
SCHLUSSBERICHT

Verbundprojekt:	Micro-iPS-Profiler – Individualisierte Mikrofluidik-Multiorgan-Chip Multimode Profiling Plattform basierend auf iPS-Technologie
Akronym:	micro-IPS-Profiler
Teilprojekt:	micro-iPS-Profiler Teilvorhaben: iPS-Profiler Plattform -- Chip & Betriebsgerät
Laufzeit:	01.11.2016-30.6.2022
Förderkennzeichen:	01EK1612A
Autoren:	Sebastian Schattschneider Dr. Claudia Gärtner
Zuwendungsempfänger:	microfluidic ChipShop GmbH Stockholmer Str. 20 07747 Jena
Kontaktperson:	Dr. Claudia Gärtner Stockholmer Straße 20 07747 Jena claudia.gaertner@microfluidic-chipshop.com +49 (0)3641 - 34705 20

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1. Kurze Darstellung.....	4
1.1 Aufgabenstellung.....	4
1.2 Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	4
1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens	5
1.4 Wissenschaftlich technischer Stand, an den angeknüpft wurde	6
1.5 Technischer Stand bei microfluidic ChipShop	6
1.6 Verwendete Fachliteratur, benutzte Informations- und Dokumentationsdienste ..	7
1.7 Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	7
2. Eingehende Darstellung	8
2.1 Projektergebnisse	8
2.1.1 Einleitung	8
2.1.2 WP1.1 Lasten- und Pflichtenheft.....	8
2.1.3 WP 1.2 Mikrofluidik-Chip	8
2.1.3.1 WP1.2.1: Chipmodule.....	8
2.1.3.2 Fluidikkontrolle	10
2.1.4 WP1.2.2: Integrierter Chip	11
2.1.4.1 Integriertes Chipdesign – Titerplatte	11
2.1.4.2 Überarbeitung integriertes Chipdesign – Doppelslideformat	16
2.1.5 WP1.3 Micro-iPS-Profiler-Instrument.....	18
2.1.5.1 Konzeptphase	18
2.1.5.2 Gesamtgerät.....	19
2.1.5.2.1 Temperierung	20
2.1.5.2.2 Anpassungen für Doppelslide Chip.....	22
2.1.5.2.3 Detektionssystem: Durchlichtmikroskop	23
2.1.5.2.4 Detektionssystem: Photomultiplier	25
2.1.5.2.5 Datenerfassung.....	27
2.1.5.2.6 Sensorintegration Sauerstoffmessung	28
2.1.5.3 Software	30
2.1.5.3.1 Updates Steuerungssoftware	33

2.1.6	WP 1.4 Prozessentwicklung	34
2.1.6.1	Funktionstest Gesamtsystem.....	34
2.1.7	WP 1.5 Systemintegration	35
2.1.7.1	Evaluierung am UKJ EN	35
2.1.8	Evaluierung an der Universität Heidelberg AG Wöfl.....	36

1. Kurze Darstellung

1.1 Aufgabenstellung

Derzeit beruht die Vorhersage von therapeutischen Wirksamkeiten von Medikamenten auf Untersuchungen im Zellkultur- und Tiermodell. Beide Modelle decken die Situation im Menschen mit einem komplexen genetischen Hintergrund in der Population nur unvollkommen ab, können aber bei falschen Vorhersagen zu enormen Kosten beim Hersteller und Gesundheitsschäden beim Patienten führen.

Mikrofluidik wird zunehmend als eine Technologie wahrgenommen, mit der Organe des Menschen imitiert werden können, um Lebensfunktionen des menschlichen Organismus im Labor nachzuempfinden und so Testsysteme für die Wirkstoffforschung zu realisieren, denn die Mikrofluidik erlaubt die organähnliche Perfusion der Organmodelle.

Mit dem Micro-iPS-Profiler kann die Ausbildung Organ-ähnlicher Strukturen aus Derivaten von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) von bestimmte Patientengruppen in einem mikrofluidischen Chip ermöglicht werden um damit Wirkstoffforschung automatisiert und individualisiert durchführen zu können.

Der Chip ermöglicht durch Implementation entsprechender Module eine präzise steuerbare Medienzuführung und eine Abführung der Stoffwechselprodukte. Die Integration einer entsprechenden Sensorik für die optische Auslese von Sauerstoff und pH-Wert erlaubt ein optimiertes Prozessmonitoring, wobei der automatische Betrieb durch das iPS-Profiler-Betriebsgeräte einen nutzerunabhängigen und zuverlässigen Einsatz des Systems und eine Parallelisierung der funktionellen Einheiten ermöglicht. Zudem werden durch die Automatisierung durch das Betriebsgerät Anwender-unabhängige Ergebnisse generiert, wodurch Standards generiert und ein Referenzsystem geschaffen werden können.

1.2 Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Projekt wurde von einem Verbund aus einem Unternehmen, der microfluidic ChipShop GmbH (MCS), zwei Arbeitsgruppen am Universitätsklinikum, Jena (Klinik für Innere Medizin III - Experimentelle Nephrologie und Institut für Biochemie AG Biochip-basierte Organmodelle, AG INSPIRE, CSCC), der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg - Fakultät für Biowissenschaften - Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie

- Abt. Pharmazeutische Biologie und der Charité - Universitätsmedizin Berlin - Berlin-Brandenburg Center für Regenerative Therapien (BCRT) durchgeführt.

Projektkoordinator war die microfluidic ChipShop GmbH.

Ausgangspunkt des Projektes waren grundlagenorientierte Arbeiten, die folgende Punkte umfassten:

- Erarbeitung der mikrofluidischen Konzepte,
- Umsetzung der mikrofluidischen Konzepte in fertigungstechnisch umsetzbare Lösungen,
- Umsetzung von mikrofluidischen Einzelmodulen für die Optimierung und Integration der Assay- und Detektionstechnologie,
- Verwirklichung des integrierten mikrofluidischen Chips mit sämtlichen Funktionalitäten,
- Konzeptionierung und Umsetzung der Schnittstellen zum Gesamtsystem,
- Konzeptionierung und Umsetzung des Gesamtsystems bestehend aus integriertem Chip und Betriebsgerät

Bei MCS standen zur Durchführung des Vorhabens ausreichend personelle Ressourcen und die entsprechende technologische Infrastruktur zur Verfügung. Im Projekt selbst waren mehrere leitende Wissenschaftler in die unterschiedlichen Teilbereiche involviert, um sowohl die fertigungstechnischen, die fluidischen als auch die anwendungsspezifischen Belange umfassend abdecken zu können.

Folgende Infrastruktur stand zur Verfügung:

- Reinräume von Klasse 1.000 – 10.000,
- Komplette industrielle Fertigungskette für polymerbasierte Mikrofluidik-Bauteile (Formenbau, Spritzguss, Aufbau- und Verbindungstechnik)
- Ausrüstung zur Qualitätskontrolle und Dokumentation

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Gesamtvorhaben war in insgesamt fünf Arbeitspakete gegliedert. Die Hauptaufgaben von MCS lagen Erarbeitung der mikrofluidischen Kartusche (Chip), des zugehörigen Betriebsgerätes, sowie der Gerätesoftware, welche in WP 1 zusammengefasst waren. In WP 1.1 wurde ein fortlaufendes Lasten und Pflichtenheft erstellt. Davon ausgehend erfolgte die Erprobung von mikrofluidischen Einzelmodulen

in WP 1.2 und die anschließende Erarbeitung der beiden im Projekt entstandenen integrierten Chipsysteme. In WP 1.3 wurde das Betriebsgerät mit Gerätesoftware für die integrierten Chips erarbeitet. Fluidikprotokolle, zur Steuerung des Chips, wurde in WP 1.4 entwickelt. Das Arbeitspaket WP 1.5 beinhaltete die Systemintegration und Erprobung in Laborumgebung in enger Zusammenarbeit mit den Projektpartnern Am UKJ und der Universität Heidelberg.

Das Projekt musste im Verlauf mehrfach verlängert werden. Zunächst wurde das Projekt um 18 Monate verlängert, die Gründe dafür waren Verzögerungen in verschiedenen Arbeitspaketen, welche ein fristgerechtes Erreichen der Projektziele verhinderten.

Weitere Verzögerungen, welche durch den Sars-Cov2 bedingten Lockdown im Jahr 2020 und die damit verbundenen Kontakt- und Reisebeschränkungen, herbeigeführt wurden verhinderten die geplante Geräteübergabe an die Projektpartner am UKJ und der Uni Heidelberg und machten somit eine zweite sechsmonatige Projektverlängerung notwendig. Leider konnte der so entstandene Verzug in der Projektbearbeitung nicht aufgeholt werden, weshalb das Projekt nochmals um sechs Monate verlängert werden musste. Alle bewilligten Verlängerungen waren zuwendungsneutral.

Trotz der Verzögerungen wurden zwei Gerätedemonstratoren an die Projektpartner zu Evaluierung des Gesamtsystems aus Chip und Gerät übergeben und konnten am UKJ und an der Uni Heidelberg erprobt werden.

1.4 Wissenschaftlich technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die Mikrofluidik hat sich in den letzten Jahren als eine sehr breit anwendbare Technologie in allen Bereichen der Life Sciences, der Diagnostik und der Analytik etabliert. Stark zugenommen hat der Bedarf an Einwegbauteilen, vor allem getrieben durch die Anwendungen in der Diagnostik, aber auch der Biotechnologie. Diese setzen eine kostengünstige Fertigungstechnologie voraus, um den Preiserwartungen der Märkte gerecht zu werden. Dies ist in der Praxis nur durch mikrostrukturierte kunststoffbasierte Bauteile, die im Spritzgussverfahren hergestellt werden, umzusetzen.

Mit den gewählten Fertigungstechnologien und den Zielanwendungen sollte eine Demonstration der Fertigbarkeit von integrierten Lab-on-a-Chip Systemen möglich sein.

1.5 Technischer Stand bei microfluidic ChipShop

Die "Lab-on-a-chip" Technologie repräsentiert den Kernbereich von microfluidic ChipShop. Die Mikrofluidik ermöglicht Problemlösungen für einen schnellen und preisgünstigen Zugang zu vielen gewünschten Informationen in den Life-Sciences sowie

zu einer Vielzahl von diagnostischen, analytischen und chemischen Fragestellungen. Spezialisten aus der Mikrofluidik, Formenfertigung, Polymerverarbeitung, Chemie, Biologie und medizinischer Diagnostik formen ein multidisziplinäres Team für die Entwicklung und Herstellung von "Lab-on-a-Chip" Systemen in Polymermaterialien.

Der Gebrauch von industriellen Fertigungstechniken ermöglicht einen nahtlosen Übergang von der Entwicklung über die Fertigung kleinerer Einheiten bis zur Serienfertigung. Ein Wissen, das sowohl für die Entwicklung als auch Fertigung für die Kunden von microfluidic ChipShop essentiell ist, um als Team schnell über die Entwicklung zur Fertigung mikrofluidischer Systeme voran schreiten zu können. Einen Überblick über das breit gefächerte Repertoire von microfluidic ChipShop gibt der Katalog der Firma, welcher diverse Komponenten und Entwicklungsplattformen anbietet; alle angebotenen Waren erfüllen die gebräuchlichen Laborstandards bezüglich Dimensionen und Schnittstellen zur Außenwelt. Dadurch bietet MCS den Kunden einen raschen, preisgünstigen und nahezu risikolosen Zugang zu dem innovativen Feld der Mikrofluidik.

1.6 Verwendete Fachliteratur, benutzte Informations- und Dokumentationsdienste

Neben regelmäßigen Internetrecherchen erfolgte der Informationsgewinn über den Besuch von Konferenzen und Messeveranstaltungen und persönliche Kommunikation mit externen Wissenschaftlern und anschließende interne Informationsweitergabe und Diskussion.

1.7 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Projekts fand über die Kooperation mit den direkt am Projekt beteiligten Partnern keine weitere direkt projektbezogene Kooperation mit anderen Parteien statt.

2. Eingehende Darstellung

2.1 Projektergebnisse

2.1.1 Einleitung

In dem Teilprojekt “iPS-Profiler-Plattform – Chip & Betriebsgerät“ der microfluidic ChipShop GmbH, wurde die Micro-iPS-Profiler-Plattform bestehend aus Chip und Betriebsgerät realisiert.

Mit dem Micro-iPS-Profiler wurde die Assemblierung iPS-basierter, organähnlicher Strukturen in einem mikrofluidischen System ermöglicht, ein mögliches Anwendungsgebiet ist hierbei die automatisierte Wirkstoffforschung. Die Geräteplattform stellt dabei sowohl die Analyse, als auch ein umfassendes analytisches Modulrepertoire zur Verfügung.

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse vorgestellt.

2.1.2 WP1.1 Lasten- und Pflichtenheft

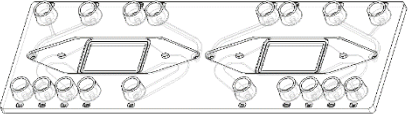
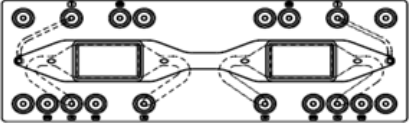
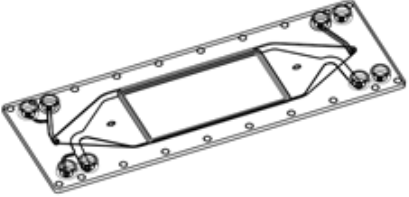

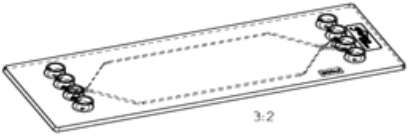
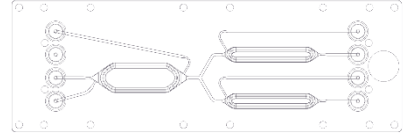
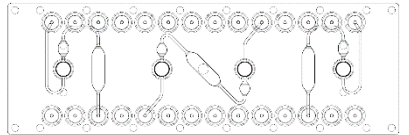
Im WP1 wurde zu Beginn des Projektes ein Lastenheft erstellt, welches als Grundlage für die Systementwicklung diente. Es wurden alle wichtigen und notwendigen Schlüsselparameter gebündelt gesammelt und im Verlauf des Projektes in die Pflichten übernommen. Ausgehend vom Lastenheft wurde Geräte- und Chipkonzepte erstellt, bewertet und final umgesetzt.

2.1.3 WP 1.2 Mikrofluidik-Chip

2.1.3.1 WP1.2.1: Chipmodule

Ausgehend von Vorversuchen mit verschiedenen Chipmodulen, welche den Projektpartnern zur Verfügung gestellt wurden, konnte der Grundstein für das Design und die Herstellung des integrierten μ iPS-Profiler Chips gelegt werden. Es wurden verschiedene Chipmodule genutzt, welche die Erarbeitung und Optimierung der Zellkulturbedingungen und der fluidischen Abläufe ermöglichten (Tabelle 1).

Tabelle 1: Überblick über im Projekt verwendete Chipmodule

Fluidikdesign	Beschreibung
	<ul style="list-style-type: none"> • mehrlagiger Doppelkammer-Membranchip im Slideformat • zwei Kavitäten bestehend aus oberer und unterer Kammer welche durch eine Membran getrennt sind • ermöglicht Nachbildung von Organoiden aus verschiedenen Zelltypen
	<ul style="list-style-type: none"> • mehrlagiger Doppelkammer-Membranchip im Slideformat • zwei Kavitäten bestehend aus oberer und unterer Kammer welche durch eine Membran getrennt sind • obere Kammern mittels Kanal miteinander verbunden, • ermöglicht Nachbildung von Organoiden aus verschiedenen Zelltypen, welche über gemeinsamen „Blutstrom“ versorgt werden
	<ul style="list-style-type: none"> • mehrlagiger Membranchip im Slideformat • Gesamtkammervolumens von 500µl • obere und untere Kammer durch Membran voneinander getrennt.
	<ul style="list-style-type: none"> • Testmodule für die standardisierte mikrofluidische Zellkultur • zwei Kavitäten mit einem Volumen von jeweils 500 µl auf • Jede Kammer kann individuell über je zwei Inlets mit mini Luer-Anschlüssen befüllt werden
	<ul style="list-style-type: none"> • Kavität mit einem Volumen von 500 µl Kammer • kann über je zwei Inlets mit Zellsuspension und Kulturmedium über mini Luer-Anschlüsse befüllt werden.
	<ul style="list-style-type: none"> • 3 Kavitäten in Reihe mit zusätzlichen Fluidikeingängen • kann über zwei Inlets mit Zellsuspension und Kulturmedium über mini Luer-Anschlüsse befüllt werden.
	<ul style="list-style-type: none"> • Testchip zur Messung der Sauerstoffkonzentration • Speziell Schnittstellen für Plug-Sauerstoffsensoren • Kammern für Zellinkubation oder Cocktailsauerstoffsensoren

2.1.3.2 Fluidikkontrolle

Ein wichtiger Faktor für ein erfolgreiches Zellseeding in mikrofluidische Systeme ist die luftblasenfreie Befüllung und fluidische Konnektierung des Chips. Im Verlauf des Projektes zeichnete sich ab, dass es notwendig ist spezielle Verschluss- und Fluidikkonnektierungssysteme zu nutzen, welche den Luftblaseneintrag über die fluidischen Abschlüsse minimiert. Aus diesem Grund wurden Luer-Plugs und Luer-konnektoren designt, hergestellt und getestet. Abbildung 1 zeigt die drei Varianten Luerkonnektoren, welche gefräst und funktionell bewertet wurden.

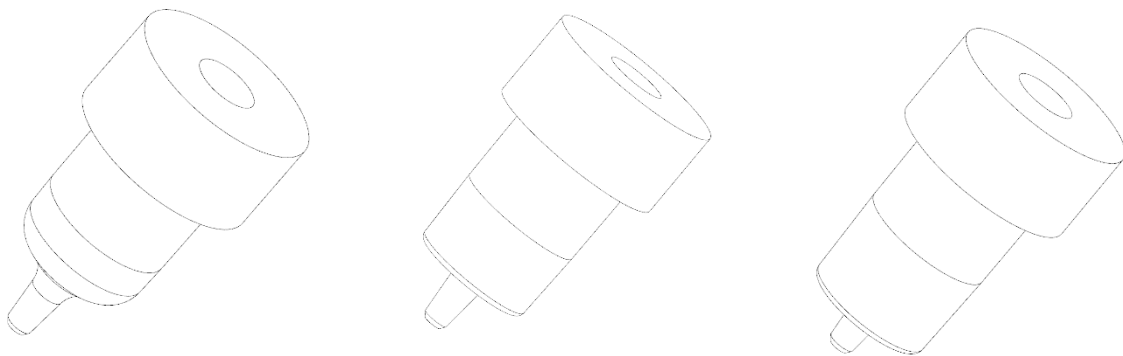


Abbildung 1: Fräsdesigns Luerkonnektoren zur Verringerung des Lufteintrags in mikofluidische Systeme mit Luer Anschluss

Da im Vergleich zu verwendeten Standardkonnektoren keine Verringerung des Luftblaseneintrags erreicht werden konnte, wurde das Konzept verworfen und nicht weiterverfolgt.

Im Gegensatz dazu konnte mit dem in Abbildung 2 dargestellten Luer Plug-Design der Lufteintrag beim manuellen Verschließen von Luer-Interfaces signifikant reduziert werden, darum wurde das Design im Spritzguss in Polypropylen und PP (Polypropylen) umgesetzt.

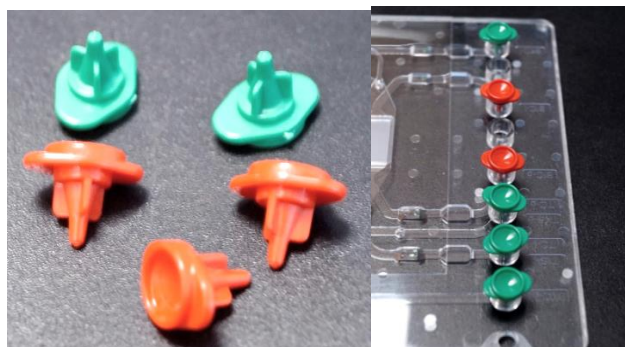


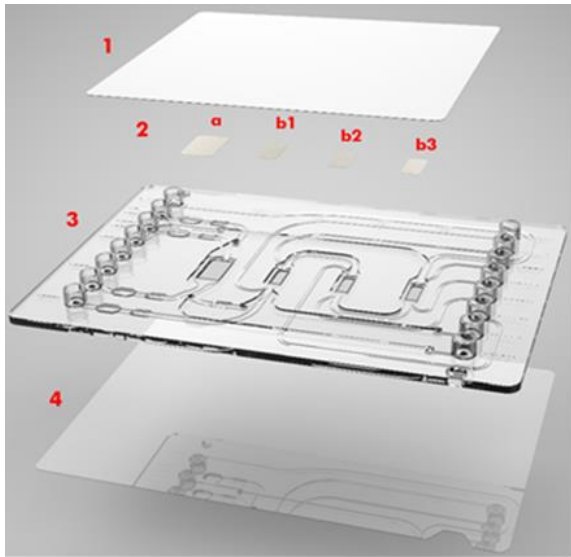
Abbildung 2: Spritzgussdesigns LuerPlug zur Verringerung des Lufteintrags in mikofluidische Systeme mit Luer Anschluss; gespritzt in rotem und grünem PP

2.1.4 WP1.2.2: Integrierter Chip

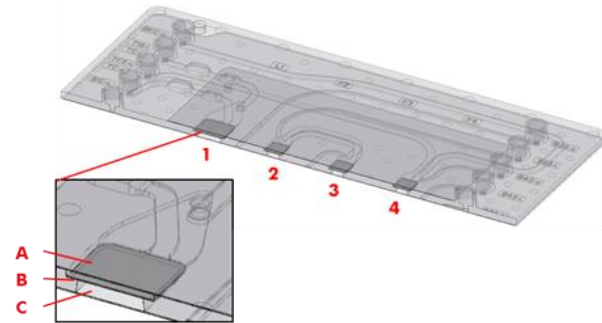
2.1.4.1 Integriertes Chipdesign – Titerplatte

Aufbauend auf den Ergebnissen, welche mit den Chipmodulen erzielt wurden, wurde ein erster integrierter Membranchip im Mikrotiterplattenformat entworfen. Die Formeinstitute wurden mittels Ultrapräzisionsfräsen hergestellt und der Chip im Spritzguss zwei Varianten, transparentes COP (cyclisches Olefin- Copolymer) und schwarzes COP gefertigt. Anschließend erfolgte die Integration der funktionellen Komponenten, wie z.B. der Membranen, abschließend wurden die Kammern und Kanäle des Chips auf Ober und Unterseite mit mcs-foil-005 verschlossen. Abbildung 3 zeigt die Details des integrierten Chipdesigns.

A



B



C

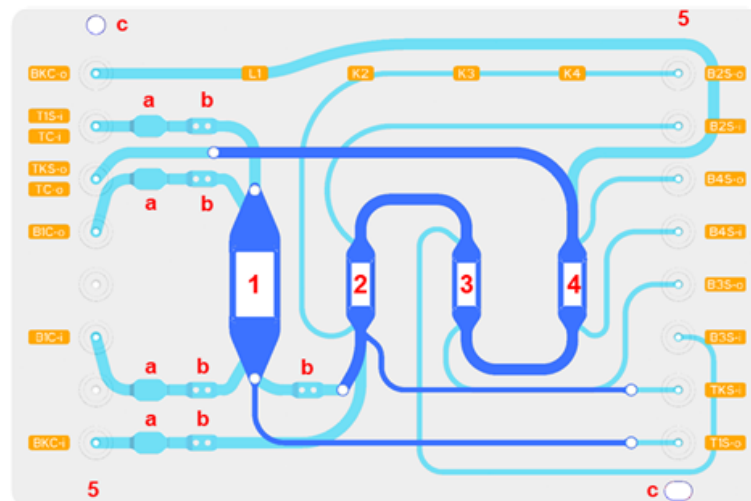


Abbildung 3A: Explosionsdarstellung des aktuellen Chipdesigns mit Darstellung der einzelnen Chip-Komponenten; 1- mcs-foil-005 2- vier Membranen, a- Membran Kammer 1 ($A_{\text{oben}} = 111,4 \text{ mm}^2$, $A_{\text{unten}} = 71,1 \text{ mm}^2$), b1, b2, b3- Membranen Kammern 2 bis 4 ($A_{\text{oben}} = 43,8 \text{ mm}^2$, $A_{\text{unten}} = 22,7 \text{ mm}^2$), 3- Spritzgussteil, Material mcs-COP-02; 4- mcs-foil-005; **3B** Zeichnung des Chips im Querschnitt durch die 4 Doppelkammern; 1, 2, 3, 4- Kammern 1 bis 4, A- obere Kammer, B- Membran (dunkelgrau dargestellt); C- untere Kammer; **3C** Übersichtszeichnung und Beschriftung des Chip-Designs, L1, 1 – Leberkammer; K2, 2 – Nierenkammer 1, K3, 3 – Nierenkammer 2, K4, 4 – Nierenkammer 3; 5- Luer-Anschlüsse, Inlets und Outlets; a- Bubbletrap, b- Kammern für Sensorintegration, C- Aussparungen im Spritzgussteil als Fixierung im Betriebsgerät, dunkelblaue Kanäle- Verlauf im Spritzgussteil oben; hellblaue Kanäle- Verlauf im Spritzgussteil unten, Beschriftung (orange Felder): B- Bottom chamber, T- Top chamber, K- kidney, L- liver, C- circulation, S- seeding, i- inlet, o- outlet.

Alle der vier oben liegenden Chipkammern sind fluidisch miteinander verbunden und bilden den oberen Chipkreislauf 1. Dieser verbindet das in der ersten Kavität befindliche

Leberorganoid mit den nachfolgenden Nierenorganoiden und wird dauerhaft fluidisch betrieben.

Alle rechtsseitig des Chips befindlichen Luer-Anschlüsse werden einmalig zum separaten Befüllen der jeweiligen Chipkammer benötigt und werden danach dauerhaft mit Luer Plugs (siehe Abbildung 2) dicht verschlossen.

Auf der linken Seite des Chips befinden sich ebenfalls fluidische Anschlüsse, welche die fluidischen Schnittstellen zum Betriebsgerät und dem dort integrierten Pumpensystem bilden.

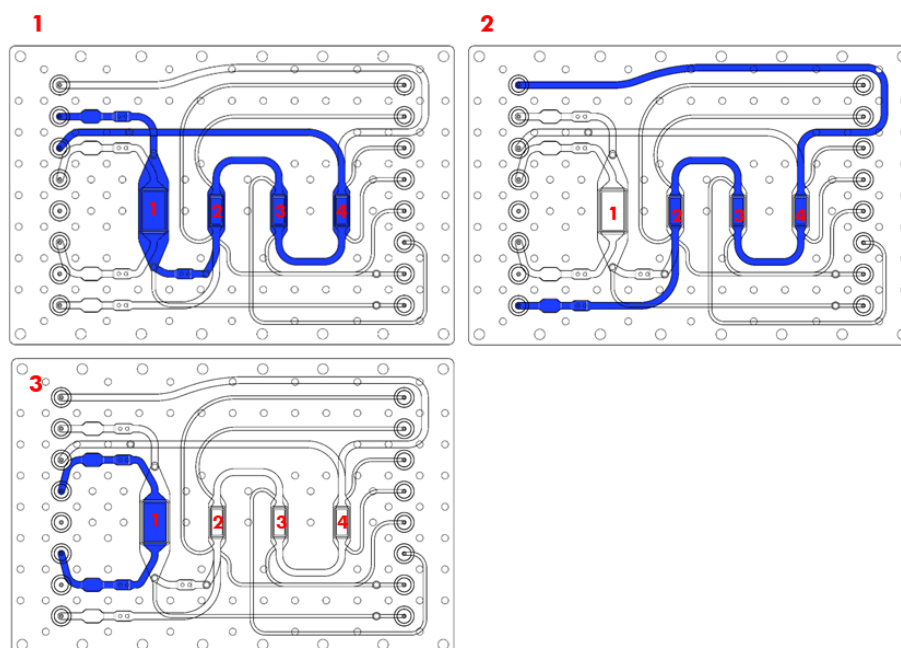


Abbildung 4: Darstellung der drei Chipkreisläufe für den fluidischen Betrieb; Bild 1- oberer Chipkreislauf 1 über die Leberkavität 1 und die drei Nierenkavitäten 2, 3 und 4; Bild 2- unterer Chipkreislauf 3 über die drei unteren Nierenkavitäten; Bild 3- unterer Chipkreislauf 2 über die Leberkavität.

In den unteren Chipkreisläufen für das Leberorganoid (Chipkreislauf 2) und die Nierenkompartimente (Chipkreislauf 3), wird das Medium einmal täglich automatisiert ausgetauscht. Der obere Kreislauf über alle vier Kavitäten wird dauerhaft mit einer geringen Flussrate betrieben.

Alle weiteren auf dem Chip (Abbildung 5) befindlichen Kanäle dienen der separaten Einsaat unterschiedlicher Zellsuspensionen in die einzelnen Kammern und sind in der Beschriftung auf dem Chip mit einem „S“ gekennzeichnet. Insgesamt sollen sechs verschiedene Zellsuspensionen eingebracht werden. Der Eingang (Inlet) für jeden Kreislauf ist mit einem „i“ und der Ausgang (Outlet) mit einem „o“ markiert. Zwei

Anschlüsse auf der linken Seite sind sowohl für die Einsaat, als auch für den Betrieb vorgesehen. Die sechs einzelnen Kreisläufe für das Befüllen aller Chipkammern sind in Abbildung 4 B dargestellt. Die Bilder 1 - 4 zeigen die Kreisläufe zum separaten Befüllen der vier unteren Chipkammern, die Bilder 5 und 6 zeigen die beiden Chipkreisläufe zum Befüllen der oberen Kammern der Leber- und Nierenkompartimente.

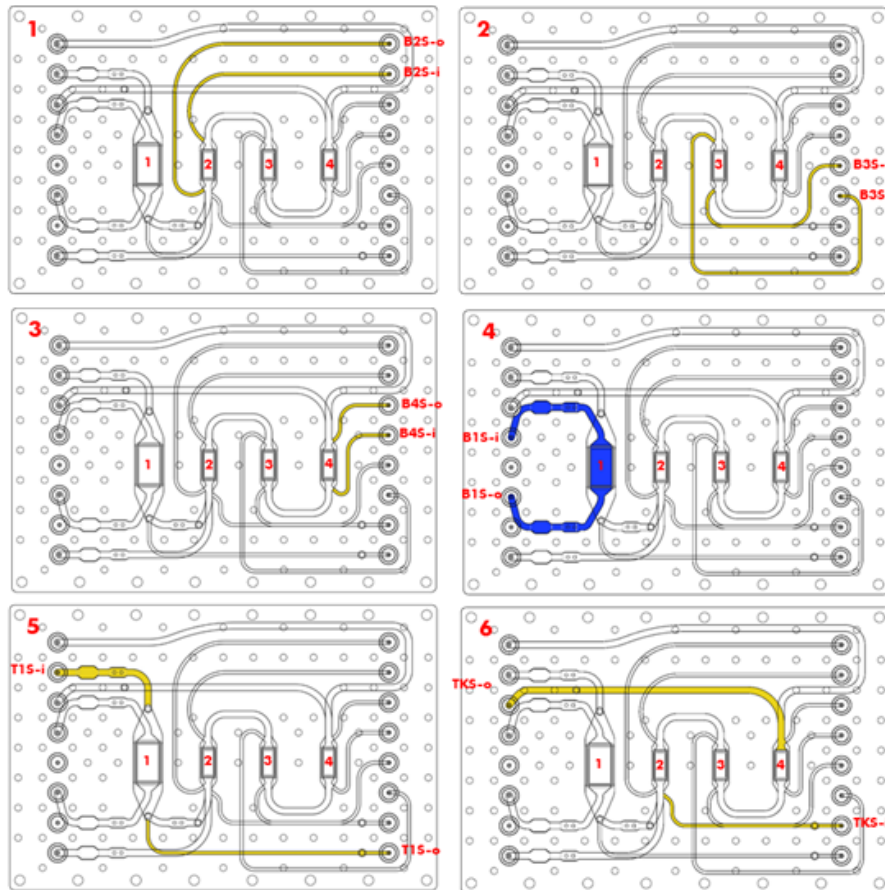


Abbildung 5: Darstellung der sechs Chipkreisläufe zum separaten Befüllen mit Zellsuspension aller Kammern, 1- Befüllen untere Nierenkammer 2, 2- Befüllen untere Nierenkammer 3, 3- Befüllen untere Nierenkammer 4, 4- Befüllen untere Leberkammer 1, 5- Befüllen obere Leberkammer 1, 6- Befüllen obere Nierenkammern 2, 3 und 4;

B- Bottom, T- Top, S- Seeding, K- Kidney, o- outlet, i- inlet

Das im Spritzguss hergestellte Design wurde in COP als transparente und als schwarze Variante gefertigt (Abbildung 6).

Die transparenten Chips wurden zur fluidischen Evaluierung des Chipdesigns verwendet. Aufgrund des hochsensitiven Messsystems, welches mit einem Photomultiplier als Detektor arbeitet, ist es notwendig möglichst viel Umgebungs- und

Streulicht vom Detektor fern zu halten. Darum wurden ebenfalls intransparente (schwarze) Chips hergestellt.

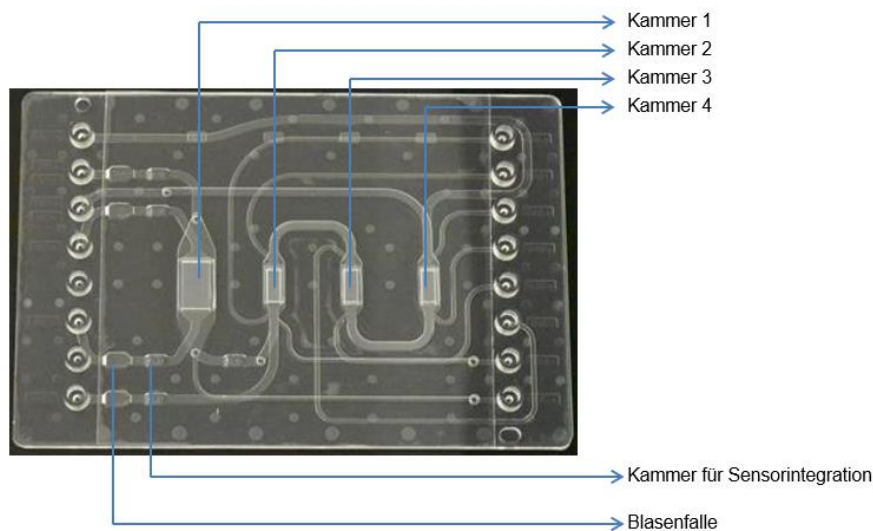


Abbildung 6: Spritzgussteil des Chipmoduls im Titerplattenformat in mcs-COP-02 mit vier integrierten Membranen, verschlossen durch eine obere und eine untere Deckelfolie; die integrierten Chips wurde in transparentem und in schwarzen Kunststoffmaterial hergestellt.

Im nächsten Schritt erfolgte die fluidische Charakterisierung und Evaluierung des Chipdesigns, welche zunächst mit Hilfe einer externen Peristaltikpumpe durchgeführt wurde um mögliche Designprobleme im fluidischen Netzwerk zu identifizieren. Auftretende Fehler konnten durch Anpassen des Handhabungsprotokolls und durch Optimierung des Gerätedesigns behoben werden. Fluidische Tests im Gerätedemonstrator verliefen erfolgreich. Die einzelnen Chipkreisläufe konnten über die erste Version der Betriebssoftware sowohl einzeln als auch in paralleler Schaltung erfolgreich angesteuert werden. Zudem wurden erfolgreiche Experimente mit Hela-Zellen durchgeführt. Abbildung 7 zeigt Aufnahmen aus der fluidischen Evaluierungsphase sowohl außerhalb, als auch im Betriebsgerät.

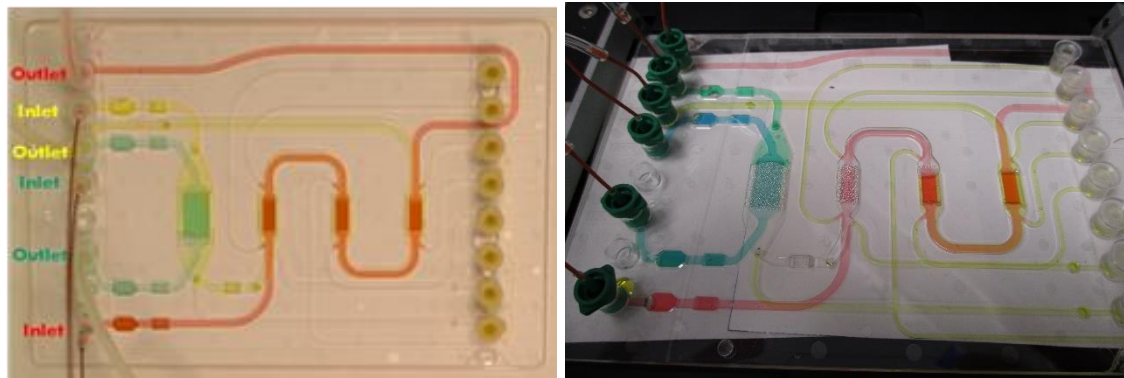


Abbildung 7: Links- Fluidische Evaluierung des integrierten Chips mit einer Peristaltikpumpe (80 $\mu\text{l}/\text{min}$) betrieben; Rechts- Fluidische Evaluierung des integrierten Chips im μiPS -profilier Betriebsgerät, zur besseren Überwachung der Fluidik wurden die Fluidikkreisläufe direkt mittels Luer-Verbindern konnektiert und bei geöffnetem Gerätedeckel gearbeitet, zur besseren Sichtbarkeit wurde eine weiße Unterlage unter den Chip gelegt;
gelb – oberer Chipkreislauf 1 (oberer Leber-Nieren-Kreislauf), grün – unterer Chipkreislauf 2 (Leber), rot – unterer Chipkreislauf 3 (Niere).

2.1.4.2 Überarbeitung integriertes Chipdesign – Doppelseideformat

Im Rahmen des Projektes wurde das integrierte Chipdesign überarbeitet. Hauptaugenmerk lag hier auf der Optimierung der Größe und den Anschlüssen des Chips. Ursprünglich wurde das Titerplattenformat für das Chipdesign gewählt. Das neue Chipdesign wurde im Doppelseideformat (50x75 mm²) umgesetzt und ist somit weniger als halb so groß. Das Volumen der Zellkulturkammern wurde nicht geändert, das Volumen der zu- und abführenden Kanäle konnten reduziert werden, die fluidische Konnektierung erfolgt im Chip über MiniLuer-Anschlüsse.

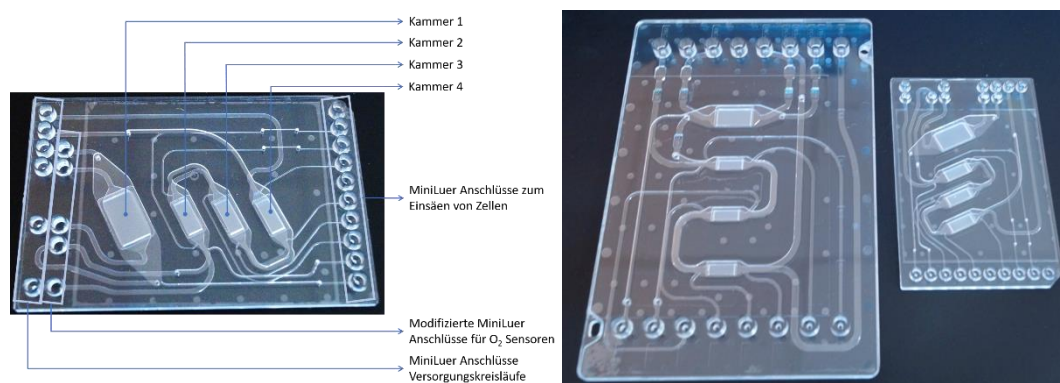


Abbildung 8: Spritzgussteil des Chipmoduls im Doppelseideformat in mcs-COP-02 mit vier integrierten Membranen, verschlossen durch eine obere und eine untere Deckelfolie (links); Größenvergleich μiPs -Profilier Chips; links integriertes Design im Titerplattenformat; rechts integriertes Design im Doppelseideformat (rechts)

Die Messung der Sauerstoffkonzentration erfolgt auf dem Doppelseitichip mit O₂-Sensorplugs, welche in angepasste MiniLuer-Anschlüsse gesteckt werden können (Abbildung 9).

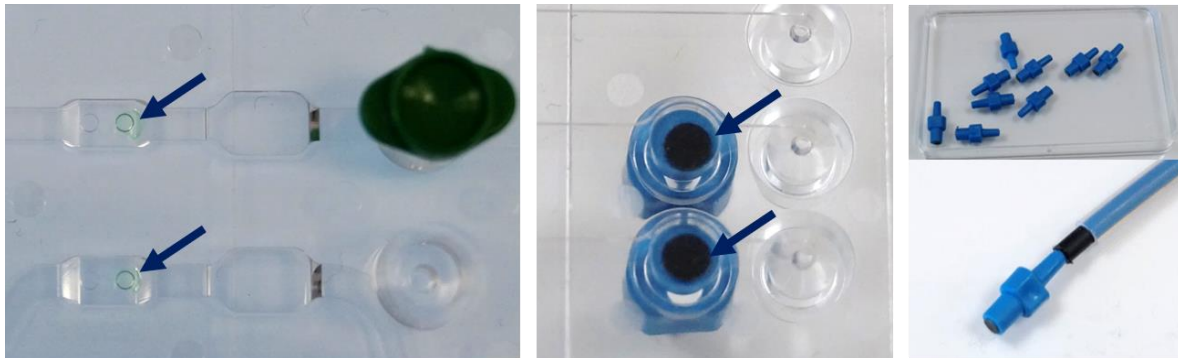


Abbildung 9: Integration der beiden Messsysteme zu O₂-Messung; die Blauen Pfeile markieren die Messpositionen; Links- Sensorspots; Rechts- MinLuer O₂ Sensor-Plugs

Abbildung 10 zeigt die fluidischen Kreisläufe des Doppelslidechips. Die fluidische Handhabung hat sich im Vergleich zum Titerplattenformat nicht geändert.

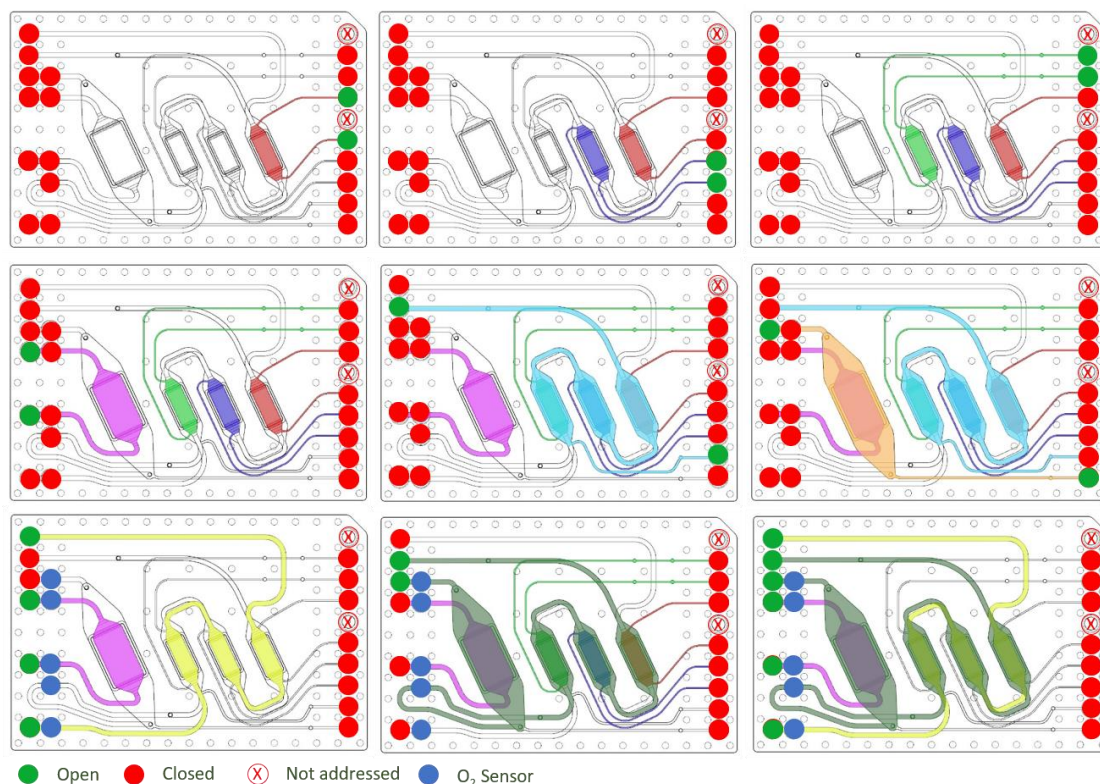


Abbildung 10: μ iPs-Profilier Doppelslideformat, fluidische Kreisläufe; oberer Reihe: Einsäen von Zellen in die unteren Kammern für Nierenorganoid, mittlere Reihe: Einsäen von Zellen in die untere Kammer für Leberorganoid (links); Einsäen von Zellen in die obere Kammer für Leberorganoid (rechts) und Einsäen von Zellen in die oberen Kammern für Nierenorganoid (Mitte); Unten: Feedingkreisläufe aller Kammern auf Unter- und Oberseite

2.1.5 WP1.3 Micro-iPS-Profiler-Instrument

2.1.5.1 Konzeptphase

Zu Beginn des Projektes wurden verschiedenen Gerätekonzepte entwickelt und bewertet. Im ersten Konzept wurde ein zweigeteiltes System vorgeschlagen, welches aus der Chipaufnahme mit Fluidikkontrolle und Sensorik und einer kompakten Elektronikeinheit, die auf der Oberseite der Chipaufnahme angekoppelt wird. Im weiteren Verlauf zeigte sich jedoch, dass die Elektronikeinheit aufgrund der Komplexität des Systems mehr Platz benötigt als zunächst angenommen. Das zweite Konzept besteht ebenfalls aus zwei Komponenten (Chipaufnahme und Elektronikeinheit) welche nebeneinander positioniert werden. Ein solches System benötigt jedoch viel Platz auf dem Arbeitsplatz, aus diesem Grund wurde das finale Konzept entwickelt, diese integriert beide Komponenten und benötigt dadurch weniger Labortischfläche. Abbildung 11 gibt einen kompakten Überblick über verschiedenen Gerätekonzepten.

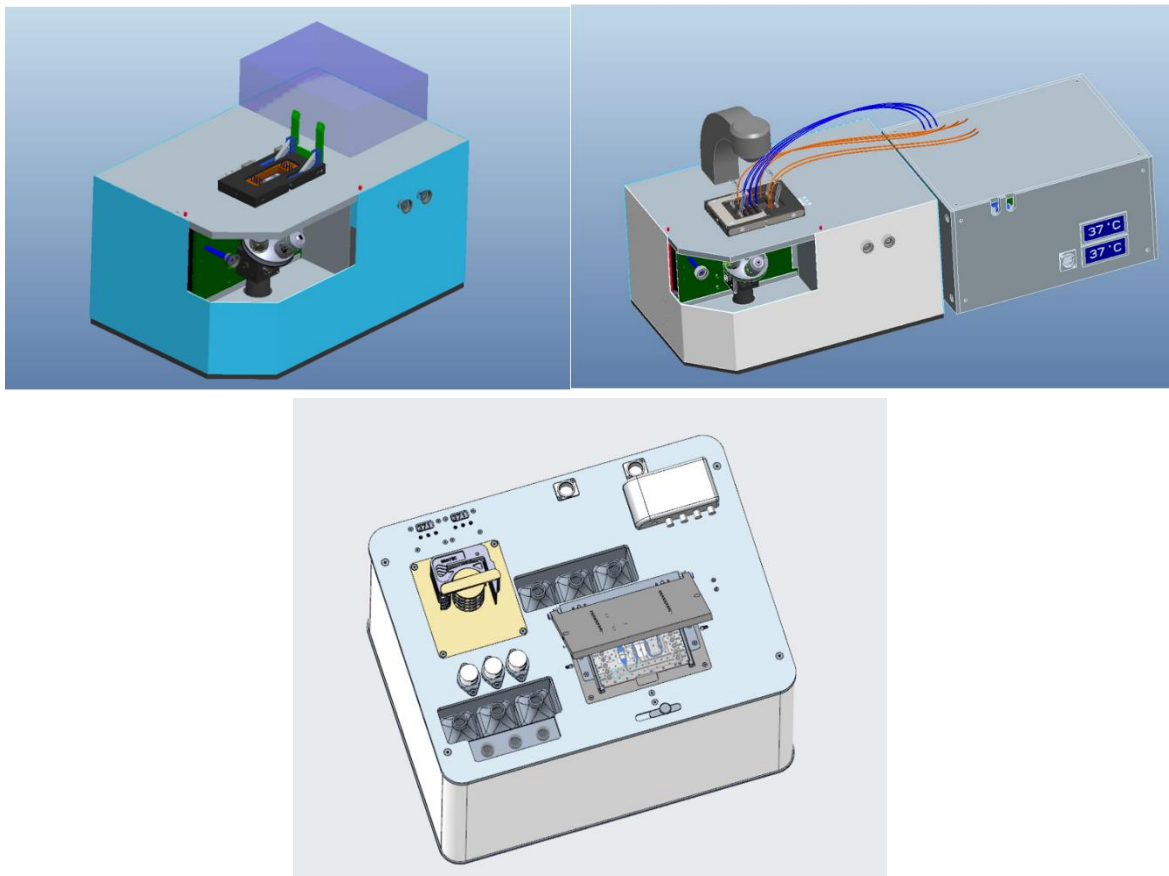


Abbildung 11: Gerätekonzepte für das Gesamtbetriebsgerät µiPS-Profiler von der 1. Idee (oben links) zum finalen Gerät (unten Mitte)

2.1.5.2 Gesamtgerät

Das Betriebsgerät zur Kontrolle des integrierten Gesamtchips dient nicht nur der fluischen Steuerung, sondern auch zur Aufrechterhaltung der physiologischen Parameter, wie Temperatur und Zellkulturmedien-Zuführung sowie der Erfassung der Messdaten der Zellkultur. Abbildung 12 zeigt das System im Labor.

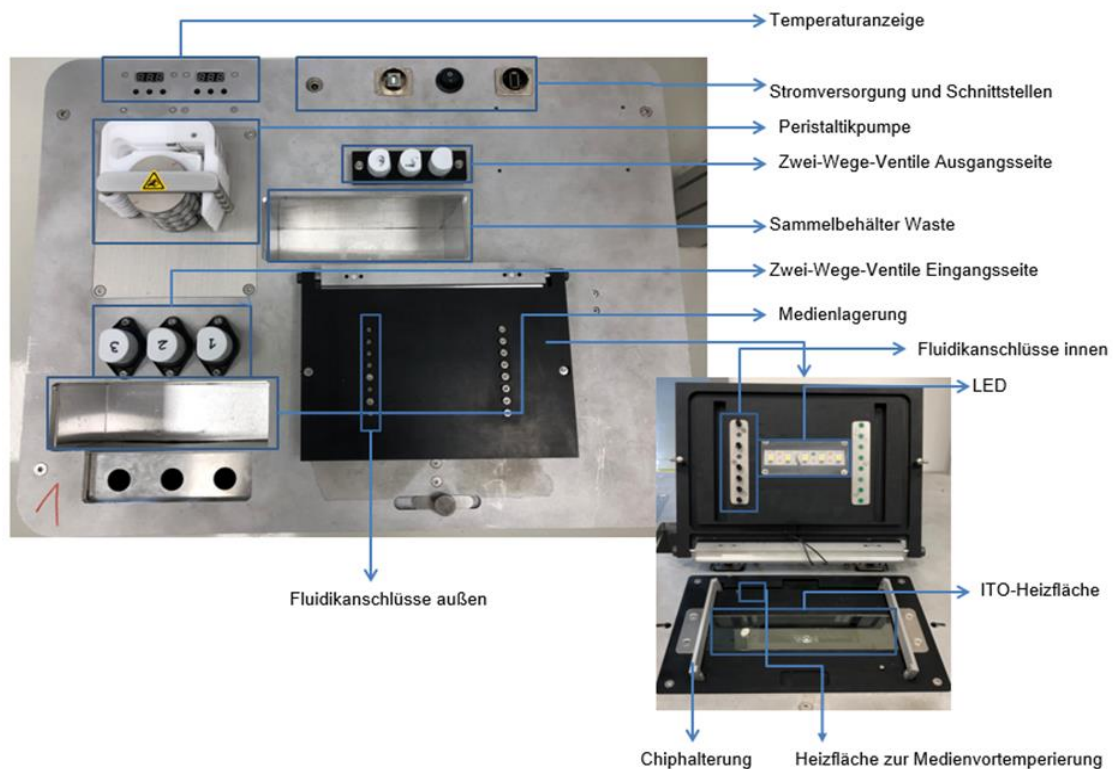
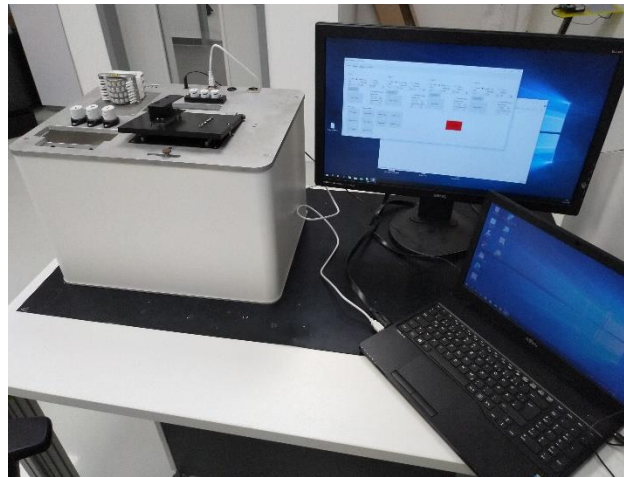


Abbildung 12: Überblick über das μ PS-Profiler Betriebsgerät bestehend aus iPS-Zellkultursystem und Steuer-PCR (oben); Detaillierte Ansicht des μ PS-Profiler Betriebs-gerätes mit Fluidiksteuerkomponenten, Temper-ierung und Chiphalter (unten)

Das System besteht aus folgenden Einzelkomponenten:

- Fluidikkontrolle
- fluidische Schnittstellen (Luer und MiniLuer)
- Medien- und Probenreservoirire
- Chiphalterung (Titerplatte und Doppelslide)
- Temperierung und Temperatursensoren
- Sensorik für Sauerstoffgehalt des Zellkulturmediums (Sensorspots und MiniLuer-Sensorplugs)
- lichtmikroskopische Wachstumskontrolle
- PMT-basiertes Detektionssystem
- Steuer-PC

Wie oben beschrieben werden die einzelnen Kammern des Chips durch drei getrennte Fluidikkreisläufe versorgt. Diese werden mittels Schlauchquetschventil gesteuert, dabei befinden sich je ein Ventil am Fluidik-Eingang und eins am Fluidik-Ausgang des Chips. Eine Mehrkanal-Peristaltikpumpe ermöglicht Flussraten von 10 bis 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, jeder Fluidikkreislauf ist durch separate Pumpenwalzen steuerbar. Abbildung 13 zeigt das System während der Systemevaluierung.

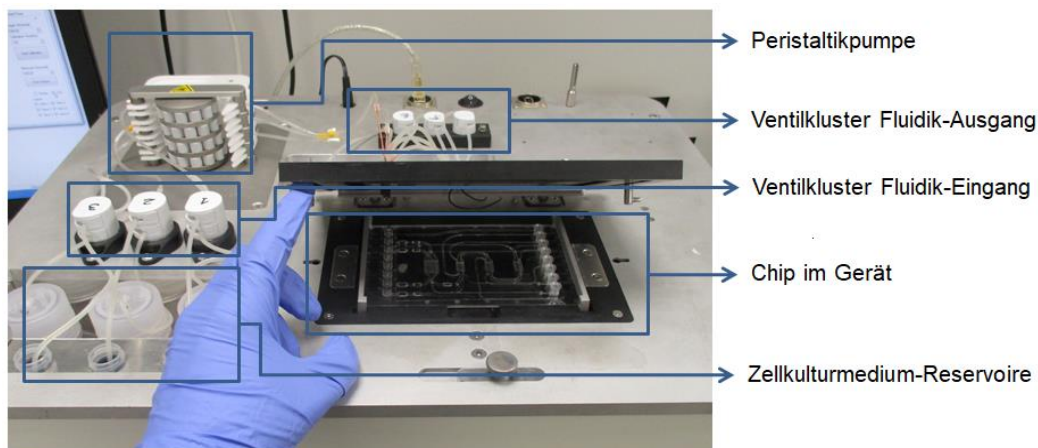


Abbildung 13: Überblick über das μiPS -Profiler System während der fluidischen und applikativen Tests, die fluidischen Kreisläufe sind mittels Schläuchen mit den Medienreservoirien und der Peristaltikpumpe verbunden, der Chip ist eingelegt.

2.1.5.2.1 Temperierung

Um eine gleichbleibende Temperierung des Chips und der iPS-Zellen zu gewährleisten kann das System auf die, durch den Nutzer definierte, Zieltemperatur geheizt werden. Die Heizung besteht aus einer Glasplatte, die mit einer transparenten ITO („indium tin

oxide“, Indiumzinnoxid)-Schicht bedampft ist, diese ist für sichtbares Licht weitestgehend transparent und behindert die lichtmikroskopische Überwachung der Zellen, sowie die Detektion des Lumineszenz-Signals nicht. Abbildung 14 zeigt vergleichende Transmissions- und Absorptionsmessungen zwischen dem genutzten ITO-Heizer und einem Standard- Glas-Objektträger.

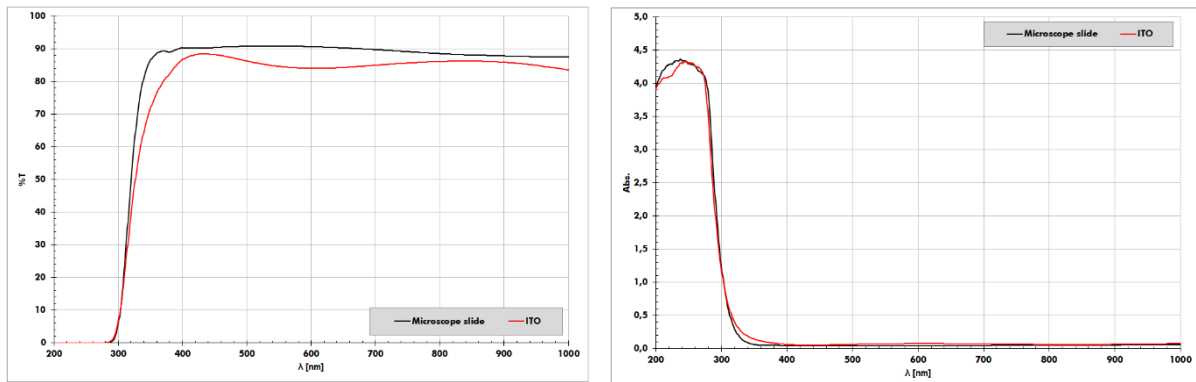


Abbildung 14: links- Transmissionsspektrum ITO-Heizer (rote Kurve) und Objektträger (schwarze Kurve); rechts- Absorptionsspektrum ITO-Heizer (rote Kurve) und Objektträger (schwarze Kurve)

Zur Evaluierung der Temperaturstabilität und Homogenität wurden Messungen mit einem Temperaturtestchip und mit einer IR-Wärmebildkamera durchgeführt. Mit Hilfe des Temperaturtestchips konnte gezeigt werden, dass die gewünschte Temperatur von 37°C erreicht wird und über den gesamten Messzeitraum stabil bleibt. Wärmebildaufnahmen zeigen die Homogenität der Temperatur über die Heizfläche. Zusätzliche Heizelemente, welche die zugeführten Zellkulturmedien von Raumtemperatur auf Inkubationstemperatur vorwärmen wurden zusätzlich integriert (Abbildung 15).

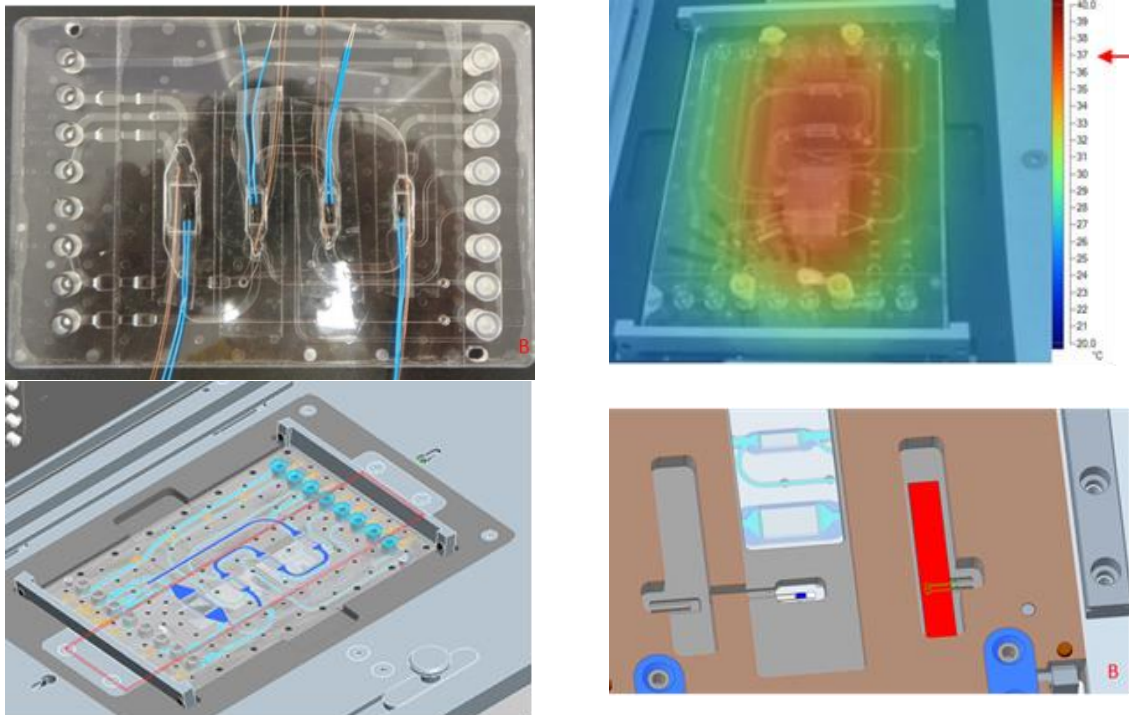


Abbildung 15: Evaluierung der gleichbleibenden Temperatur im µiPS-Profiler System; Temperaturtestchip (oben links); Infrarotwärmebildaufnahme der Heizfläche mit eingelegtem Chip (oben rechts), Zeichnung des Chips im Gerät, rot markierter Bereich – aktiv beheizter Bereich durch ITO-Platte (unten links); Position der Heizelemente zum vorwärmen der Reagenzien im Gerät (unten rechts); zur besseren Illustration wurden Konstruktionsdaten verwendet, Heizelemente sind im Gerät verdeckt.

2.1.5.2.2 Anpassungen für Doppelslide Chip

Um beide im Projekt hergestellten, integrierten Chipdesigns, Titerplattenformat und Doppelslideformat auf dem System betreiben zu können wurde ein einfach auszutauschender Deckel und eine Adapterplatte, welche es ermöglicht den Doppelslide-Chip auf dem im Gerät integrierten ITO-Heizer zu nutzen erarbeitet. Abbildung 16 zeigt den überarbeiteten Gerätedeckel.

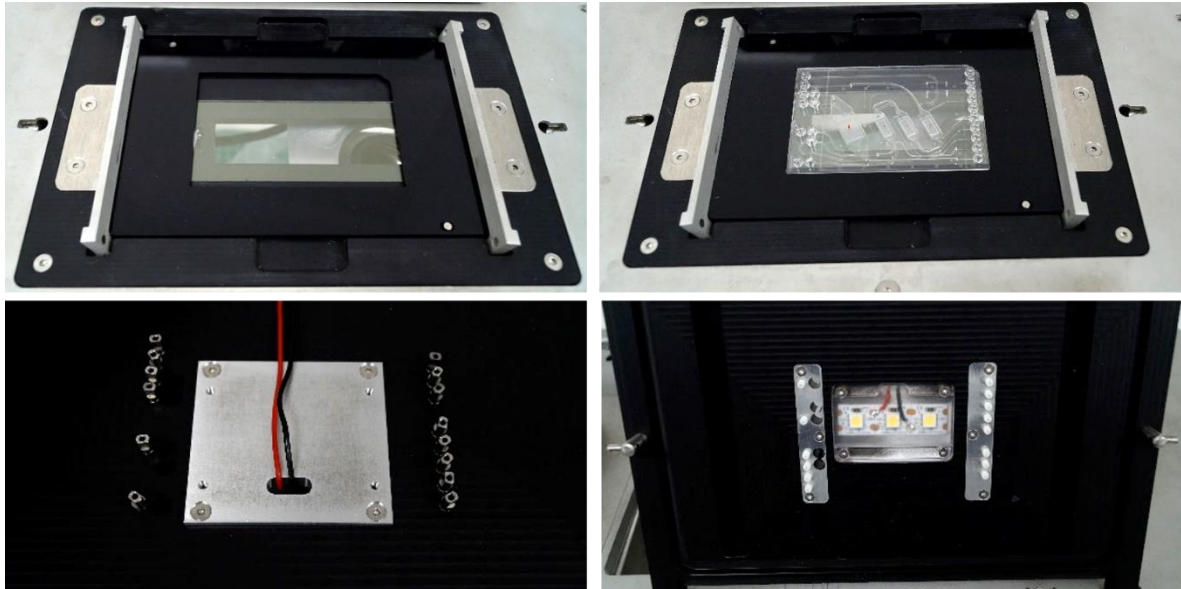


Abbildung 16: Anpassungen des μ iPS-Profilers Betriebsgerätes an das Doppelslide Chipformat, oben: Adapterplatte zu Positionierung des Chips im Gerät; Unten: Fluidische Kontaktierung und Beleuchtung für Mikroskopie

2.1.5.2.3 Detektionssystem: Durchlichtmikroskop

Ein digitales Durchlichtmikroskop mit 10-fach optischer Vergrößerung und einem Arbeitsabstand von 33,5mm wurde in das Betriebsgerät integriert. Das Mikroskop dient der Überwachung der Zellkultur und ist unterhalb der Inkubationskammern in x-Richtung verfahrbar. Die z-Achse (Fokus) kann ebenfalls verfahren werden. Die Weißlicht-LED-Durchlichtbeleuchtung ist den in Gerätedeckel integriert (siehe Abbildung 12 und Abbildung 16). Abbildung 17 zeigt das digitale Mikroskop und die Integration in den Demonstrator.

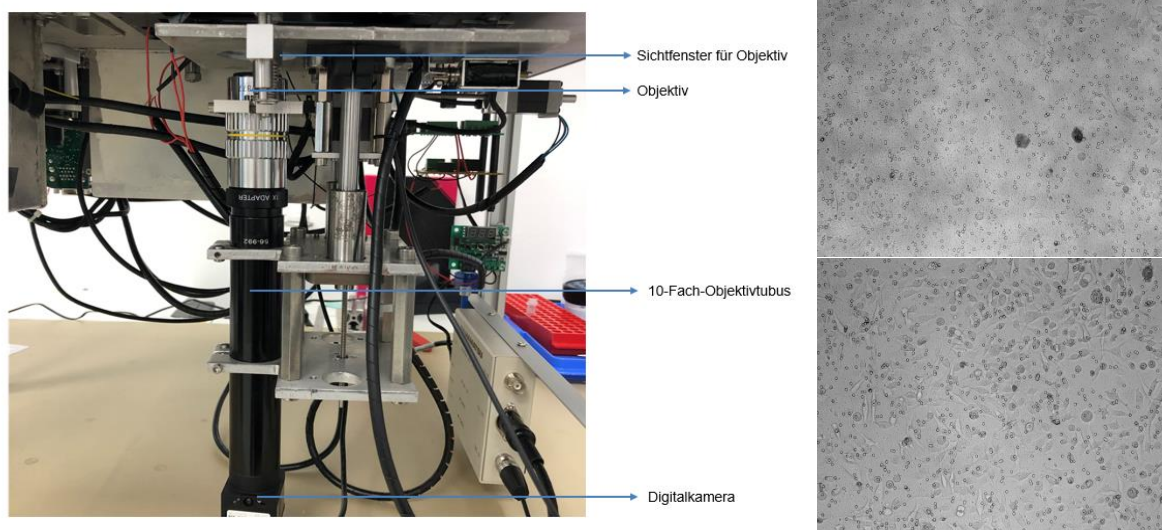


Abbildung 17: Integration Durchlichtmikroskop mit 10-fach optischer Vergrößerung und einem Arbeitsabstand von 33,5mm (links); Beispielaufnahmen Zellkultur HeLa-zellen in Kammer 1 des µiPS-Profiler Chip aufgenommen mit integriertem Mikroskop im Durchlicht (rechts).

Die prinzipielle Eignung des Mikroskops wurde mit Hilfe eines Doppelkammerchips mit integrierter Membran gezeigt, dazu wurden Aufnahmen einer HeLa-Zellkultur wurde nach 24-stündiger Kultivierung im Testchip im Betriebsgeräte-Aufbau angefertigt und analysiert (Abbildung 18).

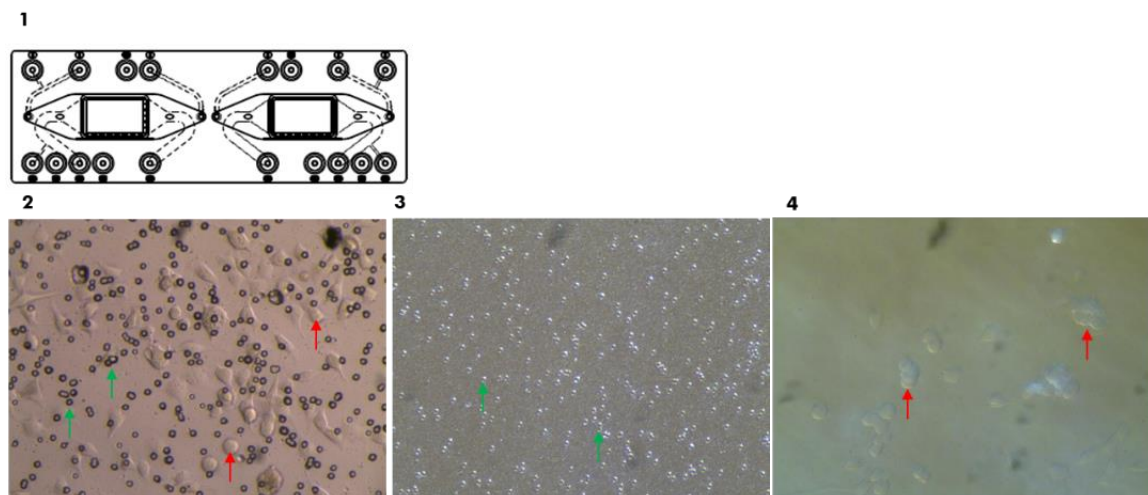


Abbildung 18: Bild 1 - Übersichtszeichnung Doppelkammerchip Fl653 mit integrierter Membran, Bild 2 - lichtmikroskopische Aufnahme der oberen Chipkammer bei geschlossenem Gerätedeckel mit Fokus auf den darauf liegenden Zellen (HeLa, 1 Tag kultiviert; roter Pfeil), grüne Pfeile-Membranporen; Bild 3 - lichtmikroskopische Aufnahme der Membranoberfläche bei geschlossenem Gerätedeckel mit Fokus auf die Membranporen (grüne Pfeile); Bild 4 - lichtmikroskopische Aufnahme der Zellen in der unteren Chipkammer mittels Durchfokussieren der Membran (rote Pfeile - HeLaZellen).

2.1.5.2.4 Detektionssystem: Photomultiplier

Zur Detektion der Lumineszenzsignale ist im Gerätedemonstrator ein PMT (Photomultiplier) vorgesehen, dieser ist am Mikroskopaufbau montiert und kann, wie das Lichtmikroskop entlang der X und Z-Achse verfahren werden. Ein Shutter schützt den PMT vor möglichen Lichtschäden, welche die LED-Beleuchtung der lichtmikroskopischen Einheit verursachen würde. Innerhalb der Software des Betriebsgerätes schließt sich die parallele Nutzung beider Systeme aus. Über Software-Einstellungen ist es möglich, die mittels Lichtmikroskopie ermittelten Chipkammerbereiche nachfolgend mit dem PMT auszuwerten.

Zur Eignungsprüfung des verwendeten PMTs, wurde im ersten Schritt ein Testmodul verwendet, welches aus dem PMT mit Shutter, der zugehörigen elektronischen Verstärker- und Ausleseschaltung und einem lichtdichten Gehäuse mit einer Aufnahme für Slideformat-Modulchips besteht. Abbildung 19 zeigt das PMT-Modul.

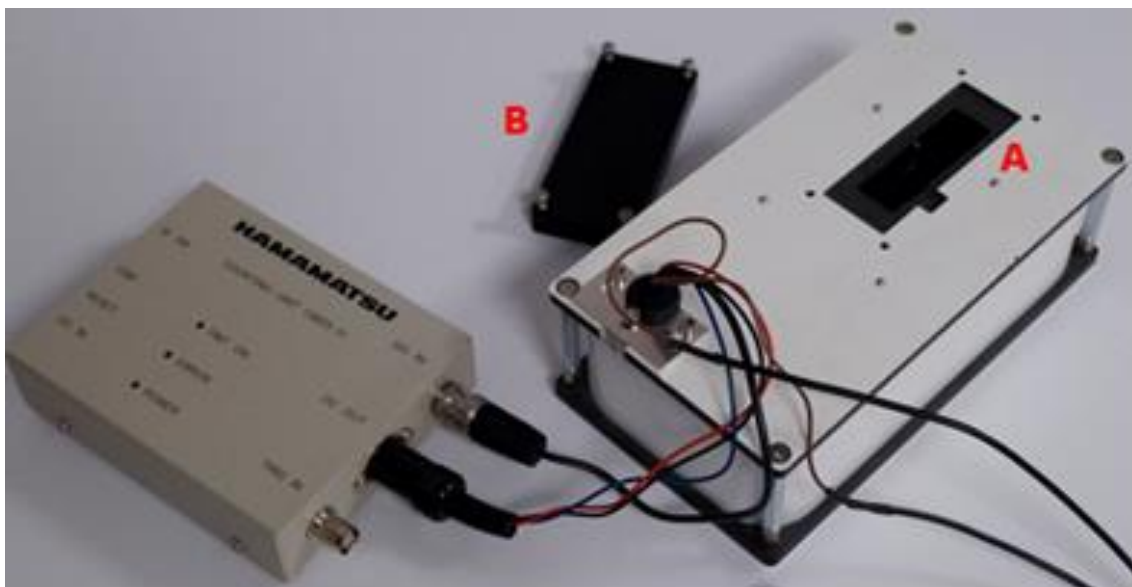


Abbildung 19: Testmodul PMT – Detektion von Lumineszenzsignalen mittels PMT in Chipmodulen (Slideformat), A – Messung des PMT von unten, Auflagefläche des Chipmodules in Slideformat, B- Lichtdicht abschließender Deckel.

Um die Nutzbarkeit des PMTs als Detektionssystem zu zeigen wurden in erster Instanz verschiedene Experimente mit dem PMT-Modul in Kombination mit dem Messkammertestchip durchgeführt. Um konstante und einfach herzustellende Bedingungen zu gewährleisten wurde eine enzymgetriggerte Lumineszenzreaktion genutzt. Dabei wird eine Substratlösung (Luminol und H_2O_2) mit einem Enzym (HRP; horse-reddish-peroxidase; Meerrettich-Peroxidase) gemischt. Das Enzym setzt das

Substrat um, dabei werden Photonen frei, die mit dem PMT detektiert werden können. Während der Experimente wurde transparente und schwarze Chips genutzt. Abbildung 20 zeigt einige Resultate der Messungen.

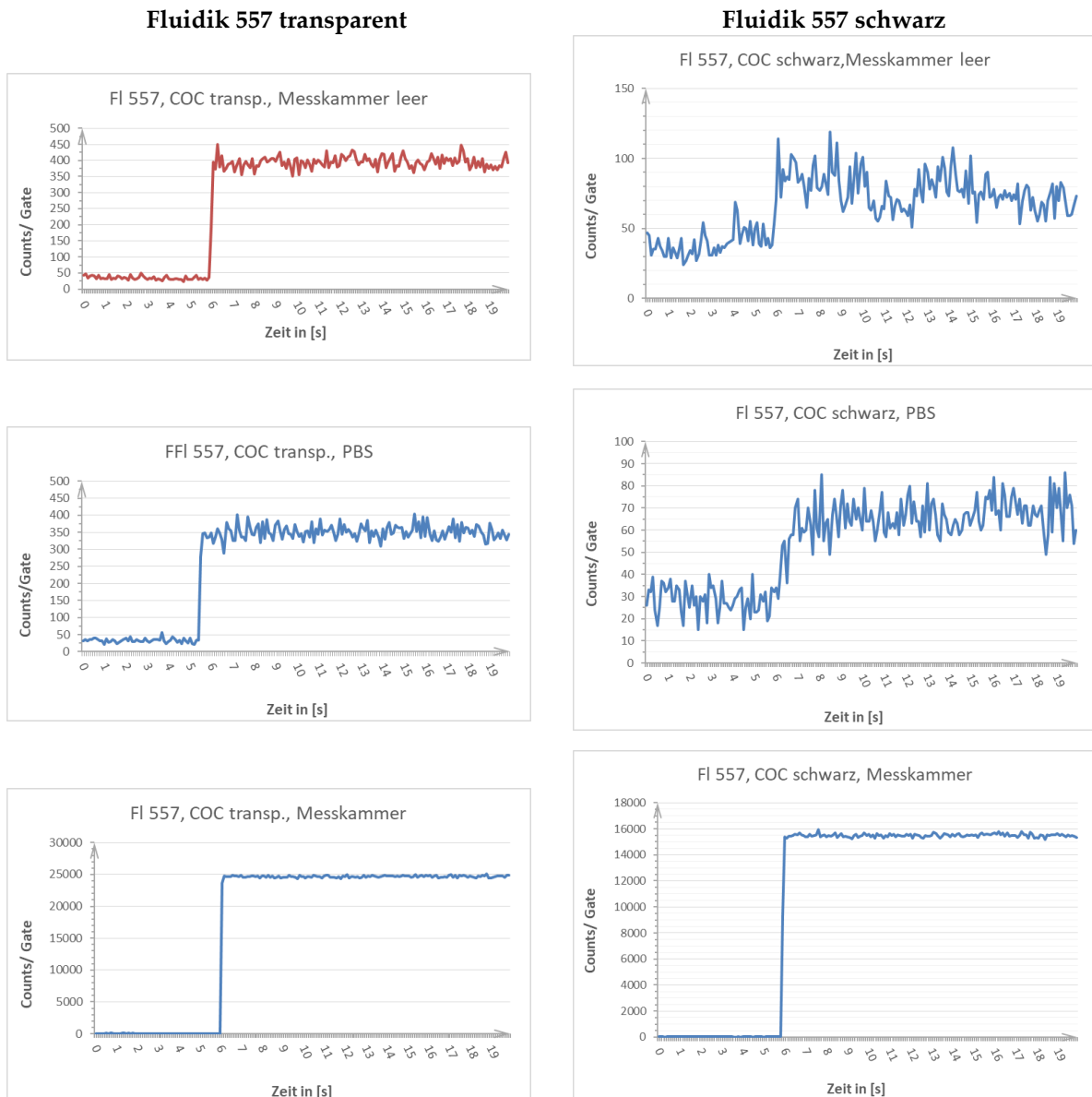


Abbildung 20: Luminolmessungen mit dem PMT-Modul in Messkammertestchips, transparent (links) und schwarz (rechts); **Oben:** Hintergrundsignal bei leerem Chip, **Mitte:** Chip mit nicht lumineszierendem PBS-Puffer gefüllt; **Unten:** Luminolmessung; Messbedingungen PMT: 100 ms Gate time, 20 s Messzeit, 2000 Messpunkte Nach ca. 5 Sekunden Leerlauf (nach Start der Messung) Öffnen des Shutters (erkennbar an Ausschlagpeak des Signals)

Es ist zu erkennen, dass der Hintergrund (leerer und mit PBS gefüllter Chip) beim transparenten Chip ungefähr 4-fach höher ist als beim schwarzen Chip. Das eigentliche Messsignal ist im transparenten Chip ca. 1,5-fach höher als im schwarzen Chip. Es konnte

gezeigt werden, dass in beiden Chips Messungen möglich sind. Das System wurde an die Projektpartner für zu Testung übergeben gleichzeitig wurde das PMT im μ PS-Profilier Betriebsgerät verbaut und in Kombination mit dem integrierten Chip getestet. Auch hier wurde für die Versuche die Luminolreaktion verwendet, dazu wurden Substrat und Enzym in die entsprechende Kammer des Chips pipettiert, der PMT wurde unter der Kammer platziert, danach wurde das Lumineszenzsignal gemessen. Um Wechselwirkungen zwischen den Kammern zu identifizieren wurde auch in allen nicht gefüllten Kammern gemessen. Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe. Die Signalintensität für transparent und schwarze Chips ist ähnlich hoch, allerdings kann bei transparenten Chips ein Signal in den nicht gefüllten Kammern detektiert werden, was bei der Auswahl des Chipmaterials in Betracht gezogen werden muss.

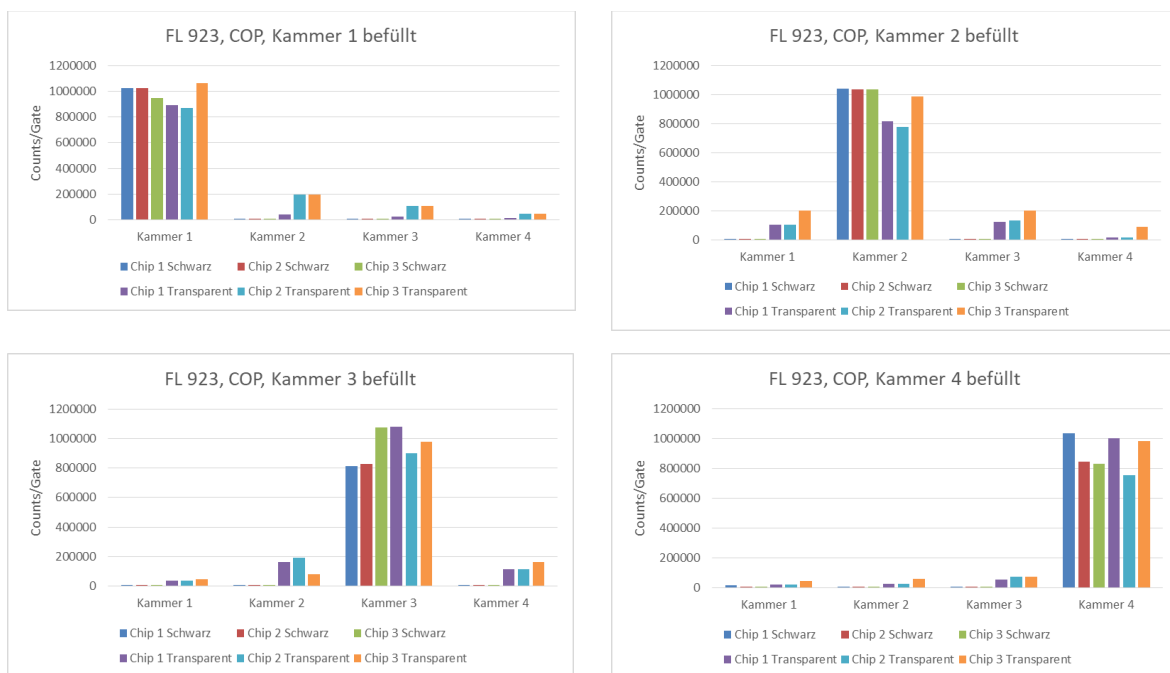


Abbildung 21: Luminolmessungen mit dem integrierten μ PS-Profilier Betriebsgerät. Messbedingungen PMT: 200 ms Gate time, 20 s Messzeit, 100 Messpunkte Nach ca. 5 Sekunden nach Start der Messung öffnen des Shutters

2.1.5.2.5 Datenerfassung

Zur Steuerung der Datenerfassung wurden Hardwaretrigger für Kamera und Countertime in das Gerät integriert. Dazu wurde ein IO-Kontrollboard verwendet, welche über die Steuersoftware kontrolliert wird. Werden die entsprechenden Ports geschaltet wird das Hardwaretriggersignal an Kamera oder Countertimer weitergeleitet und eine Messung wird ausgelöst.

2.1.5.2.6 Sensorintegration Sauerstoffmessung

Zur Überwachung der Zellkultur sind optische Sauerstoffsensoren vorgesehen, welche im integrierten Chip in den Fluidikein- und -Ausgängen positioniert sind. Mittels optischer Sauerstoffsensoren wird die O₂-Konzentration im Medium ermittelt.

Es stehen zwei verschiedene Systeme zur Verfügung, die im im Verlauf des Projektes bewertet wurden. Das erste System besteht aus einem in den Chip integrierten Messspot welcher über Lichtleiter angeregt und ausgelesen wird, dazu muss ein Sensorcocktail an den Messpunkten in den Chip gebracht werde. Alternativ kann die Messung über Sensorplugs stattfinden, welche in spezielle Messports im Chip gesteckt werden. Die beiden Systeme unterscheiden sich in der Integration in das Chipsystem, die prinzipielle Messmethodik ist gleich. Zur Bewertung der beiden Systeme wurde ein Testchip designt und gefertigt, welcher es ermöglicht den O₂- Sensorplug in die entsprechenden Messports zu positionieren, Kammern auf dem Chip ermöglichen auch die Integration des Sensorcocktails zur O₂-Messung. Für die Bewertung der Messsysteme wurde zunächst die Sauerstoffsättigung einer Pufferlösung unter Normaldruck bestimmt, dann wurde ein Reduktionmittel zugegeben und die Abnahme der Sauerstoffsättigung mit einer Referenzsonde in der Lösung und im Chip gemessen (Abbildung 22).

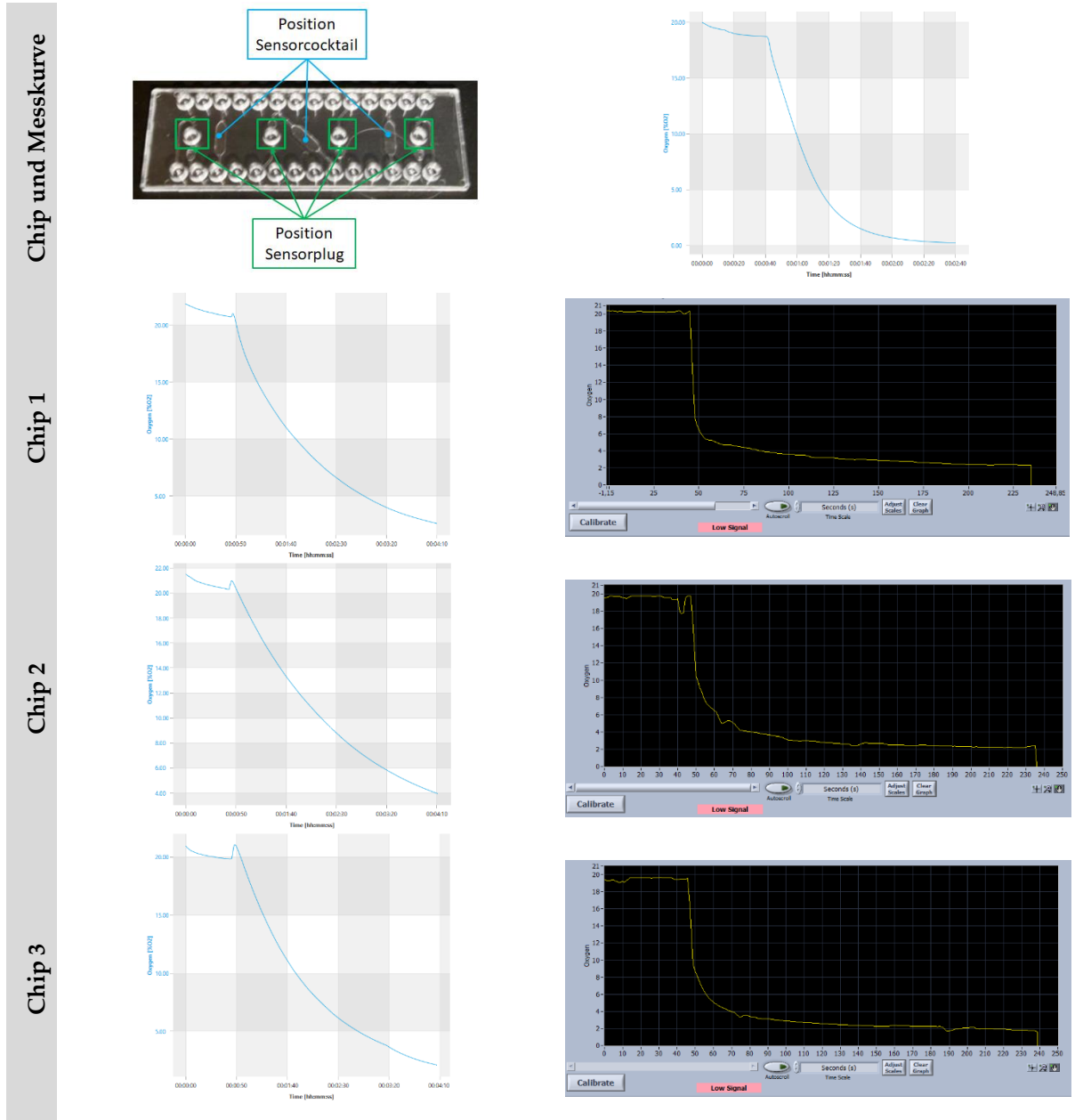


Abbildung 22: O₂-Vergleichsmessungen mit Sensorplugs und Sensorcocktail exemplarisch für 3 Chips

Die erhaltenen Messwerte beider Systeme unterscheiden sich nicht signifikant. Der größte Unterschied beider Messmethoden besteht demnach in der Integration in den Chip.

Nach Abschluss der Versuchsreihen wurde der Chip den Projektpartnern für weiterführende funktionelle Tests zur Verfügung gestellt.

2.1.5.3 Software

Die erste funktionale Version (v1.0.0.123) der C# basierten Betriebssoftware diente hauptsächlich der Inbetriebnahme und prinzipiellen Funktionsprüfung des μ iPS-Profilers Systems. Die grafische Benutzeroberfläche bestand aus zwei Software-Tabs, die die Hauptfunktionen, Fluidiksteuerung und Mikroskop-Steuerung voneinander, separierten. Im Pumpen-Tab war die Steuerung und Kalibrierung der integrierten Peristaltikpumpe möglich, auch die einzelnen Schlauchquetschventile wurden über diesen Tab gesteuert. Im Image-Tab konnte die Positionierung der Durchlichtmikroskopeinheit und das PMT-Messsystems entlang der X- und Z-Achsen werden. Abbildung 23 zeigt die Betriebsgerätesoftware v1.0.0.123.

Im Laufe der Systemevaluierung wurden verschiedene Anforderungen gesammelt, welche noch nicht von der Betriebsgerätesoftware v1.0.0.123 abgedeckt wurden. Aus diesem Grund wurde das Programm überarbeitet und die Struktur den Anforderungen angepasst. Die Tab-Struktur wurde beibehalten, im Pumpen-Tab werden die einzelnen Peristaltikpumpenwalzen, Ventile und Hardwaretrigger für die Detektion manuell gesteuert.

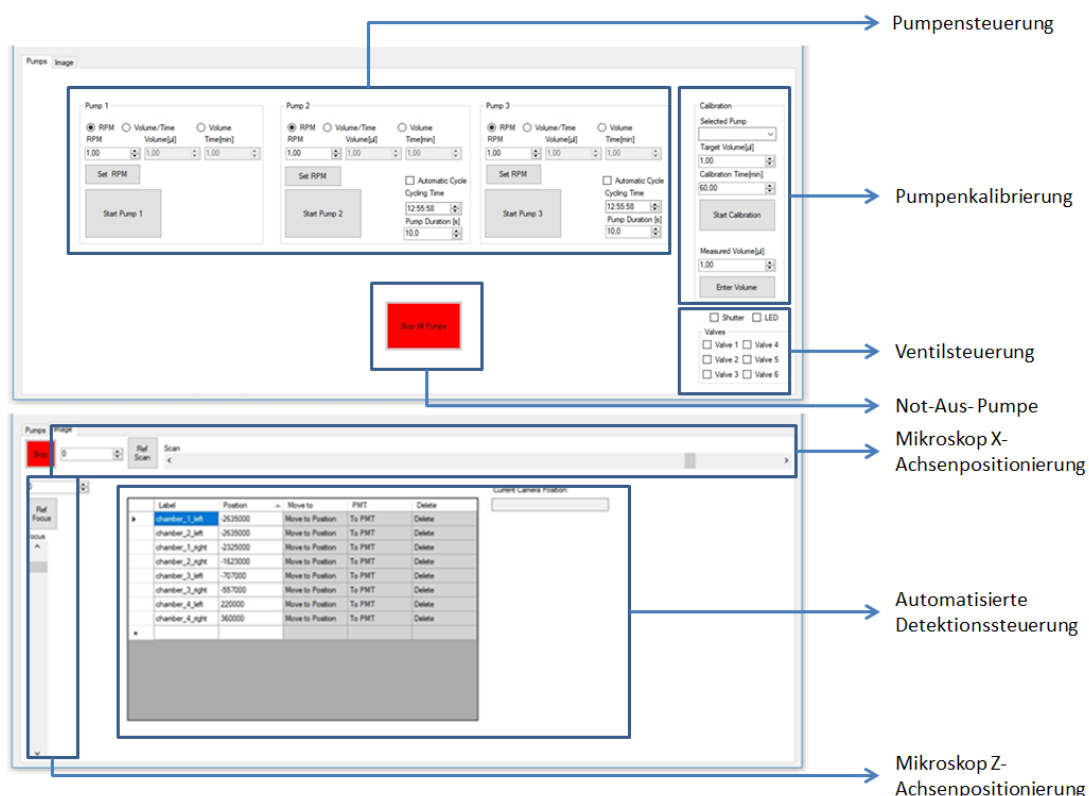
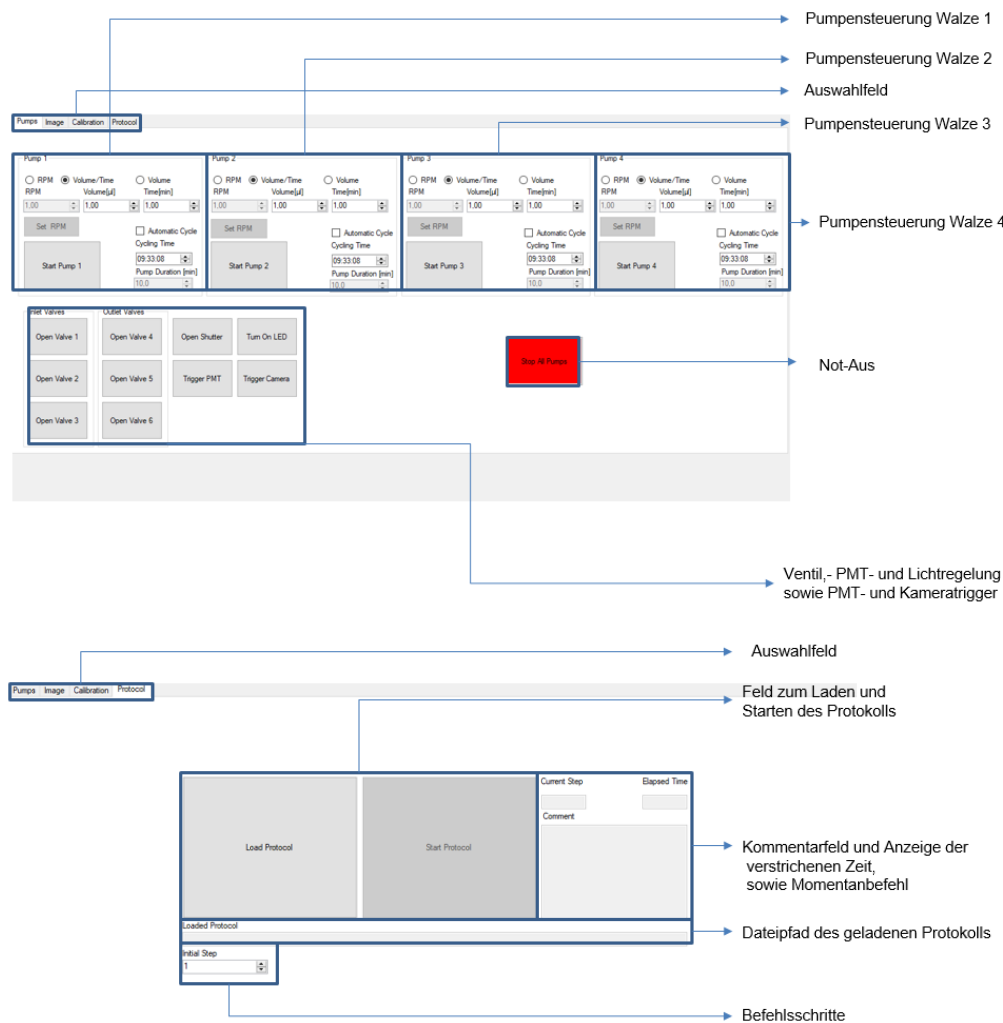


Abbildung 23: Betriebsgerätesoftware v1.0.0.123

Die Steuerung und Kalibrierung des Detektionssystems erfolgt über den Image-Tab, hier kann die Positionierung der Durchlichtmikroskopeinheit und des PMT-Messsystems

entlang der X- und Z-Achsen manuell gesteuert werden, die Detektionspositionen zur automatisierten Datenerfassung werden in diesem Tab gesetzt. Die Kalibrierung der Peristaltikpumpe erfolgt in einer separaten Tab. Größte Neuerung ist die Integration eines Protokollmodus, der für die automatisierte Gerätesteuerung genutzt wird. Dazu muss ein Steuerprotokoll geschrieben werden, welches die einzelnen Gerätekomponenten adressiert. Abbildung 24 zeigt die Betriebsgerätesoftware v1.0.0.176.



```

1 <?xml version="1.0" encoding="UTF-8" standalone="yes"?>
2 <program_steps initial_step="1">
3   <step pump_rate="10" pump_time="10:11:12" pump_number="1" valve_1_closed="false" valve_2_closed="false" valve_3_closed="false" valve_4_closed="false"
   valve_5_closed="false" valve_6_closed="false" trigger_camera="false" camera_scan_position="0" camera_focus_position="0" camera_wait_time="0" trigger_pmt
   ="false" pmt_scan_position="0" pmt_focus_position="0" pmt_wait_time="0" awaituserconfirmation="true" confirmationtext="next?" comment="Step 1"/>
4   </step>
5 </program_steps>

```

Abbildung 24: Betriebsgerätesoftware v1.0.0.176; grafische Oberfläche und Beispiel für das verwendete Steuerscript

Zur Datenerfassung wurden bis zur Betriebsgerätesoftwareversion 1.0.0.191 Steuerprogramme der jeweiligen Komponentenhersteller verwendet, die einzelnen BMBF FKZ 01EK1612A_µiPS Profiler Schlussbericht-v04-TIB.docx 31

Funktionen, wie die Bildaufnahme oder Lumineszenzmessungen wurden mit Hilfe von Hardwaretriggern, die über die Betriebsgerätsoftware gesetzt werden können, ausgelöst, Abbildung 25 zeigt diese Programme.

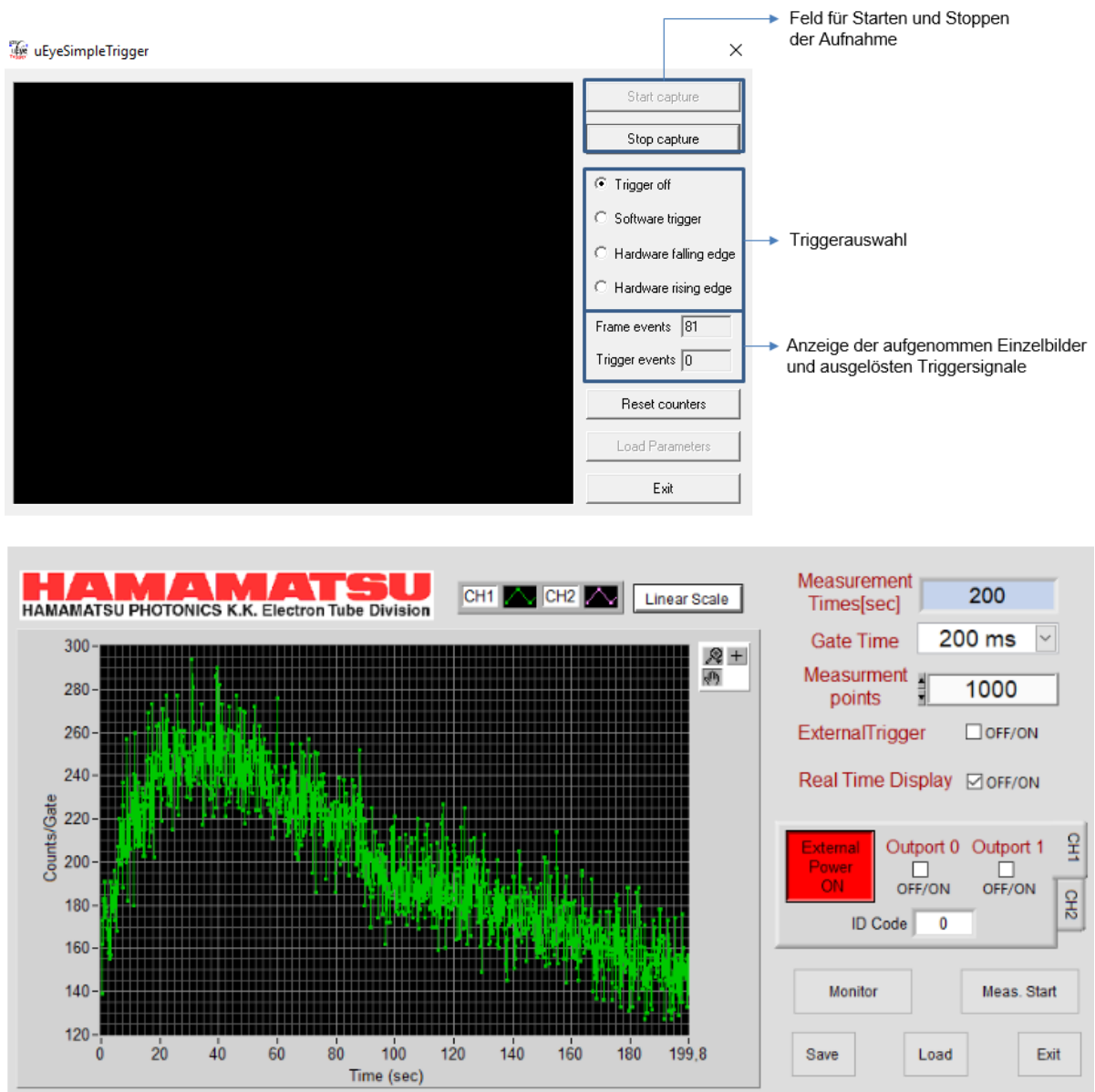


Abbildung 25:Software zur Datenakquise; oben- Bilderfassungssoftware μ EyeSimpleTrigger; unten- Countertimer Software CountingUnitC8855-01

In 03/2021 wurde dem UKJ EN ein μ iPs-Profiler Betriebsgerät mit der Softwareversion 1.0.0.206 zur Verfügung gestellt. In enger Zusammenarbeit wurde neben der fluidischen und anwednungsseitigen Evaluierung auch die Optimierung der Betriebsgerätesoftware durchgeführt. Abbildung 26 gibt einen Überblick über die grafische Benutzeroberfläche der finalen Softwareversion (v. 1.0.0.265). Die Software ist in Tabs für die manuelle

Kontrolle der einzelnen Systemkomponenten, automatisierte Protokollausführung, Pumpenkalibrierung, Mikroskopischkontrolle aufgeteilt. Zur Aufnahme von PMT-Messdaten wurde ein Messmodul integriert, welches es ermöglicht die Integrationszeit des PMTs einzustellen, den Hardware-Shutter zu öffnen und zu schließen und manuelle Messungen durchzuführen. Die Aufnahme von Mikroskop- Bildern erfolgt durch das Softwaremodul μ EyeSimpleTrigger.

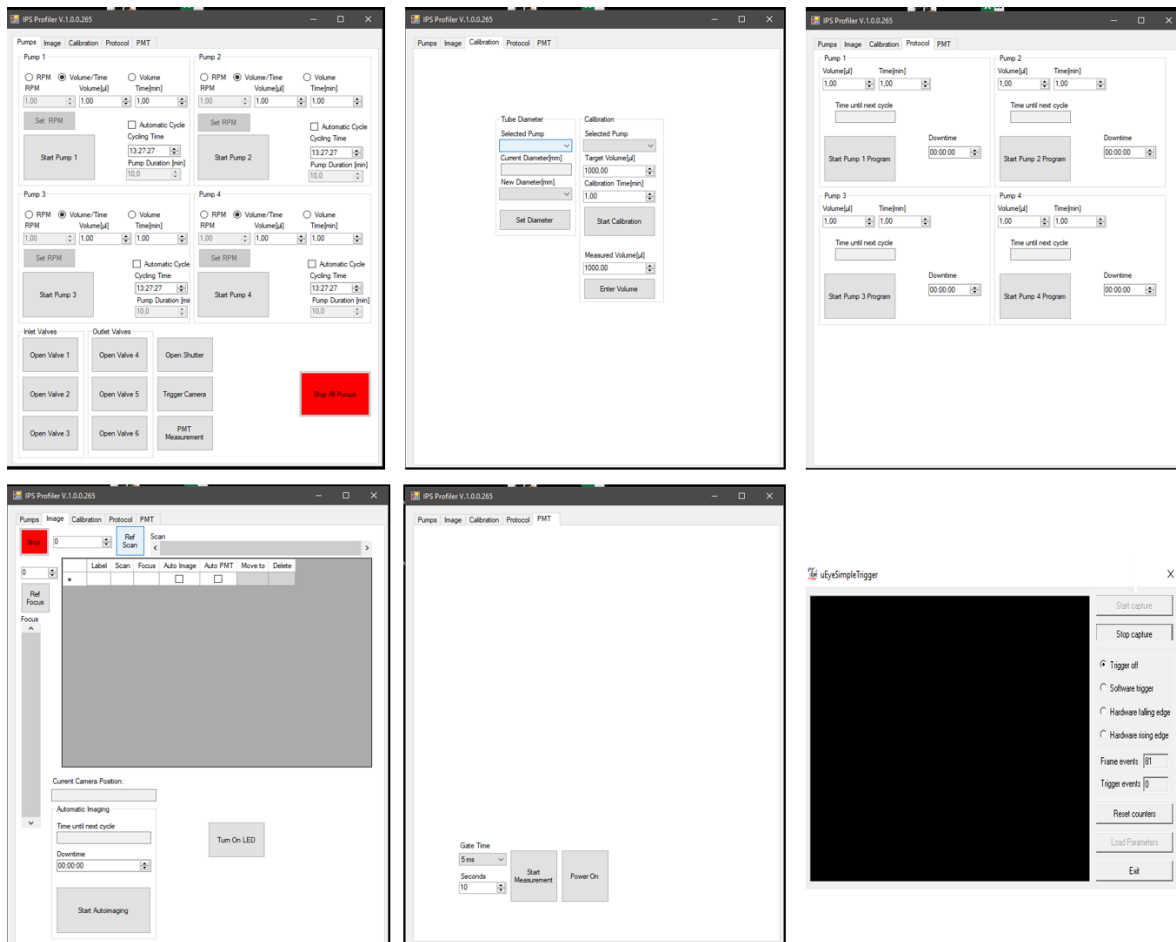


Abbildung 26: Überblick über Betriebsgerätesoftware iPS Profiler v. 1.0.0.265; Oben Manuelle Steuerung der einzelnen Gerätekomponenten; Pumpenkalibrierung; automatisierte Protokolldurchführung (v.l.n.r.); unten Mikroskopsteuerung; PMT-Steuerung, μ EyeSimpleTrigger (v.l.n.r.)

2.1.5.3.1 Updates Steuerungssoftware

Im Projektverlauf wurde kontinuierlich an der Optimierung der Betriebsgerätesoftware gearbeitet. Das letzte große Softwareupdate auf die finale Version (v. 1.0.0.265) erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem UKJ-EN. So konnte wichtiges Nutzfeedback

gesammelt werden, welches zur Optimierung der Stabilität und Usability des Systems beitrug.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die größten Softwareupdates im Verlauf des Projektes.

Tabelle 2: Optimierung Betriebsgerätesoftware; Übersicht über verschiedene Softwareversionen, welche im Laufe des Projektes zum Einsatz kamen

Software Version	Beschreibung
1.0.0.123	Erste Version der Betriebsgerätesoftware; Steuerung von Fluidik und Mikroskop
1.0.0.161	Überarbeitung GUI, Steuerung Peristaltikpumpe und Mikroskop
1.0.0.180	Einführung Tab für manuelle Ventil- und Pumpensteuerung; Getrennter Tab für automatisierte Protokolldurchführung, Automatikprotokoll als separates .xml Protokoll, Kalibrierung Peristaltikpumpe integriert
1.0.0.191	Anpassung automatisierte Protokolldurchführung über GUI; Implementierung PMT- und Bildaufnahme-Trigger für externe Aufnahmesoftware
1.0.0.206	Implementierung PMT-Steuerung
1.0.0.265	Verbesserungen aus Feedback der Nutzertests am UKJ EN; Softwarestabilität verbessert; Kalibrierung Peristaltikpumpe überarbeitet; und Mikroskopsteuerung überarbeitet; GUI überarbeitet

2.1.6 WP 1.4 Prozessentwicklung

2.1.6.1 Funktionstest Gesamtsystem

Verschiedene Funktionstests mit HeLa-Zellkulturen wurden im Betriebsgerät und integrierten Chip durchgeführt. Ziel der Funktionstests war zu überprüfen, ob die eingesäten Zellen in der jeweiligen Chipkammer wachsen und somit alle Geräteparameter funktionieren. Zunächst wurde der Chipkreislauf mit Nährmedium befüllt und HeLa-Zellen eingesät. Das μ iPS-Profiler Betriebsgerät wurde auf eine Flussrate von 1000 μ l/h Nährmedium eingestellt. Mit Hilfe des integrierten Durchlichtmikroskops wurden stündlich Bilder aufgenommen um die Entwicklung der HeLa-Zellen zu dokumentieren. Nach 69 Stunden wurde das Experiment beendet, in den Kammern hat sich ein mehrschichtiger Zellrasen gebildet, eine Auswertung bzw. die Bewertung der Zellkultur war auf Grund der hohen Zelldichte nicht mehr möglich (Abbildung 27).

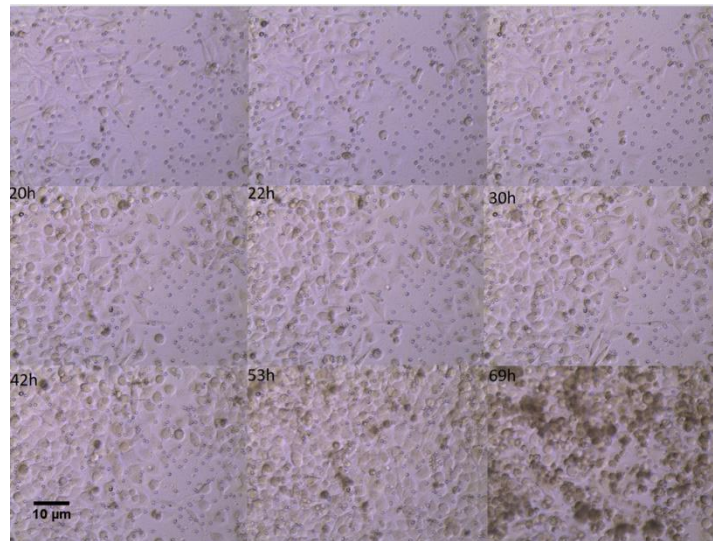


Abbildung 27: Auswahl der Mikroskopaufnahmen der HeLa-Zellkultur in Kammer 1 des integrierten Chips während des Funktionstest von 0-69 Stunden

2.1.7WP 1.5 Systemintegration

2.1.7.1 Evaluierung am UKJ EN

Wie bereits oben beschrieben wurde 03/2021 ein Betriebsgeräte an das UKJ EN für zur Evaluierung und Optimierung der Systemperformance übergeben. Die Versuche am UKJ EN zeigen die Funktionalität des integrierten Gesamtsystems bezüglich der Langzeitkultuivierung von Zellen und der Messung von Lumineszenzsignalen

Die unten gezeigten Daten wurden der Präsentation der AG Mrowka aus dem Projektmeeting am 23.04.2022 entnommen und zeigen Ergebnisse verschiedener Versuchsreihen mit dem integrierten Chip (Titerplattenformat) und dem µiPS-Profiler Betriebsgerät. Abbildung 28 enthält Aufnahmen verschiedener Zellkulturexperimente mit dem µiPS-Profiler Betriebsgerät.

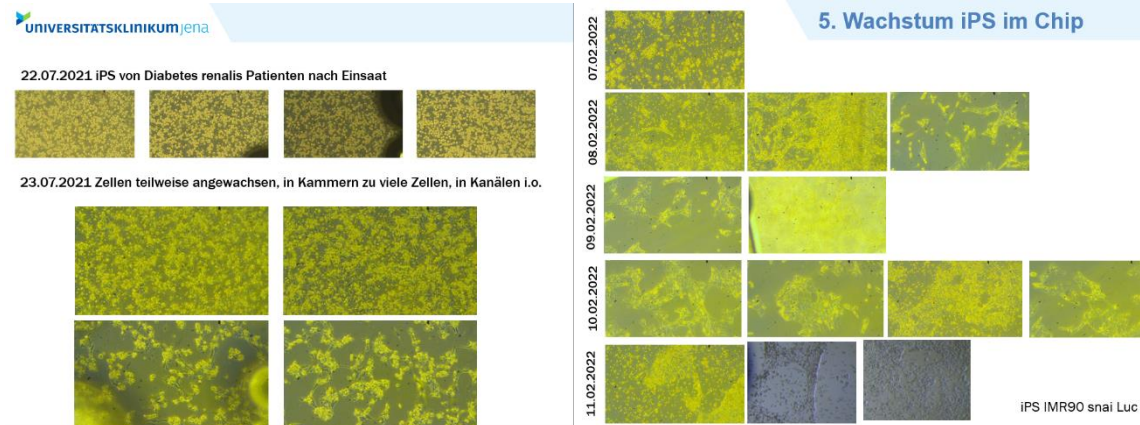


Abbildung 28: Aufnahmen verschiedener Zellkulturexperimente mit dem integrierten Durchlichtmikroskop des μ iPS-Profilers Betriebsgerätes; Quelle: Präsentation Projektmeeting 23.03.2022 UKJ

In Abbildung 29 sind Lumineszenzvergleichsmessungen verschiedener Zellkulturexperimente beispielhaft dargestellt, welche ebenfalls mit dem System durchgeführt wurden. Als Referenzgerät wurde das Topcount System von Perkin & Elmer verwendet.

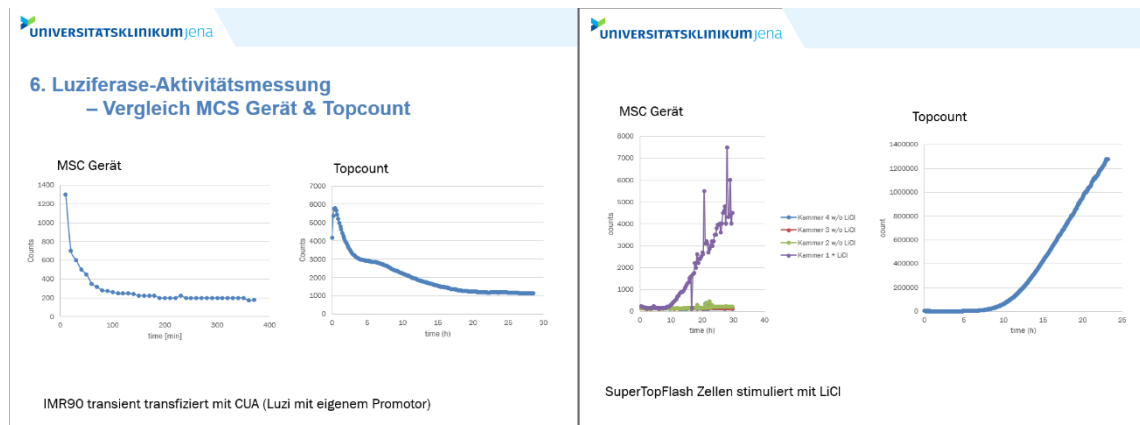


Abbildung 29: Lumineszenzmessungen verschiedener Zellkulturexperimente mit dem integrierten PMT des μ iPS-Profilers Betriebsgerätes im Vergleich zu Messungen zum Referenzgerät (Topcount); Quelle: Präsentation Projektmeeting 23.03.2022 UKJ

2.1.8 Evaluierung an der Universität Heidelberg AG Wöfl

Ein weiteres μ iPS-Profilers System wurde in 06/2022 an die AG Wöfl übergeben. Zuvor erfolgte ein ausführliches mehrtägiges Training am Gerät und am Chip. Im Gegensatz zu dem beim UKJ EN genutzten μ iPS-Profilers Gerätes, welches mit der ersten integrierten Chipgeneration (Titerplattenformat) arbeitet das System bei der AG Wöfl mit dem zweiten integrierten Chipdesign (Doppelslide).