

# Microfluidic Hanging-Drop Platforms for 3D Microtissue Culture and Analysis

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Misun, Patrick M.

**Publication date:**

2018

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000298070>

**Rights / license:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 25393

***MICROFLUIDIC HANGING-DROP PLATFORMS FOR  
3D MICROTISSUE CULTURE AND ANALYSIS***

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by  
PATRICK MARK MISUN  
M.Sc. Biotechnology, ETH Zurich

born on 18.09.1987  
citizen of  
Basel, BS, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Andreas Hierlemann

Prof. Dr. Petra S. Dittrich

Dr. Olivier Frey

2018

## ABSTRACT

This thesis presents the concept and applications of microfluidic hanging-drop platforms for the culture and analysis of 3D microtissues – an emerging *in vitro* cell culture model. The motivation of this work was to bridge the gap between advances in 3D cell cultures and the commonly used cell culture platforms, which are designed prevalently for static and 2D cell cultures, and to demonstrate the potential of dedicated 3D cell culture platforms in providing suitable and reliable experimental conditions.

Hanging drops are used for the scaffold-free formation and culture of spherical 3D microtissues. These microtissues are easy to handle and feature many organotypic tissue functions, which renders them a suitable *in vitro* model system for both, basic research, and pharmaceutical industry. Despite the biological relevance and advantages of these microtissue model systems, the lack of optimized platforms for culturing and analysis still limits the widespread use and application of 3D microtissues in biomedical testing and pharmaceutical compound screening.

Microfabrication techniques offer a great toolbox to build next-generation cell culturing and analysis systems. The combination of microfluidics to realize physiologically-relevant culture conditions and microfabricated sensor units enables the realization of integrated systems for organ-, and body-on-a-chip applications.

This thesis presents the fabrication, working principle and operation of microfluidic hanging-drop networks for the culturing and analysis of 3D microtissues, and introduces three dedicated platforms for interrogating 3D models.

- i. *Biosensing in hanging-drop networks.* Enzyme-based biosensors were integrated in hanging-drop networks for real-time *in situ* multi-analyte monitoring of 3D microtissue metabolism. The device enabled online detection of lactate secretion and glucose consumption of human colon cancer microtissues.
- ii. *High-resolution imaging in hanging-drop networks.* Integration of hydrogels in hanging-drop networks enabled both, immobilization of 3D microtissues for high-resolution and long-term imaging, as well as providing fine control over the microenvironment of the 3D microtissues. The system allows for investigating complex

biological processes down to single-cell level and for observation of physiologically events at subcellular scale.

- iii. *FlowGSIS in hanging drops*. A hanging-drop perfusion system was developed for studying the dynamics of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) of human endocrine pancreas islets. The device enabled high-temporal-resolution sampling to resolve the bi-phasic and pulsatile insulin release of single islets to study the effects of anti-diabetic medication.

The presented platforms represent a set of novel tools for culturing and interrogating 3D microtissues. The design and operation of each platform has been optimized for the respective application, ranging from precise stimulation of microtissues and subsequent metabolite detection, to long-term and high-resolution imaging. The broad range of applications served by these platforms and the platform complementarity greatly improve our capability of taking full advantage of 3D microtissues as organotypic *in vitro* model systems.

## ZUSAMMENFASSUNG

Diese Dissertation behandelt das Prinzip und die Anwendung von mikrofluidischen Plattformen zur Kultur und Analyse von 3D-Mikrogeweben, einem aufkommenden *in vitro* Zellkulturmodell.

Die Motivation dieser Arbeit war es die Lücke zwischen neuen 3D-Zellkulturmodellen und herkömmlichen Zellkulturmethoden, welche vor allem für statische und 2D-Zellkulturen konzipiert waren, zu schliessen. Wir wollten die Vorteile und das Potential von neuen Plattformen aufzeigen, welche für 3D-Zellkulturen optimiert wurden, um geeignete und verlässliche experimentelle Bedingungen zu ermöglichen.

Hängende Tropfen werden für die gerüstfreie Formung und Kultur von sphärischen 3D-Mikrogeweben verwendet. Diese Mikrogewebe sind einfach in der Handhabung und weisen viele organotypische Eigenschaften auf, welche sie zu einem geeigneten *in vitro*-Modell für die Grundlagenforschung und die Pharmaindustrie machen. Trotz der biologischen Relevanz und Vorteile dieser Mikrogewebe als Modellsystem mangelt es an optimierten Plattformen für deren Kultur und Analyse, was deren Anwendung in der Biomedizin, aber auch in der Pharmaindustrie für die Suche nach neuen Wirkstoffen beschränkt.

Mikrofabrikationsprozesse bieten eine Vielfalt an Möglichkeiten um Zellkultur-, und Analysesysteme der nächsten Generation zu entwickeln. Die Kombination von Mikrofluidik, um physiologisch relevante Kulturkonditionen zu erzeugen, und mikrofabrizierten Sensoreinheiten macht integrierte Systeme für Organ-Chip-, und Multi-Organ-Chip Anwendungen möglich.

Diese Dissertation beschreibt die Fabrikation, das Funktionsprinzip und den Einsatz von mikrofluidischen Netzwerken von hängenden Tropfen für die Kultur und Analyse von 3D-Mikrogeweben und präsentiert drei spezialisierte Plattformen für solche Zellkulturen.

- i. *Biosensorik in Netzwerken von hängenden Tropfen.* Enzymbasierte Biosensoren wurden in Netzwerken von hängenden Tropfen für die Echtzeit *in situ* Überwachung des Metabolismus von 3D-Mikrogeweben integriert. Die Plattform erlaubt die online-Detektion von Laktatsekretion und Glukoseaufnahme von humanen Darmkrebsmikrogeweben.

- ii. *Hochaufgelöste Bildgebung in Netzwerken von hängenden Tropfen.* Die Integration von Hydrogelen in Netzwerken von hängenden Tropfen erlaubt die Immobilisierung von 3D-Mikrogeweben für hochaufgelöste Bilderfassung über längere Zeiträume und erlaubt die präzise Kontrolle der Mikroumgebung von 3D-Mikrogeweben. Das System ermöglicht die Untersuchung von komplexen biologischen Vorgängen auf Einzelzellebene und ermöglicht die Überwachung von physiologischen Ereignissen auf subzellulärer Ebene.
- iii. *FlussGSIS in hängenden Tropfen.* Ein Perfusionssystem auf Basis von hängenden Tropfen wurde für die Untersuchung der dynamischen Glukose-stimulierten Insulinsekretion von humanen Langerhans'schen Inselzellen der Bauchspeicheldrüse entwickelt. Die Plattform ermöglicht Probeentnahmen mit hoher zeitlicher Auflösung um die Zweiphasen- und die pulsierende Insulinsekretion von einzelnen Langerhans-Inseln zu detektieren und um die Effekte von Diabetesmedikamenten zu untersuchen.

Die präsentierten Plattformen stellen eine Auswahl von neuartigen Instrumenten für die Kultur und die Untersuchung von 3D-Mikrogeweben dar. Die Entwicklung jeder dieser Plattformen wurden für eine spezifische Anwendung optimiert. Diese reichen von der präzisen Stimulation von Mikrogeweben und der anschliessenden Detektierung von Metaboliten bis zu Langzeitbilderfassung in hoher Auflösung. Die vielfältige Anwendbarkeit dieser Plattformen und deren Komplementarität verbessern im hohem Masse die Möglichkeiten, das Potential von 3D-Mikrogeweben als organspezifische *in vitro* Modelle voll und ganz auszuschöpfen.