

PoreGenic[®] - Patch-on-Chip-System für die präklinische Forschung an Ionenkanälen - Teil II

Carsten Taurat¹, Uwe Scheffler¹, Denise Franz¹, Thomas Kröger¹, Philipp Julian Köster¹, Werner Baumann¹, Helmut Beikirch² und Oliver Klink¹

¹ Lehrstuhl für Biophysik, Universität Rostock, Rostock

² Lehrstuhl Elektronische Bauelemente und Schaltungstechnik, Universität Rostock, Rostock
Kontakt: carsten.taurat@uni-rostock.de

Kurzfassung

Beim aktuellen Entwicklungsstand unseres PoreGenic[®] Patch-on-Chip-Systems wurden für Signalableitungen von adhärennten Zellen die pipettenähnlichen Patch-Sites auf 10 µm verlängert und eine Zellpositionierung etabliert. Nach unserem Kenntnisstand ist es uns damit weltweit erstmalig gelungen, adhärennte Säugetierzellen mit einem automatisierbaren Patch-on-Chip-System zu untersuchen. Systemaufbau und Chipherstellung sind die Kernthemen dieses Beitrags. Als Anwendungsbeispiele werden Patch-Clamp-Untersuchungen an menschlichen embryonalen Nierenzellen HEK 293 Na_v 1.7 sowie primären hippokampalen Neuronen von Mäusen vorgestellt.

Key words: Patch-Clamp, Patch-on-Chip, Elektrophysiologie, Lab-on-a-Chip

Einleitung

Zeit- und Kostendruck drängen forschende Pharmaunternehmen zur Automatisierung ihres Wirkstoffscreenings. Ihre Forderung nach stetiger Effizienzsteigerung macht sie zu branchenübergreifenden Innovationstreibern, um die Entwicklung von Medikamenten durch neue Technologien zu beschleunigen.

Ionenkanäle in den Zellmembranen steuern grundlegende Lebensprozesse und sind Wirkorte vieler Medikamente. Um einen erfolgversprechenden Wirkstoffkandidaten aus tausenden Molekülen möglichst schnell zu ermitteln, werden in der präklinischen Forschung teil- bis vollautomatisierte Patch-on-Chip-Systeme verwendet. Diese zellbasierten Sensorsysteme dienen der direkten Charakterisierung der Ionenkanalaktivität. Die zu detektierenden Signale liegen zwischen 1 pA bis 100 nA und stellen damit hohe Anforderungen an die Messtechnik und den gesamten Systemaufbau.

Für adhärennt wachsende Zellen wird seit fast einem halben Jahrhundert das klassische Patch-Clamp mit sehr geringem Durchsatz, aber hohem Informationsgehalt, verwendet [1]. Die Automatisierung des klassischen Verfahrens führte zu den Patch-on-Chip-Systemen, die jedoch auf freischwebende Einzelzellen in Suspension beschränkt sind [2]. Um diese technologische Lücke zu schließen, wollen wir mit unserem Patch-on-Chip-Ansatz eine automatisierbare Methode für adhärennte Zellen bzw. Zellnetzwerke schaffen.

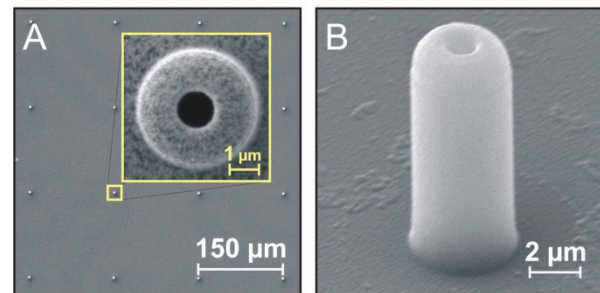


Abbildung 1. Pipettenähnliche Patch-Site.

A: REM-Aufnahme der Oberfläche eines Chips mit 16 Patch-Sites (weiße Punkte). Site-Raster: 150 µm. Die Detailsicht (gelb umrahmt) zeigt die vergrößerte Aufsicht einer Patch-Site mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. 1,3 µm. **B:** Seitliche REM-Aufnahme der Patch-Site aus **A** mit einer Höhe von ca. 10 µm. **A&B:** Originalaufnahmen: Frau A. Busch (MSF, LS Werkstoffe f. d. Medizintechnik, Universität Rostock).

Erfolgreiche Vorversuche an suspendierten Einzelzellen wurden mit unserem Patch-on-Chip-System bereits vorgestellt [3]. Für adhärennte Zellen wurde jedoch die ursprüngliche Methodik, die Zellen direkt auf der Chipoberfläche zu kultivieren, verworfen. Unsere Versuche zeigten, dass nach der Kultivierung (einige Minuten bis mehrere Wochen) die resultierende elektrische Abdichtung (Seal-Widerstand) des Pipetteninneren zum extrazellulären Raum häufig nicht den hohen Anforderungen für Patch-Clamp-Ableitungen entsprach. Für adhärennte Zellen wurde daher von uns eine neue Methodik entwickelt, die in einer Trennung von Zellkultur und Patch-Chip besteht. Auf diese Weise können der Verbrauch an Patch-Chips minimiert

und vorzeitige Verunreinigungen der pipetten-ähnlichen *Patch-Sites* (**Abb. 1**) vermieden werden.

Material und Methoden

Systemaufbau

Das Labormuster des *PoreGenic*[®] *Patch-on-Chip*-Systems besteht aus mehreren Komponenten: dem *Patch-Chip*, einem Zellträger mit den kultivierten biologischen Zellen, dem Setup, einem Mehrkanal-*Patch-Clamp*-Verstärker, einer Druckregelung, einem Mikromanipulator und weiterer Peripherie.

Der fluidische Anschluss des *Patch-Chips* an die Messelektronik und Druckregelung erfolgt im Setup [3]. Die Zellen werden auf einem Zellträger (**Abb. 4A**) kultiviert. Der Zellträger wird in eine Halterung am Mikromanipulator (**Abb. 4B**) eingesetzt und vor Versuchsbeginn an die *Patch-Sites* herangefahren und positioniert (**Abb. 2**). Für die optische Kontrolle der manuellen Positionierung wurde das Setup für Durchlichtmikroskopie konzipiert.

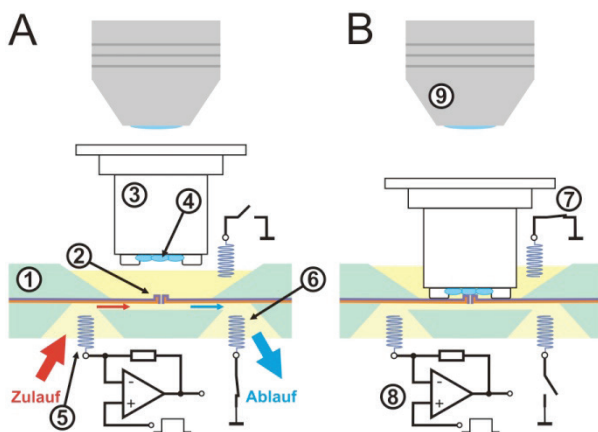


Abbildung 2. Zellpositionierung und Signalableitung.

Vereinfachte schematische Querschnittsdarstellung der *Patch-Clamp*-Ableitung am *Patch-Chip* (1) für eine *Patch-Site* (2). Der Zellträger (3) wird von einem Mikromanipulator (nicht dargestellt) gehalten. Die Messelektrode (5) taucht in den fluidischen Zulaufkanal ein und ist mit dem *Patch-Clamp*-Verstärker (8) verbunden. Schaltbare Gegenelektroden sind je nach Konfiguration die Badelektrode (7) auf der Oberseite und die Hilfelektrode (6) im Ablaufkanal. **A:** Positionierung der adhären Zellen (4) über der *Patch-Site* unter optischer Kontrolle (9). Ein leichter Überdruck in der *Patch-Site* verhindert Verunreinigungen an der Öffnung. Der Kanalwiderstand wird über die Mess- und Hilfelektrode bestimmt. **B:** Signalableitung von einer Zelle. Der Zellträger besitzt vier 20 μm hohe Füße aus PDMS. Über Mess- und Badelektrode wird vor dem Aufsetzen der Zelle der Pipettenwiderstand bestimmt. Nach dem Aufsetzen gibt diese Messkonfiguration Aufschluss über den *Seal*-Widerstand und dient der Signalableitung.

Patch-Chip

Der prozessierte Chip mit seinem 4×4 *Multi Patch-Site Array* (MPSA) ist auf einen Fluidik-Chipträger aus transparentem Kunststoff (PMMA) geklebt (**Abb. 3A**). Der Chipträger dient dem Übergang von der Mikro- auf die Makrofluidik und kontaktiert

acht *Patch-Sites* mit je einem fluidischen Zu- und Ablaufkanal nach außen. Die Höhe der *Patch-Sites* beträgt ca. 10 μm mit einem Öffnungsdurchmesser an der Spitze von $1,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$, siehe **Abb. 1**. Die für die Zellpositionierung notwendige Verlängerung um ca. 5 μm bewirkt eine nachteilige Erhöhung des Pipettenwiderstandes um 1,6 $\text{M}\Omega$.

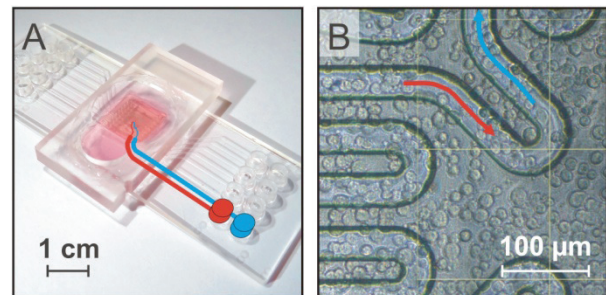


Abbildung 3. *Patch-Chip*.

Überlagerte schematische Darstellung für den mikrofluidischen Zu- (rot) und Ablauf (blau). **A:** *Patch-Chip* mit acht fluidisch kontaktierten *Patch-Sites*. Der Chipträger besitzt 16 Näpchen, in die jeweils eine von 16 Mess- oder Hilfelektroden (nicht dargestellt) eintaucht. Ein Trog aus PMMA bildet zusammen mit der Chipoberfläche die Messkammer. **B:** Chipoberfläche nach dem Aufsetzen des Zellträgers (Zelltyp: HEK 293 Na_v 1.7). Ausschnitt mit sechs *Patch-Sites* (gelbes Hilfsgitter: 150 μm).

Zellträger und -positionierung

Abb. 2 beschreibt das Heranfahren der Zellen an die *Patch-Sites*. Die Positionierung erfolgt derzeit manuell unter mikroskopischer Beobachtung. Für die Kultivierung und Handhabung der Zellen wurde ein zylinderförmiger Zellträger ($\text{Ø} = 1,2 \text{ mm}$) aus bio-kompatiblen Polydimethylsiloxan (PDMS) entwickelt, siehe **Abb. 4A**.

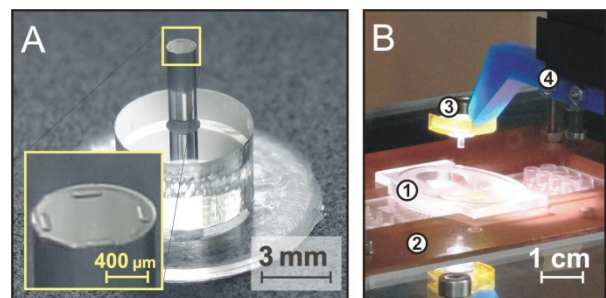


Abbildung 4. Zellträger und Positionierung.

A: Lichtbild des Zellträgers. Die Spitze des oberen Kreiszyinders ($\text{Ø} = 1,2 \text{ mm}$) bildet die Zelloberfläche. Die beiden unteren Kreiszyinder dienen als Standfuß in der Zellkultur und als Aufhängevorrichtung für die Zellpositionierung. Die optischen Materialeigenschaften von PDMS erlauben Durchlichtmikroskopie durch den gesamten Zellträger. Die Detailansicht (gelb umrahmt) zeigt die vergrößerte Aufsicht der Zelloberfläche mit den vier Positionierhilfen (Füße). **B:** Ausschnitt vom Systemaufbau. Geöffnetes Setup (2) mit eingelegtem *Patch-Chip* (1). Ein Arm (blau) mit kreisrunder Auflagefläche (gelb) hält den Zellträger (3) kopfüber. Mikromanipulator (4) und Arm sind mechanisch stabil miteinander verbunden.

Um den technischen Aufwand der Zellpositionierung so gering wie möglich zu halten, wurden für ein quasi planparalleles Aufsetzen vier Positionier-

hilfen auf dem Zellträger vorgesehen, siehe **Abb. 4A**. Diese 20 µm hohen Füße aus PDMS sitzen im Außenbereich der Zellkulturfläche und verhindern ein Zerquetschen der Zellen. Der Zellträger wird in einer CNC-gefrästen Gießform aus PMMA hausintern produziert. Für die Gestaltung der Positionierhilfen wird ein mikrostrukturierter Siliziumchip als Negativform in die mehrteilige Gießform gelegt.

Als Mikromanipulator wird ein rauscharmer Patchstar (Scientifica Ltd., East Sussex, GB) verwendet.

Messelektronik

Die verwendete *Patch-Clamp*-Messkonfiguration ist das sog. *Voltage-Clamp*, bei dem die Stromantwort auf Spannungspulse direkten Aufschluss über die Eigenschaften spannungssensitiver Ionenkanäle gibt. Aufgrund der Umladung von Streukapazitäten (*Patch-Site*, Zelle etc.) wird der Aussteuerbereich des *Patch-Clamp*-Verstärkers beschränkt. Eine Kompensation dieses Umladestroms kann je nach Verstärker nur für kleine Kapazitäten im unteren pF-Bereich erfolgen. Zur Minimierung der Streukapazitäten wurde das Setup für die aktive Schirmung jedes einzelnen Messkanals überarbeitet. Des Weiteren wurde der 16-Kanal *Patch-Clamp*-Verstärker Triton+ (Tecella LCC, Foothill R., Kalifornien, USA) schaltungstechnisch um eine aktive Schirmung für jeden Messkanal erweitert. Der zu Vergleichszwecken verwendete 3-Kanal *Patch-Clamp*-Verstärker EPC 10 USB Triple (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz) ist herstellerseitig mit einer aktiven Schirmung für jeden Messkanal ausgestattet.

Chipfertigung

Für geringe Streukapazitäten basiert der *Patch-Chip* auf einem Borosilikatglas, das gute dielektrische Eigenschaften besitzt. Darüber hinaus zeigt Borosilikatglas nur geringe Affinität zu Testsubstanzen und weist eine lange Lagerbeständigkeit auf. Um glasähnliche Eigenschaften für die *Patch-Sites* zu erhalten, werden sie aus einer Siliziumnitridschicht (700 nm) prozessiert, die anschließend mit einer dünnen Siliziumoxidschicht (600 nm) überzogen wird. Die im Glas-Wafer für die *Patch-Site* als Zu- und Ablauf geätzten Kanäle (Breite: 45 bzw. 60 µm) werden nach dem Rückätzen des Siliziumwafers von dieser dünnen Nitrid-Oxid-Membran überspannt.

Die Prozessentwicklung, Herstellung und Endkontrolle der *Patch-Chips* erfolgt durch die iX-factory GmbH (Dortmund). Die Herstellung und das Verkleben des Chipträgers mit dem *Patch-Chips* wird von der microfluidic ChipShop GmbH (Jena) vorgenommen.

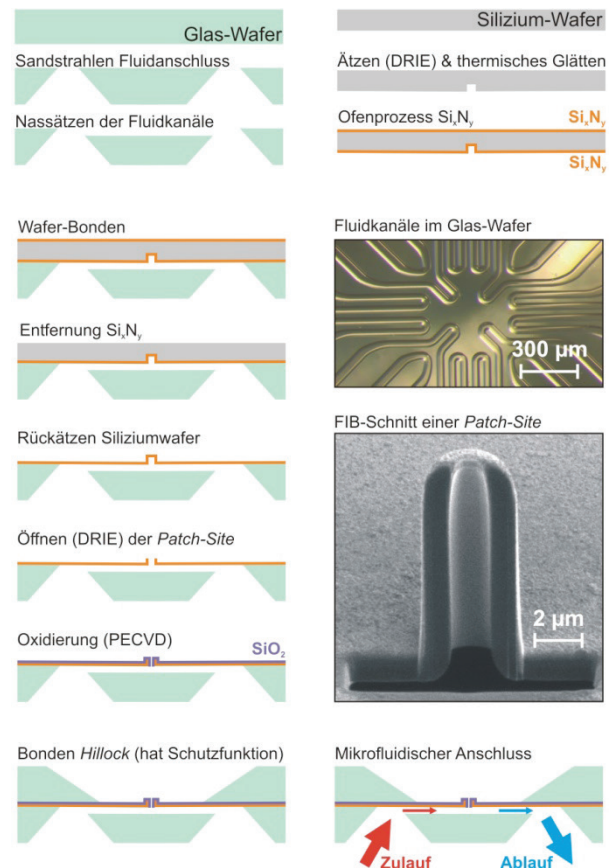


Abbildung 5. Chipfertigung.

Schematische Querschnittsdarstellung der Chipfertigung. Maskenprozesse sind nicht dargestellt. Ausgangspunkt: Glas-Wafer (500 µm) und Silizium-Wafer (300 µm). **Links:** Sandstrahlen der Fluidanschlüsse und Nassätzen der mikrofluidischen Kanäle im Chip. Zusammenführen der beiden vorprozessierten Wafer durch Wafer-Bonden. Entfernung der oberen Si_3N_4 -Schicht und Rückätzen des Silizium-Wafers. Öffnen der *Patch-Site* mittels DRIE. Auftragung Oxid-Schicht (600 nm) durch PECVD. Aufbringen eines *Hillocks* zum Schutz der *Patch-Sites*. **Rechts:** Ätzen und thermisches Glätten für die Formgebung der *Patch-Site*. Ausbildung Si_3N_4 -Schicht (700 nm) durch einen Ofenprozess. Lichtbild der Fluidkanäle im Glas-Wafer. FIB-Schnitt und REM einer *Patch-Site*. Mikrofluidischer Anschluss (Zu- und Ablauf) einer *Patch-Site*.

Druckregelung

Eine druckgeregelte pneumatische 8-Kanalpumpe (Eigenentwicklung) dient der softwaregesteuerten Regelung der Mikrofluidik. Je nach Anwendung können acht voneinander unabhängige Druckpumpkanäle statische Drücke oder Druckpulse erzeugen. Der maximale Druckbereich der Pumpe liegt zw. -300 mBar und +650 mBar.

Mit der Pumpe werden die Fluidikkanäle jeweils über den Zulauf befüllt. Der Befüllvorgang ist jeweils abgeschlossen, sofern der Kanalwiderstand zwischen der Messelektrode im Zulauf und der Hilfselektrode im Ablauf einen typischen Wert von ca. 7 MΩ annimmt (**Abb. 2A**). Für die Signalableitung wird anschließend das Einsaugen der Zellmembran, die Ausbildung des *Seal*-Widerstandes

und für Ganzzelleableitungen das lokale Öffnen der Zellmembran mit der Pumpe geregelt (**Abb. 2B**).

Zellkultur

Die HEK 293 Na_v 1.7 Zelllinie (Anaxon AG, Schweiz) wurde in DMEM/F12 (GIBCO) Medium ergänzt mit 9 % FBS (Biochrom), 0,9 % Penicillin/Streptomycin (GIBCO), 1 mM Natrium Pyruvate (GIBCO), 100 µg/ml Hygromycin (GIBCO) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die neuronale Primärkultur wurde nach Goetze *et al.* [4] hergestellt und kultiviert.

Messpuffer

Für die *Patch-Clamp*-Messungen der Zelllinie HEK 293 Na_v 1.7 wurde folgender extrazellulärer Puffer verwendet (in mM): NaCl 140, KCl 3, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, Glucose 10, HEPES 10, pH 7.4 (NaOH). Der intrazelluläre Puffer bestand aus (in mM): CsF 140, NaCl 10, EGTA 1, HEPES 10, pH 7.3 (CsOH).

Für die Messungen an primären Neuronen war der extrazelluläre Puffer zusammengesetzt aus (in mM): NaCl 137, KCl 3, CaCl₂ 3, MgCl₂ 0,1, Glycin 0,001, Glucose 10, HEPES 5, pH 7.25 (NaOH) und der intrazelluläre Puffer bestand aus (in mM): CsCl 145, MgCl₂ 1, EGTA 5, HEPES 10, K₂ATP 2, pH 7.3 (CsOH).

Ergebnisse

Die Erprobung des vorgestellten *Patch-on-Chip*-Systems erfolgte mit Einzelzellen in Suspension [3] sowie mit adhärennten Zellen auf dem Zellträger. Für den Kanalwiderstand ergab sich ein Mittelwert von $6,8 \pm 0,7 \text{ M}\Omega$ (57 *Patch-Sites* von 10 *Patch-Chips*), der nahe am berechneten Wert von $7,4 \text{ M}\Omega$ liegt. Der Pipettenwiderstand zeigte einen Wert von $5,7 \pm 1,3 \text{ M}\Omega$ (129 *Patch-Sites* von 25 *Patch-Chips*) und liegt ebenfalls nahe dem berechneten Wert von $6,8 \text{ M}\Omega$.

Erfolgreiche Ganzzelleableitungen mit *Seal*-Widerständen größer $1 \text{ G}\Omega$ (*Giga-Seal*) wurden an adhärennten menschlichen embryonalen Nierenzellen HEK 293 Na_v 1.7 und an primären Neuronen von Mäusen mit dem 3-Kanal *Patch-Clamp*-Verstärker EPC 10 USB Triple gezeigt (**Abb. 6-9**).

Zum Nachweis, dass mehrere adhärennte Zellen gleichzeitig gemessen werden können, wurden zwei Zellen im optimalen Abstand ausgewählt und nach der Etablierung des *Giga-Seals* durch Anlegen eines Unterdruckpulses in die Ganzzelleableitung überführt. Zur Induzierung der Natriumströme wurde die Haltespannung von -100 mV auf -25 mV erhöht. Die normalisierten Stromantworten der Zellen in **Abb. 6** zeigen die typische Kinetik des spannungssensitiven Natriumkanals 1.7.

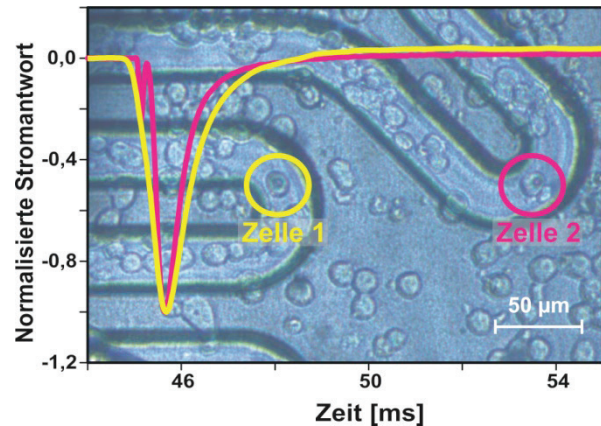


Abbildung 6. Stromantwort zweier HEK 293 Na_v 1.7.

Überlagerte Darstellung der zeitlich parallelen Ganzzelleableitung der Natriumströme zweier HEK 293 Na_v 1.7 Zellen unterlegt mit dem mikroskopischen Lichtbild der beiden Zellen. Das Öffnen der Ionenkanäle wurde zum Zeitpunkt $t = 45 \text{ ms}$ mit einer Haltespannung von -25 mV induziert.

Für die Messung der Spannungsabhängigkeit des Natriumkanals 1.7 wurden Haltespannungen von -70 mV bis $+40 \text{ mV}$ in Inkrementen von 5 mV angelegt und die resultierende Stromamplitude gemessen. Die mit unserem *Patch-Chip* ermittelte Strom-Spannungs-Kennlinie zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die mit dem klassischen *Patch-Clamp* gemessene Kennlinie (**Abb. 7**).

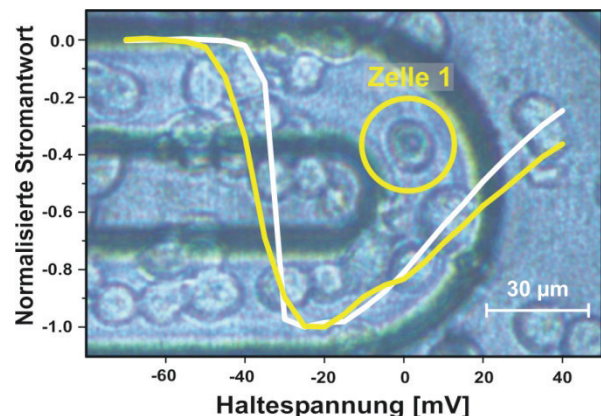


Abbildung 7. Strom-Spannungs-Kennlinie einer HEK 293 Na_v 1.7 mit Referenzmessung

Überlagerte Darstellung der Strom-Spannungs-Kennlinie (gelbe Kurve) des spannungssensitiven Natriumkanals 1.7 exprimiert in einer HEK 293 Zelle (Zelle 1 aus **Abb. 6**) unterlegt mit ihrem mikroskopischen Lichtbild. Als Referenz dient die Kennlinie (weißer Kurvenverlauf) einer HEK 293 Na_v 1.7 gemessen im klassischen *Patch-Clamp*-Aufbau.

Auch die Messung von spannungssensitiven Natriumkanälen von adhärennt wachsenden Neuronen zeigte den zu erwartenden Verlauf der Stromantwort (**Abb. 8**). Darüber hinaus war die Detektion von synaptischen Strömen mit Amplituden oberhalb 20 pA möglich (**Abb. 9**), bei denen es sich wahrscheinlich um exzitatorische postsynaptische Ströme (EPSCs) handelt.

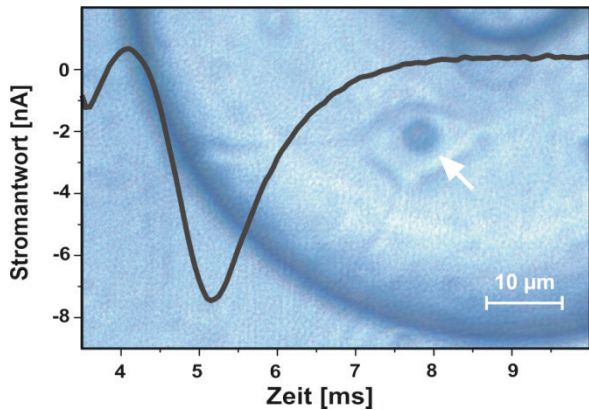


Abbildung 8. Stromantwort eines Neurons.

Messung des spannungssensitiven Natriumstroms eines adhärenen Neurons (weißer Pfeil). Das Öffnen der Ionenkanäle wurde mit einer Haltespannung von -10 mV induziert.

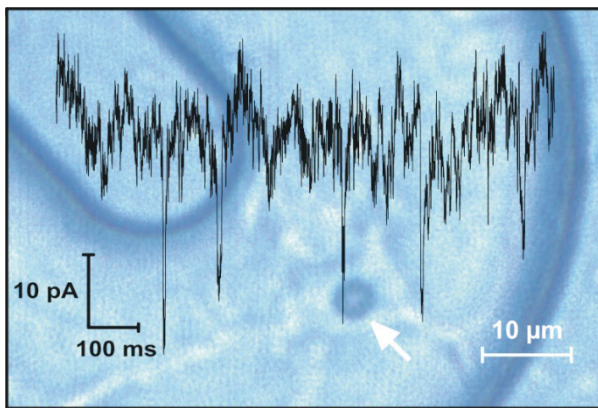


Abbildung 9. Synaptische Ströme eines Neurons.

Messung von synaptischen Strömen (EPSCs) eines adhärenen Neurons (weißer Pfeil) in der Ganzzelleableitung mit einer Haltespannung von -60 mV.

Diskussion

Die Trennung von Zellkultur und *Patch-Chip* war notwendig um saubere *Patch-Sites* zu gewährleisten. Die von uns entwickelte Methode, die Zellen auf einem Zellträger aufwachsen zu lassen und sie dann zu positionieren, ermöglichte uns adhärenente Zellen erfolgreich zu untersuchen. Unser *Patch-on-Chip*-System ist skalier- und automatisierbar.

Es wurden zeitlich parallele *Giga-Seal* Ganzzelleableitungen an mehreren adhärenen HEK 293 $\text{Na}_v 1.7$ durchgeführt. Das elektro-physiologische Verhalten der HEK 293 $\text{Na}_v 1.7$ Zellen ist durch den überexprimierten spannungssensitiven Natriumkanal standardisiert und gut charakterisiert. Die Versuchsergebnisse konnten so mit dem klassischen *Patch-Clamp* verglichen werden (**Abb. 7B**).

Ganzzelleableitungen an adhärenen primären hippocampalen Neuronen von Mäusen wurden ebenfalls mit *Giga-Seal* gemessen, allerdings mit einer geringeren *Giga-Seal*-Wahrscheinlichkeit.

Eine parallele Signalableitung von mehreren Neuronen war daher noch nicht möglich.

Im Vergleich zum klassischen *Patch-Clamp* ist die Signalqualität der Messungen ähnlich (**Abb. 7**). Unser *Patch-on-Chip*-System zeigt ein erhöhtes Rauschen, einen höheren Pipettenwiderstand und eine höhere Streukapazität, die zu einer schlechteren Kapazitätskompensation führt. Die Stromantwort von Zelle 2 in **Abb. 6** zeigt bspw. bei 45 ms ein Überschwingen, das auf eine unzureichende Kapazitätskompensation seitens des Verstärkers zurückzuführen ist.

Abb. 9 zeigt, dass das Signal-Rausch-Verhältnis des Messsystems ausreicht, um synaptische Ströme mit Amplituden ab 20 pA detektieren zu können. Für die Signalableitung von Einzelkanälen mit Amplituden kleiner 10 pA muss das Rauschen noch weiter minimiert werden.

Ausblick

Für die automatisierte Zellpositionierung soll ein bildgebendes Verfahren zur Erkennung der Lage von Zellen und *Patch-Sites* dienen. Daraus wird die optimale Position des Zellträgers berechnet und angefahren. Für die Feinpositionierung der Höhe wird der Pipettenwiderstand einbezogen, der auch die Druckregelung an der *Patch-Site* steuert.

In den durchgeführten Versuchen war die Lage der Zellen auf dem Zellträger zufällig. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass mehrere Zellen gleichzeitig in dem *Site*-Raster untersucht werden können, soll ein gerichtetes Zellwachstum bspw. durch Oberflächenstrukturierung [5] oder Beschichtung [6] etabliert werden.

Für erfolgreiche *Patch-Clamp*-Ableitungen ist ein Pipettenwiderstand kleiner $5 \text{ M}\Omega$ vorteilhaft. Um den Anteil der Mikrofluidik am Pipettenwiderstand jeder *Patch-Site* zu minimieren, wird in **Abb. 2B** die Hilfselektrode im Ablaufkanal standardmäßig mit der Messelektrode im Zulauf verdrahtet. Die resultierende Parallelschaltung des fluidischen Zu- und Ablaufkanals führt zu einer Minimierung des Pipettenwiderstandes um 27 %. Für die Messung des Kanalwiderstands nach **Abb. 2A** kann die Verdrahtung mit Hilfe von *Reed-Relais* unterbrochen werden.

Die Anzahl der notwendigen *Patch-Sites* pro Chip ist abhängig von der Fragestellung des Experiments. Für viele Anwendungen ist ein kleineres MPSA oder sogar nur eine *Patch-Site* hinreichend. Als Parallelentwicklung wurden *Patch-Chips* mit einer bzw. vier *Patch-Sites* in Silizium produziert. Durch den vereinfachten Aufbau und die standardisierten Fertigungsprozesse wurden die Kosten pro Datenpunkt minimiert. In **Abb. 10** sind zwei Beispiele für *Patch-Sites* aus Silizium dargestellt.

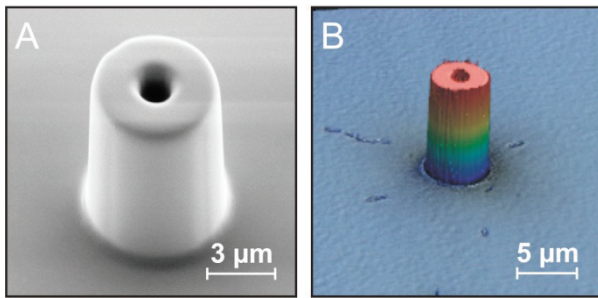


Abbildung 10. Patch-Sites in Silizium

Seitliche Aufnahmen von zwei in Silizium produzierten *Patch-Sites* mit einer Höhe von ca. 10 µm. Öffnungsdurchmesser: ca. 1,6 µm. Die Prozessentwicklung, Herstellung und Endkontrolle der Patch-Chips erfolgt durch die iX-factory GmbH (Dortmund). **A:** REM-Aufnahme einer Silizium-*Patch-Site*. Originalaufnahme: Frau A. Lange (IEF, IGS, Universität Rostock). **B:** 3D-Laser-Scanning-Mikroskopie einer Silizium-*Patch-Site*. Die Höheninformation ist farbkodiert. Die Chipoberfläche (blau) ist etwas verunreinigt.

Für eine automatisierbare Sichtprüfung der *Patch-Sites* wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop VKX-250 (Keyence Corp., Osaka, Japan) erprobt (**Abb. 10B**). Vorteilhaft an dieser zerstörungsfreien Methode ist, dass damit eine materialunabhängige, berührungslose Dokumentation und Messung in 2D und 3D ohne Präparationsaufwand möglich ist.

Danksagung

Die Arbeiten am *Patch-on-Chip*-System PoreGenic® wurden im BMBF-Projekt „PoreGenic® *Patch-on-Chip* System für Wirkstofftests und Grundlagenforschung an adhärenz vernetzten Zellen“ (Förderkennzeichen: 0315809) im Rahmen der Förderinitiative „Gründungsoffensive Biotechnologie“ (GO-Bio) am Lehrstuhl für Biophysik der Universität Rostock durchgeführt. Die Autoren danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) sowie dem Projektträger Jülich für die Förderung, Betreuung und Finanzierung des Projektes.

Des Weiteren gilt unser Dank Frau A. Busch (MSF, LS Werkstoffe für die Medizintechnik, Universität Rostock) und Herrn M. Zwanzig (Fraunhofer IZM, Berlin) für die Erstellung von FIB-Präparationen sowie REM-Aufnahmen. Frau R. Lange (IEF, IGS, Universität Rostock) für die Anfertigung von REM-Aufnahmen sowie Herrn H. Rönnfeldt (Keyence Dtl. GmbH) für die Laser-Scanning-Mikroskopie.

Literaturliste

- [1] Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* 391, 85-100. DOI: 10.1007/BF00656997.
- [2] Dunlop, J., Bowlby, M., Peri, R., Vasilyev, D., Arias, R. (2008). High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. *Nat Rev Drug Discov. Nature Publish. Group*, 358-368. DOI: 10.1038/nrd2552.
- [3] Franz, D., Tautorat, C., Scheffler, U., Klink, O., Kröger, T., Gimsa, J., Baumann, W., Beikirch, H., Köster P.J. (2013). PoreGenic® - Patch-on-Chip-System für die präklinische Forschung an Ionenkanälen. 11. Dresdner Sensor-Symposium. G. Gerlach und A. Schütze, eds. TUDpress, 68-72. DOI: 10.5162/11dss2013/3.5. ISBN 978-3-9813484-5-3.
- [4] Goetze, B., Grunewald, B., Kiebler, M.A., Macchi, P. (2003). Coupling the iron-responsive element to GFP-- An inducible system to study translation in a single living cell. *ScienceSignaling*, Issue 204, p12. DOI: 10.1126/stke.2003.204.p12.
- [5] Li, N., Folch, A. (2005). Integration of topographical and biochemical cues by axons during growth on microfabricated 3-D substrates. *Experimental Cell Research*. Vol.311, Issue 2. Elsevier B.V., 307-316. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.10.007. ISSN 0014-4827.
- [6] Gilles, S. (2010). Nanoimprint Lithographie als Methode zur chemischen Oberflächenstrukturierung für Anwendungen in der Bioelektronik. *Schriften des Forschungszentrums Jülich*. ISBN 978-3-89336-686-6.