

PoreGenic[®] - Patch-on-Chip-System für Zellnetzwerke

Carsten Tautorat¹, Denise Franz¹, Jan Gimsa¹, Werner Baumann¹, Helmut Beikirch² und Philipp Julian Köster¹

¹ Universität Rostock, Lehrstuhl für Biophysik, Gertrudenstraße 11a, 18057 Rostock

² Universität Rostock, Lehrstuhl Elektronische Bauelemente und Schaltungstechnik, Albert-Einstein-Straße 2, 18051 Rostock

philipp.koester@uni-rostock.de

Zusammenfassung

In der Medikamentenentwicklung werden die Reaktionen lebender, biologischer Zellen auf neue pharmazeutische Wirkstoffe untersucht. Für qualitativ hochwertige Messungen wird dabei die Patch-Clamp-Technik angewendet, die in den letzten 20 Jahren zunehmend automatisiert wurde. Die automatisierten Patch-Clamp-Systeme sind allerdings funktionsbedingt auf die Untersuchung von suspendierten Einzelzellen beschränkt, obwohl die meisten Zellen im Menschen, im Tier sowie in Pflanzen adhärent in Zellnetzwerken leben. Die Analyse der vernetzten Zellkultur wurde demnach in der Medikamentenentwicklung bisher eher vernachlässigt, woraus sich unsere Motivation ableitet, ein neuartiges Patch-on-Chip-System (PoreGenic[®]) für natürliche Zellnetzwerke zu entwickeln.

Die hier vorgestellte erste Entwicklungsstufe von PoreGenic[®] diente der Erprobung und Weiterentwicklung der lokalen Elektroporation als Öffnungswerkzeug für Zellmembranen. Auf diese Weise sollen intrazelluläre Ganzzelleableitungen sowie das zielgerichtete Einschleusen von Substanzen in eine oder mehrere ausgewählte Zellen im Netzwerk ermöglicht werden. Wir verwendeten dafür mikrostrukturierte Nadelelektroden mit Höhen zwischen 1 µm bis 5 µm, deren technische Machbarkeit zunächst gezeigt werden musste. Es wurden vier verschiedene Elektrodentypen prozessiert und erprobt, die jeweils in einem 8×8 Multielektrodenarray auf einem Sensorchip angeordnet sind. Mit der angeschlossenen Elektronik war es uns bereits möglich erste intra- und extrazelluläre Potentiale über die Nadelelektroden abzuleiten. Voltage- oder Current-Clamp-Ableitungen sind mit diesen Elektroden jedoch nicht möglich.

Wir stellen nachfolgend den Systemaufbau (Sensorchip, Nadelelektroden etc.), Ergebnisse zur lokalen Elektroporation sowie intra- und extrazelluläre Signalableitungen vor. Abschließend geben wir einen Ausblick auf den aktuellen Entwicklungsstand des PoreGenic[®]-Systems, das Patch-on-Chip-Ableitungen mit bis zu 16 Hohnadelstrukturen auf einem Fluidikchip ermöglicht.

1 Einleitung

Die Medikamentenentwicklung ist ein langwieriger Prozess, der stark von Zeit- und Kostendruck geprägt ist. In seinen verschiedenen Phasen müssen aus einer Bibliothek, gefüllt mit Hunderttausenden bis Millionen Substanzen, geeignete Wirkstoffe schnell und sicher erkannt werden. Damit ihr Einfluss auf die Ionenkanäle und das Verhalten von lebenden, biologischen Zellen direkt untersucht werden kann, wird u. a. die manuelle Patch-Clamp-Technik angewendet, die hier als Gold-Standard-Methode gilt. Ihr klassisch manueller Aufbau, mit bis zu 20 Testungen pro Tag, kann jedoch die zunehmende Nachfrage nach einer Steigerung der Durchsatzrate nicht erfüllen. Mit den derzeit auf dem Markt erhältlichen automatisierten Patch-Clamp-Systemen sind Raten von bis zu 10.000 Datenpunkten pro Tag erreichbar, die jedoch ausschließlich auf die Untersuchung von suspendierten Einzelzellen beschränkt sind. Die meisten Zellen im Menschen, im Tier sowie in Pflanzen wachsen allerdings adhärent in Zellnetzwerken. Problematisch ist hierbei, dass aus ihrem Netzwerk gelöste Einzelzellen, u. a. aufgrund der fehlenden Gap-Junctions (Zell-Zell-Kontakt), ein verändertes Verhalten zeigen. Dadurch besteht die Gefahr, dass es zu teuren Fehlentscheidungen in der präklinischen Phase von Substanztestungen kommen kann. Unter Umständen wird dann die optimale Wirksubstanz gegen eine bestimmte Krankheit nicht weiter untersucht und geht als Medikament verloren. Um diese

technologische Lücke zu schließen, entwickeln wir das neuartige Patch-Clamp-System PoreGenic[®] für automatisierbare Patch-Clamp-Ableitungen an natürlichen Zellnetzwerken.

2 Material und Methoden

2.1 Sensorchip

Die hier vorgestellte erste Entwicklungsstufe des PoreGenic[®]-Messsystems basiert auf einem Sensorchip mit 64 mikrostrukturierten Nadelelektroden. Die Elektroden sind mit einem Abstand von 100 μm in einem 8 \times 8 Multielektrodenarray (MEA) angeordnet. **Bild 1 I** zeigt einen Teilausschnitt des MEA mit integrierter Elektrodenbeschriftung. Die Nadelelektroden der verwendeten Sensorchips unterscheiden sich in Material sowie Form und werden in vier Grundtypen eingeteilt: **A: Platin** [1, 2]; **B: silberbeschichtetes Platin** [3]; **C: Platin-Hohnadel** [4] und **D: Silber-Ganzmetall** [5]. **Bild 1 A-H** zeigt die vier Typen anhand von Beispielen in seitlicher Ansicht sowie im Querschnitt. Die Platin-Elektroden (Typ A) in **Bild 1 A&E** stellen die einfachste Form mit spitzen oder flachen Nadelelektroden dar. Sie sind der Ausgangspunkt für die galvanisch silberbeschichteten Elektroden (Typ B) in **Bild 1 B&F**. Die Hohnadeln (Typ C) in **Bild 1 C&G** dienen als Vorarbeiten für den beabsichtigten fluidischen Zugriff auf das Zellinnere für Patch-Clamp-Ableitungen. Die Nadelstruktur bildet hier einen nach oben geöffneten Hohlraum mit einem inneren Öffnungsdurchmesser von weniger als 2 μm . Die Elektrodenmetallisierung (Platin) umgibt die äußere Nadelstruktur. Die Chiptypen A-C basieren auf einem Silizium-Substrat. Hingegen sind die Silber-Ganzmetallelektroden (Typ D) in **Bild 1 D&H** zur Verbesserung der elektrischen Eigenschaften auf Borosilikatglas-Substrat hergestellt. Die obere Passivierungsschicht isoliert die Metallisierung aller Elektrodentypen von der Zellkultur und ist im Bereich der Nadelspitze geöffnet. Jeder Sensorchip ist in einem keramischen Chipträger (68-Pin-CLCC) untergebracht, siehe **Bild 1 J**. Das Silizium-Substrat sowie die Elektroden werden durch Gold-Drahtbonden elektrisch kontaktiert. Oberhalb des Chips ist ein Plastiktrog aufgeklebt, der die eigentliche Messkammer bildet und für die Nährstoffversorgung der Zellen benötigt wird, siehe **Bild 1 J**. Der Trog begrenzt die Zellkulturfläche um den MEA-Bereich des Sensorchips.

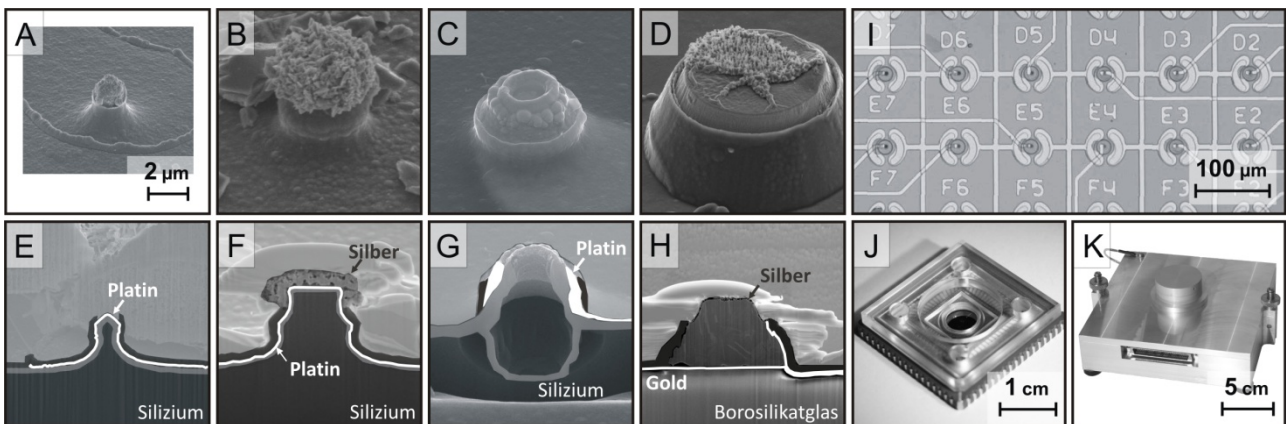


Bild 1 Chipbasiertes Messsystem PoreGenic[®] (1. Entwicklungsstufe) mit mikrostrukturierten Nadelelektroden

A-H: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (gleicher Maßstab) von zellfreien Nadelelektroden. Aufnahme: Fraunhofer IWM Halle. **E-H:** Nachbearbeitete Darstellung vom Querschnitt der Nadelelektroden. Die ausgegrauten Bereiche oberhalb der Nadelelektrode sind Artefakte der Querschnittspräparation mit fokussiertem Ionenstrahl. Ionenstrahl-Präparation: Fraunhofer IWM Halle. **I:** Lichtmikroskopische Aufnahme vom Teilbereich des MEA. Sensorchip mit Platin-Elektroden (Chiptyp A) und integrierter Elektrodenbeschriftung. Jeweils zwei planare, nierenförmige Elektroden umschließen eine Nadelelektrode zur dielektrophoretischen Zellpositionierung. **J:** Sensorchip im 68-Pin-CLCC mit aufgeklebten Plastiktrog (transparent). **K:** Headstage (Labormuster) mit integrierter Temperierung.

2.2 Elektrische Zellmanipulation

Voraussetzung für die intrazelluläre Untersuchung ist das Öffnen der dünnen Zellmembran. Im konventionellen Patch-Clamp-Aufbau sowie bei den automatisierten Systemen erfolgt das Aufreißen der Membran überwiegend durch pulsartig starkes Ansaugen. Wir wollen stattdessen die Methodik der Elektroporation anwenden und für unser System weiterentwickeln. Unsere spezielle Form der Elektroporation bezeichnen wir als Lokale Mikroinvasive Nadelspitzen-Elektroporation (LOMINE).

Angelegte Spannungspulse erzeugen dabei lokal im Spitzenbereich der Nadelelektrode ein sehr hohes elektrisches Feld, das zur Bildung von Poren in der Zellmembran führt. Darüber hinaus können schwächere elektrische Felder zur intra- und extrazellulären Stimulation verwendet werden. LOMINE ähnelt damit dem vereinzelt bei Patch-Clamp-Ableitungen angewandten sog. Buzzing oder auch Zapping. Eine Beschreibung des LOMINE-Prinzips ist [6] zu entnehmen. Die resultierende Porengröße ist von verschiedenen Parametern abhängig, wie beispielsweise dem generierten Elektroporationspuls (Frequenz, Amplitude etc.) sowie den Zelleigenschaften (Größe, Form etc.).

Für die elektrische Zellmanipulation (LOMINE und Stimulation) können Spannungspulse mit einer minimalen Impulslänge von 5 μ s und einem beliebigen Gleichanteil bis maximal ± 4 V erzeugt werden. Die Auswahl der Elektrode im MEA sowie die Vorgabe der elektrischen Parameter erfolgen über die Benutzersoftware. Das Anwendungsgebiet der LOMINE ist jedoch nicht auf das Einbringen der Nadelelektrode in die Zelle beschränkt, sondern kann bspw. auch zum lokalen Einschleusen von nichtmembrangängigen Makromolekülen (Farbstoffe, Proteine, Wirkstoffe, DNS etc.) in einzelne Zellen des Zellverbandes verwendet werden. Die Eigenschaften einer ausgewählten Zelle im Netzwerk gezielt durch Elektroporation zu beeinflussen und damit ihre genetische, metabolische sowie ihre stoffliche Zusammensetzung zu manipulieren, wird auch in [7] beschrieben. Zur Abschätzung der Feld- und Potentialverteilungen an den Nadelelektroden wurden mit COMSOL Multiphysics® (COMSOL Multiphysics GmbH) Simulationen durchgeführt. In [8] sind Simulationsergebnisse zur LOMINE an Platin-Hohladelektroden (Typ C) vorgestellt.

Für den Erfolg der LOMINE ist es von Vorteil, wenn eine Zelle direkt oberhalb der Nadelelektrode liegt. Um diese Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, wird während der Aussaat der Zellen das Verfahren der dielektrophoretischen Zellpositionierung eingesetzt [6, 9]. Hierfür sind jeweils zwei planare, nierenförmige Elektroden um jede Nadelelektrode angeordnet, siehe **Bild 1 I**.

2.3 Systemaufbau

Zeitlich parallele Signableitungen und elektrische Zellmanipulationen sind in diesem Systemaufbau auf 15 Messkanäle beschränkt. Allerdings können durch 90°-Chipdrehung 60 Elektroden des Sensorchips nacheinander kontaktiert werden. Die Aufzeichnung der aufbereiteten Sensorsignale erfolgt über eine Multifunktions-Datenerfassungskarte (NI USB-6259, National Instruments Corp.) mit jeweils 15 kHz. Aufgrund der vergleichsweise hohen Elektrodenimpedanzen der Nadelelektroden oberhalb von 50 M Ω wurden 14 Messkanäle für Spannungsmessungen als reine Impedanzwandler ausgeführt. Die für diese Vorverstärkung verwendeten Operationsverstärker zeichnen sich vor allem durch geringste Leckströme im mittleren Femtoampere-Bereich (< 250 fA bei 37 °C) aus, um elektrochemische Elektrodenprozesse möglichst gering zu halten. Die Sensorelektronik des 15. Messkanals besteht aus der sensiblen Grundstruktur einer Patch-Clamp-Vorverstärkung für Voltage-Clamp-Untersuchungen und kann zu Vergleichszwecken optional über einen EPC 9 Patch-Clamp-Endverstärker (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH) gesteuert und gemessen werden.

Das Aluminium-Gehäuse in **Bild 1 K** mit integrierter Temperierung umschließt als Faraday-Käfig den Sensorchip einschließlich der Vorverstärkung. Diesen sensiblen Teil des Messsystems bezeichnen wir wie üblich als *Headstage*. Die Temperatur der Headstage kann zwischen Raumtemperatur und +40 °C variiert werden.

Die technischen Herausforderungen bestehen vor allem in der Vermeidung kleinster Streukapazitäten, Rauschgrößen und Leckströmen, die durch konstruktive und schaltungstechnische Maßnahmen (Materialauswahl, aktive Schirmung etc.) auf ein Minimum reduziert werden müssen. Für diese Aufgaben wurden unter Anwendung der Impedanzspektroskopie die elektrischen Eigenschaften der elektronischen Komponenten (Chipträger, Chipsockel, Reed-Relais etc.) sowie der erstellten Platinenlayouts der Headstage charakterisiert und hinsichtlich ihrer Eignung bewertet. Wir verwenden für diese Untersuchungen ein Alpha-ANB Impedance / Gain Phase Messsystem mit einem ZG2 Test Interface (beide NOVOCONTROL Technologies GmbH & Co. KG), das sich für diese Anwendung durch die Kombination eines außerordentlich großen Frequenz- und Impedanzbereiches in Verbindung mit einer hohen

Messgenauigkeit auszeichnet. Dies ermöglicht uns eine elektrische Charakterisierung von sowohl hochisolierenden als auch leitfähigen Komponenten. Der Bereich des ohmschen Isolationswiderstandes wird durch ein 6517B Hochohm-Multimeter (Keithley Instruments Inc.) abgedeckt.

Aufgrund der Doppelfunktion der Nadelelektrode als Sensor und Aktor muss die Elektronik der Zellmanipulation bei Nichtbenutzung hochohmig von der Elektrode getrennt werden. Es sollen damit Elektrodenprozesse sowie eine ungewollte Belastung der Zelle vermieden werden. Wir verwenden daher mechanische Schalter in Form von Subminiatur-Reed-Relais mit typischen Isolationswiderständen von 1 T Ω . Zusätzlich wird die Endstufe der Zellmanipulation unter Verwendung der Tri-State-Funktion deaktiviert. Die hierfür notwendige digitale Prozesssteuerung erfolgt über die bereits erwähnte Multifunktions-Datenerfassungskarte, deren Schnittstelle (68-Pin SCSI) an der Front der Headstage in **Bild 1 K** zu sehen ist. Die Benutzeroberfläche und Systemsteuerung basieren auf einem LabVIEW[®] Programm.

3 Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Zelltypen, wie menschliche Hautfibroblasten, L929 Tumorzellen und primäre Zellen von Mäusen und Ratten (Neurone und Herzmuskelzellen), auf den Sensorchips kultiviert und optional mittels Dielektrophorese positioniert werden können, siehe **Bild 2 A-C** [3, 6, 10].

Die Auswirkungen der LOMINE wurden anfänglich durch Vitalfärbung und Auswertung der Überlebensrate mit dem Farbstoff Trypanblau untersucht [11]. Aus diesen Vorversuchen mit Platin-Nadelelektroden (Typ A) konnten erste Rückschlüsse auf kritische Elektroporationsparameter gezogen werden. Eine „sanftere“ Untersuchungsmethode, die das lokale Einschleusen von nichtmembrangängigen Makromolekülen zeigen kann, besteht in der Fluoreszenzfärbung der Zellen [10]. Hierfür gestattet das Messsystem die Möglichkeit der mikroskopischen Beobachtung (Wasserimmersionsobjektiv) während der Versuche. Anhand der Fluoreszenzintensität kann die Auswirkung der LOMINE in Hinblick auf die Größe und Zeitdauer der Membranöffnung abgeschätzt werden. Allerdings ist eine zusätzliche Interpretation der aufgezeichneten Potentiale nicht möglich, da vor allem die Chiptypen A-C mit Silizium-Substrat starke photoelektrische Effekte durch die Beleuchtung des Mikroskops zeigen und damit die Auswertung verfälschen würden. Zum qualitativen Nachweis der Zellpenetration wird die Rasterelektronenmikroskopie (REM) zusammen mit einer fokussierten Ionenstrahlpräparation (FIB) kombiniert [12, 13]. Die resultierenden Querschnittsdarstellungen sollen den Erfolg der lokalen Elektroporation an der Schnittstelle von Nadelelektrode und Zelle dokumentieren, siehe **Bild 2 D** und **Bild 3 A&B**. Dazu werden die Zellen sofort nach den Versuchen fixiert, dehydriert und mit einer dünnen leitenden Platinschicht überzogen. FIB-REM Untersuchungen werden auch zur Überprüfung des Lagenaufbaus der Elektroden verwendet, siehe **Bild 1 E-H**. Auf diese Weise konnten auch Prozessierungsfehler, wie die nicht geöffnete Platin-Hohl-Nadelelektrode in **Bild 3 A**, festgestellt werden.

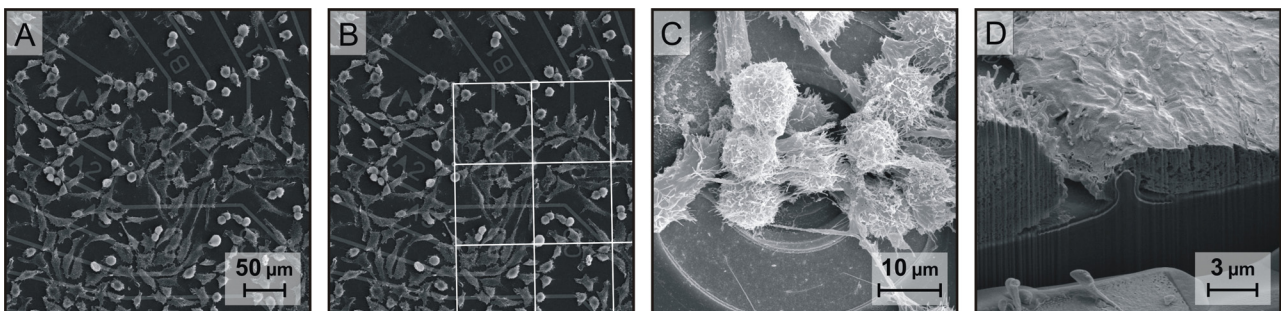


Bild 2 Bewachsene Nadelelektroden auf Sensorchip

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von bewachsenen Nadelelektroden. Zelltyp: L929 Tumorzellen. Aufnahmen und FIB-REM: Fraunhofer IWM Halle. **A&B:** Ausschnitt vom MEA. Chiptyp C. **B:** Positionsraaster zum Auffinden der Nadelelektroden. **C:** Draufsicht von vernetzten Zellen auf Nadelelektrode (Nadelelektrode ist verdeckt in Bildmitte). Zwei planare, nierenförmige Elektroden (nur teilweise bedeckt) umschließen die Nadelelektrode für die dielektrophoretische Zellpositionierung. Chiptyp A **D:** Elektroporierte Zelle mit Nadelelektrode im Zytoplasma. Chiptyp A.

Die Chiptypen A&C mit den chemisch inerten Platinelektroden wurden vorrangig für Versuche zur elektrischen Zellmanipulation verwendet. Bei diesen Tests konnte die Ableitung intrazellulärer Potentiale an mehreren L929 Tumorzellen beobachtet werden [6, 9]. In **Bild 3 C** ist ein Beispiel für eine mögliche intrazelluläre Potentialableitung nach LOMINE dargestellt, die den erwarteten negativen Sprung des Elektrodenpotentials (Elektrode 1) zeigte. Die Zugabe des Tensids Triton[®] X-100, das ein Ablösen der Zellen bewirkt, führte nach erneuter LOMINE zu einer positiven Aufladung des Elektrodenpotentials. Dieses Verhalten ist uns aus zellfreien Untersuchungen bekannt. Allerdings ist das veränderte Verhalten des Elektrodenpotentials nach Zugabe von Triton[®] X-100 kein endgültiger Beweis für eine erfolgreiche intrazelluläre Ableitung.

Extrazelluläre Untersuchungen an elektrisch aktiven Zellen wurden an primären Herzmuskelzellen von Mausembryonen sowie postnatalen Ratten [3] durchgeführt. Es konnten mit den Chiptypen B-D extrazelluläre Signale detektiert werden. Dabei zeigten sich mit den Silberelektroden (Typ B&D) Signalamplituden bis zu 30 mV, siehe **Bild 3 D**. Außerdem konnte die elektrische Kopplung der Herzmuskelzellen untereinander gezeigt werden, indem an mehreren Elektroden im MEA die gleiche Kontraktionsfrequenz detektiert wurde. Bei den Versuchen mit Platin-Hohlnadeln (Typ C) stellten wir fest, dass sie sich aufgrund des zu geringen Signal-Rausch-Abstandes nicht für extrazelluläre Signalableitungen eignen.

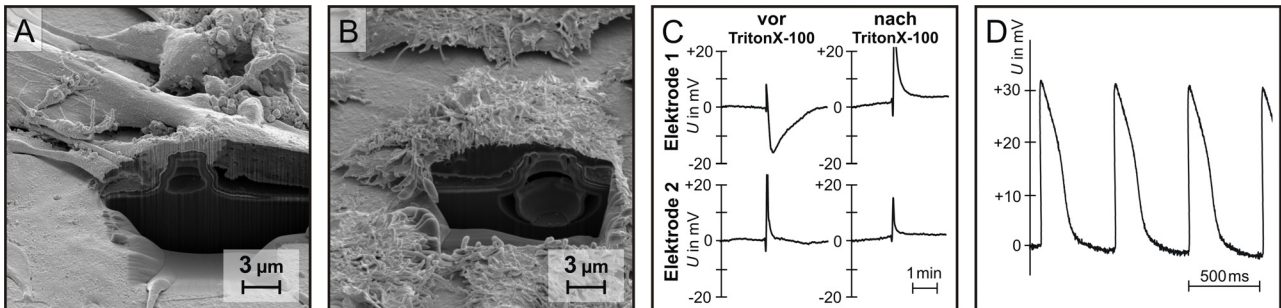


Bild 3 Beispiele für FIB-REM und detektierte Potentiale

A: Murine Herzmuskelzelle auf nicht geöffneten Hohlnadelelektrode. **B:** L929 Tumorzelle auf Hohlnadelelektrode. **A&B:** Elektroporierte Zelle mit Nadelelektrode im Zytoplasma. Chiptyp C. FIB-REM: Fraunhofer IWM Halle. **C:** Gegenüberstellung des Potentialverlaufs zweier Elektroden eines Sensorchips jeweils nach LOMINE. Mögliche intrazelluläre Potentialmessung an Elektrode 1 (ca. -20 mV). Elektrode 2 verhält sich vor und nach der Zugabe von Triton[®] X-100 wie eine zellfreie Nadelelektrode. Die Zugabe von Triton[®] X-100 führt zum Ablösen der Zellen. Chiptyp C. **D:** Extrazelluläre Ableitung an Herzmuskelzelle (Ratte). Kontraktionsfrequenz ca. 2 Hz. Chiptyp D.

4 Ausblick

Für die Durchführung von Patch-Clamp-Ableitungen wurde die aktuelle Entwicklungsstufe des PoreGenic[®]-Messsystems mit 16 Hohlnadelstrukturen konzipiert, die jeweils einen fluidischen Zu- und Ablauf besitzen. Für die Signalableitung ist ein 16 Kanal Patch-Clamp-Verstärker vorgesehen. Der Bereich der Spitze ist für die LOMINE auch weiterhin metallisiert und nach außen elektrisch kontaktiert. Erste Experimente zum Befüllen der Fluidikkanäle und zur Bestimmung der Kanal- und Pipettenwiderstände waren erfolgreich.

Danksagungen

Die Autoren danken J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, A. Trautmann, und O. Paul, Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK), Universität Freiburg, für die Fertigung der Sensorchips. Des Weiteren danken wir A. Heilmann, A. Friedmann und A. Cismak, Fraunhofer IWM Halle, für die Probenaufbereitung und die FIB-REM-Bilder. Unser spezieller Dank gilt Oliver Klink für die konzeptionellen Diskussionen und seine Bereitschaft uns in die Kunst der manuellen Patch-Clamp-Technik einzuführen, Uwe Scheffler für das Einbringen seiner Erfahrungen im Bereich Projektmanagement sowie seine konstruktiven Kritiken, Thomas Kröger für seine Mitarbeit an allen technischen Fragestellungen und Jessica Schröder für ihre zuverlässige Arbeit im Bereich der Zellkultur. Die vorgestellten Arbeiten und Forschungsergebnisse wurden vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert.

Literatur

- [1] J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, M. Hagner, A. Cismak, A. Heilmann, O. Paul: Design of experiment characterization of microneedle fabrication processes based on dry silicon etching. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. Bd. 20 (2): S. 1-11. 2010.
- [2] J. Held, J. Gaspar, P. J. Koester, C. Tautorat, A. Cismak, A. Heilmann, W. Baumann, A. Trautmann, P. Ruther, O. Paul: Microneedle Arrays for Intracellular Recording Applications. *IEEE MEMS Conference*, Tucson, USA. S. 268-271. 2008.
- [3] P. J. Koester, C. Tautorat, J. Held, P. Ruther, J. Gaspar, O. Paul, H. Beikirch, J. Gimsa, W. Baumann: GO-Bio 3: PoreGenic® - 2. Cardiomyocyte Action Potential Recordings with a 3D-MEA chip. 7th MEA Meeting. *BIOPRO Baden-Württemberg GmbH*. S. 293-294. 2010.
- [4] J. Held, J. Gaspar, P. J. Koester, C. Tautorat, M. Hagner, A. Cismak, A. Heilmann, W. Baumann, P. Ruther, O. Paul: Hollow Microneedle Electrode Arrays for Intracellular Recording Applications. *MEMS 2009. IEEE 22nd International Conference*. S. 220-223. 2009.
- [5] J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, M. Hagner, A. Cismak, A. Heilmann, O. Paul: Solid Silver Microneedle Electrode Arrays for Intracellular Recording Applications. 7th MEA Meeting. *BIOPRO Baden-Württemberg GmbH*. S. 247-248. 2010.
- [6] P. J. Koester, C. Tautorat, J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, O. Paul, H. Beikirch, J. Gimsa, W. Baumann: Ganzzell-Ableitungen mit dem PoreGenic® 3D-MEA-Chip. *Biomedizinische Technik* 55: S. 6-9. 2010.
- [7] J. Olofsson, K. Nolkranz, F. Ryttsén, B. A. Lambie, S. G. Weber, O. Orwar: Single-cell electroporation. *Current Opinion in Biotechnology* 14. S. 29-34. 2003.
- [8] K. K. Sriperumbudur, P. J. Koester, M. Stubbe, C. Tautorat, J. Held, W. Baumann, J. Gimsa: Local Electroporation of Single Adherent Cells by Micro-Structured Needle Electrodes. *COMSOL Conference 2009*. 2009.
- [9] P. J. Koester, C. Tautorat, H. Beikirch, J. Gimsa, W. Baumann: Recording electric potentials from single adherent cells with 3D microelectrode arrays after local electroporation. *Elsevier B.V. Biosensors and Bioelectronics* 26: S. 1731-1735. 2010.
- [10] C. Tautorat, P. J. Koester, J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, O. Paul, A. Cismak, A. Heilmann, J. Gimsa, H. Beikirch, L. Jonas, W. Baumann: Intracellular potential measurements of adherently growing cells using micro-needle arrays. *μTAS 2008 Conference. Chemical and Biological Microsystems Society*. S. 1777-1780. 2008.
- [11] P. J. Koester, C. Tautorat, A. Podssun, J. Gimsa, W. Baumann: Analytikchip zur Erfassung intrazellulärer Potentiale adhären wachsender Zellen nach lokaler Elektroporation: Einleitung - Biologische Aspekte. *VDE Verlag GmbH, Berlin, Offenbach*. S. 433-436. 2007.
- [12] A. Friedmann, A. Hoess, A. Cismak, A. Heilmann: Investigation of cell-substrate interactions by focused ion beam preparation and scanning electron microscopy. *Elsevier Ltd.. Acta Biomaterialia* Bd. 7 (6): S. 2499-2507. 2011.
- [13] A. Friedmann, A. Cismak, C. Tautorat, P. J. Koester, W. Baumann, J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, O. Paul, A. Heilmann: FIB preparation and SEM investigations for three-dimensional analysis of cell cultures on microneedle arrays. *Scanning. Wiley-Blackwell*. Zur Veröffentlichung angenommen.