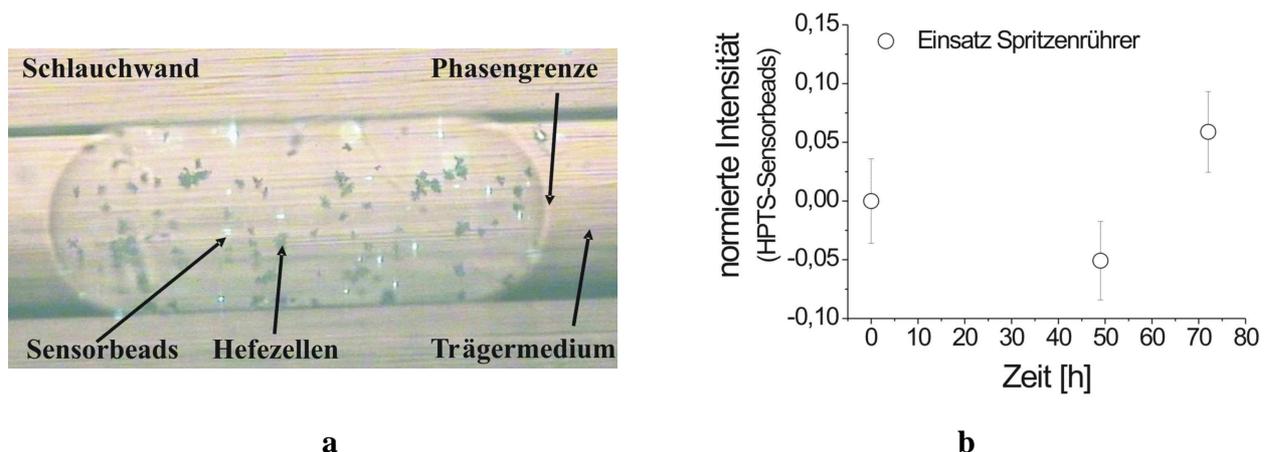
Die Referenzmessung in Falcon-Tubes mit einer pH-Elektrode zeigte den typischen pH-Wert Verlauf für die Kultivierung von *E. coli* im synthetischen Medium. Es konnte ein pH-Wert Abfall innerhalb der ersten 16 h Kultivierung bei einer Startzellichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml und keine Veränderung des pH-Wertes für  $4 \times 10^4$  Zellen/ml Startzellichte gefunden werden (Abb. 3-38, b). Der pH-Wert Abfall zeigte sich für die geringe Startzellichte erst nach 30 h Kultivierung, während für die Versuche mit einer hohen Zelldichte keine pH-Wertänderung für Kultivierungszeiten über 15 h gefunden wurde.

Der pH-Wert Abfall wird auf die Bildung von organischen Säuren bei Sauerstofflimitierung im Umgebungsmedium zurückgeführt. Bei Nährstofflimitierung kann es zu einem Verstoffwechsellern der gebildeten Säuren durch die Mikroorganismen kommen, was zu einem erneuten Anstieg des pH-Wertes führt [133]. Das Animpfen mit einer höheren Zelldichte führte in den Versuchen im Mikrofluidsegment und in der Referenzmessung zu einem früheren Auftreten der Sauerstofflimitierung und einer schnelleren Sättigung in der Wachstumsphase.

Im Vergleich mit der Referenzmethode wurden für die Messung in Mikrofluidsegmenten und synthetischem Medium viel höhere pH-Werte gefunden, welche auf das Autofluoreszenzsignal von *E. coli* zurückgeführt werden konnten. Mitgeführte Kontrollmessungen ohne Mikrobeads ermöglichten die Korrektur der Fluoreszenzintensität.

Mit der pH-Wertmessung während der Kultivierung von *E. coli* im Segment konnten unterschiedliche Stoffwechselantworten für die Kultivierung im Komplexmedium und synthetischen Medium gezeigt werden.

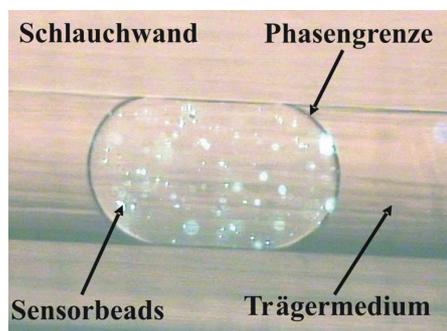
HPTS/pHEMA-Mikrobeads konnten ebenfalls für die Untersuchung der pH-Wert Entwicklung während der Kultivierung von Hefezellen im Mikrofluidsegment und synthetischem Medium adaptiert werden. Hier wurde nach 50 h Kultivierung ein Abfall des Intensitätswertes ermittelt, welcher einen pH-Wertabfall im Segment impliziert. Nach 70 h Kultivierung der Hefezellen stieg der pH-Wert in der Segmentumgebung wieder an. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit der Referenzmessung in Erlenmeyerkolben (s. Anhang 6.8).



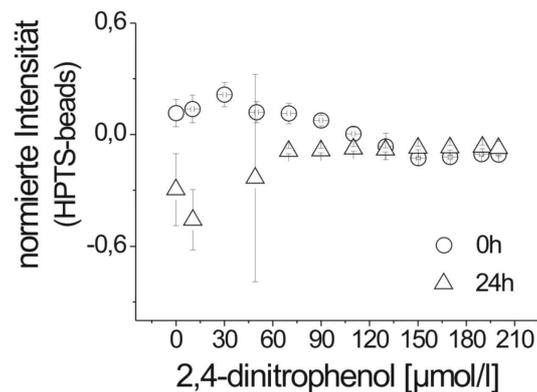
**Abb. 3-39:** Untersuchung der Stoffwechselaktivität von *S. cerevisiae* im Mikrofluidsegment. **a)** Foto Mikrobeadsignal nach 24stündiger Kultivierung von Hefezellen im Mikrofluidsegment. **b)** Fluoreszenzintensität der Mikrobeads während der Kultivierung von Hefezellen im Mikrofluidsegment.

**Toxizitätstest**

Als einen weiteren toxikologischen Endpunkt neben Wachstum und Autofluoreszenz wurde die Stoffwechselaktivität von *E. coli* in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration während der Kultivierung in Mikrofluidsegmentsequenzen untersucht. Dafür wurden HPTS/p-HEMA-Mikrobeads im Segment eingesetzt und die Veränderung der Fluoreszenzintensität analysiert (Abb. 3-40, a). Es konnten für die Positivkontrolle (nur Zellen) und 2,4-DNP Konzentrationen bis 60  $\mu\text{M}$  eine Änderung im Intensitätssignal der Mikrobeads gefunden werden (Abb. 3-40, b).



a



b

**Abb. 3-40:** Effekte von 2,4-DNP auf die Stoffwechselaktivität von *E. coli* ermittelt über die Fluoreszenzantwort von HPTS-Mikrobeads in Mikrofluidsegmenten. **a)** Fluoreszenzsignal von HPTS-Mikrobeads nach 24 h Kultivierung von *E. coli* im Segment, Durchlicht, Anregung: 450-490 nm, Emission: 515 nm. **b)** Fluoreszenzintensitäts in Abhängigkeit von der DNP-Konzentration nach 0 h und 24 h Kultivierung von *E. coli* im Mikrofluidsegment.

Dabei resultierte die Verringerung des Fluoreszenzsignals (Intensitätswerte negatives Vorzeichen) aus einer Abnahme des segmentinternen pH-Wertes während der Stoffwechselaktivität der Bakterienkultur. Für 30  $\mu\text{M}$  DNP zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle die stärkste Stoffwechselaktivität. Die Fähigkeit von *E. coli* sich an Chlorphenole zu adaptieren ist in der Literatur beschrieben [177]. Eine erhöhte Stoffwechselaktivität könnte eine mögliche Stressantwort der Bakterienzellen auf den Kontakt mit DNP sein.

Die Toxizität von Chlorphenolen ist stark pH-Wert abhängig. Mit sinkenden pH-Werten können sich verstärkt Phenolmoleküle an die Zellmembran anlagern und durch die Zellmembran diffundieren, was zu einer verstärkten Toxizität führt [171]. Es konnte gezeigt werden, dass für DNP-Konzentrationen größer 30  $\mu\text{M}$  eine zunehmende Inhibierung der Stoffwechselaktivität auftrat, wobei für DNP-Konzentrationen größer 60  $\mu\text{M}$  keine messbare Stoffwechselaktivität der Bakterienzellen gefunden werden konnte.

Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen aus den Wachstums- und Autofluoreszenzmessungen für *E. coli* (s. Kapitel 3.4.1, Abb. 3-23a).

### **Sauerstoffsensitive ptTFPP-Mikrobeads**

Die in weiterführenden Arbeiten von J. Cao<sup>b</sup> durchgeführten Messungen mit Sauerstoffsensitiven ptTFPP<sup>c</sup>-Mikrobeads in Mikrofluidsegmenten ergaben für die hier eingesetzten PTFE Schläuche ( $d_i=0,5$  mm,  $d_a=1,6$  mm und  $d_w=0,55$  mm) Diffusionszeiten für die Gleichgewichtseinstellung im Segment zwischen 150-200 min (s. Anhang 6.9, a). Der theoretisch ermittelte Massentransport für Sauerstoff durch den PTFE-Schlauch und die maximale Sauerstoffzehrung bei Annahme eines optimalen exponentiellen Wachstums während der Kultivierung von *E. coli* in Mikrofluidsegmenten ist in Anhang 6.9 a,b dargestellt.

In Martin et al. ist der theoretisch überschlagene Sauerstoffverbrauch während der exponentiellen Wachstumsphase im Mikrofluidsegment mit 3,8 ng nach 3,3 h Kultivierung angegeben, was einen vollständigen Sauerstoffverbrauch im Mikrofluidsegment bei einer Löslichkeit von Sauerstoff von 7 mg/l bei 37°C impliziert [183]. Da die Bakterienzellen in diesem Wachstumsstadium mehr Sauerstoff verbrauchen als max. an Sauerstoff durch den Schlauch diffundieren kann, ist das Auftreten einer Sauerstofflimitierung bereits nach 3 ½ Stunden Kultivierung in 500 nl Mikrofluidsegmenten und PTFE-Schlauch zu erwarten.

Die Ergebnisse aus den theoretischen Betrachtungen konnten durch die Messung des Sauerstoffpartialdruckes mit pt-TFPP-Mikrobeads im Mikrofluidsegment untermauert werden (s. Anhang 6.9, Abb. 6-17). Für die Kultivierung von *E. coli* im Mikrofluidsegment und PTFE-Schlauch zeigte sich eine Sauerstofflimitierung nach 5 h, wobei ein Wechsel vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel von *E. coli* induziert wird (s. Anhang 6.9, Abb. 6-17 a).

Die Versuche mit *Chlorella vulgaris* und dem rein aerob stoffwechselnden Bodenbakterium *Arthrobacter globiformis*<sup>d</sup> zeigten, dass die Gaspermeabilität durch den PTFE-Schlauch nicht ausreichend für eine Kultivierung im Segment ist. Hier führte der Einsatz von FEP-Schläuchen zu einer erfolgreichen Kultivierung in Mikrofluidsegmenten (s. Anhang 6.9, Abb. 6-17 b).

Die Gaspermeabilität und die Sauerstofftransferrate für verschiedene Schlauchmaterialien sind in Anhang 6.9, Tabelle 6-12 zusammengestellt. Neben PDMS konnte für den FEP-Schlauch ( $d_i=0,4$  mm,  $d_w=0,2$  mm) die höchste Gaspermeabilität gefunden werden.

---

<sup>b</sup> OPTIMI-Projekt, Durchführung J. Cao, Fachgebiet Physikalische Chemie/MRT, TU Ilmenau

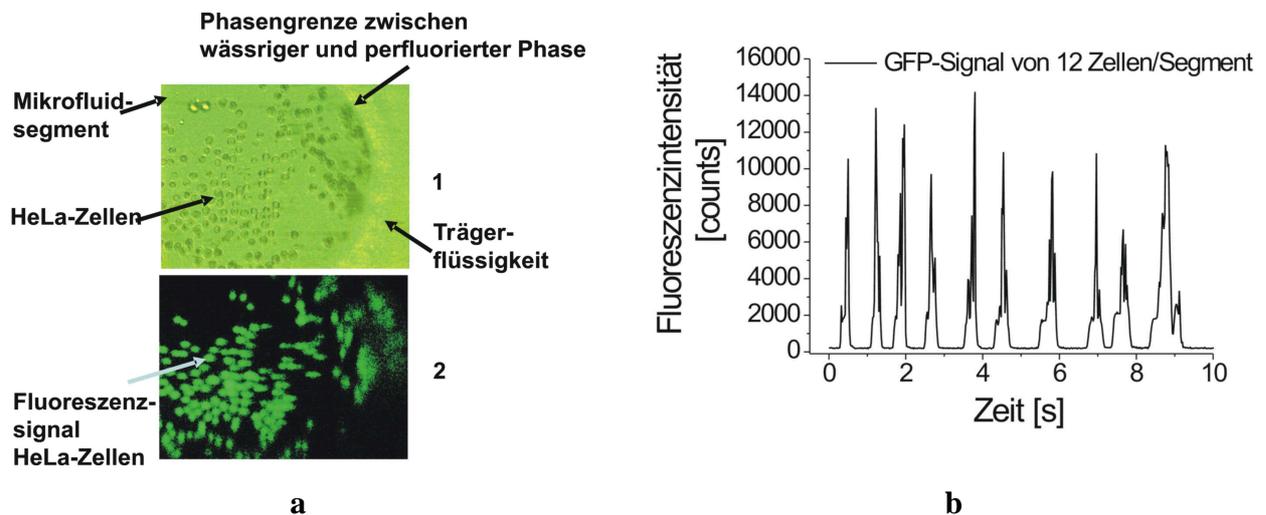
<sup>c</sup> Platinum tetrakis (pentafluorphenyl) porphyrin immobilisiert auf polystyrol polymerin

<sup>d</sup> OPTIMI-Projekt, Durchführung J. Cao, Fachgebiet Physikalische Chemie/MRT, TU Ilmenau

### 3.6 Antwortverhalten von DOX-induzierten HeLa-Zellen und Vitalitätsstudien im Mikrofluidsegment

#### 3.6.1 Signalerfassung DOX-induzierter HeLa-Zellen

Die Einbringung von HeLa-Zellen in die Mikrofluidsegmente gelang ohne Schädigung (Abb. 3-41, 1). Erste fluorimetrische Messungen des GFP-Signals der HeLa-Zellen zeigten auch bei geringen Zelldichten pro Segment gut messbare Intensitätssignale (Abb. 3-41, 2). In der dargestellten Segmentsequenz kommt es zum Auftreten von Intensitätsspitzen, welche zu Messwertschwankungen und damit höheren Messfehler führen. Mit dem optimierten Mikrodurchfluss-Fluorimeter<sup>a</sup> konnten Intensitätsspitzen stark reduziert bis ganz vermieden werden.



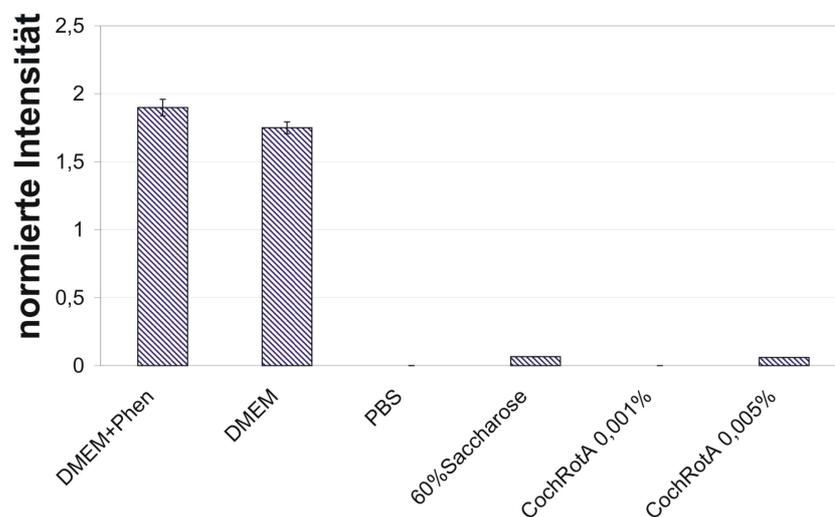
**Abb. 3-41:** GFP exprimierende HeLa-Zellen im Mikrofluidsegment. **a)** Mikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen im Mikrofluidsegment (1) im Hellfeld, (2) Fluoreszenzbild (484 nm Anregung, 510 nm Emission). **b)** Ausschnitt einer Segmentsequenz, GFP-Signal DOX-induzierter HeLa-Zellen.

Die hohe Eigenfluoreszenz des Mediums mit und ohne Zusatz von Phenolrot machte das Überführen der Zellen in PBS-Puffer notwendig (Abb. 3-42). Es zeigte sich, dass die DOX-induzierten Zellen für mehrere Stunden im Mikrofluidsegment und PBS-Puffer ohne eine signifikante Änderung des GFP-Signals gehalten werden konnten. Aufgrund der fehlenden Aufwuchsflächen für die adhären wachsenden Humanzellen und die Überführung in PBS-Puffer konnten keine Wachstumsstudien durchgeführt werden. Vielmehr lag ein Zellsystem zugrunde,

<sup>a</sup> Entwickelt und optimiert von J. Cao, [128] Cao, J. "Diplomarbeit, Nanodiagnostik in Fluidsystemen: Optische pH-Auslese in Nanoliterfluidsegmenten," 2008.

mit welchem Untersuchungen von Signal-Antwortverhalten direkt nach Stimulierung des Genexpressionssystems möglich wurden.

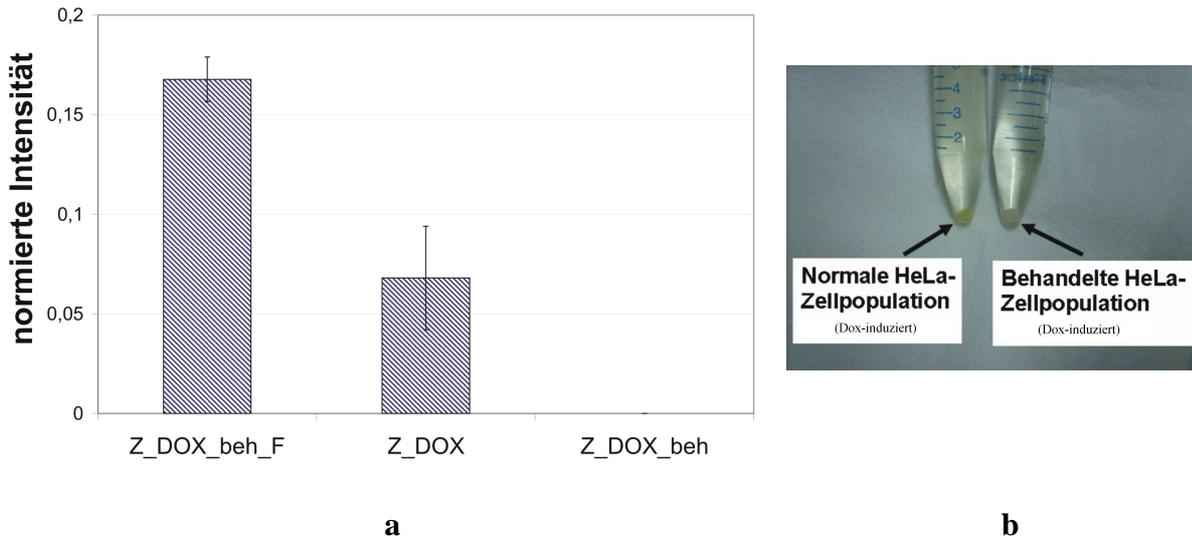
Die homogene Verteilung der Humanzellen im Mikrofluidsegment sollte durch Dichteanpassung erreicht werden. Aus Vorversuchen<sup>b</sup> wurde 60%ige Saccharoselösung als am besten geeignet für die Dichteanpassung befunden (s. Anhang 6.10). Für kurze Versuchszeiten wurde keine Beeinträchtigung der Zellen durch die Saccharoselösung beobachtet. Die Untersuchung der Verteilung ohne Zusatz von Saccharose zeigte ebenfalls eine gute Verteilung der Zellen im Mikrofluidsegment. Für die Vitalitätsstudien wurde deshalb auf die Einstellung einer angepassten Dichte verzichtet. Einer eventuellen Verstärkung der Zellschädigung sowie einer zusätzliche Beeinträchtigung des Genexpressionssystems konnte damit entgegengewirkt werden.



**Abb. 3-42:** Eigenfluoreszenz von Nährmedium und Probenkomponenten im Mikrofluidsegment

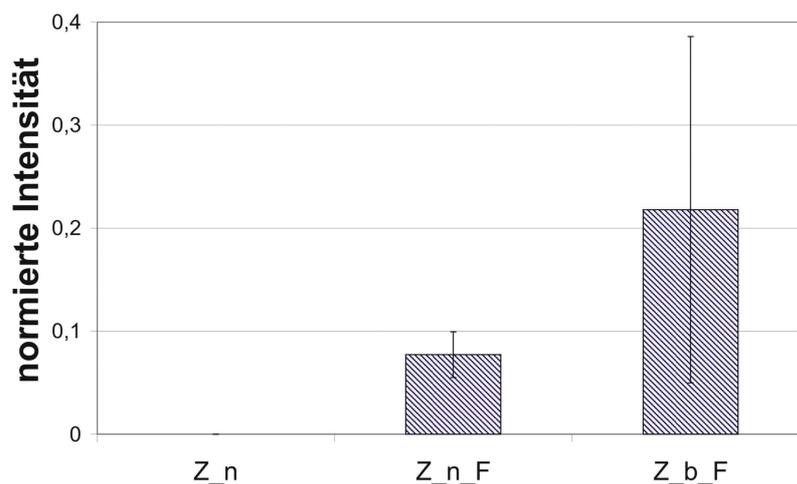
Vorversuche zur Untersuchung der Fluoreszenzantwort von DOX-induzierten Zellen sowie der Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes für nicht DOX-induzierte Zellen ermöglichten die Etablierung des Systems für die anschließenden Vitalitätstests. Die Analyse von Segmentsequenzen mit bis zu 100 Segmenten lieferte gut reproduzierbare Ergebnisse. Die Schädigung der DOX-induzierten Zellen durch Wärmebehandlung konnte über den Verlust des GFP-Signals fluorimetrisch verfolgt werden (Abb. 3-43).

<sup>b</sup> Versuchsdurchführung P. Kiesel, DPZ Göttingen.



**Abb. 3-43:** Fluoreszenzintensität DOX-induzierter HeLa-Zellen analysiert in Mikrofluidsegmenten. **(a)** Aus den einzelnen Segmentsequenzen gemittelt GFP-Signal DOX-induzierter Zellen ohne Behandlung (Z-DOX), nach Behandlung durch Frieren, Tauen (Z\_DOX\_beh), gefärbte, behandelte Zellen (Z\_DOX\_beh\_F). **(b)** Photo von unbehandelten (normalen) und behandelten HeLa-Zellen in Falcon-Tubes.

Die Färbung von nicht DOX-induzierten HeLa-Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff ermöglichte die Unterscheidung zwischen unbehandelten, nicht gefärbten Zellen, unbehandelten, gefärbten Zellen und behandelten, gefärbten Zellen (Abb. 3-44). Im Gegensatz zu den Versuchen mit DOX-induzierten Zellen wurden größere Messwertschwankungen zwischen den einzelnen Segmentsequenzen für die behandelten HeLa-Zellen gefunden.



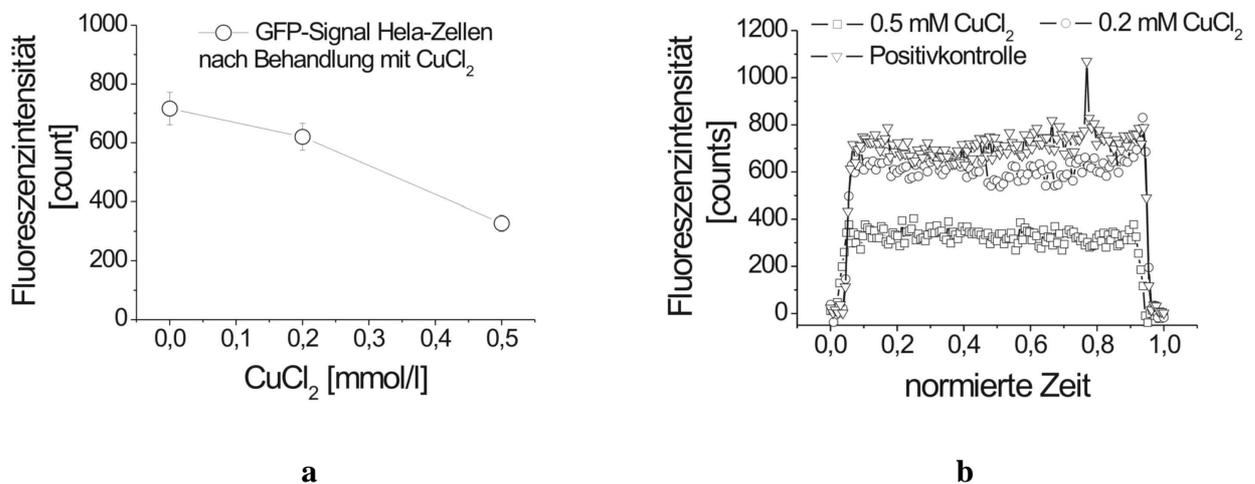
**Abb. 3-44:** Gemittelte Fluoreszenzintensität von mit Live/Dead Cell Stain Kit (Invitrogen) gefärbten nicht DOX-induzierten HeLa-Zellen im Mikrofluidsegment. Untersucht wurden unbehandelte Zellen (Z\_n), unbehandelte, gefärbte Zellen (Z\_n\_F) und behandelte, gefärbte Zellen (Z\_b\_F).

Mit beiden Methoden konnte gezeigt werden, dass eine Unterscheidung von gesunden und geschädigten Zellen durch Fluoreszenzmessung in Mikrofluidsegmenten möglich ist. Mit dem Einsatz von DOX-induzierten Zellen könnten Einflüsse auf das Genexpressionsystem und damit auf die Proteinsynthese gewonnen werden, wohingegen der Einsatz von reaktiven Fluoreszenzfarbstoffen die Analyse von membranschädigenden Eigenschaften von Testsubstanzen erlaubt.

### 3.6.2 Vitalitätsstudien

#### *Untersuchung der Wirkung von CuCl<sub>2</sub> auf DOX-induzierte HeLa-Zellen*

Schwermetallionen können, z.B. aufgrund der hohen Affinität zu Thiolgruppen, Stoffwechselprozesse in der Zelle beeinflussen. Für die Vitalitätsstudien mit DOX-induzierten HeLa-Zellen wurde die Wirkung von Kupfer(II)-Ionen auf die GFP-Expriemierung untersucht. In Abb. 3-45 ist die Abhängigkeit des GFP-Signals von der Kupferchlorid-Konzentration nach 2 h Inkubation im Mikrofluidsegment dargestellt. Im Vergleich zur Positivkontrolle konnte für 0,2 mmol/l CuCl<sub>2</sub> nur eine minimale Abweichung des Intensitätssignals gefunden werden.



**Abb. 3-45:** Antwortverhalten GFP-exprimierender HeLa-Zellen im Mikrofluidsegment **a)** Gemittelte GFP-Werte der HeLas nach Behandlung mit 0,2 mmol/l und 0,5 mmol/l CuCl<sub>2</sub>, 10 Segmente pro Sequenz, ca. 30 Zellen pro Segment. **b)** Gegenüberstellung der Einzelsegmente.

Für eine Konzentration von 0,5 mmol/l CuCl<sub>2</sub> zeigte sich ein ca. 50%ige Reduzierung des Intensitätssignals. Die Referenzversuche<sup>c</sup> mit HeLa-Zellen zeigten erst für 2 mM CuCl<sub>2</sub> ein

<sup>c</sup> Durchgeführt von P. Kiesel, DPZ Göttingen.

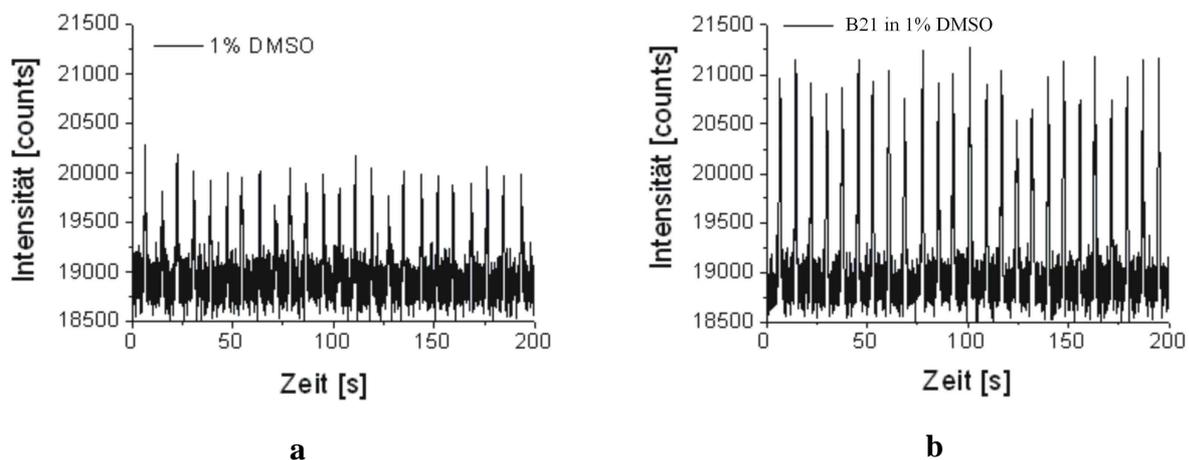
beginnendes Absterben der Zellen nach 2stündiger Kultivierung in Kulturflaschen. Nach 24stündiger Inkubation von HeLa-Zellen konnte eine Reduzierung des GFP-Signals um 60 % nachgewiesen werden (s. Anhang 6.11).

In Hultberg et al. sind die Effekte von Metallionen auf den Thiolstoffwechsel von HeLa-Zellen beschrieben [184]. Hier wurden Änderungen im Thiolstoffwechsel bereits für mikromolare Konzentrationen an Kupferionen gefunden. Ursache für die im Vergleich zu den Referenzversuchen intensiviertere Wirkung von Kupfer auf das GFP Signal der HeLa-Zellen im Mikrofluidsegment könnten die reduzierten Kultivierungsbedingungen (PBS-Puffer, CO<sub>2</sub>-Permeabilität der Schläuche) sein.

### *Untersuchung der Wirkung eines Dihydropyrimidin-Derivates (B21) auf die Vitalität von nicht DOX-induzierten HeLa-Zellen*

Die Wirkung eines Dihydropyrimidin-Derivates<sup>d</sup> auf die Vitalität von HeLa-Zellen konnte im Mikrofluidsegment untersucht werden. Einige Verbindungen, die zur chemischen Gruppe der Dihydropyrimidine zählen, wie z.B. das Monastrol, werden bereits in der Medizin zur Behandlung von Tumorzellen eingesetzt [185,186].

Es wurden Segmentsequenzen mit einer hoher Reproduzierbarkeit des Fluoreszenzsignals der Einzelsegmente gefunden (Abb. 3-46).

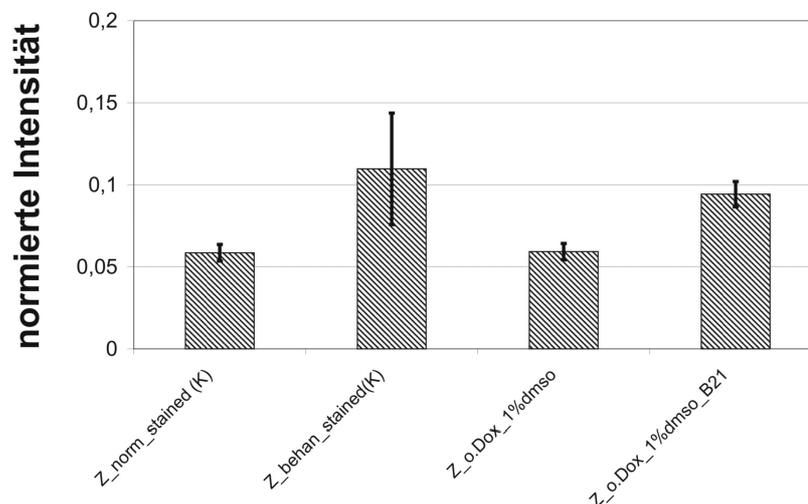


**Abb. 3-46:** Intensitätssignal von mit Fluoreszenzfarbstoff markierten nicht DOX-induzierten HeLa-Zellen im Mikrofluidsegment. **a)** Segmentsequenz für HeLa-Zellen behandelt mit 1 % DMSO. **b)** Segmentsequenz für HeLa-Zellen behandelt mit 0,01 % B21 in 1 % DMSO.

<sup>d</sup> Synthese S. Singh, Zentrum für Innovationskompetenz (ZIK), TU Ilmenau

Der Wirkstoff B21 (0,01 %) zeigte ein deutlich erhöhtes Fluoreszenzsignal gegenüber den Kontrollen, was ein Hinweis auf eine Membranschädigung der Zellen ist.

In Abb. 3-47 sind die gemittelten Fluoreszenzwerte der Segmentsequenzen für die Kontrollen (Zellen unbehandelt, gefärbt, Zellen behandelt, gefärbt, 1% DMSO) und der Probe (Wirkstoff B21) dargestellt. Es zeigte sich, dass 1 % DMSO eine vergleichbare Fluoreszenzintensität wie die gefärbten HeLa-Zellen einer gesunden Population aufwies. DMSO hatte also keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Die Behandlung der Zellen durch Frieren und Tauen zeigte ein stärkeres Intensitätssignal als die Behandlung der Zellen mit B21. Dies macht deutlich, dass die Zellen nach Behandlung mit B21 zwar Schädigungen aufwiesen, welche aber zu keiner vollständigen Färbung im Zellinneren führten.



**Abb. 3-47:** Wirkung von 0,01 % B21 in 1 % DMSO auf die Vitalität von HeLa-Zellen. Ermittlung über Fluoreszenzfärbung (Live/Dead Fixable Cell Stain Kit) der mit Wirkstoff behandelten Zellpopulationen.

Diese Ergebnisse konnten mit den Referenzversuchen<sup>e</sup> in Kulturflaschen bestätigt werden (s. Anhang 6.12). Im Gegensatz zur Behandlung der Zellen mit B21, wo die meisten Zellen eine nicht homogene Färbung aufwiesen, zeigten die mikroskopischen Bilder der HeLa-Zellen nur vereinzelt gefärbte Zellen nach Behandlung mit 1 % DMSO. Es ist bekannt, dass Dihydropyrimidin-Derivate wie Monastrol den mitotischen Spindelapparat blockieren und dadurch zelluläre Prozesse stören [186]. Dieser Wirkmechanismus konnte mit den hier durchgeführten Versuchen bestätigt werden.

Die Effekte eines neu synthetisierten Krebswirkstoffes auf Tumorzellen konnten in Mikrofluidsegmenten untersucht werden. In zukünftigen Untersuchungen soll die Färbung der

<sup>e</sup> Durchführung der Referenzversuche von P. Kiesel, DPZ Göttingen.

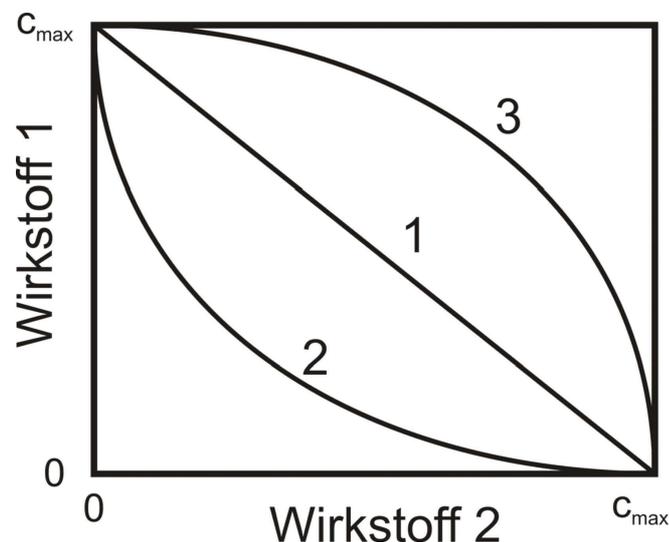
Zellen nach Behandlung mit den Testsubstanzen direkt im Mikrofluidsegment durchgeführt werden. Damit wird es möglich, schnelle Vitalitätstests mit Humanzellen in einer stark volumenreduzierten Umgebung über Fluoreszenzfarbstofffärbung durchzuführen.

### 3.7 Kombinationscreenings binärer Gemische im Mikrofluidsegment am Modellorganismus *E. coli*

#### *Kombinationswirkung binärer Gemische*

In der Toxikologie werden die zwei Vorhersage-Konzepte “Konzentrationsadditivität“ (Loewe [31]) und “unabhängige Wirkung“ (Bliss [32]) für die Bewertung von Kombinationswirkungen als allgemein begründet angesehen. Im Falle der Konzentrations-Additivität wird von ähnlichen Wirkweisen der kombinierten Substanzen (ähnliche Dosis-Wirkungskurven) ausgegangen. Es wird angenommen, dass der Effekt des Stoffgemisches bei Ersatz einer Substanz durch eine gleich wirksame konstant bleibt. Das Konzept der unabhängigen Wirkung geht dagegen von der Annahme unähnlicher Wirkung in einem Stoffgemisch und damit von der Auslösung gemeinsamer Effekte über unterschiedliche Wirkketten aus.

In der Literatur gibt es eine Vielzahl von Modellen zur Beschreibung von Kombinationwirkungen [42]. Für die Beschreibung binärer Gemische kann das Modell der Isobolographie angewendet werden. Die prinzipiellen isobolographischen Kurvenverläufe für additive, synergistische und antagonistische Effekte sind in Abb. 3-48 dargestellt [49,187].



**Abb. 3-48:** Mögliche isobolographische Kurvenverläufe binärer Mischungen für den Fall der additiven Wirkung (Effektsummation) (1), der verstärkten Wirkung (synergistisch) (2) und der Abschwächung der Wirkung (antagonistisch) (3).

Das Datendesign für die hier durchgeführten Versuche wurde an das Konzept der Konzentrationsadditivität angelehnt, unabhängig von der vorliegenden Wirkweise der

Einzelsubstanzen. Die Darstellung der Ergebnisse aus den Untersuchungen der binären Gemische konnte in isobolographischen Diagramme veranschaulicht werden. Jeder Datenpunkt auf der Isobole repräsentiert den gleichen Wert des betrachteten Endpunktes (Optische Dichte, Autofluoreszenzintensität). Der Verlauf spiegelt die Abweichung der Wirkung der Substanzen im Gemisch im Vergleich zum Erwartungswert aus den Dosis-Wirkungskurven der Einzelsubstanzen wider. In den nachfolgenden Kapiteln werden die Ergebnisse zur Untersuchung der Kombinationswirkung der binären Gemische Metallnanopartikel und Phenol, Metallnanopartikel und Schwermetall, Phenol und Schwermetall sowie Phenol und Phenol diskutiert.

### 3.7.1 Binäres Gemisch von Metallnanopartikeln und Xenobiotika

#### *Charakterisierung der Metallnanopartikel*

Die Wirkung von Goldnanopartikeln (AuNP) und Silbernanopartikeln (AgNP)<sup>f</sup> in Kombination mit verschiedenen Umweltschadstoffen auf das Wachstum und die Stoffwechselaktivität von *E. coli* im Mikrofluidsegment konnten gezeigt werden.

Die Größenverteilung der Metallnanopartikel wurde durch DCS-Messung ermittelt (s. Anhang 6.13). Die Partikelgrößen, Halbwertsbreiten und Ausgangskonzentrationen der Metallnanopartikel sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

**Tabelle 3-2:** Partikelgröße und Ausgangskonzentration der hergestellten Metallnanopartikel. **a, b** kennzeichnen die zwei unterschiedlichen Partikelgrößen der Metallnanopartikel, welche mit DCS-Messung gefunden wurden.

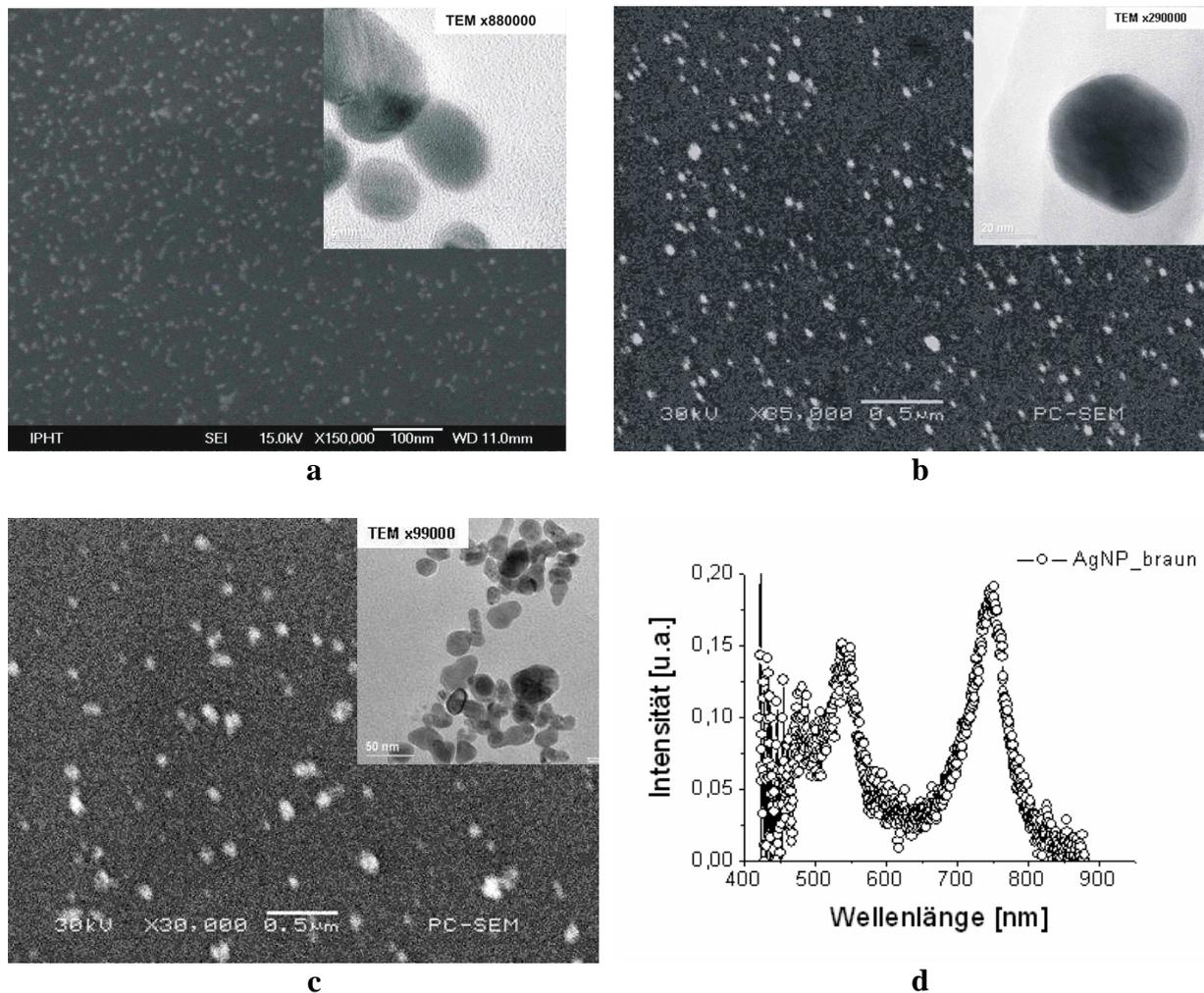
| Metallnanopartikel | Partikelgröße <sup>a</sup> /<br>/Halbwerts-<br>breite<br>[nm] | Partikelgröße <sup>b</sup> /<br>/Halbwerts-<br>breite<br>[nm] | Anfangskonzentration der<br>Metallnanopartikel<br>(bezogen auf Partikelgröße a)<br>[pM] |
|--------------------|---|---|---|
| AuNP               | 30/11,5   | 3/0,3   | 10  |
| AgNP (braun)       | 21,2/9  | 2,8/1,9   | 0,15  |
| AgNP (gelb)        | 22,5/23,8   | 4,5/3,8   | 61,68   |

Bei den untersuchten Metallnanopartikeln kristallisierten sich zwei Größenverteilungen heraus. Für die in der Anzahl dominierenden Nanopartikel wurden Partikeldurchmesser von

<sup>f</sup> Es wurden zwei verschiedene Chargen an Silbernanopartikeln untersucht, die sich im Herstellungsprozess nur in einem Filtrationsschritt unterschieden. Für die Silbernanopartikellösung mit Filtrationsschritt ergab sich eine gelbe Färbung (AgNP\_gelb) und die Silbernanopartikellösung ohne Filtration zeigte eine braune Färbung (AgNP\_braun).

3 nm bis 4 nm bestimmt, wobei die AgNP\_gelb und die AgNP\_braun hohe Halbwertsbreiten im Vergleich zu den AuNP aufwiesen.

Die Partikelgrößen mit dem höchsten Massenanteil wurden bei 30 nm für die Goldnanopartikel und 20 nm für die Silbernanopartikel ermittelt. Für die Konzentrationsberechnung der Stammlösungen an Nanopartikeln wurde die Partikelgröße mit dem größten Massenanteil zugrunde gelegt (s. Anhang 6.14). Zur weiterführenden Charakterisierung der Metallnanopartikel wurden REM- und TEM-Messungen sowie optische Dunkelfeldmessungen durchgeführt (Abb. 3-49).



**Abb. 3-49:** Charakterisierung der Größe und Form von Metallnanopartikeln. **a)** REM- und TEM-Bilder von Goldnanopartikeln (Bild: L. Abahmane). **b)** REM-Bild Silbernanopartikel\_gelb. **c)** REM- und TEM-Bilder Silbernanopartikel\_braun. **d)** Oberflächenplasmonenresonanz eines einzelnen Silbernanopartikels (AgNP\_braun), Streuspektrum der Dunkelfeldmessung.

Es konnten annähernd sphärische Partikel für die AgNP\_gelb und die AuNP gefunden werden. Die TEM-Bilder von AgNP\_braun zeigten eine Mischung aus unterschiedlichen Formen an Partikeln. Es konnten neben sphärischen Partikeln auch Partikel mit stäbchenartiger Form gefunden werden. Diese Ergebnisse konnten mit der Dunkelfeldmessung an einzelnen

Nanopartikeln bestätigt werden. Die nicht-sphärischen Formen verursachten hier das Auftreten von zwei Intensitätsbanden des Streuspektrums, welche bathochrom zur typischen Oberflächenplasmonen-Absorptionsbande von 410 nm für sphärische Partikel verschoben waren.

### ***Interaktion zwischen Nährmedium (synthetisches Medium) und Nanopartikeln ohne Anwesenheit von Zellen***

Gold- sowie Silbernanopartikel bilden im Normalfall stabile kolloidale Lösungen. Die Stabilität hängt aber von der Oberflächenladung der Partikel ab, welche durch Liganden, pH-Wert und Ionenstärke der Lösung beeinflusst werden kann. Aus diesem Grund wurde der Effekt des synthetischen Mediums auf die Nanopartikellösung untersucht.

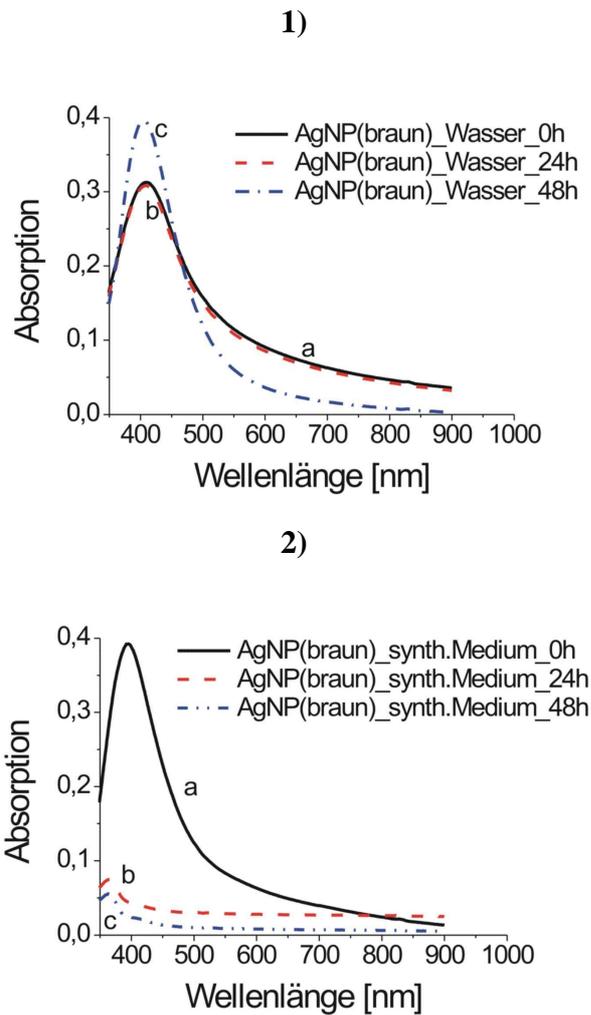
Eine Änderung der kolloidalen Lösung spiegelt sich in der Änderung des Absorptionsspektrums wider. Eine kolloidale Lösung an Goldnanopartikeln weist ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 530 nm auf, während Silbernanopartikel ein Absorptionsmaximum bei 410 nm besitzen. Beide Banden sind vergleichbar schmal und werden durch die typische Plasmonenabsorption der Metallnanopartikel verursacht.

Alle Proben zeigten eine Veränderung der optischen Spektren mit der Zeit (s. Anhang 6.15). In destilliertem Wasser (Referenzmessung) zeigten die AgNP\_braun einen leichten Abfall der Absorption bei 410 nm nach 24 h und einen leichten Anstieg nach 48 h Inkubation bei 37 °C (Abb. 3-50, 1). Es konnte aber keine Verschiebung des Absorptionsmaximums gefunden werden.

Bei der Mischung von AgNP\_braun mit synthetischem Medium zeigten sich ein starker Abfall der Absorption und eine hypsochrome Verschiebung der Absorptionsbande nach 24 h und 48 h Inkubation (Abb. 3-50, 2). Es konnte eine neue, aber schmalere Bande bei 350 nm gefunden werden.

Die Referenzmessung von Silbernanopartikel AgNP\_gelb in Wasser zeigte ebenfalls eine leichte Abnahme der Absorption, aber keine Verschiebung des Absorptionsmaximums. Beim Einsatz des synthetischen Mediums zeigte sich direkt nach Mischung mit den AgNP\_gelb eine hypsochrome Verschiebung der Absorptionsbande nach 350 nm, welche über den Inkubationszeitraum von 48 h stabil blieb (s. Anhang 6.15, 1-1, 1-2 ).

Die Absorptionsbande der kolloidalen Lösung an Goldnanopartikeln wurde sofort nach Mischung im synthetischen Medium beeinflusst (s. Anhang 6.15, 2-1,2-2). Es zeigte sich eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums mit einer breiten Absorptionsbande. Das deutete auf eine elektronische Änderung der Ligandenhülle hin und führte zu Aggregation der Goldnanopartikel.



**Abb. 3-50:** UV/VIS Absorptionsspektrum von Silbernanopartikeln in Aqua dest. und synthetischem Medium. 1) Absorptionsspektrum von AgNP\_braun in Wasser während der Inkubation für 48 h bei 37°C, a) 0 h, b) 24 h, c) 48 h. 2) Absorptionsspektrum von AgNP\_braun im synthetischen Medium während der Inkubation für 48 h bei 37°C, a) 0 h, b) 24 h, c) 48 h.

Das Verhalten der Nanopartikel nach 24 h und 48 h kann durch Aggregation, Sedimentation und Adsorption an der Oberfläche der Küvettenwand interpretiert werden.

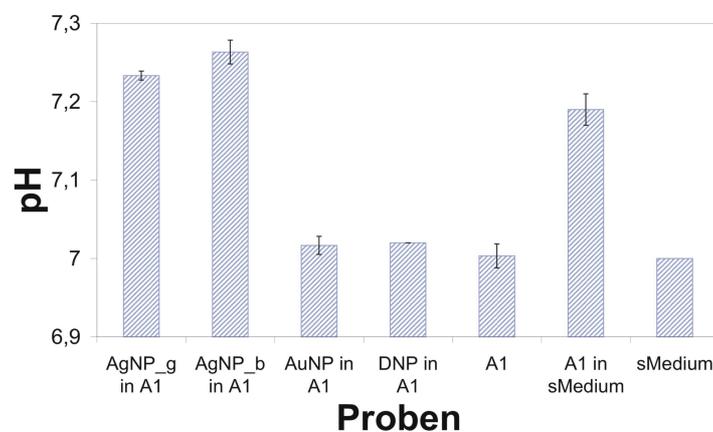
Es ist bekannt, dass Aggregation häufig mit einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums einhergeht. Die Sedimentation und Wandadsorption führen zu einer Verringerung der Absorption der kolloidalen Lösung.

Die hypsochrome Verschiebung der Absorptionsbanden bei den getesteten Silbernanopartikeln kann auf eine Oxidation der Nanopartikel zurückgeführt werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Mischung von Metallnanopartikeln mit synthetischem Medium eine Größenänderung der Partikel hervorruft und damit zu einer Veränderung der Effektivkonzentrationen der Ausgangslösungen führt. Die angegebenen

Nanopartikelkonzentrationen können deshalb nur als grobe Richtwerte in den toxikologischen Tests angesehen werden.

Um Aussagen über die Pufferleistung des Nährmediums zu erhalten, wurde das Nährmedium mit den Testsubstanzen gemischt und der pH-Wert ermittelt. Die Versuche in 15 ml Falcon-Tubes wurden so angelegt, dass die Zusammensetzung und die höchste im Segment eingestellten Konzentration der Testsubstanzen repräsentiert wurden. Es zeigte sich, dass der pH-Wert des Mediums mit oder ohne Zugabe der Testsubstanzen innerhalb eines pH-Bereiches von 7.0 bis 7.3 lag. Es konnte keine starke pH-Wert Veränderung im Medium für die getesteten Substanzen gefunden werden (Abb. 3-51).



**Abb. 3-51:** Pufferleistung des synthetischen Nährmediums für unterschiedliche Testsubstanzen, AgNP\_g: Silbernanopartikel (gelb) in Ansatz 1, AgNP\_b: Silbernanopartikel (braun) in Ansatz 1, AuNP: Goldnanopartikel in Ansatz 1, DNP: 2,4-Dinitrophenol in Ansatz 1, A1: reiner Ansatz 1 (Zellsuspension, synthetisches Medium, Indikatorfarbstoffe), A1 in sMedium: Ansatz 1 verdünnt mit synthetischen Medium, sMedium: synthetisches Medium

Damit konnte gezeigt werden, dass direkt nach Erzeugung der Segmente eine Beeinträchtigung der Stoffwechselaktivität der Organismen durch einen pH-Wert Effekt ausgeschlossen werden kann.

### ***Binäres Gemisch Metallnanopartikel und Phenol***

Phenole sind allgemein als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung bekannt. Sie sind in der Lage, Protonen entgegen dem elektrochemischen Protonengradienten zu transportieren und können damit die ATP-Synthese und den Nährstofftransport unterbinden sowie zu einer Änderung des normalen pH-Wertes des Cytoplasmas führen [177]. Als Vertreter der Phenole wurden für diese Versuche 2,4-Dinitrophenol (DNP) und 2,4-Dichlorphenol (DCP) ausgewählt.

2,4-Dichlorphenol (DCP) und 2,4-Dinitrophenol finden weit verbreitet Einsatz als Pestizide, wobei 2,4-DCP ebenfalls eine endokrine Aktivität aufweist [171].

In Anlehnung an die Literaturangaben zur Wirkung von DNP und DCP wurde von einem ähnlichen Wirkmechanismus für die beiden Phenole ausgegangen und eine ähnliche Wirkweise für die Kombination mit anderen Schadstoffen erwartet.

Metallnanopartikel haben in den letzten Jahren aufgrund ihrer physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften enorm an Interesse gewonnen [188]. Die Anwendungsgebiete von Metallnanopartikeln sind sehr verschieden, so finden sie Verwendung in der Pharma- und Kosmetikindustrie, in der Optoelektronik oder der Biomedizin. Sie werden in großen Mengen industriell hergestellt und gelangen somit auch in die Nahrungskette. Deshalb ist das Interesse an der Untersuchung der Wirkung von Nanopartikeln auf die Umwelt stark gestiegen [189,190].

Es ist nur sehr wenig über die Kombinationswirkung von Nanopartikeln mit anderen toxischen Stoffen bekannt und dieses Kenntnis beschränkt sich vorwiegend auf die Interaktion der Nanopartikel untereinander [191]. Es gibt nur vereinzelt Studien zur Kombinationswirkung von Nanopartikeln und organischen Xenobiotika [192]. Für den Modellorganismus *E. coli* sind nach bestem Wissen keine Studien bekannt, in welchen die Kombinationswirkung von Metallnanopartikeln und Xenobiotika untersucht wurde und stellte eine große Motivation für diese Arbeiten dar.

Ziel dieser Teilarbeit war es, Aussagen über die Interaktion von Gold- und Silbernanopartikeln mit Cu(II)-Ionen, DCP und DNP zu treffen und die Wirkweisen untereinander zu vergleichen. Wirkmechanismen können mit diesen Versuchen allerdings nicht aufgeklärt werden.

### ***Goldnanopartikel in binärer Mischung mit 2,4-Dinitrophenol***

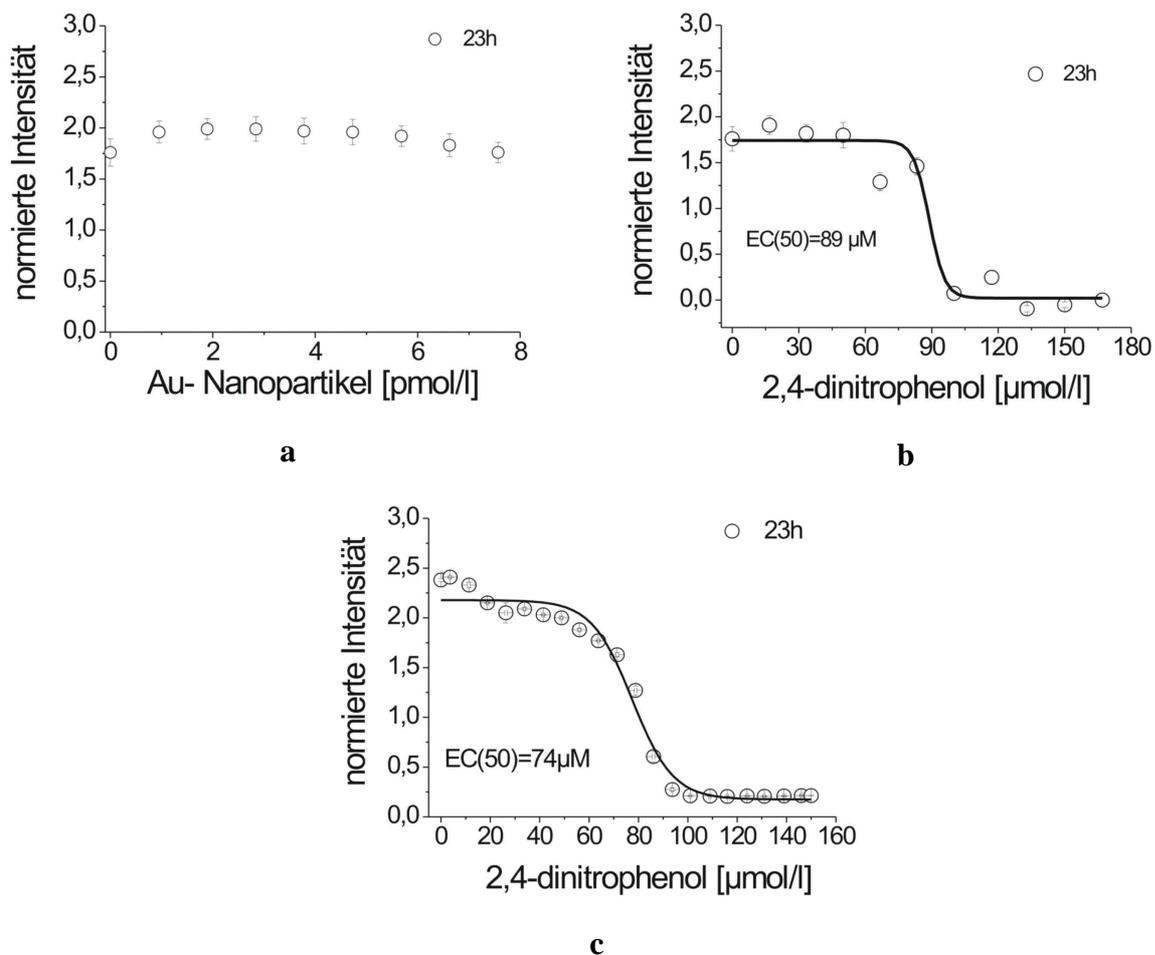
Goldnanopartikel werden für verschiedene biomedizinische Zwecke eingesetzt [193]. Aufgrund der einheitlichen plasmonischen Eigenschaften und der einfachen Immobilisierbarkeit der Partikeloberfläche mit unterschiedlichen Targetmolekülen ist das Interesse an Goldnanopartikeln für diagnostische Anwendungen in den letzten Jahren stark gestiegen [194,195].

In der Literatur wird metallisches kolloidales Gold meist als bio-inert beschrieben [196]. Andere wenige Studien zeigten, dass Goldnanopartikel durchaus pharmazeutische Aktivität aufweisen und der Umgang mit metallischen Goldnanopartikeln stärker hinterfragt werden sollte [197].

Mit dieser Motivation sollten detaillierte Studien in Mikrofluidsegmenten zur Wirkung von Goldnanopartikeln durchgeführt werden. Im Speziellen sollte die Frage geklärt werden, welche Wirkung Gold in Form von Nanopartikeln in Anwesenheit von Umweltschadstoffen verursacht.

Dafür wurden die Effekte von Goldnanopartikeln in Anwesenheit von 2,4-Dinitrophenol (DNP) als ein Vertreter der zellschädigenden aromatischen Verbindungen getestet. Es konnte ein 2-dimensionaler Konzentrationsraum zwischen 0 bis 10 pM Goldnanopartikelkonzentration und 0 bis 150  $\mu\text{M}$  DNP-Konzentration durch eine Segmentsequenz mit 500 gut voneinander getrennten Segmenten abgedeckt werden.

Zusätzlich zur Untersuchung der Effekte binärer Mischungen wurde die Wirkung der Einzelsubstanzen in Mikrofluidsegmenten untersucht. Dafür wurden Einzelwirkungsscreenings (1-dimensionale Screenings) durchgeführt sowie vergleichend die Einzelwirkung direkt aus den zweidimensionalen Screenings gewonnen (Abb. 3-52).



**Abb. 3-52:** Einzelwirkung von Goldnanopartikel und 2,4-Dinitrophenol auf die Stoffwechselaktivität von *E. coli*. **a)** Dosis-Wirkungskurve von AuNP nach 23 h Kultivierung von *E. coli* im Segment, Datenwerte aus den 2-dimensionalen Screening. **b)** Dosis-Wirkungskurve von 2,4-DNP nach 23 h Kultivierung von *E. coli* im Segment, Datenwerte aus den 2-dimensionalen Screening. **c)** Dosis-Wirkungskurve von 2,4-DNP nach 23 h Kultivierung von *E. coli* im Segment, Datenwerte aus dem 1-dimensionalen Screening.

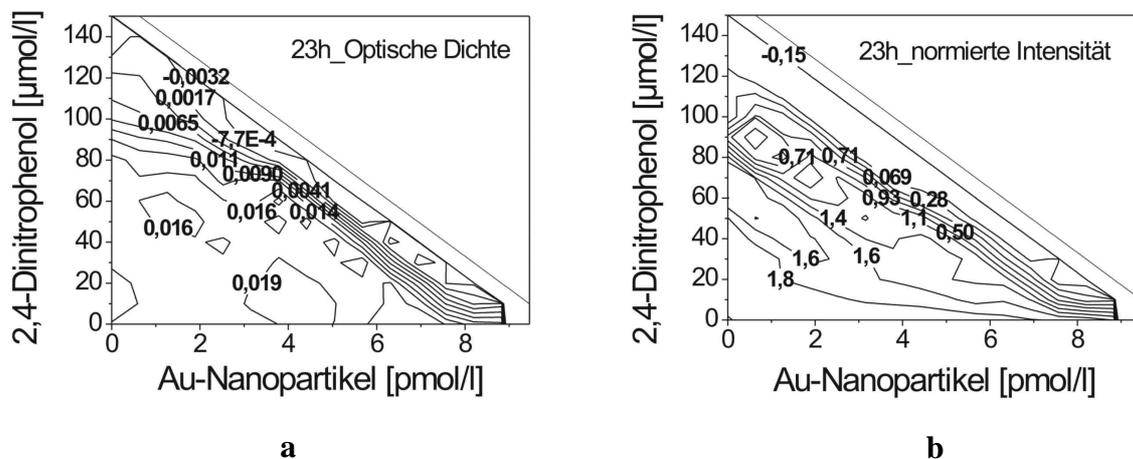
Als toxikologische Endpunkte wurde das Wachstum der Bakterienkultur durch photometrische Erfassung der optischen Dichte im Mikrofluidsegment und die Stoffwechselaktivität durch fluorimetrische Erfassung der Autofluoreszenz der Bakterienkultur untersucht.

Das Effekt-Screening der kolloidalen Lösung an Goldnanopartikeln mit einem Partikeldurchmesser von 30 nm zeigte eine untoxische Wirkung auf die Autofluoreszenz und das Wachstum von *E. coli* für die im Versuch eingesetzten Partikelkonzentrationen bis 10 pM (Abb. 3-52, a).

In Goodman et al. werden die Effekte von funktionalisierten 2 nm Goldnanopartikeln beschrieben. Hier konnten LC(50)-Werte von 3  $\mu$ M für kationisch und  $>28 \mu$ M für anionisch funktionalisierte Goldnanopartikel für *E. coli* gefunden werden [198]. In Hwang et al. wurden nicht-toxische Effekte von unmodifizierten 10 nm Goldnanopartikeln bis zu 1 mg/l für *E. coli* gefunden [189].

Die EC50-Werte, definiert als die Konzentration, bei der eine 50 %ige Verringerung in der Fluoreszenzintensität und der optischen Dichte im Vergleich zur Positivkontrolle auftrat, wurden mit  $89 \pm 0,9 \mu$ M aus den zweidimensionalen Screening (Abb. 3-52, b) und mit  $74 \pm 0,7 \mu$ M aus den eindimensionalen Screening (Abb. 3-52, c) für 2,4-DNP ermittelt. Für beide Methoden konnten ähnliche EC50-Werte gefunden werden, was die Richtigkeit der aus den in Segmenten gewonnenen Toxizitätsdaten stützt.

In Abb. 3-53 sind die Isobologramme der Endpunkte Wachstum (Trübung) und Autofluoreszenzintensität (EZFS) für den Modellorganismus *E. coli* dargestellt.



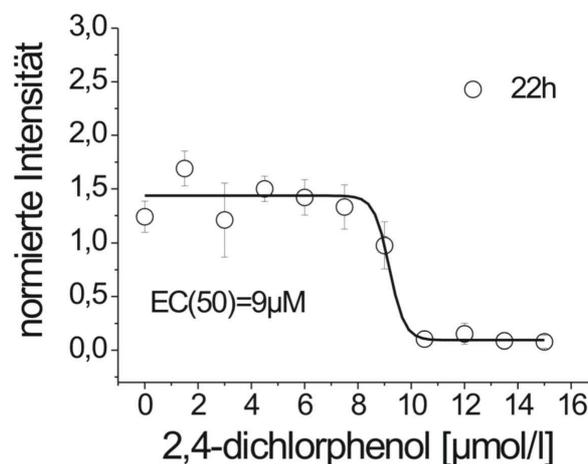
**Abb. 3-53:** 2D-Plots des binären Gemisches DNP und AuNP für den Modellorganismus *E. coli* kultiviert in Mikrofluidsegmenten. **a)** Isobolen für den Parameter Wachstum (optische Dichte) nach 23 h Kultivierung im Segment. **b)** Isobolen für den Parameter Autofluoreszenz nach 23 h Kultivierung im Segment.

Es konnten eine gute Übereinstimmung des Antwortverhaltens für beide Endpunkte als Funktion der verschiedenen Kombinationen der Effektorkonzentrationen gefunden werden.

Die zweidimensionalen Screenings erlauben die simultane Bestimmung eines kompletten Datensets an EC50-Werten für DNP innerhalb des gesamten untersuchten Konzentrationsbereiches der Goldnanopartikel. Der Einsatz von Goldnanopartikeln führte zu einer Verringerung der kritischen DNP Konzentrationen. Während die lethale Konzentration für DNP bei 100  $\mu\text{M}$  ohne Zusatz von AuNP lag, zeigte sich in bei Nanopartikelkonzentrationen von 3 pM eine Verringerung der kritischen Konzentration an DNP auf 80  $\mu\text{M}$  und auf 40  $\mu\text{M}$  bei einer AuNP-Konzentration von 7 pM. Die Ergebnisse spiegeln ein annähernd lineares (additives) Antwortverhalten des binären Gemisches DNP und AuNP wieder. Es zeigten sich nur sehr schwache synergistische Effekte für geringe Konzentrationen an DNP.

### ***Goldnanopartikel in binärer Mischung mit 2,4-Dichlorphenol***

Die Wirkung von 2,4-Dichlorphenol wurde in binärer Mischung mit einer kolloidalen Lösung an Goldnanopartikeln untersucht. Aus dem Effekt-Screening von 2,4-DCP wurde eine EC50-Wert von  $9 \pm 0,08 \mu\text{M}$  ermittelt, welcher um ein 10faches geringer als der EC50 von 2,4-DNP lag (Abb. 3-54). Damit zeigte 2,4-Dichlorphenol eine stärkere Inhibierung der Zellaktivität von *E. coli* als 2,4-Dinitrophenol.

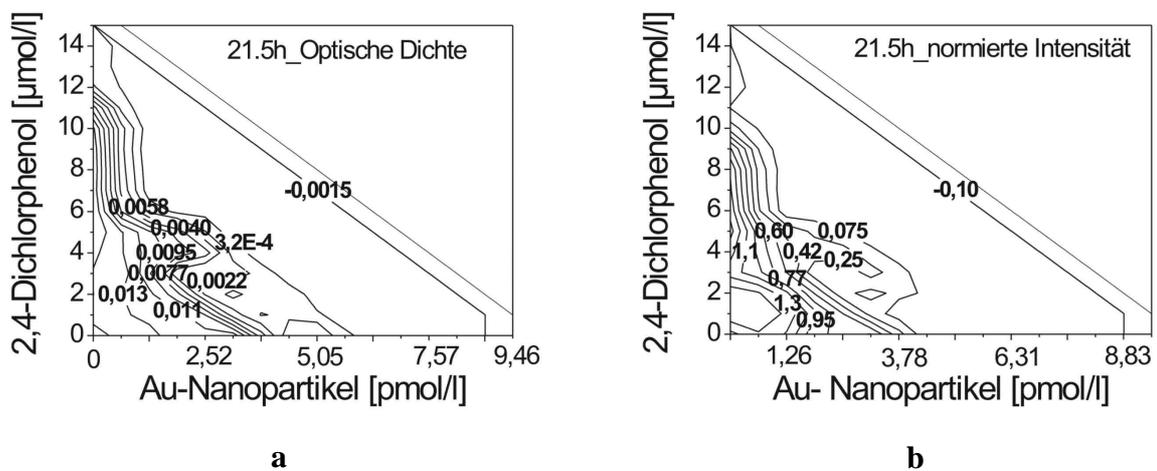


**Abb. 3-54:** Dosis-Wirkungskurve von 2,4-DCP nach 23 h Kultivierung von *E. coli* im Segment, Datenwerte aus den 2-dimensionalen Screening.

Auch die in den Versuchen mit DNP als untoxisch getesteten AuNP zeigten für die eingesetzte Bakterienkultur eine stärkere Inhibierung der Zellaktivität. Ursache für die

Schwankungen im Antwortverhalten der biologischen Systeme können unterschiedliche Vitalitätszustände der Kulturen sein.

Die Isobologramme für das binäre Gemisch DCP und AuNP zeigten ähnliche Kurvenverläufe wie bei den Versuchen mit DNP, weisen aber eine verstärkte Wirkung auf die Bakterienkultur auf. Für die Kombination von Phenolen mit Goldnanopartikeln konnten ähnliche Wirkweisen gefunden werden. In beiden Kombinationen wurden leicht synergistische Effekte auf das Wachstum und die Stoffwechselaktivität von *E. coli* gefunden (Abb. 3-55)



**Abb. 3-55:** Kombinationswirkung des binären Gemisches von AuNP und DCP für die Kultivierung von *E. coli* im Mikrofluidsegment. **a)** Isobolen für den Parameter Wachstum (optische Dichte) nach 22 h Kultivierung im Segment. **b)** Isobolen für den Parameter Autofluoreszenz nach 22 h Kultivierung im Segment.

### *Silbernanopartikel in binärer Mischung mit Phenolen*

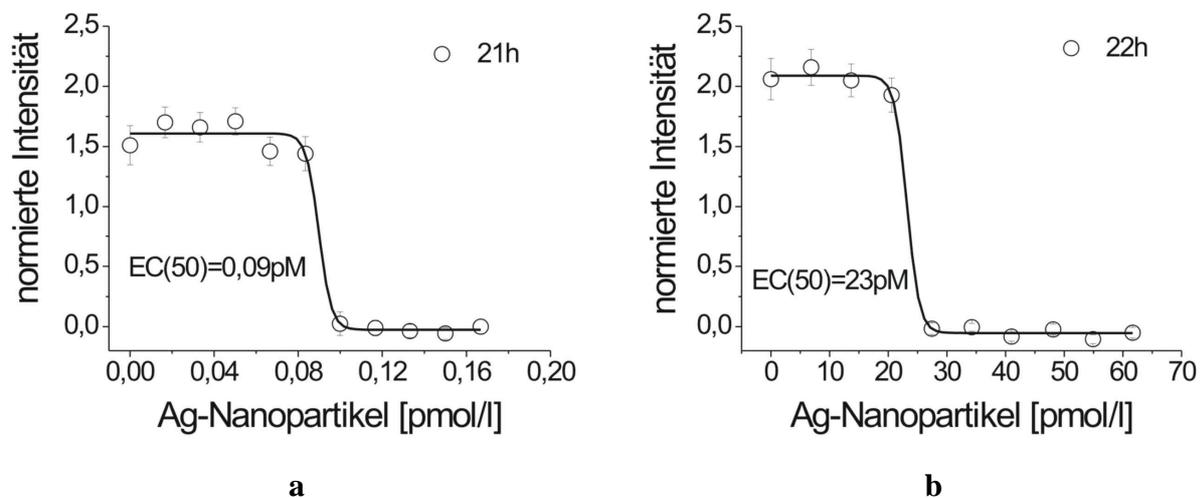
Silbernanopartikel sind bekannt für ihre antibakterielle und antivirale Aktivität. Silber wird in beiden Formen eingesetzt, als Salz (Silberionen) und in Form von metallischem Silber zur Behandlung von Infektionen oder zur Prophylaxe in verschiedenen medizinischen Therapien.

Die Wirkung von Silbernanopartikeln ist komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Als Hauptursache für die Toxizität von AgNP wird das Freisetzen von Silberionen benannt, welche durch die Zellmembran diffundieren können und dort für die Bildung von ROS (Reactive Oxygen Species) verantwortlich sind [189]. Der Einbau von Silbernanopartikel mit Durchmessern  $\leq 20$  nm in spezielle Proteine der Bakterienzellmembran kann zur Permeabilität sowie zur Perforierung der Membran und damit zu einer toxischen Wirkung auf die Zellen führen [199]. Die Toxizität von Nanopartikeln wird durch die Art der Agglomeration, der Partikelgröße und der spezifischen Oberfläche beeinflusst.

In der Literatur werden unterschiedliche Aussagen über die minimale Effektkonzentration (MIC) für AgNP auf *E. coli* getroffen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Partikelgrößen untersucht und verschiedene *E. coli*-Stämme eingesetzt wurden. Es werden kritische Konzentrationen von 25 bis 100  $\mu\text{g/ml}$  für Partikelgrößen zwischen 1 und 40 nm [190], von 5,66  $\mu\text{g/ml}$  für 4 nm AgNP [199], von 0,06  $\mu\text{g/ml}$  für 39 nm AgNP [188,191] und MIC's  $> 3.3$  nM für 13,4 nm AgNP [200] für verschiedene *E. coli*-Stämme angegeben.

Trotz des umfangreichen Wissens über die toxischen Effekte von Silbernanopartikeln auf Zellen und Mikroorganismen, gibt es nach unserem besten Wissen keine detaillierten Studien zur synergistischen Kombinationswirkung von Silbernanopartikeln mit anderen Toxinen.

Wie in Kapitel 3.7.1 *Charakterisierung der Metallnanopartikel* beschrieben, wurde die Wirkung von zwei verschiedenen Silbernanopartikel-Chargen (AgNP\_braun, AgNP\_gelb) untersucht. Beide Lösungen an Silbernanopartikeln wiesen eine Partikelgröße von ca. 20 nm auf, unterschieden sich aber in der Form der Nanopartikel. Die Effekt-Screenings in Mikrofluidsegmenten für die beiden kolloidalen Lösungen an Silbernanopartikel sind in Abb. 3-56 dargestellt.



**Abb. 3-56:** Dosis-Wirkungskurven von Silbernanopartikeln auf die Stoffwechselaktivität von *E. coli* nach 22 h Kultivierung in Mikrofluidsegmenten. **a)** Wirkung von AgNP\_braun, Mischformen von sphärischen bis stäbchenförmige Partikeln. **b)** Wirkung von AgNP\_gelb, sphärischen Partikeln.

Für die Silbernanopartikel (AgNP\_braun) mit sphärischen und anisotropen Mischformen konnte eine verstärkte Wirkung auf die Stoffwechselaktivität von *E. coli* im Vergleich zur Wirkung der sphärischen Silbernanopartikel (AgNP\_gelb) gefunden werden. Es wurden EC50-Werte von  $0,09 \pm 0,003$  pM für 20 nm AgNP\_braun und  $23 \pm 0,06$  pM für 20 nm AgNP\_gelb ermittelt.

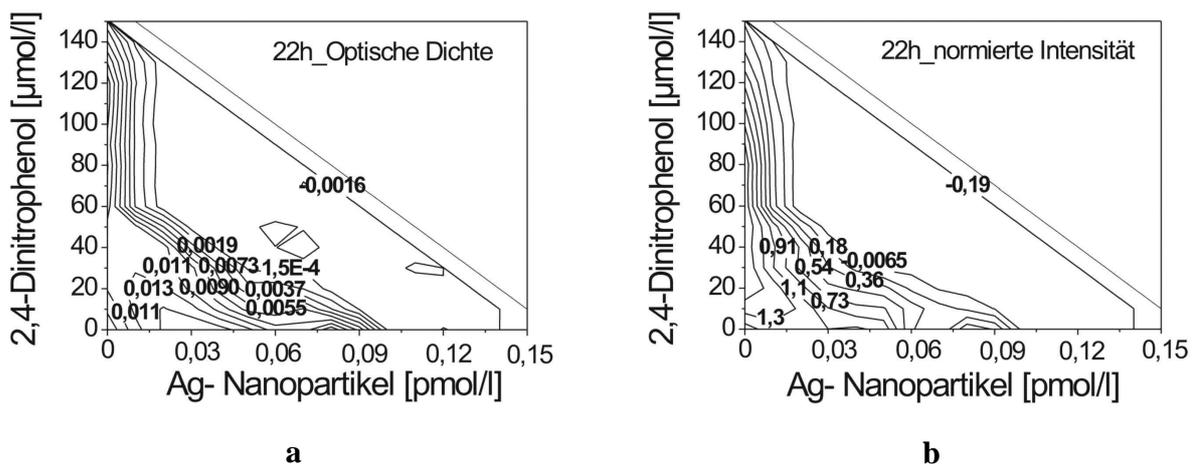
Die Formabhängige Wirkung von Silbernanopartikeln wurde in Pal et al. beschrieben [188]. Im Vergleich zur Wirkung von sphärischen und stäbchenförmigen Partikeln zeigten hier die rechteckigen Partikel eine verstärkte biozide Wirkung auf *E. coli*.

Die Effekte der binären Mischungen von Silbernanopartikeln und 2,4-DNP sowie 2,4-DCP wurden untersucht.

Die kritischen Konzentrationen für AgNP für Wachstum und Stoffwechselaktivität von *E. coli* kultiviert in Mikrofluidsegmenten zeigten viel niedrigere Werte als die mit konventionellen Methoden gefundenen kritischen Konzentrationen [200]. Dies weist auf stärkere Effekte in den Mikrofluidsegmenten hin. Die ermittelten Werte sind dennoch in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur gefundenen Größenordnungen [188,201].

Die Kombinationswirkung von AgNP\_braun in Konzentrationen zwischen 0 und 150 fM und 2,4-DNP im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 150  $\mu\text{M}$  wurde untersucht. Dafür wurden Mikrofluidsegmentsequenzen mit ca. 500 Segmenten erzeugt. Analog zu den Experimenten mit dem binären Gemisch Goldnanopartikel und DNP konnte damit der gesamte zweidimensionale Konzentrationsraum für die beiden Effektoren abgedeckt werden.

Die Ergebnisse des zweidimensionalen Screenings für das binäre Gemisch AgNP\_braun und DNP zeigten deutliche Abweichungen von den untersuchten Goldnanopartikeln in Kombination mit DNP. Es konnte ein starker synergistischer Effekt für die Kombination von AgNP\_braun und DNP gefunden werden (Abb. 3-57).



**Abb. 3-57:** Kombinationswirkung des binären Gemisches von AgNP\_braun und DNP für die Kultivierung von *E. coli* im Mikrofluidsegment. **a)** Isobolen für den Parameter Wachstum (Optische Dichte) nach 22 h Kultivierung im Segment. **b)** Isobolen für den Parameter Autofluoreszenz nach 22 h Kultivierung im Segment.

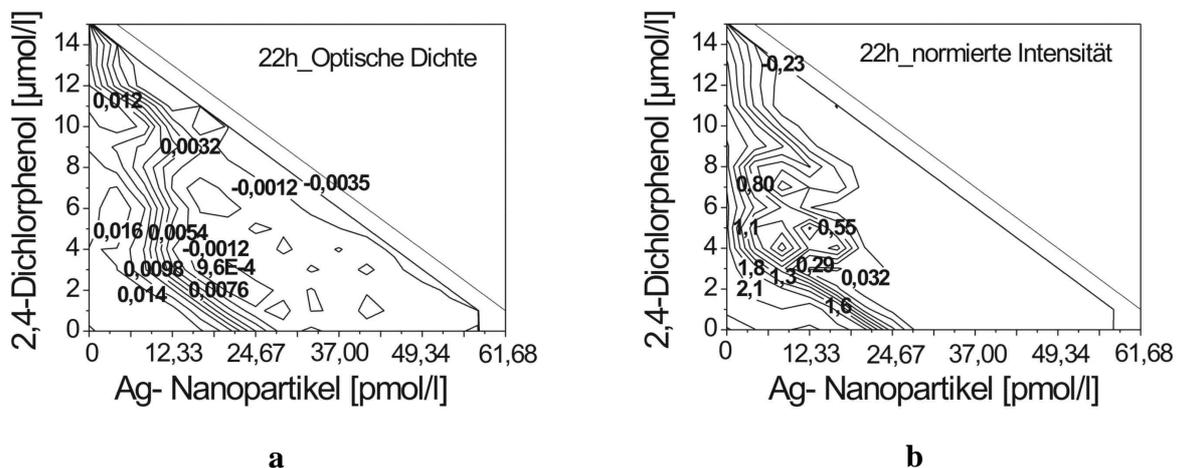
Die mikrophotometrischen und fluorimetrischen Messungen von Trübung und Fluoreszenzintensität zeigten eine starke Reduzierung der lethalen DNP-Konzentration bei vergleichbar niedrigen Silbernanopartikel-Konzentrationen.

Eine Verringerung der lethalen DNP-Konzentration von 120 auf 40  $\mu\text{M}$  konnte bei einer AgNP-Konzentration von 30 fM gefunden werden, was nur 30 % von der lethalen Dosis an Silbernanopartikeln entspricht.

Höhere AgNP-Konzentrationen (60 fM) führten zu einer weiteren Verringerung des Grenzwertes von DNP auf 10  $\mu\text{M}$ , was 10 % der lethalen Dosis des reinen DNP's entspricht.

Die Untersuchungen zeigten eine starke Beeinflussung der toxischen Effekte von Silbernanopartikeln durch DNP und umgekehrt eine Verstärkung der Effekte von DNP durch die kolloidale Silbernanopartikellösung.

Die Untersuchung der Wirkung des binären Gemisches AgNP\_gelb und DCP zeigten ebenfalls synergistische Effekte für Wachstum und Autofluoreszenz und damit eine Verstärkung der Wirkung im Vergleich zur Effektsummation (Abb. 3-58). Trotz des im Vergleich zu DNP niedrigeren EC50-Wertes für DCP konnte kein verstärkter Effekt für die Mischung von DCP mit Silbernanopartikeln gefunden werden. Ursache könnte eine Kompensation der Wirkung durch die stärker inhibierenden Silbernanopartikel mit anisotropen Mischformen sein.



**Abb. 3-58:** Kombinationswirkung des binären Gemisches von AgNP\_gelb und DCP für die Kultivierung von *E. coli* im Mikrofluidsegment. **a)** Isobolen für den Parameter Wachstum (optische Dichte) nach 22 h Kultivierung im Segment. **b)** Isobolen für den Parameter Autofluoreszenz nach 22 h Kultivierung im Segment.

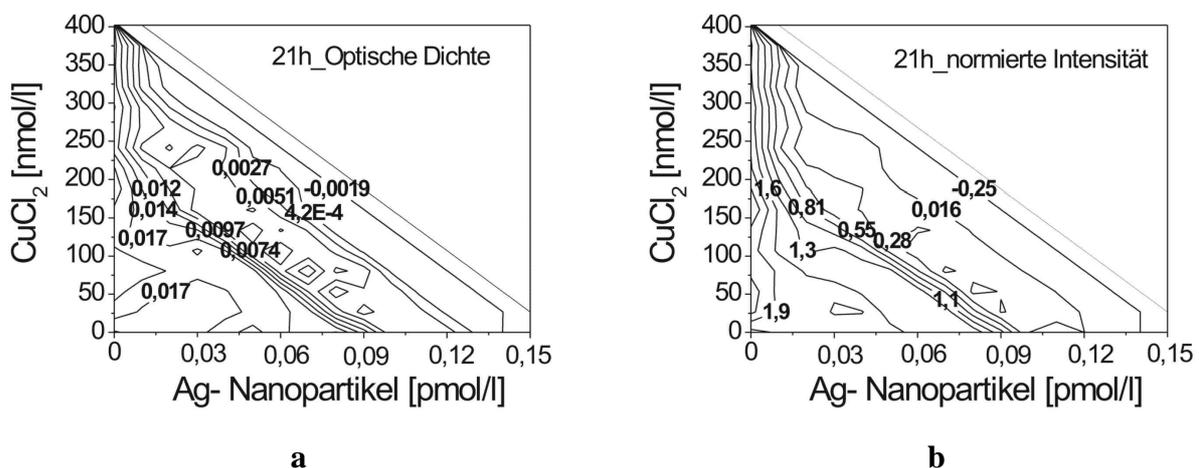
### 3.7.2 Binäres Gemisch von Metallnanopartikeln und Schwermetall

#### *Silbernanopartikel im binären Gemisch mit Kupferchlorid*

Das Schwermetall Kupfer ist ein redox-aktives Übergangsmetall, welches in zu hohen Konzentrationen zur Zellschädigung führen kann. Cu(II)-Ionen sind in der Lage mit der DNA zu interagieren und dadurch konformative Änderungen hervorzurufen. Die Toxizität von Kupfer liegt in seiner Fähigkeit, aus den wenig reaktiven ROS (reactive oxygen species), die während der oxidativen Phosphorylierung entstehen, die Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals zu begünstigen [202].

Für die Versuche in Mikrofluidsegmenten wurden Kupferkonzentrationen unterhalb ihres NOEC's (no observed effect concentration) eingesetzt. Für die Einzelwirkung von CuCl<sub>2</sub> konnten in diesem Konzentrationsbereich schwache bis keine toxischen Effekte auf das Wachstum (optische Dichte) und die Stoffwechselaktivität von *E. coli* bestätigt werden.

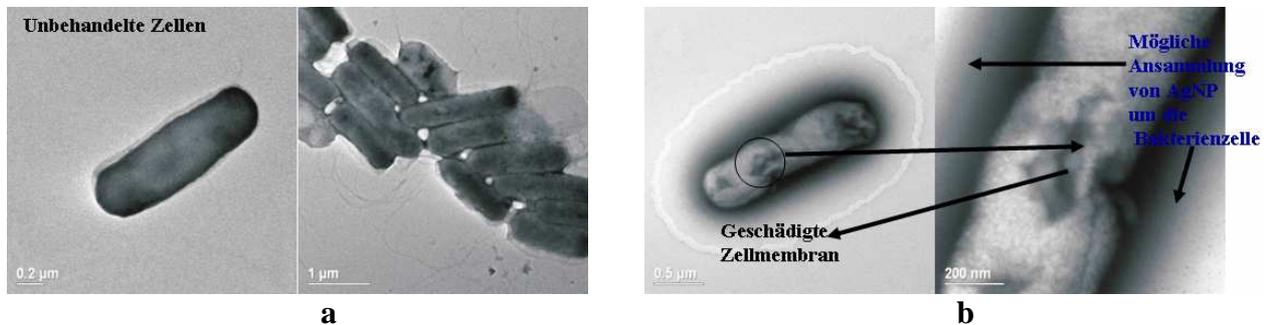
Das binäre Gemisch von CuCl<sub>2</sub> und AgNP\_braun zeigte ein schwach synergistisches Verhalten für die betrachteten Endpunkte (Abb. 3-59). Es zeigte sich, dass die Wirkung des binären Gemisches auf die Stoffwechselaktivität von *E. coli* schwächer ist als die Wirkung der Kombination von Silbernanopartikeln mit Phenolen.



**Abb. 3-59:** Kombinationswirkung des binären Gemisches von AgNP\_braun und CuCl<sub>2</sub> für die Kultivierung von *E. coli* im Mikrofluidsegment. **a)** Isobolen für den Parameter Wachstum (optische Dichte) nach 21 h Kultivierung im Segment. **b)** Isobolen für den Parameter Autofluoreszenz nach 21 h Kultivierung im Segment.

Die Untersuchungen von unbehandelten und behandelten Zellen mit Transmissionselektronenmikroskopie zeigten für die mit der binären Mischung AgNP\_braun und CuCl<sub>2</sub> behandelten Zellen Membranschädigungen (Abb. 3-60). Es konnten aber keine

Nanopartikel auf der Zellmembran oder in den Bakterienzellen nachgewiesen werden. Die toxische Wirkung scheint demnach nicht durch die Interaktionen der Nanopartikel in den Zellen verursacht zu werden. Eine genaue Aussage kann darüber aber nicht getroffen werden und erfordert weiterführende Charakterisierungen.



**Abb. 3-60:** TEM Aufnahme von *E. coli* nach Kultivierung im Mikrofluidsegment. **a)** Positivkontrolle, unbehandelte Zellen. **b)** Effekte binären Mischung AgNP\_braun und  $\text{CuCl}_2$ , behandelte Zellen.

### 3.7.3 Binäres Gemisch von Phenol und Schwermetall

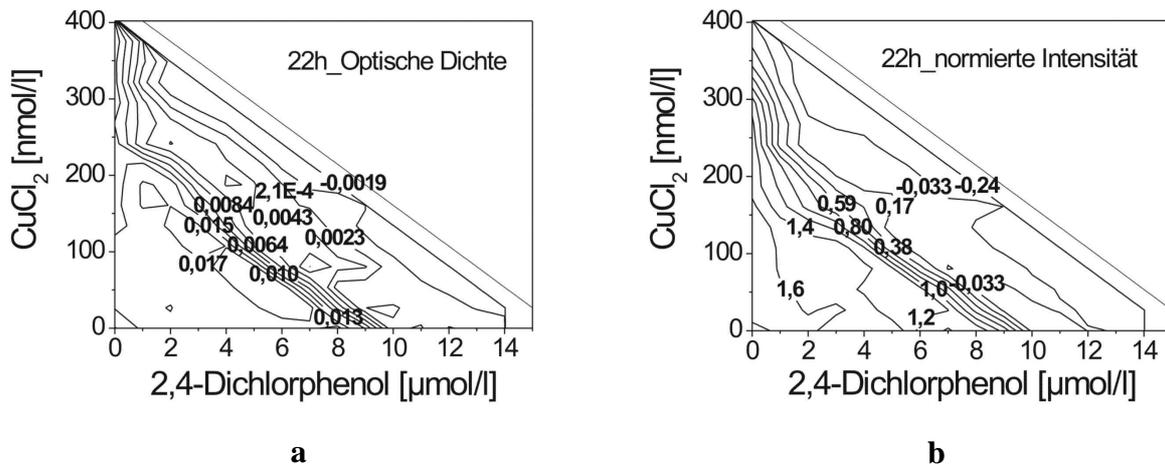
#### *2,4-Dinitrophenol und 2,4-Dichlorphenol in binärer Mischung mit $\text{CuCl}_2$*

In Jacobi et al. zur Kombinationswirkung des binären Gemisches mit 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (ein Metabolit von 2,4-D ist 2,4-DCP) wurde dargelegt, dass  $\text{Cu(II)}$  in Kombination mit anderen Chemikalien, die in der Lage sind  $\text{Cu(III)}$  zu  $\text{Cu(II)}$  und  $\text{Cu(I)}$  zu reduzieren, synergistische Effekte durch DNA-Schädigung verursachen, wobei die Einzelsubstanzen keine Effekte zeigten [203].

In Zhu et al. wurde die Zytotoxizität des binären Gemisches PCP (Pentachlorophenol) und  $\text{Cu(II)}$ -Ionen auf den *E. coli*-Stamm SR-9 untersucht [202]. Auch hier wurden die Einzelsubstanzen in sublethalen Konzentrationen eingesetzt, bei welchen eine minimale Inhibierungen des Wachstums auftrat. Es wurde ein synergistisches Antwortverhalten für die Kombination gefunden.

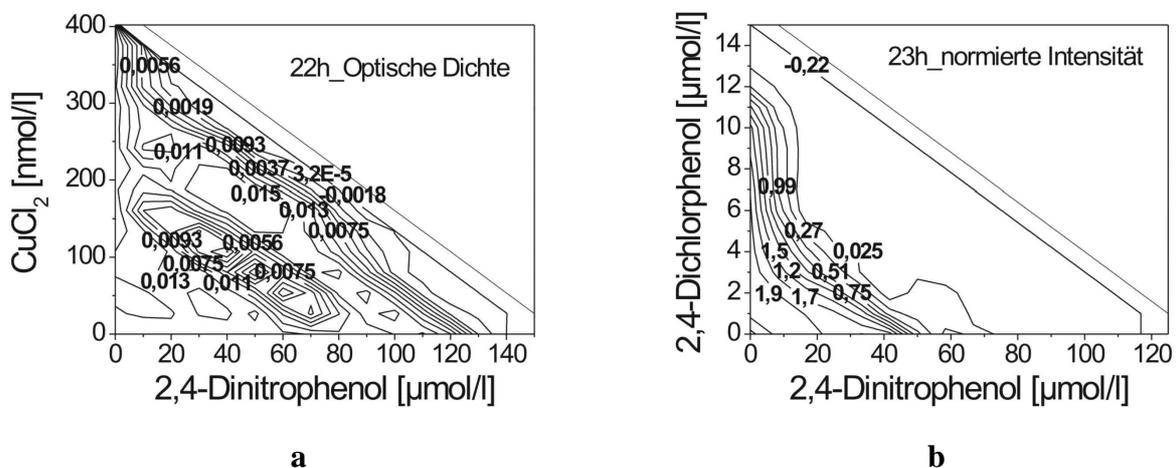
Die Kombination verschiedener Phenole mit  $\text{Cu(II)}$ -Ionen sollte erwartungsgemäß zu ähnlichen Wirkungsweisen führen. In Abb. 3-61 ist die Kombinationswirkung von  $\text{CuCl}_2$  und 2,4-DCP für die Endpunkte Wachstum und Autofluoreszenz dargestellt.

Es konnten additive Effekte für das Gemisch von DCP und  $\text{Cu(II)}$ -Ionen für beide betrachteten Endpunkte gefunden werden.



**Abb. 3-61:** Kombinationswirkung des binären Gemisches von 2,4-DCP und  $\text{CuCl}_2$  für die Kultivierung von *E. coli* im Mikrofluidsegment. **a)** Isobolen für den Parameter Wachstum (optische Dichte) nach 22 h Kultivierung im Segment. **b)** Isobolen für den Parameter Autofluoreszenz nach 22 h Kultivierung im Segment.

Für die Versuche mit 2,4-DNP und  $\text{Cu(II)}$  in binärer Mischung konnte ein schwach synergistisches Verhalten bis zu DNP-Konzentrationen von  $70 \mu\text{M}$  gefunden werden (Abb. 3-62). Für höhere DNP-Konzentrationen zeigte sich ein additives Verhalten.



**Abb. 3-62:** Kombinationswirkung des binären Gemisches von 2,4-DNP und  $\text{CuCl}_2$  für die Kultivierung von *E. coli* im Mikrofluidsegment. **a)** Isobolen für den Parameter Wachstum (optischen Dichte) nach 22 h Kultivierung im Segment. **b)** Isobolen für den Parameter Autofluoreszenz nach 22 h Kultivierung im Segment.

Die Anomalitäten für den Konzentrationsbereich zwischen  $60 \mu\text{M}$  und  $70 \mu\text{M}$  DNP könnten durch systematische Fehler bei der Segmenterzeugung verursacht worden sein und bleiben deshalb für die Diskussion unberücksichtigt. Die Untersuchungen von zwei Phenolen in Kombination mit  $\text{CuCl}_2$  zeigten, dass die Kombination mit Substanzen einer Substanzklasse nicht immer zwingend zu einer ähnlichen Wirkungsweise führen muss. Es konnte weiterhin

gezeigt werden, dass Kupfer in subtoxischen Konzentrationen die Toxizität von Phenolen verstärken kann.

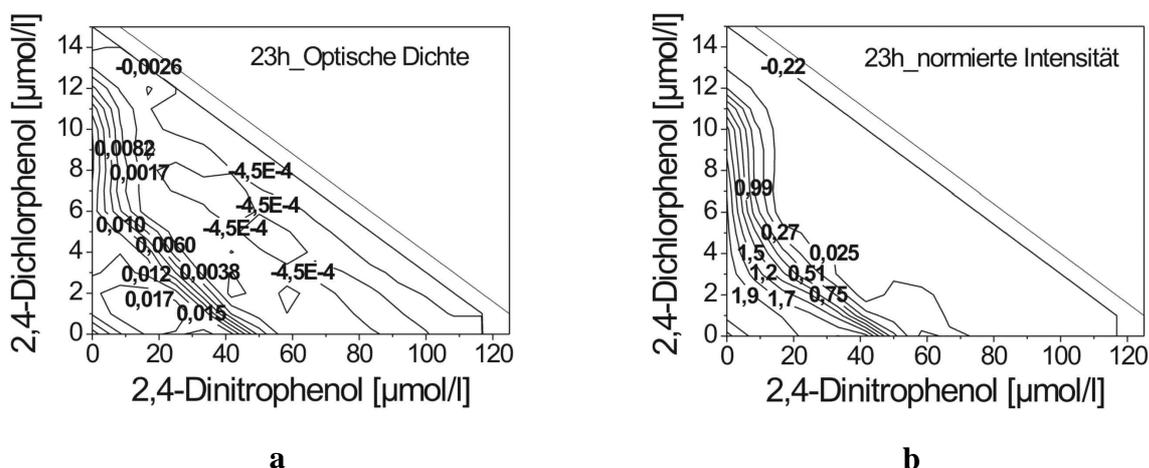
Die Ergebnisse aus dem Screening in Mikrofluidsegmenten sind in guter Übereinstimmung mit den Literaturangaben.

### 3.7.4 Binäres Gemisch von Phenolen

#### *2,4-Dinitrophenol in binärer Mischung mit 2,4-Dichlorphenol*

In der Literatur wird das Vorkommen von multiplen Gemischen an Phenolen als Komponenten in Böden und Gewässern beschrieben. Es ist deshalb von großem Interesse, den Beitrag ihrer Kombinationswirkung auf die Umwelt zu analysieren [172,204]. In Tiensing et al. wurden für die Interaktion von 2,4-DCP und PCP anhand des Modellorganismus *E. coli* untersucht. Für dieses binäre Gemisch konnten synergistische Effekte gefunden werden [172]. In Escher et al. wurden ausgewählte binäre Mischungen von phenolischen Entkopplern anhand des Modellorganismus *Rhodobacter sphaeroides* untersucht [205]. Hier konnten neben synergistische Effekten auch additive Effekte gezeigt werden.

Die Phenole 2,4-Dinitrophenol und 2,4-Dichlorphenol wurden als Vertreter dieser Substanzklasse ausgewählt und deren Kombinationswirkung untersucht. Für die Endpunkte Wachstum und Stoffwechselaktivität von *E. coli* wurde ein stark synergistisches Verhalten gefunden (Abb. 3-63).



**Abb. 3-63:** Kombinationswirkung des binären Gemisches von 2,4-DNP und 2,4-DCP für die Kultivierung von *E. coli* im Mikrofluidsegment. **a)** Isobolen für den Parameter Wachstum (optische Dichte) nach 23 h Kultivierung im Segment. **b)** Isobolen für den Parameter Autofluoreszenz nach 23 h Kultivierung im Segment.

Die Anwesenheit von Phenolen im binären Gemisch führte in diesen Versuchen zu einer verstärkten Inhibierung der Stoffwechselaktivität der Bakterien als aus den Einzelwirkungsscreening erwartet.

Die Ergebnisse aus dem zweidimensionalen Screenings des binären Gemisches von Phenolen in Mikrofluidsegmenten zeigte eine gute Übereinstimmung in der Wirkungsweise mit den Angaben aus der Literatur.

## 4 Schlussfolgerungen

Gegenstand der Dissertation ist die Entwicklung und Optimierung eines Mikrofluidsystems auf Basis der “Segmented Flow-Methode“ zur Untersuchung der Kombinationswirkung potentieller Umweltschadstoffe. Neben dem Aufbau des Systems, der Integration und Optimierung der Analyseverfahren für die multiple Endpunktbestimmung, wurde die Einbringung und Kultivierung unterschiedlicher Modellorganismen im Mikrofluidsegment untersucht. Für die geeigneten Modellorganismen erfolgten toxikologische Untersuchungen der Einzel- und Kombinationswirkung verschiedener Verbindungsklassen. Die Schlussfolgerungen aus den experimentellen Ergebnissen sind nachfolgend dargelegt.

### ***Integration und Kultivierung der Modellorganismen in Mikrofluidsegmenten***

Die Anpassung des Mikrofluidsystems für die Integration aller untersuchten Modellorganismen in die Mikrofluidsegmente konnte erfolgreich realisiert werden. Während die Integration von *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, HeLa-Zellen, *Chlorella vulgaris* und dem Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) durch Injektion der Zellsuspension in die perfluorierte Trägerphase die gewünschte Bildung gleichmäßiger Segmente mit darin eingeschlossenen Zellen und Embryonen brachte, gelang die Integration der Zebrafischeier (*Danio rerio*) nur durch alternierendes Ansaugen von Ei-Suspension und Trägerphase.

Für die Kultivierung der verschiedenen Organismen wurden unterschiedliche Schlauchmaterialien und -größen auf ihre Eignung untersucht. Die Modellorganismen *E. coli* und *S. cerevisiae* mit fakultativ anaerobem Stoffwechsel konnten in gasdichten und gasdurchlässigen Schläuchen gleichermaßen gut kultiviert werden. Für diese Organismen erwies sich der Einsatz von PTFE-Schläuchen mit einem Innendurchmesser ( $d_i$ ) von 0,5 mm und einem Außendurchmesser ( $d_a$ ) von 1,6 mm für die Kultivierung und für den störungsfreien Segmenttransport als geeignet.

Eine direkte Untersuchung der Kultivierbarkeit der adhärent wachsenden HeLa-Zellen in den Mikrofluidsegmenten wurde nicht durchgeführt, wird aber aufgrund der fehlenden Aufwuchsflächen als schwierig angesehen. Die Untersuchung des Antwortverhaltens der Zellen im Mikrofluidsystem direkt nach Einbringung in die Segmente und Stimulierung mit Testsubstanzen hat sich allgemein als sehr geeignet erwiesen. Damit bietet sich die Möglichkeit,

bereits in wenigen Minuten Aussagen über den Einfluss von Stressfaktoren auf das Genexpressionssystem mit Hilfe von Fluoreszenzanalyse zu ermitteln, ohne eine Kultivierung der Zellen voraussetzen.

Für *Chlorella vulgaris* führte der Einsatz von PTFE-Schläuchen mit Durchmessern von 0,5 mm/1,6 mm ( $d_i/d_a$ ) aufgrund der zu geringen CO<sub>2</sub>-Permeabilität der Schläuche zu einem sehr stark eingeschränkten Zellwachstum bis zur Zellyse nach wenigen Tagen.

Die Wirkung einer Modellsubstanz auf das Autofluoreszenzsignal von *Chlorella vulgaris* konnte direkt nach Einbringung in die Segmente gezeigt werden.

Weiterführende Versuche zeigten, dass der Einsatz von FEP- und PE-Schläuchen mit Durchmessern von 0,4 mm/0,8 mm ( $d_i/d_a$ ) zu einer erfolgreichen Kultivierung der Grünalge in den Mikrofluidsegmenten führt.

Mit dem Einsatz von PTFE-Schläuchen zur Kultivierung des Invertebraten *C. elegans* und des Vertebraten *Danio rerio* konnte eine erfolgreiche Entwicklung der Testorganismen gezeigt werden. Es gelang die Integration und vollständige Entwicklung der Organismen bis zum Schlupf der Larve unter Einsatz von PTFE-Schläuchen mit Durchmessern von 0,5 mm/1,6 mm ( $d_i/d_a$ ) für den Invertebraten und 1,2 mm/1,8 mm ( $d_i/d_a$ ) für den Vertebraten.

Für den Zebrafisch konnte die Weiterentwicklung eines Großteils der geschlüpften Larven zu adulten Organismen nach Freisetzung aus den Segmenten nach 5 Tagen trotz des Integrations- und Transportprozesses der Embryonen im Schlauch sowie des minimierten Entwicklungs- und Lebensraumes gezeigt werden. Die Stabilisierung der Segmente während des Transportes gelang durch die Integration von Luftblasen zwischen Träger- und Segmentphase. Neben der Auswahl von geeigneten Schlauchmaterialien gewährleistete der Einsatz eines perfluorierten Alkans eine zusätzlich gute Sauerstoffversorgung der Organismen im Segment.

Eine nahezu homogene Verteilung der Zellen gelang mit dem Einsatz einer Spritzenrührereinheit (Cetoni-GmbH) und ermöglichte die Einstellung gleicher Anfangszellichten in den Mikrofluidsegmenten. Damit konnten starke Zellschwankungen vor allem bei der Integration von *C. vulgaris* und *S. cerevisiae* in die Segmente weitgehend unterbunden werden. Bei einer Rührgeschwindigkeit von 650 bis 1000 U/min gelang eine gute Verteilung der Zellen bei minimiertem Scherstress.

### ***Endpunktbestimmung***

Die Integration eines Auflichtmikroskops und die Auswertung der embryonalen Entwicklung mit Bildverarbeitungssoftware haben sich für die Untersuchung ausgewählter phänotypischer Entwicklungsmerkmale bei dem Invertebraten und den Vertebraten als geeignet erwiesen.

Mit dem Einbau eines Mikrodurchflussphotometers und Mikrodurchflussfluorimeters in das segmentbasierte Mikrofluidsystem gelang die schnelle und einfache Analyse unterschiedlicher Endpunkte. Mit dieser Detektoreinheit konnten für die Modellorganismen *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Chlorella vulgaris* und HeLa-Zellen die Endpunkte Wachstum, Stoffwechselaktivität, ermittelt über die Parameter pH-Wert und endogenes zelluläres Fluoreszenzsignal (Autofluoreszenz-EZFS), als auch der Endpunkt GFP-Signal simultan gemessen werden.

Mit der Einbringung von Mikrobeads zur segmentinternen pH-Analyse konnten in situ Messungen von Stoffwechselaktivitäten ohne unerwünschte Interaktionen zwischen Zellen und Lumineszenzfarbstoff ermöglicht werden. Es zeigte sich, dass Sensorbeads mit Durchmessern im unteren nm-Bereich zur Beeinträchtigung der Zellaktivität führen können. Mit dem Einsatz von Mikrobeads mit Durchmessern zwischen 3  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  gelang die interaktionslose Fluoreszenzauslesung ohne Verstopfung der Segmenterzeugermodule.

Der Ersatz der Komplexmedien durch geeignete synthetische Medien führte zu einer erheblichen Minimierung des vom Medium verursachten Hintergrundsignals. Damit konnte eine bessere Auflösung des Messsignals erreicht werden. Mit dem Ersatz der proteinreichen Komplexmedien gelang die Minimierung unerwünschter Proteinadsorption an den Zellwänden und eine Phasenstabilisierung ohne den Einsatz von möglicherweise Zellaktivität inhibierenden Tensiden. Dadurch konnten unerwünschten Segmentfusionen und Segmentteilungen während der Bewegung der Segmente durch die Detektionseinheit minimiert werden und ermöglichte geringere Signalverschmierungen bei häufigen Messungen oder längeren Inkubationszeiten.

Die Adaption des Verfahrens für die Endpunktbestimmung auf Genebene gelang durch Einsatz einer HeLa-Zelllinie mit integriertem Tet-On-Genexpressionssystem. Es konnten neben Aussagen über die Vitalität der Zellen auch Effekte von Modellsubstanzen auf die Proteinsynthese durch die Erfassung des GFP Gens und des daraus resultierenden

Fluoreszenzsignals, das gebildete grün fluoreszierende Protein (GFP), gezeigt werden. Damit konnte eine viel versprechende Methode für schnelle Screenings von Zellantworten auf Stressfaktoren und ein Verfahren zur möglichen Aufklärung von Wirkmechanismen in Mikrofluidsegmenten entwickelt werden.

Die simultane Messung unterschiedlicher Endpunkte gelang durch die Reihenschaltung der Mikrodurchflusssensoren in einer kombinierten Detektoreinheit. Ein transparenter FEP-Schlauch mit Durchmessern von 0,5 mm/1,6 mm ( $d_i/d_a$ ) ermöglichte eine gute Messung der Segmentsignale durch den Schlauch. Die Minimierung der Messsignalüberlagerung zwischen den einzelnen Segmenten konnte durch ausreichende Abstände von 0,5 cm bis 1 cm Wegstrecke Trägerphase zwischen den Segmenten erreicht werden. Die Minimierung von Adsorptionseffekten an den Kanalflächen gelang durch die Einbettung der Segmente in die Trägerphase.

### ***Toxikologische Studien der Einzel- und Kombinationswirkung binärer Gemische der Modellsubstanzen***

Für den Vertebraten *Danio rerio* gelangen erste toxikologische Studien im Mikrofluidsegment. Die Erstellung von Dosis-Wirkungskurven konnte anhand ausgewählter toxikologischer Endpunkte gezeigt werden. Damit wurde es möglich, Aussagen über die Wirkung von Tensiden in Anwesenheit von Schwermetallionen auf die embryonale Entwicklung einzelner Zebrafischembryonen in stark volumenreduzierten Reaktionsräumen zu treffen.

Die Erzeugung hoch aufgelöster Konzentrationsräume in Silizium/Glas-Chips führte für einige gestestete Modellsubstanzen zu Oberflächenreaktionen und zu einer partiellen Aufhebung der Silanisierung. Von einer Anpassung der Oberflächenmodifizierung an die jeweilige Testsubstanz wurde abgesehen, da dies zu einem großen zeitlichen Mehraufwand bei der Versuchvorbereitung geführt hätte und neue Probleme bei der Untersuchung von Kombinationswirkungen hervorrufen würde.

Die problemlose Erzeugung von hoch aufgelösten Segmentsequenzen ohne zusätzliche Oberflächenmodifizierung gelang mit dem Einsatz von kommerziell erhältlichen Kunststoffmodulen (Material PEEK). Für die Erzeugung der Segmente wurden Bauteile wie T-Stücke und Kreuzstücke für die Erzeugung von eindimensionalen und ein 7-Port-Manifold für die Erzeugung von zweidimensionalen Konzentrationsfeldern angewandt.

Mit der Anpassung und Optimierung von speziellen LabVIEW-Programmen gelang die Erzeugung und Analyse von hoch aufgelösten ein- und zweidimensionalen Dosis-Wirkungsbeziehungen für die Einzelwirkung und die Kombinationswirkung verschiedener Modellsubstanzen. Bei Gesamtflussraten der Probenströme von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  konnten Frequenzen zwischen 20 und 100 Segmenten pro Minute mit durchschnittlichen Segmentvolumen zwischen 400 und 600 nl erzielt werden. Im Vergleich zu ökotoxikologischen Standardverfahren wird bei Einsatz der segmentbasierten Mikrofluidik mit bis zu eintausendstel geringeren Reaktionsvolumen und 5 bis 10fach höheren Frequenzen gearbeitet.

Der Einsatz von pulsationsfreien Spritzenpumpen ermöglichte die Abstufungen von wenigen Nanolitern bei der Dosierung im Mikrofluidsegment. Es konnten kontinuierliche und hoch aufgelöste Konzentrationsabstufung in den Segmenten ermöglicht werden. Durch die Erzeugung komplexer Parameterfelder und großer Segmentsequenzen innerhalb kurzer Generationszeiten in Verbindung mit geringstem Materialeinsatz bietet das Verfahren die Möglichkeit einer statistischen Absicherung für toxikologische Studien.

*E. coli* erwies sich für die methodischen Untersuchungen im segmentbasierten Mikrofluidsystem als geeigneter und am einfachsten zu handhabender Modellorganismus. Die Etablierung des Systems für toxikologische Screenings von Einzel- und Kombinationswirkungen verschiedener Modellsubstanzen erfolgte deshalb anhand dieses Modellorganismus.

Es konnten die Dosis-Wirkungsbeziehungen für die Verbindungsklassen Phenole, Sulfoxide, Stimulanzien wie Coffein und Adrenalin, Tenside, Polyvidone sowie ein antibakterielles Peptid-Amid auf *E. coli* in den Mikrofluidsegmentsequenzen quantitativ charakterisiert werden. Es gelangen gut reproduzierbare toxikologische Screenings in Mikrofluidsegmenten. Die aus den Einzelwirkungsscreenings gewonnenen EC50- und MIC-Werte zeigten vergleichbare Größenordnungen wie die Schwellenwerte aus den Versuchen in Mikrotiterplatten sowie der Literatur. Die Ergebnisse demonstrieren damit klar die Eignung der Methode für toxikologische Studien bei extrem reduzierten Reaktionsvolumen.

Die Darstellung des synergistischen oder additiven Antwortverhaltens der binären Substanzgemische Phenole und Metallnanopartikel, Schwermetalle und Metallnanopartikel, Phenole und Schwermetalle sowie von unterschiedlichen Phenolen gelang aus einem Datensatz von 400 bis 500 Segmenten pro Kombinationswirkung. Im Vergleich zu den Standardverfahren konnten damit detaillierte isobolische Darstellungen eines komplexen Parameterfeldes realisiert werden.

Parallel dazu konnte die Untersuchung der Einzelwirkung der Testsubstanzen durchgeführt werden und ermöglichte den Vergleich zwischen den Dosis-Wirkungskurven der Einzelwirkung mit denen der einzelnen Isobolen der Substanzgemische.

Die Mikrofluidsegmenttechnik eignete sich als Methode sehr gut für Hochdurchsatz-Screenings der Kombinationswirkung von Metallnanopartikeln. Damit konnten weiterführende Erkenntnisse in dem bisher kaum erforschten Feld der Kombinationswirkung von Metallnanopartikeln mit anderen Verbindungsklassen geliefert werden. Die Limitierung des hier vorgestellten Systems liegt im Einsatz von hydrophoben Substanzen, da bei diesen die Gefahr der Extraktion in die Trägerphase besteht, und es zu einer nicht gezielten Dosierung kommt. Für die mehrdimensionalen Screenings besteht bei dem momentan eingesetzten System eine Beschränkung in der Größe der Schlauchspulen zur Segmentlagerung aufgrund von Druckdifferenzen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Einsatz des segmentbasierten Mikrofluidsystems hervorragend geeignet ist, für:

- die Integration und Kultivierung einer Vielzahl von verschiedenen Organismen,
- die schnelle und effiziente Erzeugung von mehrdimensionalen Konzentrationsfeldern,
- Hochdurchsatz-Screenings unterschiedlicher Umweltschadstoffe unter minimalem Einsatz von Chemikalien und biologischem Material,
- stark verdunstungsminimierte, dispersionsfreie und verschleppungsarme Analysen multipler toxikologischer Endpunkte,
- qualitative und quantitative Aussagen über Schwellenwerte aus Dosis-Wirkungsfunktionen und
- die Integration der für die toxikologischen Screenings erforderlichen Segmentoperationen in automatisierten Abläufen.

Die Kombination der segmentbasierten mit den konventionellen mikrofluidischen Techniken könnte zu ganz neuen Screening-Assays für schnelle, kostengünstige und materialsparende miniaturisierte Ökotoxikotests unter Beibehalt der Qualitätsnorm beitragen.

## 4.1 Thesen

Die Schlussfolgerungen führen zu den nachfolgenden Thesen:

- Mit dem Einsatz eines Mikrofluidsystems unter Anwendung des “segmentierten Flusses“ für Toxizitätstests im Nano- und Mikrolitermaßstab können weiterführende aber auch neue Erkenntnisse über das Antwortverhalten stark volumenreduzierter biologischer Systeme auf Umwelteinflüsse von Einzelsubstanzen sowie Substanzgemischen bei geringem Chemikalieneinsatz gewonnen werden.
- Der Fortschritt dieser Promotionsarbeit auf dem Gebiet der segmentbasierten Mikrofluidik liegt in der einfachen, schnellen und volumenreduzierten Erzeugung und Analyse von ein- und zweidimensionalen Konzentrationsfeldern für hoch aufgelöste toxikologische Screenings unterschiedlichster Testsubstanzen und in der Integration und Kultivierung von prokaryotischen und eukaryotischen Einzellern, Humanzellen sowie Vielzellern.
- Die Einbringung der Modellorganismen *E. coli* (Darmbakterien), *S. cerevisiae* (Hefe), *C. vulgaris* (Grünalge), HeLa-Zellen (Humanzellen), *C. elegans* (Fadenwurm) und *Danio rerio* (Zebrafisch) in Mikrofluidsegmente gelingt in Polymermodulen durch flussratengesteuerte Injizierung der Zellsuspension in eine inerte Trägerflüssigkeit oder durch das abwechselnde Ansaugen von Zellsuspension und Trägerflüssigkeit aus einem Probenreservoir.
- Die Kultivierung von *E. coli*, *S. cerevisiae*, *C. elegans* kann in Segmentvolumen von 100 nl bis 500 nl realisiert werden. Der Sauerstofftransport durch den Schlauch (PTFE; Außendurchmesser: 1,6 mm; Innendurchmesser: 0,5 mm) und die Trägerflüssigkeit (Perfluoralkan) zeigten sich ausreichend für die vollständige Entwicklung dieser Modellorganismen.
- Die Kultivierung des Vertebraten *Danio rerio* gelingt in Segmenten mit einem Mindestvolumen von 6 µl (Segmentlänge 5 mm). Der Sauerstofftransport durch den PTFE-Schlauch (Wandstärke: 0,3 mm; Innendurchmesser: 1,2 mm) und die

Trägerphase (Perfluoralkan) ist für eine vollständige Entwicklung bis zum Schlupf sowie für eine fünftägige Weiterentwicklung im Segment ausreichend.

- Mit der Integration von Humanzellen in Segmentvolumen von 500 nl konnten erste toxikologische Screenings auf Basis eines induzierbaren Genexpressionssystems realisiert werden. Damit wird eine direkte Erfassung des Antwortverhaltens auf Stressfaktoren unmittelbar nach Stimulierung des biologischen Systems möglich.
- Das Auftreten von Segmentfusion und -teilung während der Kultivierung der Testorganismen kann durch den Einsatz synthetischer Medien stark minimiert werden. Die Minimierung von Adsorption an den Schlauchwänden wird durch die vollständige Umhüllung der Segmente mit der Trägerflüssigkeit (PP9) gewährleistet.
- Durch die Integration eines Mehrkanal-Mikrodurchflussphotometers und eines Mikrodurchflussfluorimeters kann die simultane, segmentinterne Charakterisierung der toxikologischen Endpunkte Wachstum, pH-Wert und Autofluoreszenz der Zellen ermöglicht werden.
- Die in situ Messung von Stoffwechselfparametern (z.B. pH-Wert) kann durch die Integration von Mikrobeads realisiert werden. Der Einsatz synthetischer Medien führt aufgrund der geringen Eigenfluoreszenz zur Minimierung des Hintergrundsignals und ermöglicht die pH-Wert abhängige Fluoreszenzintensitätsmessung durch Mikrobeads im Mikrofluidsegment.
- Die Integration eines pulsationsfreien Spritzenpumpensystems mit spezieller Ansteuersoftware (LabVIEW Applikation) ermöglicht die Erzeugung von ein- und zweidimensionalen Konzentrationsfeldern in Mikrofluidsegmenten. Die homogene Verteilung der Zellen in den Mikrofluidsegmenten kann durch definiertes Rühren mit integriertem Spritzenrührer (neMIX, cetoni GmbH) erreicht werden.
- Die Zuordnung der Effektorkonzentrationen zu den einzelnen Segmenten sowie die Ermittlung des mittleren Effektes pro Segment gelingen mit ausgewählten Indikatorfarbstoffen und speziellen LabVIEW-Programmen. Die Erzeugung und Analyse von hoch aufgelösten Segmentsequenzen mit bis zu 400 Segmenten für die

Einzelwirkungsscreenings und bis zu 500 Segmenten für die Kombinationscreenings kann innerhalb von 15-40 min realisiert werden.

- Die Effekte von Einzelsubstanzen aus den Verbindungsklassen Vinylpyrrolidon, Sulfoxide, Phenole, Schwermetalle, Tenside, Metallnanopartikel und Peptide und deren binärer Mischungen können gezeigt werden. Die Bestimmung von toxikologischen Schwellenwerten wie der EC50 erfolgt aus den Dosis-Wirkungskurven für die Einzelsubstanzen und der binären Gemische. Es wurden bei unterschiedlichen Effektorkombinationen sowohl additive als auch synergistische Wirkweisen für die Substanzgemische auf das biologische System nachgewiesen.
- Die in den Einzelwirkungsscreenings als untoxisch gefundenen Goldnanopartikel führten in der Kombination mit Xenobiotika zu einer Verstärkung der Wirkung.
- Die Einzelwirkungsscreenings unterschiedlicher Silbernanopartikel zeigten größen- und formabhängige Wirkungen, welche in binärer Mischung mit Xenobiotika zu unterschiedlichen Wirkweisen führten.
- Der Einsatz von Testsubstanzen mit ähnlichen Wirkmechanismen, wie die untersuchten Phenole, führte in binärer Mischung nicht zwingend zu gleichen Wirkweisen.

---

## 5 Literaturverzeichnis

- [1] Funfak, A.; Brosing, A.; Brand, M.; Kohler, J. M. *Lab on a Chip* **2007**, 7, 1132-1138.
- [2] Funfak, A.; Hartung, R.; Cao, J.; Martin, K.; Wiesmüller, K.-H.; Wolfbeis, O. S.; Köhler, J. M. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, 142, 66-72.
- [3] Funfak, A.; Cao, J. L.; Wolfbeis, O.; Martin, K.; Kohler, J. *Microchimica Acta* **2009**, 164, 279-286.
- [4] Koch, R. *Umweltchemikalien*; Weinheim: VCH, **1995**.
- [5] Fomin, A., Oehlmann, J., Merkert, B. *Praktikum der Ökotoxikologie*; Landsberg: ecomed, **2003**.
- [6] Fent, K. *Ökotoxikologie*; Stuttgart: Thieme, **1998**.
- [7] Alloway, B. J., Ayres, D.C.: *Schadstoffe in der Umwelt*; Spektrum Akademischer Verlag, **1996**.
- [8] Marquardt, H., Schäfer, S.G. *Lehrbuch der Toxikologie*; Wissenschaftsverlag BI, **1994**.
- [9] Radojević, M., Baskin, V.N. *Practical environmental analysis*; Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1999**.
- [10] Hein, H., Kunze, W. *Umweltanalytik mit Spektrometrie und Chromatographie*; Weinheim: Wiley-VCH, 3. Auflage, **2004**.
- [11] Henze, G., Koehler J.M., Lay, J.P. *Umweltdiagnostik mit Mikrosystemen*; Weinheim: Wiley-VHC, **1999**.
- [12] Grimme, L. H., Altenburger, R., Backhaus, T., Faust, M., Boedeker, W., Scholze, M. *UWSF-Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie* **2000**, 12, 226-234.
- [13] Jacobi, H., Witte, I. *UWSF-Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie* **1995**, 7, 256-260.
- [14] Müller-Herold, U., Scheringer, M. Zur Umweltgefährdungsbewertung von Schadstoffen und Schadstoffkombinationen durch Reichweiten und Persistenzanalyse; Europäische Akademie zur Erforschung von Folgen wissenschaftlich-technischer Entwicklungen **1999**; Vol. 18.
- [15] Zakrzewski, S. F. *Principles of Environmental Toxicology*; American Chemical Society, second edition: Washington DC, **1997**.
- [16] Mumatz, M. M.; Sipes, I. G.; Clewell, H. J.; Yang, R. S. H. *Fundamental and Applied Toxicology* **1993**, 21, 258-269.
- [17] Hassanien, M. A. New Versus Classic Approaches for Chemical Risk Assessment and Management. In *Exposure and Risk Assessment of Chemical Pollution — Contemporary Methodology*, 2009; pp 1-14.
- [18] Helma, C.; Knasmüller, S.; Schulte-Hermann, R. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* **1994**, 6, 277-288.
- [19] Richardson, M. *Environmental Xenobiotics*; Taylor & Francis, **1996**.
- [20] Fritsche, W. *Umweltmikrobiologie*; Gustav Fischer Verlag, **1998**.
- [21] Jones, K. C.; de Voogt, P. *Environmental Pollution* **1999**, 100, 209-221.

- [22] Ternes, T. A., Knacker, T., Oehlmann, J. *UWSF-Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie* **2003**, *15*, 169-180.
- [23] Fairbrother, A.; Fairbrother, J. R. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2009**, *72*, 1327-1330.
- [24] Lyddy, R.; Philip, W.; Associate, E.; Steve, G. G. Nanotechnology. In *Information Resources in Toxicology (Fourth Edition)*; Academic Press: San Diego, 2009; pp 321-328.
- [25] Bennett, G. F. *Journal of Hazardous Materials* **2007**, *140*, 405-406.
- [26] Rickerby, D. G.; Morrison, M. *Science and Technology of Advanced Materials*, *8*, 19-24.
- [27] Handy, R.; Whitt, M.; Rodriguez, M.; Jackson, M. J.; Waqar, A.; Mark, J. J. Environmental and Occupational Health Issues with Nanoparticles. In *Emerging Nanotechnologies for Manufacturing*; William Andrew Publishing: Boston pp 235-250.
- [28] Wang, R. G. M. *Water contamination and health*; Marcel Dekker, Inc. : New York, **1994**.
- [29] Curry, P. B., Ivengar, S., Maloney P.A., Maroni, M. NATO Committee on the Challenges of Modern Society, Plenum Press, New York **1995**.
- [30] Feron, V. J.; Groten, J. P.; Jonker, D.; Cassee, F. R.; vanBladeren, P. J. *Toxicology* **1995**, *105*, 415-427.
- [31] Loewe, S., Muischnek, H. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. **1926**, 114.
- [32] Bliss, C. I. *Ann. Appl. Biol.* **1936**, *26*, 585-615.
- [33] Altenburger, R.; Greco, W. R. Integrated Environmental Assessment and Management **2009**, *5*, 62-68.
- [34] Hermens, J.; Canton, H.; Steyger, N.; Wegman, R. *Aquatic Toxicology* **1984**, *5*, 315-322.
- [35] Grimme, L. H.; Faust, M.; Boedecker, W.; Altenburger, R. *Human and Ecological Risk Assessment* **1996**, *2*, 426-433.
- [36] Berenbaum, M. C. *Environmental Research* **1985**, *38*, 310-318.
- [37] Berenbaum, M. C. *Journal of Theoretical Biology* **1985**, *114*, 413-431.
- [38] Berenbaum, M. C. *Pharmacological Reviews* **1989**, *41*, 93-141.
- [39] Streffer, C., Bücker, J., Cansier, C., Gethmann, C.F., Guderian, R., Hanekamp, G., Henschler, D., Pösch G., Rehbindler E., Renn O., Slesina M., Wuttke K., *Kombinierte Exposition und ihre Auswirkung auf den Menschen und seine Umwelt.*; Springer Verlag, **2000**.
- [40] Boedecker, W., Altenburger, R., Faust, M., Grimme, L.H. *Archives of Complex Environmental Studies* **1992**, *4*, 45-53.
- [41] Greco, W., Unkelbach, H.-D., Pösch, G., Sühnel, J., Kundi, M., Bödecker, W. *The Saariselkä agreement. Archives of Complex Environmental Studies.* **1992**, *4*, 65-69.
- [42] Grimme, L. H., Altenburger, R., Backhaus T., Bödecker, W., Faust, M., Scholze, M. "Vorhersagbarkeit und Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen," UFZ -Bericht, 1998.

- 
- [43] Tiedge, O.; Dissertation, Universität Würzburg, 2008.
- [44] Colby, S. R. *Weeds* **1967**, *15*, 20-&.
- [45] Colby, S. R.; Feeny, R. W. *Weeds* **1967**, *15*, 163-&.
- [46] Plackett, R. L.; Hewlett, P. S. *Annals of Applied Biology* **1948**, *35*, 347-358.
- [47] Sprague, J. B. *Water Research* **1970**, *4*, 3-32.
- [48] Marking, L. L. American Society for Testing and Materials, Philadelphia **1977**, 634, 99-108.
- [49] Groten, J. P.; Feron, V. J.; Suhnel, J. *Trends in Pharmacological Sciences* **2001**, *22*, 316-322.
- [50] Rayleigh, L. *Proc. R. Soc. Lond.* **1879**, *29*, 71-97.
- [51] Taylor, G. I. Proceedings of the Royal Society of London. Series A **1934**, *146*, 501-523.
- [52] Skeggs, L. T. American Journal of Clinical Pathology **1957**, *28*, 311-322.
- [53] Hsieh, Y. S.; Crouch, S. R. *Analytica Chimica Acta* **1995**, *303*, 231-239.
- [54] Song, H.; Chen, D. L.; Ismagilov, R. F. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 7336-7356.
- [55] Kohler, J. M.; Kirner, T. *Sensors and Actuators a-Physical* **2005**, *119*, 19-27.
- [56] Teh, S. Y.; Lin, R.; Hung, L. H.; Lee, A. P. *Lab on a Chip* **2008**, *8*, 198-220.
- [57] Shoji, S.; Esashi, M. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **1994**, *4*, 157-171.
- [58] Stone, H. A.; Stroock, A. D.; Ajdari, A. *Annual Review of Fluid Mechanics* **2004**, *36*, 381-411.
- [59] Haeberle, S.; Zengerle, R. *Lab on a Chip* **2007**, *7*, 1094-1110.
- [60] Ward, T.; Faivre, M.; Abkarian, M.; Stone, H. A. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3716-3724.
- [61] Serra, C.; Berton, N.; Bouquey, M.; Prat, L.; Hadziioannou, G. *Langmuir* **2007**, *23*, 7745-7750.
- [62] Ren, H.; Fair, R. B.; Pollack, M. G. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2004**, *98*, 319-327.
- [63] Gross, G. A.; Thyagarajan, V.; Kielpinski, M.; Henkel, T.; Kohler, J. M. *Microfluidics and Nanofluidics* **2008**, *5*, 281-287.
- [64] Anna, S. L.; Mayer, H. C. *Physics of Fluids* **2006**, *18*.
- [65] Henkel, T.; Bermig, T.; Kielpinski, M.; Grodrian, A.; Metze, J.; Kohler, J. M. *Chemical Engineering Journal* **2004**, *101*, 439-445.
- [66] Schumacher, J. T.; Grodrian, A.; Kremin, C.; Hoffmann, M.; Metze, J. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2008**, *18*.
- [67] Kohler, J. M.; Henkel, T.; Grodrian, A.; Kirner, T.; Roth, M.; Martin, K.; Metze, J. *Chemical Engineering Journal* **2004**, *101*, 201-216.
- [68] Liu, K.; Ding, H. J.; Chen, Y.; Zhao, X. Z. *Microfluidics and Nanofluidics* **2007**, *3*, 239-243.
-

- [69] Baroud, C. N.; de Saint Vincent, M. R.; Delville, J. P. *Lab on a Chip* **2007**, *7*, 1029-1033.
- [70] Poe, S. L.; Cummings, M. A.; Haaf, M. R.; McQuade, D. T. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 1544-1548.
- [71] Gunther, P. M.; Moller, F.; Henkel, T.; Kohler, J. M.; Gross, G. A. *Chemical Engineering & Technology* **2005**, *28*, 520-527.
- [72] Dubois, P.; Marchand, G.; Fouillet, Y.; Berthier, J.; Douki, T.; Hassine, F.; Gmouh, S.; Vaultier, M. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 4909-4917.
- [73] Shestopalov, I.; Tice, J. D.; Ismagilov, R. F. *Lab on a Chip* **2004**, *4*, 316-321.
- [74] Hung, L. H.; Choi, K. M.; Tseng, W. Y.; Tan, Y. C.; Shea, K. J.; Lee, A. P. *Lab on a Chip* **2006**, *6*, 174-178.
- [75] Frenz, L.; El Harrak, A.; Pauly, M.; Begin-Colin, S.; Griffiths, A. D.; Baret, J. C. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 6817-6820.
- [76] Gross, G. A.; Hamann, C.; Gunther, M.; Kohler, J. M. *Chemical Engineering & Technology* **2007**, *30*, 341-346.
- [77] Zhang, H.; Tumarkin, E.; Peerani, R.; Nie, Z.; Sullan, R. M. A.; Walker, G. C.; Kumacheva, E. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 12205-12210.
- [78] Nie, Z. H.; Li, W.; Seo, M.; Xu, S. Q.; Kumacheva, E. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 9408-9412.
- [79] Glaser, N.; Adams, D. J.; Boker, A.; Krausch, G. *Langmuir* **2006**, *22*, 5227-5229.
- [80] Nie, Z. H.; Xu, S. Q.; Seo, M.; Lewis, P. C.; Kumacheva, E. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 8058-8063.
- [81] Adamson, D. N.; Mustafi, D.; Zhang, J. X. J.; Zheng, B.; Ismagilov, R. F. *Lab on a Chip* **2006**, *6*, 1178-1186.
- [82] Song, H.; Ismagilov, R. F. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 14613-14619.
- [83] Engl, W.; Tachibana, M.; Colin, A.; Panizza, P. *Chemical Engineering Science* **2008**, *63*, 1692-1695.
- [84] Hsieh, Y. S.; Crouch, S. R. *Analytica Chimica Acta* **1993**, *284*, 159-166.
- [85] Tawfik, D. S.; Griffiths, A. D. *Nature Biotechnology* **1998**, *16*, 652-656.
- [86] Taniguchi, T.; Torii, T.; Higuchi, T. *Lab on a Chip* **2002**, *2*, 19-23.
- [87] Huebner, A.; Srisa-Art, M.; Holt, D.; Abell, C.; Hollfelder, F.; Demello, A. J.; Edel, J. B. *Chemical Communications* **2007**, 1218-1220.
- [88] Huebner, A.; Bratton, D.; Whyte, G.; Yang, M.; Demello, A. J.; Abell, C.; Hollfelder, F. *Lab Chip* **2009**, *9*, 692-698.
- [89] Huebner, A.; Olguin, L. F.; Bratton, D.; Whyte, G.; Huck, W. T. S.; de Mello, A. J.; Edel, J. B.; Abell, C.; Hollfelder, F. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 3890-3896.
- [90] He, M. Y.; Edgar, J. S.; Jeffries, G. D. M.; Lorenz, R. M.; Shelby, J. P.; Chiu, D. T. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 1539-1544.
- [91] Joensson, H. N.; Samuels, M. L.; Brouzes, E. R.; Medkova, M.; Uhlen, M.; Link, D. R.; Andersson-Svahn, H. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 2518-2521.

- 
- [92] Aharoni, A.; Griffiths, A. D.; Tawfik, D. S. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, *9*, 210-216.
- [93] Leemhuis, H.; Stein, V.; Griffiths, A. D.; Hollfelder, F. *Current Opinion in Structural Biology* **2005**, *15*, 472-478.
- [94] Dittrich, P. S.; Jahnz, M.; Schwille, P. *ChemBiochem* **2005**, *6*, 811-+.
- [95] Frenz, L.; Blank, K.; Brouzes, E.; Griffiths, A. D. *Lab on a Chip* **2009**, *9*, 1344-1348.
- [96] Srisa-Art, M.; Dyson, E. C.; Demello, A. J.; Edel, J. B. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 7063-7067.
- [97] Rane, T. D.; Puleo, C. M.; Liu, K. J.; Zhang, Y.; Lee, A. P.; Wang, T. H. *Lab on a Chip*.
- [98] Roach, L. S.; Song, H.; Ismagilov, R. F. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 785-796.
- [99] Martin, K.; Henkel, T.; Baier, V.; Grodrian, A.; Schon, T.; Roth, M.; Kohler, J. M.; Metze, J. *Lab on a Chip* **2003**, *3*, 202-207.
- [100] Grodrian, A.; Metze, J.; Henkel, T.; Martin, K.; Roth, M.; Kohler, J. M. *Biosensors & Bioelectronics* **2004**, *19*, 1421-1428.
- [101] Boedicker, J. Q.; Li, L.; Kline, T. R.; Ismagilov, R. F. *Lab on a Chip* **2008**, *8*, 1265-1272.
- [102] Liu, W. S.; Kim, H. J.; Lucchetta, E. M.; Du, W. B.; Ismagilov, R. F. *Lab on a Chip* **2009**, *9*, 2153-2162.
- [103] Clausell-Tormos, J.; Lieber, D.; Baret, J. C.; El-Harrak, A.; Miller, O. J.; Frenz, L.; Blouwolff, J.; Humphry, K. J.; Koster, S.; Duan, H.; Holtze, C.; Weitz, D. A.; Griffiths, A. D.; Merten, C. A. *Chemistry & Biology* **2008**, *15*, 427-437.
- [104] Brouzes, E.; Medkova, M.; Savenelli, N.; Marran, D.; Twardowski, M.; Hutchison, J. B.; Rothberg, J. M.; Link, D. R.; Perrimon, N.; Samuels, M. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 14195-14200.
- [105] Hufnagel, H.; Huebner, A.; Gulch, C.; Guse, K.; Abell, C.; Hollfelder, F. *Lab Chip* **2009**, *9*, 1576-1582.
- [106] Shoffner, M. A.; Cheng, J.; Hvichia, G. E.; Kricka, L. J.; Wilding, P. *Nucleic Acids Research* **1996**, *24*, 375-379.
- [107] Lee, C. Y.; Lee, G. B.; Liu, H. H.; Huang, F. C. *International Journal of Nonlinear Sciences and Numerical Simulation* **2002**, *3*, 215-218.
- [108] Endo, Y.; Otsuzuki, S.; Ito, K.; Miura, K. *Journal of Biotechnology* **1992**, *25*, 221-230.
- [109] Kopp, M. U.; de Mello, A. J.; Manz, A. *Science* **1998**, *280*, 1046-1048.
- [110] Schneegass, I.; Kohler, J. M. *J Biotechnol* **2001**, *82*, 101-121.
- [111] Fei, S.; Sule, O.; Krishnendu, C. *ACM Trans. Des. Autom. Electron. Syst.* **2006**, *11*, 442-464.
- [112] Schneegass, I.; Brautigam, R.; Kohler, J. M. *Lab on a Chip* **2001**, *1*, 42-49.
- [113] Curcio, M.; Roeraade, J. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 1-7.
- [114] Wang, W.; Li, Z. X.; Luo, R.; Lu, S. H.; Xu, A. D.; Yang, Y. J. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2005**, *15*, 1369-1377.
-

- [115] Felbel, J.; Reichert, A.; Kielpinski, A.; Urban, M.; Henkel, T.; Hafner, N.; Durst, M.; Weber, J. *Chemical Engineering Journal* **2008**, *135*, S298-S302.
- [116] Felbel, J.; Reichert, A.; Kielpinski, M.; Urban, M.; Hafner, N.; Durst, M.; Kohler, J. M.; Weber, J.; Henkel, T. *Engineering in Life Sciences* **2008**, *8*, 68-72.
- [117] Hartung, R.; Brosing, A.; Sczcepankiewicz, G.; Liebert, U.; Hafner, N.; Durst, M.; Felbel, J.; Lassner, D.; Kohler, J. M. *Biomedical Microdevices* **2009**, *11*, 685-692.
- [118] Zheng, B.; Gerdts, C. J.; Ismagilov, R. F. *Current Opinion in Structural Biology* **2005**, *15*, 548-555.
- [119] Xu, T.; Thwar, P.; Srinivasan, V.; Pamula, V. K.; Chakrabarty, K. *2007 Ieee/Nih Life Science Systems and Applications Workshop* **2007**, 140-143.
- [120] Lau, B. T. C.; Baitz, C. A.; Dong, X. P.; Hansen, C. L. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 454-455.
- [121] Chen, D. L. L.; Li, L.; Reyes, S.; Adamson, D. N.; Ismagilov, R. F. *Langmuir* **2007**, *23*, 2255-2260.
- [122] Kohler, J. M.; Henkel, T. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2005**, *69*, 113-125.
- [123] Shi, W. W.; Qin, J. H.; Ye, N. N.; Lin, B. C. *Lab on a Chip* **2008**, *8*, 1432-1435.
- [124] Niggemann, M.; Ehrfeld, W.; Weber, L.; Gunther, R.; Sollbohrer, O. *Microsystem Technologies* **1999**, *6*, 48-53.
- [125] White, R. E. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2000**, *40*, 133-157.
- [126] Schmitz, R. P. H.; Eisenträger, A.; Dott, W. *Journal of Microbiological Methods* **1998**, *31*, 159-166.
- [127] Eisentraeger, A.; Dott, W.; Klein, J.; Hahn, S. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2003**, *54*, 346-354.
- [128] Cao, J. "Diplomarbeit, Nanodiagnostik in Fluidsystemen: Optische pH-Auslese in Nanoliterfluidsegmenten," 2008.
- [129] Holler, S., Schaefer, C., Sonnenberg, J. *Umweltanalytik und Ökotoxikologie*; Springer Verlag: Berlin, **1996**.
- [130] Vasylevska, G. S.; Borisov, S. M.; Krause, C.; Wolfbeis, O. S. *Chemistry of Materials* **2006**, *18*, 4609-4616.
- [131] Kocincova, A. S.; Borisov, S. M.; Krause, C.; Wolfbeis, O. S. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 8486-8493.
- [132] Kayser, F. H., Böttger, E.C., Zinkernagel, R.M. *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*; Thieme Verlag: Stuttgart, **2005**.
- [133] Kensy, F.; John, G. T.; Hofmann, B.; Buchs, J. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2005**, *28*, 75-81.
- [134] Zguris, J.; Pishko, M. V. *Sensor Letters* **2005**, *3*, 206-210.
- [135] Kvitek, L.; Pucek, R.; Panacek, A.; Novotny, R.; Hrbac, J.; Zboril, R. *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15*, 1099-1105.
- [136] Kvitek, L.; Vanickova, M.; Panacek, A.; Soukupova, J.; Dittrich, M.; Valentova, E.; Pucek, R.; Bancirova, M.; Milde, D.; Zboril, R. *Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, 4296-4300.

- 
- [137] Seidenberger, H.; Schonenberger, H.; Beck, W.; Girnthweller, M.; Ruckdeschel, G. *Archiv Der Pharmazie* **1984**, *317*, 760-767.
- [138] Sherman, F. Getting started with yeast. In *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Pt B*; Academic Press Inc: San Diego, 2002; Vol. 350, pp 3-41.
- [139] Kessler, E. *Naturwissenschaften* **1992**, *79*, 260-265.
- [140] Koenig, K.; Schneckenburger, H. *Journal of Fluorescence* **1994**, *4*, 17-40.
- [141] Billinton, N.; Knight, A. W. *Analytical Biochemistry* **2001**, *291*, 175-197.
- [142] Hasan, M. T.; Schonig, K.; Berger, S.; Graewe, W.; Bujard, H. *Genesis* **2001**, *29*, 116-122.
- [143] Cypionka, H. *Grundlagen der Mikrobiologie*; 3. ed.; Springer Verlag: Berlin Heidelberg New York, **2005**.
- [144] Urlinger, S.; Baron, U.; Thellmann, M.; Hasan, M. T.; Bujard, H.; Hillen, W. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 7963-7968.
- [145] Gossen, M.; Bujard, H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, *89*, 5547-5551.
- [146] Baron, U.; Bujard, H. Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: Principles and advances. In *Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins Pt B*; Academic Press Inc: San Diego, 2000; Vol. 327, pp 401-421.
- [147] Perfetto, S. P.; Chattopadhyay, P. K.; Lamoreaux, L.; Nguyen, R.; Ambrozak, D.; Koup, R. A.; Roederer, M. *J. Immunol. Methods* **2006**, *313*, 199-208.
- [148] Burmeister, Y.; Lischke, T.; Dahler, A. C.; Mages, H. W.; Lam, K. P.; Coyle, A. J.; Kroczeck, R. A.; Hutloff, A. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 774-782.
- [149] Chokshi, T. V.; Ben-Yakar, A.; Chronis, N. *Lab Chip* **2009**, *9*, 151-157.
- [150] Kitano, H.; Hamahashi, S.; Luke, S. *Artif. Life* **1998**, *4*, 141-156.
- [151] Geng, W.; Cosman, P.; Palm, M.; Schafer, W. R. *EURASIP J Appl. Signal Process.* **2005**, *2005*, 2229-2240.
- [152] Jorgensen, E. M.; Mango, S. E. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 356-369.
- [153] Kimmel, C. B.; Ballard, W. W.; Kimmel, S. R.; Ullmann, B.; Schilling, T. F. *Developmental Dynamics* **1995**, *203*, 253-310.
- [154] Craig, M. P.; Gilday, S. D.; Hove, J. R. *Lab Anim.* **2006**, *35*, 41-47.
- [155] Bauchrowitz, M. *Eawag News* **2008**, *64d*.
- [156] Dahm, R. *Max Planck Forschung* **2005**, *4*.
- [157] Brosing A., K. J. M. In *12. Heiligenstädter Kolloquium*; Institut für Bioprocess- und Analysemesstechnik e.V. (IBA) Heiligenstadt, 2004.
- [158] Brosing A., K. J. M. In IOMP's 14<sup>th</sup> International Conference of Medical Physics and 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Biomedical Engineering (DGBMT): Nuernberg, 2005.
- [159] Shen, Y. C.; Li, D.; Al-Shoaibi, A.; Bersano-Begey, T.; Chen, H.; Ali, S.; Flak, B.; Perrin, C.; Winslow, M.; Shah, H.; Ramamurthy, P.; Schmedlen, R. H.; Takayama, S.; Barald, K. F. *Zebrafish* **2009**, *6*, 201-213.
-

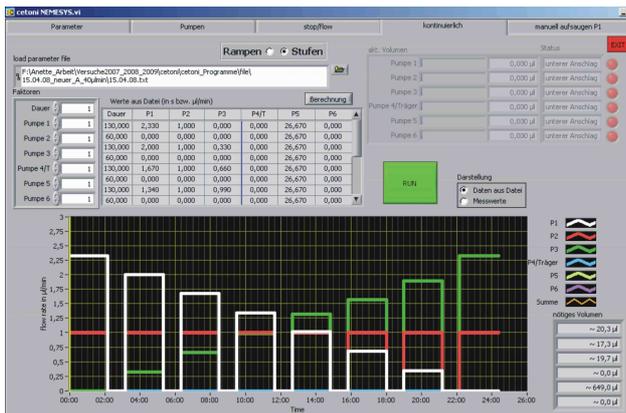
- [160] Noori, A.; Selvaganapathy, P. R.; Wilson, J. *Lab Chip* **2009**, *9*, 3202-3211.
- [161] Son, S. U.; Garrell, R. L. *Lab Chip* **2009**, *9*, 2398-2401.
- [162] Hope, I. A. *C. elegans: A Practical Approach*; Oxford University Press: Oxford, **1999**.
- [163] Burgess, S.; Reim, G.; Chen, W. B.; Hopkins, N.; Brand, M. *Development* **2002**, *129*, 905-916.
- [164] Kataranovski, M.; Vlaski, M.; Kataranovski, D. *Journal of Toxicology-Cutaneous and Ocular Toxicology* **2004**, *23*, 263-275.
- [165] Martin, K., Lemke, K., Henkel, T., Grodrian, A., Köhler, J. M., Metze J., Roth, M. *BIOspektrum* **2006**, *12. Jahrgang*, 743-745.
- [166] Veit, A. "Untersuchung zum Überflussmetabolismus in *Escherichia coli*," Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie, 4199, 2005.
- [167] Crane, M. M. *Lab - on - a - Chip* **2009**, *9*, 38-40.
- [168] Grigg, G. W. *Mol. Gen. Genet.* **1970**, *106*, 228-&.
- [169] Ramanaviciene, A., Mostovojus, V., Bachmatova, I., Ramanavicius, A. *Acta Medica Lituanica* **2003**, *4*.
- [170] Chen, J.; Jiang, J.; Zhang, F.; Yu, H.; Zhang, J. *Cell Biol. Toxicol.* **2004**, *20*, 183-196.
- [171] Sinclair, G. M.; Paton, G. I.; Meharg, A. A.; Killham, K. *Fems Microbiology Letters* **1999**, *174*, 273-278.
- [172] Tiensing, T.; Strachan, N.; Paton, G. I. *Journal of Environmental Monitoring* **2002**, *4*, 482-489.
- [173] Hakura, A.; Mochida, H.; Yamatsu, K. *Mutation Research* **1993**, *303*, 127-133.
- [174] Yang, Z. R. W.; Tendian, S. W.; Carson, W. M.; Brouillette, W. J.; Delucas, L. J.; Brouillette, C. G. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 830-841.
- [175] Mueller, G.; Kramer, A. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2008**, *61*, 1281-1287.
- [176] Notley-McRobb, L.; Pinto, R.; Seeto, S.; Ferenci, T. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 739-745.
- [177] Gage, D. J.; Neidhardt, F. C. *Journal of Bacteriology* **1993**, *175*, 7105-7108.
- [178] Heagy, F. C. *Journal of Bacteriology* **1950**, *59*, 367-373.
- [179] Hong, S. Y.; Oh, J. E.; Kwon, M. Y.; Choi, M. J.; Lee, J. H.; Lee, B. L.; Moon, H. M.; Lee, K. H. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**, *42*, 2534-2541.
- [180] Fraysse, B.; Mons, R.; Garric, J. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2006**, *63*, 253-267.
- [181] Bachmann, J. In *Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften*; TU Dresden: Dresden, 2002.
- [182] Nagel, R. *Altex-Alternativen Zu Tierexperimenten* **2002**, *19*, 38-48.
- [183] Martin, D. S. *J. Gen. Physiol.* **1932**, *15*, 691-708.
- [184] Hultberg, B.; Andersson, A.; Isaksson, A. *Toxicology* **1998**, *126*, 203-212.
- [185] Gartner, M.; Sunder-Plassmann, N.; Seiler, J.; Utz, M.; Vernos, I.; Surrey, T.; Giannis, A. *Chembiochem* **2005**, *6*, 1173-+.

- 
- [186] Yan, Y. W.; Sardana, V.; Xu, B.; Homnick, C.; Halczenko, W.; Buser, C. A.; Schaber, M.; Hartman, G. D.; Huber, H. E.; Kuo, L. C. *Journal of Molecular Biology* **2004**, *335*, 547-554.
- [187] Jonker, M. J.; Svendsen, C.; Bedaux, J. J. M.; Bongers, M.; Kammenga, J. E. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2005**, *24*, 2701-2713.
- [188] Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, *73*, 1712-1720.
- [189] Hwang, E. T.; Lee, J. H.; Chae, Y. J.; Kim, Y. S.; Kim, B. C.; Sang, B. I.; Gu, M. B. *Small* **2008**, *4*, 746-750.
- [190] Niazi, J. H.; Gu, M. B. Toxicity of Metallic Nanoparticles in Microorganisms- a Review. In *Atmospheric and Biological Environmental Monitoring*, 2009; pp 193-206.
- [191] Gajjar, P.; Pettee, B.; Britt, D. W.; Huang, W.; Johnson, W. P.; Anderson, A. J. *J Biol Eng* **2009**, *3*, 9.
- [192] Baun, A.; Sorensen, S. N.; Rasmussen, R. F.; Hartmann, N. B.; Koch, C. B. *Aquatic Toxicology* **2008**, *86*, 379-387.
- [193] Wangoo, N.; Bhasin, K. K.; Boro, R.; Suri, C. R. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *610*, 142-148.
- [194] Tom, R. T.; Suryanarayanan, V.; Reddy, P. G.; Baskaran, S.; Pradeep, T. *Langmuir* **2004**, *20*, 1909-1914.
- [195] Duan, C. F.; Cui, H.; Zhang, Z. F.; Liu, B.; Guo, J. Z.; Wang, W. *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 4561-4566.
- [196] Sezgin E., K. O. F., Cam D., Sur I., Sayin I. , Avci E., Keseroglu K., Sulek S. , Çulha M. *Journal of Engineering and Natural Sciences* **2008**, *26*, 227-246.
- [197] Browning L.M., L. K. J., Huang T., Nallathamby P. D. , Lowman J. E., Xu X-H. N. *Nanoscale* **2009**, *1*, 138 - 152.
- [198] Goodman, C. M.; McCusker, C. D.; Yilmaz, T.; Rotello, V. M. *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15*, 897-900.
- [199] Gogoi, S. K.; Gopinath, P.; Paul, A.; Ramesh, A.; Ghosh, S. S.; Chattopadhyay, A. *Langmuir* **2006**, *22*, 9322-9328.
- [200] Kim, J. S.; Kuk, E.; Yu, K. N.; Kim, J. H.; Park, S. J.; Lee, H. J.; Kim, S. H.; Park, Y. K.; Park, Y. H.; Hwang, C. Y.; Kim, Y. K.; Lee, Y. S.; Jeong, D. H.; Cho, M. H. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2007**, *3*, 95-101.
- [201] Ruparelia, J. P.; Chatterjee, A. K.; Duttagupta, S. P.; Mukherji, S. *Acta Biomaterialia* **2008**, *4*, 707-716.
- [202] Zhu, B. Z.; Shechtman, S.; Chevion, M. *Chemosphere* **2001**, *45*, 463-470.
- [203] Jacobi, H.; Metzger, J.; Witte, I. *Free Radical Research Communications* **1992**, *16*, 123-130.
- [204] Ribo, J. M.; Rogers, F. *Toxicity Assessment* **1990**, *5*, 135-152.
- [205] Escher, B. I.; Hunziker, R. W.; Schwarzenbach, R. P. *Environmental Science & Technology* **2001**, *35*, 3905-3914.
- [206] Holm, T. R.; George, G. K.; Barcelona, M. J. *Ground Water Monitoring and Remediation* **1988**, *8*, 83-89.
-

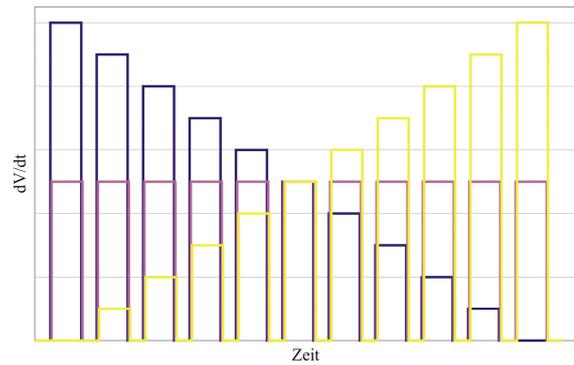
## 6 Anhang

### 6.1 Versuchsprotokolle und Programme

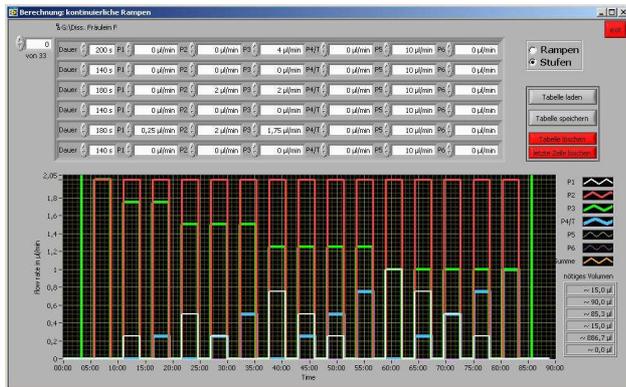
#### 6.1.1 LabVIEW-Programme für die Konzentrationseinstellung im Mikrofluidsegment



a-1<sup>a</sup>



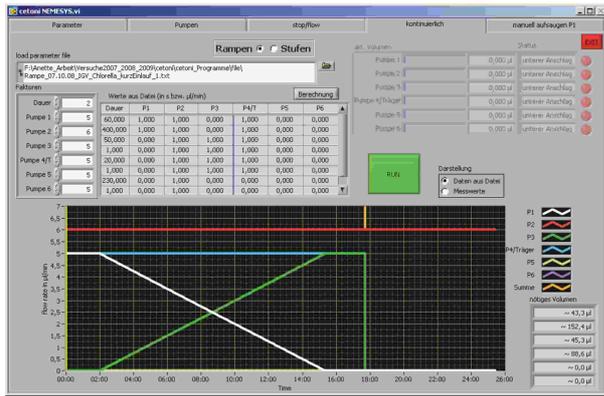
a-2



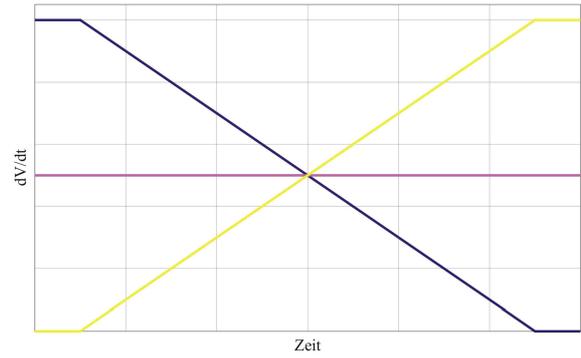
b-1<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Rote Linie: Zellsuspension, grüne Linie: Wirkstoff, Weiße Linie: Zellmedium

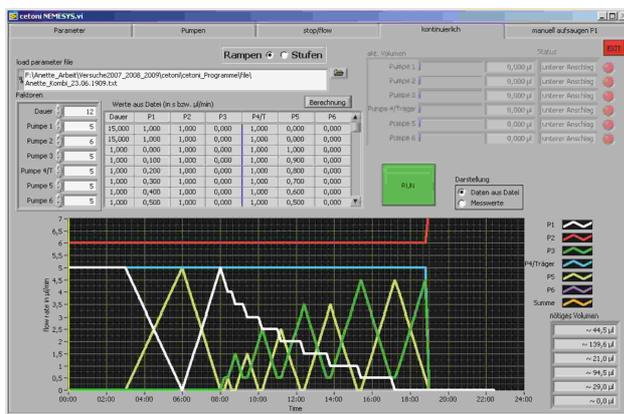
<sup>b</sup> Rote Linie: Zellsuspension, grüne Linie: Wirkstoff 1, Weiße Linie: Zellmedium, blaue Linie: Wirkstoff 2



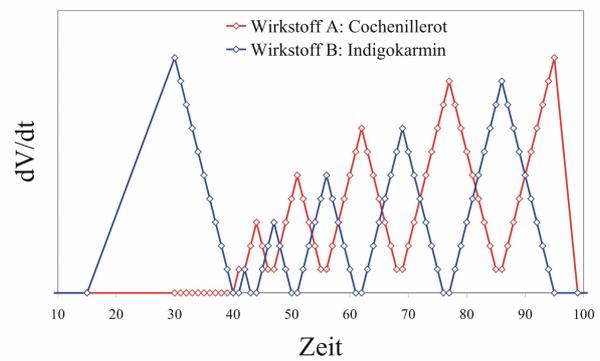
c-1<sup>c</sup>



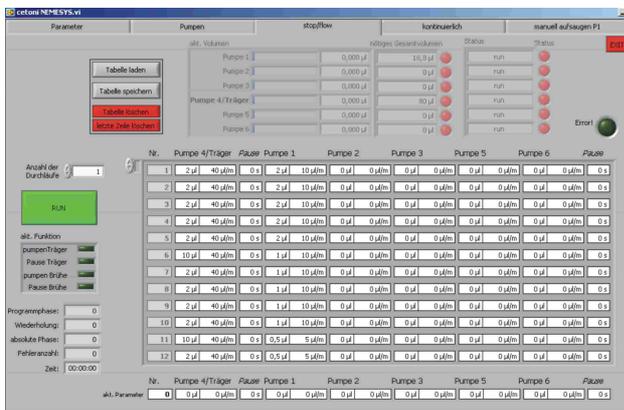
c-2



d-1<sup>d</sup>



d-2



e

**Abb. 6-1:** LabVIEW-Programme zur semikontinuierlichen und kontinuierlichen Konzentrationseinstellung in Mikrofluidsegmenten. **a-1)** Blockprogramm für Einzelwirkungsscreenings. **a-2)** Darstellung a-1 in Excel **b-1)** Blockprogramm für das Effektscreening binärer Gemische. **c-1)** Rampenprogramm für Einzelwirkungsscreenings. **c-2)** Darstellung c-1 in Excel **d-2)** Rampenprogramm für das Effektscreening binärer Gemische. **d-1)** Darstellung d-1 in Excel. **e)** LabVIEW-Programm für Stop-Flow Segmenterzeugung.

<sup>c</sup> Blaue Linie: Zellsuspension, grüne Linie: Wirkstoff, weiße Linie: Zellmedium

<sup>d</sup> Blaue Linie: Zellsuspension, grüne Linie: Wirkstoff 1, weiße Linie: Zellmedium, gelbe Linie: Wirkstoff 2

### 6.1.2 Protokoll: Untersuchung des Einflusses des synthetischen Nährmediums auf die optischen Eigenschaften von Metallnanopartikeln

**Tabelle 6-1:** Zusammensetzung Probenansatz

| Metallnanopartikel                             |                                |                                   |
|--|--------------------------------|-----------------------------------|
| Silbernanopartikel → braun/gelb                |                                |                                   |
| Goldnanopartikel → Alter Ansatz, Neuer Ansatz  |                                |                                   |
| Probe  | Lösungsmittel                  | Konzentration                     |
| Ansatz A1<br>(AgNP (gelb))                     | 500 µl synthetisches<br>Medium | 500 µl 40 µM AgNO <sub>3</sub>    |
| Referenz A1                                    | 500 µl dest. Wasser            | 500 µl 40 µM AgNO <sub>3</sub>    |
| Ansatz A2<br>(AgNP (braun))                    | 500 µl synthetisches<br>Medium | 500 µl 0,1 mM AgNO <sub>3</sub>   |
| Referenz A2                                    | 500 µl dest. Wasser            | 500 µl 0,1 mM AgNO <sub>3</sub>   |
| A3<br>(AuNP (50))                              | 500 µl synthetisches<br>Medium | 500 µl 0,14 mM HAuCl <sub>4</sub> |
| Referenz A3                                    | 500 µl dest. Wasser            | 500 µl 0,14 mM HAuCl <sub>4</sub> |
| A4<br>(AuNP (30))                              | 500 µl synthetisches<br>Medium | 500 µl 0,14 mM HAuCl <sub>4</sub> |
| Referenz A4                                    | 500 µl dest. Wasser            | 500 µl 0,14 mM HAuCl <sub>4</sub> |
| Ansatz 4_neu<br>AuNP frischer Ansatz(30)       | 500 µl synthetisches<br>Medium | 500 µl 0,25 mM HAuCl <sub>4</sub> |
| Referenz 4_neu                                 | 500 µl dest. Wasser            | 500 µl 0,25 mM HAuCl <sub>4</sub> |
| <b>Versuchsbedingung:</b>                      |                                |                                   |
| Eingesetzte Küvetten: UV-Küvetten (Brand GmbH) |                                |                                   |
| Messzeitpunkt: 0h, 24h, 48h                    |                                |                                   |
| Hintergrund Referenz: dest. Wasser             |                                |                                   |
| Hintergrund Probe: dest. Wasser                |                                |                                   |
| <b>Prozessparameter Specordmessung:</b>        |                                |                                   |
| Scanmode: 220-900nm                            | Speed [nm/s]: 50               |                                   |
| Delta lambda [nm]: 1                           | Integrationtime: 0,02          |                                   |
| Speed [nm/s]: 50                               | Correction: Standard           |                                   |
| Integrationtime: 0,02                          | Device: online display on      |                                   |
| Prozessparameter Specordmessung:               | Wavelength: 600 nm             |                                   |
| Scanmode: 220-900 nm                           | Com Port: Com1                 |                                   |
| Delta lambda [nm]: 1                           | Slit: 1 nm                     |                                   |
|  | Lamp change at: Halogen        |                                   |

### 6.1.3 Protokoll: Herstellung der Zellsuspension

**Tabelle 6-2:** Zusammensetzung der Zellsuspension

| Verfahren   | Herstellung Zellsuspension  |  |
|---|---|--|
| Blockweise Segmentierung<br>(Einzelwirkungsscreening) | 15000 Zellen/ml<br>+ 1%ige PEG-Lösung (zur Dichteanpassung)<br>+ LB-Medium  |  |
| Rampen<br>(Einzelwirkungsscreening)                   | DNP   | Decapeptid   |
|   | 40000 Zellen/ml<br>(Vorkultur:<br>$7,8 \times 10^5$ Zellen/ml)<br>+ $6,4 \times 10^7$<br>HPTS / p-HEMA Beads<br>(Stocksuspension:<br>$8 \times 10^9$ Beads/ml)<br>+ 0,003 %<br>Cochenillerot A<br>(Stocklösung 1%)<br>+ synthetisches<br>Medium | 40000 Zellen/ml<br>(Vorkultur: $4 \times 10^7$<br>Zellen/ml<br>+ $5 \times 10^6$<br>HPTS / p-HEMA Beads<br>(Stocksuspension $5 \times 10^8$<br>Beads/ml)<br>+ 1 % PEG (Stocklösung:<br>50 % in Aqua dest.)<br>+ 2 % PVP<br>(Stocklösung: 50 % in<br>Aqua dest.)<br>+ 1 % DMSO<br>(Stocklösung: 99,5 %)<br>+ 0,005 % Cochenillerot A<br>(Stocklösung 1 %)<br>+ synthetisches Medium |
| Rampen Phasendiagramm<br>(Kombinationsscreening)      | 100000 Zellen/ml<br>+ 0,004 % Cochenillerot A (Stocklösung 2 %)<br>+ 0,01 % Indigokarmin (Stocklösung 2 %)  |  |

### 6.1.4 PCR-Protokoll

**Tabelle 6-3:** PCR-Ansatz und Amplifizierungsparameter

| PCR Ansatz   | Probenvolumen 20 µl                                      | Mastermix<br>x20 |
|--|--|------------------|
| PCR-Wasser   | 10,7   | 214              |
| 10xPCR-Puffer E<br>(Genaxxon BioScience)                             | 2,0  | 40               |
| 10 mM, 2,5 mM jeweils,<br>dNTPs Mix<br>(Invitrogen)                  | 0,8  | 16               |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub><br>(Promega)                                 | 0,8  | 16               |
| BSA (1mg/ml)   | 2  | 40               |
| 25 pmol/µl Random<br>Primer<br>(50 µM)<br>(Invitrogen)               | 0,4  | 8                |
| 100 pmol/l Primer Bact R<br>(Thermo Electron)                        | 0,8  | 16               |
| Template (10 <sup>6</sup> Zellen/ml)                                 | 2,0  | 40               |
| Taq-Polymerase (5 U/µl)<br>(Genaxxon BioScience)                     | 0,5  | 10               |
| <b>Amplifizierungsparameter</b>                                      |  |                  |
| Die PCR-Ansätze wurden jeweils mit 20-30 µl Mineralöl überschichtet. |  |                  |
| Vordenaturierung   | 5 min bei 96°C   |                  |
| 35 Zyklen:   |  |                  |
| Denaturierung  | 20 s bei 94°C  |                  |
| Annealing  | 30 s bei 52°C  |                  |
| Elongation   | 45 s bei 72°C  |                  |
| Nachelongation   | 5 min bei 72°C   |                  |
| Hold   | 5°C  |                  |
| <b>Gelelektrophorese</b>   |  |                  |
| Herstellung Agarose Gel:   | 2 g Agarose auf 100 ml mit Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer |                  |
| Laufzeit Gel:  | 15-20 min bei 100 V                                      |                  |
| DNA-Marker   | GenLadder 100bp + 1,5 kbp Standard (Genaxxon)            |                  |

### 6.1.5 Protokoll: Kultivierung von *E. coli* in Mikrofluidsegmenten: Versuchsbedingungen für die Erzeugung von 1- und 2-dimensionalen Konzentrationsfeldern mit Rampenprogrammen

#### *1-dimensionale Konzentrationsfelder*

**Tabelle 6-4:** 1-dimensionale Konzentrationsfelder

| Versuchsbedingung                                   | Parametereinstellung        |
|---|-----------------------------|
| Flussrate Trägermedium (PP9)                        | 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ |
| Flussrate Zellsuspension                            | 4 $\mu\text{l}/\text{min}$  |
| Flussrate Wirkstoff                                 | 4 $\mu\text{l}/\text{min}$  |
| Flussrate Nährmedium                                | 4 $\mu\text{l}/\text{min}$  |
| Gesamtflussrate bei Detektion der Segmente          | 38 $\mu\text{l}/\text{min}$ |
| Anzahl Segmente einer Sequenz für DNP               | 250                         |
| Anzahl Segmente einer Sequenz für Decapeptid        | 180                         |
| Durchschnittliche Größe der Segmente für DNP        | 300 nl                      |
| Durchschnittliche Größe der Segmente für Decapeptid | 600 nl                      |
| Integrationszeit Fluorimeter                        | 30 ms                       |
| Spaltbreite Fluorimeter                             | 1 mm                        |
| Abtastrate Photometer                               | 250/s                       |

**2-dimensionale Konzentrationsfelder****Tabelle 6-5:** Protokoll Versuchstag 16.06.09Zellkultivierung in Mikrofluidsegmenten: *E. coli* in synthetischem Medium

Datum: 16.06.09

Zeitraum: 16.06-18.06.09

Daten Fluorimeter: IGZ: 50 ms, AZR: 3,3 Hz, AR: 20Hz

Daten Photometer: AR: 250 Hz, AKR: 5 Hz

P1: Positivkontrolle

P2: Effektorlösung: DNP

4.5 µl Zellsuspension (100000 Z / ml)

300 µl DNP (Stock: 1 mM) 300µmol/l

2974,5 µl synthetisches Medium (mit 15 ml  
Glucose)

2 µl 2 % Cochenillerot A

698 µl Aqua dest.

6 µL 2 % Cochenillerot A

15µL 2 % Indigokarmin

P3: Effektorlösung: AuNP (mit 1mM  
HAuCl<sub>4</sub> und 0.1 M VitC als RM)

P3\_1: Effektorlösung: AuNP

21,3 µl AuNP (Stock: 0.14 mM) 3 µM

21,3 µl AuNP (Stock: 0.14 mM) 3 µM

2µL 2 % Cochenillerot A

5µl 2% Indigokarmin

976,7 µl Aqua dest.

973,7 µl Aqua dest.

Zellzahlbestimmung:

Zellzählung mit Thoma-Zählkammer:  $6,65 \times 10^7$  Zellen ml<sup>-1</sup>

Verdünnung 1:665

Zellzahl: 100000 Zellen ml<sup>-1</sup>

Homogenisierung im Segment: mit Cetoni Spritzenrührereinheit → 650 U/min (mittlere Stufe, 54 Dreheinheiten)

Screenings:

Coli\_A1: Positivkontrolle

Coli\_A2: AuNP Einzelwirkung

Coli\_A3: DNP Einzelwirkung

Coli\_A4: DNP + AuNP

Coli\_A5: Wiederholung DNP + AuNP

Segmentierung:

Flussrate Träger: 40µl / min, Flussrate Proben: 5 µl / min

Segmentierungsprogramme:

A1: nur kontinuierlich, kein Programm

A2 / A3: Einzelwirkungsscreening: Daten E/ Cetoni /7.10.08\_Chlorella\_kurzEinlauf\_1.txt  
für Einzelwirkung (Dauer A2 / A3: 2)A4 / A5: Screening Kombinationswirkung: Daten E/ Cetoni /Anette\_kombi\_12.06.09.txt  
(Dauer A4 / A5: 15)

Messzeitpunkte und Kultivierungstemperatur

Direkt nach Segmentierung 0 h, 24 h, 48 h, 37°C

IGZ: Integrationszeit, AZR: Anzeigerate, AR: Abtastrate, AKR: Aktualisierungsrate, AuNP:

Goldnanopartikel, RM: Reduktionsmittel

**Tabelle 6-6:** Protokoll Versuchstag 18.06.09

|  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| Zellkultivierung in Mikrofluidsegmenten: <i>E. coli</i> in synthetischem Medium  |                                     |
| Datum: 18.06.09  |                                     |
| Zeitraum: 18.06-20.06.09   |                                     |
| Daten Fluorimeter: IGZ: 50 ms, AZR: 3,3 Hz, AR: 20Hz   |                                     |
| Daten Photometer: AR: 250 Hz, AKR: 5 Hz  |                                     |
| P1: Positivkontrolle   | P2: Effektorlösung: DNP             |
| 197,4 µl Zellsuspension (100000 Zellen ml <sup>-1</sup> )  | 250 µl DNP (Stock: 1 mM) 250 µmol/l |
| 2781,6 µl synthetisches Medium   | 2 µl 2 % Cochenillerot A            |
| 6 µL 2% Cochenillerot A  | 748 µl Aqua dest.                   |
| 15µL 2% Indigokarmin   |                                     |
| P3: Effektorlösung: DCP  | P3_1: Effektorlösung: DCP           |
| 30 µl DCP (Stock: 1 mM) 30 µM  | 30 µl DCP (Stock: 1 mM) 30 µM       |
| 2 µL 2 % Cochenillerot A   | 5µl 2 % Indigokarmin                |
| 968 µl Aqua dest.  | 965 µl Aqua dest.                   |
| P4: Effektorlösung: Ascorbinsäure  |                                     |
| 14,1 µl AS (Stock: 0.1M) 1,4 mM  |                                     |
| 2 µl 2 % Cochenillerot A   |                                     |
| 983,9 µl Aqua dest.  |                                     |
| Zellzahlbestimmung:  |                                     |
| Zellzählung mit Thoma-Zählkammer: 1.57x10 <sup>8</sup> Zellen ml <sup>-1</sup>   |                                     |
| Verdünnung 1:1520  |                                     |
| Zellzahl: 100000 Zellen ml <sup>-1</sup> ,   |                                     |
| Homogenisierung im Segment: mit Cetoni Spritzenröhreinheit → 650 U/min (mittlere Stufe, 54 Dreheiten)                            |                                     |
| Screenings:  |                                     |
| Coli_A1: Positivkontrolle  |                                     |
| Coli_A2: DCP Einzelwirkung   |                                     |
| Coli_A3: DNP Einzelwirkung   |                                     |
| Coli_A4: DNP + DCP   |                                     |
| Coli_A5: Wiederholung DNP + DCP  |                                     |
| Coli_A6: Ascorbinsäure Einzelwirkung   |                                     |
| Segmentierung:   |                                     |
| Flussrate Träger: 40µl / min, Flussrate Proben: 5 µl / min   |                                     |
| Segmentierungsprogramme:   |                                     |
| A1: nur kontinuierlich, kein Programm  |                                     |
| A2 / A3: Einzelwirkungsscreening: Daten E/ Cetoni /7.10.08_Chlorella_kurzEinlauf_1.txt für Einzelwirkung (Dauer A2 / A3 / A6: 2) |                                     |
| A4 / A5: Screening Kombinationswirkung: Daten E/ Cetoni /Anette_kombi_12.06.09.txt (Dauer A4 / A5: 15)                           |                                     |
| Messzeitpunkte und Kultivierungstemperatur   |                                     |
| Direkt nach Segmentierung 0 h, 24 h, 48 h, 37°C  |                                     |
| IGZ: Integrationszeit, AZR: Anzeigerate, AR: Abtastrate, AKR: Aktualisierungsrate  |                                     |

**Tabelle 6-7:** Protokoll Versuchstag 23.06.09

|  |   |
|--|---|
| Zellkultivierung in Mikrofluidsegmenten: <i>E. coli</i> in synthetischem Medium  |   |
| Datum: 23.06.09  |   |
| Zeitraum: 23.06-25.06.09   |   |
| Daten Fluorimeter: IGZ: 50 ms, AZR: 3,3 Hz, AR: 20Hz   |   |
| Daten Photometer: AR: 250 Hz, AKR: 5 Hz  |   |
| P1: Positivkontrolle   | P2: Effektorlösung: AgNP_braun<br>(RM Glucose_22.06.09)   |
| 379,7 µl Zellsuspension (100000 Zellen ml <sup>-1</sup> )  | 40 µl AgNP (Stock: 1 mM) 40 µmol/l  |
| 2600,3 µl synthetisches Medium   | 2 µl 2 % Cochenillerot A  |
| 6 µL 2 % Cochenillerot A   | 958 µl Aqua dest.   |
| 15µL 2 % Indigokarmin  |   |
| P3: Effektorlösung: DCP  | P3_1: Effektorlösung: DCP   |
| 30 µl DCP (Stock: 1 mM) 30 µM  | 30 µl DCP (Stock: 1 mM) 30 µM   |
| 2µL 2 % Cochenillerot A  | 5 µl 2 % Indigokarmin   |
| 968 µl Aqua dest.  | 965 µl Aqua dest.   |
| P4: Effektorlösung: AgNP_gelb<br>(RM: Glucose 8.03.05)   | <b>IGZ:</b> Integrationszeit, <b>AZR:</b> Anzeigerate,<br><b>AR:</b> Abtastrate, <b>AKR:</b> Aktualisierungsrate,<br><b>AgNP_braun:</b> Silbernanopartikel mit<br>brauner Färbung, <b>AgNP_gelb:</b><br>Silbernanopartikel mit gelber Färbung, <b>RM:</b><br>Reduktionsmittel |
| 40 µl AgNP (Stock: 1 M) 40 µM  |   |
| 2 µl 2 % Cochenillerot A   |   |
| 958 µl Aqua dest.  |   |
| Zellzahlbestimmung:  |   |
| Zellzählung mit Thoma-Zählkammer: 7.9x10 <sup>7</sup> Zellen ml <sup>-1</sup>  |   |
| Verdünnung 1:790   |   |
| Zellzahl: 100000 Zellen ml <sup>-1</sup> ,   |   |
| Homogenisierung im Segment: mit Cetoni Spritzenröhreinheit → 650 U/min (mittlere Stufe, 54 Dreheinheiten)                        |   |
| Screenings:  |   |
| Coli_A1: Positivkontrolle  |   |
| Coli_A2: DCP Einzelwirkung   |   |
| Coli_A3: AgNP_braun Einzelwirkung  |   |
| Coli_A4: AgNP_gelb Einzelwirkung   |   |
| Coli_A5: DCP + AgNP_gelb   |   |
| Coli_A6: DCP + AgNP_braun  |   |
| Segmentierung:   |   |
| Flussrate Träger: 40µl / min, Flussrate Proben: 5 µl / min   |   |
| Segmentierungsprogramme:   |   |
| A1: nur kontinuierlich, kein Programm  |   |
| A2 / A3: Einzelwirkungsscreening: Daten E/ Cetoni /7.10.08_Chlorella_kurzEinlauf_1.txt für Einzelwirkung (Dauer A2 / A3 / A4: 2) |   |
| A5: Screening Kombinationswirkung: Daten E/ Cetoni /Anette_kombi_12.06.09.txt (Dauer: 15)  |   |
| A6: Screening Kombinationswirkung: Daten E/ Cetoni /Anette_kombi_23.06.09.txt (Dauer: 15)  |   |
| Messzeitpunkte und Kultivierungstemperatur:  |   |
| Direkt nach Segmentierung 0 h, 24 h, 48 h, 37°C  |   |

**Tabelle 6-8:** Protokoll Versuchstag 29.06.09

|   |  |
|---|--|
| Zellkultivierung in Mikrofluidsegmenten: <i>E. coli</i> in synthetischem Medium                         |  |
| Datum: 29.06.09   |  |
| Zeitraum: 29.06-01.07.09  |  |
| Daten Fluorimeter: IGZ: 50 ms, AZR: 3,3 Hz, AR: 20Hz  |  |
| Daten Photometer: AR: 250 Hz, AKR: 5 Hz   |  |
| P1: Positivkontrolle  | P2: Effektorlösung: DCP                                  |
| 104,5 µl Zellsuspension (100000 Zellen ml <sup>-1</sup> )   | 30 µl DCP (Stock: 1 mM) 30 µM                            |
| 2874,5 µl synthetisches Medium  | 2 µl 2 % Cochenillerot A                                 |
| 6 µL 2 % Cochenillerot A  | 968 µl Aqua dest.  |
| 15µL 2 % Indigokarminr  |  |
| P2_1: Effektorlösung: DCP   | P3: Effektorlösung: CuCl <sub>2</sub>                    |
| 30 µl DCP (Stock: 1 mM) 30 µM   | 20 µl CuCl <sub>2</sub> (Stock: 540 mg / l, 1:100VED)    |
| 5 µl 2 % Indigokarminr  | 803 nM   |
| 965 µl Aqua dest.   | 2 µL 2 % Cochenillerot A                                 |
|   | 978 µl Aqua dest.  |
| P3_1: Effektorlösung: CuCl <sub>2</sub>   | P4: Effektorlösung: DNP                                  |
| 20 µl CuCl <sub>2</sub> (Stock: 540 mg / l, 1:100VED)   | 300 µl DNP (Stock: 1 mM) 300 µM                          |
| 803 nM  | 2 µL 2 % Cochenillerot A                                 |
| 5 µL 2 % Indigokarminr  | 698 µl Aqua dest.  |
| 975 µl Aqua dest.   |  |
| P4_1: Effektorlösung: DNP   | P5: Effektorlösung: AgNP_braun<br>(RM: Glucose 22.06.09) |
| 300 µl DNP (Stock: 1 mM) 300 µM   | 1 µl AgNP (Stock: 1 mM, 1:10 VED, 0.1 mM)                |
| 2 µL 2 % Indigokarminr  | 0,1 µM AgNO <sub>3</sub>                                 |
| 695 µl Aqua dest.   | 2 µl 2 % Cochenillerot A                                 |
|   | 997 µl Aqua dest.  |
| P6: Effektorlösung: AgNP_gelb<br>(RM: Glucose 08.03.05)   | P7: Effektorlösung: AuNP (30nm-rot)                      |
| 40 µl AgNP (Stock: 1 mM) 40 µM AgNO <sub>3</sub>  | 21.3 µl AuNP (Stock: 0.14 mM) 3 µM                       |
| 2 µl 2% Cochenillerot A   | 2 µl 2% Cochenillerot A                                  |
| 958 µl Aqua dest.   | 976,7 µl Aqua dest.                                      |
| P8: Effektorlösung: AuNP (50nm-violett)   |  |
| 21,3 µl AuNP (Stock: 0.14 mM) 3 µM  |  |
| 2 µl 2 % Cochenillerot A  |  |
| 976,7 µl Aqua dest.   |  |
| Zellzahlbestimmung:   |  |
| Zellzählung mit Thoma-Zählkammer: 2.87x10 <sup>8</sup> Zellen ml <sup>-1</sup>                          |  |
| Verdünnung 1:2870   |  |
| Zellzahl: 100000 Zellen ml <sup>-1</sup> ,  |  |
| Homogenisierung im Segment: mit Cetoni Spritzenrührereinheit → 650 U/min (mittlere Stufe, 54 Dreheiten) |  |
| Screenings:   |  |
| Coli_A1: AuNP (50nm-rot) Einzelwirkung  |  |
| Coli_A2: CuCl <sub>2</sub> (blau) + DCP <sub>(rot)</sub>  |  |
| Coli_A3: CuCl <sub>2</sub> (blau) + DNP <sub>(rot)</sub>  |  |
| Coli_A4: CuCl <sub>2</sub> (blau) + AgNP_braun <sub>(rot)</sub>   |  |
| Coli_A5: DNP <sub>(blau)</sub> + AgNP_braun <sub>(rot)</sub>  |  |
| Coli_A6: DCP <sub>(blau)</sub> + AuNP(30nm-rot) <sub>(rot)</sub>  |  |
| Coli_A7: DCP <sub>(blau)</sub> + AuNP_gelb <sub>(rot)</sub>   |  |

Segmentierung:

Flussrate Träger: 40µl / min, Flussrate Proben: 5 µl / min

---

Segmentierungsprogramme:

A1: Einzelwirkungsscreening: DatenE/Cetoni/Berechnung\_Vorlagen/file/230609\_Einzelwirkung.txt (Dauer: 1.2)

A2-A7: Screening Kombinationswirkung: DatenE/Cetoni/Anette\_kombi\_23.06.09.txt (Dauer A2-A7: 12)

---

Messzeitpunkte und Kultivierungstemperatur:

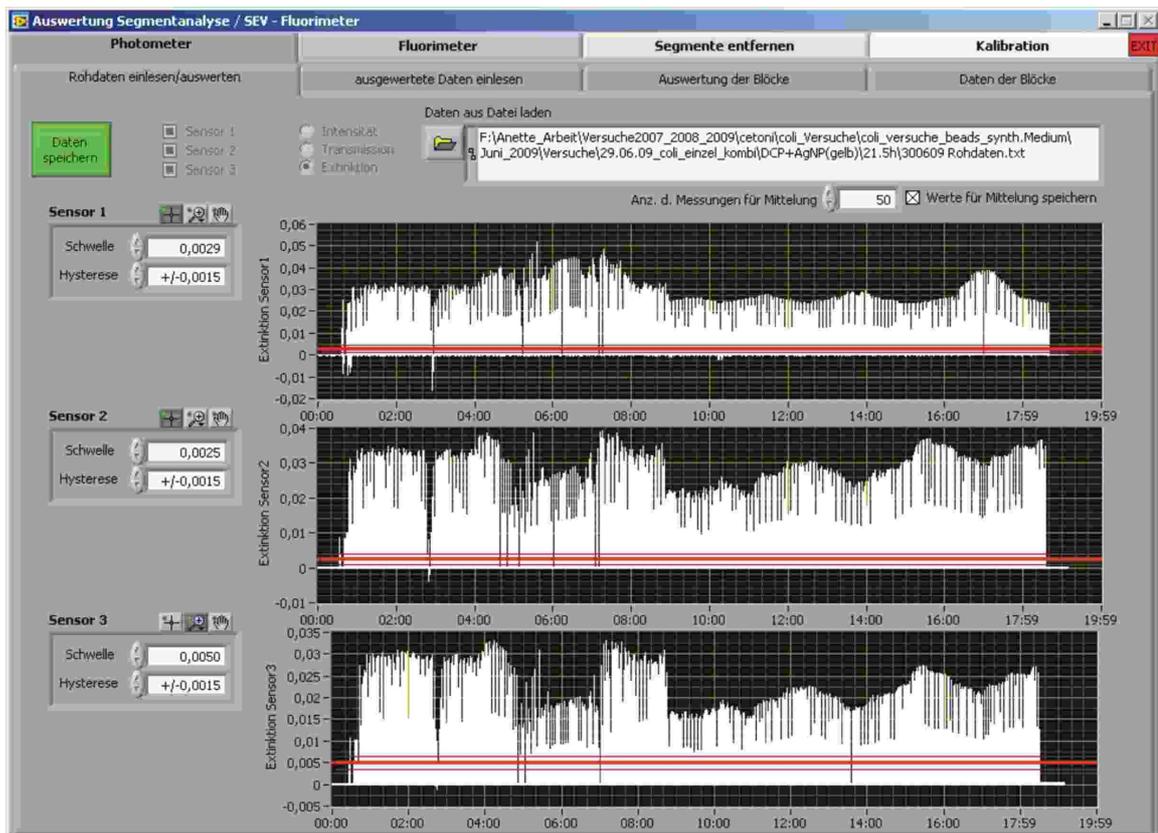
Direkt nach Segmentierung 0 h, 24 h, 48 h, 37°C

---

IGZ: Integrationszeit, AZR: Anzeigerate, AR: Abtastrate, AKR: Aktualisierungsrate, AgNP\_braun: Silbernanopartikel mit brauner Färbung, AgNP\_gelb: Silbernanopartikel mit gelber Färbung, RM: Reduktionsmittel, AuNP: Goldnanopartikel mit unterschiedlichen Größen.

## 6.1.6 LabVIEW-Programme zur Auswertung von 1- und 2-dimensionalen Segmentsequenzen

### Auswertung der Daten Binäre Gemische



**Abb. 6-2:** Bestimmung der mittleren optischen Dichte (Trübung) pro Segment<sup>a</sup> aus den Rohdaten durch Festlegen von Schwellenwert und Hysterese, Datensatz einer Kombinationswirkung für eine Messung nach 22h Kultivierung, 3-Kanal-Photometer: Sensor 1 (610nm LED), Sensor 2 (505nm LED), Sensor 3 (470nm LED).

$$^a \text{StAbW} = \sqrt{\frac{\sum_{i=0} (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

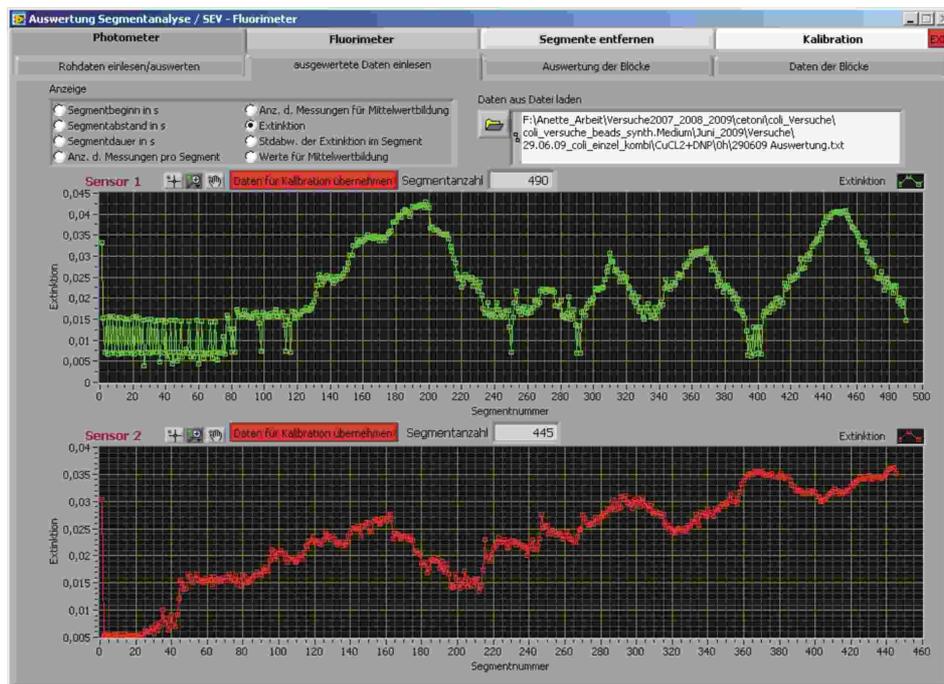


Abb. 6-3: Darstellung der gemittelten Trübungswerte des Rohdatensatzes (s. Abb. 6-2) der binären Segmentsequenz für Sensor 1 und Sensor 2.

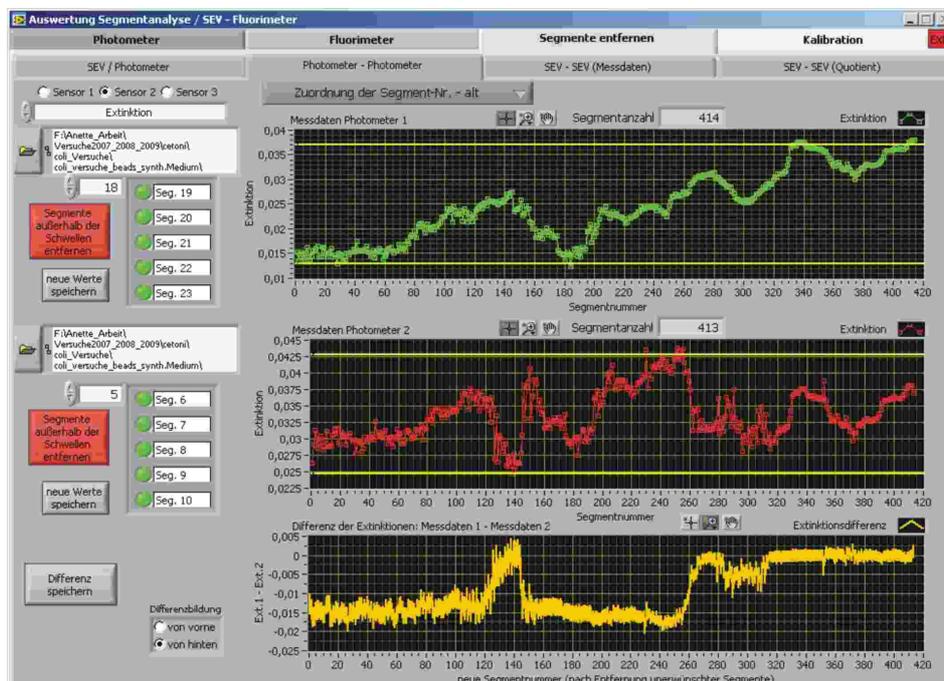
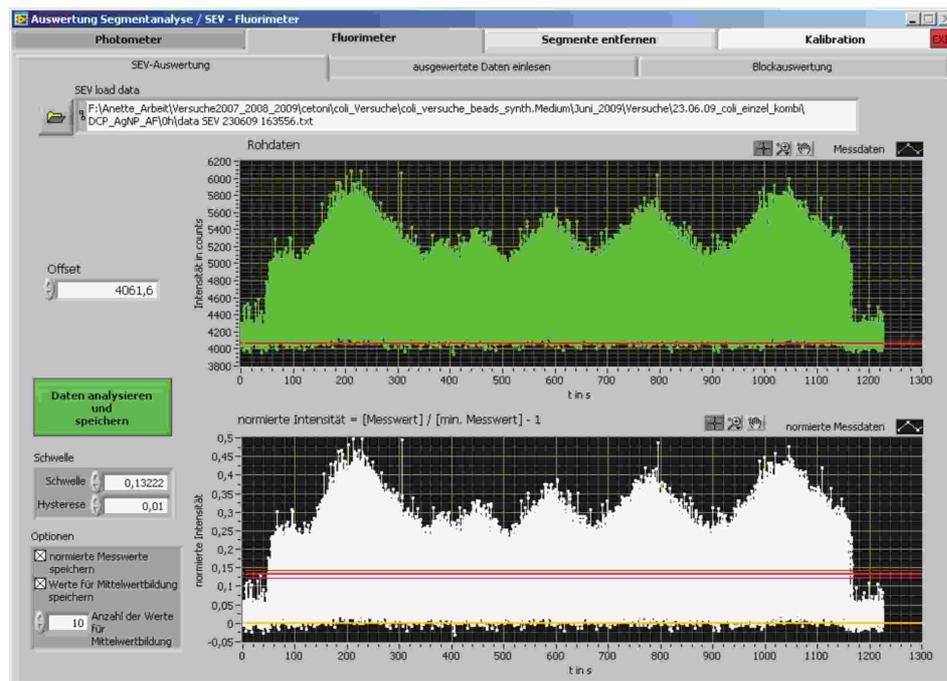
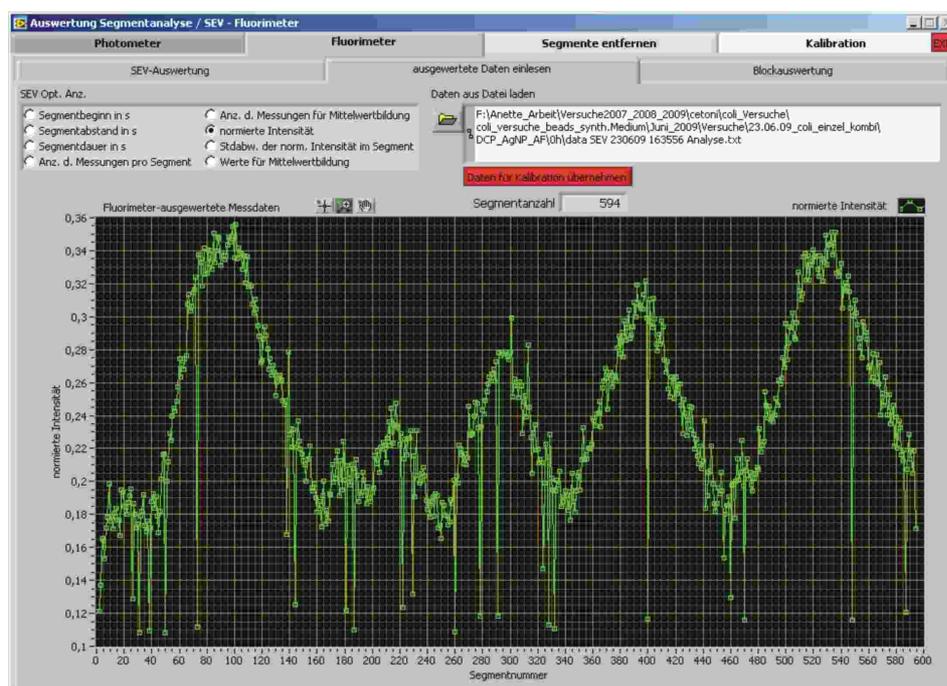


Abb. 6-4: Berechnung der Trübungsdifferenz  $t_1 - t_0$  durch Abzug des Hintergrundes (korrigierte Datensätze).



**Abb. 6-5:** Bestimmung des mittleren normierten<sup>b</sup> Intensitätswertes pro Segment aus den Rohdaten nach Festlegen von Offset, Schwellenwert und Hysterese (im Bild ist der Datensatz für eine Kombinationswirkung direkt nach Segmentierung (0 h) dargestellt).



**Abb. 6-6:** Darstellung der gemittelten Intensitätswerte (Rohdatensatz s. Abb. 6-5) der Segmentsequenz zum Zeitpunkt  $t = 0$ h.

$$^b \text{normierte Intensität} = \frac{\text{Intensitätssignal}}{\text{Grundsignal}} - 1, \text{ Grundsignal: Fluoreszenzsignal des Schlauches.}$$

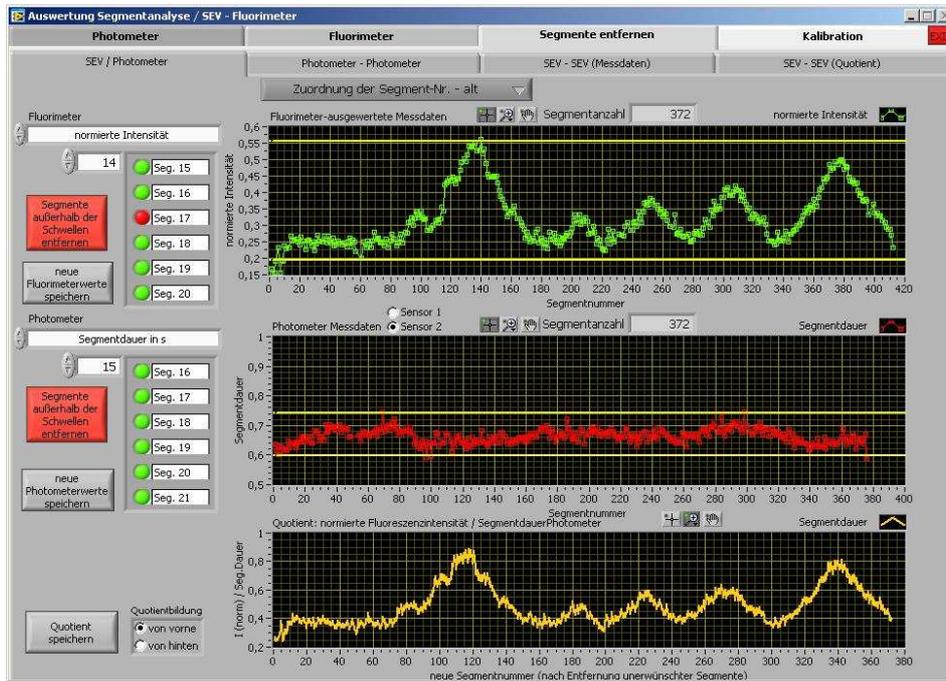


Abb. 6-7: Ermittlung der normierten Intensität bezogen auf die Segmentdauer (herangezogen werden Datensätze der Extinktionsmessung bei 505 nm zum jeweiligen Messzeitpunkt).

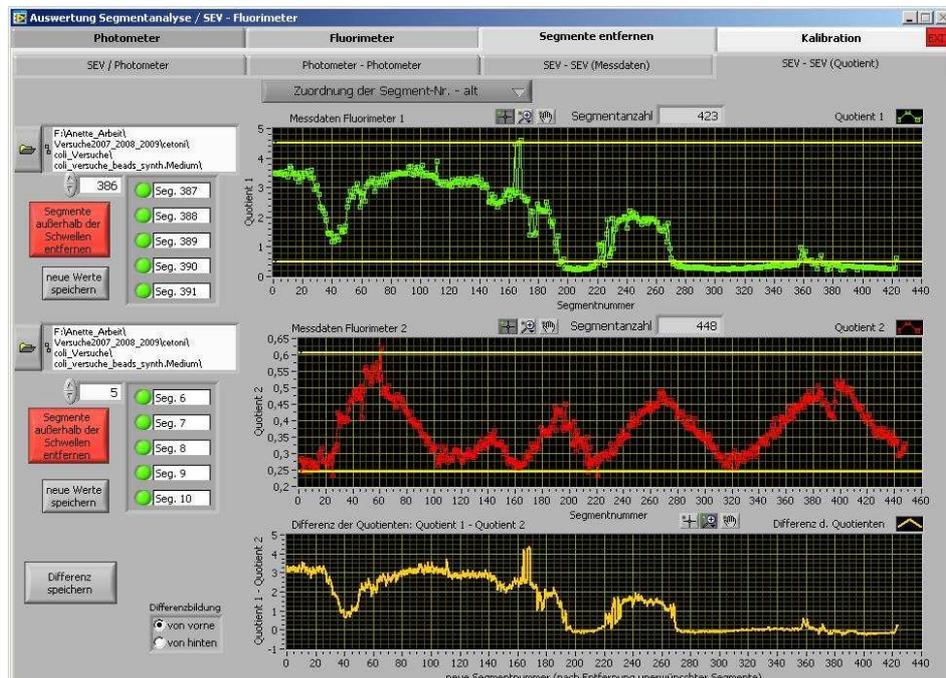


Abb. 6-8: Berechnung der normierten Intensitätsdifferenz  $t_1 - t_0$  durch Abzug des Hintergrunds (korrigierte Datensätze).

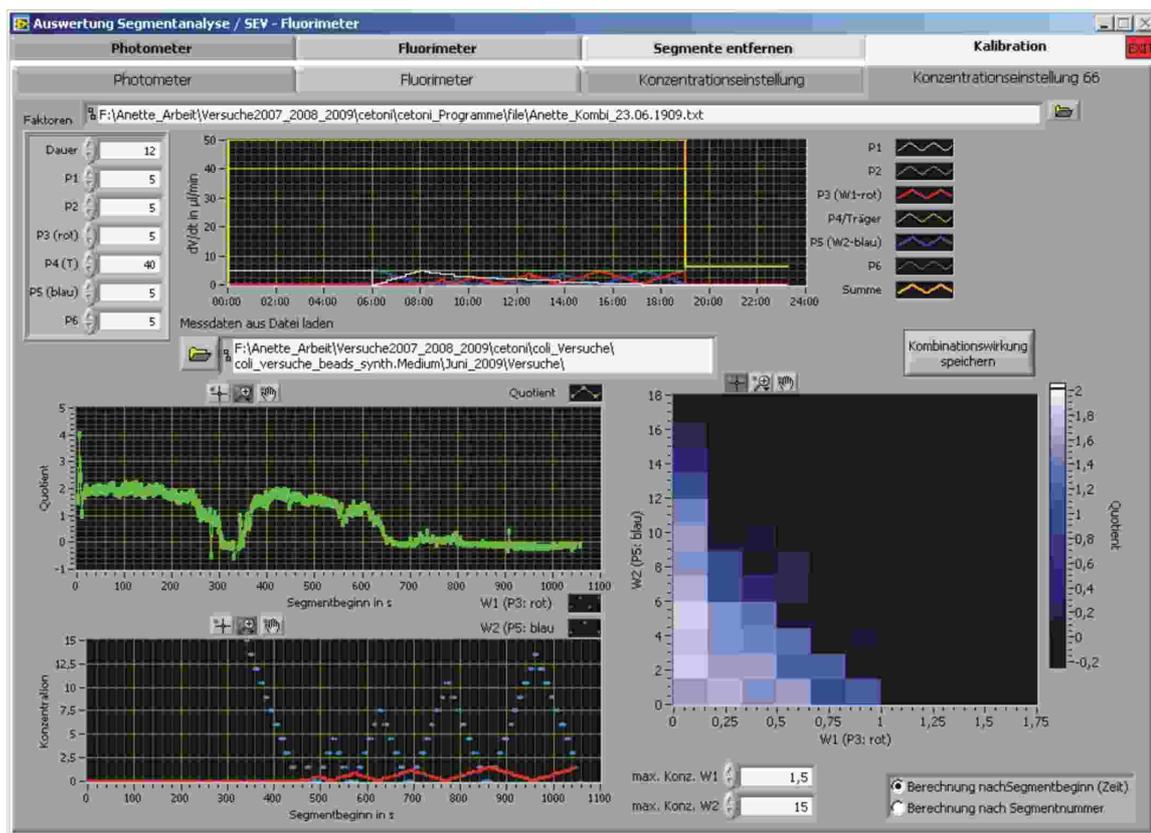
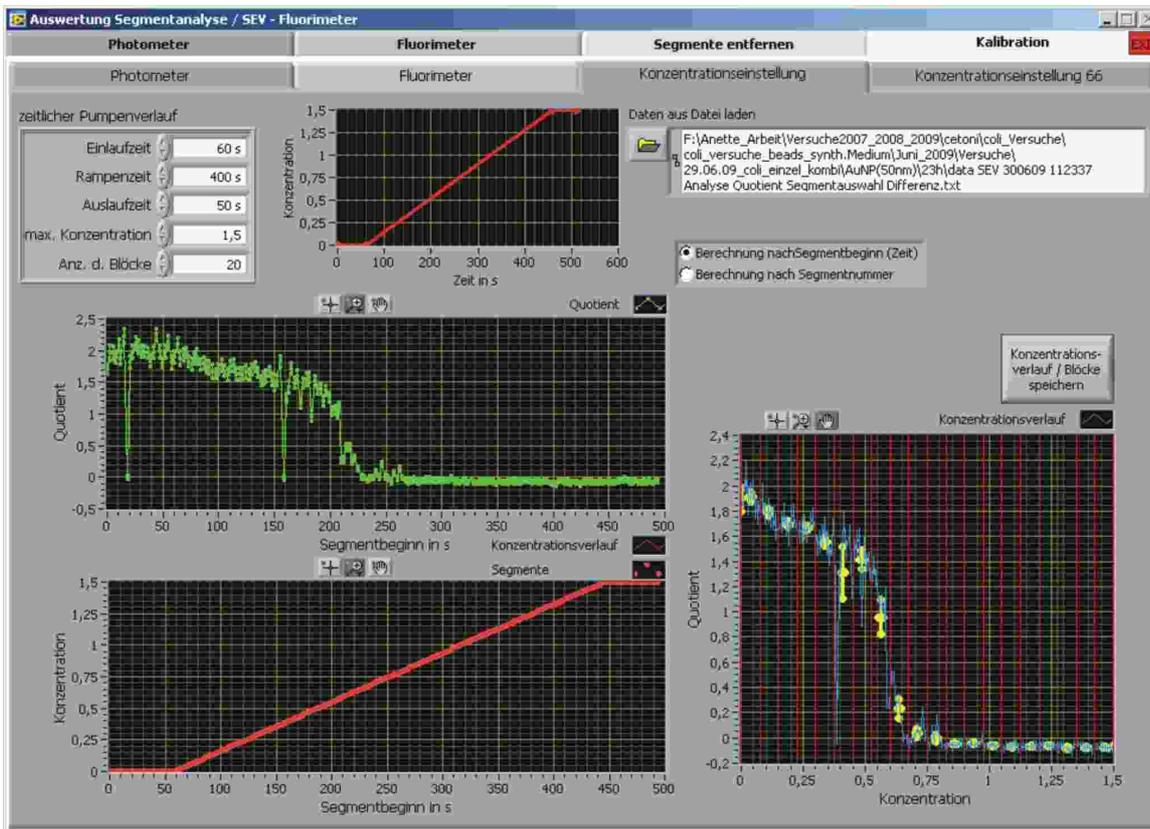


Abb. 6-9: Konzentrationszuordnung der einzelnen Kombinationen und Erstellung von 2-D Diagrammen durch Einbindung der Segmentierungsfile's und der korrigierten Datensätze.

|    | 1       | 2       | 3        | 4        | 5        | 6        | 7        | 8        | 9        | 10       | 11       | 12       | 13       |
|----|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1  | 2,39    | 2,29598 | 1,43765  | 0,19146  | -0,15839 | -0,04617 | -0,03527 | -0,04681 | -0,06382 | -0,10274 | -0,10427 | -0,07029 | -0,06374 |
| 2  | 2,57338 | 1,29486 | 0,02418  | -0,13356 | -0,02949 | -0,07235 | -0,04812 | -0,02979 | -0,10901 | -0,11523 | -0,06595 | -0,08541 | -0,09855 |
| 3  | 2,59796 | 0,66261 | -0,38512 | -0,19968 | -0,05198 | -0,07519 | -0,05559 | -0,09472 | -0,12396 | -0,08397 | -0,09015 | -0,11886 | -0,07791 |
| 4  | 2,66    | 0,72773 | -0,26232 | -0,20737 | -0,0421  | -0,06732 | -0,14191 | -0,14439 | -0,07431 | -0,08909 | -0,12881 | -0,07823 | -0,05378 |
| 5  | 2,75366 | 0,73418 | -0,28248 | -0,16922 | -0,01825 | -0,12564 | -0,13365 | -0,06032 | -0,08502 | -0,10946 | -0,0605  | -0,05971 | --       |
| 6  | 2,40526 | 0,5157  | -0,26589 | -0,15792 | -0,08304 | -0,12473 | -0,07334 | -0,07159 | -0,10463 | -0,06872 | -0,05907 | --       | --       |
| 7  | 1,99    | 0,58557 | -0,19213 | -0,21316 | -0,08646 | -0,08559 | -0,12978 | -0,12603 | -0,08433 | -0,1011  | --       | --       | --       |
| 8  | 2,42311 | 0,74827 | -0,25836 | -0,18371 | -0,01831 | -0,14778 | -0,14694 | -0,08157 | -0,12858 | --       | --       | --       | --       |
| 9  | 2,80701 | 0,74525 | -0,29294 | -0,17259 | -0,07032 | -0,13515 | -0,08615 | -0,12202 | --       | --       | --       | --       | --       |
| 10 | 2,73    | 0,69365 | -0,3117  | -0,22741 | -0,0552  | -0,06297 | -0,14814 | --       | --       | --       | --       | --       | --       |
| 11 | 2,53307 | 0,65223 | -0,28621 | -0,19817 | -0,03642 | -0,15303 | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       |
| 12 | 2,42527 | 0,62574 | -0,27646 | -0,20637 | -0,13337 | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       |
| 13 | 2,36    | 0,60771 | -0,29592 | -0,28932 | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       |
| 14 | 2,15932 | 0,58626 | -0,34172 | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       |
| 15 | 1,99461 | 0,54741 | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       |
| 16 | 1,92    | --      | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       | --       |

Abb. 6-10: Erstellung von Random Matrizen (Origin Software) für die isoblographische Darstellung der ausgewerteten Datensätze aus den Versuchen mit binären Mischungen.

## Konzentrationszuordnung für ausgewertete Datensätzen aus Einzelwirkungsscreenings



**Abb. 6-11:** Für die Untersuchung der Wirkung von Einzelsubstanzen erfolgte die Berechnung der Mittelwerte und der Abzug des Hintergrundes wie unter “Auswertung der von binären Gemischen“ beschrieben. Im Bild: Zuordnung der Konzentrationen zu den einzelnen Segmenten (links), Einteilung der Datensätze in Blöcke: Erstellung von Konzentrationsklassen, erneute Mittelwertbestimmung<sup>c</sup> (rechts).

<sup>c</sup>  $StabW \text{ des Mittelwertes} = \frac{StabW}{\sqrt{N}}$

### 6.1.7 Protokoll: Wachstumsstudien und Toxizitätstests an *S. cerevisiae* in Mikrofluidsegmenten

Zellkultivierung in Mikrofluidsegmenten: *Hefe in YNB- und YM-Medium*

Daten Fluorimeter: IGZ: 50 ms, AZR: 3,3 Hz, AR: 20Hz

Daten Photometer: AR: 250 Hz, AKR: 5 Hz

P1: Positivkontrolle

400 µl Zellsuspension (400000 Zellen/ml für Wachstumstest, 500000 Zellen/ml für Toxizitätstest)

2594 µl YNB- oder YM-Medium

6 µL 2 % Cochenillerot A (0,004%)

P3: Effektorlösung: Peptid Amid

100 µl Peptide (Stock: 1050 ng/ml) 525ng/ml

5 µl 2 % Cochenillerot A

895 µl Aqua dest.

P4: Effektorlösung: DNP

500 µl DNP (Stock: 1 mM) 300 µM

2 µL 2 % Cochenillerot A

498 µl Aqua dest.

Wachstumsstudie ohne Rührer

Zellzählung mit Thoma-Zählkammer:  $5,5 \times 10^6$  Zellen/ml

Segmentanzahl: 220

Segmentvolumen: 580 nl ± 35 nl

Wachstumsstudie mit Magnetrührer

Zellzählung mit Thoma-Zählkammer:  $1,8 \times 10^8$  Zellen/ml

Segmentanzahl: 440

Segmentvolumen: 800 nl ± 0,5 nl

Wachstumsstudie mit Spritzenrührersystem Cetoni

Zellzählung mit Thoma-Zählkammer:  $3 \times 10^6$  Zellen/ml

Segmentanzahl: 430

Segmentvolumen: 460 nl ± 125 nl

Toxizitätsstudie ohne Rührer für DNP

Zellzählung mit Thoma-Zählkammer:  $5,5 \times 10^6$  Zellen/ml

Segmentanzahl: 200

Segmentvolumen: 570 nl ± 140 nl

Toxizitätsstudie mit Rührer für DNP

Zellzählung mit Thoma-Zählkammer:  $5 \times 10^7$  Zellen/ml

Segmentanzahl: 400

Segmentvolumen: 500 nl ± 160 nl

Toxizitätsstudie ohne Rührer für Decapeptid

Zellzählung mit Thoma-Zählkammer:  $5,5 \times 10^6$  Zellen/ml

Segmentanzahl: 200

Segmentvolumen: 590 nl ± 85 nl

Segmentierung für Wachstumstests: Flussrate Träger: 40 µl / min, Flussrate Proben: 5 µl / min

Segmentierungsprogramme für Toxizitätstest: Flussrate Träger: 40 µl / min, Flussrate Proben:

5 µl / min, Einzelwirkungsscreening: DatenE/Cetoni/Berechnung\_Vorlagen/file/230609\_Einzelwirkung.txt

Messzeitpunkte / Kultivierungstemperatur: Direkt nach Segmentierung 0 h, 48 h, 72 h, 90 h und 160 h bei 25°C

### 6.1.8 Protokoll: Segmentierung und Verteilung von *Chlorella vulgaris*

**Tabelle 6-9:** Zusammensetzung Zellsuspension und Versuchsbedingungen für den Testorganismus *Chlorella vulgaris*

| Versuche mit Rührer in Spritze                        |                               | Versuche Spritzenrühereinheit Cetoni      |                               |
|---|-------------------------------|---|-------------------------------|
| Zellsuspension  |                               | Zellsuspension                            |                               |
| 72,7 µl Zellsuspension ( $1,6 \times 10^6$ Zellen/ml) |                               | 375 µl Zellsuspension ( $10^7$ Zellen/ml) |                               |
| 927,8 µl IGV-Medium                                   |                               | 2619 µl IGV-Medium                        |                               |
| 0,5 µL 2 % Cochenillerot A (0,001 %)                  |                               | 6 µL 2 % Cochenillerot A (0,004 %)        |                               |
| Versuchsbedingungen                                   |                               |   |                               |
| Zellzählung mit Thoma-Zählkammer:                     | 2,2x10 <sup>7</sup> Zellen/ml | Zellzählung mit Thoma-Zählkammer:         | 8,3x10 <sup>7</sup> Zellen/ml |
| Segmentanzahl:  | 100                           | Segmentanzahl:                            | 235                           |
| Segmentvolumen:                                       | 573±97 nl                     | Segmentvolumen:                           | 578±88 nl                     |
| Flussrate Träger:                                     | 40 µl/min                     | Flussrate Träger:                         | 40 µl/min                     |
| Flussrate Probe:                                      | 3 µl/min                      | Flussrate Probe:                          | 5 µl/min                      |
| Messzeitpunkt:  | Direkt nach Segmentierung     | Messzeitpunkt:                            | Direkt nach Segmentierung     |
| Daten Photometer:                                     |                               | 250 Hz Abtastrate                         |                               |
| Daten Fluorimeter:                                    |                               | 30 ms Integrationszeit                    |                               |

### 6.1.9 Protokoll: Versuch mit DOX-induzierten HeLa-Zellen

|                              | Beschreibung   |
|------------------------------|--|
| Zellen                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>HeLa-Zellen mit 200 ng/ml Doxycyclin induziert. Die Zellen fluoreszieren dauerhaft grün.</li> </ul>   |
| Vorbereitung Zellen          | <ul style="list-style-type: none"> <li>HeLa mit DOX induziert am 04.04.08 (<math>7 \times 10^5</math> Zellen/ml ausgesät) abtrypsiniert, gezählt: ZZ 280, 312 = <math>7,4 \times 10^5</math> Zellen/ml</li> <li>Erfassung Fluoreszenzsignal von:               <ol style="list-style-type: none"> <li>normale Population, nicht gefärbt, (Z_DOX), 2) behandelte Population (5 Minuten <math>-80^\circ\text{C}</math>, 5 Minuten <math>+70^\circ\text{C}</math>) mit Invitrogen cell stain kit gefärbt, (Z-DOX_beh_F), 3) bearbeitete (5 Minuten <math>-80^\circ\text{C}</math>, 5 Minuten <math>+70^\circ\text{C}</math>) Population, nicht gefärbt (Z_DOX_beh)</li> </ol> </li> </ul>   |
| Herstellung Probensuspension | <ul style="list-style-type: none"> <li>jeweils 2,7 ml <math>2 \times 10^6</math> Zellen/ml in 15 ml Röhrchen überführt, gilt für Proben 1-3, Probe 4 später eingefügt mit restlichen Zellen, d.h. Startmenge waren <math>1,48 \times 10^6</math> Zellen/ml</li> <li>5 Minuten 300 g zentrifugiert, in 1 ml PBS 2 Minuten resuspendiert, in 1,5 ml E-Cup überführt</li> <li>Zählung: (um Verlust festzustellen und Proben auf <math>1 \times 10^6</math> Zellen/ml zu verdünnen)               <ol style="list-style-type: none"> <li>ZZ 505, 510 = <math>1,269 \times 10^6 \text{ ml}^{-1} = 788 \mu\text{l}</math> (<math>=1 \times 10^6</math>) Zelllösung + 212 <math>\mu\text{l}</math> PBS</li> <li>ZZ 472, 416 = <math>1,110 \times 10^6 \text{ ml}^{-1} = 900 \mu\text{l}</math> (<math>=1 \times 10^6</math>) Zelllösung + 100 <math>\mu\text{l}</math> PBS</li> <li>ZZ 508, 447 = <math>1,194 \times 10^6 \text{ ml}^{-1} = 837 \mu\text{l}</math> (<math>=1 \times 10^6</math>) Zelllösung + 163 <math>\mu\text{l}</math> PBS</li> <li>ZZ 370, 358 = <math>9,1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1} =</math> komplette Menge weiterverarbeitet</li> </ol> </li> <li>Probe 3,4 behandelt: 5 Minuten <math>-80^\circ\text{C}</math>, 5 Minuten <math>+70^\circ\text{C}</math></li> <li>Proben 1-4 mit 1 <math>\mu\text{l}</math> Invitrogen cell stain kit (Aliquot am 07.04.08 in 50 <math>\mu\text{l}</math> DMSO (am 07.04.08) angesetzt) bei <math>4^\circ\text{C}</math> 30 Minuten im Dunkeln inkubiert, 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert, Überstand verworfen</li> <li>Probe 3 leuchtet nicht</li> <li>Probe 4 leuchtet weniger als 1-2, schwer zu resuspendieren, in 1 ml PBS mit abgeschnittener Pipettenspitze resuspendiert, 5 Minuten 300 g zentrifugiert</li> <li>Probe 4 leuchtet nicht mehr, Überstand verworfen, in 0,9 ml PBS mit abgeschnittener Pipettenspitze 2 Minuten resuspendiert, Probe 4 wieder normal zu resuspendieren</li> <li>Zählung: (anschließend <math>8 \times 10^4</math> Zellen /ml Proben für Segmentierung)               <ol style="list-style-type: none"> <li>ZZ 271, 276 = <math>6,837 \times 10^5 \text{ ml}^{-1} = 117 \mu\text{l}</math> (<math>=8 \times 10^4</math>) Zelllösung + 883 <math>\mu\text{l}</math> PBS + 1 <math>\mu\text{l}</math> Cochenillerot A, 2) ZZ 305, 336 = <math>8,010 \times 10^5 \text{ ml}^{-1} = 99,8 \mu\text{l}</math> (<math>=8 \times 10^4</math>) Zelllösung + 900,2 <math>\mu\text{l}</math> PBS + 1 <math>\mu\text{l}</math> Cochenillerot A, 3) ZZ 90, 104 = <math>2,425 \times 10^5 \text{ ml}^{-1} = 330 \mu\text{l}</math> (<math>=8 \times 10^4</math>) Zelllösung + 670 <math>\mu\text{l}</math> PBS + 1 <math>\mu\text{l}</math> Cochenillerot A, Zellen sind alle tot, 4) ZZ 107, 111 = <math>2,725 \times 10^5 \text{ ml}^{-1} = 296 \mu\text{l}</math> (<math>=8 \times 10^4</math>) Zelllösung + 704 <math>\mu\text{l}</math> PBS + 1 <math>\mu\text{l}</math> Cochenillerot A, Zellen sind alle tot</li> </ol> </li> </ul> |

### 6.1.10 Protokoll: Zellfärbung mit Live/Dead<sup>®</sup> Cell Stain Kit (P. Kiesel)

|                              | Beschreibung  |
|------------------------------|---|
| Zellen                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• HeLa-Zellen nicht DOX-induziert</li> </ul>   |
| Vorbereitung Zellen          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Flaschen abtrypsiniert (Trypsin/EDTA-Mischung), poolen</li> <li>• Flaschen sollten nicht zu voll sein, da die Population eher in einer stationären als in einer Wachstumsphase sein könnte. Deshalb lieber mehrere Flaschen poolen.</li> <li>• Zellzahl: die Ausgangsmenge sollte pro Probe zwischen <math>2 \times 10^6</math> Zellen/ml und <math>8 \times 10^5</math> Zellen/ml liegen, da mit einem Verlust von ca. 50 % während der Färbung zu rechnen ist für eine anschließende Segmentierung sollten <math>8 \times 10^4</math> Zellen/ml zur Verfügung stehen</li> <li>• Kontrollen: normale Population mit Invitrogen cell stain kit gefärbt und normale Population behandelt (5 Minuten bei <math>-80^\circ\text{C}</math>, 5 Minuten bei <math>+70^\circ\text{C}</math>) mit Invitrogen live-dead cell stain kit gefärbt</li> </ul>  |
| Herstellung Probensuspension | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellen in 15 ml Röhrchen überführen</li> <li>• 5 Minuten 300 g zentrifugieren, in 1ml PBS waschen, 5 Minuten bei 300 g zentrifugieren, Rücklauf abziehen, in 1ml PBS lösen, in 1ml PBS lösen</li> <li>• Proben mit <math>1\mu\text{l}</math> Invitrogen cell stain kit (Aliquot in <math>50\mu\text{l}</math> DMSO angesetzt, bei <math>-20^\circ\text{C}</math> gelagert) bei <math>4^\circ\text{C}</math> und für 30 Minuten im Dunkeln inkubieren</li> <li>• 5 Minuten bei 300 g zentrifugieren und Überstand verwerfen</li> <li>• in 1ml PBS mit abgeschnittener Pipettenspitze resuspendieren</li> <li>• erneut 5 Minuten bei 300 g zentrifugieren, Überstand verwerfen und in 0,9 ml PBS mit abgeschnittener Pipettenspitze 2 Minuten resuspendieren</li> <li>• Bestimmung der Zellzahl, Vorbereitung der Proben für die Segmentierung (= <math>8 \times 10^4</math> Zellen in 1ml PBS mit <math>1\mu\text{l}</math> Cochenillerot A)</li> </ul> |
| Zellzählung                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ermittlung von Zellzahl und Viabilität mit einer Zählkammer (z.B. Fuchs-Rosenthal Zählkammer). Dabei wird ein bestimmtes Volumen einer mit Trypanblau gefärbten Zellsuspension unter dem Mikroskop gezählt. Dunkel gefärbte Zellen werden als "tot" gewertet, ungefärbte als "vital".</li> <li>• Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen in das Cytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Bei zu langer Einwirkzeit des Trypanblau ist ein Anstieg von toten Zellen zu beobachten, da dieser Farbstoff zytotoxisch wirkt. Sicherheitshinweise beachten: Trypanblau gilt als gesundheitsschädlich.</li> </ul>  |

### 6.1.11 Protokoll: Toxizitätstests anhand von HeLa-Zellen

| Versuche mit CuCl <sub>2</sub>                           |   |  |
|--|---|--|
| Zusammensetzung<br>Probensuspension-<br>Positivkontrolle | Zusammensetzung<br>Probensuspension-<br>0,2 mM CuCl <sub>2</sub>  | Zusammensetzung<br>Probensuspension-<br>0,5 mM CuCl <sub>2</sub> |
| 100 µl HeLa<br>(10 <sup>5</sup> Zellen/ml)               | 100 µl HeLa<br>(10 <sup>5</sup> Zellen/ml)  | 100 µl HeLa<br>(10 <sup>5</sup> Zellen/ml)                       |
| 850 µl 60% Saccharoselösung                              | 850 µl 60% Saccharoselösung   | 750 µl 60% Saccharoselösung                                      |
| 50 µl PBS  | ---   | ---  |
| ---  | 50 µl CuCl <sub>2</sub>   | 50 µl CuCl <sub>2</sub>  |
| Segmentvolumen:  | 1-2 µl  |  |
| Zellzahl pro Segment:                                    | 7-14  |  |
| Flussraten   | Träger (Tetradecan): 40 µl/min, Probensuspension 20 µl/min  |  |
| Segmenterzeugung:  |   |  |
| Flussrate Messung:                                       | 4 µl/min  |  |
| Referenzversuch in<br>Kulturflaschen:                    | Fluoreszenzbildanalyse nach 2h und 24h Inkubation der HeLa-Zellen mit 0,5 mM, 1 mM und 2 mM CuCl <sub>2</sub> bei 37°C und 5% CO <sub>2</sub> .   |  |
| Versuche mit B21   |   |  |
| Vorbereitung Zellen:                                     | HeLa ohne DOX vom 09.04.08 (1,5x10 <sup>5</sup> ) 1 Flaschen abtrypsiniert und gepoolt, mit Rest von Konzentrationsabstufung gezählt: 302, 306=7,6x10 <sup>5</sup> Zellen/ml  |  |
| Stockkonzentration:                                      | 0,01 % B21 in DMSO, 1 % DMSO  |  |
| Proben   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unbehandelte Population mit Invitrogen cell stain kit gefärbt</li> <li>• Behandelte Population (5 Minuten -80 °C, 5 Minuten + 70 °C), mit Invitrogen cell stain kit gefärbt</li> <li>• Inkubation mit 0,01% B21 (30 Minuten), mit Invitrogen cell stain kit gefärbt</li> <li>• Inkubation mit 1% DMSO (30 Minuten), mit Invitrogen stain kit gefärbt</li> </ul>  |  |
| Versuchsdurchführung                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 8x1,05 ml (=8x10<sup>5</sup> Zellen/ml) in 15ml Röhrchen überführt, 5 Minuten 300 g zentrifugiert, in 1 ml PBS gewaschen, 5 Minuten 300 g zentrifugiert, Rücklauf abgezogen</li> <li>• in 1 ml PBS gelöst</li> <li>• in 1 ml PBS gelöst, 5 Minuten -80°C, 5 Minuten + 70°C</li> <li>• in 1 ml 0,01 % B21 gelöst (Stocklösung 1 % 10µl + 990µl PBS)</li> <li>• in 1ml 1% DMSO gelöst (Stocklösung 100 % 10µl + 990µl PBS)</li> <li>• Proben 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert</li> <li>• Proben mit 1 µl Invitrogen cell stain kit (Aliquot mit 50 µl DMSO (am 11.04.08) angesetzt), bei 4°C</li> </ul> |  |

|   |  |
|---|--|
|   | <p>30 Minuten im Dunkeln inkubiert, 5 Minuten 300 g zentrifugiert, Überstand verworfen, in 1 ml PBS mit abgeschnittener Pipettenspitze resuspendiert, 5 Minuten 300 g zentrifugiert, Überstand verworfen, in 0,9 ml PBS mit abgeschnittener Pipettenspitze 2 Minuten resuspendiert, Zählung und Vorbereitung der Proben (= <math>4 \times 10^4</math> Zellen in 1 ml PBS mit 1 <math>\mu</math>l Cochenillerot A)</p>  |
| <p>Referenzversuche in Kulturflaschen</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unbehandelte Population, ZZ 207, 191 = <math>4,98 \times 10^5</math> Zellen/ml, 161 <math>\mu</math>l (= <math>4 \times 10^4</math>) Zelllösung + 838 <math>\mu</math>l PBS + 1 <math>\mu</math>l Cochenillerot A, Zellen sind gut, im Fluoreszenzmikroskop leuchten einige, wenige</li> <li>• Behandelte Population, ZZ 52, 40 = <math>1,15 \times 10^5</math> Zellen/ml 695 <math>\mu</math>l (= <math>4 \times 10^4</math>) Zelllösung + 304 <math>\mu</math>l PBS + 1 <math>\mu</math>l Conchenille Rot A, Zellen sehen tot aus, im Fluoreszenzmikroskop leuchten einige, wenige</li> <li>• 0,01% B21 (30 Minuten), ZZ 48, 58 = <math>1,33 \times 10^5</math> Zellen/ml, 601 <math>\mu</math>l (= <math>4 \times 10^4</math>) Zelllösung + 398 <math>\mu</math>l PBS + 1 <math>\mu</math>l Cochenillerot A, Zellen sind ok, im Fluoreszenzmikroskop leuchten einige, aber sehr schwach (es leuchten nicht alle toten Zellen?)</li> <li>• 1% DMSO (30 Minuten), ZZ 185, 202 = <math>4,8 \times 10^5</math> Zellen/ml, 167 <math>\mu</math>l (= <math>4 \times 10^4</math>) Zelllösung + 832 <math>\mu</math>l PBS + 1 <math>\mu</math>l Cochenillerot A, Zellen sehen nicht gut aus, im Fluoreszenzmikroskop keine Zellen gefunden (standen zu lange im PBS?)</li> </ul> |

**6.1.12 Protokoll: Isolierung *C. elegans* Embryonen aus Adulttieren**

- Nach 3 Tagen Inkubation Abspülen der Nematoden mit M9-Puffer von den Wouts-Agarplatten.
- Abzentrifugieren bei 6000 U/min für kurze Zeit.
- Abnahme Überstand.
- Verteilung der Zellsuspension auf 1,5 ml Tubes.
- Zugabe von 1 ml Hypochloridlösung.
- 2 min Schüttel und für 30 s bei 6000 U/min abzentrifugieren.
- Überstand abnehmen und mit M9-Puffer spülen.
- Dieser Arbeitsschritt wird 4x wiederholt.
- Am Ende 3x mit M9-Puffer spülen.

### 6.1.13 Protokoll: Referenzversuche in Mikrotiterplatten

**Tabelle 6-10:** Zusammensetzung der Proben für die Referenzversuche in Mikrotiterplatten. Zusammensetzung für 1 well a 250 µl, pro Ansatz 4x250 µl hergestellt. Die Negativkontrolle (Hintergrund) für alle Versuche Medium + Farbstoff.

| Wirkstoff                                | Positiv-<br>kontrolle   | Konzentration<br>A  | Konzentration<br>B  | Konzentration<br>C  | Konzentration<br>D  |
|--|---|---|---|---|---|
| DNP<br>(1 mM)                            | 0,5 µl Coch. A<br>(2%)<br>2,6 µl Zellen<br>(2x10 <sup>7</sup> Z/ml) | 0,5 µl Coch. A<br>(2%)<br>2,6 µl Zellen<br>(2x10 <sup>7</sup> Z/ml) | 0,5 µl Coch. A<br>(2%)<br>2,6 µl Zellen<br>(2x10 <sup>7</sup> Z/ml) | 0,5 µl Coch. A<br>(2%)<br>2,6 µl Zellen<br>(2x10 <sup>7</sup> Z/ml) | 0,5 µl Coch. A<br>(2%)<br>2,6 µl Zellen<br>(2x10 <sup>7</sup> Z/ml) |
| Hefe                                     | 246,7 µl YNB  | 2,5 µl DNP<br>244,4 µl YNB  | 12,5 µl DNP<br>234,4 µl YNB   | 25 µl DNP<br>221,9 µl YNB   | 125 µl DNP<br>121,9 µl YNB  |
| Decapeptid<br>(21 mg/ml)                 | 0,5 µl Coch. A<br>(2%)<br>2,6 µl Zellen<br>(2x10 <sup>7</sup> Z/ml) | 0,5 µl Coch. A<br>(2%)<br>2,6 µl Zellen<br>(2x10 <sup>7</sup> Z/ml) | 0,5 µl Coch. A<br>(2%)<br>2,6 µl Zellen<br>(2x10 <sup>7</sup> Z/ml) | 0,5 µl Coch. A<br>(2%)<br>2,6 µl Zellen<br>(2x10 <sup>7</sup> Z/ml) | ---   |
| Hefe                                     | 246,7 µl YNB  | 2,4 µl Peptid<br>244,5 µl YNB                                       | 6 µl Peptid<br>240,9 µl YNB   | 11,9 µl Peptid<br>265 µl YNB  |   |
| Wirkstoff                                | Positiv-<br>kontrolle   | Konzentration<br>A  | Konzentration<br>B  | Konzentration<br>C  | Konzentration<br>D  |
| Decapeptid<br>(12,5 mg/ml)               | 0,5 µl Coch. A<br>(2%)<br>8,3 µl Zellen<br>(1x10 <sup>9</sup> Z/ml) | 0,5 µl Coch. A<br>(2%)<br>8,3 µl Zellen<br>(1x10 <sup>9</sup> Z/ml) | 0,5 µl Coch. A<br>(2%)<br>8,3 µl Zellen<br>(1x10 <sup>9</sup> Z/ml) | ---   | ---   |
| <i>E. coli</i>                           | 241,2 µl<br>synth.M.  | 4 µl Peptid<br>237,2 µl<br>synth.M.                                 | 20 µl Peptid<br>221,2 µl<br>synth.M.                                |   |   |
| DNP<br>(1 mM)                            | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    |
| <i>E. coli</i>                           | 223 µl synth.M.   | 0,5 µl DNP<br>222,5 µl<br>synth.M                                   | 2,5 µl DNP<br>220,5 µl<br>synth.M                                   | 25 µl DNP<br>198 µl synth.M   | 125 µl DNP<br>98 µl synth.M   |
| DCP<br>(1 mM)                            | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    |
| <i>E. coli</i>                           | 223 µl synth.M.   | 0,5 µl DCP<br>222,5 µl<br>synth.M                                   | 2,5 µl DCP<br>220,5 µl<br>synth.M                                   | 25 µl DCP<br>198 µl synth.M   | 125 µl DCP<br>98 µl synth.M   |
| DMSO<br>(100 %)                          | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    |
| <i>E. coli</i>                           | 223 µl synth.M.   | 0,5 µl DMSO<br>222,5 µl<br>synth.M                                  | 2,5 µl DMSO<br>220,5 µl<br>synth.M                                  | 25 µl DMSO<br>198 µl synth.M  | 125 µl DMSO<br>98 µl synth.M  |
| AuNP<br>(HAuCl <sub>4</sub><br>=0,05 mM) | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    | 1 µl Coch. A<br>(1%)<br>26 µl Zellen<br>(5x10 <sup>8</sup> Z/ml)    |
| <i>E. coli</i>                           | 223 µl synth.M.   | 0,5 µl HAuCl <sub>4</sub><br>222,5 µl<br>synth.M                    | 2,5 µl HAuCl <sub>4</sub><br>220,5 µl<br>synth.M                    | 25 µl HAuCl <sub>4</sub><br>198 µl synth.M                          | 125 µl HAuCl <sub>4</sub><br>98 µl synth.M                          |

### 6.1.14 Protokoll Silanisierung

- Carosche Säure frisch hergestellt (3 Teile Wasserstoffperoxid / 1 Teil konz. Schwefelsäure), mit abgedrehter Kanüle vorsichtig in den Kanal einbringen, für 2 bis 3 Minuten einwirken lassen (immer wieder nachfüllen).
- mit Wasser spülen bis Output neutralen pH-Wert zeigt.
- mit Isopropanol (wasserfrei) den Kanal mehrmals füllen.
- mit Druckluft Kanal freiblasen.
- im Trockenschrank bei 80°C ca. 2 h (Vakuum) trocknen lassen.
- ab jetzt muss der Chip absolut von der Luft getrennt gehalten werden (Luftfeuchtigkeit).
- Überführen in Exikator (mit aktiven Trockenmaterial) zum Abkühlen.
- Einfüllen (wieder mit abgedrehter Kanüle ) von 10% ODT in Heptan (wasserfrei).
- Für mind. 3 h bei 60 °C (Trockenschrank) in Heptan-Atmosphäre einwirken lassen (Chip füllen zum Chip Heptan geben und in den Trockenschrank legen)
- Chip unter Argon-Atmosphäre bringen.
- Mit Isopropanol spülen.
- Unter Argon -Atmosphäre ist der Chip lagerbar.

## 6.2 Standardmethoden und Geräte

Für die Charakterisierung der Metallnanopartikel wurden DCS-, UV/VIS-Spektralphotometrie-, Durchlicht-Dunkelfeldmikroskopie- und REM-Messungen durchgeführt. Die UV-VIS Spektralphotometrie wurde für die Bestimmung der optischen Dichte bei den Referenzmessungen in Mikrotiterplatten und für die Untersuchung der Absorptionsbanden von Nanopartikeln in Mischung mit synthetischem Medium eingesetzt. Nachfolgend sind die Verfahren kurz erläutert.

### 6.2.1 Differentielles Zentrifugales Sedimentationssystem (DCS)

Mit dem analytischen Zentrifugensystem DC 20000 der Firma CPS Instruments Inc. (USA) ist es möglich, Partikelgrößen zwischen 5 nm und 40 µm zu bestimmen. Grundlage dieses Verfahrens ist die Trennung von sphärischen Partikeln unterschiedlicher Volumina aufgrund ihrer verschiedenen Sedimentationsgeschwindigkeiten in einem Dichtegradienten. Die Analyse der Sedimentationszeiten erfolgte mit Hilfe eines optischen Analyseverfahrens auf Grundlage der Mie-Theorie. Die benötigten Materialeigenschaften und physikalischen Parametern wurden in Prozeduren festgelegt (Tabelle 6-11).

**Tabelle 6-11:** DCS-Prozeduren für die Erfassung der Größenverteilung von Silber- und Goldnanopartikeln

| DCS Prozedur für Silber:<br>Ag-300 nm-5 nm | DCS Prozedur für Gold: Au-300 nm-5 nm      |
|--|--|
| <b>Probenparameter</b>                     | <b>Probenparameter</b>                     |
| Durchmesser <sub>max</sub> : 0,3 microns   | Durchmesser <sub>max</sub> : 0,3 microns   |
| Durchmesser <sub>min</sub> : 0,002 microns | Durchmesser <sub>min</sub> : 0,005 microns |
| Partikeldichte: 10,5 g/ml                  | Partikeldichte: 19,32 g/ml                 |
| Brechungsindex Partikel: 1,7               | Brechungsindex Partikel: 0,36              |
| Partikelabsorption: 1 K                    | Partikelabsorption: 1 K                    |
| Non-Sphericity Faktor: 1                   | Non-Sphericity Faktor: 1                   |
| <b>Parameter Kalibrationsstandard</b>      | <b>Parameter Kalibrationsstandard</b>      |
| Peak Durchmesser: 0,377 microns            | Peak Durchmesser: 0,377 microns            |
| Halbwertsbreite: 0,15 microns              | Halbwertsbreite: 0,15 microns              |
| Partikeldichte: 1,385 g/mol                | Partikeldichte: 1,385 g/mol                |
| <b>Parameter Flüssigkeit</b>               | <b>Parameter Flüssigkeit</b>               |
| Dichte Flüssigkeit: 1,045 g/ml             | Dichte Flüssigkeit: 1,045 g/ml             |
| Brechungsindex: 1,35                       | Brechungsindex: 1,35                       |
| Viskosität Flüssigkeit: 1,07 cps           | Viskosität Flüssigkeit: 1,07 cps           |

### 6.2.2 UV/VIS-Spektrometrie

Das Zweistrahl-Spektralphotometer (Specord 200, Analytik Jena AG) diente zur Aufnahme der Extinktionsspektren der dispergierten Nanopartikel. Für Gold- und Silbernanopartikel zeigen sich ausgeprägte Plasmonenresonanzen im sichtbaren Spektralbereich. Die Extinktionsspektren wurden über einen Wellenlängenbereich von 220-900 nm aufgenommen.

Das UV/VIS Spektrometer wurde weiterhin für die Ermittlung von Referenzdaten aus den Versuchen in Mikrotiterplatten für die unterschiedlichen Testorganismen und Testsubstanzen eingesetzt. Hier wurde die optische Dichte (OD) bei 600 nm bestimmt.

Für die Messungen wurden Einmal-UV-Küvetten der Firma Roth für  $\lambda > 270$  nm verwendet.

### 6.2.3 Dunkelfeldmikroskopie

Mit der Dunkelfeldmikroskopie können einzelne Nanopartikel aufgrund von Streulichtmessung sichtbar gemacht werden. Abhängig von Größe und Material erscheinen Nanopartikel im Dunkelfeld als farbige Lichtpunkte. Mit der hier eingesetzten Methode konnte eine Aussage über die spektrale Lage der Plasmonenresonanz im Streulichtspektrum eines einzelnen Partikels getroffen werden.

Der Versuchsaufbau setzt sich aus einem optischen Mikroskop (JENAVAL, Durchlicht-Forschungsmikroskop, CARL ZEISS JENA), einem Spektrometer (Acton SP-2150i, Princeton Instruments) mit variablem Eintrittsspalt, einem abbildenden Beugungsgitter und einer Kamera mit CCD-Chip als Detektor (Andor iDus DU420, Andor Technology) zusammen. Während einer Belichtungszeit von zehn Sekunden werden die Streueignisse für jede Wellenlänge des ausgewählten Messbereichs aufgezeichnet.

Für die Probenpräparation wurde 20  $\mu$ l verdünnter Nanopartikeldispersion auf gut gereinigte Objektträger plaziert und an der Luft getrocknet. Danach wurden die Objektträger mit Aqua dest. gespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

### 6.2.4 Rasterelektronenmikroskopie

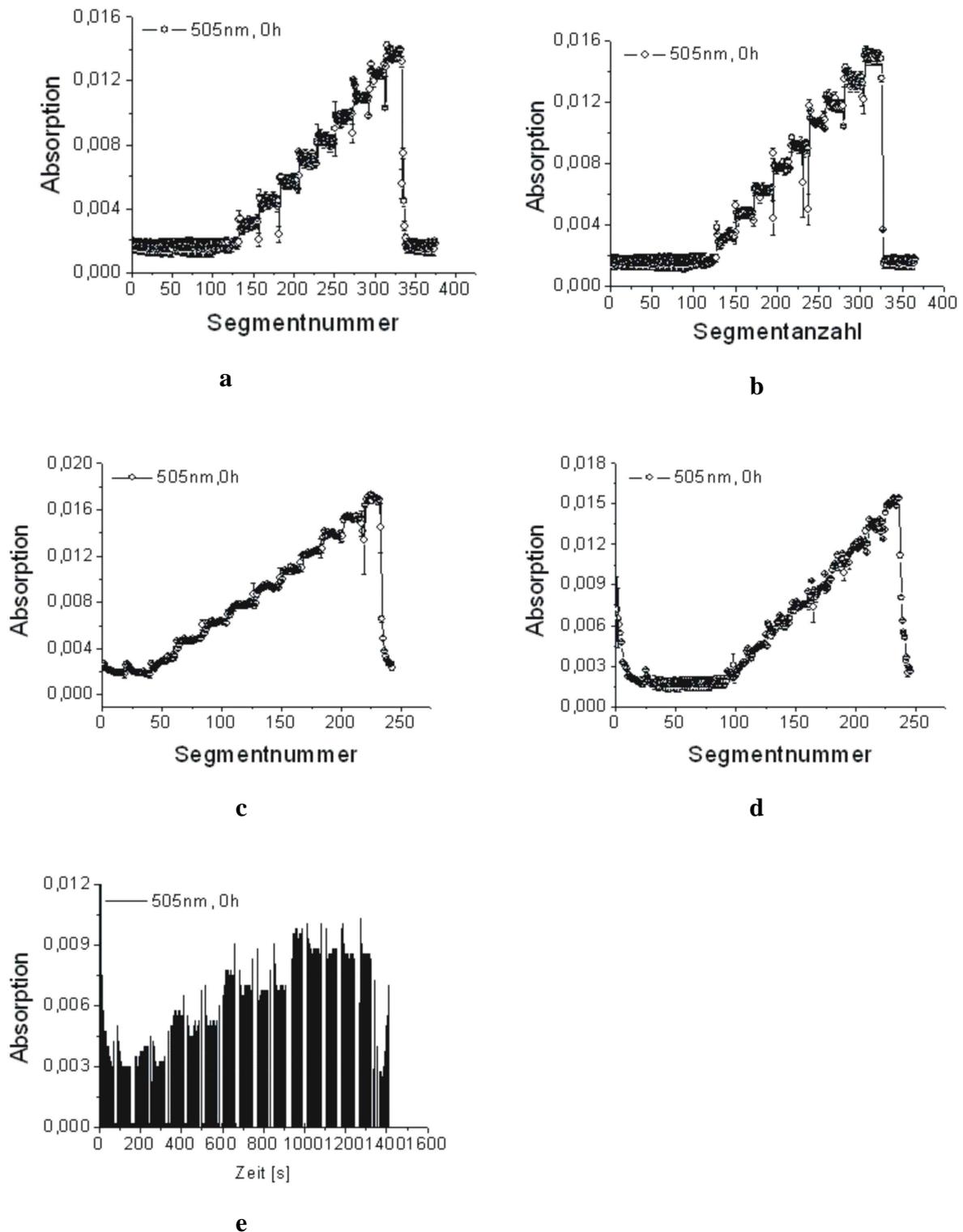
Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wird die Probe mit einem Elektronenstrahl abgerastert. Die Detektion der dabei aus dem Probenmaterial austretenden Sekundärelektronen führt zum REM-Bild. Die REM-Messungen wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop JSM-6380LV von JEOL (USA) durchgeführt. Für die Messungen wurde die Probenlösung auf

sorgfältig gereinigten Silizium-Substraten (5 x 5 mm<sup>2</sup>) aufgetropft, an der Luft getrocknet, mit Aqua dest. gewaschen und anschließend mit Stickstoff trocken geblasen. Es wurden Bilder von reinen Nanopartikeln und Probenansätzen mit *E. coli* untersucht.

### **6.2.5 Transmissionselektronenmikroskopie**

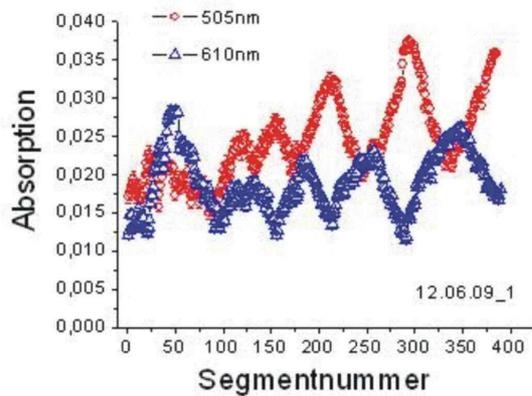
Mit der Transmissionselektronenmikroskopie kann durch das Durchstrahlen von dünnschichtigen Objekten mit Elektronen deren Darstellung möglich gemacht werden. Für die TEM-Messung wurden die aus den einzelnen Segmentsequenzen gewonnen Proben mit Paraformaldehyd fixiert, in PBS-Puffer aufgenommen und anschließend mit dem Kontrastmittel Wolframsäure versetzt. Auf die Kupferplättchen wurde ein Tropfen von 1-2 µl Probe aufgeben und nach Lufttrocknung vermessen. Die TEM-Messungen wurden von H. Romanus am ZMN Ilmenau am Transmissionselektronenmikroskop Philips Tecnai 20 S-TWIN (FEI-Beschleunigungsspannung 200kV) durchgeführt. Die Bilder wurden bei 12000 bis 490000facher Vergrößerung aufgenommen und als tif-Dateien gespeichert.

### 6.3 Blockweise Konzentrationseinstellung in Mikrofluidsegmentsequenzen

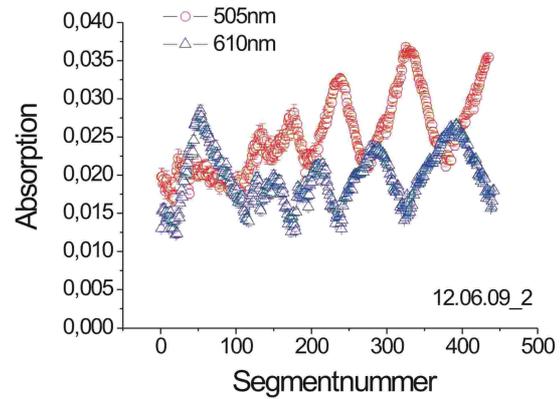


**Abb. 6-12:** Blockweise Erzeugung von 1- und 2-dimensionalen Konzentrationsfeldern, Ermittlung durch photometrische Messung der Absorption des Indikatorfarbstoffes Cochenillerot A. **a)** Mittlere Absorptionswerte für Testsubstanz Coffein. **b)** Mittlere Absorptionswerte für Testsubstanz DCP. **c)** Mittlere Absorptionswerte für Testsubstanz DMSO. **d)** Mittlere Absorptionswerte für Testsubstanz PVP. **e)** Absorptionswerte binäre Mischung DMSO und PVP.

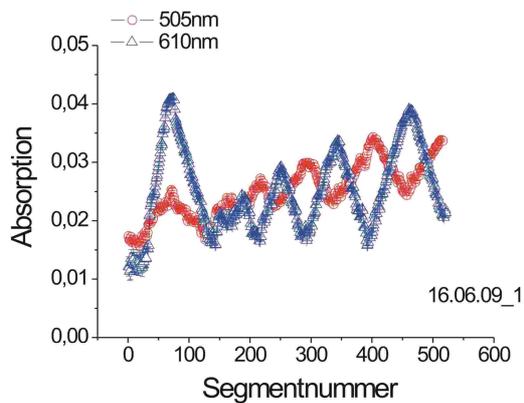
## 6.4 2D-Konzentrationseinstellung in Mikrofluidsegmentsequenzen



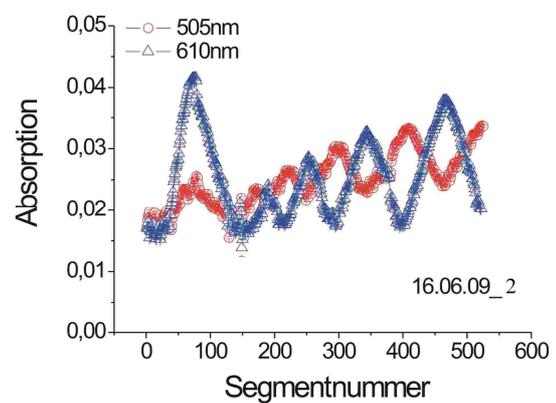
a-1



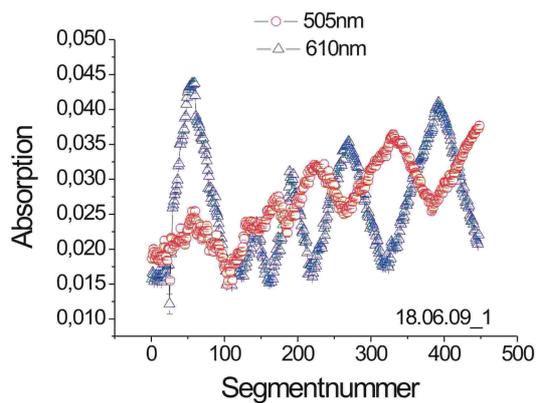
a-2



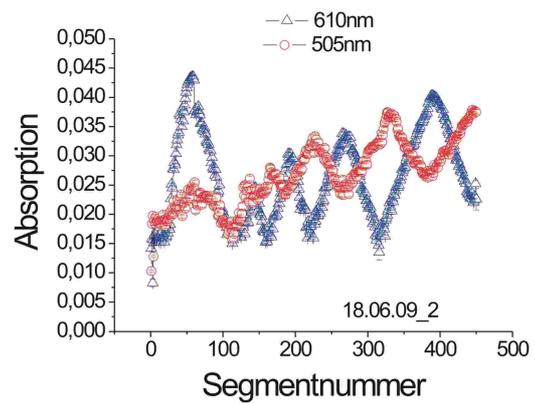
b-1



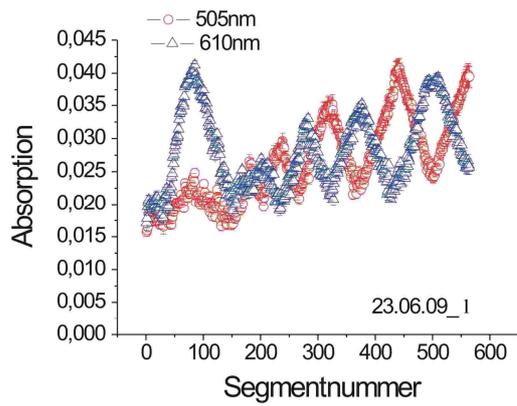
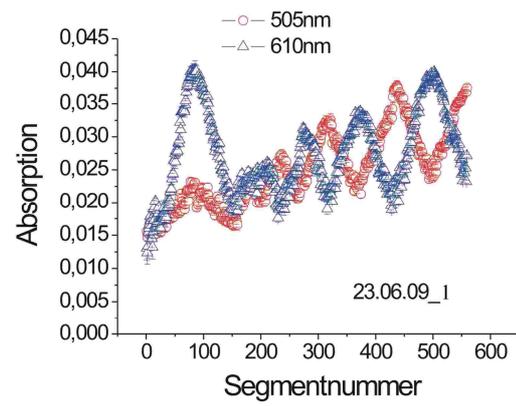
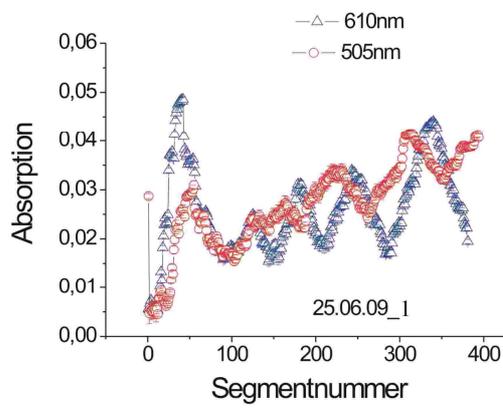
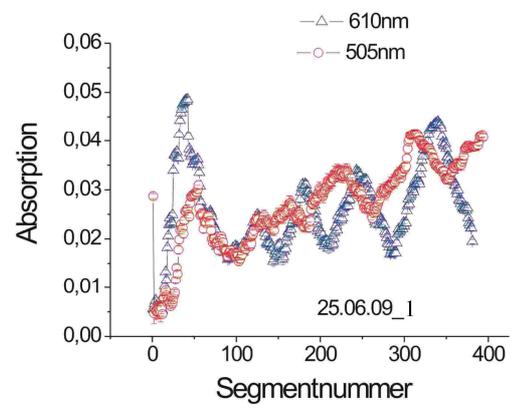
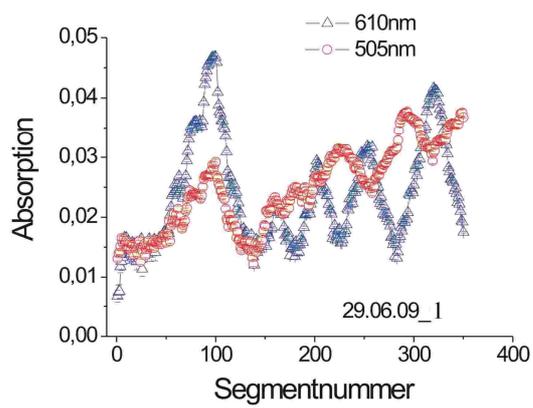
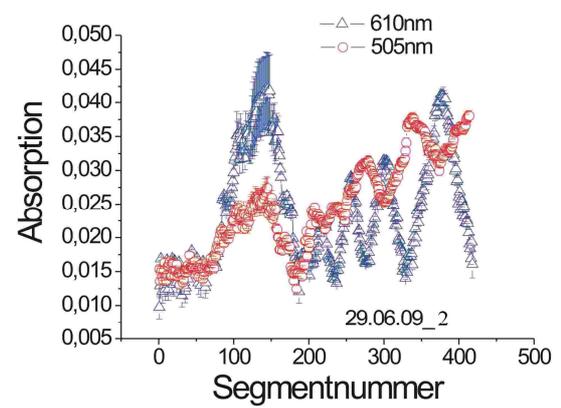
b-2

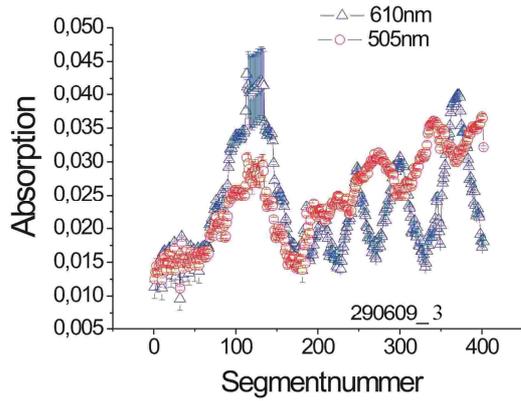
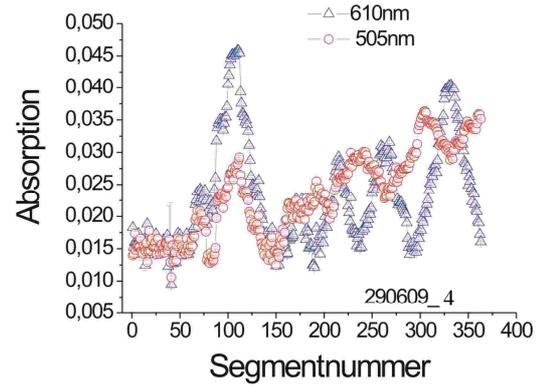
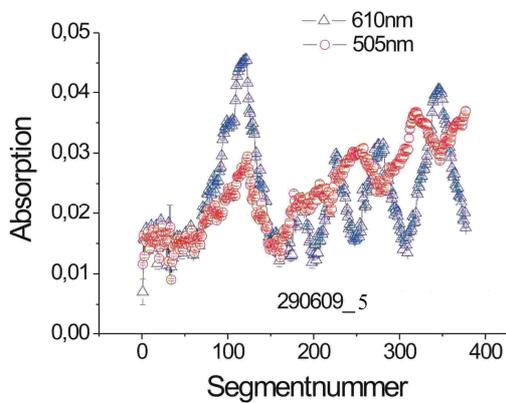
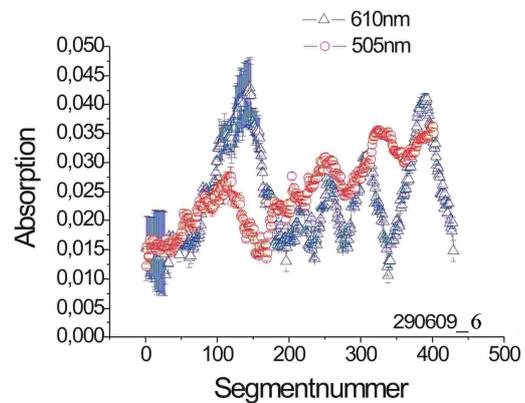


c-1



c-2

**d-1****d-2****e-1****e-2****f-1****f-2**

**f-3****f-4****f-5****f-6**

**Abb. 6-13:** Absorptionswerte Cochenillerot A und Indigokarmin nach 2D-Konzentrationseinstellung im Mikrofluidsegment. **a-1)**  $\text{CuCl}_2$ +DNP, **a-2)**  $\text{CuCl}_2$ +DNP\_WH, **b-1)** AuNP+DNP, **b-2)** AuNP+DNP\_WH, **c-1)** DCP+DNP, **c-2)** DCP+DNP\_WH, **d-1)** DCP\_AgNP\_braun, **d-2)** DCP\_AgNP\_gelb, **e-1)** AgNP\_braun+DCP, **e-2)** AuAgNP+ $\text{CuCl}_2$ , **f-1)**  $\text{CuCl}_2$ +AgNP\_braun, **f-2)**  $\text{CuCl}_2$ +DCP, **f-3)**  $\text{CuCl}_2$ +DNP, **f-4)** DCP+AgNP\_gelb, **f-5)** DCP+AuNP, **f-6)** DNP+AgNP\_braun

## 6.5 Korrektur des durch additive Überlagerung der Farbstoffspektren bedingten Konzentrationsfehlers

Die Überlappung der Absorptionsbanden von Farbstoffen führt - sofern keine chemische Beeinflussung zwischen den Farbstoffen stattfindet - zu einer additiven Überlagerung der Einzelspektren (Superposition).

$$\text{Einzelfarbstoff : } E(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (\text{Lambert - Beersches Gesetz})$$

$$\text{Stoffgemisch : } E(\lambda) = d \cdot \sum_k \varepsilon_k(\lambda) \cdot c_k \quad (\text{Superposition})$$

Für zwei Farbstoffe A und B ergibt sich für die Extinktion bei den Wellenlängen  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$ :

$$\begin{aligned} E(\lambda_1) &= E_A(\lambda_1) + E_B(\lambda_1) = d \cdot (c_A \cdot \varepsilon_A(\lambda_1) + c_B \cdot \varepsilon_B(\lambda_1)) \\ E(\lambda_2) &= E_A(\lambda_2) + E_B(\lambda_2) = d \cdot (c_A \cdot \varepsilon_A(\lambda_2) + c_B \cdot \varepsilon_B(\lambda_2)) \end{aligned}$$

$$\begin{pmatrix} E(\lambda_1) \\ E(\lambda_2) \end{pmatrix} = d \cdot \begin{pmatrix} \varepsilon_A(\lambda_1) & \varepsilon_B(\lambda_1) \\ \varepsilon_A(\lambda_2) & \varepsilon_B(\lambda_2) \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} c_A \\ c_B \end{pmatrix}$$

Nach Umformung mittels folgender Matrizenoperation:

$$\begin{aligned} A \cdot X &= Y \\ A^{-1} \cdot A \cdot X &= A^{-1} \cdot Y \quad ; \quad A^{-1} \cdot A = E \\ X &= A^{-1} \cdot Y \end{aligned}$$

ergibt sich für die Berechnung der Farbstoffkonzentrationen  $c_A$  und  $c_B$  folgender Zusammenhang:

$$\begin{pmatrix} c_A \\ c_B \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \varepsilon_A(\lambda_1) & \varepsilon_B(\lambda_1) \\ \varepsilon_A(\lambda_2) & \varepsilon_B(\lambda_2) \end{pmatrix}^{-1} \cdot \begin{pmatrix} E(\lambda_1) \\ E(\lambda_2) \end{pmatrix} \cdot d^{-1}$$

Für photometrische Messungen im Schlauch ist die Bestimmung des optischen Weges  $d$  durch die gekrümmten Flächen der Schlauchwand schwierig. Auch die Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon(\lambda)$ , welche durch Messung der Extinktion  $E(\lambda)$  bei bekannter Konzentration  $c$  zwischen planparallelen Flächen mit definiertem Abstand spektrometrisch bestimmt werden, entsprechen nicht den Werten im Mikrodurchflussphotometer, da einerseits Brechungseffekte durch die Krümmung des Schlauches auftreten, andererseits das Emissionsspektrum einer LED relativ

breit ( $\Delta\lambda_{1/2} = 20..30 \text{ nm}$ ) ist. Letzteres könnte durch eine Wichtung der Extinktionskoeffizienten mit dem LED-Spektrum unter Berücksichtigung der wellenlängenspezifischen Empfindlichkeit der Photodioden korrigiert werden. Der messtechnische Aufwand hierfür wäre jedoch sehr groß.

Eine Lösung all dieser Probleme gelang durch Einführung von „spezifischen photometrischen Extinktionskoeffizienten“  $\varepsilon'(\lambda)$ . Diese wurden durch Kalibrierung der einzelnen Messkanäle ermittelt und beinhalten die Extinktionseigenschaften des Farbstoffes im Schlauch, die Emissionseigenschaften der LED sowie die wellenlängenspezifische Sensitivität der Photodiode.

$$\text{Definition :} \quad \varepsilon'(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot d$$

$$\text{Photometer :} \quad E(\lambda) = \varepsilon'(\lambda) \cdot c$$

$$\text{Stoffgemisch im Photometer :} \quad E(\lambda) = \sum_k \varepsilon'_k(\lambda) \cdot c_k$$

Für ein Zwei-Farbstoffsystem (**A** und **B**) ergibt sich für die photometrischen Messungen bei  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$  folgender Zusammenhang:

$$\begin{aligned} E(\lambda_1) &= E_A(\lambda_1) + E_B(\lambda_1) = \varepsilon'_A(\lambda_1) \cdot c_A + \varepsilon'_B(\lambda_1) \cdot c_B \\ E(\lambda_2) &= E_A(\lambda_2) + E_B(\lambda_2) = \varepsilon'_A(\lambda_2) \cdot c_A + \varepsilon'_B(\lambda_2) \cdot c_B \end{aligned}$$

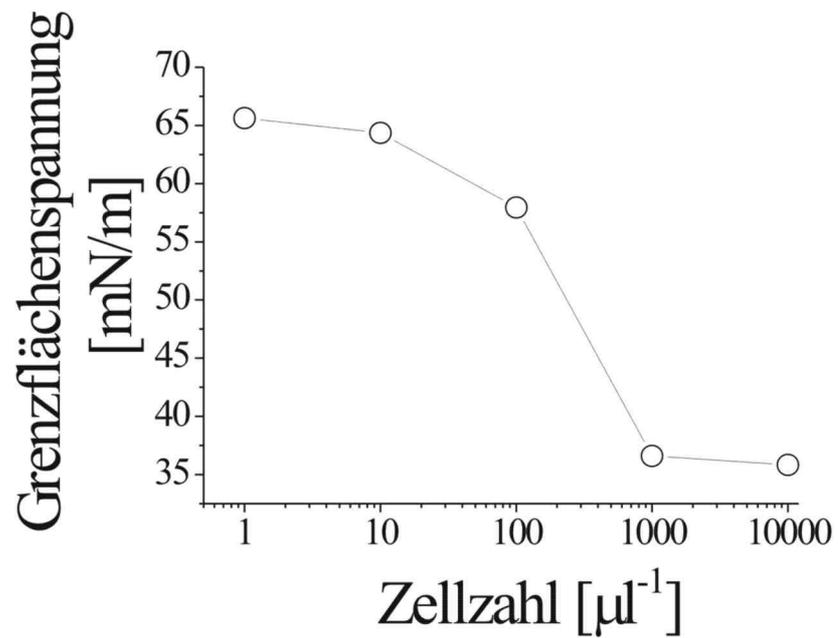
$$\begin{pmatrix} E(\lambda_1) \\ E(\lambda_2) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \varepsilon'_A(\lambda_1) & \varepsilon'_B(\lambda_1) \\ \varepsilon'_A(\lambda_2) & \varepsilon'_B(\lambda_2) \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} c_A \\ c_B \end{pmatrix}$$

Die Farbstoffkonzentrationen  $c_A$  und  $c_B$  berechnen sich wie folgt:

$$\begin{pmatrix} c_A \\ c_B \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \varepsilon'_A(\lambda_1) & \varepsilon'_B(\lambda_1) \\ \varepsilon'_A(\lambda_2) & \varepsilon'_B(\lambda_2) \end{pmatrix}^{-1} \cdot \begin{pmatrix} E(\lambda_1) \\ E(\lambda_2) \end{pmatrix}$$

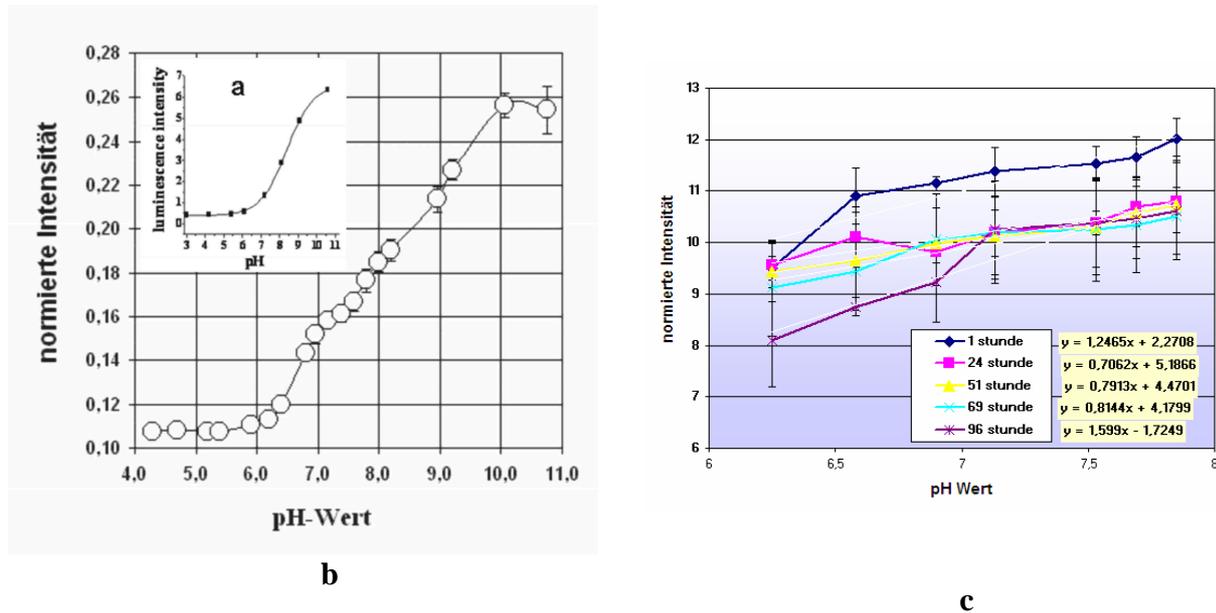
Quelle: Steffen Schneider FG Physikalische Chemie/MRT, TU Ilmenau, Optimi-Projekt.

## 6.6 Abhängigkeit der Grenzflächenspannung von der Zelldichte



**Abb. 6-14:** Darstellung der Abhängigkeit zwischen Grenzflächenspannung und Zellzahl anhand von *E. coli* (Versuchsdurchführung R. Hartung)

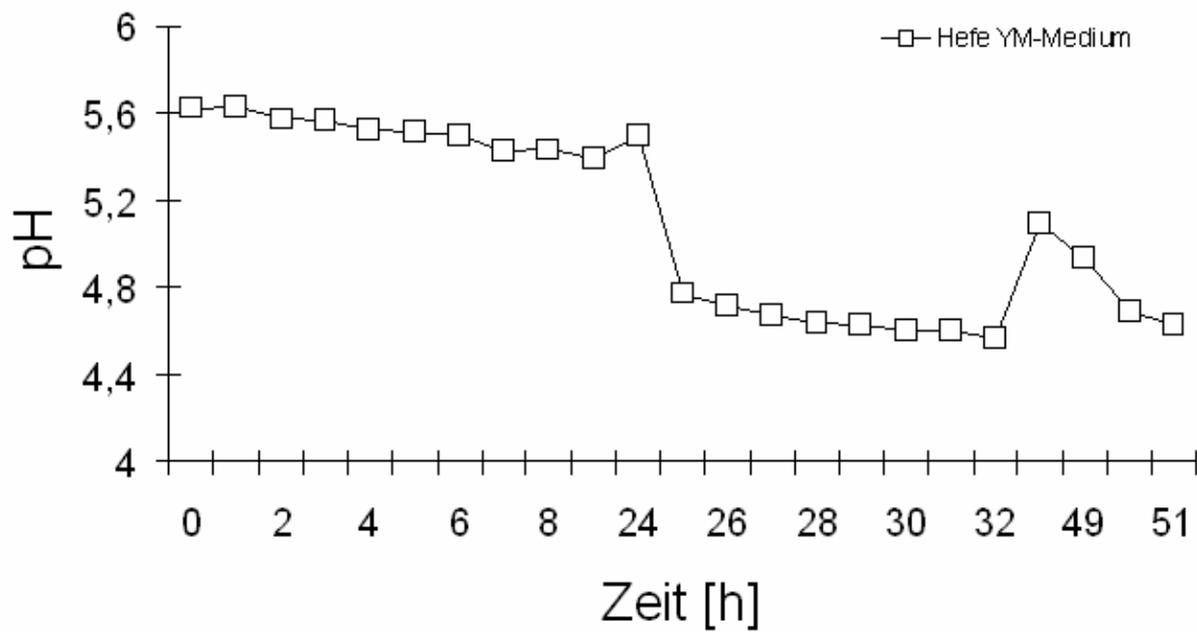
## 6.7 Kalibrierungskurven für HPTS/p-HEMA-Mikrobeads im Segment<sup>a</sup>



**Abb. 6-15:** Kalibrierungskurven für HPTS/p-HEMA-Mikrobeads in Mikrofluidsegmenten. **a)** Referenzkurve Universität Regensburg, Institut für Analytische Chemie, Prof. Wolbeis, durchgeführten Versuchen nicht im Segment. **b)** pH-Wert Abhängigkeit von pH-sensitiven Mikrobeads für Pufferlösungen mit pH-Werten von 4 bis 11. **c)** Zeitabhängige Kalibrierungskurven im stoffwechselrelevanten pH-Bereich für Mikrobeads im DYT-Medium, inkubiert bei 37 °C für 100 h,  $10^9$  Beads/Segment, 2500 beads/segment.

<sup>a</sup> [128] Cao, J. "Diplomarbeit, Nanodiagnostik in Fluidsystemen: Optische pH-Auslese in Nanoliterfluidsegmenten," 2008.

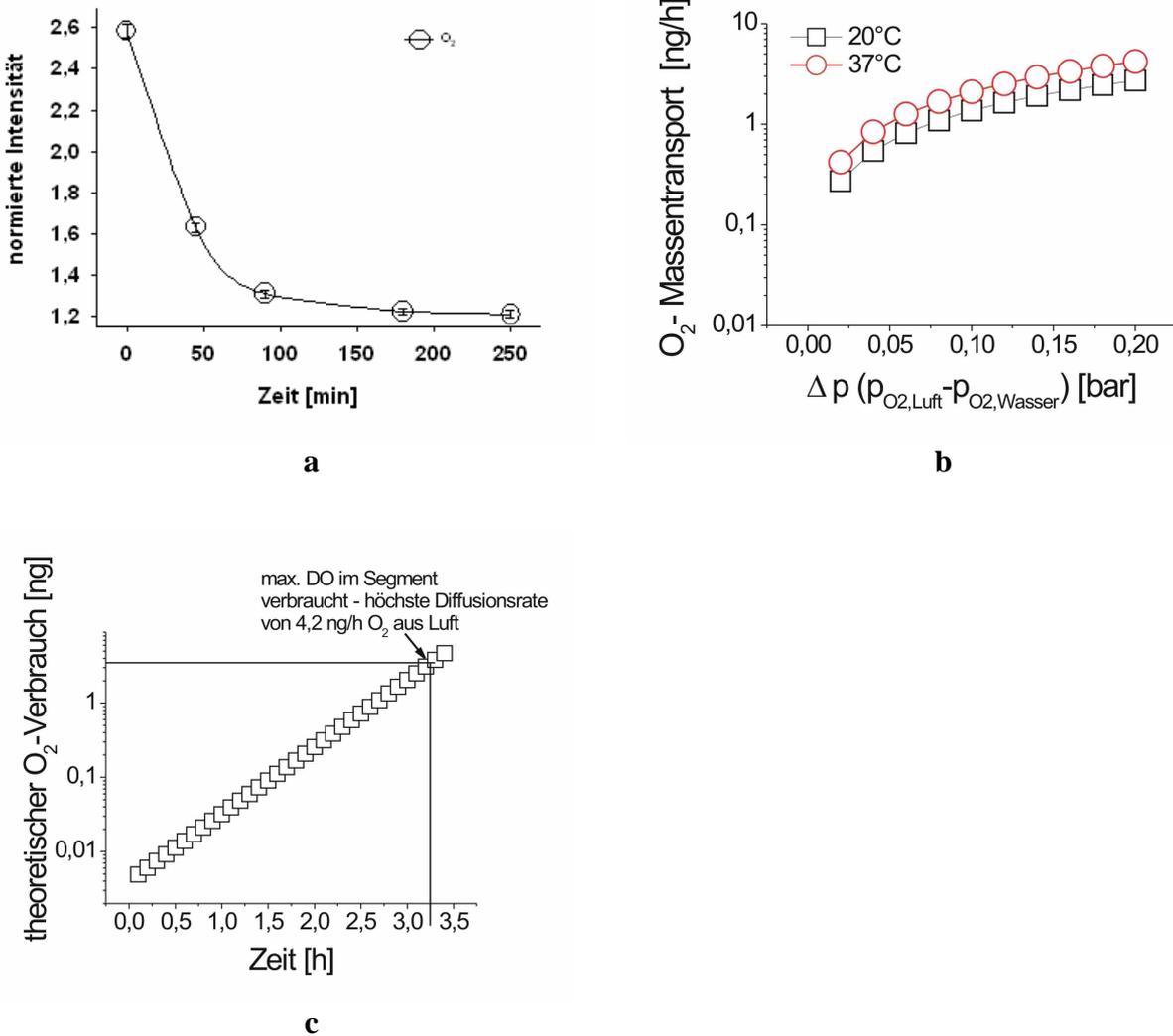
### 6.8 Referenzversuche in Erlenmeyerkolben: pH-Wert Messung während der Kultivierung von *S. cerevisiae*



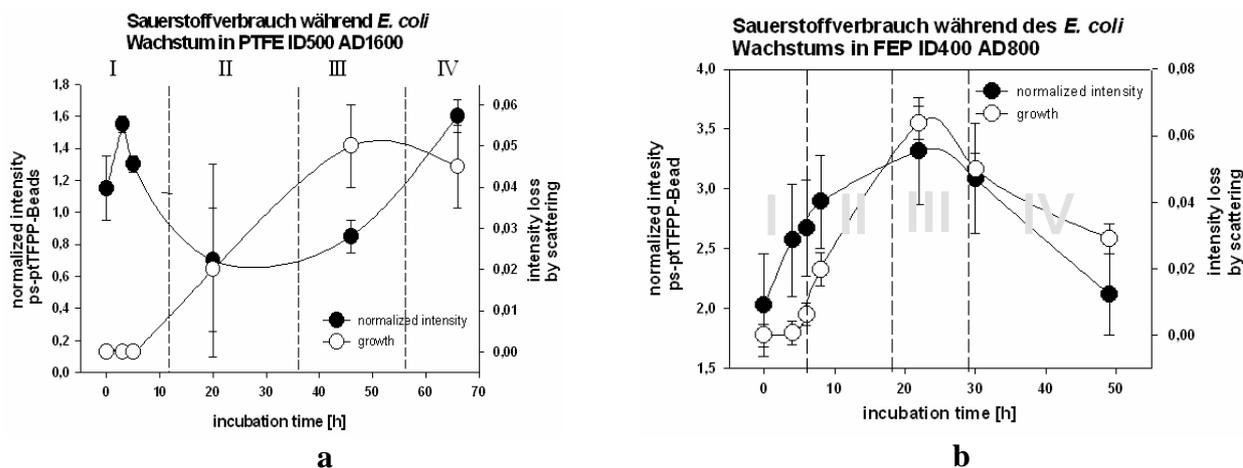
**Abb. 6-16:** pH-Wert Verlauf während der Kultivierung von Hefe im Erlenmeyerkolben, Messung mit pH-Elektrode<sup>b</sup>.

<sup>b</sup> Arbeiten aus der Diplomarbeit von Di Zhi, Titel: Charakterisierung von Zellkulturen durch Energie-Transfer- und pH-sensitive Chemochips.

## 6.9 Sauerstoffsensitive Mikrobeads und Gaspermeabilität der Polymerschläuche



**Abb. 6-17:** Sauerstofftransport in 500 nl Mikrofluidsegmenten **a)** Änderung der Fluoreszenzintensität von Sauerstoffsensitiven-Mikrobeads während der Gleichgewichtseinstellung in Mikrofluidsegmenten (Sauerstoffdiffusion durch PTFE-Schlauch mit  $d_i=0,5$  mm und  $d_w=0,55$  mm). **b)** Theoretischer Massentransport von Sauerstoff durch den PTFE-Schlauch in Abhängigkeit von der Druckdifferenz zwischen  $p_{\text{O}_2}$  in Luft und  $p_{\text{O}_2}$  in Wasser. **c)** Theoretischer Sauerstoffverbrauch bei Annahme von exponentiellem Wachstum während der Kultivierung von *E. coli* in Mikrofluidsegmenten.



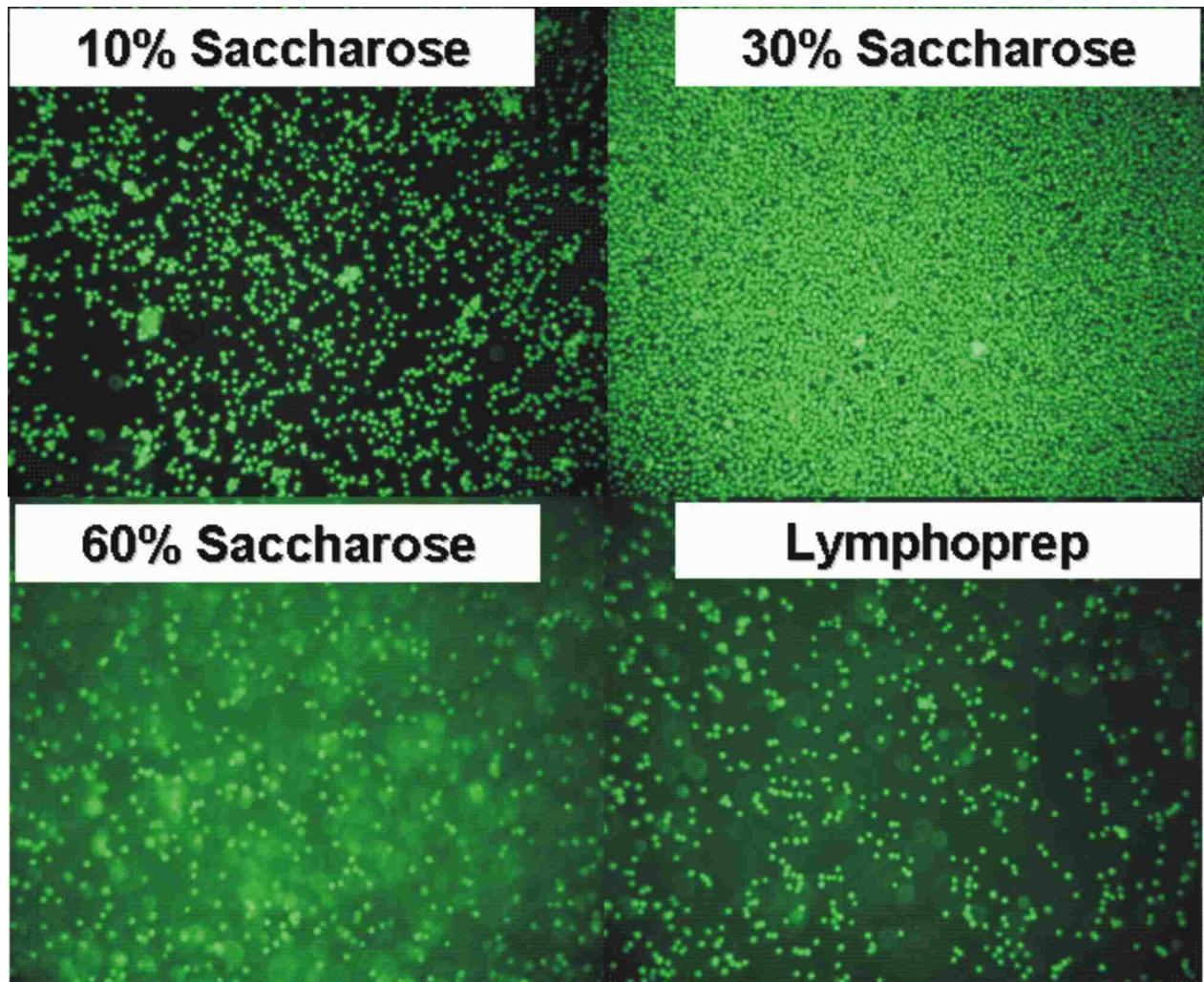
**Abb. 6-18:** Sauerstoffverbrauch und Wachstumskurven für die Kultivierung von *E. coli* im Mikrofluidsegment<sup>c</sup>, Anstieg Intensitätssignal Mikrobeads → Sauerstoffverbrauch, Abnahme Sauerstoffpartialdruck, Abnahme Intensitätssignal → Zunahme Sauerstoffpartialdruck. **a)** PTFE-Schlauch mit  $d_i=0,5$  mm und  $d_w=0,55$  mm, Startzelldichte:  $10^5$  Zellen/ml, Segmentvolumen: 550 nl, Minimalmedium. **b)** FEP-Schlauch mit  $d_i=0,4$  mm und  $d_w=0,2$  mm, Startzelldichte:  $10^5$  Zellen/ml, Segmentvolumen: 450 nl, Minimalmedium.

**Tabelle 6-12:** Gaspermeabilität und Sauerstofftransferrate für unterschiedliche Schlauchmaterialien. Die Permeabilitäten wurden den Herstellerdaten und der Literatur entnommen. Hersteller: FEP: Upchurch Scientific and Bohlender GmbH, PTFE: Upchurch Scientific, PE: Smith Medical.

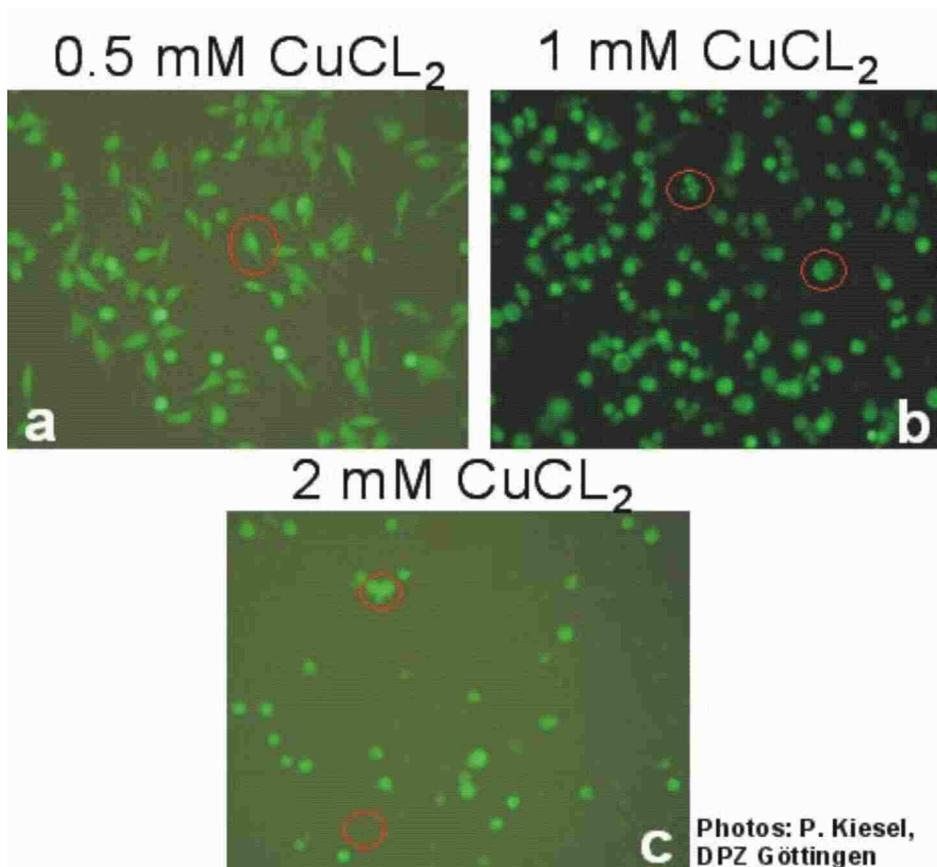
| Schlauchmaterial  | Permeabilität<br>[mol $\times$ cm/(cm <sup>2</sup> x s x atm)] | Sauerstofftransfer nach Holm<br>et al.[206] [ng/h x atm] |
|---|--|--|
| FEP<br>( $d_i$ 0,5 mm, $d_a$ 1,6 mm, $d_w$<br>0,55 mm, T=25°C)      | 1,52162E-12  | 0,044616634  |
| PTFE,<br>( $d_i$ 0,5 mm, $d_a$ 1,6 mm, $d_w$<br>0,55 mm, T=20°C)    | 1,5501E-12   | 0,045451705  |
| FEP,<br>( $d_i$ 0,405 mm, $d_a$ 0,794 mm,<br>$d_w$ 0,2 mm, T=25°C)  | 1,52162E-12  | 0,155759615  |
| FEP,<br>( $d_i$ 0,2 mm, $d_a$ 0,794 mm, $d_w$<br>0,27 mm, T=25°C)   | 1,52162E-12  | 0,050372441  |
| FEP,<br>( $d_i$ 0,075 mm, $d_a$ 0,794 mm,<br>$d_w$ 0,36 mm, T=25°C) | 1,52162E-12  | 0,015605648  |
| PE-LD<br>( $d_i$ 0,4 mm, $d_a$ 0,8 mm, $d_w$<br>0,2 mm, T=25°C)     | 2,31E-08<br>[cm <sup>3</sup> x cm/(cm <sup>2</sup> x s x bar)] |  |
| PDMS  | 7,51E-06<br>[cm <sup>3</sup> x cm/(cm <sup>2</sup> x s x bar)] |  |

<sup>c</sup> Ergebnisse aus den Arbeiten von J. Cao, Optimi-Projekt

### 6.10 Dichteanpassung in Mikrofluidsegmenten

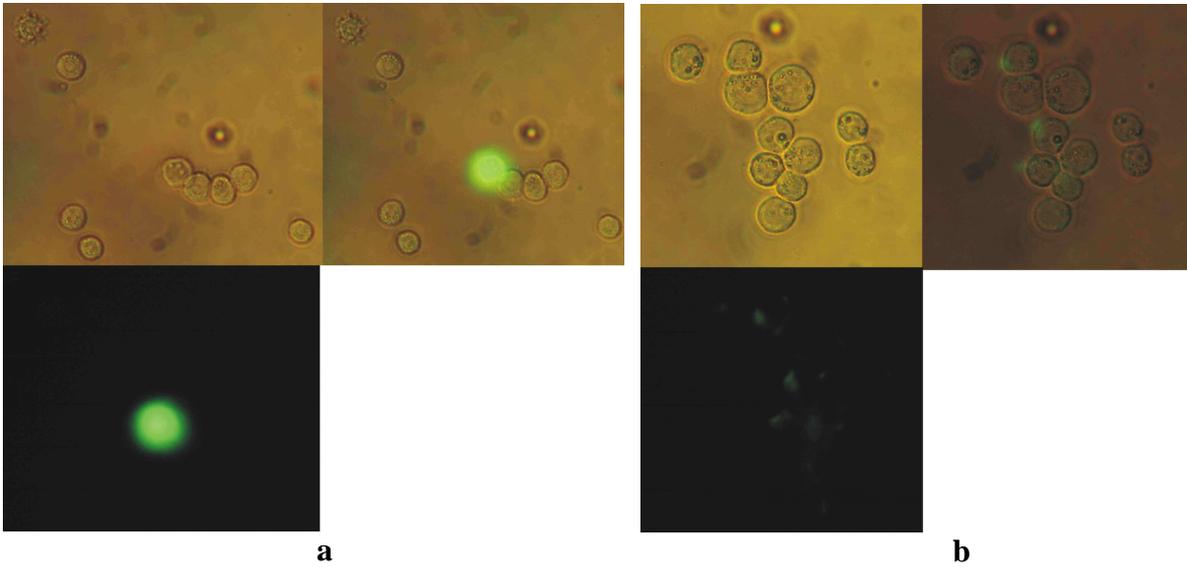


**Abb. 6-19:** Dichteanpassung mit Saccharose und Lymphoprep. In 10 % und 20 % Saccharoselösung haben sich nach 2 h fast allen Zellen abgesetzt. Für Lymphoprep (Seperationsmedium, die Dichte entspricht etwa 30 % Saccharoselösung) und 60 % Saccharose zeigte sich nach 2 h nur ein vereinzelt Absetzten der Zellen.

**6.11 Referenzversuche in Kulturflaschen: Wirkung von  $\text{CuCl}_2$  auf HeLa-Zellen**

**Abb. 6-20:** Wirkung von Kupferionen auf DOX-induzierte HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation in Kulturflaschen. **a)** keine Schädigung der Zellen für 0,5 mM  $\text{CuCl}_2$ . **b)** Ablösen der Zellen vom Flaschenboden, es kommt zum teilweisen Aufblähen der Zellen, einige Zellen sind zusammengefallen und weisen kein GFP-Signal mehr auf. **c)** Die größte Anzahl an Zellen ist zerstört und weist kein GFP-Signal mehr auf.

## 6.12 Referenzversuche in Kulturflaschen: Wirkung von B21 auf HeLa-Zellen



**Abb. 6-21:** Fluoreszenzbilder von mit B21 behandelten HeLa-Zellen in Kulturflaschen. **a)** Effekte von 1% DMSO. **b)** Effekte von 0,01% B21 gelöst in 1% DMSO. Versuchsdurchführung und Photos:P. Kiesel

### 6.13 Größenverteilung Metallnanopartikel-DCS Messung

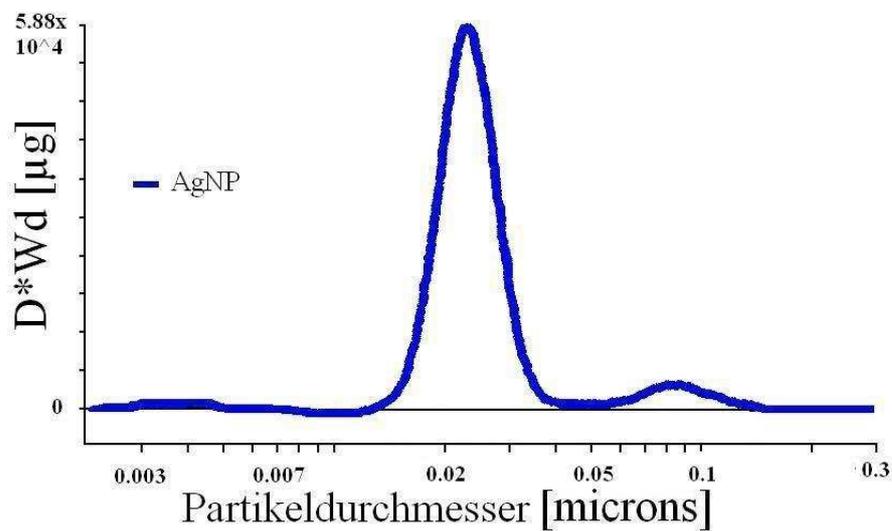


Abb. 6-22: Gewichtsbezogene Größenverteilung von Silbernanopartikeln (AgNP\_braun), DCS-Messung

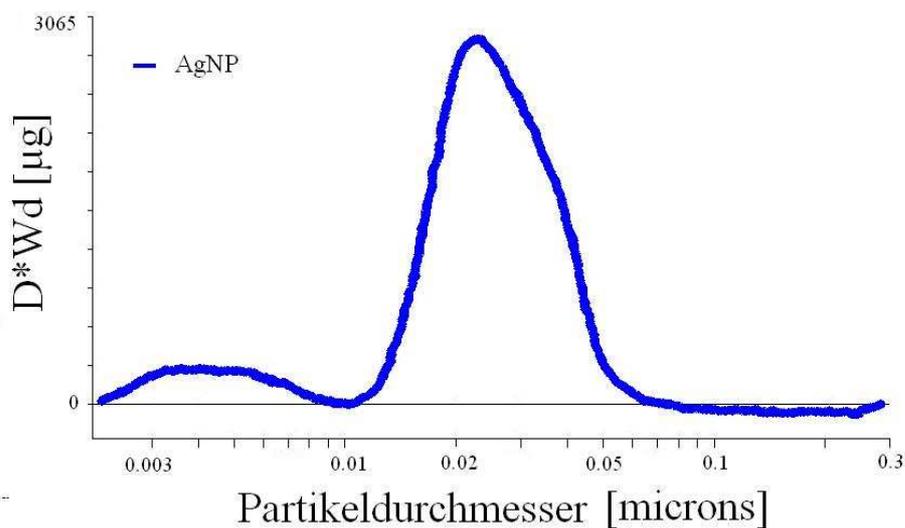
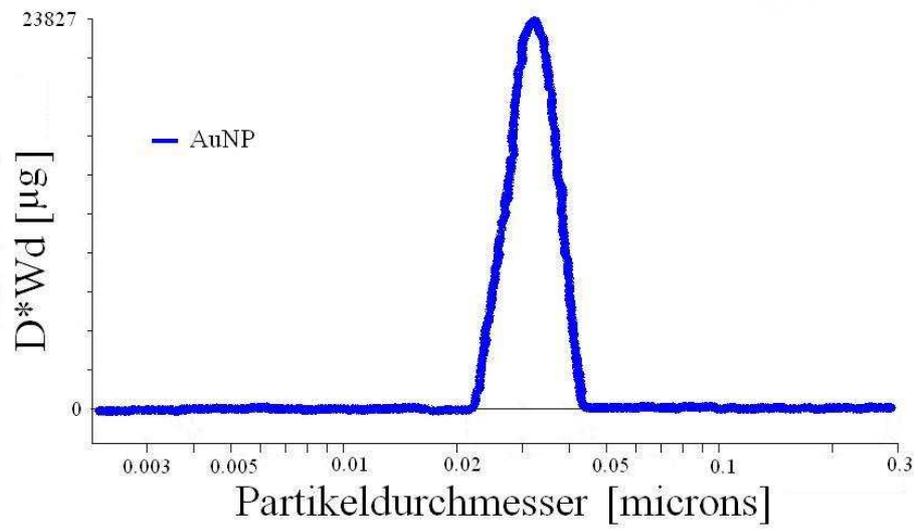


Abb. 6-23: Gewichtsbezogene Größenverteilung von Silbernanopartikeln (AgNP\_gelb), DCS-Messung



**Abb. 6-24:** Gewichtsbezogene Größenverteilung von Goldnanopartikeln (AuNP), DCS-Messung.

## 6.14 Konzentrationsberechnung für Metallnanopartikel<sup>d</sup>

Annahme: Alle Metall-Ionen werden zu  $M_0$  reduziert.

Anzahl an Metall-Atomen pro Liter:

$$N = n * N_A$$

$$N_A = 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

Anzahl der Metall-Atome in einem Metall-NP mit einem definierten Durchmesser

- für kugelförmige Partikel

- unter Berücksichtigung der Ausbildung eines kubisch flächenzentrierten

Kristallgitters (kfz-Gitter) mit einer Raumerfüllung von 74% aufgrund der kubisch dichtesten Kugelpackung

$$R(\text{Au-Atom}) = 0,144 \text{ nm} = R(\text{Ag-Atom})$$

$R(\text{Metall-NP}) = \text{Ergebnis CPS}$  (Für die Berechnung wurde der Radius der NP verwendet, in denen das meiste Material steckte)

$$V(\text{Metall} - \text{Atom}) = \frac{4}{3} * \pi * R_{\text{Atom}}^3 \quad [m^3]$$

$$V(\text{Metall} - \text{NP}) = \frac{4}{3} * \pi * R_{\text{NP}}^3 \quad [m^3]$$

Anzahl an Metall-Atomen pro Metall-NP:

$$N = \frac{V(\text{Metall} - \text{NP})}{V(\text{Metall} - \text{Atom})} * 0.74$$

<sup>d</sup> Berechnungsvorlage A. Knauer, FG Physikalische Chemie/MRT, TU Ilmenau

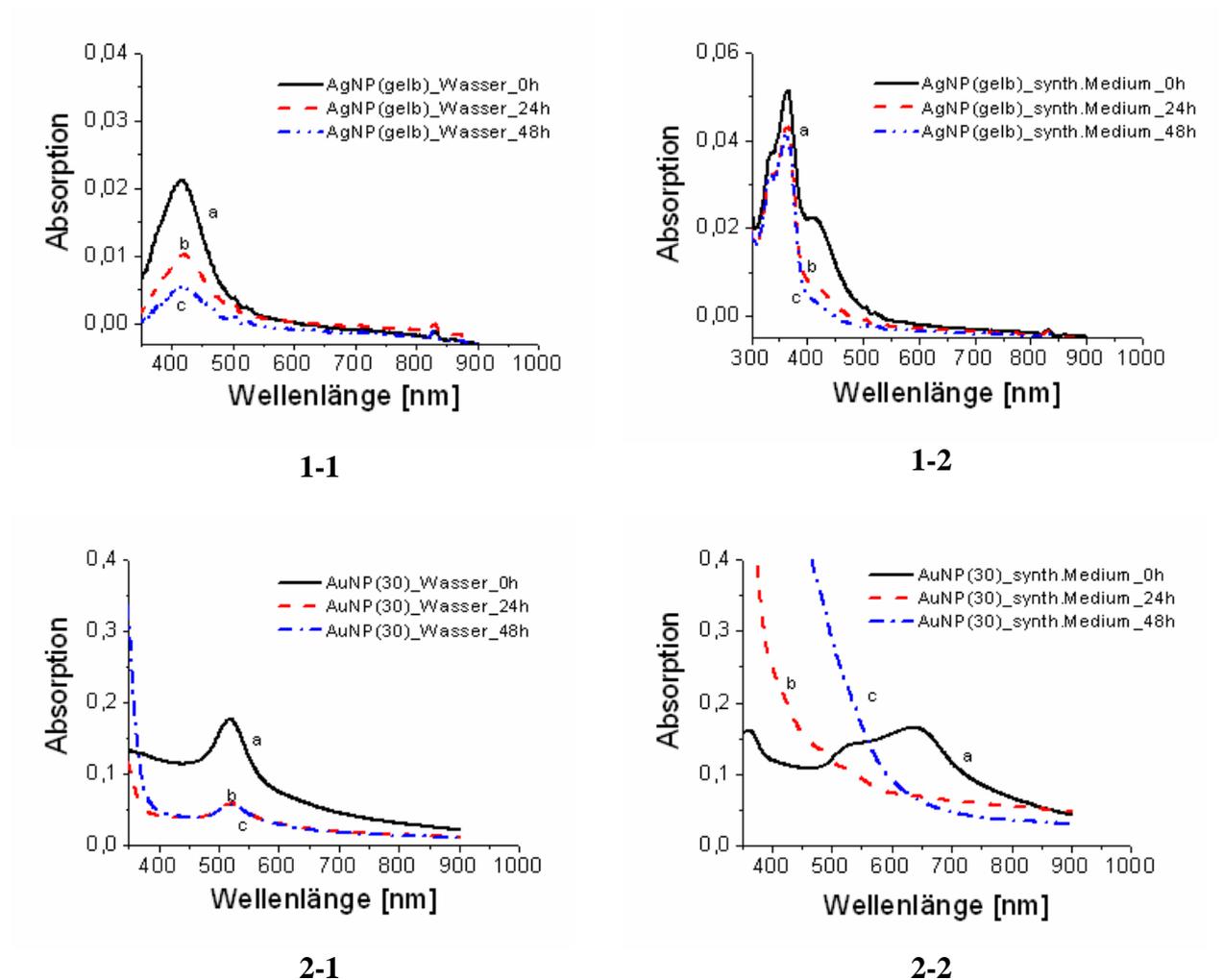
Anzahl an Metall-NP pro Liter:

$$A = \frac{N(\text{Metall} - \text{Atom} / \text{Liter})}{N(\text{Au} - \text{Atome} / \text{NP})} \left[ \frac{\text{NP}}{\text{l}} \right]$$

Konzentration der Metallnanopartikel

$$n(\text{Metall} - \text{NP}) = \frac{A}{N_A} \left[ \frac{\text{mol}}{\text{l}} \right]$$

## 6.15 Einfluss von synthetischem Medium auf die Absorptionsbanden von Metallnanopartikeln



**Abb. 6-25:** UV/VIS Absorptionsspektrum von Silber- und Goldnanopartikeln in Aqua dest. und synthetischem Medium. **1-1)** Absorptionsspektrum von AgNP\_gelb in Wasser während der Inkubation für 48 h bei 37°C, a) 0 h, b) 24 h, c) 48 h. **1-2)** Absorptionsspektrum von AgNP\_gelb im synthetischen Medium während der Inkubation für 48 h bei 37°C, a) 0 h, b) 24 h, c) 48 h. **2-1)** Absorptionsspektrum von AuNP in Wasser während der Inkubation für 48 h bei 37°C, a) 0 h, b) 24 h, c) 48 h. **2-2)** Absorptionsspektrum von AuNP in synthetischen Medium während der Inkubation für 48 h bei 37°C, a) 0 h, b) 24 h, c) 48 h.

**6.16 Abkürzungsverzeichnis**

|                   |  |
|-------------------|--|
| AgNP              | -Silbernanopartikel                                  |
| AuNP              | -Goldnanopartikel                                    |
| CFS               | -Confocale Fluorescence Spectroscopy                 |
| Coch. A           | -Cochenillerot A                                     |
| CuCl <sub>2</sub> | -Kupfer(II)-chlorid                                  |
| d <sub>a</sub>    | -Außendurchmesser                                    |
| DCP               | -Dichlorphenol                                       |
| DCS               | -Differentielles Zentrifugales Sedimentationssystem  |
| DEP               | -Dielectrophoresis                                   |
| d <sub>i</sub>    | -Innendurchmesser                                    |
| DNA               | -Desoxyribonukleinsäure                              |
| DNP               | -Dinitrophenol                                       |
| d <sub>w</sub>    | -Wandstärke  |
| EDTA              | -Ethylendiamintetraessigsäure                        |
| EWOD              | -Electro Wetting On Dielectric                       |
| EZFS              | -Endogenes Zelluläres Fluoreszenzsignal              |
| FEP               | -Perfluorethylenpropylen                             |
| HTS               | -High-Throughput-Screenings/Hochdurchsatz-Screenings |
| MTP               | -Mikrotiterplatten                                   |
| NOAEL             | -No observed adverse effect level                    |
| ODT               | -Octadecyltrichlorosilan                             |
| PBS               | -Phosphate Buffered Saline                           |
| PCR               | -Polymerase chain reaction/Polymerase-Kettenreaktion |
| PEEK              | -Polyetheretherketon                                 |
| PEG               | -Polyethylenglycol                                   |
| PE-LD             | -Polyethylen-Low Density                             |
| PMMA              | -Polymethylmethacrylat                               |
| PTFE              | -Polytetrafluorethylen                               |
| R                 | -Radius  |
| Re                | -Reynoldzahl   |
| REM               | -Rasterelektronenmikroskop                           |

|        |                                   |
|--------|-----------------------------------|
| RNA    | -Ribonukleinsäure                 |
| RT-PCR | -Reverse Transcriptase PCR        |
| SAW    | -Surface Acoustic Waves           |
| TEM    | -Transmissionselektronenmikroskop |
| U/min  | -Umdrehungen pro Minute           |
| WH     | -Wiederholung                     |

## 6.17 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

### 6.17.1 Zeitschriften-Beiträge

A. *Funfak*, J. Cao, A. Knauer, K. Martin and J. M. Köhler (2010), Analysis of synergistic effects of noble metal nanoparticles and a phenolic uncoupler using microdroplet-based two-dimensional screening, *Environmental Science and Technology*, submitted.

A. *Funfak*, R. Hartung, J. Cao, K. Martin, K-H. Wiesmüller, O. S. Wolfbeis, and J. M. Köhler (2009), Highly resolved dose-response functions for drug-modulated bacteria cultivation obtained by fluorometric and photometric flow-through sensing in microsegmented flow, *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 142(1):66-72.

A. *Funfak*, J. Cao, O. S. Wolfbeis, K. Martin, J. M. Köhler (2008), Monitoring cell cultivation in microfluidic segments by optical pH sensing with a micro flow-through fluorometer using dye-doped polymer particles, *Microchimica Acta*, 164 (3): 279 – 286.

J. Lerchner, A. Wolf, H.-J. Schneider, F. Mertens, E. Kessler, V. Baier, A. *Funfak*, M. Nietzsche, M. Krügel (2008), Nano-calorimetry of small-sized biological samples, *Thermochimica Acta*, 477: 48–53.

A. *Funfak*, A. Brösing, M. Brand and J. M. Köhler (2007), Micro fluid segment technique for screening and development studies on *Danio rerio* embryos, *Lab Chip*, 7(9):1132-8.

A. *Funfak*, M. Fischlechner, E. Donath, J. M. Köhler (2007), Fluorescence-Labelled Polymer Beads for Chemical Monitoring of Nanoliter Fluid Segments, Spring National Meeting Houston, TX.

### 6.17.2 Vorträge

A. **Funfak**, K. Martin, J. M. Köhler (2010), Analyzing combined effects of pollutants using segment-based microfluidic, 5. Elgersburg Workshop 2010, Chemical and Biological Micro Laboratory Technology, Ilmenau/Elgersburg.

A. **Funfak**, K. Martin, J. M. Köhler (2008), Einsatz eines Mikrofluidsystems zur Durchführung toxikologischer Studien an Mikroorganismen, 4. Workshop "Chemische und biologische Mikrolabortechnik, Ilmenau/Elgersburg.

A. **Funfak**, A. Brösing, M. Brand, J. M. Köhler (2006), Introduction and Development of Zebrafish Embryos in Micro Fluid Segments, 3. Workshop "Chemische und biologische Mikrolabortechnik, Ilmenau/Elgersburg.

### 6.17.3 Poster

A. **Funfak**, Jialan Cao, Otto S. Wolfbeis, Anna S. Vasylevska, Karin Martin, Christian Steinweg and Michael J. Köhler (2009), Toxicological screenings with *Escherichia coli*, *Saccaromyces cerevisiae* and *Chlorella vulgaris* via micro segmented flow, Lab-on-a-Chip European Congress, Stockholm.

A. **Funfak**, K. Martin and J. M. Köhler (2008), Optical characterisation of the effects of toxic substances on the growth of *Escherichia coli* inside microfluid segments, Lab On Chip MiniSymposium, Siegen.

J. Michael Köhler, A. **Funfak**, J. Cao , R. Hartung , M. Günther (2008), Anwendung der Segmented-Flow-Technik zur Erstellung von hochaufgelösten Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Nanopartikel zur ökotoxikologischen Bewertung, Projekt und Partnerfindungsworkshop NanoNature, Dechema, Frankfurt.

A. **Funfak**, J. Cao , O. S. Wolfbeis , J. M. Köhler, K. Martin (2008), Sensorbead - gestütztes optisches Monitoring der Zellkultivierung in Mikrofluidsegmenten, 14. Heiligenstädter Kolloquium "Technische Systeme für die Lebenswissenschaften", Heilbad Heiligenstadt.

A. **Funfak**, K. Martin, J. M. Köhler (2008), Einsatz eines Mikrofluidsystems zur Durchführung toxikologischer Studien an Mikroorganismen, 4. Workshop "Chemische und biologische Mikrolabortechnik", Ilmenau.

A. **Funfak**, J. Lerchner, J. M. Köhler (2008), Stoffwechselwärmeleistung einzelner Zebrafischembryonen (*Danio rerio*) in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium: Detektion mittels Chip-Kalorimetrie, 4. Workshop "Chemische und biologische Mikrolabortechnik", Ilmenau.

A. **Funfak**, P. Kiesel, K. Martin, K. Schönig, H. Bujard, J. M. Köhler (2007), Einsatz von Mikrofluidsegmenten zur Untersuchung des Antwortverhaltens GFP-exprimierender HeLa-Zellen auf eine toxische Modellsubstanz, AK Bio-MST, Dortmund.

A. **Funfak**, A. Brösing, M. Brand, J. M. Köhler, Untersuchung der *Danio rerio*- Embryonen Entwicklung im mikro-segmentierten Fluss unter Einfluss toxikologischer Modellsubstanzen (2007), 41. Jahrestagung der DGBMT - Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik im VDE, Aachen.

A. **Funfak**, J. Cao, O. S. Wolfbeis, A. S. Vasylevska, K. Martin and J. M. Köhler (2007), Optical characterisation of micro fluid segments for toxicological studies on microorganisms, Biomicroworld 2007, II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Seville.

## 6.18 Lebenslauf



Adresse: Goetheallee 2  
98693 Ilmenau

E-Mail: anette.funfak@tu-ilmenau.de

Geburtsdatum/-ort: 08.01.1979, Plauen

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Beruflicher Werdegang

- seit 09/2005 **Doktorandin** an der TU Ilmenau, Fachgebiet Physikalische Chemie/Mikroreaktionstechnik  
(Stipendium der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, DBU)  
Thema: "Einsatz eines Mikrofluidsystems und Anwendung der Methode des segmentierten Flusses für die umwelttoxikologische Untersuchung von Kombinationswirkungen".
- 04/2009 Nachweis der **Promotionseignung** durch den erfolgreichen Abschluss von jeweils zwei Eignungsprüfungen aus Grund- und Hauptstudium (Physikalische Chemie: gut, 1,7; allg. anorganische Chemie: gut, 2,3; molekulare Zellbiologie: gut, 2,0 und Mikroreaktionstechnik: gut, 2,0).
- 03/2005-08/2005 **Forschungsassistent** an der Fachhochschule Jena, Fachgebiet Materialwissenschaft/Analytische Chemie.
- 03/2005 **Diplom-Ingenieurin (FH)** für Bioverfahrenstechnik (Gesamtnote: gut, 1,8)

- 03/2004-03/2005      **Diplomarbeit** bei der Firma MUT Dr. Zeising & Partner Ingenieur-GmbH Erfurt, im Auftrag der Pollmeier Massiv Holz GmbH & Co KG Creuzburg  
Thema: “Optimierung der Prozesswasseraufbereitung in der holzverarbeitenden Industrie“.
- 03/2003-08/2003      **Forschungssemester** am Institut für Photonische Technologien e.V. (IPHT), Abteilung Laserdiagnostik, Jena.  
Mitarbeit im Projekt “Fabrication of thin layer - photovoltaic cells by laser crystallization of silicon”.
- 10/2000-03/2005      **Studium der Bioverfahrenstechnik** an der Fachhochschule Jena. (University of Applied Sciences).
- 09/1998-09/2000      **Studium der Volkswirtschaftslehre** an der Friedrich Schiller Universität Jena.
- 08/1995-08/1998      **Abitur** (Gesamtnote: gut), Wirtschaftsgymnasium “Anne Frank”, Plauen.

## 6.19 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Michael Köhler für die interessante Themenstellung, die fachlichen Diskussionen, die zahlreichen Anregungen sowie die vielseitige Unterstützung, aber vor allem für das Vertrauen in mich.

Prof. Dr. Walter Bodemer und Dr. habil. Andreas Schober danke ich recht herzlich für die Bereitschaft, Gutachten zu dieser Arbeit anzufertigen.

Der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) danke ich für die finanzielle Unterstützung durch ein dreijähriges Promotionsstipendium sowie die Ermöglichung anregender fachlicher und fachübergreifender Diskussionen mit Stipendiaten aus verschiedensten Forschungsrichtungen im Rahmen der Stipendiatenseminare. Ganz herzlich danke ich auch Dr. Hempel für die sehr gute Betreuung im Rahmen des Stipendiatenprogrammes sowie für sein großes Engagement, diese Arbeit mit voranzutreiben. Ich bin von der Nachhaltigkeit des Konzeptes der DBU zur Förderung der Ideen junger, für die Umwelt engagierter Akademiker überzeugt.

Weiterhin danke ich der Landesgraduiertenförderung und der Frauenförderung der TU Ilmenau für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit in den letzten Monaten der Fertigstellung sowie für die Unterstützung bei der Teilnahme an verschiedenen internationalen Konferenzen.

Großer Dank gebührt der mechanischen Werkstatt des Institutes für Physik der TU Ilmenau für die kreative, eifrige und exakte Arbeit an vielen kleinen und großen für die Arbeit benötigten Einzelteilen bis hin zur Konstruktion vollständiger Geräte, ohne die kein Arbeiten möglich gewesen wäre.

Bei Dr. Romanus, ZMN, TU Ilmenau bedanke ich mich für die TEM-Bilder von Nanopartikeln und Zellen.

Prof. Dr. Filser vom UFT Bremen, Allgemeine und Theoretische Ökologie, danke ich für die viele Unterstützung innerhalb des Themengebietes Toxikologie und die Möglichkeit

weiterführende Kenntnisse in verschiedenen toxikologischen Standardverfahren während eines Besuchs am UFT zu erlangen.

Einen ganz herzlichen Dank möchte ich Jürgen Arning aussprechen. Danke für die große Hilfe bei der Auswertung, Bewertung und Vergleich der Toxizitätsdaten und die gute Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Brand am Max-Planck Institut Dresden und Prof. Dr. Schnabel an der TU Braunschweig wird herzlichst für die Bereitstellung der Modellorganismen Zebrafisch *Danio rerio* und Fadenwurm *C. elegans* gedankt.

Prof. Dr. Bujard und Dr. Kai Schönig vom ZSG Mannheim danke ich für die Bereitstellung der HeLa-Zelllinie sowie für die Bemühungen und wissenschaftlichen Diskussionen im Rahmen der Arbeiten mit Humanzellen im Mikrofluidsegment.

Ich danke Walter für die große Begeisterung an meiner Arbeit, welche dafür gesorgt hat, dass ich auch in schwierigen Phasen nie die Hoffnung auf Erfolg verloren habe. Natürlich möchte ich mich bei Petra, Vera, Andreas und Walter für die wissenschaftlichen Diskussionen und auch für die nicht wissenschaftlichen gemeinsamen Ausflüge bedanken. Es war immer wieder eine schöne Abwechslung zum Doktorandenalltag!

Bei Petra möchte ich mich noch einmal ganz herzlich für die große Unterstützung bei den Arbeiten mit Humanzellen am DPZ und die immerwährende Bereitschaft meine Fragen zu beantworten bedanken. Es war eine tolle und interessante Zeit!

Ich danke der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfbeis an der Universität Regensburg für die großzügige Unterstützung mit Mikrobeads und die wissenschaftlichen Diskussionen um die Arbeiten zur pH-Detektion in Mikrofluidsegmenten.

Weiterhin danke ich Christian Steinweg von der Universität Karlsruhe für die Bereitstellung von *Chlorella vulgaris*.

Ganz besonders danke ich Regina Hartung und Karin Martin, die mich in den Jahren der Dissertation mit ihrem fachlichen Rat, durch Hilfestellungen bei den Experimenten und bei Fragestellung zur Kultivierung der biologischen Systeme immerwährend unterstützt haben.

Ihnen habe ich es zu verdanken, dass ich im Feld der Biologie nie ganz allein und ohne Hilfe stand!

Ganz herzlich danke ich auch Dr. Mike Günther und Dr. Alexander Gross für die fachlichen Diskussionen und die vielen Ratschläge. Frances Möller und Melanie Börner danke ich für die “all around“ Unterstützung.

Meiner ehemaligen Diplomandin, Kollegin und Freundin Jialan Cao danke ich für ihre vielseitige Unterstützung in unserem gemeinsamen Forschungsgebiet. Besonders danke ich aber auch für all die schönen gemeinsamen Zeiten jenseits der Arbeit und für die mahnenden Worte, wenn ich mal wieder über der Arbeit all die anderen wichtigen Dinge im Leben vergaß. Danke für die sehr gute Zusammenarbeit und die Freundschaft! Ich wünsche Dir viel Erfolg mit deiner Dissertation.

Bei Sukhdeep Singh möchte ich mich für die fachlichen und spirituellen Diskussionen bedanken! Meiner Kollegin und Freundin Shuning Li möchte ich für ihr ansteckendes Lachen und den gemeinsamen sportlichen Ausgleich danken. Dank euch beiden für das Licht in manch dunklen Tagen! Es ist eine sehr schöne Zeit gewesen.

Meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Freundinnen Anja, Mandy, Jani und Franziska sowie meinem besten Freund Martin möchte ich nur eines sagen: Danke, dass ihr immer für mich da seid und trotz meiner chaotischen Natur nie das Vertrauen in mich verloren habt!

Ich möchte mich bei Andrea für die Einführung und die fachlichen Diskussionen auf dem spannenden Gebiet der Nanopartikel, aber vor allem für das Verständnis, die Unterstützung und die Freundschaft in den letzten schweren Tagen der Dissertation bedanken. Danke für die helfende Hand und das Zurückbringen einer längst vergessenen Zeit! Ich hoffe das Band ist für die Ewigkeit gewebt.

Zum Schluss möchte ich meinen herzlichen Dank einem Menschen aussprechen, der nicht genannt werden möchte, ohne den aber diese Arbeit nicht in dieser Form entstanden wäre. Vielen Dank für die große Unterstützung, danke für die Orangen, die unzähligen Kaugummis, die beruhigenden aber auch kritischen Worte und das Auffangen bei jedem Fall von Verzweiflung. Danke für alles!

## 6.20 Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise entgeltlich/unentgeltlich geholfen:

### 1. Dipl.-Ing. Jialan Cao, TU Ilmenau:

- Entwicklung eines Mikrodurchflussfluorimeters für die Analyse in Nano- und Mikrofluidsegmenten (im Rahmen der Diplomarbeit “Nanodiagnostik in Fluidsystemen: optische pH-Auslesung“ von Frau J. Cao im FG Physikalische Chemie/MRT, Betreuer: A. Funfak, J.M. Köhler) (unentgeltlich).

### 2. Petra Kiesel, DPZ Göttingen:

- Kultivierung und Haltung der eingesetzten HeLa-Zelllinie, Durchführung der Referenzversuche in Kulturflaschen, Mithilfe bei den am DPZ durchgeführten Versuchen mit HeLa-Zellen im Mikrofluidsegmenten (unentgeltlich).

### 3. Dr. Henry Romanus, ZMN, TU Ilmenau:

- TEM Aufnahmen der Nanopartikel und von mit Nanopartikeln behandelten Zellen (unentgeltlich).

### 4. Dipl.-Ing. René Müller, Dipl.-Ing. Michael Ludemann, Fachgebiet Experimentalphysik II, TU Ilmenau:

- Messung des Streuspektrums einzelner Nanopartikel (unentgeltlich).

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalte der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich bin darauf hingewiesen worden, dass die Unrichtigkeit der vorstehenden Erklärung als Täuschungsversuch angesehen wird und den erfolglosen Abbruch des Promotionsverfahrens zu Folge hat.

Diplom-Ingenieurin Anette Funfak

Ilmenau, 5.03.2010