

# Ortsselektives, präzises Laserdrucken von Biomaterialien und Zellen

Von der Fakultät für Maschinenwesen  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Ingenieurwissenschaften  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dominik Arthur Riester

## **Berichter:**

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Reinhart Proprawe M.A.  
Univ.-Prof. Dr.-Ing. Horst Fischer  
Adjunct Professor Dr.-Ing. Ingomar Kelbassa

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Dezember 2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.



# ERGEBNISSE AUS DER LASERTECHNIK

**Dominik Riester**

Ortsselektives, präzises Laserdrucken  
von Biomaterialien und Zellen

**Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Dominik Riester:

Ortsselektives, präzises Laserdrucken von Biomaterialien und Zellen

1. Auflage, 2015

Gedruckt auf holz- und säurefreiem Papier, 100% chlorfrei gebleicht.

Apprimus Verlag, Aachen, 2015

Wissenschaftsverlag des Instituts für Industriekommunikation und Fachmedien  
an der RWTH Aachen

Steinbachstr. 25, 52074 Aachen

Internet: [www.apprimus-verlag.de](http://www.apprimus-verlag.de), E-Mail: [info@apprimus-verlag.de](mailto:info@apprimus-verlag.de)

Printed in Germany

ISBN 978-3-86359-313-1

D 82 (Diss. RWTH Aachen University, 2014)

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Ziel der Arbeit .....	3
3	Stand der Forschung und Technik.....	7
3.1	Drucktechnologien .....	7
3.1.1	Inkjet.....	7
3.1.2	Extrudieren .....	10
3.1.3	Laser induzierter Vorwärtstransfer.....	11
3.2	In Vitro Testsysteme.....	18
3.2.1	Hochdurchsatz-Screening.....	19
3.2.2	High-Content-Screening.....	20
3.3	Tissue Engineering .....	22
4	Experimentelle Durchführung.....	25
4.1	Zellkultur .....	25
4.2	LIFT-Experimente .....	26
4.2.1	Aufbau und Vorbereitung der Transferträger.....	26
4.2.2	Betrachtung der Wärmeeinwirkung im Transferträger durch das LIFT- Verfahren .....	29
4.2.3	Aufbau und Vorbereitung der Empfängerträger.....	33
4.2.4	Versuchsdurchführung LIFT .....	34
4.2.5	Kultivierung transferierter Zellen.....	35
4.2.6	Analyse der Überträge.....	35

5	Konzeption und Aufbau von LIFT-Systemen.....	37
5.1	Aufbau eines Hochgeschwindigkeits-LIFT-Systems.....	37
5.2	Aufbau eines Festoptik basierten LIFT-Systems .....	39
6	Ergebnisse der LIFT-Versuche .....	43
6.1	Übertrag von Proteinen .....	43
6.1.1	Prozessfenster für den Transfer von Hydrogelen.....	43
6.1.1.1	Matrigel-Transfer auf unbeschichtete Glasobjektträger und Gelatine ....	44
6.1.1.2	Gelatine-Transfer auf eine Matrigelschicht.....	46
6.1.1.3	Bestimmung der Positioniergenauigkeit der Matrigel- und Gelatine- Überträge.....	47
6.1.2	Übertrag von fluiden Schichten.....	51
6.1.3	Übertrag von trockenen Schichten .....	52
6.1.4	Zusammenfassung des Übertrags von Proteinen .....	54
6.2	Übertrag von Zellen .....	54
6.2.1	Parameter-Untersuchung mittels Übertrag von Polystyrol-Partikeln.....	55
6.2.1.1	Polystyrol-Partikel-Untersuchungen mit einer gaußförmigen Intensitätsverteilung .....	55
6.2.1.2	Polystyrol-Partikel-Untersuchungen mit einer Intensitätsverteilung höherer Ordnung .....	62
6.2.2	Zelltransfer .....	67
6.2.2.1	Zelltransfer aus einem einschichtigen Hydrogelsystem.....	67
6.2.2.2	Zelltransfer aus einem zweischichtigen Hydrogelsystem.....	72
6.2.2.3	Diskussion des Zelltransfers aus ein- und zweischichtigem Hydrogelsystem.....	75
6.2.2.4	Überprüfung der Vitalität.....	76
6.2.2.5	Herstellung von Mustern mit Zellen .....	86

7	Diskussion und Ausblick.....	89
7.1	Diskussion.....	89
7.2	Ausblick.....	91
8	Zusammenfassung.....	95
9	Literaturverzeichnis.....	99
10	Verzeichnisse.....	107
10.1	Abbildungsverzeichnis.....	107
10.2	Tabellenverzeichnis.....	109
10.3	Abkürzungsverzeichnis.....	110
	Anhang.....	111



# 1 Einleitung

Technologien zum Drucken und Übertragen von Materialien haben schon lange eine besonders wichtige Rolle für die Gesellschaft gespielt. Erste Bücher wurden bereits in Hochkulturen wie Babylon oder Rom im Blockdruckverfahren hergestellt. Insbesondere das Typendruckverfahren von Gutenberg leitete das Zeitalter der modernen Informationsgesellschaft ein.

Auch heutzutage haben Druckverfahren meist die Funktion, auf Papier zu drucken. Sie gewinnen aber auch in weiteren Anwendungsbereichen immer mehr an Bedeutung. Unterschiedliche Verfahren werden mittlerweile für Anwendungen von der Elektrotechnik bis hin zur Medizintechnik und pharmazeutischen Forschung eingesetzt. Je nach zu übertragenden und zu bedruckenden Materialien, können auch dreidimensionale Objekte erzeugt werden, was beispielsweise in der Fertigungstechnik durch das „Selective Laser Melting“ bereits industrielle Umsetzung erlangt hat.<sup>1</sup>

Dabei müssen jeweils geeignete Verfahren entwickelt werden, die für unterschiedliche Einsatzbereiche in der Photovoltaik, der Elektronikindustrie, der Medizintechnik als auch der pharmazeutischen Forschung geeignet sind. Dies spiegelt sich auch in der Materialvielfalt der zu verarbeitenden Materialien wieder. Von metallischen über organische, bis hin zu biologischen Materialien, wie lebenden Zellen müssen entsprechende Drucktechniken entwickelt, angepasst und optimiert werden.<sup>2,3</sup>

Die Bedeutung von Drucktechniken wird insbesondere in der pharmakologischen Forschung und der Medizintechnik immer wichtiger. Für diese Anwendung stellen das Drucken und der Transfer von empfindlichen Materialien, wie Proteinen oder auch lebende Zellen, eine wichtige Anwendung dar. Für Knochen oder Zahnimplantate kommt häufig Titan als Werkstoff zum Einsatz.<sup>4</sup> Sollen beispielsweise patientenspezifische Prothesen für Nasen oder Ohren gedruckt werden, so müssen farbtreue, biokompatible Kunststoffe verarbeitet werden. Hierfür eignen sich insbesondere Extrusions-Verfahren. Werden lebende Zellen übertragen, so eignen sich häufig druckluftgestützte Druckverfahren.<sup>5</sup> Hier ist jedoch die Auflösung der Druckerzeugnisse eingeschränkt, da die kleinsten Volumina im Bereich mehrerer Nanoliter liegen. Das Volumen einer Zelle beträgt bei einem angenom-

menen Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  lediglich 0,5 pl. Sollen nun einzelne Zellen gedruckt werden, ist folglich ein möglichst geringes Druckvolumen anzustreben.

Eine hohe Auflösung und eine weitgehende Freiheit in der Wahl der Werkstoffe erlauben laserbasierte Druckverfahren. Mit ihnen können sowohl anorganische als auch organische Werkstoffe, wie empfindliche Biomaterialien und Zellen, schonend übertragen werden. Eine vielfältige Drucktechnologie, der laserinduzierte Vorwärtstransfer (Laser Induced Forward Transfer, LIFT), ist hier eine vielversprechende Technologie. Sie ermöglicht erstmals ein großes Spektrum an Materialien mit hoher Präzision zu übertragen.<sup>6-8</sup> Zudem ist das Verfahren sehr schonend zu den zu übertragenen Materialien. Daher eignet es sich insbesondere für die Positionierung von Biomaterialien.

Dies ermöglicht es zum einen gezielt Strukturen *in vitro* nachzubauen, wie sie sonst nur *in vivo* beobachtet werden können. Dadurch kann in einem ersten Schritt ein grundlegendes Verständnis für biologische Prozesse entwickelt werden. Ist die Herstellung von komplexen Strukturen *in vitro* erst einmal möglich, können diese Strukturen in einem weiterführenden Schritt dazu eingesetzt werden, um beispielsweise Wirkstoffe für die Medizin zu entwickeln. Auch die Herstellung patientenspezifischer Testsysteme für eine personalisierte medizinische Behandlung können mit einem derartigen System realisiert werden. Aus solchen kleinen *in vivo*-ähnlichen Strukturen können letztlich auch Organstrukturen für die regenerative Medizin hergestellt werden.

## 2 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der Arbeit wird das Laser Induced Forward Transfer (LIFT)-Verfahren für das Positionieren von einzelnen Zellen qualifiziert. Hierbei handelt es sich um einen lasergestützten Druckprozess. Von einem dreischichtigen Transferträgersystem (Transferträger, Absorberschicht, Transferschicht) wird auf einen Empfängerträger Material übertragen. Dabei kommt eine gepulste Laserstrahlquelle zum Einsatz, die die Absorberschicht verdampft und dadurch einen Übertrag aus der Transferschicht ermöglicht. Für das LIFT-Verfahren müssen viele unterschiedliche Parameter betrachtet werden. Dabei haben unterschiedliche Faktoren Einfluss auf den Prozess. Es können zum einen unterschiedliche biologische Materialien übertragen werden und die Materialien können in unterschiedlichen Umgebungen (Matrix) eingebettet sein. Diese Materialien müssen auf den Transferträger aufgebracht werden. Die eingesetzte Strahlquelle beeinflusst mit der Wellenlänge, der Pulsdauer, dem Strahlprofil und der Fokussierung den Prozess. Sind alle Parameter aufeinander abgestimmt und der Prozess ist stabil, so kann ein erfolgreicher Übertrag des biologischen Materials realisiert werden (siehe Bild 1).

In dieser Arbeit werden zwei unterschiedliche biologische Materialsysteme übertragen. Zum einen werden Proteine, zum anderen lebende Zellen übertragen. Die Proteine werden entweder in fester oder in flüssiger Form, bei Zellen werden flüssige Matrix-Bestandteile eingesetzt. Die Schichtdicke und die Transferschichtzusammensetzung werden auch variiert. Bei der Strahlquelle wird in dieser Arbeit der Einfluss des Strahlprofils auf die Übertragung von Zellen untersucht. Für die unterschiedlichen biologischen Materialsysteme werden zwei LIFT-Systeme konzipiert, aufgebaut und untersucht.

Das eine System wird darauf optimiert, dass Materialien wie Proteine gezielt und funktional übertragen werden können. Hierfür wird das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) übertragen und im Anschluss die Funktionalität über eine Oxidationsreaktion überprüft.

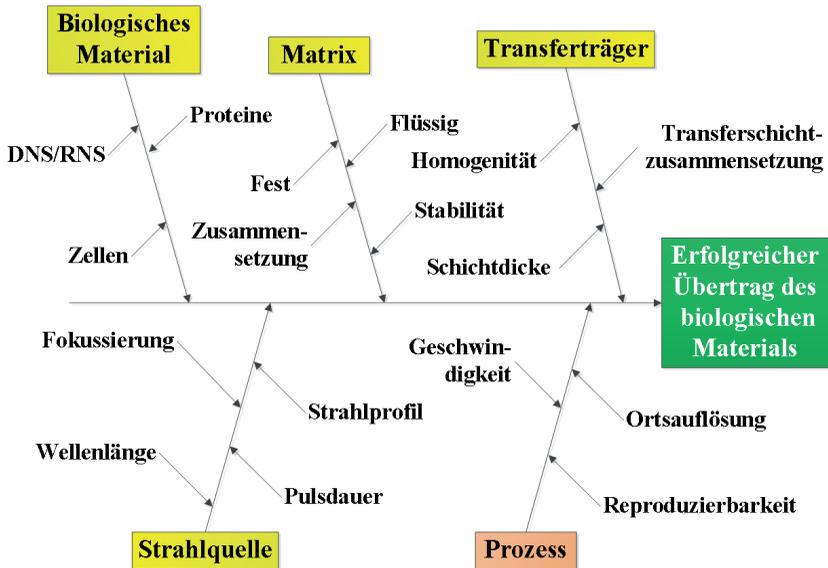


Bild 1: Ishikawa Diagramm der LIFT-Technologie für biologische Anwendung. Die Einflussgrößen des biologischen Materials, der Matrix, des Transferträgers und der Strahlquelle bestimmen den Prozess. Ist alles aufeinander abgestimmt, so kann ein Übertrag von biologischem Material realisiert werden.

Das zweite System wird dafür entwickelt, den Übertrag einzelner Zellen zu ermöglichen. Dafür wird eine koaxiale Durchlichtbeleuchtung integriert, wodurch eine Analyse der Transferschicht im Prozess ermöglicht wird. Hiermit werden Polystyrolpartikel und Zellen auf einem Transferobjektträger identifiziert und im Anschluss gezielt auf einen Empfängerträger übertragen. Es werden sowohl die Positioniergenauigkeit der Partikel und Zellen, als auch die Vitalität der Zellen untersucht. In konventionellen LIFT-Ansätzen werden Zellen in großen Mengen in die Transferschicht eingebettet und somit in großer Zahl bei jedem LIFT-Prozess übertragen. Der Übertrag von einzelnen Zellen durch eine Untersuchung der Transferschicht wird hier weiter analysiert (siehe Bild 2). In einer Untersuchung zum Einzelzell-LIFT wurde ein Frequenzvervierfacher ND:YAG Laser (266 nm) eingesetzt.<sup>9</sup> Im Gegensatz zu den dort beschriebenen Untersuchungen werden in der vorliegenden Arbeit die Positioniergenauigkeit von Partikeln innerhalb der Tropfen, der Einfluss des Strahlprofils und ein automatisiertes Anlagensystem untersucht.

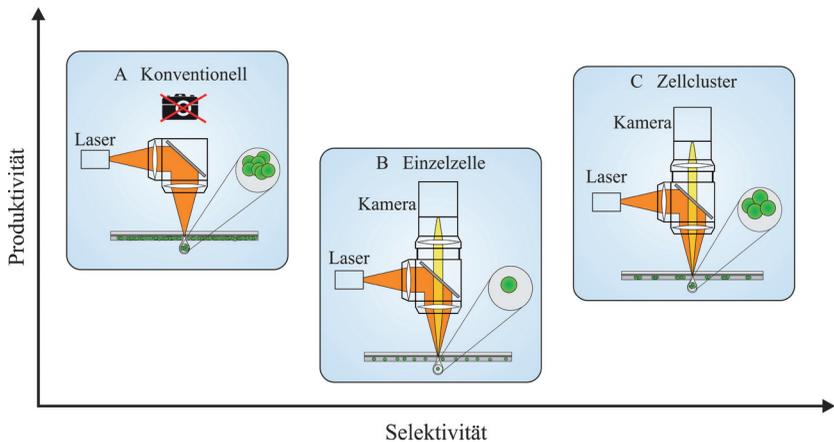


Bild 2: Schematische Darstellung des LIFT-Verfahrens. **A:** Konventionelles LIFT-Verfahren, die Transferschicht ist mit Zellen dicht beladen und diese werden ohne Analytik im Prozess in großen Mengen übertragen. **B** und **C:** Selektiver Übertrag von Einzelzellen bzw. Zellclustern nach gezielter Detektion in der Transferschicht mittels Kamerasystem.

Mittels LIFT werden auch gezielt einfache Muster aus Zellen aufgebaut. Dies demonstriert, dass sich LIFT dazu eignet gezielte Teststrukturen aus Zellen für Anwendungen zu realisieren, wie in vitro Testsysteme und das Tissue Engineering. Eine gezielte Anordnung von Zellen kann dazu führen, dass sich diese besser in Cokultur halten lassen. Dadurch können sich in vivo-ähnliche Strukturen in vitro nachbilden lassen. Ein Beispiel für solche hoch definierten zellulären Strukturen ist die Stammzellnische, die aus einer hoch definierten Umgebung aus Zellen und Matrixbestandteilen besteht. Diese hat beispielsweise die Funktion, dass Stammzellen ihre Eigenschaft als Ursprung für adulte Zellen erfüllen können.



## 3 Stand der Forschung und Technik

In diesem Kapitel werden die wichtigsten Drucksysteme vorgestellt, die in der Biowissenschaft zum Einsatz kommen (siehe Kapitel 3.1). Dabei wird zum einen der weit verbreitete Inkjetdruck erläutert, der einfach in der Handhabung und kostengünstig im Einsatz ist, jedoch hohe Anforderung an die zu übertragenen Materialien stellt. Zum anderen wird das Plotten vorgestellt, welches ebenfalls einfach in der Handhabung und kostengünstig ist, eine große Materialauswahl zulässt, jedoch eine geringe Auflösung hat. Zudem wird das in dieser Arbeit eingesetzte laserinduzierte Vorwärtstransfer (Laser Induced Forward Transfer, LIFT) erläutert. Des Weiteren wird beschrieben, welche Testsysteme in der Biowissenschaft entwickelt werden und die Relevanz von Drucksystemen wird ausgearbeitet (siehe Kapitel 3.2). Im Anschluss wird noch eine wichtige Anwendung, das Tissue Engineering, beschrieben und die Bedeutung von Druckverfahren hierfür erklärt (siehe Kapitel 3.3).

### 3.1 Drucktechnologien

#### 3.1.1 Inkjet

Es gibt zwei Formen des Inkjet Druckens:

- Kontinuierliches Drucken (continuous ink jet printing, CIJ)
- Drucken einzelner Tropfen (drop on demand ink jet printing, DOD).

Im Fall von CIJ wird eine Flüssigkeit unter hohem Druck durch eine Düse mit kleinem Durchmesser gepresst. Der sich dadurch ergebende Strahl bricht durch die Rayleigh-Instabilität spontan ab. Eine Folge von Tropfen entsteht. Diese Tropfen sind elektrisch geladen und können durch ein elektrisches Feld abgelenkt werden. Nicht benötigte Tropfen werden dabei in ein Auffanggefäß (Reservoir) geleitet und zurückgeführt. Bei den DOD-Verfahren werden Tropfen ausschließlich generiert, wenn sie benötigt werden (siehe Bild 3).

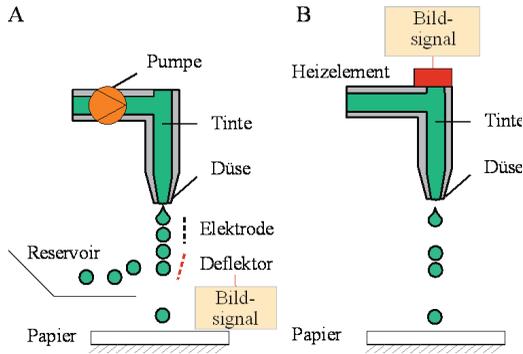


Bild 3: Schematische Darstellung des Inkjet-Druckverfahrens. **A:** Continuous inkjet printing, (CIJ), das Bildsignal wird im Deflektor umgesetzt. **B:** Drop on Demand (DOD). Das Bildsignal wird im Piezo- oder Heizelement umgesetzt.

Zur Tropfenerzeugung kommen unterschiedliche Methoden zum Einsatz:

- Thermischer DOD: Ein Mikroheizelement erzeugt eine Dampfblase, die beim Abkühlen kollabiert. Durch den daraus resultierenden akustischen Druckimpuls wird ein Tropfen erzeugt.
- Piezoelektrischer DOD: Der Druckvorgang funktioniert rein mechanisch. Wird eine Spannung angelegt, drückt eine Piezoscheibe gegen eine Membran. Dadurch wird ein Druck im Düsenkanal erzeugt, durch den ein Tropfen entsteht.

CIJ ist weit verbreitet für kommerzielle Anwendungen mit niedriger Auflösung. Thermische DOD wird auf Grund ihrer geringen Baugröße und Kosten vornehmlich in Geräten für handelsübliche Tintenstrahldrucker eingesetzt, piezoelektrische DOD werden meist für kommerzielle Drucker mit hoher Auflösung verwendet.

### **Vorteile des Inkjetdrucks**

Der Inkjetdruck ist ein etabliertes und gut untersuchtes Verfahren, das seit langer Zeit zur Erstellung von Druckwaren benutzt wird (U.S. Patent 6,319,530). Dadurch sind die benötigten Komponenten kommerziell erhältlich und Geräte sind günstig in der Anschaffung. Mit Inkjet Druckern können Pikoliter-Tropfen mit der Auflösung von  $< 30 \mu\text{m}$  bei einem Arbeitsabstand von bis zu 2 mm transferiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem Verfahren erfolgreich unterschiedliche Biomaterialien wie DNS, Proteine und Zellen in hoher Auflösung übertragen werden können.<sup>10</sup> Das Protein Meerettichperoxidase verlor nach dem Übertrag in einem piezoelektrischen DOD-System an Aktivität.<sup>11</sup> Glucose Oxidase konnte hingegen ohne Aktivitätsverlust übertragen werden.<sup>12</sup> Für einen Aktivitätsverlust sind insbesondere hohe Scherkräfte verantwortlich. Auch Proteine, die das Zellwachstum beeinflussen, können erfolgreich mit solchen Drucksystemen aufgebracht werden.

Dabei kann insbesondere der Einfluss von Konzentrationsgradienten auf das Verhalten von Stammzellen ein interessantes Forschungsinstrument darstellen. Es konnten in den Untersuchungen Parameter identifiziert werden, bei denen sich Stammzellen in bestimmte Zelltypen differenzieren.<sup>3,13</sup>

Beim Drucken lebender Zellen wurden die unterschiedlichen Drucksysteme getestet. Dabei konnte festgestellt werden, dass nicht nur das Drucken alleine, sondern auch das Vorbereiten der Zellen für den Druck zu einer Zellaufschluss-Rate von bis zu 15 % führen kann.<sup>14</sup> Lediglich 3 % der Zellen werden durch den Transferprozess geschädigt. Insbesondere bei der Untersuchung der Zellen auf Hitzeschock-Proteine (HSP70) konnte festgestellt werden, dass es keine signifikante Erhöhung in deren Expression gibt.<sup>15</sup>

### **Einschränkungen des Inkjetdrucks**

Beim Inkjetdruck handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Flüssigkeit durch eine Düse gepresst wird. Daher kann die Düse und somit der Druckkopf verstopfen, wenn Flüssigkeiten mit hoher Viskosität oder schwierigen Materialien (z.B. Glykoproteine) übertragen werden.<sup>16,17</sup> Zusätzlich werden auf die Zellen beim Passieren der Düse Scherkräfte ausgeübt, die eine beliebige Verringerung des Kapillardurchmessers einschränkt. Deshalb sind nicht beliebig kleine Strukturgrößen mittels Inkjetdruck herstellbar. Insbesondere wenn

kleine Volumina übertragen werden, wird ein Restvolumen benötigt, das in den Leitungen zurückbleibt. Dieses sogenannte Totvolumen steht für den Druck nicht zur Verfügung.<sup>18</sup>

Der Inkjetdruck wurde auch dahingehend weiter entwickelt, dass einzelne Zellen gedruckt werden können. Diese steht für weitergehende Experimente, wie PCR-Analysen und Stammzelluntersuchungen, zur Verfügung. Dabei wurde eine spezielle Düse entwickelt, die es ermöglicht, eine Kamerabeobachtung während des Drucks durchzuführen. Wenn eine Zelle detektiert wird, so wird der Druck zugelassen und die nächste Position wird angefahren werden. Stellt das System fest, dass keine, oder mehr als eine Zelle in dem Tropfen enthalten sind, so wird der Tropfen per Vakuum-Absaugung verworfen. Mit diesem System wurden beispielsweise HeLa-Zellen erfolgreich mit bis zu 85% vereinzelt übertragen, bei einer Überlebensrate der Zellen von über 70 %.<sup>19</sup>

#### **3.1.2 Extrudieren**

Beim Extrudieren wird ein kontinuierlicher Strom einer dickflüssigen Lösung generiert, der nicht abreißt. Somit werden keine separaten Tropfen gebildet (siehe Bild 4). Es handelt sich, wie der Inkjetdruck, um ein düsenbasiertes Verfahren.

#### **Vorteile des Extrudierens**

Das Druckverfahren ist relativ einfach, wodurch auch die Anschaffungskosten für derartige Geräte klein sind. Da ein Abriss des Flüssigkeitsstroms vermieden werden muss, ist die Düsengröße eine Größenordnung größer als bei Inkjetdruckern.<sup>20</sup> Dadurch kann eine viel größere Bandbreite an Materialien verarbeitet werden.<sup>21</sup> Zusätzlich entstehen verfahrensbedingt nur geringe Scherkräfte, was den Prozess wiederum sehr schonend für das druckende Material macht. Dadurch lassen sich Gele in 3-D Strukturen aufbauen, die als Gerüststrukturen für medizinische Anwendungen eingesetzt werden können.<sup>22,23</sup> Es lassen sich auch direkt Zellen im Prozess verarbeiten.<sup>24,25</sup>

#### **Einschränkung des Extrudierens**

Die oben genannten Vorteile gehen zu Lasten der Auflösung. Diese ist um eine Größenordnung schlechter als beim Inkjetdruck (250  $\mu\text{m}$  zu 30  $\mu\text{m}$ ), was an der größeren Düsen-

öffnung liegt.<sup>20,26</sup> Das Extrudieren eignet sich daher nicht zur Übertragung einzelner Zellen.

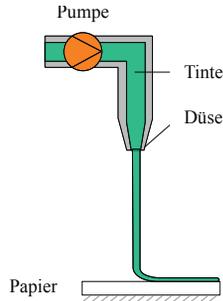


Bild 4: Schematische Darstellung des Extrusions-Verfahrens. Durch einen kontinuierlichen Strom wird ein Faden auf dem Papier abgelegt. Da der Düsendurchmesser ausreichend groß ist, reißt der Flüssigkeitsstrom nicht ab.

Insbesondere der Aufbau großer Strukturen, die nur eine geringe Auflösung brauchen, ist hiermit realisierbar. Sobald kleine Strukturgrößen mit hohen Auflösungen gebraucht werden sind andere Verfahren notwendig. Es wird ein Verfahren benötigt, mit dem es möglich ist Materialien in hoher Auflösung also auch eine Vielzahl an Materialien zu übertragen.

### 3.1.3 Laser induzierter Vorwärtstransfer (Laser induced Forward Transfer, LIFT)

Seit 1985 beschäftigen sich Wissenschaftler mit laserbasierten Methoden zum gezielten Abscheiden von Metallen.<sup>27</sup> Aus diesen Untersuchungen ist die Methode des laserinduzierten Vorwärtstransfers (Laser Induced Forward Transfer, LIFT) hervorgegangen.<sup>28</sup> Im Jahr 2000 wurde der Prozess erstmalig zum Übertrag von biologischen Materialien eingesetzt.<sup>7,29,30</sup>

Der Transferträger ist aus mehreren Schichten aufgebaut. Auf eine für die Laserstrahlung transparente Unterlage wird eine Absorberschicht aufgebracht. Darauf befindet sich eine homogene Schicht des Transfermaterials. Der Empfängerträger ist eine Unterlage zur Aufnahme der zu übertragenden Materialien (siehe Bild 5). Auch dieser kann mit einer Dämpfungsschicht beschichtet sein, um die Übertragung von empfindlichen Materialien zu ermöglichen.

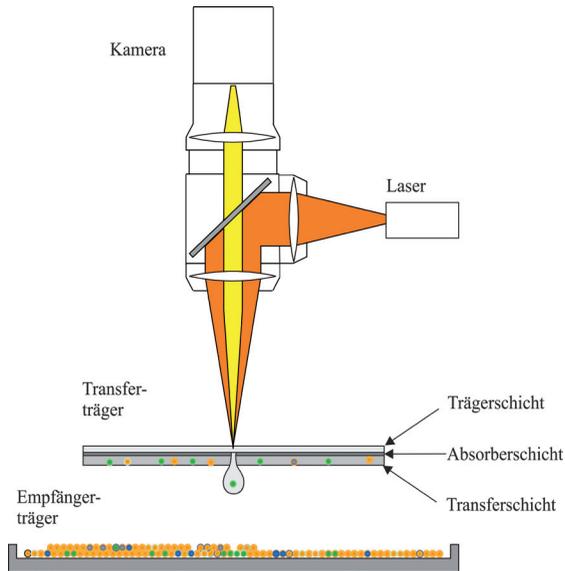


Bild 5: Schematische Darstellung des LIFT-Vorgangs. Dabei wird Material von einem Transferträger auf einen Empfängerträger mittels gepulster Laserstrahlung übertragen.

Für biologische Anwendungen gibt es unterschiedliche Ansätze. Zum Einsatz kommen Festkörperlaser und Excimerlaser. In Tabelle 1 sind einige für den LIFT-Prozess eingesetzte Laserstrahlquellen, die eingesetzte Fluenz und das Materialsystem genannt. Dabei fällt auf, dass für Festkörperlaser die eingesetzten Fluenzen zwei Größenordnungen über denen von Excimerlasern liegen.

Der auf die Absorberschicht des Transferträgers fokussierte Laserstrahl wird nahezu vollständig absorbiert und verdampft diese lokal. Dadurch wird das darauf befindliche Transfermaterial über eine Strecke von typischerweise 0,1 bis 5 mm übertragen und lagert sich auf dem Empfängerträger ab.<sup>31,32</sup>

Tabelle 1: LIFT für biologische Anwendungen, ein Auszug verschiedener Arbeitsgruppen.

Gruppe	Aktives Medium	Wellenlänge [nm]	Pulsdauer [ns]	Repetitionsrate [Hz]	Fluenz [J/cm <sup>2</sup> ]	Transferschicht (M = Material D = Dicke)
Farsari <i>et al.</i> <sup>33-35</sup>	KrF	248	15	--	0,016 - 0,03	PBS/Glycerin ca. 10 µm
Barron <i>et al.</i> <sup>32,36,37</sup>	KrF	248	2,5	1 - 100	0,025 - 0,09	Kulturmedium 20 - 100 µm
Duocastella <i>et al.</i> <sup>38-40</sup>	Nd:YAG	355	10	1	1,5 - 7	Wasser/Glycerin ca. 20 µm Na-Alginate in
F. Guillemot <i>et al.</i> <sup>41-43</sup>	Nd:YAG	1064	30	100.000	1,58 - 6	PBS (1 % w/v) 25 µm
Chichkov <i>et al.</i> <sup>44-46</sup>	Nd:YAG	1064	10	20	1 - 2	Kulturmedium, Hydrogele ca. 60 µm

### Vorteile von LIFT:

Mit dem LIFT-Verfahren können viele unterschiedliche Materialien übertragen werden. Dies gilt für Materialien wie z.B. Metalle, Kunststoffe und Biomaterialien, bis hin zu lebenden Zellen. Diese werden übertragen, ohne dass Schädigungen an ihnen nachgewiesen werden können.<sup>36,47</sup> Die erreichten Auflösungen sind ähnlich gut wie die des Inkjetdrucks bei bis zu 10 µm Tropfendurchmesser. Durch den Aufbau des LIFT-Verfahrens ist es auch möglich geringste Mengen an Flüssigkeit zu verarbeiten, da keine Totvolumina durch Zuleitungen vorhanden sind.<sup>48</sup>

### Beschränkungen von LIFT:

Inkjetdrucker sind weit verbreitet und auch kommerzielle Geräte für Extrusionsanwendungen sind verfügbar. Im Gegensatz hierzu gibt es keine kommerzielle LIFT-Anlage auf dem Markt. Das Verfahren muss noch weitergehend untersucht werden, sodass reproduzierbare Druckerzeugnisse mittels LIFT hergestellt werden können. Auch der benötigte Bauraum

für den Transferträger stellt eine Einschränkung dar. Bisher werden meist Objektträger eingesetzt. Somit können kleine Öffnungen nur aus großem Abstand bearbeitet werden.

Wird mittels LIFT-Verfahren eine Flüssigkeit übertragen, können Tropfen unterschiedlicher Volumina entstehen. Das Tropfenvolumen liegt zwischen einem Pikoliter und einigen hundert Pikolitern. Das Transfermaterial ist nicht direkt der Laserstrahlung ausgesetzt und es werden lediglich 1 % der Laserstrahlung transmittiert. In früheren Arbeiten ist gezeigt worden, dass eine Aufheizung des Transfermaterials infolge der Absorption der Laserstrahlenergie in der Absorberschicht innerhalb einer Sekunde wieder abklingt. Die Transferschicht selbst wird thermisch gering beansprucht. Eine nähere Betrachtung der thermischen Einwirkung ist in Kapitel 4.2.2 dargestellt (siehe Bild 11).<sup>28,32,49</sup>

Während des LIFT-Übertrags werden die Tropfen mit einer Geschwindigkeit von ca. 80 m/s übertragen. Für die Ausbildung eines Flüssigkeitstropfens muss ausreichend viel Energie in das System eingebracht werden. Wird zu wenig Leistung eingesetzt, so findet kein Übertrag statt. Wird zu viel Leistung eingesetzt, so bilden sich viele kleine Tropfen, die sich auf dem Empfänger als Spray verteilen. Dazwischen befindet sich das Prozessfenster für das LIFT-Verfahren (siehe Bild 6). Diese Geschwindigkeit ist abhängig von der Fluenz des Laserstrahls, wobei der Zusammenhang näherungsweise linear ist (siehe Bild 7).<sup>31</sup>

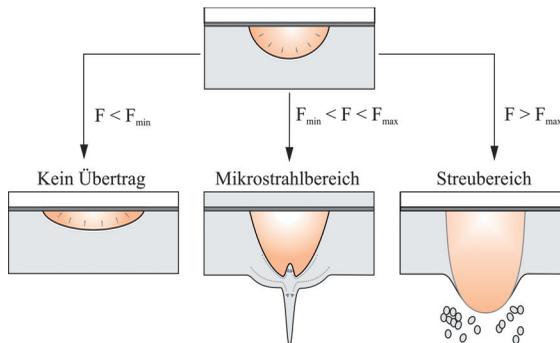


Bild 6: Prinzip der LIFT-Übertragsstufen auf dem Transferträger. In Abhängigkeit der Fluenz können drei Bereiche unterschieden werden: Kein Übertrag, Mikrostrahlbereich und der Streubereich.

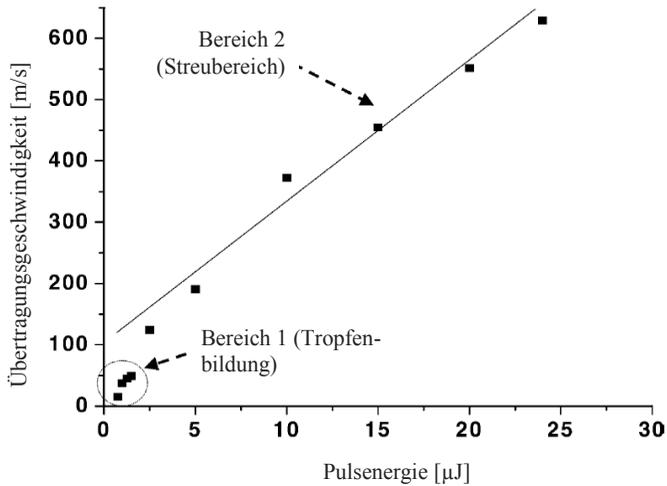


Bild 7: Die Geschwindigkeit der Tropfen in Abhängigkeit von der Laserfluenz mittels LIFT ist dargestellt. Die verwendete Laserstrahlquelle ist ein Excimer-Laser mit 248 nm Wellenlänge und 2,5 ns Pulsdauer. Das Transfermaterial ist eine Mischung von 80 % Glycerin und 20 % Wasser.<sup>32</sup>

### **Einflussgrößen auf den LIFT-Prozess**

Die Einflussfaktoren auf den LIFT-Prozess lassen sich in folgende Kategorien einordnen:

- Laserparameter
- Absorberschicht
- Beschaffenheit der Transferschicht
- Oberflächenbeschaffenheit des Empfängerträgers

### Laserparameter

Der Laserstrahl wird durch den Fokusradius  $w_0$ , den Fernfeld-Divergenzwinkel  $\Theta_0$  und die räumliche Intensitätsverteilung im Fokus beschrieben. Zusätzlich hat auch die Fokussierlinse einen maßgeblichen Einfluss auf  $w_0$ . Der Fokusradius hängt von der Brennweite  $f$ , der Wellenlänge  $\lambda$ , dem Rohstrahldurchmesser  $D$  und der Strahlqualitätskennzahl  $M^2$  folgendermaßen ab:

$$3.1 \quad w_0 = \frac{fM^2\lambda}{\pi D}$$

Die Fluenz im Fokus berechnet sich aus der mittleren Strahlleistung  $P_m$  und der Repetitionsrate des Lasersystems  $f_p$  folgendermaßen.<sup>50</sup>

$$3.2 \quad F = \frac{P_m}{\pi w_0^2 f_p}$$

Der untere Schwellenwert für den Übertrag wird  $F_{\min}$  bezeichnet. Bis zu dieser Leistung findet kein Übertrag statt.  $F_{\max}$  ist der Fluenzwert, oberhalb dessen kein spezifisches Übertragsergebnis erfolgt, da keine definierte Tropfenbildung stattfindet.

In Abhängigkeit von der Fluenz  $F$  lassen sich drei Stufen unterscheiden (siehe Bild 6):<sup>43</sup>

a) Kein Übertrag, Fluenz unterhalb des Schwellenwerts ( $F < F_{\min}$ )

Es entsteht entweder keine Dampfblase oder sie fällt vor der Ausbildung eines Mikrostrahls in sich zusammen und es findet kein Tropfenübertrag statt.

b) Mikrostrahlbereich ( $F_{\min} < F < F_{\max}$ )

Die Dampfblase wächst auf eine kritische Größe an. Sobald die Dampfblase kollabiert, bildet sich ein Mikrostrahl aus. Auf dem Empfängerträger werden Tropfen abgesetzt, die in Form und Größe innerhalb eines Prozessfensters eingestellt werden können.

c) Streubereich ( $F > F_{\max}$ )

Die Größe der Dampfblase wächst über die Transferschichtdicke hinaus und zerplatzt. Dabei zerstäubt das Material und schlägt sich auf dem Empfängerträger nieder.

#### **Absorberschicht**

Die Absorberschicht auf dem Transferträger besteht aus einem Material, welches die Laserstrahlung absorbiert.<sup>28</sup> Dies kann eine durch einen PVD-Prozess aufgedampfte Metallschicht, z.B. aus Titan, Gold oder Silber, sein. Auch andere Absorberschichten, die für die Laserstrahlung intransparent sind, wie Triazene, können eingesetzt werden. Die Absorberschicht muss angepasst eingesetzt werden für die optische Eindringtiefe der eingesetzten Laserstrahlung. Dies kann durch eine chemische Anpassung der Absorberschicht erfolgen,<sup>51-53</sup> oder aber durch eine Anpassung der Schichtdicke der Absorber.

#### **Beschaffenheit der Transferschicht**

Für einen reproduzierbaren LIFT-Prozess ist die gleichmäßige Bedeckung des gesamten Transferträgers mit einer homogenen, dünnen Transferschicht essentiell. Dabei kann die Schichtdicke vom Nanometer- bis in den 100 Mikrometer-Bereich variiert werden. Für jede Transferschichtdicke muss für die verwendete Absorberschicht ein Prozessfenster ermittelt werden.

#### **Oberflächenbeschaffenheit des Empfängerträgers**

Je nach zu übertragendem Material muss auch der Empfängerträger vorbereitet werden. Dabei können bestimmte, für die Herstellung von Microarrays spezialisierte Haftsichten für Materialien zum Einsatz kommen. NexterionE (Schott AG) ist beispielsweise ein epoxyliertes Spezialglas, auf dem Proteine kovalent gebunden werden können. Sollen lebende Zellen übertragen werden, muss der Aufprall auf dem Empfängerträger sanft getoppt werden. Würden Zellen direkt auf eine Glasoberfläche gedruckt, so wird die Zellmembran

durch die entstehenden Scherkräfte irreversibel geschädigt. Daher werden Hydrogelschichten eingesetzt um als Dämpfungsschicht den Aufprall abzufangen und das Überleben der Zellen zu ermöglichen.

### 3.2 In Vitro Testsysteme

Die Definition von in vitro Testsystemen kann aus der EU-Direktive über in vitro Diagnostika (RICHTLINIE 98/79/EG) abgeleitet werden. Diese umfasst alle Reagenzien, Kalibrationsmittel und Instrumente die eingesetzt werden, um Untersuchungen durchzuführen. Bei diagnostischen in vitro Testsystemen werden Gewebe- oder Blutproben auf nachfolgende Punkte untersucht:

- Genetische Auffälligkeit
- Kompatibilität zu möglichen Empfängern
- Laufende Therapie
- Physiologie und Pathologie

Der Begriff der in vitro Testsysteme ist noch weiter gefasst und umfasst auch Proben aus pflanzlichen und tierischen Biomaterialien. Die Anwendung von in vitro Tests zur Identifizierung und Untersuchung von Wirkstoffen ist von hohem gesellschaftlichem und wirtschaftlichem Interesse. In den letzten Jahren hat das Feld des Hochdurchsatz-Screenings wichtige Fortschritte in der medizinischen Forschung gebracht (siehe Kapitel 3.2.1).

Hiermit kann sehr schnell eine große Anzahl von Parametern für eine einzelne Person oder auch einen Pflanzenschädling untersucht werden. Daraus werden Rückschlüsse auf das eingesetzte Zielsystem gezogen.

Werden noch komplexere Zusammenhänge erforscht wird ein Ansatz benötigt, bei dem mehrere Parameter auf einmal zu untersuchen sind. Dadurch kann die Wechselwirkung von Zellen untereinander verstanden werden. Hierfür können High Content Screenings eingesetzt werden (siehe Kapitel 3.2.2).

### 3.2.1 Hochdurchsatz-Screening

Hochdurchsatz-Screenings (High-Throughput-Screenings, HTS) erlauben bis zu 100.000 Reagenzien pro Tag zu testen.<sup>54</sup> Dabei sind die Automatisierungstechnik und die Datenanalyse wichtige Punkte, die beachtet werden müssen. Die Ergebnisse dieser Analysen sind oft der Startpunkt von Wirkstoffentwicklungen in der pharmazeutischen Industrie.

Meist werden für Experimente Standard-Mikrotiterplatten eingesetzt, die mehrere Tausend Reaktionskammern enthalten können. Diese Kammern werden entsprechend einer experimentellen Vorschrift gefüllt und das Analyt, Proteine, DNA oder RNA hinzugefügt. Die Reaktionskammern können nach einer Inkubationszeit analysiert werden. Häufig ist das Resultat ein Farbumschlag oder eine Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzreaktion, die mit einem Spektrophotometer ausgelesen werden. Die Befüllung der Reaktionskammern kann bei geringen Probenzahlen manuell durchgeführt werden, bei hohen Probenzahlen ist eine automatisierte Durchführung notwendig. Dies kann mit automatisierten Pipettierrobotern realisiert werden, deren Funktionsweise beispielsweise auf Extrusion oder dem Inkjetdruck zurückzuführen ist. Die Reagenzien, die bei diesem ersten Screening als interessant identifiziert worden sind, können in folgenden Experimenten weiter untersucht werden. Eine Substanz, die die gewünschten Eigenschaften aufweist, wird Treffer genannt und kann zu neuen Wirkstoffen führen. Die erzeugten Daten müssen danach auf relevante Ergebnisse hin ausgewertet werden. Dafür kommen spezielle Algorithmen zum Einsatz. Diese basieren meist auf Unterstrukturanalysemethoden, Ähnlichkeitssuche oder künstlichen neuronalen Netzen.<sup>55</sup>

Ein hoher Durchsatz an Substanzen ist am Anfang wichtig, da erst die potentiell wirksamen Substanzklassen identifiziert werden müssen. Um dies wirtschaftlich gestalten zu können sind einfache, automatisierbare Analyseschritte für eine erste Vorauswahl notwendig. Dadurch können Substanzen identifiziert werden. Zur genaueren Analytik dieser Substanzen müssen dann jedoch aussagekräftigere Testsysteme herangezogen werden. Hierfür sind in den letzten Jahren die HCS entwickelt worden (siehe Kapitel 3.2.2).<sup>56</sup>

Der Aufbau eines Labors für HTS ist sehr teuer, weshalb kleinere und mittelgroße Einrichtungen diese Experimente meist von größeren Laboren durchführen lassen.

### 3.2.2 High-Content-Screening

High-Content-Screenings (HCS) sind eine Kombination aus zellbiologischen Untersuchungen, automatisierter hochaufgelöster Mikroskopie und Automatisierung. Potentielle Wirkstoffe werden darauf untersucht, wie diese die Zellfunktionalität beeinflussen. Dabei werden orts- und zeitaufgelöst Daten erfasst und somit mehrere Parameter auf einmal untersucht. Insbesondere die Bildanalyse gibt dabei Rückschlüsse auf die Auswirkung der Treffer bzw. Stimuli auf die Zelle. Im Vergleich zu den HTS liegt der Hauptvorteil darin, dass beispielsweise gleichzeitig mehrere Phänomene auf einmal beobachtet werden können. Beispielsweise lassen sich Signaltransduktionskaskaden und der Zustand des Cytoskeletts parallel beobachten. Zellen beinhalten als kleinste Einheit des Lebens alle lebenswichtigen Funktionen. In ihnen können DNS, RNS, Proteine, Metabolom oder Ionenkonzentrationen analysiert werden. Eine große Menge an Daten kann durch das Screening generiert werden. Somit wird ein wesentlich detaillierteres Verständnis der Wirkmechanismen der untersuchten Substanz ermöglicht. Nachteilig für HCSs ist die relativ lange Dauer der Experimente im Vergleich zu HTS.

Daher sind HCS nur ergänzende Untersuchungen, bei denen eine Validierung der identifizierten Treffer stattfindet. Primäre Zielwirkstoffe werden mit HTS identifiziert.

HCSs können sowohl an fixierten, toten Zellen, als auch an lebenden Zellen durchgeführt werden. Fixierte Zellen erlauben eine einfache Handhabung, da im Prinzip die gleichen Verfahren wie beim HTS eingesetzt werden können. Es können somit schnell tausende von Substanzen automatisiert getestet werden. Bei HTSs hingegen können über 100.000 Substanzen getestet werden.

Testsysteme mit lebenden Zellen sind die vielseitigsten Werkzeuge, die für das Screening von Wirkstoffen zur Verfügung stehen. Hier können sämtliche Funktionen einer lebenden Zelle genutzt werden, um Rückschlüsse auf die biologischen und letztlich auch physiologischen Zusammenhänge von Wirkstoffen zu erforschen. Jedoch wird letztlich der höchste technische Aufwand benötigt. Die Umgebungsbedingungen müssen kontrolliert werden und auch die Fluoreszenzsignale in den Zellen müssen aufrecht erhalten bleiben. Auch eine höhere Anzahl an fluoreszierenden Biomarkern gibt wichtige Rückschlüsse. Das Hauptaugenmerk ist dabei auf die Skalierung der Experimente gerichtet. Ist eine experimentelle Vorgehensweise ausgearbeitet, werden Werkzeuge benötigt, die es erlauben, die Experi-

mente in großer Anzahl durchzuführen. Dies wird durch die Automatisierung in der Mikroskopie und dem Liquid Handling ermöglicht.

Diese zellbasierten Testsystemen können zusätzlich wie folgt unterschieden werden:

- Ein Zelltyp wird ausschließlich eingesetzt und untersucht. Ein Beispiel für derartige Testsysteme ist der Kratztest aus der dermatologischen Testung. Dabei werden Hautzellen, Keratinocyten, so kultiviert, dass sie die Oberfläche ganz abdecken. Nach der gezielten Einbringung einer definierten Lücke in dieser Zellschicht wird beobachtet wie lange es dauert, bis sich die Lücke schließt. Die Zugabe von Chemikalien beeinflusst dieses Wachstumsverhalten und somit können Rückschlüsse auf die Hautverträglichkeit gezogen werden. Ein weiteres Beispiel für Tests mit Einzelzellen sind die Ausrichtung von Nervenzellen an Zelleitstrukturen.<sup>57</sup> Dies soll es ermöglichen, Läsionen von Nervengewebe in Zukunft besser behandeln zu können.
- Zwei oder mehr Zelltypen werden eingesetzt. Hier wird entweder ein Zelltyp hauptsächlich betrachtet oder die Interaktion mehrerer Zelltypen untereinander beobachtet. Entweder können Zellen durch eine geschickte Trennung in Cokultur gehalten werden oder sie werden durch ein Drucksystem positioniert. Auch hier kann Haut als ein Beispiel dienen. Es werden mehrere Hautmodelle angeboten, bei denen über einer Lage von Bindegewebszellen, Fibroblasten, Hautzellen, Keratinocyten, kultiviert werden. Hier haben die Zellen eine viel natürlichere Umgebung und die Hautzellen weisen bei richtiger Kultivierung die charakteristischen Marker (Keratine) von Haut auf.<sup>58,59</sup> Mit diesem 3D-Hautmodell können wesentlich detaillierte Aussagen über die Wirkung von Chemikalien auf die menschliche Haut getroffen werden. Die Penetration durch die äußere Hautschicht kann somit in vitro nachgeahmt werden. Werden solche Modelle händisch aufgebaut, so kann eine relativ große Varianz in deren Aufbau beobachtet werden. Wird der Automatisierungsgrad erhöht und das Hautmodell vollautomatisch aufgebaut, so sind die daraus resultierenden Ergebnisse reproduzierbar und die Aussage des Testsystems wird verlässlicher.

### 3.3 Tissue Engineering

Tissue Engineering ist ein interdisziplinärer Forschungsansatz Gewebe künstlich herzustellen. Dieses künstlich erzeugte Gewebe kann im Anschluss eingesetzt werden, um krankes oder verletztes Gewebe im Körper zu ersetzen. In den letzten Jahren ist das Gebiet intensiv erforscht worden und es gibt unterschiedliche Ansätze für die Herstellung dieser Produkte. Entweder können Gele im Patienten appliziert werden, oder formstabile Gerüststrukturen kommen zum Einsatz. Sowohl die Gele als auch die Gerüststrukturen können mit oder ohne Zellen eingesetzt werden (siehe Bild 8).<sup>60</sup>

Dabei bietet insbesondere der Einsatz von Hydrogelen dem praktizierenden Arzt eine einfache Handhabung (siehe Bild 8 A und B). Im einfachsten Fall wird das Gel an die defekte Stelle gespritzt. Hierdurch setzen die Heilungsmechanismen des Körpers ein. Damit dies funktioniert, muss das Gel die richtigen chemischen und mechanischen Eigenschaften für die einwachsenden Zellen bieten.

Zusätzlich kann noch zwischen absorbierbaren und biodegradierbaren Materialien unterschieden werden. Absorbierbare Materialien werden Stück für Stück aufgelöst und dabei über Urin oder Schweiß ausgeschieden (Bsp. Polylactid).<sup>61</sup> Biodegradierbare Materialien hingegen werden enzymatisch verändert und können in Form und chemischer Zusammensetzung durch den Körper angepasst werden. Sie verbleiben jedoch am Wirkort (Bsp. Alginat).<sup>62</sup>

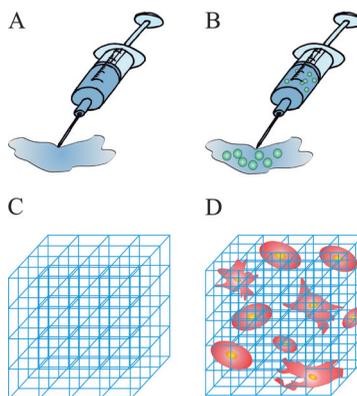


Bild 8: Strategien zur Herstellung von Tissue Engineering Produkten. **A:** Injizierbares Gel ohne Zellen, **B:** Injizierbares Gel mit Zellen, **C:** Gerüststruktur ohne Zellen, **D:** Gerüststruktur mit Zellen

In Tierversuchen ist gezeigt worden, dass die Injektion von Gelen zu einer besseren Heilung führen kann. Der Einsatz von Fibrin, das auch bei normalen Wundheilungsprozessen anwesend ist, verbessert auch die Wundheilung im Tier.<sup>63,64</sup> Hyaluronsäure-basierte Gele können beispielsweise zur Behandlung von Arthrose eingesetzt werden.<sup>65</sup>

Um eine mechanische Stabilität zu gewährleisten oder um große, makroskopische Bereiche zu füllen, wie z.B. nach einer Tumorsektion, werden in vielen Anwendungsfällen starre Formen benötigt (siehe Bild 8 C und D). Hierfür werden unterschiedliche Geometrien von Gerüststrukturen aus einer großen Vielfalt an Materialien eingesetzt. Zu Beginn wurden diese Gerüststrukturen durch einfache Produktionsverfahren hergestellt, wie Gießen<sup>66</sup> und Abformen<sup>67</sup> oder auch Gefriertrocknungsprozesse,<sup>68</sup> die das Herstellen von großflächigen homogenen Strukturen ermöglichen. Um naturidentische Formen nachbauen zu können, werden heutzutage vermehrt abtragende und generative Fertigungstechniken eingesetzt. Dabei werden, je nach gewünschtem Gewebetyp, unterschiedliche Materialien und Verfahren verwendet.

Für Hartgewebe, wie Knochen und Zähne, müssen Verfahren eingesetzt werden, bei denen am Ende starre Objekte erzeugt werden. Ursprünglich wurden hierfür abtragende Verfahren, wie das Fräsen oder die Funkenerosion, eingesetzt. Generative Fertigungsverfahren, wie das selektive Laserschmelzen gewinnen heute immer mehr an Bedeutung.<sup>69</sup>

Für den Aufbau von Weichgewebeersatz ist ein Verfahren notwendig, mit dem Hydrogele oder auch Zellsuspensionen verarbeitet werden kann. Dabei kommen unterschiedliche Drucktechnologien zum Einsatz, wie Inkjet-Druck, Extrudieren oder LIFT-Verfahren (siehe Kapitel 3.1).



## 4 Experimentelle Durchführung für den ortsselektiven Biomaterial- und Zelltransfer

### 4.1 Zellkultur

Für die Untersuchungen zum Zell-LIFT werden zwei unterschiedliche Zelltypen eingesetzt. Zum einen wird die adhärent wachsende Fibroblasten-Zelllinie 3T3-Swiss Albino, ATCC® Nr.: CCL-92™ (LGC Standards GmbH) eingesetzt. Das verwendete 3T3-Zellkulturmedium setzt sich zusammen aus 500 ml 4,5 g/L Glukose haltiges Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 50 ml 10 %-igem fötalem Kälberserum (FCS), 2,5 ml Natrium-Pyruvat sowie 0,5 ml Gentamycin-Sulfat (Lonza Group Ltd.).

Die Subkultivierung der Zellen wird wie folgt durchgeführt:

- Absaugen des Mediums mittels Pasteurpipette beziehungsweise Vakuumpumpe.
- Einmaliges Waschen des Zellrasens mit PBS (Invitrogen AG).
- Ablösen der adhärent gebundenen Zellen durch die Zugabe von 1 ml 0,2 g/L Trypsin/EDTA Lösung (Lonza Group Ltd.) sowie leichtes Klopfen und Schwenken der Zellkulturflasche (Greiner bio-one GmbH).
- Zugabe von 4 ml 3T3 Zellkulturmedium zum Abstoppen der Reaktion.
- Zentrifugation der Zellsuspension bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 136 g für 5 Minuten bei 21°C.
- Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in 3 ml Zellkulturmedium resuspendiert.
- Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.
- 30000 Zellen pro Zellkulturflasche werden in 5 ml Kulturmedium ausgesät.
- Inkubation für 3 bis 4 Tage bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> unter humiden Bedingungen.

Die zweite Zelllinie sind die in Suspensionskultur wachsenden Leukozyten K562, ATCC® Nr.: CCL-243™ (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, UKA Aachen).

Das eingesetzte Zellkulturmedium besteht aus HEPES-haltigem Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) mit 4,5 g/L Glukose sowie 50 ml fötalem Kälberserum (FCS) und 0,5 ml Gentamycin-Sulfat (Lonza Group Ltd.).

Die Zellen werden mit 5 % CO<sub>2</sub> unter humiden Bedingungen inkubiert. Die Subkultivierung der Zellen erfolgt alle 3 Tage durch den Ersatz beziehungsweise die Zugabe von frischem Zellkulturmedium.

- Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer
- Bei einer Zellzahl von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml werden 500 µl der Zellsuspension in 4,5 ml Zellkulturmedium resuspendiert
- Die resultierende Zelldichte beträgt  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml

### 4.2 LIFT-Experimente

Das LIFT-Experiment besteht aus 4 Teilen, dem Vorbereiten der Transfer- und Empfängerträger, dem LIFT-Experiment und nachfolgenden Kultivierung der übertragenen Zellen und der Analysen der Ergebnisse.

#### 4.2.1 Aufbau und Vorbereitung der Transferträger

Die Stützschiicht des Transferträgers besteht aus Borosilikatglasobjektträgern (VWR International). Die Unterseite der Objektträger ist mit einer 100 nm dünnen Absorberschicht aus Titan beschichtet (2. Physikalisches Institut, RWTH Aachen). Vor der weiteren Verwendung der beschichteten Objektträger werden diese mit 2 %-iger HELLMANEX II Lösung (Hellma GmbH & Co. KG) bei 37°C für 30 min gereinigt. Anschließend werden diese dreifach mit demineralisiertem Wasser gewaschen und bei 60° getrocknet. Die so vorbereiteten Transferträger werden im Folgenden mit der Transferschicht beschichtet.

Dafür kommen zum einen Matrigel (BD Biosciences) sowie 5 %-ige Gelatine, gewonnen aus Rinderhaut, (Sigma Aldrich Co LLC) gelöst in 3T3- beziehungsweise K562-Zellkulturmedium, zum Einsatz. Bei Matrigel handelt es sich um eine gelierende Proteinmischung, die aus Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus Sarcomazellen gewonnen wird. Es wird bei einer Temperatur von 1°C verarbeitet und erstarrt bei Temperaturen oberhalb von 4°C. Die 5 %-ige Gelatinelösung wird bei einer Temperatur von 33°C verarbeitet und ist bei Raumtemperatur fest. Die beiden verschiedenen Transferschichten werden mit Hilfe von Spiralarakeln (Olbrich Know How GmbH) aufgetragen.

Der Transfer von Proteinen und vereinzelt Zellen wird in gleicher Weise durchgeführt. Dabei wird ein Transferträger folgendermaßen aufgebaut. Ein mit Titan beschichteter Objektträger wird gereinigt und anschließend wird eine Lösung auf den Transferträger gegeben. Diese Lösung wird mit einem Rakelel gleichmäßig auf dem Transferträger verteilt. Für getrocknete Proteinschichten wird diese Schicht danach kontrolliert getrocknet und für die LIFT-Experimente eingesetzt. Der Aufbau des Transferträgers ist in Bild 9 gezeigt.

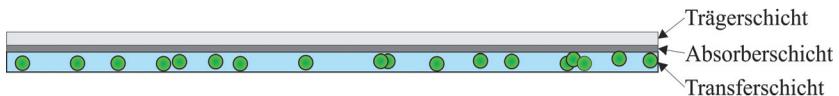
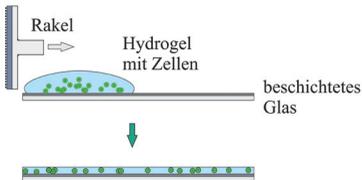


Bild 9: Schematischer Aufbau des Transferträgers. Die Trägerschicht ist für den Laserstrahl durchlässig, die Absorberschicht absorbiert die Laserstrahlung und die Transferschicht wird durch das LIFT-Verfahren übertragen.

Der Übertrag von Zellen wird auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt (siehe Bild 10):

- Einschichtsystem: Durch Suspension von Zellen in das Transferhydrogel.
- Zweischichtsystem: Zuerst wird ein Transferhydrogel ohne Zellen aufgetragen, im Anschluss wird ein zellhaltiges Medium aufgebracht und verteilt.

### A Einschichtsystem



### B Zweischichtsystem

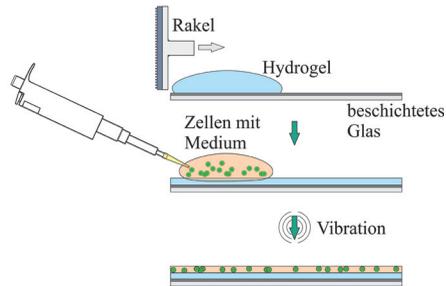


Bild 10: Vorbereitung des Transferträgers für die LIFT-Experimente. **A:** Einschichtige Systeme können nach einem Rakelschritt für LIFT-Experimente eingesetzt werden. **B:** Zweischichtsysteme werden nach dem Beschichten des Transferträgers mit Hydrogels mit einer weiteren Schicht benetzt, die Zellen enthält.

Für das Einschichtsystem werden die Zellen zunächst abzentrifugiert. Dazu werden sie bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 136 g für 5 Minuten bei 21°C zentrifugiert. Durch die Resuspension der Zellen in das jeweilige Hydrogel können diese gemeinsam mit dem Hydrogel auf den Transferträger aufgetragen werden.

Bei dem Zweischichtsystem wird der Transferträger mit 150 µl Hydrogel beschichtet und mittels Spiralarakel verteilt. Nach dem Ausgelieren des Hydrogels wird der beschichtete Transferträger mit 1 ml Zellsuspension überschichtet. Im Folgenden wird der Transferträger in eine Petrischale mit gesättigter Luftfeuchtigkeit überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das überstehende Medium wird vorsichtig abgesaugt. Anschließend wird der Transferträger 2 Minuten bei 37°C im Brutschrank und weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Als Empfängerträger für die Bestimmung des Mikrostrahlbereichs der beiden Hydrogele (Matrigel sowie Gelatine) werden verschiedene Glasobjektträger verwendet. Werden flüssige Schichten oder getrocknete Proteine übertragen, so kommen Standard-Glasobjektträger, NexterionE-Objektträger (Schott AG) oder Nitrozellulose-Objektträger (NMI, Reutlingen) zum Einsatz. Für Hydrogel- und Partikelüberträge werden Standard-Glasobjektträger mit einem Hydrogel beschichtet, dessen Zusammensetzung eine 2 mg/ml als Konzentration aufweist als die der Transferschicht. Die Empfängerträger werden mit

einem 150  $\mu\text{m}$  Spiralraketel beschichtet. Dadurch wird es möglich die übertragenen Tropfen der Transferschicht auf dem Empfängerträger über Phasenkontrastmikroskopie zu untersuchen.

#### **4.2.2 Betrachtung der Wärmeeinwirkung im Transferträger durch das LIFT-Verfahren**

Beim LIFT-Verfahren wird die Laserstrahlung in der Absorberschicht absorbiert. Im Prozess selbst können zwei Kräfte und drei Übertragsarten beschrieben werden:

1. Thermo-mechanische Mechanismen durch Verdampfen der Transferschicht
2. Thermo-akustische Mechanismen durch Abplatzen der Transferschicht
3. Kombination aus thermo-mechanischem und thermo-akustischem Effekt

In einer wässrigen Transferschicht hat der erste Punkt den maßgeblichen Anteil am Prozess und somit die maßgebliche Auswirkung auf die Zellen. Wenn das Hydrogel zu stark erwärmt wird, werden die Zellen letal geschädigt. In einer FEM-Analyse ist von Barron et al. festgestellt worden, dass trotz starker Erwärmung der Titanschicht in einem Abstand von 5  $\mu\text{m}$  in Wasser keine Temperaturerhöhung stattfindet (siehe Bild 11).

Das hier eingesetzte Schichtsystem besteht aus einer Glasschicht, einer Absorberschicht und einer Wasser-Transferschicht. Die Wärmeübertragung wird mit einer Finite-Elemente-Modellierungs-Software (COMSOL) simuliert. Diese ermöglicht über ein Wärmetransfermodul Wärmeleitung, Konvektion und Strahlungswärme über verschiedene Materialien hinweg zu berechnen. Dabei wird ein in der Literatur beschriebenes Modell für die Wärmeausbreitung eingesetzt.<sup>50,70</sup> Als Stoffzahlen werden die Werte von reinem Titan und Wasser, als Hauptbestandteil des Hydrogels, eingesetzt (siehe Tabelle 2).

## 4 Experimentelle Durchführung

---

Tabelle 2: Materialkenngrößen von Wasser und Titan für die Simulation.

Eigenschaften	Symbol	Einheit	Titan	Wasser
Dichte	$\rho$	kg/m <sup>3</sup>	4500	1000
Wärmekapazität	$C_p$	J/kg K	523	4180
Spezifische Wärmeleitfähigkeit	$\lambda$	W/m K	21,6	0,6
Reflektivität	R	---	0.44281	Nicht relevant
Absorptionskoeffizient	$\alpha$	1/m	71,293*10 <sup>6</sup>	Nicht relevant

Für das Modell werden folgende Annahmen getroffen:

- Die optische Eindringtiefe  $\delta$  für 355 nm in Titan kann mit Hilfe des Absorptionskoeffizienten als  $\delta = \frac{1}{\alpha}$  berechnet werden und beträgt 14 nm. Damit ist sie um mehrere Größenordnungen geringer als der Fokusedurchmesser von 20  $\mu\text{m}$  und ein ein-dimensionaler Wärmestrom kann angenommen werden.
- Die Wärmeeindringtiefe wird nach der Formel  $\sqrt{4\kappa t}$  berechnet, wobei die Temperaturleitfähigkeit  $\kappa$  aus der Wärmeleitfähigkeit  $\lambda$ , der Dichte  $\rho$  und der Wärmekapazität  $C_p$  als  $\kappa = \frac{\lambda}{\rho \cdot C_p}$  ermittelt werden kann. Sie beträgt folglich für einen 1 ns langen Puls 189 nm. Da die Absorberschicht nur 80 nm dick ist, wird die gesamte Schichtdicke als thermisch durchdrungen betrachtet.
- Nach 80 ns ist im Experiment eine Dampfblasenentwicklung gezeigt worden. Deshalb wird die thermische Ausbreitung in der Wasserschicht nur bis zu diesem Zeitpunkt betrachtet.<sup>40</sup>
- Aggregatzustandsänderungen werden zur Vereinfachung des Modells nicht berücksichtigt. Dadurch ist dies eine Abschätzung der oberen Grenze, da ansonsten Energie für die Umwandlung in Schmelze und v.a. Dampf aufgewandt werden muss.

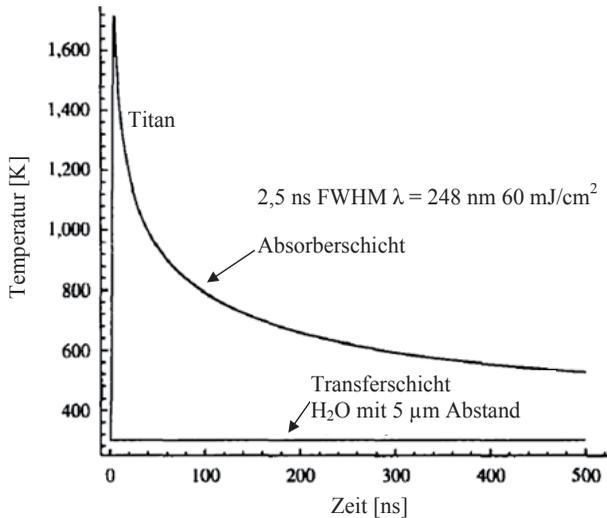


Bild 11: Der Temperaturverlauf in der Absorber- und der Transferschicht während des LIFT-Prozesses ist dargestellt. Die Transferschicht wird für einen Abstand von 5 µm betrachtet. Die verwendete Laserstrahlquelle ist ein Excimer-Laser mit 248 nm Wellenlänge (Pulsdauer 2,5 ns).<sup>32</sup>

#### Grundlagen für die LIFT-Modellierung:<sup>50,70</sup>

Die Wärmeentwicklung wird in Abhängigkeit der Zeit betrachtet. Dafür wird die Wärmestromdichte nach dem Fourier-Gesetz wie folgt betrachtet.

$$4.1 \quad \frac{dQ}{dt} = -\lambda \cdot \nabla T$$

Dabei ist  $\lambda$  die spezifische Wärmeleitfähigkeit und  $Q$  der Wärmestrom. Über  $\nabla T$  kann der Temperaturgradient beschrieben werden. Über die Laserstrahlung wird Energie in das Material eingetragen und das bestrahlte Material, also die Titan-Absorberschicht, heizt sich auf. Dabei kann ein Wärmetransfer durch Kurzpulslaserstrahlung über Gleichung 4.2 beschrieben werden.

$$4.2 \quad \rho \cdot c_p \cdot \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla(\lambda \nabla T) + Q(x, y, t)$$

$C_p$  ist die spezifische Wärmekapazität  $\rho$  die Dichte des Materials und  $Q(x,y,t)$  die Laserenergiegedichte im Material. Die Laserenergiegedichte  $Q(x,y,t)$  ist eine Funktion der Intensität und des Lambert-Beerschen Gesetzes, siehe Gleichung 4.3.

$$4.3 \quad Q(x, y, t) = I(x, t) \cdot (1 - R) \cdot \alpha \cdot e^{(-\alpha \cdot y)}$$

Dabei stellt  $I(x,t)$  Laserintensität über Zeit und den Ort dar. Für das System wird angenommen, dass ein gaußscher Laserpuls in räumlicher und zeitlicher Domäne vorliegt. Die Reflektivität und Absorptivität werden hier ebenfalls mit berücksichtigt. Für die Laserintensität wird Gleichung 4.4 für die Simulation eingesetzt.

$$4.4 \quad I(x, t) = I_0 \cdot e^{\left(-\frac{x^2}{r^2}\right)} \cdot e^{\left(-\frac{3,5 \cdot (t-\tau)^2}{\tau^2}\right)}$$

Der erste Exponent beschreibt den räumlichen, der zweite Exponent den zeitlichen Anteil der gaußschen Verteilung.  $I_0$  ist die Ausgangsintensität der Energiedisposition und wird dabei wie folgt beschrieben.

$$4.5 \quad I_0 = \frac{E}{\tau \cdot A}$$

Dabei sind  $E$  die Energie,  $\tau$  die Pulslänge und  $A$  die Fläche im Fokus. Die optischen Eigenschaften der Absorberschicht (Absorptionskoeffizient,  $\alpha$  und Reflektivität,  $R$ ) sind material- und temperaturabhängig. Für die Simulation werden die Werte bei 20°C festgesetzt, da die Reflektivität mit steigender Temperatur zunimmt und die Absorption abnimmt. Dadurch ergibt sich für beide Fälle eine Reduktion der entstehenden Temperatur. In der Modellierung wird eine Netzweite von 30 nm eingesetzt.

Mit dem Modell wird gezeigt, dass die maximale thermische Eindringtiefe in das Hydrogel 80 ns nach dem Laserpuls 3  $\mu\text{m}$  beträgt (siehe Bild 12). Da die verwendete Hydrogelschicht ca. 50  $\mu\text{m}$  dick ist und die Zellen sich darin homogen verteilen, werden die Zellen nicht auf Grund der thermischen Einwirkung geschädigt. Eine Schädigung der Zellen wird folglich entweder durch die prozessbedingte Dampfblase oder durch den Aufprall am Empfängerträger verursacht.

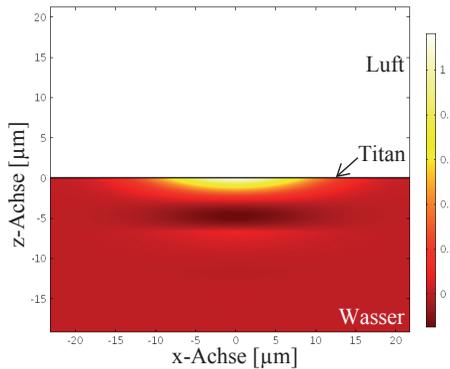


Bild 12: Modellierung der Thermischen Ausbreitung in Wasser nach 80 ns. Ein Laserfokus mit einer Fluenz von  $0,45 \text{ J/cm}^2$  (355 nm und 1 ns Pulsdauer nach 80 ns) trifft auf eine 80 nm dicke Titanschicht. Diese leitet die Wärme an eine 20  $\mu\text{m}$  dicke Wasserschicht weiter. Die maximale Wärmeeindringtiefe in das Wasser beträgt 3  $\mu\text{m}$ . Bei der Modellierung sind Schmelz- und Verdampfungsprozesse außer Acht gelassen worden, weshalb in der Realität die Wärmeeindringtiefe weit unter den hier angegebenen 3  $\mu\text{m}$  liegen wird.

### 4.2.3 Aufbau und Vorbereitung der Empfängerträger

Werden Partikel oder Zellen übertragen, so kommen  $\mu$ -Slides Angiogenesis ibiTreat ( $\mu$ -Slides, ibidi GmbH) als Empfängerträger zum Einsatz. Diese bieten den Vorteil kleiner Versuchs-Kompartimente und weisen eine geringe Doppelbrechung sowie Autofluoreszenz auf. Dadurch können sämtliche mikroskopische Analysemethoden angewandt werden. Darüber hinaus wird die sterile Kultivierung der transferierten Zellen ermöglicht. Des Weiteren sind die  $\mu$ -Slides mit einer Standardoberfläche versehen.

Hierdurch wird eine vergleichbare Oberfläche geschaffen, wie in Zellkulturflaschen, wodurch die Zelladhäsion der meisten Zelltypen ermöglicht wird (siehe Bild 13). Bei der Verwendung der  $\mu$ -Slides als Empfängerträger werden 30  $\mu\text{l}$  Hydrogel (Matrigel oder Gelatine) in die einzelnen Kammern pipettiert. Nach dem Zell-LIFT werden die jeweiligen Kammern mit 20  $\mu\text{l}$  Zellmedium überschichtet. Des Weiteren können bei Bedarf dem Zellmedium Fluoreszenzfarbstoffe Calcein AM und Propidiumiodid in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt werden. Anschließend werden die  $\mu$ -Slides bei  $37^\circ\text{C}$  mit 5 %  $\text{CO}_2$  unter humiden Bedingungen inkubiert.

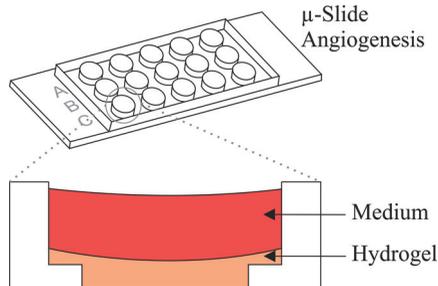


Bild 13: µ-Slides von ibidi als Empfängerträger. In das Hydrogel werden die Zellen übertragen und im Anschluss wird das Hydrogel mit Medium überschichtet.

### 4.2.4 Versuchsdurchführung LIFT

Der Abstand zwischen Transfer- und Empfängerschicht wird bei trockenen und flüssigen Proteinschichten variiert. Bei Arbeiten mit Partikeln oder Zellen ist mit einem Transfer-Empfängerträgerabstand von 2 mm gearbeitet worden.

Die Leistungsbestimmung des Lasers wird mit Hilfe eines thermischen Messkopfes (Modell S302C, Thorlabs Inc.) bei einer Laserfrequenz von 100 Hz durchgeführt.

Eine erste Abschätzung des Fokussdurchmessers wird durch den Beschuss einer fotosensitiven Folie (UBE Industries LTD.), sowie deren anschließender lichtmikroskopischer Auswertung gemacht. Dabei wird die z-Achse des LIFT-Aufbaus Schritten um je 25 µm um den Brennpunkt des Lasers verfahren. Zudem wird durch ein Kamerasystem (Spiricon, Ophir GmbH) die Intensitätsverteilung im Fokus bestimmt.

Der Laser wird mittels Neutraldichtfilter abgeschwächt. Dabei kommen unterschiedliche Filter mit optischen Dichten von 0,1 bis 0,7 zum Einsatz. Die Leistung wird nach Bedarf eingestellt. Der Transferträger und der Empfängerträger werden unter der Fokussierung positioniert. Im Anschluss wird ein Laserpuls ausgelöst und es wird eine neue Position für Transfer- und Empfängerträger angefahren. Dies wird so lange wiederholt, bis die gewünschte Anzahl an Überträgen erreicht worden ist. Die Zusammenfassung aller LIFT-Versuche ist in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Zusammenfassung aller LIFT-Experimente. Alle Versuche werden mit einem Crylas FTSS355 Laser mit 355 nm und einem Fokusbereich von 20  $\mu\text{m}$  durchgeführt. Hydrogele (Matrigel, Gelatine und Fibrin) sind, wenn im Experiment nicht anders angegeben, mit einer Schichtdicke von ca. 50  $\mu\text{m}$  übertragen worden.

Versuchsbeschreibung	Transfermaterial	Empfängermaterial
Transfer von Hydrogelen	Matrigel Gelatine	Glas + Gelatine Glas
Transfer von getrockneten Schichten	HRP (Fraunhofer IGB) GFP(Fraunhofer IGB)	Glas Glas
Transfer von flüssigen Schichten	Glycerin-Wasser-Lösung (80/20, v/v)	Glas, Fibrin (2,14 mg/ml)
Einschichtsystem: Polystyrolpartikel	Polystyrolpartikel aus Matrigel	Fibrin
Einschichtsystem: 3T3-Zellen	Matrigel Gelatine	Matrigel Matrigel
Einschichtsystem: K562 Zellen	Matrigel Gelatine	Matrigel Matrigel
Zweischichtsystem: 3T3, K562 und HUVEC-Zellen	Gelatine-Kulturmedium	Matrigel

#### 4.2.5 Kultivierung transferierter Zellen

Um transferierte Zellen in Kultur halten zu können, werden diese in die Kammern der  $\mu$ -Slides übertragen. Nach dem LIFT-Experiment werden die jeweiligen Kammern mit 20  $\mu\text{l}$  Zellmedium überschichtet. Anschließend werden die  $\mu$ -Slides bei 37°C mit 5 %  $\text{CO}_2$  unter humiden Bedingungen inkubiert. Nach 5-tägiger Inkubation werden weitere 10  $\mu\text{l}$  Kulturmedium pro Versuchskammer hinzugefügt. Die Unterseite der  $\mu$ -Slides ermöglicht dabei über eine Gaspermeable Folie den Gasaustausch.

#### 4.2.6 Analyse der Überträge

Zur Überprüfung der Vitalität werden dem Zellmedium die Fluoreszenzfarbstoffe Calcein AM (Calbiochem, Merck KG) und Propidiumiodid (Calbiochem, Merck KG) in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt.

In einer lebenden Zelle wird Calcein AM (AM = Acetoxymethylester) durch die Zellmembran in die Zelle transportiert. Die Acetoxymethylgruppe wird unspezifisch auf enzymatischem Weg durch Esterasen abgespalten. Anschließend fluoresziert das entstandene Calcein bei einer Anregung mit der Wellenlänge 495 nm.

Propidiumiodid kann perforierte Zellmembranen von toten Zellen oder beschädigten Zellen durchdringen, jedoch nicht in intakte Membran eindringen. Nach Interkalation in die DNS kann der Farbstoff mit der Wellenlänge 488 nm zur Fluoreszenz angeregt werden.

Die bildgebende Darstellung von transferierten Zellen wird mittels Phasenkontrastmikroskopie sowie durch Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Zur Bildbearbeitung wird die Software excellence RT (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH) verwendet.

### **Transferträger**

Die Transferträger werden mit einem Spiralrakel beschichtet, im Anschluss werden die Schichten mittels LSM (Keyence VK) untersucht. Um die optische Dichte der Beschichtung zu bestimmen, wurde eine 2,5 mg/ml Proteinlösung mit einem Refraktometer untersucht und die optische Dichte ermittelt. Daraus kann die Schichtdicke der eingesetzten Transferträger ermittelt werden.

### **Empfängerträger**

Zur Bestimmung der Druckgenauigkeit, in Bezug auf die Auflösung, werden die Übertragungsversuche mit Borosilikatglasobjektträger als Empfängerträger eingesetzt. Hierfür wird aus beiden Hydrogelen (5 %-ige Gelatine, sowie Matrigel) in eine Matrigel-Empfängerschicht übertragen. Die Matrigel-Empfängerschicht wird mit einem 100 µm Spiralrakel auf den Träger aufgebracht. Die einzelnen Überträge werden in einer Linie im Abstand von 300 µm auf den Empfängerträger transferiert. Anschließend werden die Überträge mittels Phasenkontrastmikroskopie dokumentiert und bezüglich ihrer Positionsgenauigkeit zueinander vermessen.

Für den Übertrag von Partikeln und Zellen wird aus dem Bildmaterial auch deren Lage im Tropfen analysiert und deren Abstrahlwinkel und Entfernung zum Tropfenzentrum ermittelt.

## 5 Konzeption und Aufbau von LIFT-Systemen

LIFT kann für unterschiedliche Anwendungen eingesetzt werden. Werden HTS aufgebaut, wie Microarrays, so ist eine möglichst kurze Herstellungszeit wichtig. Beim Aufbau von HCS hingegen wird eine möglichst exakte Positionierung von Zellen benötigt. Somit ist es wichtig, dass die Positioniergenauigkeit von Zellen ermöglicht wird. In beiden Fällen gilt, dass die Tropfen auf dem Empfängerträger auf wenige  $\mu\text{m}$  genau platziert werden müssen. Daher werden zwei LIFT-Systeme konzipiert und aufgebaut. Das eine System ermöglicht, schnell eine große Anzahl an Überträgen zu generieren (siehe Kapitel 5.1). Das andere ermöglicht eine Analyse der Transferträgerschicht und somit einen gezielten und kontrollierten Übertrag (siehe Kapitel 0). In beiden Systemen kommt ein Microchiplaser der Firma Crylas zum Einsatz, der wegen seiner Robustheit, guten Strahlqualität und somit Fokussierbarkeit und der kompakten Bauweise ausgewählt wurde (FTSS355Q-Serie).

### 5.1 Aufbau eines Hochgeschwindigkeits-LIFT-Systems

#### **Anforderungen**

Es wird eine Anlage aufgebaut, mit der es möglich ist, schnell viele gleiche Überträge auf einem Empfängerträger zu platzieren. Um Microarrays mittel LIFT herzustellen, müssen gezielt entweder flüssige oder feste Proteine auf einem Empfängerträger, respektive Microarraychip, übertragen werden.

#### **Umsetzung**

Aus dieser Anforderung wird abgeleitet, dass die Laserstrahlung mittels eines Galvanometrischen Scanners auf den Transferträger gelenkt wird. Dabei wird das System so ausgelegt, dass man mit bis zu 2,5 kHz Überträge herstellen kann. Dauert die Herstellung eines Proteinmicroarrays mit einem herkömmlichen Microarrayploter bisher bis zu einem Tag, kann es mittels des neuen Systems innerhalb von einer Stunde erfolgen. Eine Kamerabeobachtung kann entweder koaxial oder auch neben der Bearbeitungsoptik erfolgen. Zusätzlich ist es möglich, den Transferträger einfach auszutauschen, um auch unterschiedliche Materialien übertragen zu können.

Die Fokussierung erfolgt mittels telezentrischer Fokussieroptik. Zusätzlich werden eine Abschwächung und ein Teleskop für die Strahlaufweitung in den Strahlengang integriert um den Prozess zu kontrollieren. Durch den Einsatz einer telezentrischen Optik mit 100 mm Brennweite (Sill, Deutschland) unter einem Scanner ist es möglich 100 mm x 100 mm zu bearbeiten. Da ein Standard-Mikroskopie-Objektträger die Abmaße 25 mm x 76 mm aufweist, können bis zu 3 Transferträger mit unterschiedlichen Transferschichten auf einmal für den Transfer eingesetzt werden. Um unterschiedliche Empfängerträger anfahren zu können, ist das Scanner-Transferträger-System über ein 3-Achssystem zu bewegen (siehe Bild 14).

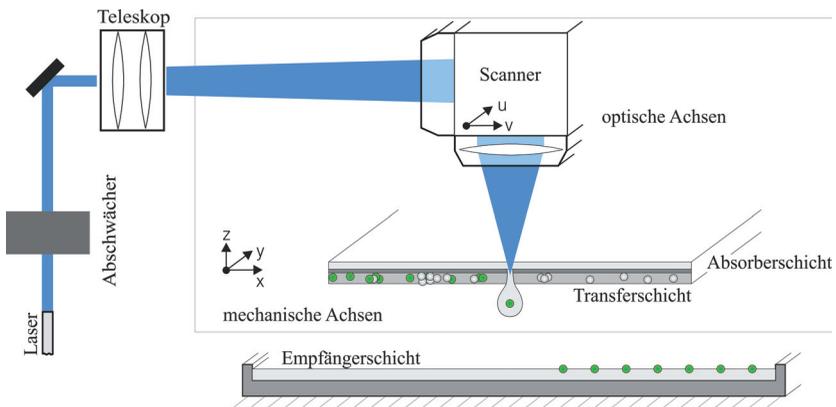


Bild 14: Schematischer Aufbau für eine HTS Anwendung von LIFT mit Scanner für die Herstellung von Microarrays.

Für die Lasersicherheit ist die Strahlführung gekapselt und ausschließlich im Bearbeitungsbereich frei geführt. Zusätzlich ist eine Einhausung vorgesehen, die mit einem Interlock versehen ist, sodass keine Verletzungsrisiken bestehen und eine Sicherheitsklasse 1 erreicht werden kann (siehe Bild 15).

Diese Forschungsarbeit demonstriert in Kapitel 6.1.2 und 0, dass sich mit einfachen Mitteln und in kurzer Zeit vollfunktionsfähige Hochdurchsatz *in vitro* Testsysteme auf Basis der fortschrittlichen LIFT-Technologie aufbauen lassen.

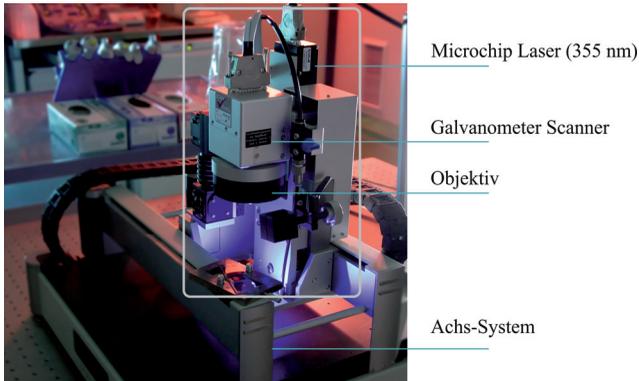


Bild 15: Anlagenumsetzung für eine HTS Anwendung mit dem LIFT-Verfahren: ProtOPrinter.<sup>71</sup>

### 5.2 Aufbau eines Festoptik basierten LIFT-Systems

#### Anforderungen

Ziel ist es, eine Anlage aufzubauen, mit der hoch präzise einzelne Partikel, Pigmente und Zellen mit hoher Genauigkeit übertragen werden können. Um eine möglichst modulare Aufbauweise zu gewährleisten, sind kompatible Schnittstellen zu Mikroskopoptiken ausgewählt worden (RMS-Gewinde). Dadurch können für Beobachtung der Transferschicht und für die Bearbeitung beispielsweise auch unterschiedliche Objektive im System eingesetzt werden. Durch eine koaxiale Beobachtung im Durchlicht, kann auch durch eine dünne metallische Absorberschicht beobachtet werden. Dadurch wird es möglich, Zellen in der Trägerschicht zu identifizieren und beliebig auf einem Empfängerträger zu platzieren. Zudem ist es wichtig, dass Transfer- und Empfängerträger unabhängig voneinander bewegt werden können. Dies ermöglicht es, dass beispielsweise unterschiedliche Partikel auf einem Transferträger aufgetragen werden können und diese mit der LIFT-Anlage auf dem Empfängerträger sortiert werden können (siehe Bild 16).

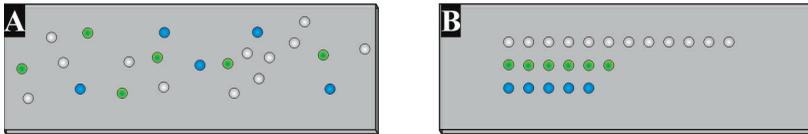


Bild 16: Funktionsweise der LIFT-Anlage zum Transfer einzelner unterschiedlicher Pigmente. **A:** unsortierte Partikel oder Zellen auf dem Transferträger. **B:** Sortierte Partikel oder Zellen auf dem Empfängerträger.

### Umsetzung

Die Analytik der Transferträgerschicht kann durch den Einsatz einer Durchlichtbeleuchtungs-LED und einer Kamera realisiert werden. Mittels eines X-Y-Achsenpaares für jeweils Transfer- und Empfängerträger lassen sich einzelne Zellen gezielt auswählen und platzieren. Als Optik können beliebige Linsen oder auch Mikroskopobjektive eingesetzt werden. Diese werden ebenfalls durch eine Achse verfahren, wodurch sich der Laserfokus auf den Transferträger einstellen lässt.

Um den Abstand zwischen Transferträger und Empfängerträger einstellen zu können wird ein manueller Mikrometertisch integriert, der es einem erlaubt, den Abstand zwischen Transferträger und Empfängerträger einzustellen (siehe Bild 17 und Bild 18). Durch eine SPS-Schnittstelle ist es möglich, dass die Achsen programmierbar sind und das System kann mit einer Automatischen Bilderkennung ausgestattet werden. Dadurch kann mit dem System, bei entsprechender Eingabe der Parameter, automatisch ein Zellmuster generiert werden.

Mit diesem Aufbau können mittels Durchlichtbeleuchtung Partikel oder Zellen in der Transferschicht detektiert werden. Dadurch ist die gezielte Untersuchung des LIFT-Prozesses auf das Übertragungsverhalten möglich. Ergebnisse mit diesem Aufbau sind in Kapitel 6.1.1 und 6.2 dargestellt.

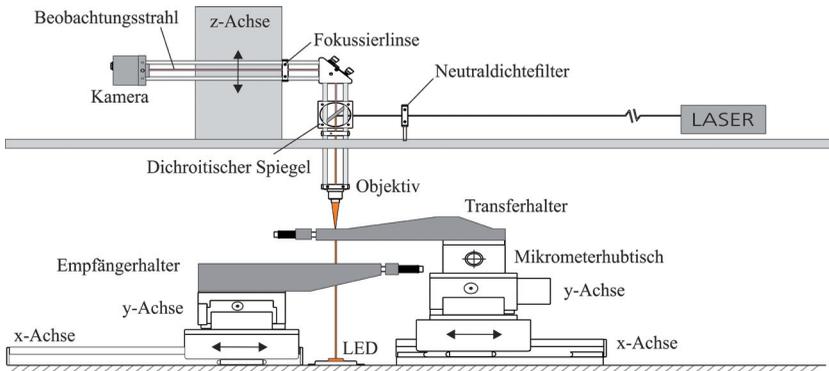


Bild 17: Schematischer Aufbau des LIFT-Systems (LIFTSYS™). Der Laser, die Strahlformungsoptiken und die z-Achse (oben) sind über dem Bearbeitungsraum (unten) angeordnet. Der Beobachtungs- und Bearbeitungsstrahlengang verlaufen koaxial.<sup>72</sup>



Bild 18: LIFTSYS™-Anlage. In der Anlage sind fünf Linearachsen eingebaut, die über eine SPS-Schnittstelle gesteuert werden können. Zusätzlich können Laserpulse einzeln ausgelöst und die Laserleistung über Neutraldichtefilter abgeschwächt werden. Die Anlage ist nach Sicherheitsstandards konzipiert, so dass sie mit Laserschutzklasse 1 betrieben werden kann (Abmaße: 1080 mm x 850 mm x 800 mm).



## 6 Ergebnisse der LIFT-Versuche

Das LIFT-Verfahren wird eingesetzt, um unterschiedliche biologische Materialien zu übertragen. Dabei wird in Kapitel 6.1 der Übertrag von Proteinen in wässriger Lösung und in getrockneter Form untersucht. Die Proteine müssen nach dem Übertrag funktional sein, so dass sich das Verfahren somit für Anwendungen zum Herstellen von Microarrays einsetzen lässt. In Kapitel 6.2 werden Zellen übertragen, die in Hydrogelen eingebettet sind und die Übertragungseigenschaften untersucht. Dies sind zum einen die Reproduzierbarkeit des Übertrags mit einer kontrollierten Anzahl an übertragenen Zellen, zum anderen die Vitalität und Proliferation der Zellen nach dem Übertrag.

### 6.1 Übertrag von Proteinen

Der Übertrag von Proteinen stellt eine wichtige Aufgabe in der Herstellung von Microarrays dar. Daher werden die Möglichkeiten zum Übertragen von Proteinen mittels der in Kapitel 5 beschriebenen LIFT-Aufbauten untersucht. In Kapitel 6.1.1, 6.1.1.3 und 6.1.2 wird beschrieben, wie Proteine in einer Lösung übertragen werden, in Kapitel 0 wird gezeigt wie sich der Übertrag verhält, wenn Proteine in getrockneter Form auf dem Empfängerträger aufgebracht werden. Für alle Experimente wird ein Crylas FTSS355-Q3 eingesetzt mit 1 ns Pulsdauer und einer Wellenlänge von 355 nm. Der Fokusbereich beträgt 20  $\mu\text{m}$ .

#### 6.1.1 Prozessfenster für den Transfer von Hydrogelen

Um das Prozessfenster zu bestimmen, muss der Mikrostrahlbereich für die jeweilige Schicht bestimmt werden.

Dafür wird eine Matrigel-Transferschicht (Kapitel 6.1.1.1) und eine Gelatine-Transferschicht (Kapitel 6.1.1.2) übertragen. Als Empfängerschicht kommen ebenfalls sowohl Matrigel als auch Gelatine zum Einsatz. Der Einsatz unterschiedlicher Hydrogele als Transfer- und Empfängerschicht ist notwendig, da die übertragenen Hydrogele auf

Grund desselben Brechungsindex sonst nicht mittels Phasenkontrastmikroskopie unterscheidbar sind.

### 6.1.1.1 Matrigel-Transfer auf unbeschichtete Glasobjektträger und Gelatine

Es werden für alle Experimente die Spiralrakel mit Drahtgrößen 50  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  und 100  $\mu\text{m}$  eingesetzt. Dadurch können für alle Experimente ähnliche Schichtdicken erzeugt werden. Für Matrigel wird die Schichtdicke mittels LSM bestimmt (siehe Anhang).

Die durch Spiralrakel aufgetragene Schicht der Hydrogele ist über den gesamten Objektträger nicht homogen. Im zentralen Bereich der Objektträger ist die Schichtdicke konstant. In den Randbereichen des Objektträgers nimmt die Schichtdicke zu. Das Hydrogel bildet eine Wulst über den Glasobjektträger aus. Die Schichtdicke ist daher am Rand der Objektträger bis zu 80 % erhöht. Deshalb wird ein Übertrag nur aus dem Zentralbereich des Transferträgers fokussiert (siehe Tabelle 4, Beispielhafte Schichtdickenmessung im Anhang).

Über ein Refraktometer wird die optische Dichte von Matrigel als 1,339 bestimmt. Wird diese mit den optischen Schichtdicken multipliziert, so ergeben sich die realen Schichtdicken von  $27,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$  bis zu  $54,5 \pm 2,9 \mu\text{m}$ .

Für Schichtdicken von 54,5  $\mu\text{m}$  liegt die untere Schwellfluenz bei  $F_{\min} < 0,79 \text{ J/cm}^2$ . Für die Matrigel-Transferschicht finden Überträge im Mikrostrahlbereich  $F = 0,79 \text{ J/cm}^2$  bis  $2,50 \text{ J/cm}^2$  statt. Oberhalb der Schwellfluenz von  $F_{\max} = 2,5 \text{ J/cm}^2$  beginnt die Satellitentropfenbildung und somit der Streubereich. Für kleinere Schichtdicken (50  $\mu\text{m}$  und 75  $\mu\text{m}$  Rakel) beginnt der Mikrostrahlbereich bereits bei  $0,45 \text{ J/cm}^2$  (siehe Bild 19).

Tabelle 4: Mittels LSM gemessene Schichtdicke von Matrigel auf Objektträgern durch unterschiedliche Spiralrakel

Drahtgröße des Spiralrakel [ $\mu\text{m}$ ]	Matrigel Filmdicke [ $\mu\text{m}$ ]	
	Mitte	Rand
50	$27,6 \pm 0,3$	$41,1 \pm 3,7$
75	$43,55 \pm 1,6$	$40,6 \pm 1,7$
100	$54,5 \pm 2,9$	$54,7 \pm 2,4$

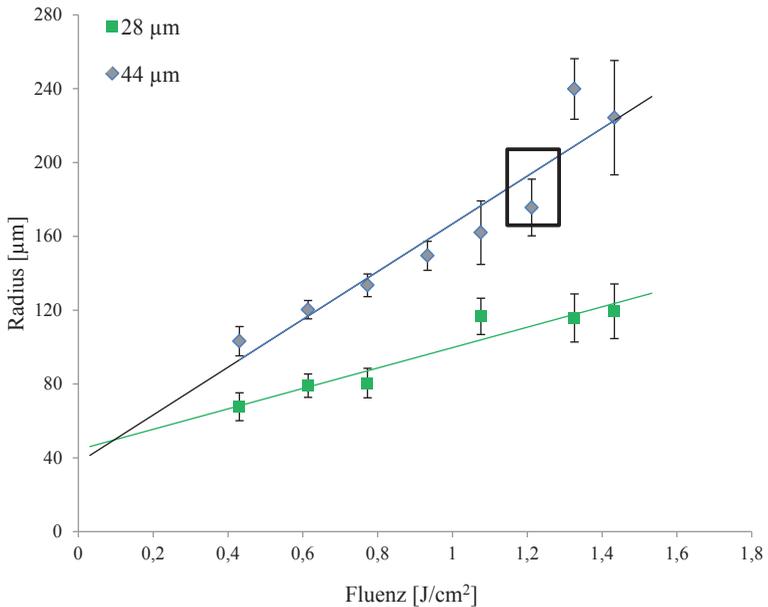


Bild 19: Messung der Tropfengröße von Matrigel für verschiedene Schichtdicken. Der mit einem Kasten markierte Energiewert ist in Bild 20A dargestellt ( $n = 50$ ).

In Bild 20 sind zwei Überträge im Mikrostrahlbereich bei  $F 1,25 \text{ J/cm}^2$  gezeigt. Zusätzlich wird auch ein Übertrag aus dem Streubereich mit  $F 3,15 \text{ J/cm}^2$  gezeigt, bei dem keine klar abgegrenzten Tropfen beobachtet werden können. Die Dampfblase expandiert stark und dadurch wird die Transferschicht auseinander gerissen. In Folge dessen werden zahlreiche kleinere Tropfen der Transferschicht auf den Empfängerträger gesprenkelt. (siehe Bild 20 unten). Diese Werte stimmen mit den Literaturwerten überein (siehe Anhang).

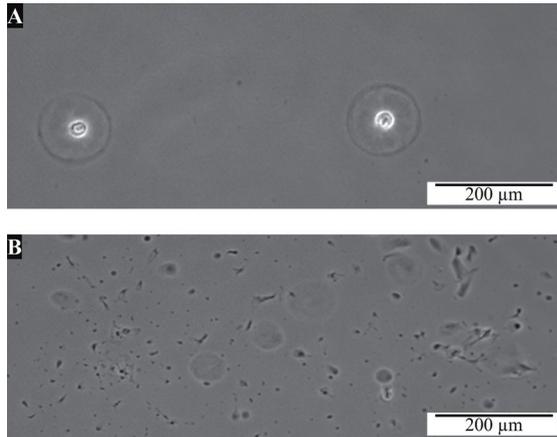


Bild 20: Matrigel-Überträge im Mikrostrahl- und Streubereich bei einer 44  $\mu\text{m}$  dicken Schicht. **A:** Matrigel-Überträge auf Gelatine im Mikrostrahlbereich bei einer Leistung mit  $F$  von  $1,25 \text{ J/cm}^2$ . **B:** Matrigel-Überträge auf Gelatine bei einer Leistung mit  $F > F_{\text{max}}$  von  $3,15 \text{ J/cm}^2$ .

### 6.1.1.2 Gelatine-Transfer auf eine Matrigelschicht

Gelatine ist, wie Matrigel, ein thermosensitives Hydrogel, das bei Raumtemperatur geliert und ab  $30^\circ\text{C}$  flüssig wird. Dabei spielt die Gelatinekonzentration für das Gel eine entscheidende Rolle. In den LIFT-Überträgen wird stets eine 5 %-ige Gelatine-Lösung mit einer  $43 \mu\text{m}$  dicken Schicht aufgetragen. Dabei kann  $F_{\text{min}}$  bei  $1,99 \text{ J/cm}^2$  bestimmt werden.  $F_{\text{max}}$  kann mit dem eingesetzten System nicht bestimmt werden, da bei maximal verfügbarer Leistung noch der Mikrostrahlbereich vorliegt (siehe Bild 21).

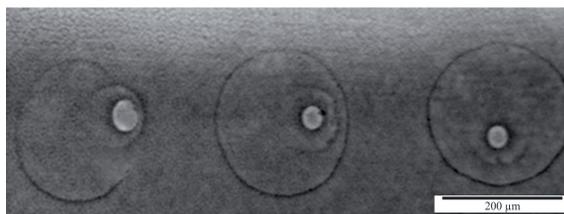


Bild 21: Gelatine-Überträge auf Matrigel im Mikrostrahlbereich bei der maximal einsetzbaren Fluenz von  $3,96 \text{ J/cm}^2$ .

Daraus ergibt sich, dass für Gelatine der Arbeitsbereich ab  $1,99 \text{ J/cm}^2$  beginnt. Aufgrund des experimentellen Aufbaus und der darin verwandten Laserstrahlquelle kann mit diesem System für Gelatine kein Streubereich bestimmt werden, da ausreichend hohe Fluenzen nicht erreicht werden können.

### **6.1.1.3 Bestimmung der Positioniergenauigkeit der Matrigel- und Gelatine-Überträge**

Um die Präzision des Übertrags bezüglich der Druckgenauigkeit zu bestimmen, mit der ein Übertrag durchgeführt werden kann, werden die Abstände von Hydrogelüberträgen mit Hilfe der excellence RT Software (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH) mikroskopisch vermessen. Dabei werden Überträge von 5 %-iger Gelatine sowie Matrigel auf mit Matrigel beschichteten Borosilikatglasobjektträgern bezüglich ihres Abstands zueinander untersucht. Der Abstand der Überträge auf dem Empfängerträger liegt bei  $300 \mu\text{m}$ . Es werden alle Überträge des Mikrostrahlbereichs von 5 %-iger Gelatine sowie Matrigel vom Tropfenmittelpunkt aus vermessen.

### **Positioniergenauigkeit beim Transfer von Gelatine**

Für den Transfer aus einer Gelatine-Transferschicht wird aus den erhobenen Daten ersichtlich, dass für alle Überträge, unabhängig von der Fluenz, eine hohe Präzision des Übertrags beobachtet werden kann (siehe Bild 22). Die Standardabweichung vom angestrebten Transferabstand von  $300 \mu\text{m}$  bei der niedrigsten eingesetzten Fluenz liegt bei 10 %. Mit steigender Fluenz nimmt die Standardabweichung auf 2 % ab. Daraus folgt, dass die Präzision, mit der Biomaterialien übertragen werden können, mit steigender Fluenz zunimmt. Daher ist für eine hohe Positioniergenauigkeit für den Mikrostrahlbereich des Gelatine-transfers eine hohe Laserleistung von Vorteil. Weitere Aussagen zur Positioniergenauigkeit in Bezug auf die obere Schwellenfluenz  $F_{\text{max}}$  können für die verwendete Gelatine-Transferschicht nicht getroffen werden, da der experimentelle Aufbau keine höheren Leistungen zulässt.

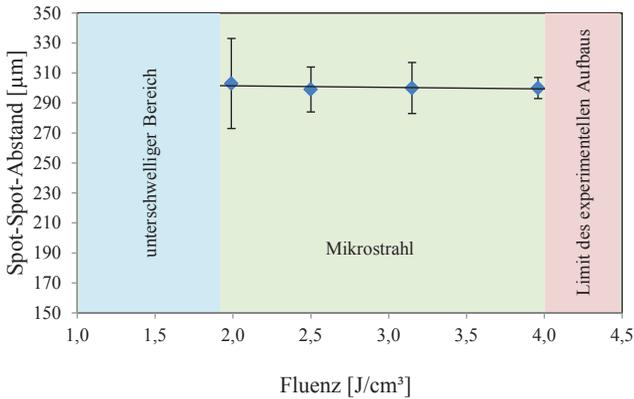


Bild 22: Positioniergenauigkeit des Gelatine-Transfer (n = 30). Mit zunehmender Leistung nimmt die Standardabweichung ab. Somit werden die Tropfen reproduzierbarer positioniert.

### Positioniergenauigkeit beim Transfer von Matrigel

Die Transferversuche aus einer Matrigel-Transferschicht zeigen, dass der voreingestellte Transferabstand von 300 µm im Mittel eingehalten werden kann. Die Standardabweichung vom angestrebten Transferabstand ist bei einer mittleren Fluenz von 1,58 J/cm<sup>2</sup> mit 4 % am geringsten. Sowohl bei Leistungen hin zum unteren Schwellenwert  $F_{\min}$ , als auch zum oberen Schwellenwert  $F_{\max}$ , nimmt die Standardabweichung auf 10 % beziehungsweise 12 % vom angestrebten Transferabstand zu. Somit liegt die Fluenz mit der die höchste Präzision für den Übertrag von Biomaterialien erreicht werden kann im mittleren Bereich des Mikrostrahlbereichs der übertragenen Matrigel-Transferschicht (siehe Bild 23).

### Vergleich der Positioniergenauigkeit von Gelatine und Matrigel

Die Ergebnisse der Hydrogelüberträge von Gelatine und Matrigel zeigen, dass für beide Transferschichten der voreingestellte Transferabstand von 300 µm mit einer Standardabweichung von bis zu 2 % beziehungsweise 4 % eingehalten werden kann.

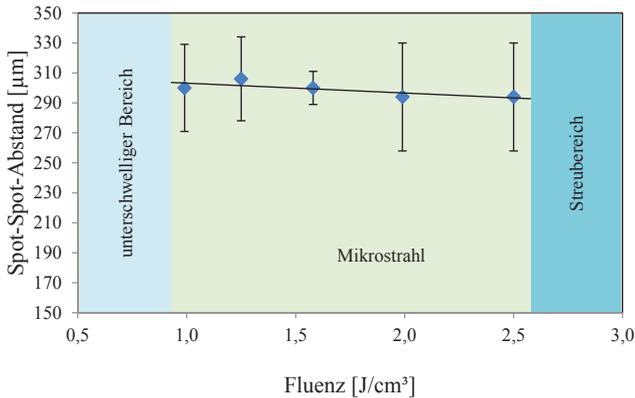


Bild 23: Positioniergenauigkeit des Matrigel-Transfer (n = 30). Bei einer Fluenz von  $1,58 \text{ J/cm}^2$  ist die Standardabweichung am geringsten und die Positioniergenauigkeit am besten.

Die Resultate des Matrigel-Transfers verdeutlichen, dass in der Mitte des Prozessfensters für den Übertrag im Mikrostrahlbereich mit der größten Positioniergenauigkeit gearbeitet werden kann. Der ausgebildete Mikrostrahl scheint in diesem Fluenzbereich stabiler zu sein als bei höheren oder niedrigeren Fluenzen. Da das Prozessfenster des Mikrostrahlbereichs für den Gelatine-Transfer, auf Grund der limitierten Leistung des Lasers nicht vollständig charakterisiert werden kann, ist es nicht möglich, diese Beobachtung für den Gelatine-Transfer zu überprüfen. Die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der hohen Positioniergenauigkeit mit einer Standardabweichung von lediglich 2 % für den Gelatinetransfer deuten jedoch ebenfalls darauf hin, dass bei der vorliegenden Fluenz von  $3,96 \text{ J/cm}^2$  ein stabiler Mikrostrahl ausgebildet wird.

Allgemein zeigen die gefundenen Ergebnisse, dass es im Mikrostrahlbereich ein Optimum für die Positioniergenauigkeit in Abhängigkeit der Fluenz gibt. Wenn hohe Fluenzen eingesetzt werden, dann wird die Dampfblasenbildung im Verhältnis zur übertragenen Flüssigkeitsmenge sehr groß. Vermutlich ist der daraus gebildete Mikrostrahl nicht so stabil wie aus den mittleren Bereichen des Prozessfensters. Ähnlich gilt für kleine Fluenzen, dass die Dampfblase gerade so ausreicht um einen Jet auszulösen und somit noch nicht die beste Stabilität gewährleistet werden kann.

### Vergleich des Übertrags von Gelatine und Matrigel

Die Matrigel-Transferschicht wird mit einer 53 µm dicken Schicht auf die Titan-Absorberschicht aufgebracht. Die Gelatine-Transferschicht wird durch eine 43 µm dicke Schicht auf die Absorberschicht aufgetragen. Für Gelatine muss eine dünnere Schicht eingesetzt werden, da sich das Material bei dickeren Schichtdicken nicht übertragen lässt. Trotz der größeren Schichtdicke des eingesetzten Matrigels, kann dieses bei geringeren Fluenzen im Mikrostrahlbereich übertragen werden. Wird Matrigel mit einer 43 µm dicken Schicht eingesetzt, so beginnt der Mikrostrahlbereich sogar bei 0,45 J/cm<sup>2</sup>. Da die Viskosität der 5 %-igen Gelatine im Vergleich zum Matrigel höher ist, werden höhere Fluenzen benötigt, um einen Übertrag im Mikrostrahlbereich zu erzeugen. Um die Gelatine bei niedrigeren Fluenzen zu übertragen, müssten geringere Schichtdicken eingesetzt werden oder die Viskosität des Gels durch eine weitere Verdünnung verringert werden. Dünnere Schichtdicken sind jedoch schneller von Austrocknung betroffen. Dies hat den Nachteil, dass sich das Zeitfenster für die Durchführung der LIFT-Prozesse von einer Stunde auf 30 Minuten halbiert.

Für beide Hydrogele gilt, dass mit steigender Fluenz auch der Durchmesser der Hydrogeltropfen zunimmt. Gelatine ist als Transferschicht interessant, da es bei 37°C wieder flüssig wird und im Rahmen der Inkubation durch einen des Kulturmediums aus dem Gel entfernt werden kann.

In Tabelle 5 sind die Mikrostrahlbereiche von Gelatine und Matrigel in einer Übersicht dargestellt.

Tabelle 5: Mikrostrahlbereiche für 5 %-ige Gelatine bei 43 µm Schicht und Matrigel bei 54,5 µm Schicht.

Fluenz [J/cm <sup>2</sup> ]	0,45	0,79	1	1,25	1,58	2,0	2,5	3,15	3,96
Gelatine									
Matrigel									

### 6.1.2 Übertrag von fluiden Schichten

Versuche mit fluiden Schichten werden auf Glastransferträgern mit einer Titanbeschichtung von 80 nm Schichtdicke durchgeführt. Dabei wird die Reproduzierbarkeit eines einfachen Aufbaus zum Übertragen von Tropfen auf einem Empfängerträger gezeigt. Eine Voraussetzung sind reproduzierbare, homogene Schichten auf dem Transferträger.

Für Untersuchungen wird eine 80 %-ige Glycerin/Wasser-Lösung (v/v) eingesetzt. Dieser können noch Proteine zugesetzt werden. Im Gegensatz zu eingesetzten hoch-konzentrierten Proteinlösungen oder auch Hydrogelen lassen sich in diesem Fall teure Proteine in geringen Konzentrationen auf definierte Flächen übertragen.

Bei dem Einsatz wässriger Transferschichten ist zu beobachten, dass diese schnell austrocknen. Insbesondere der Zusatz von Glycerin in der Transferschicht verhindert dies und lässt ein Arbeiten über einen Zeitraum von Tagen mit den Transferträgern zu. Die Transferträgervorbereitung erfolgt wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben.

Für wässrige Proteinlösungen werden folgende Parameter untersucht:

- Fluenz
- Kontaktwinkelabhängigkeit vom Empfängerträger

Bei zunehmender Fluenz werden die übertragenen Tropfen größer. Dies stimmt mit den Literaturwerten überein. Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf das Druckverhalten ist die Empfängerschicht. Werden beispielsweise unterschiedliche Gläser mit bekannten Kontaktwinkeln verwendet, so kann der Einfluss des Substrates bei diesem Verfahren ausschlaggebend für die Tropfenform sein. Wird ein hydrophiles Substrat (z.B. Glas) eingesetzt ist der Tropfen, bei gleichen Übertragsparametern, größer als bei einem hydrophoberen Material (NexterionE, siehe Bild 24).

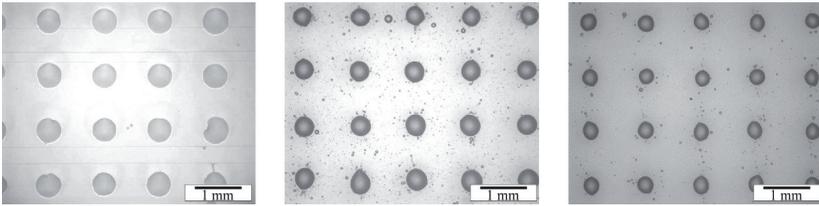


Bild 24: Tropfengröße von 80 % Glycerin-Wasser-Lösungen auf unterschiedlichen Oberflächen. A: Glasobjektträger, ca. 250  $\mu\text{m}$  (Menzel, Kontaktwinkel:  $50^\circ \pm 3,5^\circ$ ). B: NextionE Objektträger ca. 200  $\mu\text{m}$  (Schott, Kontaktwinkel:  $54,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ). C: Nitrozellulose-Objektträger, ca. 150  $\mu\text{m}$  (NMI, Reutlingen, Kontaktwinkel:  $61,6^\circ \pm 4^\circ$ ).

### 6.1.3 Übertrag von trockenen Schichten

Für den Übertrag von Proteinen in getrockneten Schichten sind mehrere Einflussgrößen für die entstehenden Spotgrößen bekannt:

- Schichtdicke
- Zusammensetzung der Schicht
- Abstand des Transferträgers zu der Empfängerschicht

Die Herstellung von homogenen Schichten für getrocknete Proteine ist in Kapitel 4.2.4 dargestellt. Die in diesem Fall gezeigten Ergebnisse sind mit Meerrettichperoxidase (HRP) erzielt. Nach einer erfolgreichen Übertragung wird die Funktionalität von HRP durch die Reduktion von Silbernitrat nachgewiesen (siehe Bild 25). Auch GFP (Green Fluorescence Protein) wird funktional übertragen.<sup>73</sup>

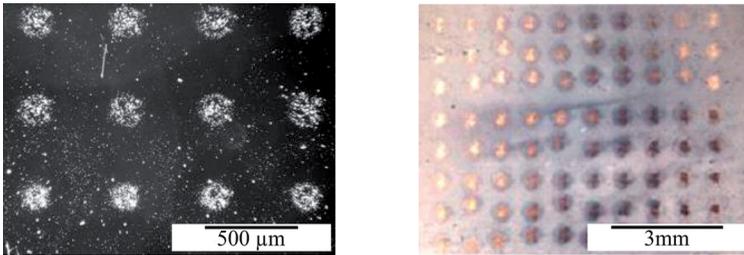


Bild 25: Übertragene Proteine. Meerrettichperoxidase (HRP). **A:** Dunkelfeldaufnahme nach dem Übertrag. **B:** Nachweis der enzymatischen Aktivität von HRP nach dem Übertrag durch Silbernitrat.<sup>74</sup>

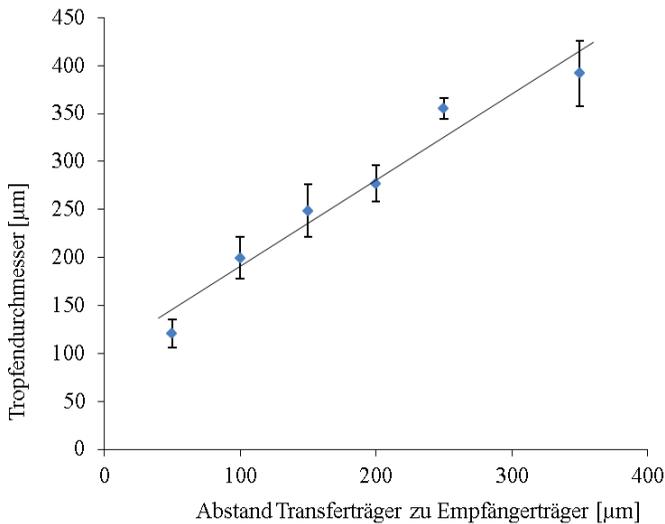


Bild 26: Lineares Wachstum des Spotdurchmessers bei Vergrößerung des Abstands zwischen Transferträger und Empfängerträger und Empfängerträger.

Der Einfluss des Abstandes zwischen Transferträger und Empfängerträger ist beim Transfer von getrockneten Schichten ausschlaggebend. Je näher Transferträger und Empfängerträger zusammengeführt werden, desto kleiner ist der Spot, der auf dem Substrat abgebildet wird. Dabei kann die Proteinmenge von einem 100 μm Bereich bis auf einen 400 μm Bereich im Durchmesser verteilt werden (siehe Bild 26).

### **6.1.4 Zusammenfassung des Übertrags von Proteinen**

Die Tropfengröße auf dem Empfängerträger wird zum einen von der eingesetzten Fluenz und zum anderen von der Oberflächeneigenschaft des Empfängerträgers beeinflusst. Werden unterschiedliche Gläser eingesetzt, kann bei gleichbleibender Fluenz die Tropfengröße um den Faktor 1,6 variiert werden. Je nach zu übertragenem Material und Empfängerträger lassen sich Tropfen von 10  $\mu\text{m}$  bis zu 400  $\mu\text{m}$  Durchmesser herstellen.

Für die Anforderung der Herstellung von HTS-Microarrays müssen viele Proteinspots erzeugt werden. Folglich wird für die Auslegung des LIFT-Systems ein galvanometrischer Scanner eingesetzt. Dabei eignet sich das Verfahren um schnell und einfach eine große Anzahl an Tropfen zu übertragen. Die reproduzierbaren Überträge können eingesetzt werden, um gezielt Microarrays herzustellen. Hierdurch ist gezeigt worden, dass mittels Scannertechnologie ein Druckvorgang im kHz-Bereich realisierbar ist und dadurch schnell große Mengen übertragen werden können. Dadurch kann mit dieser Technologie eine sehr große Varianz übertragen werden. Für den verwandten Prozess des Inkjet-Drucks können Tinten mit der dynamischen Viskosität zwischen 0,1 Pa·s und 2 Pa·s eingesetzt werden. Zusätzlich können bei diesem Prozess auch noch die Druckköpfe verstopfen.<sup>75</sup> Somit ist das LIFT-Verfahren für den Übertrag von Proteine variabler einsetzbar.

## **6.2 Übertrag von Zellen**

Für den Aufbau von High Content Screening Testsystemen ist eine genaue Platzierung von Zellen wichtig. Insbesondere die Möglichkeit einzelne Zellen zu positionieren kann zur Entwicklung neuartiger Testsysteme führen. Daher wird im Folgenden untersucht, wie sich LIFT dazu eignet, einzelne Partikel und auch Zellen zu übertragen. Die Partikel dienen dazu, die prinzipielle Eignung des Verfahrens für den gezielten Übertrag einzelner Objekte zu demonstrieren und den Übertrag zu charakterisieren. Im Anschluss werden unterschiedliche Zelltypen, 3T3-Zellen und K562-Zellen, übertragen.

Um Zellen übertragen zu können, müssen diese in einem Hydrogel eingebettet übertragen werden. Zunächst werden Silicat- und Polystyrol-Partikel übertragen, um die Möglichkeiten des Systems für Zellen in Bezug auf Einzelpartikel-Übertrag und Positioniergenauigkeit der Partikel zu untersuchen (siehe Kapitel 6.2.1). Danach werden Zellen in einem einschichtigen System (siehe Kapitel 6.2.2.1) und in einem zweischichtigen System übertra-

gen (siehe Kapitel 6.2.2.2) und die Zellvitalität nach dem Übertrag nachgewiesen (siehe Kapitel 6.2.2.4). Zuletzt wird demonstriert, dass mittels LIFT gezielt Muster aus Zellen aufgebaut werden können (siehe Kapitel 6.2.2.5).

### **6.2.1 Parameter-Untersuchung mittels Übertrag von Polystyrol-Partikeln**

Mit dem Übertrag von Partikeln wird gezeigt, dass mit dem in Kapitel 0 beschriebenen Aufbau mit Durchlichtbeobachtung LIFT die Möglichkeit bietet, gezielt einzelne Objekte aus der Transferschicht anzuvisieren und im Anschluss zu übertragen. In diesem Kapitel wird die Positioniergenauigkeit des LIFT-Verfahrens für Polystyrolpartikel untersucht.

#### **6.2.1.1 Polystyrol-Partikel-Untersuchungen mit einer gaußförmigen Intensitätsverteilung**

Grundsätzlich wird im Rahmen dieser Arbeit mittels des LIFT-Verfahrens ein qualifizierter Übertrag für einzelne eukaryotischen Zellen entwickelt. Diese haben eine Dichte von  $1,03 \text{ g/cm}^3$ . Da Polystyrolpartikel ebenfalls eine Dichte von  $1,03 \text{ g/cm}^3$  aufweisen, werden die grundlegenden Übertragungsversuche anhand von Partikeln durchgeführt. Somit kann mit den Partikeln das Transferverhalten von Hydrogelen untersucht werden, um einzelne Partikel zu übertragen. Die Parameter werden im Anschluss auf den Übertrag von Zellen übertragen.

Bei allen Versuchen wird die Transferschicht, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, vorbereitet und auf dem Empfängerträger ein Gel aufgetragen. Bei den Experimenten kann entweder kein, ein oder mehrere Partikel pro Übertrag auf dem Empfängerträger ankommen (siehe Bild 27).

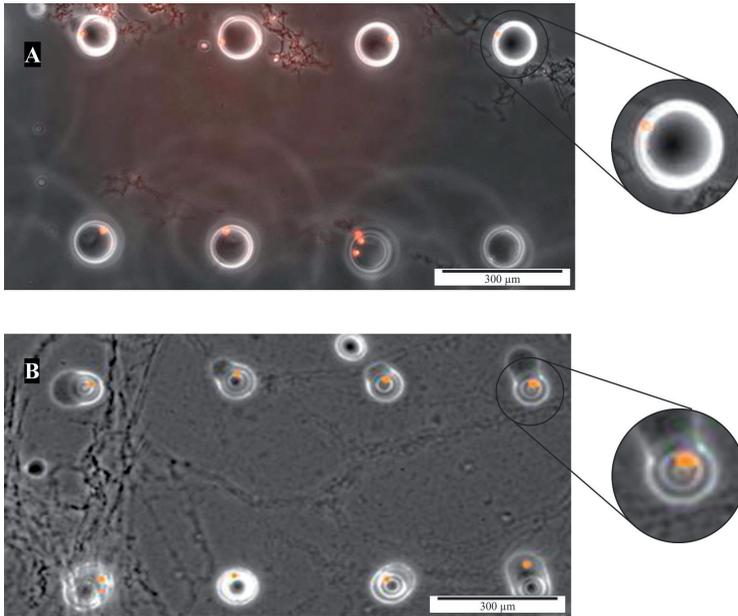


Bild 27: Fluoreszenzaufnahme übertragener Polystyrol-Partikel. **A:** Spots ohne Partikel, mit mehreren Partikeln oder auch einem Partikel. Fluenz:  $1,7 \text{ J/cm}^2$ . **B:** Pro Spot wird ein Partikel übertragen. Fluenz:  $0,9 \text{ J/cm}^2$ .<sup>76</sup>

Wird die Fluenz erhöht, so werden auch die entstehenden Tropfen auf dem Empfängerträger größer. Die Partikel sind in die Matrigel-Schicht eingebettet. Bei geringen Fluenzen wird oft nur Hydrogel ohne Partikel übertragen. Sobald sich die Ausbildung des Mikrostrahlbereichs in der Mitte des Prozessfensters befindet, so kann mit einer Wahrscheinlichkeit von über 70 % ein Einzel-Partikeltransfer erreicht werden. In ca. 15 % der Fälle werden keine Partikel oder zwei Partikel in einem Spot übertragen. Bei höheren Fluenzen nimmt die Zahl der Einzelpartikel-Spots ab und es werden häufiger zwei bis drei Partikel übertragen (siehe Bild 28).

Wird der Abstand der Partikel zum Spotzentrum untersucht, so wird über alle Leistungen gemittelt festgestellt, dass ca. 10 % der Partikel in einem Abstand von  $10 \mu\text{m}$  vom Spotmittelpunkt aufzufinden sind. 50 % befinden sich in einem Abstand von  $20 \mu\text{m}$ , weitere

40 % in einem Abstand von 50  $\mu\text{m}$  zum Zentrum. Wird dies mit der Tropfengröße korreliert, so kann festgestellt werden, dass die Partikel mit ca. 95 % Anteil im Tropfen liegen und ca. 5 % der Partikel außerhalb des Tropfens aufzufinden sind (siehe Bild 29).

Bei einer Unterscheidung der Lage der Partikel auf die eingesetzte Fluenz wird beobachtet, dass bei kleinen Fluenzen im Mikrostrahlbereich die Partikel weit vom Spotzentrum vorliegen können. Manche Partikel sind weiter als 50  $\mu\text{m}$  vom zugehörigen Tropfen entfernt. Für höhere Fluenzen stabilisiert sich der Mikrostrahl und somit auch der Abstand des Partikels zum Spotcenter. Bis zu einer Fluenz von 1,21  $\text{J}/\text{cm}^2$  sind die Partikel in 60 % der Überträge max. 20  $\mu\text{m}$  und mit 90 % max. 30  $\mu\text{m}$  vom Spotzentrum entfernt. Bei höheren Fluenzen wird der Abstand der Partikel zum Spotzentrum wieder größer (Bild 30).

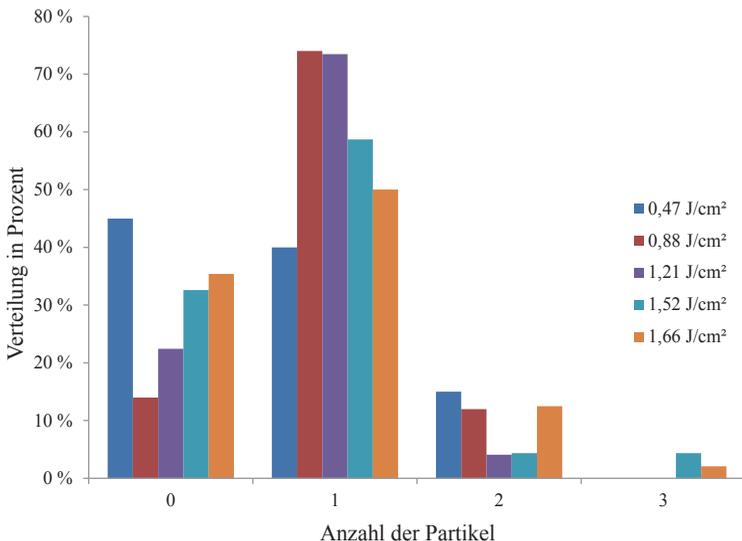


Bild 28: Darstellung der Partikelüberträge für unterschiedliche Fluenzen. Die Anzahl der Partikel pro übertragenen Spot wurde gezählt. Für 0,47  $\text{J}/\text{cm}^2$  ist  $n = 20$ , für alle anderen Fluenzen ist  $n > 50$ .

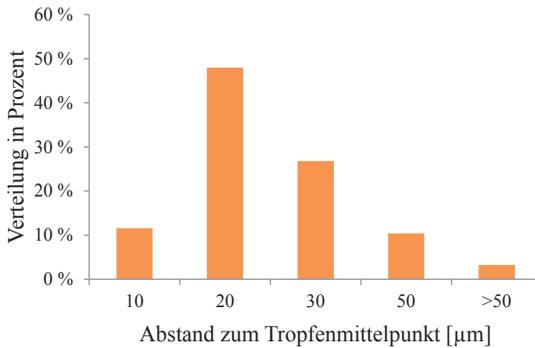


Bild 29: Entfernung der Partikel zum Spotzentrum, gemittelt über alle Leistungen.

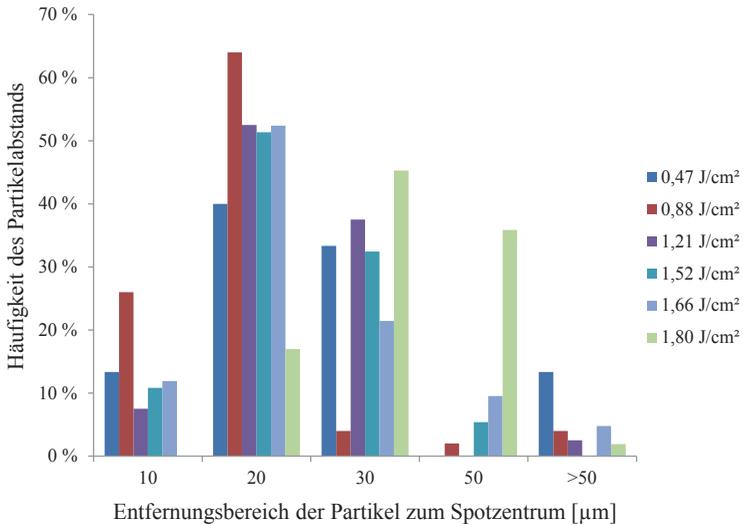


Bild 30: Entfernung der Polystyrol-Partikel zum Spotzentrum in Abhängigkeit zur Leistung.

Um die Partikellage innerhalb eines Spots zu charakterisieren, wird der Spot in 45°-Abschnitte unterteilt. Die im Folgenden benutzte Winkелеinteilung ist in Bild 31 darge-

stellt. Für jeden einzelnen Partikel wird die Lage im Tropfen bestimmt. Im Anschluss findet eine Klassifizierung statt. Über alle Spots gemittelt kann festgestellt werden, dass Partikel überall innerhalb eines Spots vorkommen können, mit einer leichten Anhäufung zwischen  $180^\circ - 315^\circ$  (siehe Bild 32).

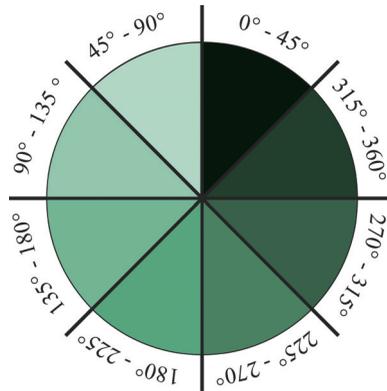


Bild 31: Schematische Darstellung der Tropfen mit den dazugehörigen Winkeln. Übertragene Partikel werden dabei einer Winkelgruppe zugeordnet, um eine Aussage über die Lagestabilität der Partikel in einem Tropfen nach dem Übertrag zu beschreiben.

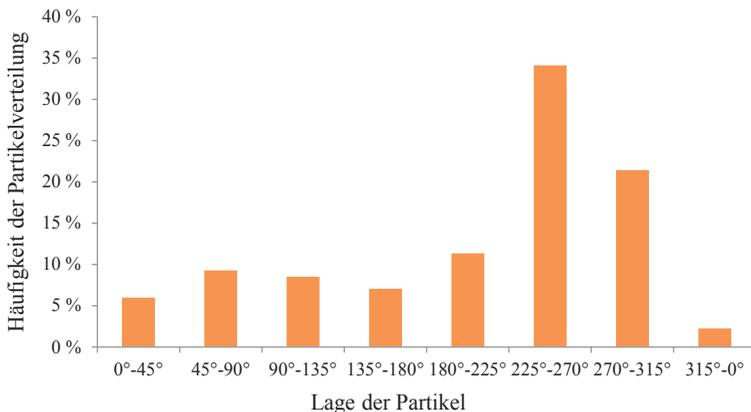


Bild 32: Lage der Partikel innerhalb eines Spots. Dabei wird der Spot in 45°-Abschnitte unterteilt und alle Partikel werden manuell eingeordnet.

Bei Betrachtung des Ergebnisses in Bild 33 der eingesetzten Fluenzen wird festgestellt, dass bei  $0,47 \text{ mJ/cm}^2$  kein stabiler Prozess zu beobachten ist, obwohl ein Übertrag stattfindet. Zum einen kann lediglich bei jedem zweiten LIFT-Transfer ein Spot auf dem Empfängerträger nachgewiesen werden, zum anderen sind auch die Partikelabstände und die Lage im Spot willkürlich. Bei ansteigender Fluenz wird die Lage der Partikel im Spot immer zentraler und auf einen kleineren Winkelbereich verteilt. Bei  $1,21 \text{ J/cm}^2$  sind fast 70 % der Partikel zwischen  $225^\circ$ - $270^\circ$  zu finden. Bei weiter steigender Fluenz sind ebenfalls die Partikel vermehrt im Bereich  $180^\circ$  -  $315^\circ$  vorzufinden, die Streuung nimmt wieder deutlich zu (siehe Bild 33).

Zusätzlich wird überprüft, ob durch die Strahlform die Position der übertragenen Partikel beeinflusst werden kann. Daher wird der Laserstrahl in den Experimenten nicht von den Nebenmaxima gereinigt und es wird ein eierförmiger Fokus eingesetzt. Dies ermöglicht somit, genauer die Prozessstabilität innerhalb des Mikrostrahlbereichs zu beurteilen.

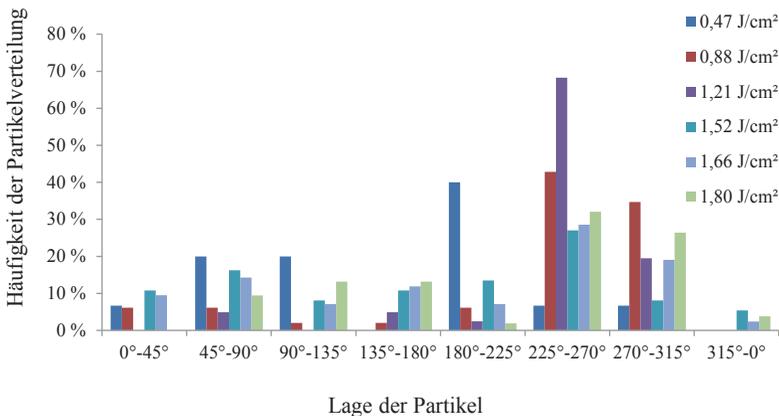


Bild 33: Histogramm der Partikelverteilung: Partikel in Prozent, bezogen auf deren Lage in Abhängigkeit von der Leistung.

Der Einfluss der Partikel-Lage innerhalb eines Spots in Bezug auf die Fluenz zeigt, dass es innerhalb des Prozessfensters auch noch Bereiche gibt, in denen der Prozess noch kontrollierbarer abläuft als am Rande des Prozessfensters. Insbesondere möglichst niedrige Flu-

zen bieten die Chance, eine hohe Positioniergenauigkeit der Partikel zu erreichen. Zum einen ist der Abstand zum Spotzentrum gering, da fast 90 % innerhalb von  $20\ \mu\text{m}$  zu finden sind, zudem ist die Lage innerhalb des Spots relativ konstant. Zusammenfassend aus dem Abstand der Partikel zum Tropfenzentrum und der Winkelverteilung der Partikel kann festgestellt werden, dass die Partikellage im mittleren Fluenzbereich ( $1\ \text{J}/\text{cm}^2$  bis  $1,21\ \text{J}/\text{cm}^2$ ) besser kontrollierbar ist als in höheren oder niedrigeren Fluenzbereichen des Mikrostrahls (siehe Bild 34).

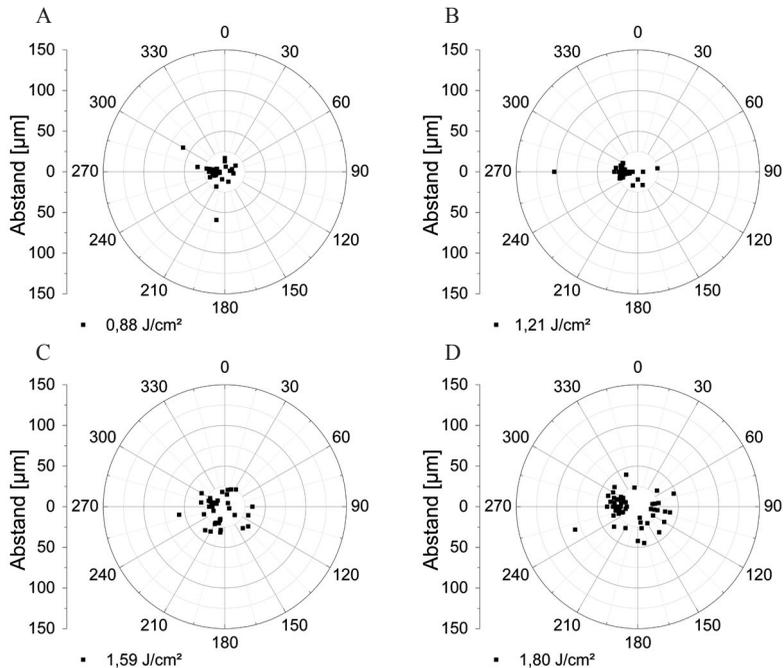


Bild 34: Polardiagramm aus der Partikelverteilung und des Partikelabstandes für Überträge von Polystyrolpartikel in Matrigel. **A:** Unterer Wert des Mikrostrahlbereichs bei  $0,88\ \text{J}/\text{cm}^2$ . Die Partikel liegen zentral im Tropfen und sind relativ stark verteilt. **B:** Mittlerer Wert des Mikrostrahlbereichs bei  $1,21\ \text{J}/\text{cm}^2$ . Die Partikel liegen zentral im Tropfen und vermehrt zwischen  $240^\circ$  und  $300^\circ$ . **C und D:** Höhere Fluenzen des Mikrostrahlbereichs bei  $1,59\ \text{J}/\text{cm}^2$  und  $1,80\ \text{J}/\text{cm}^2$ . Bei steigenden Fluenzen sind die Partikel weiter entfernt vom Tropfenmittelpunkt und weisen auch eine stärkere Streuung bei der Winkelverteilung auf.

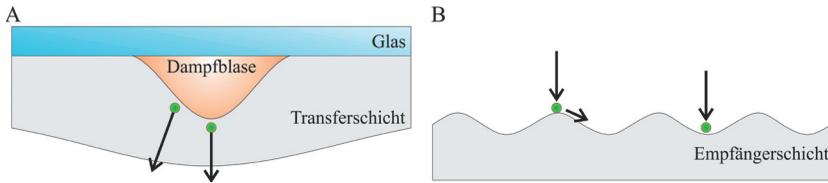


Bild 35: Modell für die Positioniergenauigkeit der Partikel. **A:** Abhängigkeit der Abstrahlrichtung der Partikel oder Zellen in Abhängigkeit ihrer Lage zur Dampfblase auf dem Transferträger. **B:** Bewegung der Partikel oder Zellen nach dem LIFT auf einer unebenen Empfängerschicht auf dem Empfängerträger.

Aus den Daten können mehrere Begründungen für die Positioniergenauigkeit der Partikel postuliert werden (siehe Bild 35):

- Wenn die Partikel zentral zur Dampfblase positioniert sind, ist eine senkrechte Positionierung möglich
- Wenn die Partikel nicht ganz exakt zentral liegen, werden diese nicht zentral abgelenkt und ein Abstand zum Spotzentrum ist zu beobachten
- Bei einer Unebenheit in der Empfängerschicht wird die Positioniergenauigkeit durch eine Bewegung nach dem LIFT-Prozess beeinflusst

Die oben genannten Begründungen gehen davon aus, dass die Intensitätsverteilung perfekt gaußförmig ist. Wenn dies nicht der Fall ist, hat dies ebenfalls einen Einfluss auf die Ausbreitung der Dampfblase und somit auch auf die Richtung in der der Partikel vom Transferträger auf den Empfängerträger gelenkt wird.

### 6.2.1.2 Polystyrol-Partikel-Untersuchungen mit einer Intensitätsverteilung höherer Ordnung

Beim LIFT-Verfahren wird meist eine gaußförmige Strahlverteilung im Fokus eingesetzt. LIFT-Versuche mit Tophat-Energieverteilung sind bisher für Excimer-Laserstrahlung dokumentiert. Andere Strahlformen, wie beispielsweise eine Donut-Verteilung, können dazu führen, dass die zu übertragenen Zellen eine bessere Vitalität nach dem Übertrag aufweisen. Außerdem kann hierdurch die Präzision der Zellpositionierung verbessert werden (siehe Bild 36). Der zu untersuchende Parameterraum für die Abhängigkeiten des LIFT-

Verfahrens von der Fokusgeometrie ist sehr groß (Innenradius  $r_i$ , Außenradius  $r_a$ , Verhältnis  $r_i$  zu  $r_a$  und die Intensitätsverteilung, Anzahl der Maxima). Deshalb wird in einer ersten Versuchsreihe zunächst nachgewiesen, ob mit unterschiedlichen Intensitätsverteilungen im Fokus Partikel übertragen werden können.

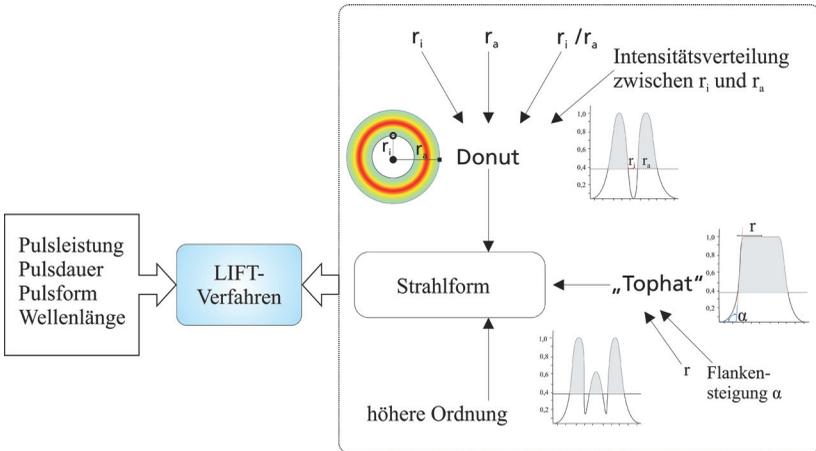


Bild 36: Einflussgrößen, die die Präzision des LIFT-Verfahrens beeinflussen.

Um die Übertragbarkeit von Partikeln bei unterschiedlichen Strahlprofilen und einen Einfluss auf die Übertragspräzision nachzuweisen werden unterschiedliche Intensitätsverteilungen eingesetzt. Dies wird durch einen Pi-Shaper realisiert. Die eingesetzten Strahlformen gehen von gaußförmiger Intensitätsverteilung ( $\Delta z = 200 \mu\text{m}$ ) zu ringförmigen Intensitätsverteilungen über ( $\Delta z = -300 \mu\text{m}$ , siehe Bild 37).

Für den Übertrag werden Partikel in einem einschichtigen System übertragen. Das Transfergerät ist Matrigel, in der Empfängerschicht befindet sich Fibrin. Auf Grund des Pi-Shapers ist der Fokusbereich in diesen Versuchsreihen im Vergleich zu den ansonsten in dieser Arbeit eingesetzten Fokusbereichen vergrößert. Für die Überträge wird gezeigt, dass für die verwendeten Intensitätsverteilungen Partikel übertragen werden können (siehe Bild 38). Aus diesen ersten Versuchen ist es möglich, einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Strahlprofil und Positioniergenauigkeit festzustellen. Die Streuung nimmt bei der Strahlform  $z = -300 \mu\text{m}$  stark zu und wird homogen im Tropfen verteilt. Insbeson-

dere bei  $z = +200 \mu\text{m}$  kann festgestellt werden, dass die Partikel vermehrt im Tropfenzentrum detektiert werden können. Für eine gaußförmige Intensitätsverteilung werden keine Partikel im Tropfeninneren detektiert. Bei einer sehr breiten Gaußverteilung mit einem vierfach größerem Laserfokus (Durchmesser von  $80 \mu\text{m}$ ) scheint die Partikelverteilung besser zu sein. Um eine endgültige Aussage zu treffen, muss somit die Strahlform Tophat näher untersucht werden. Diesbezüglich kann auch ein inverser Versuchsansatz herangezogen werden. Die benötigten Drücke für die Ausbreitung eines gleichmäßigen Jets müssen bestimmt werden. Diese können dann dafür herangezogen werden um die benötigte Intensitätsverteilung im Fokus zu ermitteln. Hierfür sind detaillierte Versuchsreihen mit unterschiedlichen Fluenzen und Fokusgrößen in nachfolgenden Arbeiten durchzuführen.

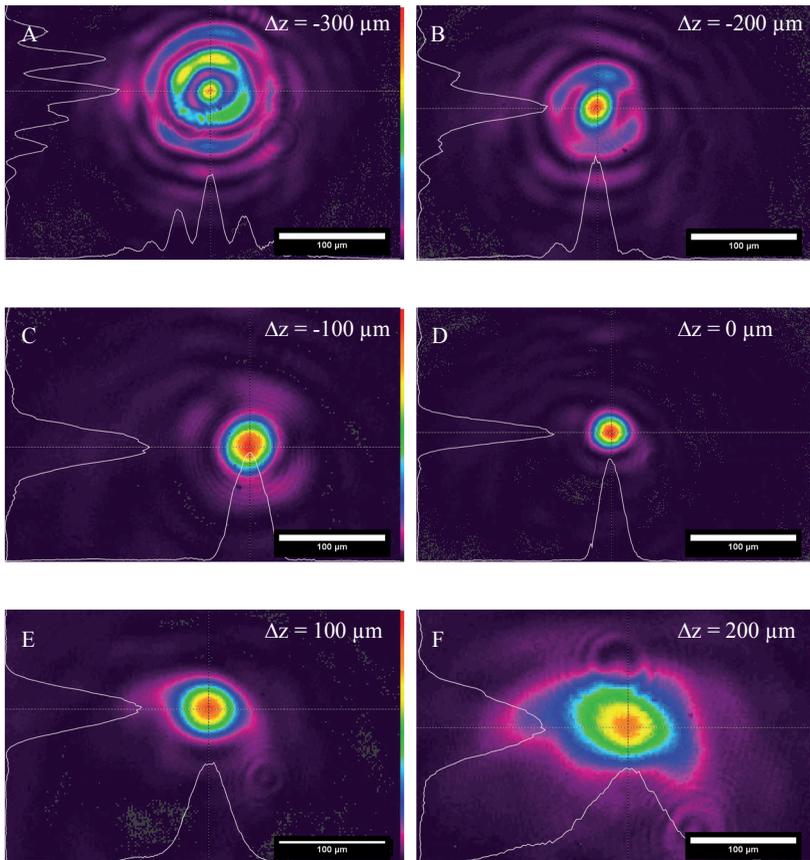


Bild 37: Intensitätsverteilung der Laserstrahlung nach einem Mikroskopobjektiv durch den Pi-Shaper. Intensitätsverteilung im Fokus in 100  $\mu\text{m}$  Schritten. **A und B:** Bei  $z = -300 \mu\text{m}$  liegt eine dreizackige Strahlform vor. **C und D:** Diese geht bei  $z = -100 \mu\text{m}$  in eine gaußförmige Strahlverteilung über. **E und F:** Ab  $z = 100 \mu\text{m}$  liegt eine verbreiterte gaußförmige Intensitätsverteilung vor.

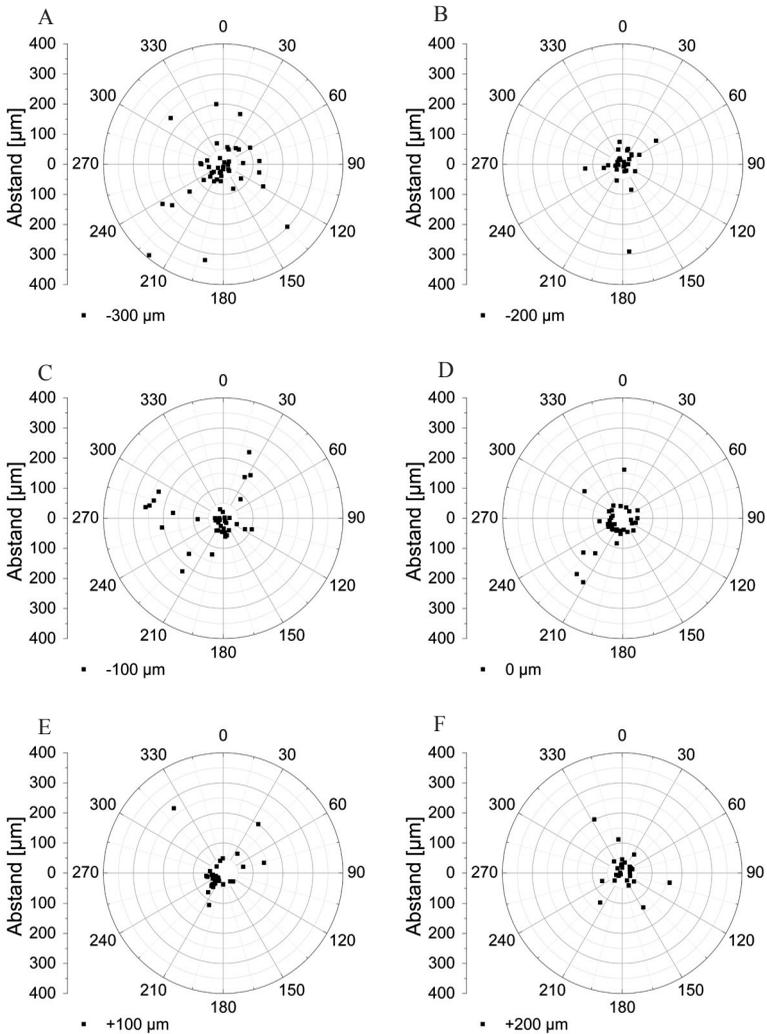


Bild 38: Einzelpartikelüberträge mit unterschiedlichen Intensitätsverteilungen. Überträge sind mit allen untersuchten Strahlformen möglich. Dabei scheinen besonders homogene Intensitätsverteilungen eine geringe Streuung der Partikel hervorzurufen.

## 6.2.2 Zelltransfer

Die Position von Zellen in einer Zellkultur kann große Auswirkung auf deren weiteres Wachstumsverhalten haben. Dies wird insbesondere dann wichtig, wenn unterschiedliche Zelltypen organoide Strukturen aufbauen. In den folgenden Kapiteln werden Überträge für zwei unterschiedliche Zelltypen, K562 (Suspensionszellen) und 3T3 (Adhäsionszellen) untersucht. In dieser Untersuchung wird der Einfluss zweier unterschiedlich vorbereiteter Transferschichten auf den Zellübertrag betrachtet. Um das Übertragsverhalten zu untersuchen, wird ein einschichtiges System mit Zellen (Kapitel 6.2.2.1) zum LIFT eingesetzt. Zum anderen wird die Transferschicht in einem zweischichtigen Materialsystem durchgeführt. Zunächst wird eine reine Hydrogelschicht aufgetragen. In einem zweiten Schritt werden auf dieses Hydrogel die Zellen aufgebracht (Kapitel 6.2.2.2). Die Ergebnisse mit den beiden Schichtsystemen werden miteinander verglichen (Kapitel 6.2.2.3). Untersucht werden die reproduzierbare Einzelzellübertragung und die Vitalität der übertragenen Zellen (Kapitel 6.2.2.4). In Kapitel 6.2.2.5 wird gezeigt, dass sich die Technologie zum Herstellen von Zellmustern auf dem Empfängerträger eignet.

### 6.2.2.1 Zelltransfer aus einem einschichtigen Hydrogelsystem

Für den Einzelzelltransfer von in Hydrogel eingebetteten Zellen wird das in Kapitel 6.1.1 bestimmte Prozessfenster eingesetzt. Aus beiden Hydrogelen (Gelatine und Matrigel) werden K562- sowie 3T3-Zellen in eine Matrigel-Empfängerschicht übertragen. Es werden 60 LIFT-Prozesse pro Leistungseinstellung des Lasers durchgeführt.

Der Übertrag von einzelnen Zellen kann mit bis zu 90 % erfolgreich durchgeführt werden. Die verbliebenen 10 % der nicht erfolgreich transferierten Zellen sind nicht auf dem Empfängerträger detektierbar. Dies kann zum einen daran liegen, dass sie auf Grund einer nicht homogenen Transferschicht nicht übertragen worden sind. Zum anderen kann es sein, dass die Zellen so stark zerstört wurden, dass sie nicht mehr auffindbar sind.

Der Transferprozess übt eine starke Beanspruchung auf die Zellen aus. Dies hat zur Folge, dass entweder ganze Zellen oder nur Fragmente dieser übertragen werden. Alle übertragenen Zellen werden in den hier betrachteten Versuchen vor dem Übertrag mittels Calcein-

AM angefärbt. Dadurch können Zellen eindeutig anhand ihrer Fluoreszenz nach dem Übertrag bestimmt werden. Durch Fluoreszenzmikroskopie sind alle Zellen oder deren Fragmente auf dem Empfänger wieder auffindbar. Falsch-positive Signale können somit ausgeschlossen werden. Nach einem Übertrag können die Zellkörper in unterschiedlichen Formen auf dem Empfängerträger ankommen (siehe Bild 39).

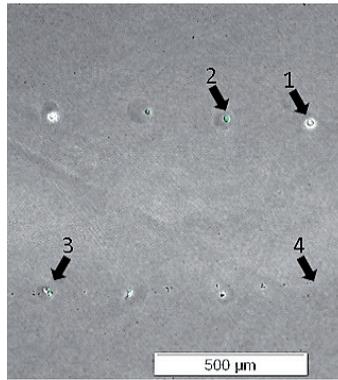


Bild 39: K562-Eizellüberträge aus Matrigel-Transferschicht in Matrigel-Empfängerschicht. **Obere Reihe** 1,25 J/cm<sup>2</sup>; **Untere Reihe** 0,99 J/cm<sup>2</sup>. Durchlichtaufnahme und Fluoreszenzaufnahme kombiniert (1) weiß leuchtende, runde Objekte, und starke Fluoreszenz; (2) schwarze runde Objekte, starke Fluoreszenz; (3) Zellkörper nicht rund, mehrere Stücke im Fluoreszenzbild (4) kein Zellkörper im Durchlichtbild, Zellfragmente im Fluoreszenzbild.

Zellen, die weit verstreut in Fragmenten im Übertrag zu finden sind, werden als eindeutig fragmentiert bezeichnet. Allerdings können auch Zellen, die im mikroskopischen Bild als intakter Zellkörper erscheinen, ebenfalls beschädigt oder partiell fragmentiert sein. Die schwarze Verfärbung einiger Zellkörper, die in der Durchlichtaufnahme zu sehen ist, weist auf nicht mehr intakte Zellen hin.

### Transfer von einem einschichtigen System mit Gelatine

Der Zelltransfer aus 5 %-iger Gelatine zur Bestimmung der geeigneten Fluenz für den Einzelzelltransfer wird zwischen einer Fluenz von 1,99 J/cm<sup>2</sup> und 3,96 J/cm<sup>2</sup> durchgeführt. Dies entspricht dem Mikrostrahlbereich für Gelatine (siehe 6.1.1.2). Die Transferschicht

wird mit Hilfe eines 75  $\mu\text{m}$  Spiralrakel auf den Transferträger aufgebracht. Die auf den Transferträger aufgetragene Zellzahl beträgt ca. 50.000, suspendiert in 150  $\mu\text{l}$  Hydrogel. Die Fibrin-Empfängerschicht wird mit einem 100  $\mu\text{m}$  Spiralrakel auf Borosilikatglasobjektträger aufgetragen. Für die Experimente werden sowohl K562 Zellen als auch Swiss Albino 3T3 Zellen eingesetzt.

Mit steigender Fluenz nimmt die Anzahl transferierter Zellen oder Zellfragmenten zu. Bei einer Fluenz von 1,99  $\text{J}/\text{cm}^2$  werden 60 % der Zellen ganz oder fragmentiert übertragen. Bei der maximal eingesetzten Fluenz von 3,96  $\text{J}/\text{cm}^2$  werden 88 % der Zellen intakt oder fragmentiert übertragen.

Im Bereich geringer Fluenzen von 1,99  $\text{J}/\text{cm}^2$  und 2,50  $\text{J}/\text{cm}^2$  sind die Unterschiede in Bezug auf den Fragmentierungsgrad der Zellen gering. Durch höhere Fluenzen sinkt die Ausbeute an transferierten Zellkörpern jedoch stark ab. Bei der niedrigeren Fluenz von 1,99  $\text{J}/\text{cm}^2$  sind 50 % der Zellen fragmentiert. Bei der höheren Fluenz von 3,96  $\text{J}/\text{cm}^2$  sind 80 % der Zellen fragmentiert (Bild 40).

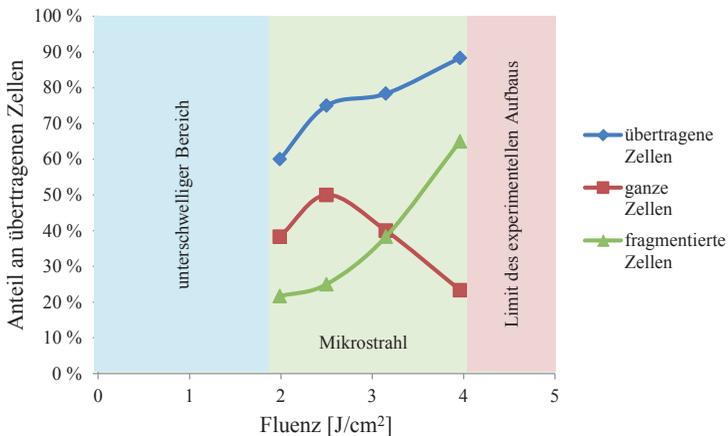


Bild 40: Zelltransfer aus einer Gelatine-Transferschicht in eine Matrigel-Empfängerschicht. Für unterschiedliche Fluenzen ist dargestellt, in welcher Häufigkeit der Versuche eine Zelle übertragen wurde. Dabei wird im Ergebnis zusätzlich zwischen fragmentierten und ganzen Zellen unterschieden. Je höher die Fluenz ist, desto größer ist der Anteil an fragmentierten Zellen ( $n = 60$ ).

Wenn Zellen in Gelatine eingebettet übertragen werden, so kann die Quote an Überträgen mit steigender Fluenz erhöht werden. Da jedoch keine Zellfragmente entstehen sollen, ist bei der Fluenz von  $1,99 \text{ J/cm}^2$  bereits das Maximum an ganzen Zellen erreicht. Daher ist eine weitere Steigerung der Fluenz für Experimente mit Zellen nicht sinnvoll.

### **Transfer von einem einschichtigen System mit Matrigel**

Um die geeigneten Fluenzen für den Einzelzelltransfer aus einer Matrigel-Transferschicht zu bestimmen, werden Fluenzen zwischen  $0,99 \text{ J/cm}^2$  und  $2,50 \text{ J/cm}^2$  eingesetzt (siehe Kapitel 6.1.1.1). Die Transferschicht wird mit Hilfe eines  $100 \mu\text{m}$  Spiralraketel auf den Transferträger aufgebracht. Die auf den Transferträger aufgetragene Zellzahl beträgt ca. 50.000 Zellen, suspendiert in  $150 \mu\text{l}$  Hydrogel. Der Empfängerträger wird mit einem  $150 \mu\text{m}$  Raketel mit Fibrin beschichtet.

Bei einer niedrigeren Fluenz von  $0,99 \text{ J/cm}^2$  werden in 60 % der Übertragungsversuche Zellen oder Zellfragmente wieder gefunden. Die höchste Ausbeute an transferierten Zellen und Zellfragmenten findet sich bei Fluenzen von  $1,25 \text{ J/cm}^2$  und  $1,58 \text{ J/cm}^2$  mit 90 % sowie 88 % an übertragenen Zellen und Zellfragmenten. Durch den Einsatz höherer Fluenzen von  $1,99 \text{ J/cm}^2$  und  $2,50 \text{ J/cm}^2$  steigt die Transferausbeute auf 73 % beziehungsweise 77 %, jedoch nimmt die Ausbeute an intakten Zellen ab.

Bei einer Fluenz von  $0,99 \text{ J/cm}^2$  und  $1,25 \text{ J/cm}^2$  werden 83 % beziehungsweise 85 % der Zellen ganz übertragen. In diesem Bereich der Fluenz sind die Unterschiede in Bezug auf den Fragmentierungsgrad der Zellen relativ gering. Durch höhere Fluenzen nimmt die Ausbeute an ganzen Zellen deutlich ab. Mit steigender Fluenz nimmt der Fragmentierungsgrad stetig zu. Bei einer Fluenz von  $1,58 \text{ J/cm}^2$  werden lediglich 68 % der transferierten Zellen im Ganzen übertragen. Dieser Wert sinkt bei  $2,50 \text{ J/cm}^2$  auf 30 % der übertragenen Zellen (siehe Bild 41).

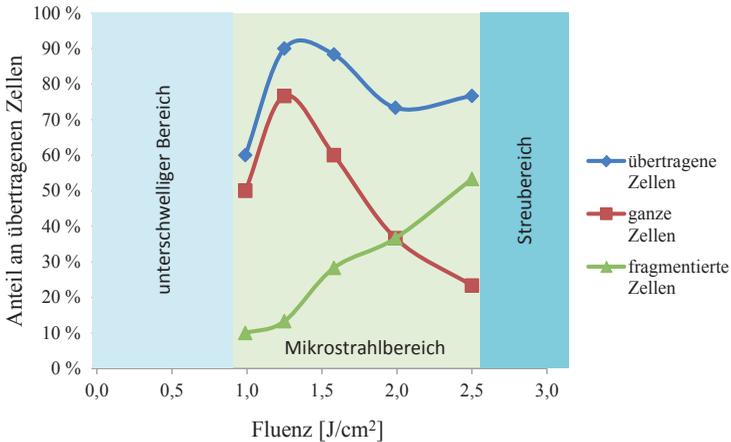


Bild 41: Zelltransfer aus einer Matrigel-Transferschicht in eine Matrigel-Empfängerschicht. Für unterschiedliche Fluenzen ist dargestellt, wie oft eine einzelne Zelle übertragen wurde. Dabei wird im Ergebnis zusätzlich zwischen fragmentierten und ganzen Zellen unterschieden werden. Je höher die Fluenzen sind, desto größer ist der Anteil an fragmentierten Zellen (n = 60).

### Zusammenfassung der einschichtigen Gelatine- und Matrigel-Transferschichten

Beim einschichtigen System zum Übertrag von Zellen in Hydrogelen werden sowohl für Gelatine, als auch für Matrigel Zellen im gesamten Bereich des Prozessfensters übertragen. Dabei kommt es immer zu einer Zellschädigung. Ein Maximum an nicht fragmentierten Zellen kann in beiden Fällen im Bereich niedrigerer Fluenzen bestimmt werden.

Obwohl für Gelatine die Anzahl an übertragenen Zellen bei steigender Fluenz zunimmt, nimmt auch der prozentuale Anteil an fragmentierten Zellen zu. Da für größere Fluenzen eine stärkere Ausbildung der prozessbedingten Dampfblase zu erwarten ist, nimmt zwar einerseits die Menge an übertragenem Material zu. Dies bedingt eine höhere Wahrscheinlichkeit eine Zelle zu übertragen. Andererseits nimmt auch die Wahrscheinlichkeit zu, dass sich die Zelle in der Nähe der Dampfblase befindet. Hierdurch werden größere Scherkräfte erzeugt und die Zellen werden geschädigt. Dabei ist bekannt, dass bei Scherkräften unter 8.000 Pa Zellen überleben, zwischen 8.000 und 18.000 Pa kann die sogenannte Optoporation stattfinden und bei größeren Scherkräften werden die Zellen nekrotisch oder werden lysiert.<sup>77,78</sup> Daher sollten für Zellüberträge möglichst geringe Fluenzen eingesetzt werden,

um einen Einzelzellübertrag mit lebenden Zellen zu realisieren. Jedoch wird selbst bei geringen Leistungen noch häufig eine Zelle fragmentiert. Es ist prozesstechnisch sehr schwierig mit dem einschichtigen Transfersystem reproduzierbar ganze Zellen zu übertragen, ohne eine Zellschädigung zu haben. Daher ist es für den Einzelzelltransfer sinnvoll, die Beschichtungsstrategie des Transferträgers so anzupassen, dass die Zellen eine bessere Überlebenschance haben und der Übertrag mit möglichst sanften Mitteln möglich wird.

### 6.2.2.2 Zelltransfer aus einem zweischichtigen Hydrogelsystem

Bei der Ermittlung des Prozessfensters für das zweischichtige System kann beobachtet werden, dass geringere Fluenzen als beim einschichtigen System eingesetzt werden können, um im Mikrostrahlbereich zu arbeiten. Dabei können Fluenzen zwischen  $0,79 \text{ J/cm}^2$  bis  $3,96 \text{ J/cm}^2$  für den Zelltransfer benutzt werden.

Die Herstellung der zweischichtigen Transfersysteme ist in Kapitel 4.2.1 beschrieben. Es wird ein  $75 \text{ }\mu\text{m}$  Rakel eingesetzt. Die Zellsuspension für die zweite Schicht besteht aus ca. 50.000 Zellen, die in Kulturmedium suspendiert sind. Für die Versuche mit dem Zweischichtsystem werden sowohl K562 Zellen als auch 3T3 Zellen übertragen.

Durch die Zugabe der Zellsuspension ist die Transferschicht nicht vollständig geliert. Die Viskosität ist so gering, dass die Transferschicht aus einer Flüssigkeit besteht. Innerhalb dieses Flüssigkeitsfilms können sich die Zellen in der Transferschicht durch äußere Einflüsse bewegen.

Ein äußerer Einfluss ist die Beschleunigung der Achsen, die den Transferträger positionieren. Durch eine geeignete Einstellung der Beschleunigungsrampen lässt sich dieser Effekt minimieren. Des Weiteren wirkt auch das LIFT-Verfahren auf die Transferschicht. Durch die Entstehung der Dampfblase und den daraus resultierenden Mikrostrahl wird die umliegende Flüssigkeit in Bewegung versetzt. Zellen um den LIFT-Prozess herum werden auf den Verfahrensort hin gelenkt und nähern sich diesem an. Der Übertragsbereich für den Transfer von Zellen im beschriebenen Versuch liegt bei einer eingesetzten Fluenz von  $2,50 \text{ J/cm}^2$  bei einem Radius von circa  $250 \text{ }\mu\text{m}$  (siehe Bild 42). Nach jedem LIFT-Übertrag

muss abgewartet werden, bis sich die Transferschicht nicht mehr bewegt, bevor mit weiteren LIFT-Überträgen begonnen werden kann.

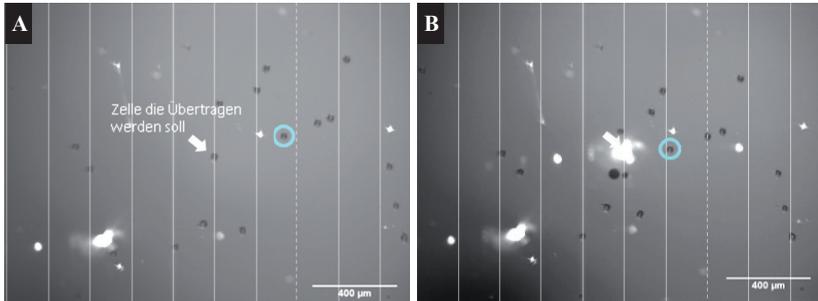


Bild 42: Transferschicht in der LIFT-Anlage. Die mit weißem Pfeil markierte Zelle im Zentrum der Abbildung soll transferiert werden. Vor dem LIFT-Prozess (Fluenz von  $2,50 \text{ J/cm}^2$ ) befindet sich die umkreiste Zelle in unmittelbarer Nähe zur gestrichelten Linie. Nach dem LIFT-Prozess hat sich die markierte Zelle zum Transferersprung hin bewegt. **A:** K-562-Zellen auf zweifach überschichteten Gelatine-Transferträger vor dem LIFT-Prozess. **B:** K-562-Zellen auf zweifach überschichteten Gelatine-Transferträger nach dem LIFT-Prozess.

Mit dem Übertrag aus dem zweischichtigen System ist sowohl der Transfer von mehreren Zellen als auch der Transfer von Einzelzellen mit einem einzigen LIFT-Prozess durchführbar. Wenn sich in der Nähe des Laserfokus lediglich eine Zelle befindet, so wird auch nur diese übertragen. Sind jedoch nahe am Fokus weitere Zellen vorhanden, so werden auch diese bei einem Druckprozess mit übertragen (siehe Bild 43).

Liegen mehrere Zellen auf dem Transferträger in unmittelbarer Nähe zur anvisierten Zelle, können diese zusammen transferiert werden. Somit werden mehrere Zellen gleichzeitig übertragen, obwohl der Laserstrahl auf eine einzelne Zelle fokussiert wird (Bild 44). Darüber hinaus kann beobachtet werden, dass die Häufigkeit, mit der mehrere Zellen durch einen LIFT-Prozess übertragen werden, mit steigender Fluenz zunimmt. Je höher die eingesetzte Fluenz des Lasers ist, umso größer ist der Bereich in der Transferschicht in dem Zellen beeinflusst werden und sich auf den Bearbeitungsbereich zubewegen.

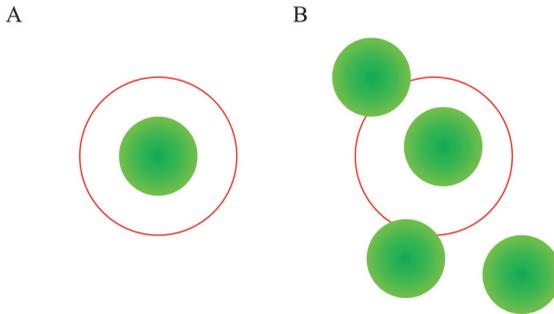


Bild 43: Schematische Darstellung der Fokussierung auf die zu übertragene Zellen. Der rote Kreis deutet den Laserfokus an, die kleineren grünen Kreisflächen sind die Zellen. **A:** Dies ist der Fall für einen Einzelzellübertrag. Die Zelle befindet sich in der Mitte des Fokus. **B:** Dies ist der Fall für einen Mehrfachübertrag. Eine Zelle befindet sich in der Mitte des Fokus, weitere Zellen befinden sich am Rand oder auch außerhalb des Laserfokus.

Daher ist das Transferschichtsystem anzupassen. Eine Möglichkeit ist es die erste aufgetragene Gelatineschicht in einer höheren Konzentration einzusetzen. Durch die nachfolgende Zugabe der Zellen in wässriger Lösung wird die gesamte Hydrogelschicht wieder verdünnt und eine gut übertragbare Gesamtschicht entsteht. Dadurch wird das Gesamtkonstrukt stabiler und die Einflusszone auf dem Transferträger geringer.

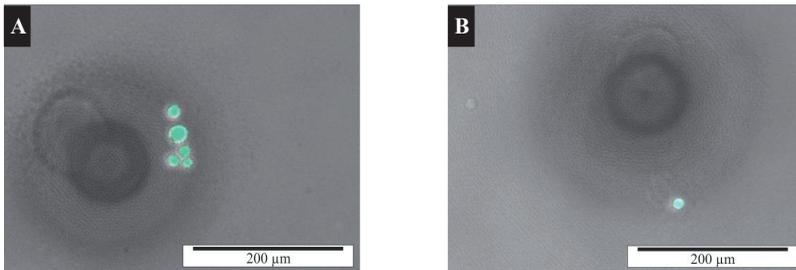


Bild 44: Aufnahme von K562-Zellen direkt nach dem LIFT-Prozess. Die Zellen wurden, zur besseren Detektion nach dem Transferprozess, vor dem LIFT-Prozess mit Calcein-Am angefärbt. **A:** Mehrfachübertrag von K-562-Zellen nach Beschuss einer Einzelzelle bei einer Fluenz von  $3,15 \text{ J/cm}^2$  aus einer überschichteten Gelatine-Transferschicht in eine Matrigel-Empfängerschicht. **B:** Einzelübertrag einer von K-562-Zellen nach Beschuss einer Einzelzelle bei einer Fluenz von  $3,15 \text{ J/cm}^2$  aus einer überschichteten Gelatine-Transferschicht in eine Matrigel-Empfängerschicht.

### 6.2.2.3 Diskussion des Zelltransfers aus ein- und zweischichtigem Hydrogelsystem

Überträge für das Zweischichtsystem erfolgen bei deutlich niedrigeren Fluenzen als beim Einschichtsystem. Für den Übertrag von 5 %-iger Gelatine liegt der untere Schwellenwert  $F_{\min}$  beim einschichtigen System bei  $1,99 \text{ J/cm}^2$ , beim Zweischichtsystem hingegen bei  $0,79 \text{ J/cm}^2$ .

Bei Versuchen mit den zweischichtigen Transferträgern werden keine Zellen fragmentiert. Dies weist darauf hin, dass diese Methode deutlich schonender ist, als Überträge mit einschichtigen Transferträgern. Ein Übertrag kann mit den Versuchsbedingungen gut erreicht werden. Die Zellen in der Transferschicht zeigen jedoch eine hohe Mobilität auf, was den gezielten Einzelzellübertrag erschwert. Die in Kapitel 6.1.1 ermittelten Parameter für den Hydrogelübertrag sind für das einschichtige System anwendbar. Für das zweischichtige System sind diese Werte nicht anwendbar, da durch die Übersichtung mit der Zellsuspension die Endkonzentration der Gelatine undefiniert verdünnt wird. Dadurch wird sowohl die Viskosität als auch die Schichtdicke der Transferschicht verändert. Die eingesetzte Fluenz steht in direkter Abhängigkeit zur Schichtdicke und Viskosität der Transferschicht. Der aufgetragene Flüssigkeitsfilm führt zur Quellung des Transferhydrogels und verändert somit die Schichtdicke der zu übertragenden Gelschicht, sowie deren Konzentration. Als erste Hydrogelschicht auf dem Transferträger sollte in weiterführenden Versuchen eine Gelatinekonzentration mit höherer Konzentration getestet werden.

Darüber hinaus kann eine gleichbleibende Viskosität der Transferschicht nicht sichergestellt werden. Durch das Absaugen der überstehenden Flüssigkeit bleibt eine unbekanntes Flüssigkeitsmenge auf dem Hydrogel zurück. Zudem wird, trotz der gleichen Anzahl von Zellen im Übersichtungsmedium, eine unbekanntes Zellzahl durch das Absaugen des überstehenden Mediums wieder entfernt. Die einzusetzende Fluenz kann somit nicht so genau auf das zweischichtige System abgestimmt werden, wie es beim einschichtigen System möglich ist.

Einzelne Zellen zu übertragen ist mit in Hydrogel eingebetteten Zellen reproduzierbar und die Präparation der Transferschicht ist einfacher. Die teilweise starke Fragmentierung der Zellen zeigt allerdings auch, dass die Zellen hier stärker beansprucht werden. Die Beweg-

lichkeit der Zellen beim Transfer aus zweifach überschichteten Transferträgern ist hingegen für den vitalen Einzelzelltransfer vorteilhaft. Da die Zellen beim Übertrag aus zweifach beschichteten Transferträgern in einem Flüssigkeitsfilm suspendiert auf der Hydrogelschicht aufliegen, sind diese besser vor der im Hydrogel entstehenden Dampfblase geschützt. Die Einflusszone der Dampfblase in der Hydrogelschicht nimmt in diesem System folglich zu. Bei höher eingesetzten Zellkonzentrationen können somit auch gezielt Mehrzellüberträge erreicht werden. Die meisten übertragenen Zellen stehen nicht unter der direkten Einwirkung der Dampfblase und der Laserstrahlung. Somit treten geringere Scherkräfte auf und dies führt zu einem schonenderen Übertrag. Mit diesem Aufbau ist auch der gezielte Transfer einzelner Zellen möglich, es müssen hierfür maximal ca. 10.000 Zellen in die Transferschicht eingebracht werden.

### 6.2.2.4 Überprüfung der Vitalität

Zur Überprüfung der Vitalität nach dem Zelltransfer werden sowohl einschichtige als auch zweischichtige Transferschichten eingesetzt. Die Zellen werden dafür nach dem Transfer mit Calcein AM sowie Propidiumiodid angefärbt (siehe Kapitel 4.2.6). Unmittelbar nach dem Zelltransfer wird der Übertrag mittels Durchlichtmikroskopie überprüft. Nach Inkubation und Kultivierung der Zellen, sowie der Zugabe der Fluoreszenzfarbstoffe, werden die transferierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie eindeutig nachgewiesen.

Als Empfängerträger werden  $\mu$ -Slides eingesetzt. Die einzelnen Kammern der  $\mu$ -Slides bieten kleine Versuchskompartimente. Dadurch kann materialsparend eine hohe Schichtdicke der Empfängerschicht von 1,8 mm verwendet werden. Dies stellt sicher, dass die Dampfschicht in jedem Fall ausreichend dick ist. Darüber hinaus ermöglichen die Kammern der  $\mu$ -Slides ein steriles Arbeiten und eine Kultivierung der transferierten Zellen. Dies lässt sich mit Standard-Glasobjektträgern nicht realisieren, da diese homogen über die gesamte Fläche beschichtet werden. Von Nachteil bei der Verwendung der  $\mu$ -Slides ist, dass auf Grund des größeren Luftpolsters zwischen Transfer- und Empfängerträger die Transferschicht schneller austrocknet. Dadurch müssen die Versuche in maximal 20 Minuten abgeschlossen werden. Die verstärkte Austrocknung bewirkt auch eine stetige Veränderung der Schichtdicke des Transferträgers während des Übertrags, was das Über-

tragungsverhalten der Transferschicht und die Vitalität der Zellen beeinflusst. Dies lässt sich damit lösen, indem für LIFT-Experimente eine klimatisierte Kammer mit regelbarer Luftfeuchtigkeit eingesetzt wird.

Es werden für alle unterschiedlichen Transferschichtsysteme sowohl K562- als auch 3T3-Zellen für den Transfer eingesetzt. Das Kapitel untergliedert sich dabei wie folgt:

- A. Transfer mit einschichtigem Transferträger aus einer Gelatine-Transferschicht
- B. Transfer mit einschichtigem Transferträger aus einer Matrigel-Transferschicht
- C. Vergleich des einschichtigen Zelltransfers von 3T3- und K562-Zellen aus einer Gelatine- und Matrigel-Transferschicht
- D. Zelltransfer mit zweischichtigen Transferträgern aus Gelatine

#### **A: Transfer mit einschichtigem Transferträger aus einer Gelatine-Transferschicht**

Auf Grundlage der Ergebnisse des Zelltransfers aus in Hydrogel eingebetteten Zellen werden für den Transfer aus Gelatine Fluenzen von  $1,99 \text{ J/cm}^2$  bis  $3,15 \text{ J/cm}^2$  eingesetzt. (siehe Kapitel 6.1.1).

Für den Transfer der Zellen werden je 25 LIFT-Prozesse mit den Fluenzen  $1,99 \text{ J/cm}^2$ ,  $2,50 \text{ J/cm}^2$  und  $3,15 \text{ J/cm}^2$  durchgeführt. Nach dem Übertrag werden die Zellen auf dem Empfängerträger detektiert (nicht quantitativ). Im Anschluss wird die Zellkultivierung durchgeführt.

#### **3T3-Zelltransfer mit einschichtigem Transferträger aus einer Gelatine-Transferschicht**

Von den insgesamt 75 durchgeführten LIFT-Prozessen aller drei eingesetzten Fluenzen werden nach 5-tägiger Inkubation und Kultivierung der Zellen insgesamt 25 Zellen detektiert. Von 50 LIFT-Experimenten wird folglich keine Zelle mehr auf dem Empfängerträger gefunden. Nach fünf Tagen Inkubation der transferierten Zellen werden für alle eingesetzten Fluenzen vitale Zellen gefunden. Die meisten lebenden Zellen werden bei einer Fluenz von  $2,50 \text{ J/cm}^2$  übertragen. Auch bei der geringeren Fluenz von  $1,99 \text{ J/cm}^2$  können keine

toten Zellen nachgewiesen werden. Bei einer größeren hier untersuchten Fluenz von  $3,15 \text{ J/cm}^2$  sind von den neun detektierbaren Zellen drei nicht mehr vital (Tabelle 6).

Tabelle 6: Zelltransfer aus einer Gelatine-Transferschicht in Matrigel-Empfängerschicht ( $\mu$ -Slide,  $n = 25$  pro Fluenz).

Fluenz [ $\text{J/cm}^2$ ]	3T3-Zellen		K562-Zellen	
	lebend	tot	lebend	tot
1,99	6	0	0	0
2,50	10	0	2	1
3,13	6	3	0	1

### **K562-Zelltransfer mit einschichtigem Transferträger aus einer Gelatine-Transferschicht**

Bei dem Transfer von K562-Zellen aus der Gelatinetransferschicht werden von den insgesamt 75 Transferversuchen nach fünf Tagen nur vier K562-Zellen detektiert. Daraus resultiert eine Wiederfindungsrate der Zellen von 5 %. Lebende Zellen konnten dabei nur bei einer Fluenz von  $2,50 \text{ J/cm}^2$  nachgewiesen werden (siehe Tabelle 6). Dies liegt daran, dass K562-Zellen als Suspensionskultur wachsen und bei der weiteren Kultivierung leichter ausgewaschen werden können. Daher dürfen Suspensionszellen nur in kleine Volumina übertragen werden, bei denen man die Zellen einfach automatisiert wieder untersuchen kann.

### **B: Transfer mit einschichtigem Transferträger aus einer Matrigel-Transferschicht**

Basierend auf den Ergebnissen des Zelltransfers von einschichtigen Systemen mit Matrigel, erfolgt der Zelltransfer bei Fluenzen zwischen  $0,99 \text{ J/cm}^2$  und  $1,58 \text{ J/cm}^2$  (siehe Kapitel 6.1.1.1).

Zum Zelltransfer werden, analog zu dem Transfer aus den Gelatine-Transferschichten, je 25 LIFT-Prozesse für die eingesetzten Fluenzen ( $0,99 \text{ J/cm}^2$ ,  $1,25 \text{ J/cm}^2$  und  $1,58 \text{ J/cm}^2$ ) durchgeführt.

### **3T3-Zelltransfer aus einer Matrigel-Transferschicht**

Nach der Inkubation und Färbung der Zellen werden aus den insgesamt 75 Übertragungsversuchen aus einer Matrigel-Transferschicht neunzehn 3T3-Zellen wieder beobachtet. Insbesondere bei geringen Fluenzen und bei den Suspensionskulturzellen ist die Zahl der zu untersuchenden Zellen nach den Färbeprotokollen gering. Bei steigenden Fluenzen werden mehr Zellen auf dem Empfängerträger für Untersuchungen verfügbar. Für die transferierten Zellen werden für alle eingesetzten Fluenzen vitale Zellen gefunden. Die meisten Zellen werden bei der maximal eingesetzten Fluenz zum Übertrag von  $1,58 \text{ J/cm}^2$  detektiert. Vier der elf untersuchten Zellen sind tot. Bei den niedrigeren eingesetzten Fluenzen von  $0,99 \text{ J/cm}^2$  und  $1,25 \text{ J/cm}^2$  werden weniger Zellen gefunden. Diese setzen alle den Calcein-AM Farbstoff um, wodurch ihre Vitalität nachgewiesen werden kann (siehe Tabelle 7).

### **K562-Zelltransfer aus einer Matrigel-Transferschicht**

Werden K562 Zellen in einer Matrigel-Transferschicht übertragen, sind ebenfalls nur wenige Zellen für die Auswertung verfügbar. Die Wiederfindungsrate transferierter K562-Zellen nach der Inkubation und Färbung durch die Fluoreszenzfarbstoffe beträgt 16 %.

Einzig bei den Überträgen mit der maximal eingesetzten Fluenz von  $1,58 \text{ J/cm}^2$  können Zellen nachgewiesen werden. Von den 12 gefundenen Zellen werden neun Zellen als lebend nachgewiesen. Die übrigen drei Zellen werden tot aufgefunden (siehe Tabelle 7). Da es sich um Suspensionszellen handelt werden die K562-Zellen sehr einfach ausgewaschen. Durch die höheren Fluenzen bekommen die Zellen auch eine höhere Geschwindigkeit. Dadurch werden sie tiefer in das Gel transferiert und sind somit vor einem Auswaschen besser geschützt.

Tabelle 7: Zelltransfer aus einer Matrigel-Transferschicht in eine Matrigel-Schicht  
( $\mu$ -Slide, n = 25 pro Fluenz).

Fluenz [ $\text{J}/\text{cm}^2$ ]	3T3-Zellen		3T3-Zellen	
	lebend	lebend	lebend	lebend
0,99	4	0	0	0
1,25	4	0	0	0
1,58	7	4	9	3

### C: Vergleich des einschichtigen Zelltransfers von 3T3- und K562-Zellen aus einer Gelatine- und Matrigel-Transferschicht

Für die transferierten 3T3-Zellen, sowohl aus einer Matrigel-Transferschicht als auch aus einer Gelatinetransferschicht, können bei allen eingesetzten Fluenzen vitale Zellen nach der Inkubation gefunden werden. Bei der maximal eingesetzten Fluenz von  $1,58 \text{ J}/\text{cm}^2$  beziehungsweise  $3,13 \text{ J}/\text{cm}^2$  werden tote Zellen übertragen. Für die übertragenen 3T3-Zellen werden ähnlich viele Zellen nach den Färbeprotokollen untersucht. Beim Transfer aus einer Gelatine-Transferschicht können 30 % der übertragenen Zellen untersucht werden, für den Transfer aus einer Matrigel-Transferschicht 25 %.

Für K562-Zellen werden beim Transfer aus beiden Hydrogelen wesentlich weniger Zellen im Empfängerträger detektiert. Beim Transfer aus einer Gelatine-Transferschicht beträgt diese nur 4 %. Für den Übertrag der K562-Zellen aus einer Matrigel-Transferschicht wird eine Wiederfindungsrate von 16 % bestimmt. Auf Grund der nur geringen Wiederfindungsrate der K562-Zellen sind Aussagen über einen Zusammenhang zwischen eingesetzter Fluenz und der Vitalität der Zellen nicht feststellbar.

Die niedrigeren Wiederfindungsraten des K562-Zelltransfers lassen sich dadurch erklären, dass es sich bei den verwendeten Zellen um Suspensionszellen handelt. Durch die Zugabe des Kulturmediums beziehungsweise der Fluoreszenzfarbstoffe, werden diese somit leichter aus dem Hydrogel ausgewaschen. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den transferierten 3T3-Zellen um adhärent wachsende Zellen. Durch die bessere Anhaftung der Zellen

an das Empfängerhydrogel sind diese ortsfest gebunden und können somit auch nach mehrtägiger Kultivierung auf Matrigel detektiert werden.

### **D: Zelltransfer mit zweischichtigen Transferträgern aus Gelatine**

Für die Vitalitätsuntersuchung des Zweischichtsystems wird eine Verfahrensüberprüfung durchgeführt. Dabei werden pro Fluenz 4 LIFT-Überträge durchgeführt und die Zellen im Anschluss durch eine Lebend-Tot-Färbung angefärbt.

Der Zelltransfer von zweifach überschichteten Gelatine-Transferträgern wird bei unterschiedlichen Fluenzen für die jeweils zu transferierenden Zellen durchgeführt. Der Zelltransfer für 3T3-Zellen wird bei Fluenzen zwischen  $0,79 \text{ J/cm}^2$  und  $1,99 \text{ J/cm}^2$  durchgeführt. Der Übertrag von K562-Zellen erfolgt bei Fluenzen zwischen  $0,79 \text{ J/cm}^2$  und  $3,96 \text{ J/cm}^2$ .

### **3T3-Zelltransfer mit zweischichtigen Transferträgern aus Gelatine**

Für alle eingesetzten Fluenzen können lebende Zellen nach dem LIFT-Prozess nachgewiesen werden. Die 3T3-Zellen werden in eine 5 %-ige Gelatine-Empfängerschicht transferiert. Es wird beobachtet, dass bei Mehrfachüberträgen von Zellen durch einen einzelnen LIFT-Prozess viele Zellen den Transfer überleben. Beim Einzelzelltransfer hingegen werden häufiger tote Zellen detektiert. Darüber hinaus werden bei Einzelüberträgen mit hohen Fluenzen mehr tote Zellen aufgefunden als bei Überträgen mit niedrigeren Fluenzen (siehe Bild 45). Eine mögliche Ursache für dieses Verhalten der Zellen ist die Strategie der LIFT-Überträge. Einzelne Zellen werden immer im Laserfokus übertragen. Wenn nun mehr als eine Zelle übertragen wird, so haben sich nicht alle übertragenen Zellen im Fokus befunden. Dies ist für die Vitalität der übertragenen Zellen positiv (siehe Bild 46).

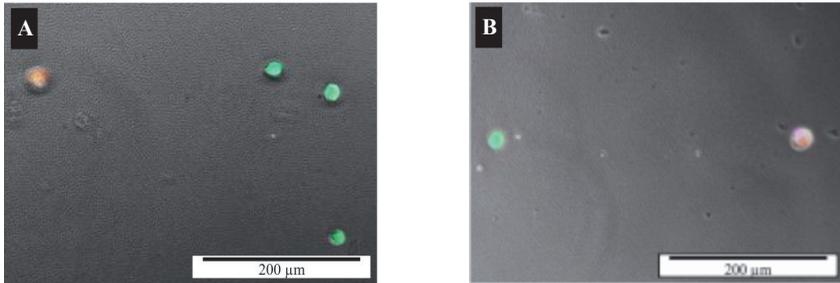


Bild 45: Zellen transferiert aus einer überschichteten Gelatine-Transferschicht in eine Gelatine-Empfängerschicht. Aufnahme 3 h nach dem LIFT-Prozess. Lebende 3T3-Zellen aus Zellübertrag sind grün, tote Zelle rot angefärbt. **A:** 3T3-Zellen transferiert mit einer Fluenz von  $1,99 \text{ J/cm}^2$ . **B:** Einzelübertrag von 3T3-Zellen transferiert mit einer Fluenz von  $0,99 \text{ J/cm}^2$ .

Für die aus zweifach beschichteten Gelatine-Transferträgern übertragenen 3T3-Zellen kann neben ihrer Vitalität auch die Adhäsion und Proliferation nachgewiesen werden. Die in die Matrigel-Empfängerschicht transferierten 3T3-Zellen wachsen als 3D-Kultur im  $\mu$ -Slide-Angiogenesis. Direkt nach dem LIFT sind die Zellen noch abgerundet. Bereits nach einem Tag kann beobachtet werden, dass die Zellen ihre Morphologie verändern und nach 48 h können auch Zellteilungen beobachtet werden. Die Zellen wachsen und proliferieren im Matrigel.

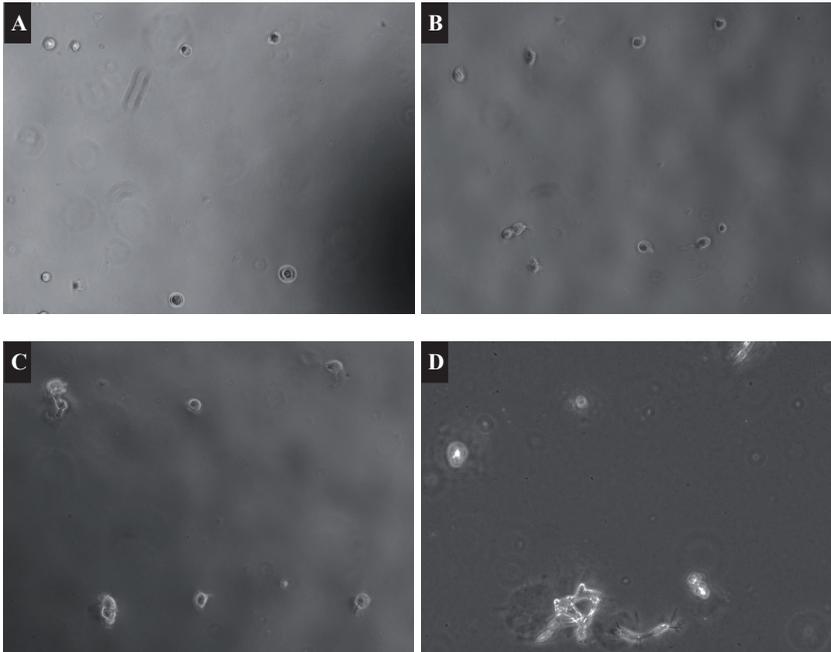


Bild 46: 3T3-Zellen transferiert aus einer überschichteten Gelatine-Transferschicht in eine Gelatine-Empfängerschicht. Es wird eine Fluenz von  $2,50 \text{ J/cm}^2$  eingesetzt. Die Zellen proliferieren nach dem Übertrag und bilden im Gel größere Strukturen. Die Zellen werden nach unterschiedlichen Zeiten mikroskopiert. **A:** Zellen direkt nach dem LIFT. **B:** Nach 24 h fangen die Zellen an zu wachsen. **C:** Nach 48 h sind geteilte Zellen zu sehen. **D:** Nach 120 h sind die Zellen dreidimensional im Matrigel gewachsen.

### **K562-Zelltransfer mit zweischichtigen Transferträgern aus Gelatine**

Die K562-Zellen werden in eine Empfängerschicht aus Matrigel übertragen. Die Zellen werden nach dem Übertrag mit einem Lebendfarbstoff angefärbt. Aus einem Zweischichtsystem übertragene Zellen weisen eine hohe Vitalität auf. Sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Fluenzen werden lebende Zellen detektiert (siehe Bild 47).

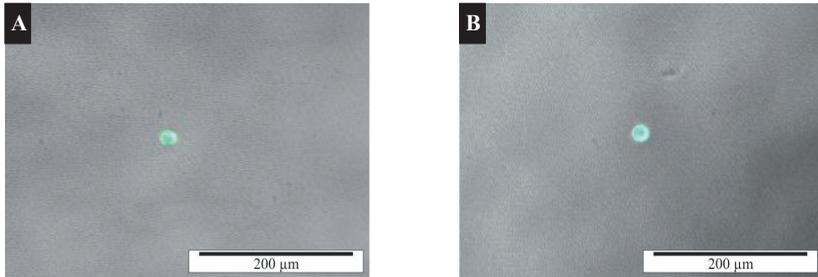


Bild 47: Zellen transferiert aus einem Zweischichtsystem in eine Matrigel-Empfängerschicht. Aufnahme 3 h nach dem LIFT-Prozess. **A:** Lebende K562-Zelle transferiert mit einer Fluenz von  $1,99 \text{ J/cm}^2$ . **B:** Lebende K562-Zelle transferiert mit einer Fluenz von  $0,99 \text{ J/cm}^2$ .

Werden die Zellen für einen längeren Zeitraum inkubiert, kann überprüft werden, ob diese noch teilungsfähig sind. Die Proliferation der K562-Zellen konnte nicht festgestellt werden. Die Zellen leben noch mehrere Tage nach dem Zelltransfer, sterben jedoch im weiteren Verlauf der Inkubation (siehe Bild 48).

Zusammenfassend für die Überträge des Zweischichtsystems kann festgestellt werden, dass sowohl K562-Zellen als auch 3T3-Zellen überleben. In einem weiterführenden Versuch werden humane Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) übertragen. Hierbei handelt es sich um primäre Zellen, die aus der Nabelschnur gewonnen werden. Dieser Zelltyp ist für viele Untersuchungen im Bereich der Blutgefäßbildung, Angiogenese, wichtig und kann beispielsweise für Tumormodelle eingesetzt werden. Auch für diese Zellen werden Parameter identifiziert, bei denen ein Transfer von vitalen Zellen ermöglicht wird.

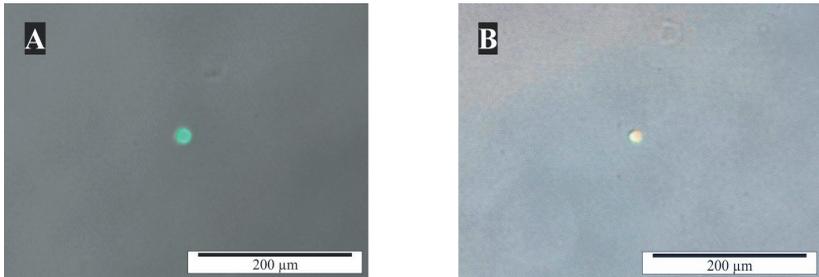


Bild 48: K562-Zellen transferiert aus einer überschichteten Gelatine-Transferschicht in eine Matrigel-Empfängerschicht. **A:** Lebende Zelle transferiert mit einer Fluenz von  $0,99 \text{ J/cm}^2$  Aufnahme einen Tag nach dem Transferprozess. **B:** Zellen durch den Transfer mit einer Fluenz von  $0,99 \text{ J/cm}^2$  tot. Aufnahmen 10 Tage nach dem Transferprozess.

### **Zusammenfassung der Zellvitalitätsversuche von einschichtigen und zweischichtigen Transferträgersystemen**

Für den Übertrag von Zellen aus dem Einschichtsystem kann deren Vitalität nach mehrtägiger Inkubation nachgewiesen werden. Gleiches gilt für Zellüberträge mit Hilfe des Zweischichtsystems. Eine Proliferation von übertragenen Einzelzellen, die aus dem Zweischichtsystem übertragen wurden, ist bisher ausschließlich für 3T3 Zellen nachgewiesen.

Ein großer Vorteil des Zweischichtsystems im Vergleich mit dem Einschichtsystem ist die merkliche Verbesserung der Vitalität der übertragenen Zellen. Die überschichteten Zellen liegen hier auf dem Hydrogel, statt darin eingebettet zu sein. Dadurch ist die Entfernung zur Absorberschicht größer. Auf Grund der größeren Entfernung der Zellen zur Absorberschicht ist der Effekt minimiert, den die Laserstrahlung auf das biologische Material hat. Somit sind diese besser vor dem Einfluss der eingebrachten Energie des Lasers geschützt.

Zudem sind die Zellen weiter von der entstehenden Dampfblase entfernt. Die durch die kollabierende Dampfblase entstehenden Scherkräfte haben einen geringeren Einfluss auf die Zellen. Dies wird dadurch untermauert, dass bei Überträgen, bei denen der Laserstrahl nicht direkt auf die Zellen gerichtet ist, die Zellen eine höhere Vitalität aufweisen. Die Zellen werden nicht direkt durch die Dampfblasenentstehung vom Transferträger auf den

Empfängerträger transportiert. Der entstehende Mikrostrahl nimmt Zellen, die auch weiter weg von der Absorberschicht liegen, mit auf.

### 6.2.2.5 Herstellung von Mustern mit Zellen

Mittels LIFT können einzelne Zellen übertragen werden. Diese Methode wird genutzt, Zellen in bestimmten Mustern anzuordnen. Damit kann letztlich das Zellverhalten untereinander untersucht werden, in Abhängigkeit der Lage eines oder mehrerer Zelltypen. Um die Funktionsweise zellulärer Systeme zu verstehen, müssen diese molekularbiologisch und zellbiologisch untersucht werden. Insbesondere adulte Stammzellen sind hier von großem Interesse, da aus ihnen neues Zellmaterial regeneriert wird. Sie befinden sich beispielsweise in sehr definierten Umgebungen im Körper. Um die Stammzellen besser untersuchen zu können, müssen Methoden entwickelt werden, um diese Stammzellnischen-Strukturen nachzubauen. Hierfür ist das LIFT-Verfahren eine vielversprechende Technologie, um gezielt einzelne Zellen in eine definierte 3D-Matrix zu platzieren und diese für nachfolgende Untersuchungen zugänglich zu machen.<sup>79,80</sup>

Um dies zu demonstrieren, werden K562-Zellen eingesetzt. Die erreichbare Präzision von  $\pm 10 \mu\text{m}$  bezüglich der Druckgenauigkeit ermöglicht Zellen exakt auf dem Empfängerträger zu positionieren (siehe Kapitel 6.1.1.3). Zudem liegen die Zellen bei der Wahl des optimalen Bereichs des Prozessfensters im gleichen Bereich des Spots in einem Abstand von ca.  $20 \mu\text{m}$  zur Spotmitte.

Dies kann genutzt werden, um verschiedene Muster mit Zellen zu drucken und diese für weiterführende Experimente einzusetzen. K562-Zellen werden gezielt übertragen und lassen sich in einem vorgegebenen Muster anordnen. Beim Druck von Zellen in einem Abstand von  $250 \mu\text{m}$  lässt sich sehr gut ein reproduzierbares Muster generieren (siehe Bild 49 A). Wird der Abstand auf  $150 \mu\text{m}$  verringert, ist die Zellpositionierung nicht mehr reproduzierbar zu realisieren. Die Zellen befinden sich nicht mehr an den vorgesehenen Positionen (siehe Bild 49 B).

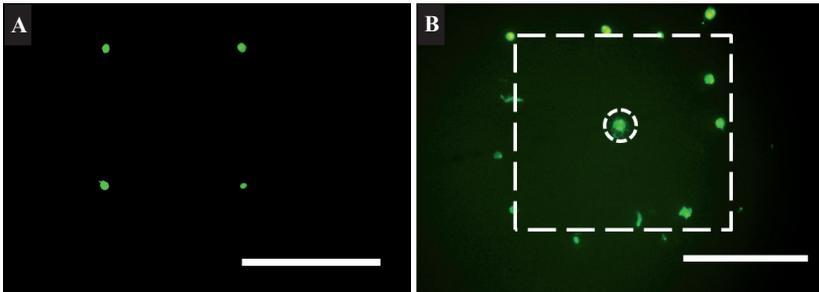


Bild 49: K562-Zellen transferiert aus einer überschichteten Matrigel-Transferschicht in eine Matrigel-Empfängerschicht. Fluenz:  $1,25 \text{ J/cm}^2$ , Bildmaßstab:  $250 \text{ µm}$ . **A:** Vier Zellen im Abstand von  $250 \text{ µm}$  sind gezeigt. **B:** K562-Zellen im Abstand von  $150 \text{ µm}$  in quadratischem Muster ( $4 \times 4$  Zellen) mit einer Zelle im Zentrum. Die Zellen zeigen eine Varianz in ihrer Positioniergenauigkeit auf.

Zudem können auch unterschiedliche Zellen kombiniert gedruckt werden. Dies ist am Druck von K562-Zellen demonstriert worden. Dabei sind Zellen sowohl grün, als auch blau eingefärbt worden. In einem ersten Schritt werden die blau eingefärbten Zellen auf einen Empfängerträger übertragen. Danach werden die grün eingefärbten Zellen auf die gleichen Positionen übertragen (siehe Bild 50). Versuchsziel ist es hier, zu demonstrieren, dass gezielt mehrere Zellen (blau) mit einzelnen Zellen (grün) in eine räumliche Nähe gebracht werden können (siehe Bild 51).

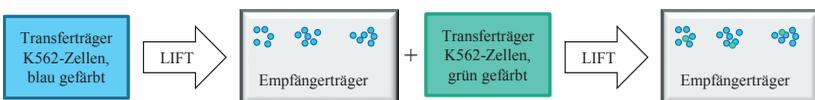


Bild 50: Versuchsablauf für das Drucken von unterschiedlichen Zellen auf einen Empfängerträger.

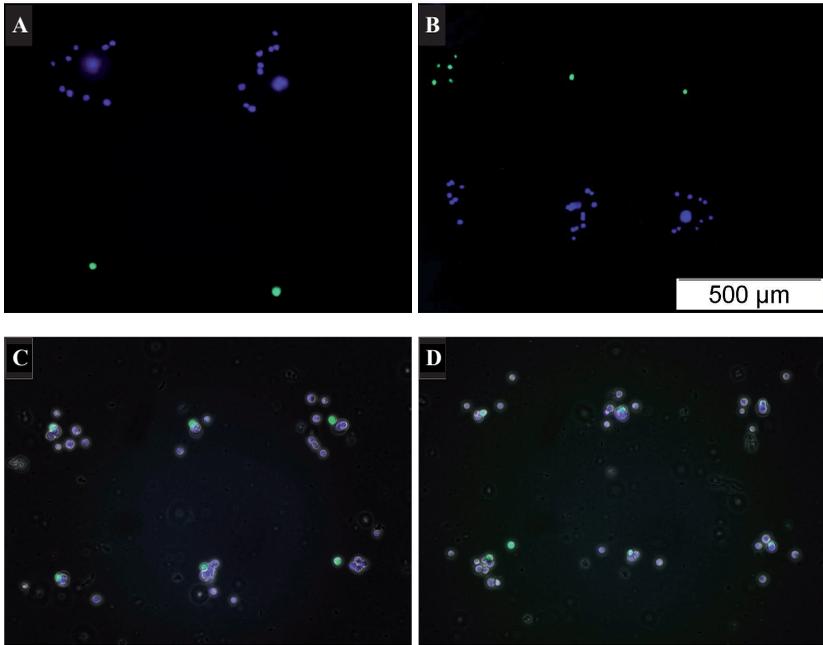


Bild 51: Muster aus zwei unterschiedlich angefärbten K562-Zellen. Die DAPI-Lebendfärbung ist blau, die Calcein-AM-Lebendfärbung grün dargestellt. **A und B:** Die Zellen können entweder in unterschiedlichen Abständen zueinander positioniert werden. **C und D:** Zellen können ineinander gedrückt werden. Dabei ist es möglich, einen Zelltyp in einer großen Anzahl und einen zweiten Zelltyp gezielt als Einzelzelle zu positionieren.

## 7 Diskussion und Ausblick

### 7.1 Diskussion

LIFT eignet sich hervorragend zum gezielten Positionieren von Proteinen. Diese erleiden bei dem Prozess keine Schädigung und behalten ihre Funktionalität bei.<sup>81,82</sup> Durch das eingesetzte galvanometrische Scannersystem kann in kurzer Zeit eine Vielzahl von Proteinspots übertragen werden. Dabei sind Repetitionsraten von 1000 Hz möglich. Mit den in dieser Arbeit aufgebauten Systemen können somit Ergebnisse, wie in der Literatur beschrieben, erzielt werden bei hoher Flexibilität und relativ günstigen Herstellungskosten.

Zur parallelen, molekularbiologischen Analyse von DNA/RNA oder Proteinen werden beispielsweise Microarrays mit vielen Tausend Sonden eingesetzt. Diese lassen sich mit einem LIFT-System sehr schnell und reproduzierbar herstellen. Durch LIFT ist es möglich diese Sonden sowohl in gelöster Form als auch in getrockneter Form auf den Microarray zu übertragen.<sup>34,83,84</sup> Dies erlaubt eine neuartige Formulierung der Sonden. Um HTS aufzubauen, ist LIFT ein interessanter und vielversprechender Ansatz. Dabei kann durch das LIFT-Verfahren die Herstellung solcher Microarrays deutlich beschleunigt werden, da beispielsweise im Vergleich zu Pipetierrobotern langwierige Waschschritte ersetzt werden können. Dies lässt sich auch auf andere Materialsysteme und Zellen anwenden.<sup>43</sup>

In dieser Arbeit wird die Positioniergenauigkeit der transferierten Zellen, bedingt durch die Zugabe des Kulturmediums sowie der Fluoreszenzfarbstoffe, nach dem Übertrag zum Teil beeinträchtigt. Somit können sie nicht oder nur schwer wieder untersucht werden. Zusätzlich quillt das Hydrogel bei der Zugabe von Nährmedium. Hierdurch können sich auch die Positionen der transferierten Zellen verändern, wodurch sie einer erneuten Detektion schwerer zugänglich werden. Zudem wird beobachtet, dass nach einmaliger Fluoreszenzfärbung der transferierten Zellen ein starkes Hintergrundrauschen auftritt. Dadurch können solche Zellen im weiteren Verlauf erschwert auf ihre Vitalität untersucht werden. Dies lässt sich beispielsweise durch die Auswahl anderer Fluoreszenzfarbstoffe verhindern, wie Hoechst 33342 oder Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. Auch eine hydrostatische Aufladung der Kunststoff-Empfängerschicht kann zu einer zusätzlichen Positionier-

ungenauigkeit führen. Die hier eingesetzten  $\mu$ -Slides bestehen aus Kunststoffen, die prinzipiell dieser Problematik unterliegen. Dies kann durch eine Entladungsstation gelöst werden.

Insbesondere K562-Zellen, als Suspensionskultur, werden leicht ausgewaschen. Daher können keine endgültigen Aussagen über den vitalen Zelltransfer des Zweischichtsystems getroffen werden. Die Entwicklung einer definierten Transferschicht für Zweischichtsysteme zum Zellübertrag steht für weitere Experimente im Vordergrund. Des Weiteren kann bei den Ergebnissen beobachtet werden, dass der Übertrag bei höheren Fluenzen im Prozessfenster besser funktioniert hat und mehr Zellen in der Kultur geblieben sind. Dies liegt voraussichtlich daran, dass die Zellen tiefer in die Gelschicht auf dem Empfängerträger gedrückt wurden und sie dadurch besser von äußeren Einflüssen geschützt sind. Die Eindringtiefe ins Hydrogel ist somit ein wichtiger Faktor für die Folgebehandlung der gedruckten Zellen.

Für Zellversuche ist LIFTSYS<sup>TM</sup> mit anderen Druck- und Positionierverfahren für einzelne Zellen zu vergleichen. Ein kommerzielles System ist der CellCelector<sup>TM</sup> der Firma ALS Automated Lab Solutions GmbH, Jena. Hier werden durch einen Pipettiervorgang Zellen aus der Kulturschale direkt entnommen. Das System kann direkt mit einem handelsüblichen Mikroskop und der zugehörigen Software betrieben werden. Somit handelt es sich um einen Zellpicker, der es ermöglicht, einzelne Zellen auszusuchen, sodass diese gezielt vermehrt werden können.<sup>85,86</sup> Dadurch lassen sich mit dem CellCollector<sup>TM</sup> im Vergleich zu einem LIFT-Prozess zwar ebenfalls einzelne Zellen gezielt aussuchen und vermehren, eine Positionierung der Zellen ist jedoch im Gegensatz zu LIFT nicht möglich.

Ein weiterer Ansatz Zellen einzeln zu übertragen, ist das im Folgenden beschriebene Verfahren. Dabei ist ein Kamerasystem mit angepasster Optik so verbaut, dass die Druckdüse während des Prozesses beobachtet werden kann. Die Düse ist für die Verteilung der Zellen speziell modifiziert. Folgende Komponenten sind integriert:

- Zell-Fokussierkanäle
- Zell-Detektionselektroden
- Tropfengenerator

Dieser Düsenaufbau ist mit einem Piezoaktuator verbunden, wodurch kleine Tropfengrößen im Pikoliterbereich Volumen generiert werden können. Werden Zellen während des

Drucks in einem Tropfen detektiert, so wird der Druckprozess zugelassen und die Zelle wird positioniert. Wird keine oder mehr als eine Zelle in einem Tropfen detektiert, so wird dieser verworfen. Mit dem Aufbau lassen sich Zellen in wässriger Lösung einzeln positionieren.<sup>87</sup> Dies stellt neben LIFT eine weitere Technologie dar, einzelne Zellen zu positionieren. Mittels Inkjet ist jedoch das Drucken von Zelllösungen und stark proteinhaltigen Materialien schwierig, da die Düsen verstopfen können.<sup>88</sup> Diese Einschränkung kann mittels des LIFT-Verfahrens umgangen werden.

Die aktuelle Gerätetechnik erlaubt nicht, Zellen kontrolliert und schonend mit hoher Positionierpräzision zu übertragen. Daher ist das LIFT-Verfahren sehr vielversprechend, da hiermit gezielt einzelne Zellen zunächst analysiert und im Anschluss positioniert werden können. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten zum LIFT-Verfahren für Einzelzellüberträge sind in dem hier beschriebenen System die Achsen automatisierbar über eine SPS-Schnittstelle ansteuerbar.<sup>9</sup> Diese Methode bietet somit das Potential in der Anwendung zur Herstellung von HTS und HCS.<sup>89</sup>

## 7.2 Ausblick

Durch die Integration einer Durchlichtbeleuchtung beim LIFT-Verfahren wird die Selektivität des Transferprozesses für bestimmte ausgewählte Zellen erhöht. Um diese Eigenschaft noch weiter zu verbessern, kann eine Fluoreszenzdiagnostik in den Aufbau integriert werden. Dadurch wird es möglich, unterschiedlich markierte Zellen auf einem Transferträger durch das LIFT-Verfahren zu sortieren und positioniert zu übertragen (siehe Bild 52). Dabei lassen sich auch Zellkonstrukte aus humanem Material aufbauen. Mittels der induzierten pluripotenten Stammzelltechnologie lassen sich sehr viele Zelltypen aus menschlichem Material aufbauen.<sup>90</sup> Dabei werden Körperzellen umprogrammiert, sodass sie sich wie pluripotente Stammzellen verhalten, aus denen wiederum viele unterschiedliche Zelltypen hergestellt werden können. Werden diese Zellen nun mittels des LIFT-Verfahrens gezielt positioniert und daraus HCS-Testsysteme aufgebaut, sind für die Forschung und Entwicklung in der pharmazeutischen Industrie neue Testsysteme realisierbar.

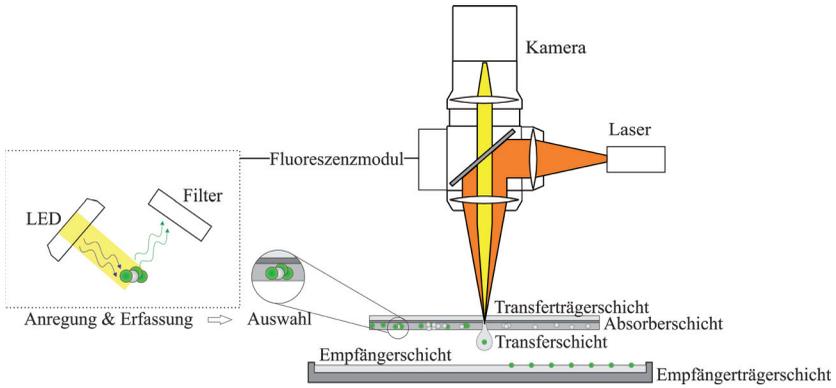


Bild 52: Schematische Darstellung der Fluoreszenzerfassung in LIFT-Experimenten.

Für eine Verbesserung der Vitalität muss der LIFT-Prozess für Zellüberträge in der Bestrahlungsstrategie angepasst werden. Bisher sind Zellen immer zentriert im Laserfokus anvisiert und übertragen worden. Wie in Kapitel 6.2.2.4 beschrieben, ist es für die Vitalität der Zellen gut, wenn der Laserfokus nicht direkt auf sie eingestellt wird. Dies kann auch für den Einzelzellübertrag eingesetzt werden. Eine einzelne Zelle wird gezielt an eine Randlage oder auch außerhalb des Fokus positioniert (siehe Bild 53). Dabei wird sie trotzdem mit dem Matrixmaterial direkt übertragen, ist aber von der Dampfblase weiter entfernt und somit von einer möglichen Membranschädigung geschützt.

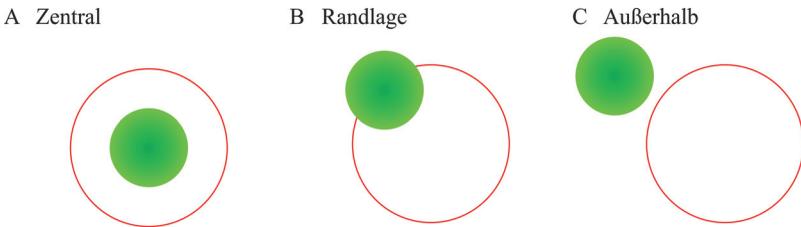


Bild 53 Fokussierungsstrategie für den LIFT-Prozess. **A:** Bisher wurden Zellen immer zentrisch fokussiert um einen Übertrag zu erzielen. **B und C:** Für die Überlebensrate von Zellen kann es bedeutend sein, die Fokussierung in den Randbereich oder sogar außerhalb des Laserfokus zu verlegen.

Die eingesetzte Wellenlänge ist ein weiterer Parameter für zukünftige Arbeiten. Beim Einsatz eines Lasers mit der Wellenlänge  $2\ \mu\text{m}$  ist die Absorption von Wasser um 3 Größenordnungen größer als im UV-Bereich bis  $200\ \text{nm}$ . Dies macht die Absorberschicht überflüssig und die Dampfblase kann direkt im Hydrogel erzeugt werden. Dadurch können negative Effekte durch Nano-Partikel aus der Absorberschicht vermieden werden, die auf der Empfängerschicht verbleiben. Um bei diesem Ansatz eine mögliche Schädigung der Zellen durch die Laserstrahlung zu vermeiden, ist beispielsweise das in dieser Arbeit untersuchte Zweischichtsystem sinnvoll. Hiermit werden die Zellen möglichst weit weg von der Dampfblase platziert und dadurch eine mögliche Schädigung durch die Laserstrahlung minimiert.



## 8 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit ist es, eine LIFT-Anlage zu konzeptionieren und aufzubauen, die es ermöglicht, entweder HTS- oder HCS-Testsysteme herzustellen. Im Anschluss wird mit diesen Anlagen gezeigt, dass sich damit unterschiedliche biologische Materialien - wie Proteine und Zellen - funktional und vital übertragen lassen.

Im Rahmen der Arbeit wird gezeigt, dass kompakte Microchiplasersysteme geeignet für den Aufbau von LIFT-Anlagen sind. Mit diesen Anlagen lassen sich sowohl Proteine als auch Zellen sehr schnell und gezielt auf Empfängerträger übertragen.

Die Übertragung von Proteinen wird beispielsweise für die Herstellung von Microarrays eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit werden sowohl Hydrogele, in Glycerin gelöste Proteine und getrocknete Proteinschichten untersucht. Für die Materialien wird ein reproduzierbarer Übertrag gezeigt.

Die Tropfengröße auf dem Empfängerträger wird zum einen von der eingesetzten Fluenz und zum anderen von der Oberflächeneigenschaft des Empfängerträgers beeinflusst. Werden unterschiedliche Gläser eingesetzt, kann bei gleichbleibender Fluenz die Tropfengröße um den Faktor 1,6 variiert werden. Je nach zu übertragenem Material und Empfängerträger lassen sich Tropfen von 10  $\mu\text{m}$  bis zu 400  $\mu\text{m}$  Durchmesser herstellen.

Für die Anforderung der Herstellung von HTS-Microarrays müssen viele Proteinspots erzeugt werden. Folglich wird für die Auslegung des LIFT-Systems ein glavanometrischer Scanner eingesetzt. Dabei eignet sich das Verfahren um schnell und einfach eine große Anzahl an Tropfen zu übertragen. Die reproduzierbaren Überträge können eingesetzt werden, um gezielt Microarrays herzustellen.

Dadurch kann LIFT eingesetzt werden um HTS herzustellen, wodurch die Verfahrenszeiten gering gehalten werden. Auch wässrige Lösungen können schnell verarbeitet werden und prozessbedingte negative Eigenschaften, wie das Austrocknen einer Transferschicht, minimiert werden.

Das LIFT-Verfahren eignet sich, Partikel und Zellen zu übertragen. Hierfür wird ein Kamera-System in den Strahlengang integriert. Zusätzlich wird der Aufbau mit einer Durch-

lichtbeleuchtung ausgestattet. Trotz metallischer Absorberschicht werden die Zellen in der Transferschicht detektiert.

Anhand des Übertrags von Partikeln aus Polystyrol wird der Prozess zunächst etabliert. Da ihre Dichte ähnlich der von Zellen ist, werden zusätzlich nähere Untersuchungen zur Übertragungspräzision durchgeführt. Hier werden in über 70 % der Fälle die Partikel einzeln übertragen. Bei 15 % der Überträge werden mehr als ein Partikel übertragen. Somit eignet sich das LIFT-Verfahren hervorragend um gezielt einzelne Objekte zu positionieren.

Zur näheren Charakterisierung des LIFT-Vorgangs wird die Lage der übertragenen Partikel für verschiedene Fluenzen untersucht. Für unterschiedliche Fluenzen im Mikrostrahlbereich liegen verschiedene Vorzugsorte der Partikel im Tropfen vor. Der eingesetzte Laserstrahl ist nicht ideal gaußförmig. Dadurch werden die Partikel beim Übertrag in eine Vorzugsrichtung abgelenkt. Dies bestimmt die Partikellage innerhalb des Tropfens. Sie wird durch den Abstand zum Tropfenmittelpunkt und der radialen Lage beschrieben. Im unteren Fluenzbereich des Mikrostrahls werden die Partikel innerhalb des Tropfens stark gestreut. Bei mittleren Fluenzen ist die Partikellage näher am Tropfenmittelpunkt und die Ablenkung erfolgt in eine definierte Richtung. Wird die Fluenz weiter erhöht, so nimmt die Streuung der übertragenen Partikel innerhalb des Tropfens wieder zu. Somit kann festgehalten werden, dass die Ausbildung des Mikrostrahls in den mittleren Bereichen des Prozessfensters am stabilsten ist.

Die Ergebnisse aus den Partikeltransfers werden auf den Übertrag von einzelnen Zellen angewandt. Für den Übertrag von Zellen aus einem Einsichtssystem aus Matrigel und Gelatine lassen sich gezielt einzelne Zellen transferieren. Die Zellen werden bei zunehmender Leistung im Prozessfenster stärker geschädigt. Es kann auch festgehalten werden, dass Überträge aus Matrigel bei niedrigeren Fluenzen stattfinden als aus 5 %-iger Gelatine. Um die übertragenen Zellen weniger zu schädigen, wird die Transferschicht als ein Zweischichtsystem aufgebaut. Hier können für Fibroblasten und K562-Zellen erfolgreich einzelne Zellen vital übertragen werden, die im Anschluss proliferieren.

Als Demonstrator für einen späteren Aufbau von HCS-Testsystemen werden K562-Zellen mittels LIFT in vorgegebene Muster angeordnet. Diese erste Demonstrationsstruktur zeigt den Aufbau gezielter Zellmuster, die als Testsysteme eingesetzt und untersucht werden können. Dieser Effekt muss noch weiterführend untersucht werden, um ein besseres Verständnis für die Positioniergenauigkeit zu gewinnen. Die Arbeit gibt des Weiteren einen

Ausblick in anknüpfende gerätetechnische Verbesserungsmöglichkeiten für die gezielte Positionierung einzelner Zellen. Zudem lässt sich durch die Anpassung der Strahlformung die Position von Zellen im Tropfen gezielt beeinflussen. Dies lässt sich mit unterschiedlichen optischen Komponenten wie asphärischen Linsen oder diffraktive optische Elemente bewirken. Verglichen mit anderen Zellpositioniersystemen eröffnet LIFT weitere Möglichkeiten und Chancen neue HTS und vor allem HCS aufzubauen. Damit lassen sich in Zukunft standardisiert in vitro Testsysteme für unterschiedliche Anwendungen aufbauen.



## 9 Literaturverzeichnis

1. Vandenbroucke B, Kruth J. Selective laser melting of biocompatible metals for rapid manufacturing of medical parts. *Rapid Prototyping Journal* 2007;13:196–203.
2. Derby B. Bioprinting: inkjet printing proteins and hybrid cell-containing materials and structures. *Journal of Materials Chemistry* 2008;18:5717.
3. Phillippi JA, Miller E, Weiss L, Huard J, Waggoner A, Campbell P. Microenvironments Engineered by Inkjet Bioprinting Spatially Direct Adult Stem Cells Toward Muscle- and Bone-Like Subpopulations. *Stem Cells* 2008;26:127–134.
4. Lin Y, Gallucci GO, Buser D, Bosshardt D, Belser UC, Yelick PC. Bioengineered Periodontal Tissue Formed on Titanium Dental Implants. *Journal of Dental Research* 2011;90:251–256.
5. Dutton G. 3D Printing May Revolutionize Drug R&D. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 2013;33:10, 12.
6. Ringeisen BR, Piqué A, Chrisey DB. Next-generation applications for laser-based tools in biotechnology. *Am Clin Lab* 2001;20:36–38.
7. Chrisey D, Pique A, Fitz-Gerald J, Ringeisen B, Mohdi R. Laser direct writing builds biostructures. *Laser Focus World* 2000;36:113–116.
8. Ringeisen BR. Generation of whole cell, living or non-living tissue, protein, DNA or RNA microarrays by laser transfer 152. US;2002-68364(2002071901); 2002. 13 p.
9. Othon CM, Wu X, Anders JJ, Ringeisen BR. Single-cell printing to form three-dimensional lines of olfactory ensheathing cells. *Biomed Mater* 2008;3:34101.
10. Nakamura M, Kobayashi A, Takagi F, Watanabe A, Hiruma Y, Ohuchi K, Iwasaki Y, Horie M, Morita I, Takatani S. Biocompatible Inkjet Printing Technique for Designed Seeding of Individual Living Cells. *Tissue Engineering* 2005;11:1658–1666.
11. Nishioka GM, Markey AA, Holloway CK. Protein Damage in Drop-on-Demand Printers. *Journal of the American Chemical Society* 2004;126:16320–16321.
12. Setti L, Fraleoni-Morgera A, Ballarin B, Filippini A, Frascaro D, Piana C. An amperometric glucose biosensor prototype fabricated by thermal inkjet printing. *Biosensors and Bioelectronics* 2005;20:2019–2026.
13. Ilkhanizadeh S, Teixeira AI, Hermanson O. Inkjet printing of macromolecules on hydrogels to steer neural stem cell differentiation. *Biomaterials* 2007;28:3936–3943.

14. Xu T., Jin J, Gregory C., Hickman J. J. Inkjet printing of viable mammalian cells. *Bio-materials* 2005;93–99.
15. Nakamura M, Kobayashi A, Takagi F, Watanabe A, Hiruma Y, Ohuchi K, Iwasaki Y, Horie M, Morita I, Takatani S. Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells. *Tissue Engineering* 2005;11:1658–1666.
16. Calvert P. Inkjet Printing for Materials and Devices. *Chemistry of Materials* 2001;13:3299–3305.
17. Calvert P. Printing cells. *Science (Washington, DC, U. S.)* 2007;318:208–209.
18. Lemmo AV, Fisher JT, Geysen HM, Rose DJ. Characterization of an Inkjet Chemical Microdispenser for Combinatorial Library Synthesis. *Analytical Chemistry* 1997;69:543–551.
19. Yusof A, Keegan H, Spillane CD, Sheils OM, Martin CM, O'Leary JJ, Zengerle R, Koltay P. Inkjet-like printing of single-cells. *Lab Chip* 2011;11:2447.
20. Pfister A, Landers R, Laib A, Hübner U, Schmelzeisen R, Müllhaupt R. Biofunctional rapid prototyping for tissue-engineering applications: 3D bioplotting versus 3D printing. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2004;42:624–638.
21. Peltola SM, Melchels FPW, Grijpma DW, Kellomäki M. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Annals of medicine* 2008;40:268–280.
22. Wang F, Shor L, Darling A, Khalil S, Sun W, Güçeri S, Lau A. Precision extruding deposition and characterization of cellular poly-epsilon-caprolactone tissue scaffolds. *Rapid Prototyping Journal* 2004;10:42–49.
23. Xiong Z, Yan Y, Zhang R, Sun L. Fabrication of porous poly(l-lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering via precise extrusion. *Scripta Materialia* 2001;45:773–779.
24. Sugiura S, Oda T, Izumida Y, Aoyagi Y, Satake M, Ochiai A, Ohkohchi N, Nakajima M. Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array. *Biomaterials* 2005;26:3327–3331.
25. Dupuy B, Gin H, Baquey C, Ducassou D. In situ polymerization of a microencapsulating medium round living cells. *Journal of Biomedical Materials Research* 1988;22:1061–1070.
26. Wüst S, Müller R, Hofmann S. Controlled Positioning of Cells in Biomaterials - Approaches Towards 3D Tissue Printing. *JFB* 2011;2:119–154.

27. Chen CJ, Gilgen HH, Osgood RM. Resonant, optical growth of submicrometer metal gratings. *Optics Letters* 1985;10:173.
28. Bohandy J, Kim BF, Adrian FJ. Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser. *Journal of Applied Physics* 1986;60:1538.
29. Ringeisen BR, Chrisey DB, Pique A, Krizman D, Brooks M, Spargo B, Auyeng R, Wu P. Direct write technology as a tool to form patterns of living cells and active biomolecules. *American Biotechnology Laboratory* 2001;19:42,44.
30. Barron JA, Ringeisen BR, Spargo B. Laser forward transfer of biomaterials. *Proceedings of the ACS Division of Polymeric Materials: Science & Engineering* 2003;89:223.
31. Young D, Auyeng R, Pique A, Chrisey D, Dlott DD. Plume and jetting regimes in a laser based forward transfer process as observed by time-resolved optical microscopy. *Applied Surface Science* 2002;197-198:181–187.
32. Barron JA, Wu P, Ladouceur HD, Ringeisen BR. Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. *Biomed Microdevices* 2004;6:139–147.
33. Farsari M, Dinca V, Dinescu M, Georgiou S, Fotakis C. Construction of 2D and 3D biomolecules structures using fs lasers. *International Journal of Nanomanufacturing* 2007;1:762–770.
34. Dinca V, Farsari M, Kafetzopoulos D, Popescu A, Dinescu M, Fotakis C. Patterning parameters for biomolecules microarrays constructed with nanosecond and femtosecond UV lasers 92. *Thin Solid Films* 2008;516:6504–6511.
35. Farsari M, Dinca V, Dinescu M, Drakakis TS, Fotakis C. 2D and 3D printing of biomolecules employing femtosecond lasers. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering* 2007;6606:66061F/1.
36. Barron JA, Krizman DB, Ringeisen BR. Laser Printing of Single Cells: Statistical Analysis, Cell Viability, and Stress. *Annals of Biomedical Engineering* 2005;33:121–130.
37. Barron JA. Biological laser printing as an alternative to traditional protein arrays. *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering* 2005;5699:517–525.

38. Duocastella M, Colina M, Fernandez-Pradas JM, Serra P, Morenza JL. Study of the laser-induced forward transfer of liquids for laser bioprinting. *Applied Surface Science* 2007;253:7855–7859.
39. Duocastella M, Fernández-Pradas JM, Serra P, Morenza JL. Jet formation in the laser forward transfer of liquids. *Applied Physics A* 2008;93:453–456.
40. Duocastella M, Fernández-Pradas JM, Morenza JL, Serra P. Time-resolved imaging of the laser forward transfer of liquids. *Journal of Applied Physics* 2009;106:84907.
41. Guillemot F, Souquet A, Catros S, Guillotin B. Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering. *Nanomedicine* 2010;5:507–515.
42. Guillemot F, Guillotin B, Fontaine A, Ali M, Catros S, Kériquel V, Fricain J, Rémy M, Bareille R, Amédée-Vilamitjana J. Laser-assisted bioprinting to deal with tissue complexity in regenerative medicine. *MRS Bulletin* 2011;36:1015–1019.
43. Guillemot F, Souquet A, Catros S, Guillotin B, Lopez J, Faucon M, Pippenger B, Bareille R, Rémy M, Bellance S, Chabassier P, Fricain JC, Amédée J. High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 2010;6:2494–2500.
44. Unger C, Gruene M, Koch L, Koch J, Chichkov BN. Time-resolved imaging of hydrogel printing via laser-induced forward transfer. *Applied Physics A* 2010.
45. Gruene M, Unger C, Koch L, Deiwick A, Chichkov B. Dispensing pico to nanolitre of a natural hydrogel by laser-assisted bioprinting. *BioMedical Engineering OnLine* 2011;10:19.
46. Kuznetsov AI, Unger C, Koch J, Chichkov BN. Laser-induced jet formation and droplet ejection from thin metal films. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* 2012;106:479–487.
47. Ovsianikov A, Gruene M, Pflaum M, Koch L, Maiorana F, Wilhelmi M, Haverich A, Chichkov B. Laser printing of cells into 3D scaffolds. *Biofabrication* 2010;2:14104.
48. Arnold CB, Serra P, Piqué A. Laser Direct-Write Techniques for Printing of Complex Materials. *MRS Bulletin* 2007;32:23–32.
49. Barron J, Ringeisen BR, Kim H, Wu P. Biological laser printing via indirect photon-biomaterial interactions(7294367); 2007.  
<http://www.freepatentsonline.com/7294367.html>.

50. Poprawe R, editor (2011-2012). Tailored light. RWTH edition. Berlin: Springer. 1 online resource (2 v.).
51. Enders D, Rijkse C, Bremus-Köbberling E, Gillner A, Köbberling J. A triazene-based new photolabile linker in solid phase chemistry. *Tetrahedron Letters* 2004;45:2839–2841.
52. Nagel M, Hany R, Lippert T, Molberg M, Nüesch FA, Rentsch D. Aryltriazene Photopolymers for UV-Laser Applications: Improved Synthesis and Photodecomposition Study. *Macromolecular Chemistry and Physics* 2007;208:277–286.
53. Doraiswamy A, Narayan R, Lippert T, Urech L, Wokaun A, Nagel M, Hopp B, Dincescu M, Modi R, Auyeng R. Excimer laser forward transfer of mammalian cells using a novel triazene absorbing layer. *Applied Surface Science* 2006;252:4743–4747.
54. Hann MM, Oprea TI. Pursuing the leadlikeness concept in pharmaceutical research. *Current opinion in chemical biology* 2004;8:255–263.
55. Bleicher KH, Böhm H, Müller K, Alanine AI. A guide to drug discovery: Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003;2:369–378.
56. Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:2480–2487.
57. Bremus-Koebberling EA, Beckemper S, Koch B, Gillner A. Nano structures via laser interference patterning for guided cell growth of neuronal cells. *Journal of Laser Applications* 2012;24:42013.
58. Kluger PJ, Panas M, Schober L, Tovar, Guenter E. M., Mertsching H, Borchers K. Amino- and Carboxy-functionalized Nano- and Microstructured Surfaces for Evaluating the Impact of Non-biological Stimuli on Adhesion, Proliferation and Differentiation of Primary Skin-Cells. *MRS Proceedings* 2009;1187.
59. Bernerd F, Asselineau D. An organotypic model of skin to study photodamage and photoprotection in vitro. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2008;58:S155–S159.
60. Burg KJ, Boland T. Minimally invasive tissue engineering composites and cell printing. *IEEE engineering in medicine and biology magazine the quarterly magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society* 2003;22:84–91.

61. Gugala Z, Gogolewski S. In vitro growth and activity of primary chondrocytes on a resorbable polylactide three-dimensional scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000;49:183–191.
62. Dumitriu S, editor (2002). *Polymeric biomaterials*, 2nd edn. New York: Marcel Dekker, Inc. 1168 pages.
63. Black J, editor (2006). *Biological performance of materials: Fundamentals of biocompatibility*, 4th edn. Boca Raton: CRC Taylor & Francis. 497 pages.
64. Recum A von, Jacobi JE, editors (1999). *Handbook of biomaterials evaluation: Scientific, technical, and clinical testing of implant materials*, 2nd edn. Philadelphia, PA: Taylor & Francis. xix, 915.
65. Kim KS, Park SJ, Yang J, Jeon J, Bhang SH, Kim B, Hahn SK. Injectable hyaluronic acid–tyramine hydrogels for the treatment of rheumatoid arthritis. *Acta Biomaterialia* 2011;7:666–674.
66. Deville S, Saiz E, Tomsia AP. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:5480–5489.
67. Yang S, Leong K, Du Z, Chua C. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering* 2001;7:679–689.
68. Zhao F, Yin Y, Lu WW, Leong JC, Zhang W, Zhang J, Zhang M, Yao K. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials* 2002;23:3227–3234.
69. Lindner M, Hoeges S, Meiners W, Wissenbach K, Smeets R, Telle R, Poprawe R, Fischer H. Manufacturing of individual biodegradable bone substitute implants using selective laser melting technique. *Journal of biomedical materials research. Part A* 2011;97:466–471.
70. Manoj Kumar Sharma. *Optimization of Laser Induced Forward Transfer by Finite Element Modeling*. Stockholm, Sweden; 2013.
71. Riester D, Genov S, Engelhardt S, Seiler N, Weber A, Bremus-Koebberling E, Gillner A. Laser Induced Forward Transfer: A Compact Machine. *Proceedings of LPM2010 - the 11th International Symposium on Laser Precision Microfabrication*; 2010.
72. Riester D, Özmet A, Wehner M. Laser Tool for Single Cell Transfer. *JLMN* 2014;9:93–97.

73. Genov S, Baier M, Riester D, Tovar GE, Hirth T, Weber A. Native proteins in ultrathin dried trehalose films on titanium coated glass and cyclo-olefine polymer foils for the Laser-Induced-Forward Transfer process: Proceedings European Coating Symposium; 2009:159–162.
74. Genov S, Riester D, Hirth T, Tovar G, Borchers K, Weber A. Preparation and characterisation of dry thin native protein trehalose films on titanium-coated cyclo-olefin polymer (COP) foil generated by spin-coating/drying process and applied for protein transfer by Laser-Induced-Forward Transfer (LIFT). Chemical Engineering and Processing: Process Intensification; 2010:558–564.
75. Magdassi S, editor (2009). The chemistry of inkjet jets. World Scientific Publishing Company.
76. Riester D, Özmert A., Ungers M., Wehner M. What you see is what you print: single cell transfer. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2012:374.
77. Hellman, Amy Noel Stacy. Pulsed laser microbeams for cellular manipulation: Applications in cell biology and microfluidics. La Jolla: University of California, San Diego; 2008. 174 Pages.
78. Rau KR, Quinto-Su PA, Hellman AN, Venugopalan V. Pulsed laser microbeam-induced cell lysis: Time-resolved imaging and analysis of hydrodynamic effects 3 169. Biophysical Journal 2006;91:317–329.
79. Lutolf MP, Blau HM. Artificial Stem Cell Niches. Advanced Materials 2009;21:3255–3268.
80. Tasoglu S, Demirci U. Bioprinting for stem cell research. Trends in Biotechnology 2013;31:10–19.
81. Grigorescu S, Hindié M, Axente E, Carreiras F, Anselme K, Werckmann J, MIHAILESCU I, Gallet O. Fabrication of functional fibronectin patterns by nanosecond excimer laser direct write for tissue engineering applications. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2013;24:1809–1821.
82. Serra P, Colina M, Fernández-Pradas JM, Sevilla L, Morenza JL. Preparation of functional DNA microarrays through laser-induced forward transfer. Applied Physics Letters 2004;85:1639.

83. Barron JA, Young HD, Dlott DD, Darfler MM, Krizman DB, Ringeisen BR. Printing of protein microarrays via a capillary-free fluid jetting mechanism. *Proteomics* 2005;5:4138–4144.
84. Colina M, Serra P, Fernandez-Pradas JM, Sevilla L, Morenza JL. DNA deposition through laser induced forward transfer. *Biosensors and Bioelectronics* 2005;20:1638–1642.
85. Peterbauer T, Heitz J, Olbrich M, Hering S. Simple and versatile methods for the fabrication of arrays of live mammalian cells. *Lab on a Chip* 2006;6:857.
86. Caron AW, Nicolas C, Gaillet B, Ba I, Pinard M, Garnier A, Massie B, Gilbert R. Fluorescent labeling in semi-solid medium for selection of mammalian cells secreting high-levels of recombinant proteins. *BMC Biotechnol* 2009;9:42.
87. Schöndube J., Yusof A., Wright D., Kalkandjiev K., Zengerle R., Kotay P. Picoliter Droplet Dispenser with Integrated Impedance Detector for Single-cell Printing. *Proceedings 13th International Conference on New Actuators* 2012:418–421.
88. Wüst S, Müller R, Hofmann S. Controlled Positioning of Cells in Biomaterials - Approaches Towards 3D Tissue Printing. *JFB* 2011;2:119–154.
89. Rodríguez-Dévora JI, Shi Z, Xu T. Direct assembling methodologies for high-throughput bioscreening. *Biotechnology Journal* 2011;6:1454–1465.
90. Baumann K. Stem cells: No limits to iPS cells? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013;14:610–611

# 10 Verzeichnisse

## 10.1 Abbildungsverzeichnis

Bild 1:	Ishikawa Diagramm der LIFT-Technologie für biologische Anwendung.....	4
Bild 2:	Schematische Darstellung des LIFT-Verfahrens .....	5
Bild 3:	Schematische Darstellung der Inkjet-Druckverfahren.....	8
Bild 4:	Schematische Darstellung des Extrusions-Verfahrens .....	11
Bild 5:	Schematische Darstellung des LIFT-Vorgangs .....	12
Bild 6:	Prinzip der LIFT-Übertragsstufen auf dem Transferträger.....	14
Bild 7:	Die Geschwindigkeit der Tropfen in Abhängigkeit von der Laserfluenz mittels LIFT ist dargestellt.....	15
Bild 8:	Strategien zur Herstellung von Tissue Engineering Produkten .....	22
Bild 9:	Schematischer Aufbau des Transferträgers.....	27
Bild 10:	Vorbereitung des Transferträgers für die LIFT-Experimente.....	28
Bild 11:	Der Temperaturverlauf in der Absorber- und der Transferschicht während des LIFT-Prozesses .....	31
Bild 12:	Modellierung der Thermischen Ausbreitung in Wasser nach 80 ns .....	33
Bild 13:	$\mu$ -Slides von ibidi als Empfängerträger .....	34
Bild 14:	Schematischer Aufbau für eine HTS Anwendung von LIFT .....	38
Bild 15:	Anlagenumsetzung für eine HTS Anwendung mit dem LIFT-Verfahren .....	39
Bild 16:	Funktionsweise der LIFT-Anlage zum Transfer einzelner unterschiedlicher Pigmente .....	40
Bild 17:	Schematischer Aufbau des LIFT-Systems (LIFTSYS™) .....	41
Bild 18:	LIFTSYS™-Anlage.....	41
Bild 19:	Messung der Tropfengröße von Matrigel für verschiedene Schichtdicken .....	45
Bild 20:	Matrigel-Überträge im Mikrostrahl- und Streubereich.....	46
Bild 21:	Gelatine-Überträge auf Matrigel im Mikrostrahlbereich.....	46
Bild 22:	Positioniergenauigkeit des Gelatine-Transfer (n = 30).....	48
Bild 23:	Positioniergenauigkeit des Matrigel-Transfer (n = 30).....	49

Bild 24: Tropfengröße von 80 % Glycerin-Wasser-Lösungen auf unterschiedlichen Oberflächen.....	52
Bild 25: Übertragene Proteine. Meerrettichperoxidase (HRP).....	53
Bild 26: Lineares Wachstum des Spotdurchmessers bei Vergrößerung des Abstands zwischen Transferträger und Empfängerschicht. ....	53
Bild 27: Fluoreszenzaufnahme übertragener Polystyrol-Partikel.....	56
Bild 28: Darstellung der Partikelüberträge für unterschiedliche Fluenzen. ....	57
Bild 29: Entfernung der Partikel zum Spotzentrum, gemittelt über alle Leistungen.....	58
Bild 30: Entfernung der Polystyrol-Partikel zum Spotzentrum.....	58
Bild 31: Schematische Darstellung der Tropfen mit den dazugehörigen Winkeln. ....	59
Bild 32: Lage der Partikel innerhalb eines Spots.....	59
Bild 33: Histogramm der Partikelverteilung: Partikel in Prozent, bezogen auf deren Lage in Abhängigkeit von der Leistung. ....	60
Bild 34: Polardiagramm aus der Partikelverteilung und des Partikelabstandes für Überträge von Polystyrolpartikel in Matrigel.....	61
Bild 35: Modell für die Positioniergenauigkeit der Partikel.....	62
Bild 36: Einflussgrößen, die die Präzision des LIFT-Verfahrens beeinflussen.....	63
Bild 37: Intensitätsverteilung der Laserstrahlung nach einem Mikroskopobjektiv durch den Pi-Shaper.....	65
Bild 38: Einzelpartikelüberträge mit unterschiedlichen Intensitätsverteilungen.....	66
Bild 39: K562-Eizellüberträge aus Matrigel-Transferschicht in Matrigel-Empfängerschicht. ....	68
Bild 40: Zelltransfer aus einer Gelatine-Transferschicht in eine Matrigel-Empfängerschicht .....	69
Bild 41: Zelltransfer aus einer Matrigel-Transferschicht in eine Matrigel-Empfängerschicht. ....	71
Bild 42: Transferschicht in der LIFT-Anlage.....	73
Bild 43: Schematische Darstellung der Fokussierung auf die zu übertragenen Zellen. ....	74
Bild 44: Aufnahme von K562-Zellen direkt nach dem LIFT-Prozess. ....	74
Bild 45: Zellen transferiert aus einer überschichteten Gelatine-Transferschicht in eine Gelatine-Empfängerschicht. ....	82

---

Bild 46: 3T3-Zellen transferiert aus einer überschichteten Gelatine-Transferschicht in eine Gelatine-Empfängerschicht .....	83
Bild 47: Zellen transferiert aus einem Zweischichtsystem in eine Matrigel-Empfängerschicht .....	84
Bild 48: K562-Zellen transferiert aus einer überschichteten Gelatine-Transferschicht in eine Matrigel-Empfängerschicht.....	85
Bild 49: K562-Zellen transferiert aus einer überschichteten Matrigel-Transferschicht in eine Matrigel-Empfängerschicht.....	87
Bild 50: Versuchsablauf für das Drucken von unterschiedlichen Zellen auf einen Empfängerträger.....	87
Bild 51: Muster aus zwei unterschiedlich angefärbten K562-Zellen.....	88
Bild 52: Schematische Darstellung der Fluoreszenzerfassung in LIFT-Experimenten....	92
Bild 53 Fokussierungsstrategie für den LIFT-Prozess .....	92
Bild 54: Messung der Schichtdicke einer Matrigel-Schicht auf einem Glasobjektträger mit dem LSM .....	111
Bild 55: Darstellung der Partikelüberträge für unterschiedliche Fluenzen.....	112
Bild 56: Lage der Partikel innerhalb eines Spots.....	112

## 10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: LIFT für biologische Anwendungen, ein Auszug verschiedener Arbeitsgruppen. ....	13
Tabelle 2: Materialkenngrößen von Wasser und Titan für die Simulation.....	30
Tabelle 3: Zusammenfassung aller LIFT-Experimente .....	35
Tabelle 4: Mittels LSM gemessene Schichtdicke von Matrigel auf Objektträgern.....	44
Tabelle 5: Mikrostrahlbereiche für 5 %-ige Gelatine .....	50
Tabelle 6: Zelltransfer aus einer Gelatine-Transferschicht in Matrigel-Empfängerschicht .....	78
Tabelle 7: Zelltransfer aus einer Matrigel-Transferschicht in eine Matrigel-Schicht .....	80

**10.3 Abkürzungsverzeichnis**

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
μ-Slides	μ-Slides Angiogenesis ibiTreat
CIJ	Continuous Inkjet
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOD	Drop On Demand
FCS	Fötales Kälberserum
HCS	High Content Screening
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP70	Heat Shock Protein 70
HTS	High Throughput Screening (Hochdurchsatz Screening)
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
LIFT	Laser Induced Forward Transfer
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion

## Anhang

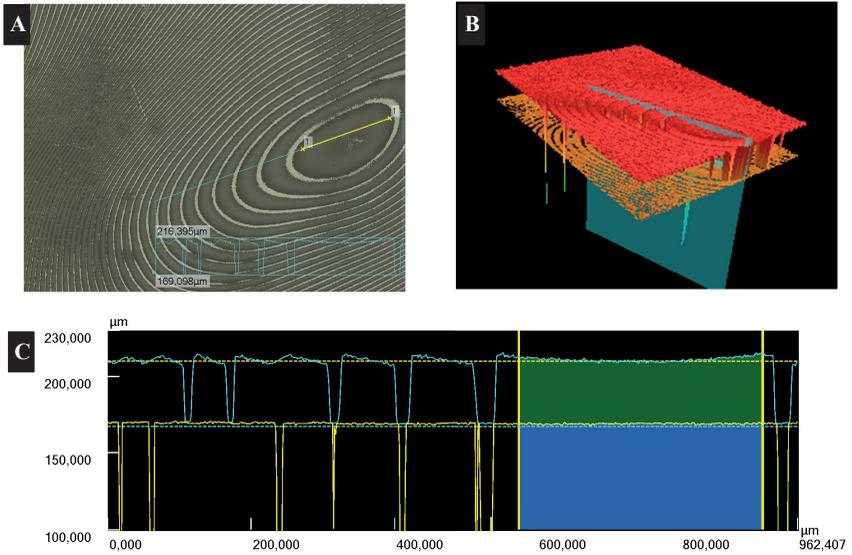


Bild 54: Messung der Schichtdicke einer Matrigel-Schicht auf einem Glasobjektträger mit dem LSM (100er Spiralarakel). **A:** Auflichtaufnahme der Schicht. Newtonringe sind sichtbar. **B:** 3D-Darstellung der Schichtdickenmessung. **C:** Schnitt durch die Schicht, Segment 1 ist gelb eingezeichnet.

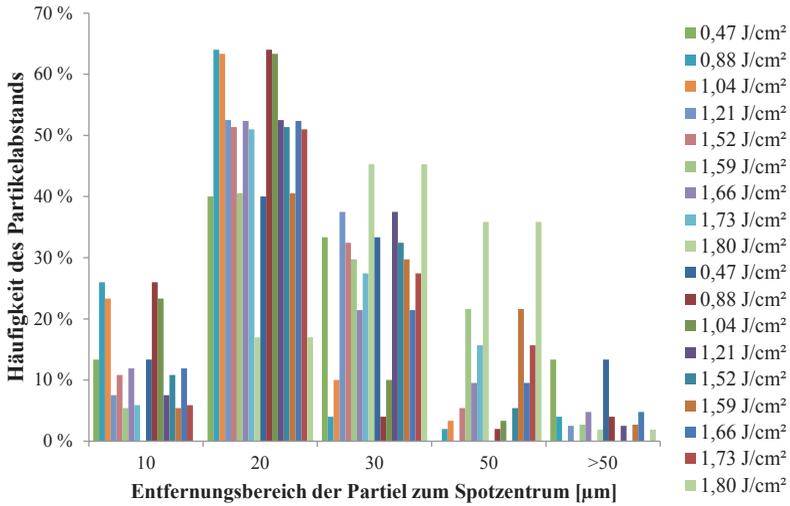


Bild 55: Darstellung der Partikelüberträge für unterschiedliche Fluenzen. Die Anzahl der Partikel pro übertragenen Spot wurde gezählt. Für 0,47 J/cm<sup>2</sup> ist n = 20, für alle anderen Fluenzen ist n > 50.

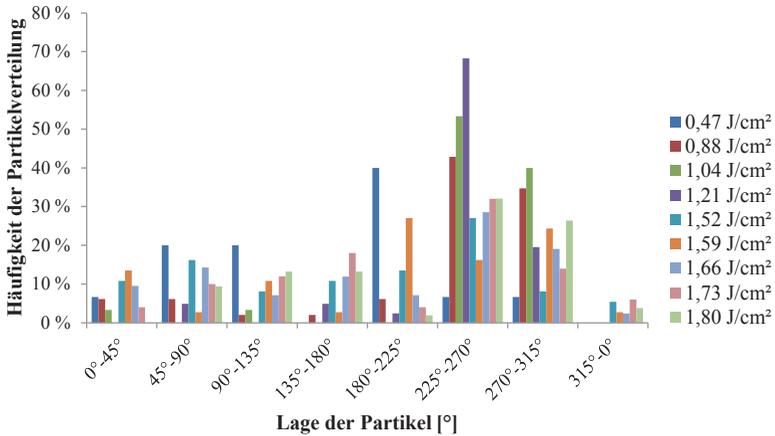


Bild 56: Lage der Partikel innerhalb eines Spots. Dabei wird der Spot in 45°-Abschnitte unterteilt und alle Partikel werden manuell eingeordnet.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist während meiner Tätigkeit am Fraunhofer-Institut für Lasertechnik ILT sowie am Lehrstuhl für Lasertechnik der RWTH Aachen University entstanden. Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Reinhart Poprawe M. A. für die Betreuung dieser wissenschaftlichen Arbeit. Herrn Prof. Dr.-Ing. Horst Fischer möchte ich für die sehr hilfreiche Übernahme des Korreferats danken. Einen weiteren besonderen Dank möchte ich an Adj. Prof. (RMIT) Akad. Oberrat Dr.-Ing. Ingomar Kelbassa richten, der als zweiter Korreferent das Verfahren maßgeblich unterstützt hat.

Herrn Dr.-Ing. Arnold Gillner und Herrn Dr.-Ing. Martin Wehner danke ich für die Möglichkeit in diesem spannenden ingenieurwissenschaftlichen Umfeld zu arbeiten sowie für ihre Unterstützung während der Erstellung der Dissertationsschrift.

Am Fraunhofer-Institut für Lasertechnik ILT haben sich viele Begegnungen ergeben und ich möchte allen Kollegen und Freunden dafür danken. Besondere Dankesworte gelten dabei:

- Christian Gach, Boris Geller, Jan Janhsen und David Schönauer; euch gilt ein herzlicher Dank für die tatkräftige Unterstützung und Hilfe während eurer Hiwi-Tätigkeit.
- Sascha Engelhardt, Dr. Claudia A. Hartman, Michael Jüngst, Holger Leonards, Dr. Nadine Nottrodt, Oliver Nottrodt, Michael Steger und Michael Ungers; Danke für den fachlichen Rat und viele anregende Gespräche bei der Arbeit und beim Kaffee.
- Christian Tiwisina, Alp Özmert und Jan Janhsen möchte ich für die gute Zusammenarbeit bei der Konzeption und Umsetzung von LIFTSYS™ danken.

Für die gewissenhaften Korrekturen bedanke ich mich im Speziellen bei Dr. Claudia A. Hartmann, Dr. Sebastian Riester und meiner Mutter.

Bei Dr. Claudia A. Hartmann möchte ich mich für die einzigartige Unterstützung auf den letzten Metern bedanken, es bedarf manches Mal eines besonderen Ansporns.

Die Arbeit ist allen voran meiner Familie gewidmet, die mich während der gesamten Zeit bis zur Promotion unterstützt hat. Meine Brüder Daniel Riester und Dr. Sebastian Riester haben immer ein offenes Ohr und Rat für mich gehabt. Insbesondere gilt ein großer Dank *meinen Eltern*, die mir alles ermöglicht haben und mich stets auf meinem Lebensweg begleiten.

