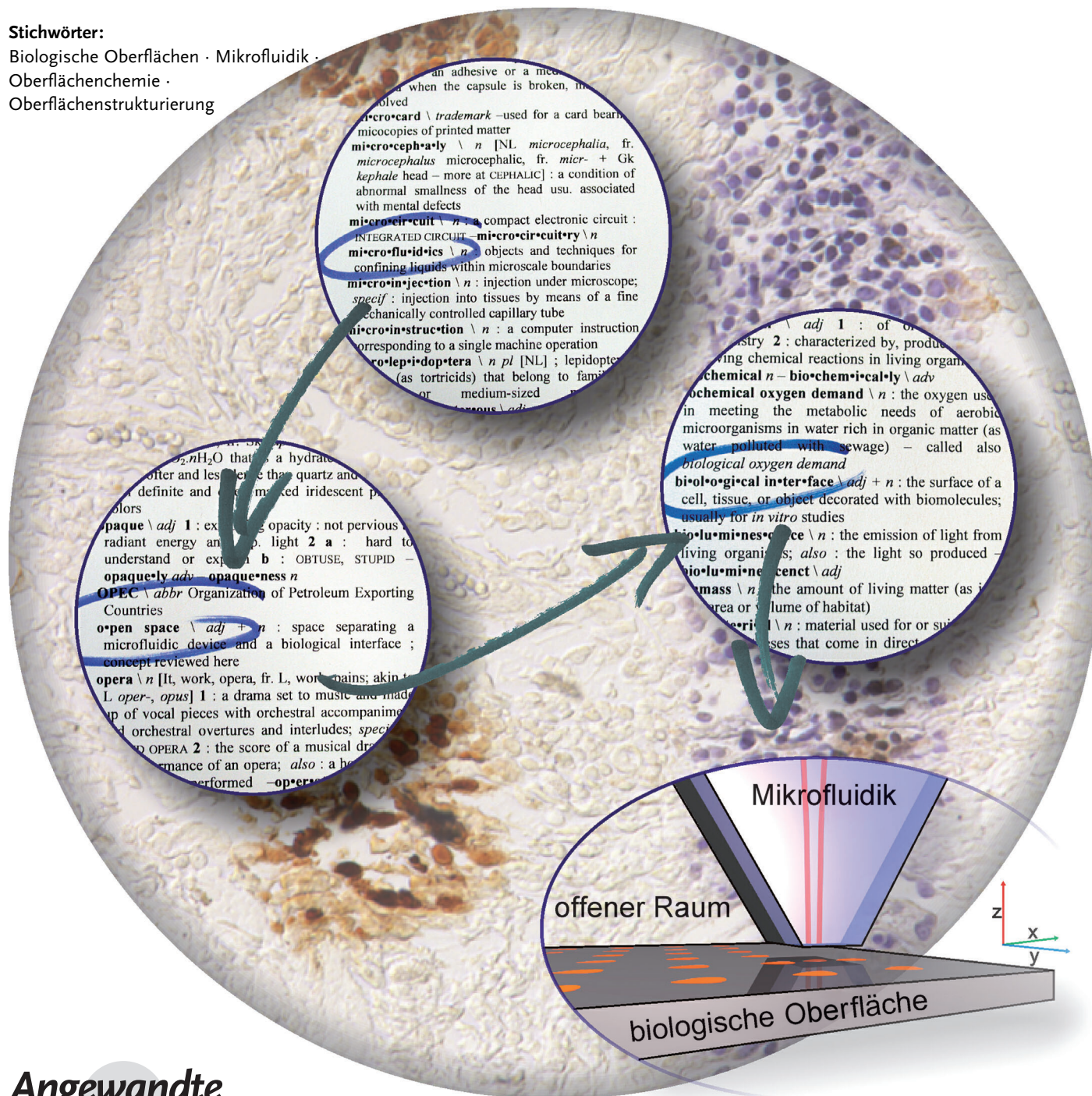


Mikrofluidik im „offenen Raum“: lokalisierte Prozesse an biologischen Oberflächen

Govind V. Kaigala,* Robert D. Lovchik und Emmanuel Delamarche*

Stichwörter:

Biologische Oberflächen · Mikrofluidik · Oberflächenchemie · Oberflächenstrukturierung



Lokale Wechselwirkungen zwischen (Bio)chemikalien und biologischen Grenz-/Oberflächen spielen eine wichtige Rolle in Gebieten wie der Oberflächenfunktionalisierung bis hin zur Zelltoxikologie. Diese Wechselwirkungen können mithilfe von Mikrofluidsystemen untersucht werden, die im „offenen Raum“ arbeiten, d. h. ohne die gewöhnlich in der Mikrofluidik verwendeten geschlossenen Kanäle und Kammern. Diese aktuell entstehende Klasse von Verfahren lokalisiert chemische Reaktionen an Oberflächen biologischer Proben, ohne den Proben signifikante „Einschränkungen“ wie Einbettung, Vorverarbeitungsschritte oder die Notwendigkeit von stabilisierenden Gerüsten aufzuerlegen. Sie öffnen damit neue Möglichkeiten für die Handhabung und Analyse von Wechselwirkungen mit biologischen Proben. Es werden drei Klassen von Mikrofluidsystemen vorgestellt, die im offenen Raum arbeiten, nämlich solche auf mikroelektrochemischer Basis, auf der Basis von Multiphasentransport und auf der Basis von hydrodynamischer Fokussierung von Flüssigkeiten.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	11387
2. Bedingungen, um lokalisierte Prozesse an biologischen Oberflächen im offenen Raum durchzuführen	11391
3. Strategien zur Untersuchung lokalisierter Prozesse an biologischen Oberflächen	11391
4. Ausblick	11402

1. Einleitung

Aktuelle Fortschritte auf den Gebieten der Mikrotechnologie, der Mikrofluidik und der Soft-Lithographie ermöglichen eine immer engere Verknüpfung dieser Technologien mit der Biologie und mit den Biowissenschaften im Allgemeinen. Diese Technologien, die ursprünglich von Mikrotechnologen und Chemikern entwickelt wurden, werden nun von Biochemikern und Biologen zum lokalen Applizieren von Proteinen, zur Assay-Miniaturisierung, Diagnostik und fortgeschrittenen Aufreinigung und Separation verwendet.^[1] Der nächste wichtige Schritt ist eine verbesserte Vereinbarkeit der Mikrofluidik mit biologischen Systemen, die empfindlich gegenüber der Umgebung sind (beispielsweise fragile Proteine auf Oberflächen und lebende Zellen). Außerdem sollte sie mit der Verwendung von Objekträgern und Petrischalen kompatibel sein. Da lebende Materie Oberflächen „mag“, werden immer häufiger für biologische Anwendungen funktionalisierte Substrate verwendet, die auch im Handel erhältlich sind. Die Mikrofluidik sollte fähig sein, mit solchen Substraten im „offenen Raum“ zu arbeiten und damit die Untersuchung biologischer Proben zu ermöglichen. Zu diesem Zweck muss die Mikrofluidik eine ihrer größten Beschränkungen beseitigen: die Wände.

Für viele Anwendungen müssen chemische und biochemische Reaktionen auf biologischen Oberflächen im Mikro- und Nanometermaßstab gesteuert werden. So wird in der biomedizinischen Forschung die Wechselwirkung mit adhären Zellen angestrebt, um Zellarchitekturen aufzubauen, die Mikroumgebung von Stammzellen für die regenerative Medizin zu modulieren, für die Untersuchung von Vorgängen in der Zell- und Entwicklungsbiologie Gradienten von Leitmolekülen zu erzeugen und für das Wirkstoff-Screening und toxikologische Untersuchungen Chemikalien in verschiedensten Konzentrationen zu dispensieren.^[2–5] Die Volumen und Längenmaßstäbe in der Mikrofluidik sind allgemein mit jenen in den Biowissenschaften vereinbar, aber auch die in-

härenten Komponenten dieser Technologie müssen biokompatibel sein.

Es besteht immer größerer Bedarf an der Entwicklung derartiger Technologien,^[6] die in Biolaboratorien ebenso universell werden könnten wie Mikroskope und Mikropipetten. Neben der genauen Beschreibung des Bedarfs an einer Technologie und der Spezifikation davon, wie sie von der biologischen/klinischen Forschung vorangetrieben wird, sind gründliche Betrachtungen der physikalischen und chemischen Mechanismen erforderlich, die der Mikrofluidik zugrundeliegen. So beruhen weithin verwendete Assays, wie z. B. DNA/Protein-Mikroassays und Immunoassays, auf Analyt-Rezeptor-Wechselwirkungen, und erst das genaue Verständnis dieser Wechselwirkungen ermöglicht die weitere Optimierung der Assays. Für die erfolgreiche Umsetzung von Werkzeugen zur Lokalisierung chemischer Funktionen oder Reaktionen an biologischen Oberflächen ist zuerst ein tiefgehendes Verständnis des Wechselspiels zwischen Diffusion, Konvektion und Reaktion erforderlich,^[7] und auch, wie sich ein System auf der Grundlage der Flüsse, Äquilibrierungszeiten und Grundmengen der beteiligten chemischen Spezies verhalten wird.^[8]

1.1. Thematischer Rahmen des Aufsatzes

In diesem Kurzaufsatz untersuchen wir zunächst die Motivation, lokalisierte Prozesse an biologischen Grenzflächen durchzuführen, und die Bedingungen für die Lokalisierungsverfahren. Anschließend geben wir ein Bild der aktuellen Umsetzungen der Mikrofluidik für die Handhabung biologi-

[*] Dr. G. V. Kaigala, R. D. Lovchik, Dr. E. Delamarche
IBM Research, Zürich
Säumerstrasse 4, 8803 Rüschlikon (Schweiz)
E-Mail: gov@zurich.ibm.com
emd@zurich.ibm.com

scher Proben in geschlossenen Systemen. Als Übergang von geschlossenen zu offenen Mikrofluidsystemen wird das Verzicht auf eine der Wände (den Deckel) beschrieben, womit das System teilweise offen wird. Schließlich beschreiben wir drei Klassen von Mikrofluidsystemen, die im offenen Raum arbeiten, nämlich solche auf mikroelektrochemischer Basis, auf der Basis von Multiphasentransport und auf der Basis der hydrodynamischen Fokussierung von Flüssigkeiten.

Wir richten diesen Kurzaufsatz auf biologische Systeme und ihre Oberflächen aus, da wir glauben, dass gerade auf diesem Gebiet, welches für die Biowissenschaften bis hin zur Gesundheitsversorgung so wichtig ist, großer Bedarf an der Mikrofluidtechnologie besteht.

1.2. Wozu Wechselwirkungen mit biologischen Oberflächen im „offenen Raum“ lokalisieren?

Ein grundlegendes Merkmal der Biologie ist die Bildung von Kompartimenten. Biochemisch gesprochen sollten Reaktionen am richtigen Ort und zur richtigen Zeit in Zellen und Geweben stattfinden. Aus diesem Grund beruhen die meisten Ansätze zur Untersuchung und Transformation von Zellen entweder auf dem Verkapseln von Flüssigkeiten (beispielsweise Nanotröpfchen, Vesikel) oder auf der Konstruktion physikalischer Kompartimente für Zellen (beispielsweise Trägerstrukturen, mikrotechnologisch hergestellte Kammern). Beide Ansätze sind aber restriktiv. Healy^[9] beschreibt ein ausgezeichnetes Beispiel zur Veranschaulichung der räumlichen und zeitlichen Abfolge biologischer Vorgänge. Während der Embryonalentwicklung tragen verschiedene Zellpopulationen zur Gesamtorganisation des Gewebes bei, wobei das Schicksal der Zellen von chemischen Signalen innerhalb der sich entwickelnden Gewebe und Organe bestimmt wird. Biologen versuchen seit langem, diese Vorgänge außerhalb des Körpers zu detektieren. Ex-vivo-Methoden der Zellbiologie haben wesentlich zu unserem Wissen über die Funktion von Säugerzellen beigetragen, die räumliche und zeitliche Darstellung von chemischen und physikalischen Signalen an Zellen bleibt aber weiterhin schwierig.^[9]

Technologien, die die Untersuchung und Handhabung von adhären Zellen und Geweben in einem „offenen Raum“ ermöglichen, könnten zu einem vertieften Verständnis der Biologie und Physik an biologischen Oberflächen führen, ähnlich wie dies mit anderen Technologien gelungen

ist. Ein Beispiel für eine gut eingeführte Methode ist Patch-Clamp,^[10] das auf dem Kontaktieren von Zellen mit einer Mikropipette von 1–2 µm Durchmesser beruht. Patch-Clamp wird weithin für Messungen des Membranpotentials verwendet und hat wesentliche Einblicke in die Zellfunktionen geliefert. Oberflächenbasierte Assays werden in „offenen“ Systemen durchgeführt (beispielsweise mit Mikrotiterplatten und Glasplättchen), und es gibt einen Trend zur Verwendung der Mikrofluidik, um die Leistungsfähigkeit solcher Assays zu verbessern. Wir nehmen daher an, dass die Mikrofluidik noch anwendungstauglicher wird, wenn sie im „offenen Raum“, d.h. ohne physikalischen Kontakt oder Eingrenzung angewendet werden kann. Abbildung 1 fasst das Spektrum an aufkommenden Technologien zusammen, die für das lokale Prozessieren biologischer Oberflächen angewendet werden können. Einige dieser Techniken sind für die Zellbiologie und die Gewebeforschung relevant.

1.3. Mikrofluidik zur Durchführung lokalisierter Prozesse

Die ersten Mikrofluidsysteme wiesen geschlossene Mikrofluidkanäle und -kammern auf. Solche Apparaturen werden weithin für spezialisierte Anwendungen verwendet, beispielsweise in der Immundiagnostik.^[11] Allerdings wird die praktische Verwendung geschlossener Mikrofluidsysteme durch den hohen hydraulischen Widerstand, das schwierige Einführen von Proben wie Gewebe, Zellen und mesoskopische Objekte in die Mikrostrukturen und das Verstopfen durch Partikel und Luftbläschen behindert. Ferner sind biologische Proben empfindlich gegenüber ihrer Umgebung und neigen zu Artefakten durch Austrocknen und Denaturierung. Trotz erheblicher Fortschritte in der Mikrofluidik gibt es eine starke Motivation zur Entwicklung neuer und verbesserter Ansätze zur Steuerung der chemischen und physikalischen Umgebung intakter Zellen in Geweben oder Zellkulturen. Traditionell werden Mikropipetten aus Glas verwendet, um die Zellumgebung zu verändern und aktive Chemikalien an biologische Oberflächen zu bringen, einzelne Zellen mit eingeschlossen. Dieses Verfahren ist aber nicht geeignet, um eine lokalisierte chemische Umgebung aufrechtzuerhalten, da die aktive Substanz aus dem Analysefeld hinausdiffundieren kann. Sims und Allriton^[12] veröffentlichten eine umfassende Übersicht über die Anwendung von Mikrofluidik-Technologien zur Analyse einzelner Zellen.



Emmanuel Delamarche studierte Chemie in Toulouse und wechselte 1992 zur Promotion in Biochemie zu IBM Research, Zürich (in Kooperation mit der Universität Zürich), wo er über Verfahren zur Oberflächenstrukturierung mit Rastersondenmethoden, über selbstorganisierte Monoschichten, Soft-Lithographie und Mikrofluidik forschte. Aktuell leitet er bei IBM die Forschung zu experimentellen Biowissenschaften mit dem Ziel, medizinische Fragen unter Verwendung von Mikrofluidik, Mikro- und Nanotechnologie zu lösen.



Govind Kaigala studierte und promovierte an der University of Alberta und arbeitete als Postdoktorand an der Stanford University. Aktuell arbeitet er bei IBM Research, Zürich, auf dem Grenzgebiet von Biowissenschaften und der Mikro- und Nanotechnologie. Seine Forschungsinteressen umfassen den Aufbau und die Entwicklung von Mikrofluidsystemen und Assays für die chemische und biomolekulare Analyse im Hinblick auf potentielle medizinische und klinische Anwendungen.

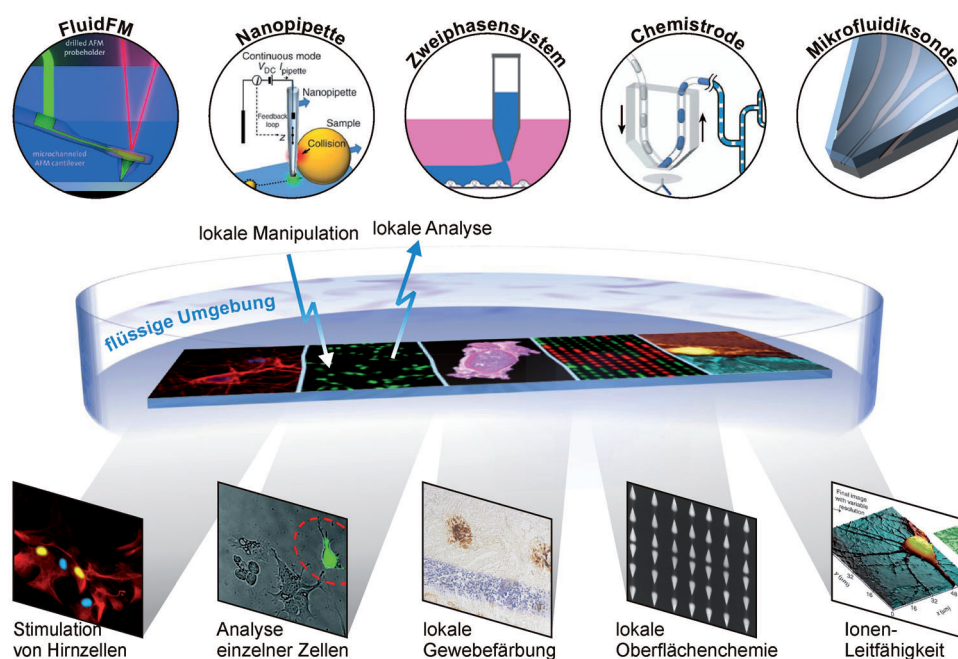


Abbildung 1. Neue Verfahren zur lokalen Durchführung (bio)chemischer Verfahren an biologischen Oberflächen in flüssiger Umgebung. Angabe der Bildquellen in den nachfolgenden Abbildungen.

Es ist wichtig, über Technologien zu verfügen, die Flüssigkeiten auf Längenskalen, die der Biologie entsprechen, lokalisieren können. Der Ursprung der Lokalisierung von Flüssigkeiten ist die Inkjet-Technologie, deren Anwendungsspektrum vom Tintenstrahldrucken bis hin zum Applizieren biologischer Moleküle reicht. Parallel dazu ermöglichen Fortschritte der Mikrotechnologie die Herstellung von Vorrichtungen zum Messen komplexer biophysikalischer und biochemischer Charakteristika von Zellen und subzellulären Komponenten.^[13,14] Eine „Mikrokontaktdruck“ (micro-contact printing, μ CP)^[15,16] genannte Technologie ist einfach genug für die Verwendung durch den Nichtspezialisten und wird weithin eingesetzt, um Chemikalien auf Oberflächen in verschiedensten Längenskalen zu applizieren.^[17] Mikrokontaktdruck wird auf verschiedenen Gebieten eingesetzt, beispielsweise bei der Herstellung von Protein-Biochips^[18] und der Vorbereitung von Oberflächen für die Untersuchung von Zell-Oberfläche-Wechselwirkungen.^[19] Beim Mikrokontaktdruck werden Moleküle von einem Stempel auf eine Oberfläche übertragen. Zum Modifizieren des Druckbildes

muss der Stempel neu gestaltet werden, ein umständlicher und zeitaufwändiger Vorgang.

Die allgemeinen Ansätze der Mikrofluidik im Zusammenhang mit Lokalisierungsvorgängen sind folgende:

Mikrofluidik zur Handhabung von Zellen: Eine Vielzahl von Technologien wie die Elektrophorese, Dielektrophorese, Elektroporation, Oberflächenakustik und Raman-Spektroskopie sind miniaturisiert und in Mikrofluidik-Vorrichtungen integriert worden, von denen einige für die Zellanalyse und Zell-Interaktionen erfolgversprechend sind. Die Verwendung dieser geschlossenen Mikrofluidiksysteme ist aber mit vielen Problemen verbunden. Untersuchungen von adhären Zellen und Geweben in einer geschlossenen Vor-

richtung spiegeln nicht unbedingt die wahre Biologie der Zellen wider.

Mikrofluidik für die Kompartimentalisierung: Tröpfchen, die eine wässrige Phase verkapseln, bieten eine noch kleinere und wirkungsvollere Form der Kompartimentalisierung als Mikrotiterplatten und Mikroarrays. Die Flüssigkeitsvolumen, die in den Tröpfchen verkapselt sind, sind so klein, dass sie in der Lage sind, nur eine oder einige wenige Zellen aufzunehmen. Es gibt vielfältige Anwendungen für diese Technik, von der DNA-Sequenzierung, der Biochemie und dem Wirkstoff-Screening bis hin zur gerichteten Evolution.^[20] Eines der Verfahren auf der Grundlage von Tröpfchen ist die Elektrobenetzung auf Dielektrika,^[21] die auch digitale Mikrofluidik genannt wird.^[22,23] Dabei werden Tröpfchen mithilfe eines Felds von Elektroden, die die Benetzungseigenschaften der Oberfläche modifizieren, auf einer Oberfläche bewegt. Diese Technologie ist erfolgversprechend für eine Mikrofluidik im offenen Raum, benötigt aber künstliche Oberflächen.

Diese Methoden der Mikrofluidik beruhen alle hauptsächlich auf direktem Kontakt mit einer festen Grenzfläche, und sind ungeeignet um die empfindlichen Oberflächen lebender Zellen zu bearbeiten, die durch den physikalischen Kontakt beschädigt werden können. Bei der Implementierung von Assays in Mikrofluidiksysteme wurden zwar signifikante Fortschritte erzielt, allerdings blieb man bisher auf oberflächenbasierte Assays beschränkt. Nachstehend werden einige Implementierungen biologischer Assays in Mikrofluidiksysteme beschrieben (Abbildung 2).

Park et al.^[24] entwickelten ein Mikrofluidiksystem für die parallele Immunhistochemie (MMIHC) auf Gewebeschnitten. Sie verwendeten Mikrokanäle in Polydimethylsiloxan (PDMS), um verschiedene Bereiche von Gewebeschnitten mit Antikörper zum Nachweis von Krankheitsmarkern zu



Robert D. Lovchik studierte Biotechnologie an der University of Applied Sciences (UAS) in Wädenswil (Schweiz) mit Ingenieursabschluss im Jahr 2000. Er studierte Mikro- und Nanotechnologie an der UAS Vorarlberg (Österreich) und wechselte 2007 als Forschungsingenieur zu IBM Research, Zürich. Aktuell arbeitet er an der Mikrofluidiksonden-Technologie und der Entwicklung einer Mikrofluidikplattform für Zellstudien. Parallel dazu nimmt er an einem Promotionsprogramm der ETH Zürich unter Betreuung von Prof. Viola Vogel teil.

inkubieren (Abbildung 2a). Mit diesem System konnten die vier Biomarker Estrogen, humaner epidermal Wachstumsfaktor-Rezeptor 2, Progesteronrezeptor und Ki-67 gleichzei-

schädigten oder heterogenen Gewebeschnitten kann dies problematisch werden.

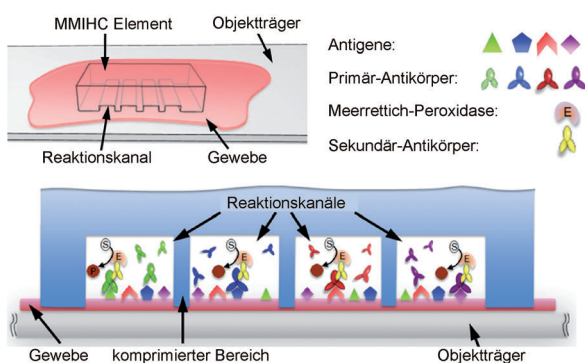
Im Zusammenhang der lokalen IHC besteht Bedarf an der Entwicklung von Verfahren für In-situ-Hybridisierungssassays an Gewebeschnitten. Dufva et al.^[25] entwickelten ein System zur Online-Überwachung der Hybridisierung mit Fluorescein-markierten Sonden für 18S-ribosomale RNA in Mäusehirn-Gewebeschnitten. Diese als „HistoFlex“ bezeichnete Vorrichtung stellt gleichmäßige Hybridisierungsbedingungen über die Reaktionskammer bereit und erzielt eine höhere Empfindlichkeit als herkömmliche Verfahren zum miRNA-Nachweis, benötigt aber erhebliche Voroptimierungen zur Berücksichtigung der variablen Gewebesthistologie.

Whitesides und Mitarbeiter^[26] entwickelten eine Mikrofluidiktechnik zur Visualisierung, Sondierung und Manipulation der metabolischen und strukturellen Maschinerie von Säugerzellen, bezeichnet als PARTCELL („partielle Behandlung von Zellen auf der Basis von laminarer Strömung“). Die Technik wurde zur Untersuchung der subzellulären Vorgänge der Mitochondrienbewegung und von Veränderungen der Zytoskelettstruktur lebender Zellen verwendet. Die Mikrofluidiksysteme wurden durch Platzieren von in PDMS geformten Kanälen auf einer lebenden Zelle realisiert. In einem Mikrokanal wurde eine Strömung parallel fließender Flüssigkeiten erzeugt (Abbildung 2b). Die Breite, welche jede Flüssigkeit im Strom einnahm, und die Position der Grenzfläche zwischen den Flüssigkeiten wurde über die Flussmenge der einzelnen Flüssigkeit gesteuert. Die Zellen wurden zwischen zwei benachbarten Flüssigkeiten angeordnet, von denen die eine das interessierende Molekül enthielt, die andere nicht. Abbildung 2b zeigt das Zerreißen von Aktinfilamenten in ausgewählten Zellbereichen nach der Behandlung mit Latrunculin A, einem membrangängigen Molekül, das an Aktinmonomere bindet.

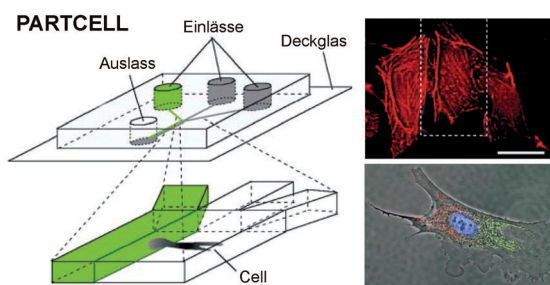
Die Manipulation mit Mikropipetten bietet eine Möglichkeit, die Funktionalität von Mikrofluidik-Vorrichtungen mit „geschlossenem“ Kanal zu erweitern. Zu diesem Zweck entwickelten Folch et al.^[27] eine „offene“ Mikrofluidik-Vorrichtung ohne Deckel (bezeichnet als „Microcanals“), die eine für Mikropipetten zugängliche Zellkulturumgebung bietet (Abbildung 2c). Die Mikrokanäle wurden in PDMS gefertigt, als Träger wurde Glas verwendet. Die Flüssigkeit befand sich in offenen Kanälen, blieb aber aufgrund der Benetzung der unteren Ränder und der Hydrophobie der oberen Mikrokanalwände in den Mikrokanälen fokussiert. Zellen wurden auf die Böden der Mikrokanäle gesät, indem eine Zellsuspension durch den entsprechenden Einlass zugegeben und der Fluss während der Zellanhaftung/Verteilung gestoppt wurde. Es wurden elektrophysiologische Patch-Clamp-Aufzeichnungen an menschlichen Nierenzellen durchgeführt.

Die oben beschriebenen Verfahren sind gute Beispiele für die Untersuchung von Zellen und Geweben unter Verwendung von Mikrofluidiktechniken. Das Verfahren auf der Grundlage von Mikrokanälen stellt einen Übergang von der geschlossenen zur offenen Mikrofluidik dar. Durch Entfernen einer Wand entsteht ein offener Raum über der biologischen Probe, sodass die Probe mithilfe der Patch-Clamp-Technik

(a) Immunhistochemisches Mikrofluidiksystem



(b) laminare Strömungen zur Behandlung von Zellen



(c) Mikrofluidkanäle ohne „Dach“

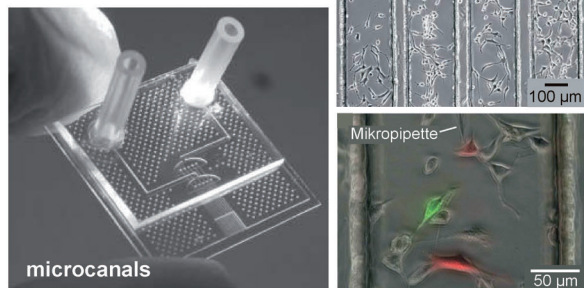


Abbildung 2. „Geschlossene“ Mikrofluidvorrichtungen. a) PDMS-Element mit Kanälen zur Abgabe von Antikörpern für die lokale Immunhistochemie auf Gewebeschnitten. b) Partielle Manipulation von Zellen mithilfe einer Mikrofluidvorrichtung. c) „Mikrokanäle“ in Glas und PDMS mit Löchern zum Pipettieren von Nährstoffen/Farbstoffen zu ausgewählten Zellen. Abdruck aus: (a) Lit. [24]; (b) Lit. [26], Copyright 2001 Macmillan Publishers; (c) Lit. [27], Copyright 2004 Royal Society of Chemistry.

tig auf Brustkrebszellen und menschlichen Brustkrebsgeweben nachgewiesen werden. Zwar ermöglicht dieser Ansatz Parallelanalysen mittels IHC, er ist aber insofern restriktiv, als der Bereich der Mikrofluidkanäle auf dem Gewebeschnitt willkürlich durch den Aufbau und die Herstellungsweise der Mikrofluidik-Vorrichtung bestimmt wird. Bei kleinen, be-

direkt sondiert werden kann und Flexibilität und Wechselwirkungsmöglichkeiten verbessert werden.

2. Bedingungen, um lokalisierte Prozesse an biologischen Oberflächen im „offenen Raum“ durchzuführen

Im vorigen Abschnitt wurde die Entwicklung der Mikrofluidik mit geschlossenem Kanal zur Aufnahme von Geweben und adhären Zellen für biologische Untersuchungen dargestellt. Es werden aber flexiblere und interaktive Werkzeuge benötigt, um der biologischen Proben inhärenten Heterogenität zu genügen. Es gibt nur eine beschränkte Zahl von Verfahren, die mit biologischen Oberflächen vereinbar sind, insbesondere für die Bearbeitung im „offenen Raum“. Verfahren zur Lokalisierung chemischer Reaktionen an biologischen Grenzflächen sollten folgende Merkmale aufweisen:

- nichtinvasiv: Arbeiten im „kontaktfreien“ Modus, um die Oberfläche der Probe nicht zu stören.
- immersiort: Eine Puffer-/Flüssigkeitsumgebung verhindert Artefakte durch Austrocknen, wie z. B. Denaturierung.
- biokompatibel: Keine toxischen Materialien oder Chemikalien sollten eingesetzt werden, und die Verfahren sollten mit den typischen Bereichen von pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke, Scherkräften und Druck vereinbar sein.
- flexibel: Günstig sind Vereinbarkeit mit verschiedenen Materialien, Topographien, Längenskalen (μm bis cm) und Volumen, die biologischen Systemen inhärent sind.
- interaktiv: Das Verfahren sollte während der Interaktion mit der biologischen Oberfläche eine Rückantwort geben können (Strom, Spannung, Kraft, optisches Signal).

Bei der Verwendung eines teilweise oder vollständig offenen Aufbaus ist die Verdunstung nicht zwingend ein Problem, da die Probe einfach in größeren Volumen (mL -Bereich) von Flüssigkeiten eingetaucht oder eine Umgebung mit hoher relativer Feuchtigkeit bereitgestellt werden kann. Der entscheidende Vorteil eines offenen Aufbaus ist, dass Zellen und Gewebe zur Bearbeitung nicht durch einen geschlossenen Mikrokanal geleitet werden müssen, sondern dass stattdessen die (Bio)chemikalien zur biologischen Oberfläche hin gebracht werden.

3. Strategien zur Untersuchung lokalisierter Prozesse an biologischen Oberflächen

Die Rastersondenmikroskopie (SPM) wurde bereits kurz nach ihrer Erfindung zum Sondieren von (Bio)molekülen auf Oberflächen eingesetzt. Mit zusätzlichen Mikrofluidik-Funktionalitäten haben sich verschiedene Verfahren auf SPM-Basis für die Lokalisierung (bio)chemischer Verfahren auf biologischen Oberflächen herausgebildet. Diese Verfahren genügen mehreren der in Abschnitt 2 aufgeführten Bedingungen zum Lokalisieren chemischer Reaktionen auf biologischen Oberflächen. Daher beschreiben wir zunächst diese Verfahren, bevor wir Anwendungen der Mikrofluidik auf der Basis von Mikroelektrochemie, Multiphasentransport

und hydrodynamischer Fokussierung diskutieren, die noch mehr den genannten Bedingungen entsprechen.

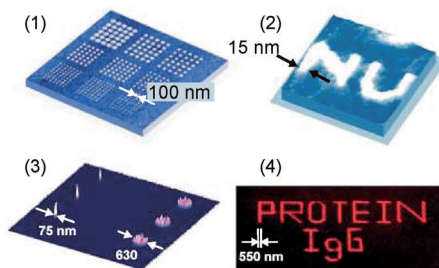
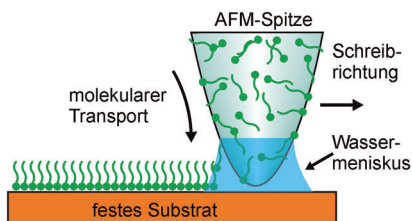
3.1. Von der Rastersondenmikroskopie zu Rasterverfahren mit Mikrofluidik-Elementen

Die Rastersondenmikroskopie^[28] umfasst ein Spektrum von Verfahren mit hoher Positionierungsgenauigkeit, die in den Materialwissenschaften, der Lithographie, Metrologie und der Sondierung von Biomolekülen auf Oberflächen verwendet werden. Bei diesen Verfahren wird eine Sonde linienweise bewegt, um Sonde-Oberfläche-Wechselwirkungen als Funktion der Position aufzuzeichnen. Von diesen Verfahren ist die Rasterkraftmikroskopie (AFM) am besten bekannt und wird am häufigsten angewendet. Sie verwendet einen Ausleger mit einer feinen Spitze am Ende, um Oberflächeneigenschaften abzutasten, wie z. B. Topographie, Elastizität, elektrisches Potential, Magnetismus und mechanischen Widerstand. Die AFM wurde ursprünglich für die physikalische Untersuchung von Materialien entwickelt, wurde aber schon bald für wichtige Fragen der Biowissenschaften eingesetzt, beispielsweise für die exakte Manipulation von biologischen Proben. Eine wichtige Erweiterung der AFM und verwandter Verfahren war die kürzlich entwickelte Fähigkeit zur Handhabung von Fluiden, die eine Brücke zwischen SPM-Techniken und den Biowissenschaften schlägt.

Die Arbeitsgruppe von Mirkin setzte AFM zur Anordnung von Biomolekülen auf Oberflächen ein, bezeichnet als „Dip-Pen-Nanolithographie“ (DPN).^[29,30] Ursprünglich wurde die DPN verwendet, um Alkanthiolate von der AFM-Spitze auf eine Goldoberfläche zu überführen, wodurch selbstorganisierte Monoschichten (SAMs) auf Gold mit einer Auflösung von unter 100 nm strukturiert werden konnten. Die DPN-Spitze ist mit einer Chemikalie („Tinte“) überzogen und führt sie durch Kontakt und Diffusion lokal an die Oberfläche (Abbildung 3a). Die aus Siliciumnitrid hergestellten Ausleger sind funktionalisiert, um die Hydrophobie der Spitze zu erhöhen. Die Flüssigkeitsübertragung wird durch die Wechselwirkungen zwischen Tinte und Spitze, Tinte und Oberfläche und die Eigenschaften der Tinte selbst, wie z. B. Oberflächenspannung, Viskosität und Dampfdruck, bestimmt. Ansätze auf AFM-Basis arbeiten in einem kontaktfreien Modus, wobei die genaue Steuerung des Abstands zwischen Ausleger und Oberfläche entscheidend ist. Dies führt zu Beschränkungen hinsichtlich der Rauheit und Elastizität der Oberflächen, die abgetastet werden können, und der lateralen Bewegungsgeschwindigkeit des Auslegers.

Eine interessante Erweiterung der DPN ist die Verwendung von Mikrofluidik-Elementen, um die Flüssigkeit zur Sonde zu führen. Die Arbeitsgruppe von Espinosa^[31,33] entwickelte einen Ansatz zur kontinuierlichen Zufuhr von Tinte zur Spitze der Sonde. Sie entwickelten eine AFM-Sonde mit einer Öffnung an der Spitze eines hohlen, pyramidenförmigen Reservoirs (Abbildung 3b)^[31] und nannten diese Vorrichtung „Nano-Füllfeder“, die eine „Vulkanspitze“, Mikrokanäle und das auf dem Chip angeordnete Reservoir umfasst. Bei diesem Aufbau wird die Tinte im Reservoir durch Kapillarkräfte durch die Kanäle transportiert, um eine flüssige

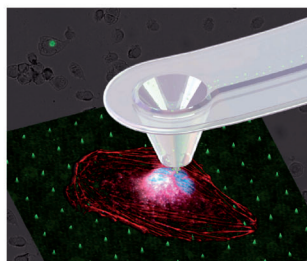
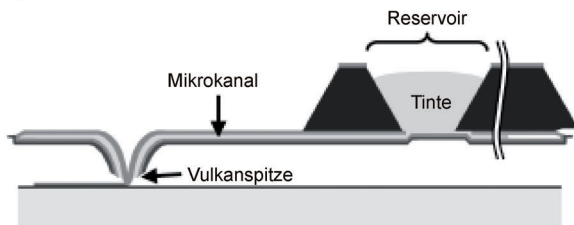
(a) Dip-Pen-Nanolithography



Technologie können auch einzelne mikroskopische Objekte, beispielsweise lebenden Säugerzellen, Hefen oder Bakterien, aufgehoben werden.

3.2. Mikroelektrochemie mit (Bio)chemikalien

(b) Nanofüllfeder für molekulares Schreiben



Nadelartige Elektroden mit präziser Positionierung bieten neuartige Ansätze für die Visualisierung und Steuerung chemischer und biochemischer Reaktionen auf Oberflächen. Es gibt bereits mehrere ausgezeichnete Übersichten zu diesem Thema, beispielsweise von Schulte und Schuhmann^[34] im Zusammenhang der Einzelzellanalyse. Die Kombination der Mikrofluidik mit Mikroelektroden, die im elektrochemischen Rastermikroskop-Modus betrieben werden, oder mit Nanopipetten für die Ionenleitfähigkeitsmikroskopie ermöglichen neue Anwendungen, welche folgend aufgeführt sind.

(c) FluidFM: Rasterkraftmikroskop mit hohler Spitze

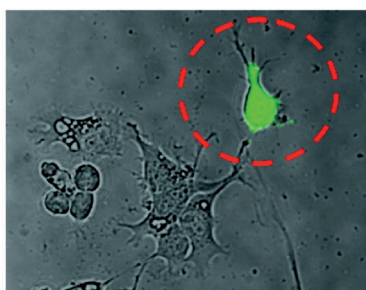
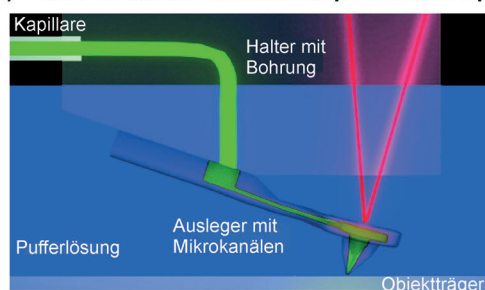


Abbildung 3. Rastersondenmikroskopie für lokales Prozessieren und Applizieren von Chemikalien auf biologischen Oberflächen. a) Bei der Dip-Pen-Nanolithographie wandert im Kontaktbereich Tinte von der Oberfläche einer AFM-Spitze an eine Oberfläche. Unter Verwendung von DPN wurden 1) nanometergroße Punktfelder, 2) Buchstaben auf eine Goldoberfläche, 3) mit Oberflächen-DNA-Templaten hybridisierte 25 und 13 nm große Gold-Nanopartikel und 4) Strukturen von fluoreszenzmarkiertem Immunglobulin G geschrieben. b) Bei einer „Nano-Füllfeder“-Sonde bildet von einem Reservoir zugeführte Tinte eine Flüssigkeit-Luft-Grenzfläche an der Spitze, und Moleküle werden durch Diffusion von der Grenzfläche auf ein Substrat übertragen. c) Ein an einen gebohrten AFM-Sondenhalter befestigter Ausleger gibt einen Fluoreszenzfarbstoff an ein einzelnes lebendes Neuron ab. Abdruck aus: (a) Lit. [29] (links) und Lit. [30] (rechts), Copyright 2004 Wiley-VCH; (b) Lit. [31], Copyright 2005 Wiley-VCH; (c) Lit. [32], Copyright 2009 American Chemical Society.

Schicht um die Spitze zu bilden. Es wurden Strukturen mit 40 nm schmalen Linien geschrieben.

Ähnlich wie bei der Einführung eines Reservoirs für Flüssigkeiten in der Nähe des Auslegers integrierten Zambelli und Mitarbeiter^[32] Mikrofluidik-Elemente in einen AFM-Aufbau und bezeichneten ihre Technik „FluidFM“ (Abbildung 3c). Die Vorrichtung umfasst einen hohlen Ausleger mit Mikrofluidik-Elementen für die Verwendung an Luft und in Flüssigkeit. Eine Reihe von Auslegern ist durch einen modifizierten AFM-Halter mit einem Zufuhrsystem verbunden, wodurch die Abgabe einer Lösung mit ausgewählten Molekülen an einzelne Zellen in einer physiologischen Umgebung möglich ist. Die Auslegergeometrie und die AFM-Kraftrückmeldung ermöglichen die lokale Abgabe von Molekülen an Zellen, entweder durch leichten Kontakt mit der Membran oder durch Perforation der Membran. Mit der FluidFM-

Oberfläche, sodass die elektrochemische Kartierung einer anfänglich trockenen Probe durchgeführt werden kann. Da die Probe nicht in einen Elektrolyten getaucht werden muss, können auch vertikale oder gekippte Substrate untersucht werden. Die Push-Pull-Sonde wurde in einem „Kontakt“-Modus betrieben, sodass der zeitaufwändige Vorgang der Probennivellierung vor der SECM-Bildgebung vermieden werden konnte. Dieser Ansatz ermöglicht die Untersuchung welliger oder gekrümmter Proben. Das Konzept der lokalen, hochauflösenden Charakterisierung der Oberflächenaktivität wurde durch SECM-Aufnahmen verschiedener Gold-auf-Glas-Proben verwirklicht. Wir glauben, dass diese Sonde mit anderen Analyseverfahren gekoppelt werden kann, beispielsweise mit Massenspektrometrie, Flüssigkeits- oder Gaschromatographie und Kapillarelektrophorese.

3.2.1. Elektrochemische Rastermikroskopie (SECM)

Die von Momotenko et al. entwickelte Push-Pull-Sonde^[35] kartiert (elektro)chemische Informationen auf Oberflächen mit hoher räumlicher Auflösung. Die Vorrichtung umfasst eine Arbeitselektrode, eine Gegen/Referenzelektrode und ein Mikrofluidsystem (Abbildung 4). Mikrofluidkanäle ersetzen kontinuierlich Flüssigkeit zwischen der Sondenspitze und der

Nanopipette für die Zugabe von individuellen Molekülen in Zell-Kompartimente

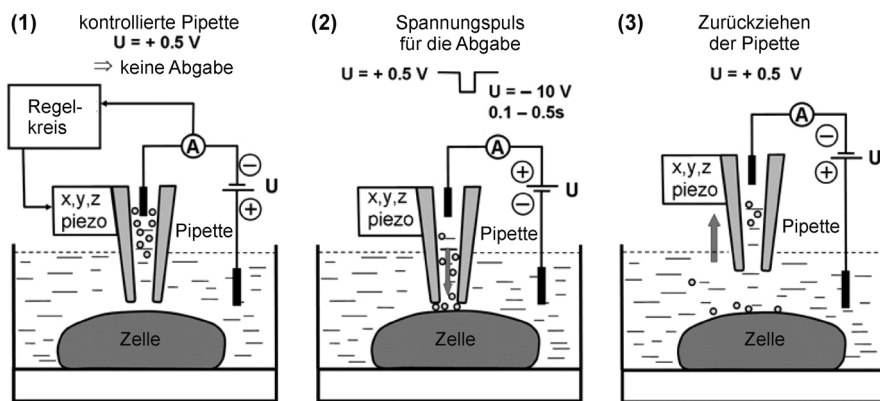


Abbildung 6. Abgabe einzelner Moleküle an Zellkompartimente durch eine Nanopipette. Die Pipette ist in einem Abstand von 100 nm von der Zellmembran mit einem positiven Potential angeordnet, anschließend wird ein negativer Spannungspuls angelegt, um Moleküle an die Zellmembran abzugeben. Abdruck aus Lit. [39], Copyright 2007 Elsevier.

Das elektrische Feld im Bereich der Spitze ist aufgrund der konischen Form der Pipette entlang der Pipettenachse ungleichmäßig. Die Anzahl der Moleküle, die aus der Spitze austreten, hängt von der Kombination von elektroosmotischem Fluss, Elektrophorese und Dielektrophorese ab.

Physikalische Untersuchungen von Zellen und die Abgabe ausgewählter Moleküle an spezifische Bereiche auf Zellmembranen erfordern empfindliche und spezialisierte Verfahren. Bruckbauer et al.^[39] entwickelten ein Werkzeug zur gesteuerten Abgabe von Fluorophor-markierten Molekülen und konnten damit erfolgreich Einzelmoleküle verfolgen. Das Vorzeichen und die Höhe der angelegten Spannung steuerten die Anzahl der abgegebenen Moleküle. Eine Nanopipette gab einzelne fluoreszierende Moleküle an ausgewählte Stellen auf der Plasmamembran lebender Schweinespermatozoen ab (Abbildung 6). Die Absicht war, die Diffusion von Membran-Glycoproteinen in verschiedenen Makrodomänen zu verfolgen. Dieses Verfahren erlaubte wichtige membranbiologische Untersuchungen über die heterogene Verteilung von Lipid- und Proteinbestandteilen. Durch dieses hochauflösende Raster- und Abgabeverfahren konnte die Dynamik von Submikrometerstrukturen, wie z.B. Lipidflößen („lipid rafts“), untersucht werden. Dies wurde durch Verfolgen und Analysieren der Diffusion von Einzelmolekülen in Echtzeit durchgeführt, wobei die Moleküle mit einer Genauigkeit von 50 nm lokalisiert werden konnten. Im Gegensatz zu der Verwendung von Fluorophoren, die innerhalb kurzer Zeit ausbleichen, erlaubte der Ansatz mit Nanopipetten die Durchführung mehrerer Experimente an der gleichen Zelle, um verschiedene Makrodomänen und Unterregionen der Plasmamembran abzutasten, sowie die Untersuchung des Vorhandenseins von Diffusionsbarrieren ohne Beschränkung der Beobachtungszeit.

Die Mechanobiologie gewinnt immer mehr an Bedeutung. Die entsprechenden Technologien zum beschädigungs-freien Sondieren der mechanischen Eigenschaften von Membranen sind aber noch ungenügend.^[40] Shevchuk et al.^[41] entwickelten ein Verfahren zum Abbilden kontrahierender

Herzzellen unter Verwendung von Nanopipetten (Abbildung 7a). Ein abstandsmoduliertes Verfahren der SICM lieferte einen ausgefeilten Mechanismus zur Abstandssteuerung, der komplizierte physiologische Experimente ermöglichte, bei denen die Ionenstärke des flüssigen Mediums verändert wurde. Während der Kontraktion des Herzmyozyten bewegte die Feedback-Steuerung den Proben-tisch, um den Abstand zwischen Nanopipette und Zelloberfläche konstant zu erhalten. Mit dem Verfahren wurden schnelle Veränderungen der Zellhöhe von 10 nm bis hin zu mehreren μm mit Millisekunden-Zeitauf-lösung gemessen. Die Nanopipetten wurden mit konfokaler Lasermikro-skopie zur gleichzeitigen Messung der Herzmyozyten-Bewegung auf dem

Nanometermaßstab und der lokalen Calciumkonzentration unter der Zellmembran kombiniert. Trotz großer Zellbewegungen konnten mit dem Nanopipetten-Ansatz gleichzeitig die Veränderungen der Zelldicke verfolgt und Messungen des intrazellulären Ca^{2+} nahe der Zelloberfläche bei aufrechtergehaltener Zellfunktionalität gemessen werden.

Die Abbildung lebender Zellen mit Auflösungen im Nanometermaßstab liefert faszinierende Einblicke in die biomolekularen Mechanismen von Zellen. Allerdings ist die SICM auf die Abbildung relativ flacher Oberflächen beschränkt, die Zellen jedoch nicht aufweisen. Wenn die Nanopipette während des Scannings auf eine vertikal vorragende Struktur trifft, kollidiert sie mit dieser. Dieses Problem wurde von Novak et al.^[42] durch die Verwendung eines SICM im dynamischen Modus überwunden. Dies erlaubte die kontaktfreie Abbildung komplexer dreidimensionaler Oberflächen lebender Zellen mit Auflösungen unter 20 nm (Abbildung 7b). Das Funktionieren einer Ionenleitfähigkeitsmikroskopie mit dynamischer Sonde (HPICM) wurde durch nanoskalige Abbildung von Erscheinungen auf der Oberfläche lebender Zellen unter physiologischen Bedingungen demonstriert. Bei einem herkömmlichen SICM ist eine Nanopipette auf einem dreidimensionalen piezoelektrischen Translationstisch befestigt, und ein automatisierter Feedback-Steuerungsmechanismus bewegt die Pipette nach oben oder unten, um den Pipettenstrom konstant zu halten, während die Probe lateral gescannt wird. Gegenüber dem herkömmlichen Rasterscanning hat die HPICM den Vorteil, dass die Reihenfolge der Bildpixel nicht vorbestimmt sein muss. Das gesamte Bild wird in gleich große Quadrate aufgeteilt, und vor der Abbildung jedes Quadrats wird die Gesamttraugkeit der Probe durch Messen des Höhenunterschieds an den Ecken des Quadrats abgeschätzt. Wenn die Oberfläche in einem Quadrat rau ist, wird die Topographie des Quadrats mit hoher Auflösung gemessen. Wenn die Probe relativ flach ist, wird das Quadrat mit geringerer Auflösung abgebildet. Dieses adaptive Verfahren wurde durch die Abbildung von pyramidalen Hippocampus-Neuronen innerhalb von 15 min ausge-

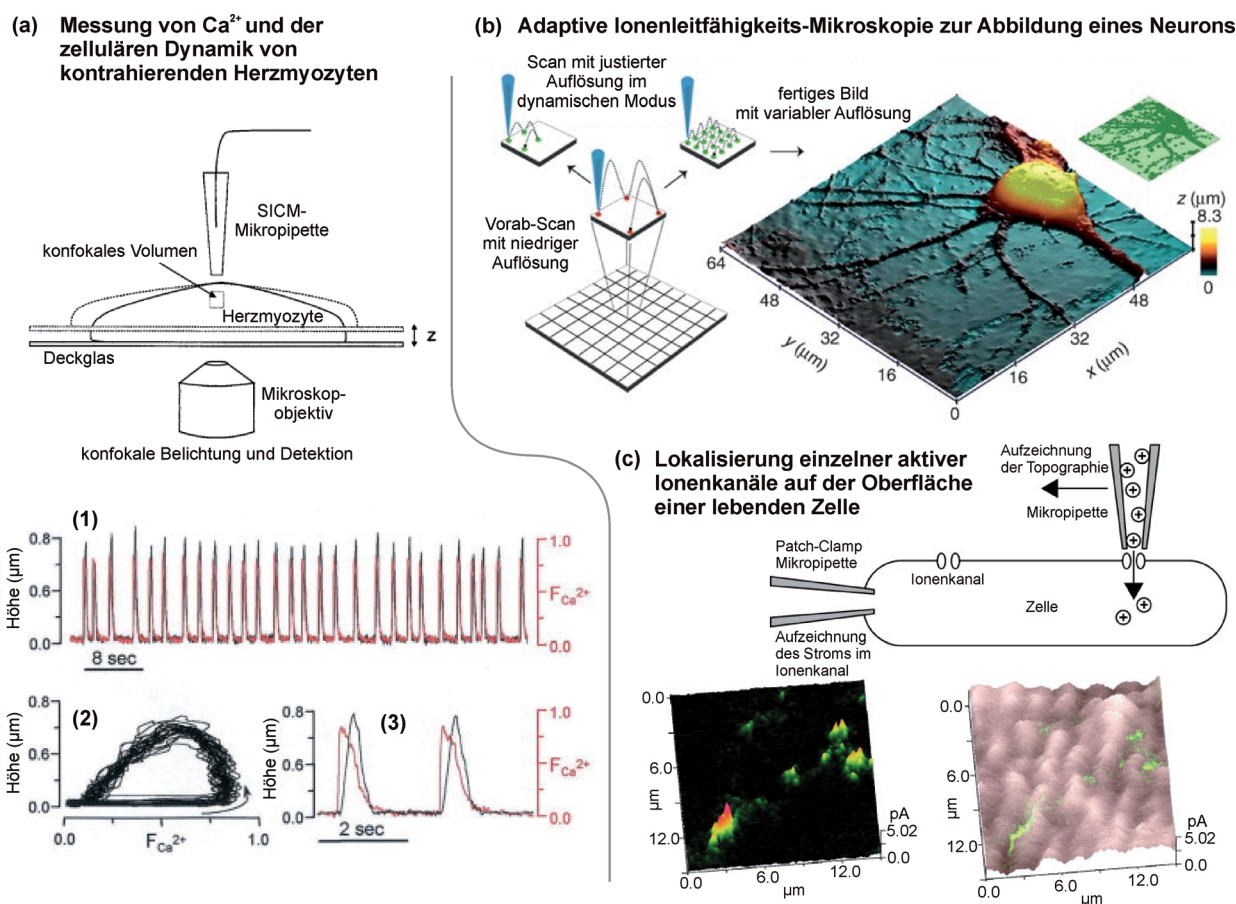


Abbildung 7. Nanopipetten für Interaktionen mit biologischen Oberflächen im Nanometer-Maßstab. a) Gleichzeitige SICM und konfokale Laser-mikroskopie an einem kontrahierenden Herzmyozyten. Diagramme: 1) gleichzeitige Messung der Oberfläche eines kultivierten Ratten-Herzmyozyten und der lokalen Ca^{2+} -Konzentration unterhalb der Zelloberfläche; 2) Zelloberfläche gegen relative Calciumkonzentration für alle Kontraktionen in (1); 3) Vergrößerung von zwei der Kontraktionen in (1). b) Prinzip der adaptiven HPICM und erhaltenes dreidimensionales Bild eines Neurons. c) Lokalisierung einzelner Ionenkanäle in intakten Zellmembranen. Karten des K^+ -Stroms (links) und der Oberflächentopographie, der Karte des K^+ -Stroms überlagert (rechts). Abdruck aus: (a) Lit. [41], Copyright 2001 Elsevier; (b) Lit. [42], von den Autoren bereitgestellt; Lit. [43], Copyright 2000 Macmillan Publishers.

führt (Abbildung 7b). Es ist sehr wahrscheinlich, dass dieses Verfahren zunehmend bei biophysikalischen Untersuchungen von Zellen angewendet wird.

Für biophysikalische Untersuchungen von Zelloberflächen werden Verfahren zum Kartieren einzelner aktiver Ionenkanäle in intakten Zellmembranen benötigt. Diese Art der Kartierung ist so wichtig, weil die räumliche Verteilung der Ionenkanäle in der Zellmembran genaue und ortsspezifische Informationen über Zellfunktionen liefern kann. Mittels Nanopipetten kartierten Korchev et al.^[43] die Verteilung von ATP-regulierten K^+ -Kanälen (K_{ATP} -Kanälen) in Herzmyozyten (Abbildung 7c). Die Kanäle waren in kleinen Gruppen organisiert und in den Z-Furchen der Sarcolemma verankert. Das ausgeprägte Muster der Kanalverteilung hat wichtige funktionelle Konsequenzen. Mit diesem Rasterverfahren wurde gezeigt, dass die K_{ATP} -Kanäle ihre Position an der Zelloberfläche über einen vergleichsweise langen Zeitraum behalten. Das Verfahren hat Potenzial für eine ganze Reihe von biophysikalischen Präzisionsuntersuchungen von Zellen.

3.3. Transport auf der Basis von Multiphasensystemen

Bei der Kompartimentalisierung in der Natur, die für biochemische Vorgänge entscheidende Bedeutung hat, sind oft Multiphasensysteme beteiligt.^[44] In Mikrofluidsystemen wurde Kompartimentalisierung über nichtmischbare Flüssigkeiten erzielt, insbesondere in der Mikrofluidik mit geschlossenen Kanälen. An dieser Strategie ist besonders attraktiv, dass nur kostengünstige Materialien und handelsübliche Ausrüstung benötigt werden und dass sie auch für Forscher zugänglich ist, die keine Experten auf dem Gebiet der Mikrofabrikation sind. Eine Übersicht von Baret^[45] behandelt Multiphasensysteme unter Verwendung von Mikrofluidsystemen; die umfassende Übersicht von Hardt und Hahn^[46] über wässrige Zweiphasensysteme ist eine Ergänzung dazu. In diesem Abschnitt behandeln wir Anwendungen in offenen Mikrofluidsystemen, die Multiphasen- und nichtmischbare Systeme einsetzen.

Wichtige Aspekte bei der Verwendung von Multiphasensystemen sind der Stofftransport durch Diffusion und die Auftrennung der Probe in zwei oder mehrere Phasen. Die

Systeme können unter Betrachtung der freien Gibbs-Mischungsenergie (ΔG_{mix}) mit $\Delta G_{\text{mix}} = \Delta H_{\text{mix}} - T\Delta S_{\text{mix}}$ qualitativ verstanden werden, wobei ΔH_{mix} der Enthalpieunterschied und ΔS_{mix} der Entropieunterschied zwischen dem gemischten und dem phasengetreunten Zustand ist. Die Zeitskala der Auftrennung hängt vom Diffusionskoeffizienten ab und kann mehrere Stunden betragen. Bei der Auftrennung in Multiphasensystemen ist die Steuerung der Oberflächenenergie wichtig.

3.3.1. Polymere wässrige Zweiphasensysteme (ATPS)

Takayama und Mitarbeiter leisteten wichtige Beiträge zur Implementierung wässriger Zweiphasensysteme (aqueous two-phase-systems, ATPSs) in der Mikrofluidik. Sie erforschten Polymere wie Polyethylenglycol (PEG) und Dextran in wässrigen Lösungen,^[9] da 1) diese Polymere in einem breiten Temperaturbereich stabile ATPSs bilden, ein Vorteil hinsichtlich der Einfachheit und Stabilität der Experimente; 2) das hohe Molekulargewicht von PEG und Dextran bereits bei niedrigen Polymerkonzentrationen zu ATPSs führt, sodass die beiden Phasen hochgradig wässrig und nichttoxisch für Zellen sind; und 3) dieses System in den gängigen Zell-

kulturbedien robust funktioniert. In Abbildung 8a werden die freien Grenzflächenenergien zwischen den beiden wässrigen Phasen, zwischen der Zellschicht und der PEG-Phase und zwischen der Zellschicht und der Dextranphase durch γ_{12} , γ_{c1} bzw. γ_{c2} dargestellt, während der Kontaktwinkel zwischen den drei Phasen durch θ dargestellt wird.

Das Exponieren ausgewählter Zellen in Kultur gegenüber Reagentien ist beispielsweise bei der Einzelzellen-Transfektion, bei Toxizitätsstudien und für die Erzeugung von Mikrofeldern lebender Zellen von Bedeutung. Tavana et al.^[47] füllten eine Pipettenspitze mit der Dextranphase und senkten sie in die PEG-Phase in die Nähe einer Zellschicht ab. Horizontale Bewegung der Pipettenspitze führte zur Entstehung eines kontinuierlichen Musters der abgegebenen Dextranphase auf den Zellen. Dies wurde durch das Aufbringen des Schriftzugs „UMICH“ auf eine Schicht von HEK293H-Zellen demonstriert (Abbildung 8b). Die Strukturen waren über lange Inkubationszeiten stabil. Für die Stabilität der Muster sind die niedrige Grenzflächenenergie zwischen den beiden nichtmischbaren Phasen und die Rauigkeit der Zelloberfläche und der damit verbundenen Dextranphase an der Zelloberfläche entscheidend. Die Eignung der Strukturierungstechnik wurde anhand von Paralleluntersuchungen der

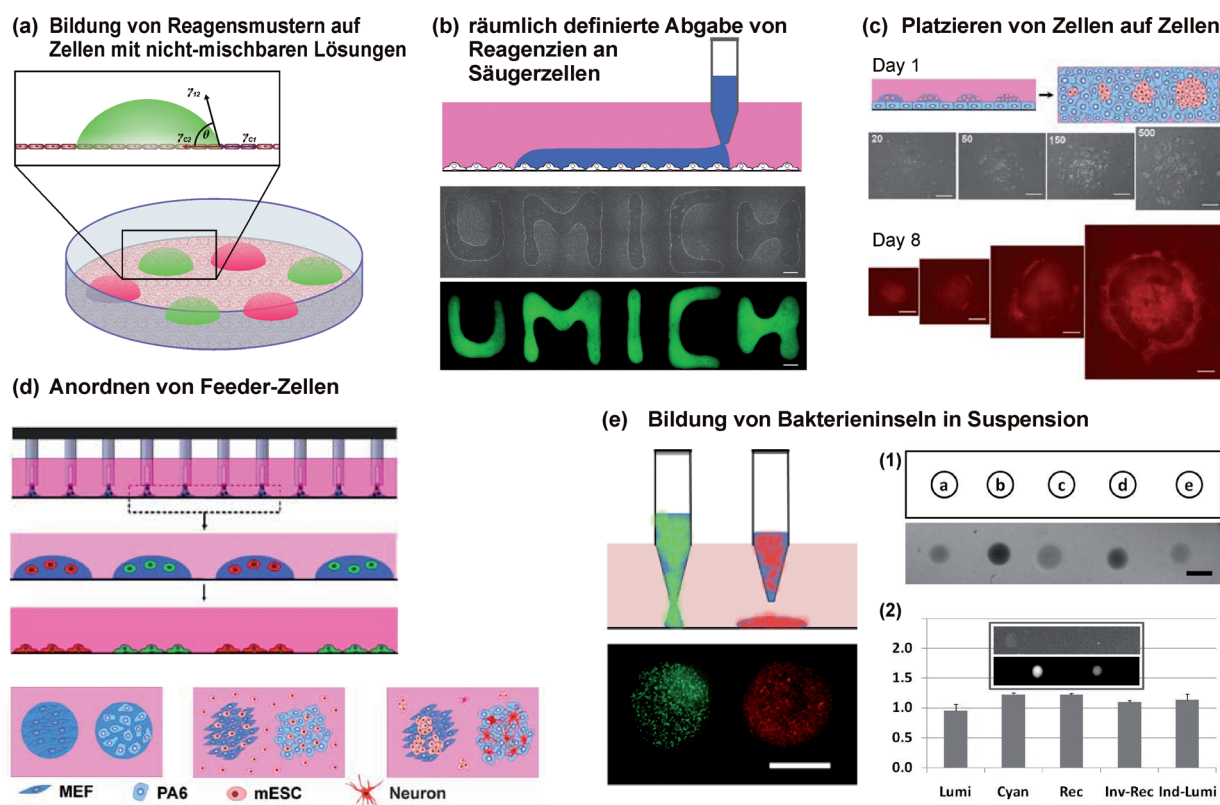


Abbildung 8. Wässrige Multiphasensysteme zum Strukturieren von Reagentien oder Zellen auf Zellen. a) Dextrantröpfchen, die Reagentien, entweder grünen oder roten Farbstoff, in einer PEG-Lösung enthalten, wurden auf lebende Zellen aufgebracht. b) Strukturbildung einer wässrigen Dextranphase (blau) auf einer Zell-Monoschicht, die mit der PEG-Phase bedeckt ist (pink). Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen einer strukturierten Dextranphase auf HEK293H-Zellen, die den Schriftzug „UMICH“ bildet. c) Von der Koloniegröße abhängige neuronale Differenzierung von mESC auf PA6-Trägerzellen. Schema und Hellfeld-/Fluoreszenzaufnahmen von mESC, mit verschiedenen Dichten auf eine PA6-Monoschicht aufgebracht. d) Multiples wässriges Zweiphasendruck von Zellen. e) In Dextran suspendierte Bakterien (cyan oder rot fluoreszierend) in einer mit einer PEG-reichen Phase gefüllten Schale zum Strukturieren bakterieller Suspensionen. Die mikroskopische Aufnahme (1) der Bakteriensuspensionen und das Diagramm (2) zeigen die Veränderung der Lumineszenz der Bakteriensuspension ohne chemische Anregung. Abdruck a) aus Lit. [9]; b) aus Lit. [47], von den Autoren bereitgestellt; c) aus Lit. [48]; d) aus Lit. [49]; e) aus Lit. [53], von den Autoren bereitgestellt.

Genexpression und Genstumschaltung von Zellen demonstriert.

Das Erzeugen heterozellulärer Nischen durch räumliche Platzierung eines Typs von Zellen auf einen anderen Zelltyp wird vermutlich bei vielfältigen biologischen Untersuchungen nützlich sein, einschließlich der Stammzellforschung und der regenerativen Medizin. Zu diesem Zweck verwendeten Tavana et al.^[48] ATPSs zum kontaktfreien Platzieren von Zellen auf Schichten von lebenden Zellen in physiologischer Umgebung. Sie erzeugten zelluläre Nischen, um die neuronale Differenzierung von embryonalen Maus-Stammzellen (mESC) zu unterstützen und zeigten dabei, dass die Dichte der aufgetragenen mESCs ein wichtiger Faktor für die Steuerung der mESC-Differenzierung zu Neuronen ist (Abbildung 8c).

Systeme zur Untersuchung der Rolle von Zell-Zell-Kontakten zwischen verschiedenen Zell-Phänotypen können für diverse Aspekte der Stammzellforschung Bedeutung erlangen. Tavana et al.^[49] platzierten Tröpfchen einer Zellsuspension in der dichteren wässrigen Phase auf ein Substrat innerhalb einer wässrigen Immersionsphase. Aufgrund ihrer Affinität für die dichtere Phase blieben die Zellen in den Tropfen lokalisiert und haften an Bereiche des Substrats unterhalb der Tropfen an. Durch Platzieren von zwei verschiedenen Trägerzelltypen auf eine Geloherfläche wurden zweifach-heterozelluläre Stammzellnischen hergestellt, die mit mESCs überdeckt wurden. Für die Herstellung von systematischen Zellanordnungen wurden die beiden Zelltypen getrennt mit der Dextranphase gemischt und die Suspension in eine 1536-Kammer-Mikrotiterplatte überführt (Abbildung 8d). An einer Haltevorrichtung befestigte Kernnadeln wurden in die Kammern eingetaucht, um die zellenhaltige Dextranphase aufzunehmen. Die Nadeln wurden wieder aus der Quellplatte zurückgezogen und in eine Kulturschale mit PEG eingetaucht. Das wässrige Zweiphasen-Zellkulturmedium ernährte die Zellen während der Inkubation. Nach dem Adhären der Zellen wurden die ATPSs abgewaschen und durch normales Kulturmedium ersetzt. Dieser Vorgang führte zu gleichmäßig großen Inseln von zwei verschiedenen Zelltypen mit definiertem Abstand. Die räumliche Anordnung der platzierten Trägerzellen bestimmte das Schicksal der darüber gelagerten mESCs. Die auf differenzierungsinduzierenden Feeder-Zellen angeordneten mESC-Kolonien zeigten erhöhte neuronale Differenzierung und bildeten dichte neuronale Netzwerke.

Die „Quorum Sensing“ genannte Kommunikation zwischen Zellen ermöglicht Bakterien ihre Umgebung wahrzunehmen.^[50,51] Die Untersuchung des Quorum Sensing im „offenen Raum“ entspricht der Realumgebung von Bakterien. Für die Untersuchung der Funktionen von bakteriellen und anderen Zellpopulationen sind physikalisch getrennte, aber chemisch verbundene Inseln verschiedener Bakterienpopulationen von Interesse.^[52] Die Untersuchung des Quorum Sensing ist schwierig, da sich Bakterien in Suspension gewöhnlich durch Diffusion, Konvektion und die Motilität der Bakterien selbst verteilen und so eine räumliche Fokussierung vermeiden. Yaguchi et al.^[53] entwickelten eine stabile räumliche Strukturierung von sub-mikrolitergroßen Tröpfchen von Bakteriensuspensionen mithilfe von ATPS.

Verschiedene Typen von Bakterienpopulationen wurden einander benachbart angeordnet und ohne Ausbreitung gehalten (Abbildung 8e), sodass hohe Konzentrationen von *E. coli* lokalisiert werden konnten. Bei Anlegen eines chemischen Reizes erzeugte das Tröpfchenfeld ein Muster bakterieller „Illumination“, abhängig vom Typ der stimulierenden Chemikalie. Es wurden Mikrokolonien mit verschiedenen Bakteriendichten erzeugt. Jede Mikrokolonie wurde im Wesentlichen zu einem Biosensor, mit dem, abhängig von dem Typ der suspendierten Bakterien, verschiedene Chemikalien nachgewiesen werden konnten. Wie in Abbildung 8e gezeigt, wurde erwartet, dass die Tröpfchen a) konstitutiv Biolumineszenz exprimieren, b) konstitutiv Cyan-Fluoreszenzprotein exprimieren, c) die Expression von grünem Fluoreszenzprotein in Antwort auf Acylhomoserinlacton erhöhen, d) die Expression von grünem Fluoreszenzprotein in Antwort auf Acylhomoserinlacton verringern und e) die Biolumineszenz in Antwort auf Mutagene erhöhen. Abbildung 8e zeigt die entsprechenden Mikroaufnahmen und Daten des Ansprechverhaltens des bakteriellen Biosensorfelds.

3.3.2. Andere Partitionierungsansätze

Die Diskussion in Abschnitt 3.3.1 verdeutlicht zahlreiche Vorteile von Multiphasensystemen für die Kompartimentalisierung im „offenen Raum“. Ismagilov und Mitarbeiter^[54] entwickelten eine „Chemistode“ genannte Vorrichtung, die Multiphasensysteme mit Rastersonden kombiniert. Diese Mikrofluidvorrichtung verwendet nichtmischbare Flüssigkeiten, um Pfropfen („plugs“) zu erzeugen, die Flüssigkeiten räumlich trennen, und ermöglichte die Anregung, Aufzeichnung und Analyse molekularer Signale mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung. Die Chemistode bringt Flüssigkeiten in kurzzeitigen Kontakt mit einem chemischen oder biologischen Substrat, und molekulare Signale werden ausgetauscht. Dieses Analysewerkzeug könnte zur Untersuchung von Systemen nützlich werden, die molekulare Signale verwenden, beispielsweise chemische Kommunikation zwischen Zellen. Die Chemistode führt dies durch chemische Reize und die Aufzeichnung von kurzen 50-ms-Pulsen aus. Molekulare Signale werden in wässrigen Pfropfen, die von einem Fluorkohlenwasserstoff-Trägerfluid umgeben sind, weitergegeben und erfasst. Die Kompartimentalisierung dieser molekularen Signale verhindert das Ausbreiten von und den Verlust an Probe durch Oberflächenadsorption. Die aufgezeichneten molekularen Signale wurden mit zusätzlichen Reagentien injiziert und offline analysiert. Die kombinierten Analysen lieferten eine „Zeitmarke“ auf der chemischen Aufzeichnung der Antwort eines Systems auf Stimulation. Abbildung 9 zeigt die Messung der Insulinsekretion einer einzelnen murinen Langerhans-Inselzelle mithilfe der Chemistode. Der Betrieb der Chemistode besteht aus folgenden Schritten: 1) Herstellung einer systematischer Anordnung (Feld) von wässrigen Pfropfen, die eine willkürliche Folge von Stimuli enthalten; 2) Übertragen des Felds von Stimulipfropfen auf ein hydrophiles Substrat; 3) Koaleszenz der Stimulipfropfen mit der benetzenden Schicht über dem hydrophilen Substrat, während das Fluorkohlenwasserstoff-

Chemistrode: Kombination aus Multiphasensystem und Rastersonde

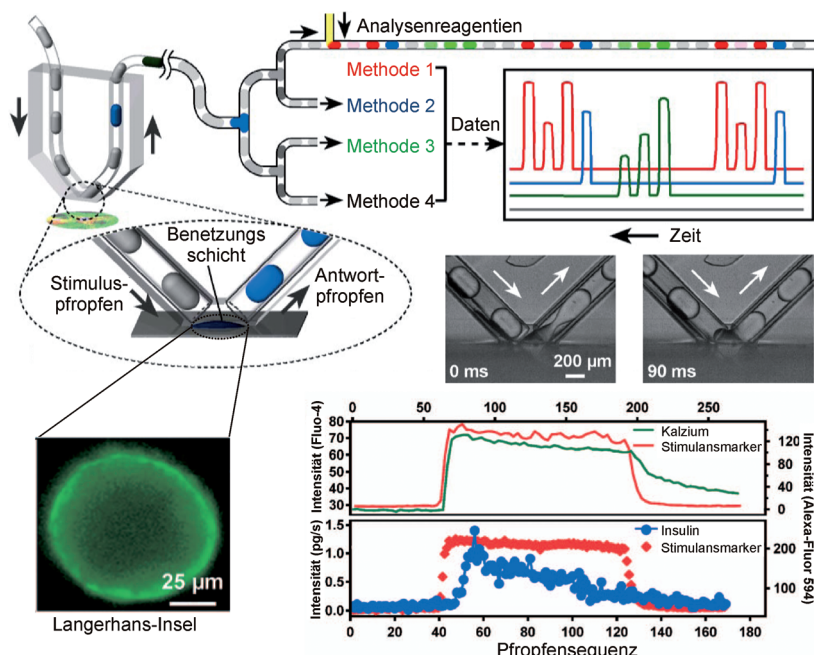


Abbildung 9. Schema einer Chemistrode in Kontakt mit einem hydrophilen Substrat. Es wird gezeigt, wie Proben auf mehrere verschiedene Weisen analysiert werden können. Eine Fluoreszenzaufnahme einer Langerhans-Insel zeigt eine Zunahme der Fluoreszenz, die dem Anstieg des intrazellulären $[Ca^{2+}]$ in der Langerhans-Insel durch Anregung mit der Chemistrode entspricht. Rechts: Hellfeldaufnahmen im Zeitverlauf eines ankommenden Stimuluspfropfens, der mit der Benetzungsschicht verschmilzt. Die Diagramme zeigen die $[Ca^{2+}]$ -Antwort und die Insulinsekretion einer stimulierten Inselzelle. Durch Fluoreszenzmikroskopie während der Stimulation gemessene Spuren und Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität von grünem Farbstoff als Indikator von $[Ca^{2+}]$, und der Intensität von rotem Farbstoff als Marker der stimulierenden Lösung (oben rechts). Spuren mit den Ergebnissen einer Offline-Analyse von während der Aufzeichnung gesammelten Pfpfropfen (unten). Abdruck aus Lit. [54].

Trägerfluid in Kontakt mit der hydrophoben Wand der Chemistrode bleibt; 4) schneller Austausch von diffusionsfähigen Signalen zwischen den Pfpfropfen und der benetzenden Schicht; 5) Abgabe von Antwortpfropfen an einen Verteiler, um identische Tochterfelder zu bilden; 6) Injizieren der Tochterfelder zusammen mit Reagentien, die für die weitere Analyse benötigt werden; 7) Analyse jedes Tochterfelds durch ein anderes Verfahren; und 8) Zusammenführen der Analysedaten der Tochterfelder, um eine zeitaufgelöste Aufzeichnung der molekularen Stimulation und der Antwortdynamik zu erhalten. Dieser Ansatz kann also verwendet werden, um molekulare Signale von mehreren Stellen einer biologischen Grenzfläche mit hoher räumlicher Auflösung zu messen.

3.4. Hydrodynamische Fokussierung von Flüssigkeiten

Die hydrodynamische Fokussierung von Flüssigkeiten ist in Vorrichtungen mit „geschlossenem Kanal“ gut bekannt und wird routinemäßig in Flusszytometern und Coulter-Zählern zum Zählen und zur Größenbestimmung von Zellen und Partikeln verwendet. In diesem Abschnitt behandeln wir

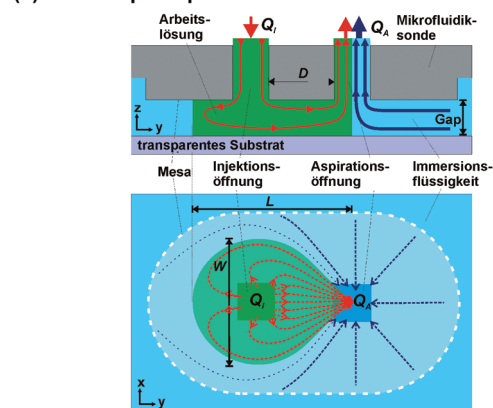
Mikrofluidansätze, die eine hydrodynamische Fokussierung im „offenen Raum“ ermöglichen (Abbildung 10 und 11).

3.4.1. Mikrofluidiksonde (MFP)

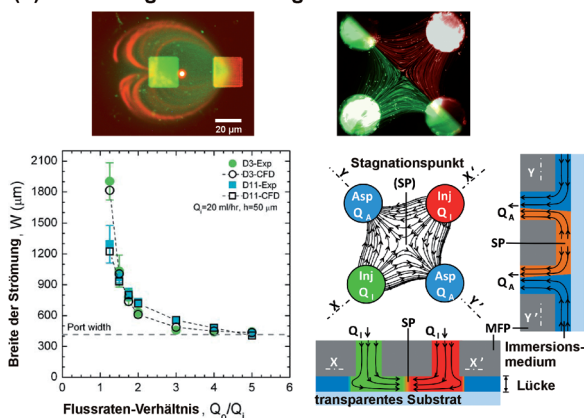
Die Mikrofluidiksonde („microfluidic probe“, MFP) wurde erstmals von der IBM-Arbeitsgruppe in Zürich beschrieben.^[55] Die MFP kombiniert hydrodynamische Fokussierung mit dem Konzept der Rastersonde für die Bearbeitung von Oberflächen. Die Flüssigkeits-Grenzschichten, die durch hydrodynamische Kräfte unterhalb eines MFP-Kopfs gebildet werden, fokussieren die Strömung einer „Arbeitslösung“. Diese Situation wird erreicht, indem die Ansaug-Flussrate (Q_a) der Arbeitslösung größer als die Einspritz-Flussrate (Q_i ; Abbildung 10a) eingestellt wird. Der Grundaufbau des Kopfs zeigt zwei Mikrokanäle zum Einspritzen/Absaugen der Flüssigkeit. Die umgebende, Immersionsflüssigkeit genannte Flüssigkeit, worin der MFP-Kopf eingetaucht ist, verkapselt die Arbeitsflüssigkeit. Somit ersetzt die hydrodynamische Fokussierung die festen Wände geschlossener Mikrokanäle und ermöglicht den Übergang von der geschlossenen Mikrofluidik zur Mikrofluidik im „offenen Raum“. Aufgrund ihrer Mobilität kann die MFP große Flächen durch Rastern interaktiv bearbeiten. Die Flüssigkeitsströmungen in diesem System sind durch kleine Reynoldszahlen (ein Maß des Verhältnisses von Trägheitskräften zu viskosen Kräften für eine gegebene Strömungsbedingung) und eine

hohe Péclet-Zahl (ein Maß für den Konvektions- gegenüber dem Diffusionstransport, das zu bestimmen hilft, ob sich die hydrodynamisch fokussierte Arbeitslösung durch Diffusion aufweiten kann) gekennzeichnet. Daher ist die Diffusion der Arbeitsflüssigkeit in die umgebende Immersionsflüssigkeit minimal, wodurch die lokale Bearbeitung biologischer Grenzflächen im „offenen Raum“ möglich wird. Größe und Form der eingekapselten Flüssigkeit hängen neben der Öffnungsgeometrie und dem Spalt zwischen Sonde und biologischer Oberfläche von Parametern wie Viskosität, Dichte und Grenzflächenspannung zwischen den Flüssigkeiten ab (Abbildung 10b). Bei der MFP kann die abgesaugte Lösung zur weiteren Analyse verwendet werden, ähnlich wie bei den bei der Perfusion und Mikrofluidik eingesetzten Verfahren. Dieses Werkzeug wurde verwendet, um chemische Gradienten auf Oberflächen, mikroskopische Muster von Proteinen, lokalisierte Färbung von Zellen und kontaktloses Ablösen einzelner Zellen zu erzielen (Abbildung 11a). Die MFP-Köpfe wurden aus PDMS hergestellt, um sie für verschiedene Anwendungen schnell umgestalten zu können. Um die Zuverlässigkeit und Ausbeute der Herstellung zu verbessern, entwickelten Lovchik et al.^[56] mehrschichtige MFP-Köpfe unter Verwendung mikrotechnologischer Standard-Herstell-

(a) Arbeitsprinzip einer Mikrofluidiksonde



(b) Strömungsfokussierung



(c) Mikrofluidiksonden-Köpfe

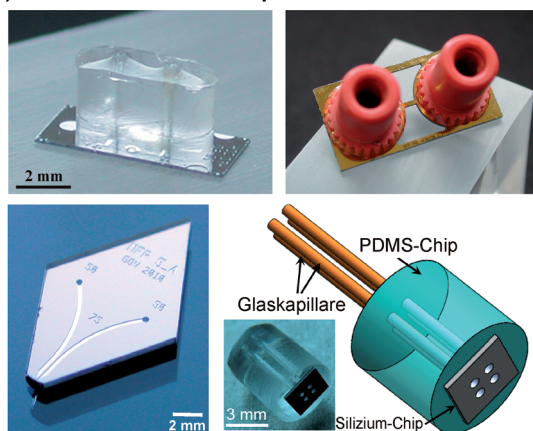
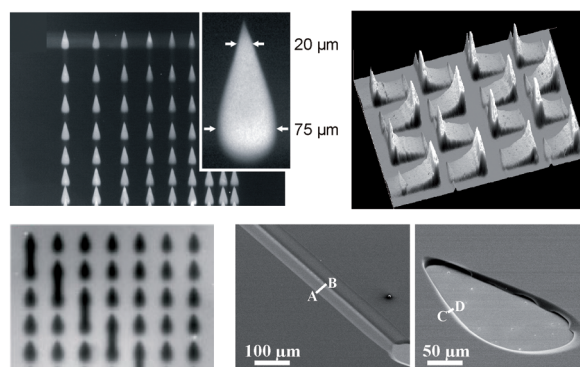


Abbildung 10. Hydrodynamische Fokussierung von Flüssigkeiten zur Durchführung lokaler Chemie an biologischen Grenzflächen. a) Arbeitsprinzip der MFP. b) Mikroaufnahme eines fokussierten Flusses und Diagramm mit der Abhängigkeit der Größe des fokussierten Flusses von den Injektions/Absaug-Flussraten. Es wurden MFPs mit mehreren Öffnungen verwendet, um komplexe Formen von Flussfokussierungen und „fließende“ chemische Gradienten zu erzeugen (rechts). c) Verschiedene MFP-Köpfe. Abdruck von (a) und (b) oben links aus Lit. [55], Copyright 2005 Macmillan Publishers; (b) unten links aus Lit. [62], Copyright 2011 Royal Society of Chemistry; (b) rechts oben und unten sowie (c) unten rechts aus Lit. [61], von den Autoren bereitgestellt; (c) oben aus Lit. [56], Bild von den Autoren bereitgestellt; (c) unten links nach. [58], Copyright 2011 American Chemical Society.

(a) Erzeugen von Muster und Gradienten mit MFPs



(b) Färben von Zellen und Geweben mit MFPs

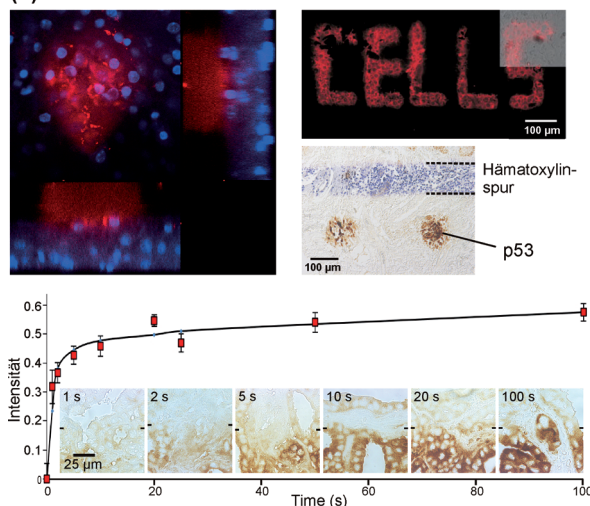


Abbildung 11. Hydrodynamische Fokussierung von Flüssigkeiten zur Durchführung lokaler Chemie an biologischen Oberflächen. a) Lokale Abscheidung von Molekülen mittels MFP (oben links), komplexe Gradienten (oben rechts), Entfernen von Proteinen (unten links) und Strukturieren von Fotolack (unten rechts). b) Färben konfluenter Zellen mit Farbstoffen, lokale Perfusion von Gehirnzellen und lokale Immunhistochemie von Krebsgewebeschnitten. Mehrere Gebiete eines normalen menschlichen Schilddrüsengewebeschnitts wurden mit verschiedenen Aufenthaltsdauern mit α -TGB inkubiert. Das Diagramm zeigt die Färbungsintensitäten für verschiedene Aufenthaltsdauern. Die Markierungen in den Mikrographen zeigen die Grenze zwischen gefärbten (untere Hälfte) und nichtgefärbten (obere Hälfte) Bereichen. Abdruck von (a) oben rechts und unten links sowie (b) oben rechts aus Lit. [55], Copyright 2005 Macmillan Publishers; (a) oben links und unten rechts aus Lit. [56], Bild von den Autoren bereitgestellt; (b) oben links aus Lit. [60], Bild von den Autoren bereitgestellt; Mitte rechts und unten aus Lit. [59], Bild von den Autoren bereitgestellt.

lungsverfahren. Mithilfe dieser mehrschichtigen Köpfe wurden Antikörper auf Oberflächen abgeschieden, und eine Fotolackschicht wurde direkt entwickelt. Anschließend veröffentlichten Perrault et al.^[57] eine Beschreibung einer weitgehend auf diese Instrumentierungsform ausgerichteten MFP-Plattform.

Die IBM-Arbeitsgruppe entwickelte auch eine vertikal ausgerichtete MFP, die vMPF, um die Anwendung der MFP an biologischen Oberflächen zu verbessern.^[58] Die vMPF überwindet Probleme, die die praktische Anwendung der ersten MFP-Technologie beschränkt hatten.^[55] Die Vorrich-

tung besteht aus Glas und Silicium, wobei die Mikrofluidik-Elemente innerhalb der Siliciumschicht hergestellt sind. Der vMFP-Kopf ist vertikal, mit der Spitze parallel zur Oberfläche orientiert. Typischen Spaltbreiten sind 1–30 μm . Hinsichtlich Bauform und Umsetzung wurden mehrere Strategien verfolgt, um eine hohe Ausbeute bei der Herstellung der vMFP-Köpfe zu erzielen. In die vMFP-Köpfe wurden zusätzliche funktionelle Elemente wie Partikelfilter, redundante Öffnungsarchitekturen, geneigte Strömungswege und Mehrfachkanäle für eine symmetrische Fokussierung der Strömung integriert. Ferner wurde ein Verfahren zum Kalibrieren des Abstands zwischen der Spitze des vMFP und der biologischen Grenzfläche eingerichtet. Dieser Ansatz umfasst das visuelle Überwachen der räumlichen Fokussierung einer Lösung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf einer Glasoberfläche, während die Spaltbreite zwischen dem Sondenkopf und der Oberfläche verändert wird. Die Vielseitigkeit der vMFP wurde durch Strukturieren von Proteinen auf Oberflächen, Inaktivieren von Zellen durch Natriumhypochlorit und Färben lebender NIH-Fibroblasten demonstriert.

Kürzlich verwendete die IBM-Arbeitsgruppe die vMFP zum präzisen Anfärben von Gewebeschnitten.^[59] Das Verfahren wurde als „Mikroimmunhistochemie“ (μIHC) bezeichnet. Es umgeht typische Probleme, die in der Pathologie auftreten, wie z. B. kleine Gewebeproben und den Bedarf an qualitativen Färbungsergebnissen. Mithilfe der vMFP wurde die Inkubation primärer Antikörper durchgeführt, ein wichtiger Schritt in der Immunhistochemie. Bei der μIHC werden mittels vMFP Nanoliter primärer Antikörperlösungen über Bereiche von Gewebeschnitten im Mikrometer-Maßstab fokussiert. Das Verfahren war nicht limitiert hinsichtlich Gewebe und Reagentien, verringerte Probleme von Antikörper-Kreuzreaktivität und ermöglichte die Anwendung eines weiten Bereichs von Färbungsbedingungen an einem einzigen Gewebeschnitt. Der vMFP-Kopf war mit (bio)chemischen Systemen verträglich, die zum Färben verwendet werden, beständig gegen verschiedenste Chemikalien und konnte, sofern nicht physikalisch beschädigt, unbegrenzt verwendet werden. Seine Form und seine kleine Spitze ermöglichten die einfache Beobachtung von Gewebeschnitten sowohl von oben als auch von unten unter Verwendung eines umgedrehten Mikroskops. Wie erwartet, wurde eine Korrelation zwischen der Inkubationszeit der primären Antikörper und der Signalintensität beobachtet (Abbildung 11b). Diese Korrelation zeigte, dass spezifische Antigen/Antikörper-Wechselwirkungen in verschiedenen Geweben durch Einstellen der Aufenthaltsdauer des MFP-Kopfs auf dem Gewebeschnitt eingestellt werden können. Für die Inkubation von anti-Thyroglobulin ($\alpha\text{-TGB}$) mit Schilddrüsengewebe wurden die Bedingungen zum Erzielen einer sichtbaren Färbung bestimmt, und es wurde gefunden, dass die erforderliche Inkubationszeit unter den im Experiment verwendeten Bedingungen etwa 20 s beträgt. Diese Inkubationsdauer ist sehr viel kürzer als die 30 min, die für herkömmliche Färbung empfohlen werden, eine Verringerung, die den erhöhten Konvektionsströmen durch die vMFP zugeschrieben wurde. Parallel- μIHC wurde auch an Brustkrebs-Gewebeschnitten und an ausgewählten Kleinstschnitten von Gewebe (Tissue Microarray) durchgeführt.

Mikrofluidik-Ansätze sind zur Kultivierung und Untersuchung einzelner Zellen gut geeignet; das Kultivieren von organisiertem Gewebe, wie z. B. Gehirnschnitten, bleibt in Mikrofluidik-Vorrichtungen aber weiterhin schwierig. Queval et al.^[60] verwendeten die MFP für die lokale Perfusion von Gehirngewebe. Die Perfusion ermöglicht, Teile von Gehirngewebe über ausgedehnte Zeiträume ohne Veränderung der Zellzusammensetzung des Hirngewebes *in vitro* zu halten. Dies ermöglichte die Untersuchung vieler biologischer Vorgänge, die im Verlauf von Tagen bis Wochen im Hirngewebe stattfinden, und erlaubte zugleich die hochauflösende Abbildung mittels konfokaler Mikroskopie. Der Aufbau umfasste eine Perfusionskammer zum Kultivieren organotypischer Schnitte und eine transparente MFP für die Mikroperfusion des Gehirngewebes. Die verwendete MFP war aus PDMS hergestellt und verfügte über sechs Öffnungen, um die Perfusion einer kleinen Zahl von Zellen in einem Gehirn durchzuführen (Abbildung 11b).

Ergänzt man das einzelne Apertur-Paar der MFP durch weitere Öffnungen, so erhöht sich nicht nur die Anzahl der lokalen chemischen Reaktionen, sondern es wird auch die Erzeugung stabiler Gradienten ermöglicht. Qasimeh et al.^[61] entwickelten einen derartigen zweidimensionalen Mikrofluid-Quadrupol (MQ) mit vier Öffnungen und erzeugten damit lokal fließende chemische Gradienten. Der MQ wurde durch gleichzeitiges Einspritzen und Absaugen von Fluiden mit zwei Paaren von gegenüberliegenden Öffnungen in einem schmalen Spalt zwischen der Mikrofluidik-Sonde und einem Substrat gebildet (Abbildung 10c). Aufgrund der mehrfachen Strömungsfokussierung bildet sich wie erwartet ein Ruhepunkt mit einer hydrodynamisch eingestellten Position in der Mitte des Mikrofluid-Quadrupols. Die Strömungsgradienten ermöglichen die räumlich-zeitliche Einstellung des Gradienten, entweder hydrodynamisch durch Einstellen der Strömungsgeschwindigkeiten oder physikalisch durch Bewegen der MFP. MQs könnten an verschiedenen biologischen Oberflächen anwendbar sein.

Mehrere Anwendungen von MFPs wurden bereits demonstriert, ihr Aufbau und Betrieb war aber hauptsächlich von empirischer Optimierung geleitet. Qasimeh et al.^[61] beschrieben einen theoretischen Rahmen für Mikrofluid-Quadrupole unter Verwendung von MFPs. Christ und Turner^[62] lieferten wichtige Einblicke in die zugrundeliegende Fluidmechanik, indem sie eine umfassende Studie zu den Beziehungen zwischen der Geometrie der Vorrichtung, den Einlass- und Auslass-Strömungsgeschwindigkeiten und der Fluidphysik durchführten. Sie untersuchten den Einfluss multipler Strömungen und der Geometrie der Aperturen auf die Größe und Form der umhüllten Strömung und den Druckabfall zwischen den Aperturen bei Zweiapertur-Vorrichtungen. Auf der Grundlage dreidimensionaler Fluidynamik-Rechnungen und experimenteller Messungen für mehrere Geometrien der Vorrichtungen mit mehreren Spaltbreiten, Strömungsgeschwindigkeiten und Strömungsgeschwindigkeitsverhältnissen wurden entsprechende Trends beschrieben. Die analytischen Ergebnisse und Simulationsergebnisse bieten ein elegantes Gerüst zum Verständnis der Fluidmechanik von MFPs, das beim Entwurf zukünftiger MFPs hilfreich sein wird.

3.4.2. Doppel- und Multikapillarsonden

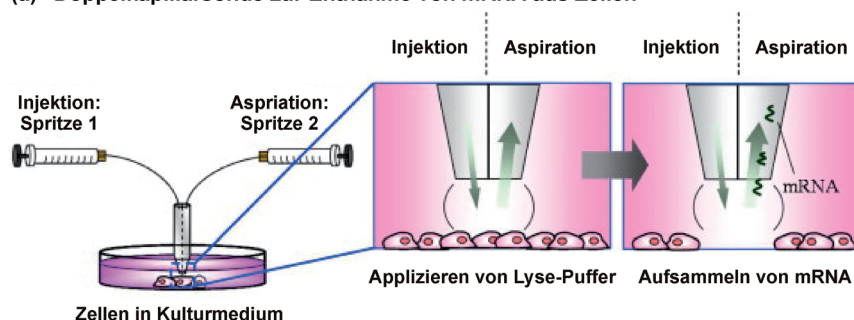
Die hydrodynamische Fokussierung von Flüssigkeiten im „offenen Raum“ wurde auch unter Verwendung von Doppel- oder Mehrfachkapillaren durchgeführt. In diesem Abschnitt werden einige interessante Ergebnisse hierzu beschrieben.

Die Entnahme von Bioanalyten aus ausgewählten Zellen in Kultur ist allgemein schwierig. Shiku et al.^[63] verwendeten eine Doppelkapillarsonde für die mRNA-Analyse ausge-

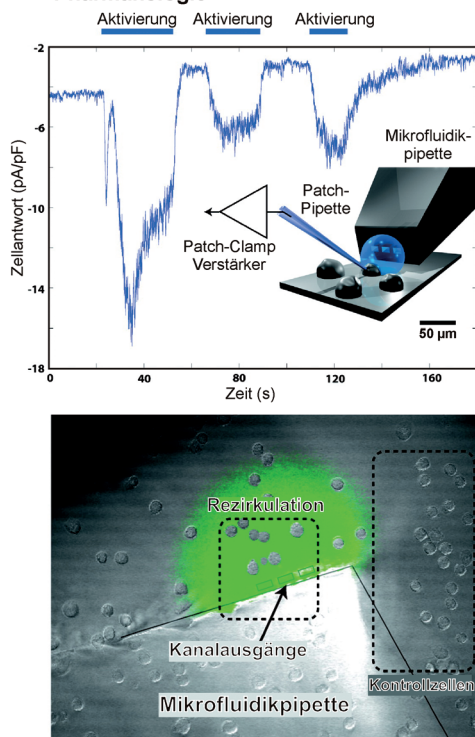
wählter adhärenter Zellen. Die Sonde enthielt Theta-förmige Glaskapillaren. Eine Zellyse-Pufferlösung wurde durch eine Injektionsöffnung eingeführt, ohne Zellen in der Umgebung zu stören, und das Zellysate wurde durch die Absaugöffnung zur Analyse entnommen (Abbildung 12a). Es wurden menschliche Brustkrebszellen NCF-7 und maligne menschliche Mammaepithelzellen HMT-3522 T4-2 verwendet. Die Effizienz der mRNA-Aufsammlung wurde mittels Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (PCR) ausgewertet.

Elektrophysiologische Messungen der Ionenkanalaktivität einzelner Zellen ist äußerst wichtig für das Verständnis der Zellfunktion. Ainla et al.^[64] entwickelten eine Vorrichtung mit einer Mikrofluidik-Pipette aus PDMS mit einer Spitze, in der zirkulierende Flüssigkeiten ein selbstfokussierendes Volumen vor den Auslasskanälen erzeugten (Abbildung 12b). Eine ausgefeilte Form dieser Vorrichtung mit mehrfachen Flüssigkeitsströmen und schnellem Umschalten zwischen Lösungen wurde in Folgestudien ebenfalls beschrieben.^[65] Die Vorrichtung verwendete Strömungszirkulation von Flüssigkeiten, um Kontaminationen im „offenen Raum“ zu vermeiden, und ermöglichte die räumliche Konzentrationssteuerung von Chemikalien, die auf ausgewählte Objekte an der Oberfläche aufgebracht wurden. Die durch das rezirkulierende Fluid bestimmten Abmessungen der Spitze betrugen weniger als 10 μm , um einzelne Zellen ansprechen zu können. Unter Verwendung dieses Aufnahmeassays wurden in situ Dosis-Antwort-Kurven von adhärenter Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, die protonenaktivierte hTRPV1-Rezeptoren exprimierten, bestimmt. Mit fokussierter Superfusion und Zellstimulation wurden hTRPV1-Rezeptoren in einzelnen Zellen aktiviert, und die Antwort wurde mithilfe einer Patch-Clamp-Pipette gemessen (Abbildung 12b). Eine weitere Implementierung eines Systems mit Doppelpipette wurde von Feinerman und Moses^[66] für die lokale und gesteuerte Wirkstoffinfusion entwickelt. Dieses System bestand aus zwei konzentrischen Pipetten, von denen jede getrennt manipuliert und angesteuert werden konnte. Die innere Pipette war mit der gewünschten Lösung gefüllt und diente als Quelle, während die äußere eine Senke war. Dies ermöglichte eine Strömung der Lösung zwischen den beiden Pipetten, die nur eine kleine Strecke in das umgebende Fluid ragte.

(a) Doppelkapillarsonde zur Entnahme von mRNA aus Zellen



(b) Mikrofluidikpipette für Einzel-Zell-Pharmakologie



(c) Mikrospotter zum Anordnen von fluiden Lipid-Doppelschichten

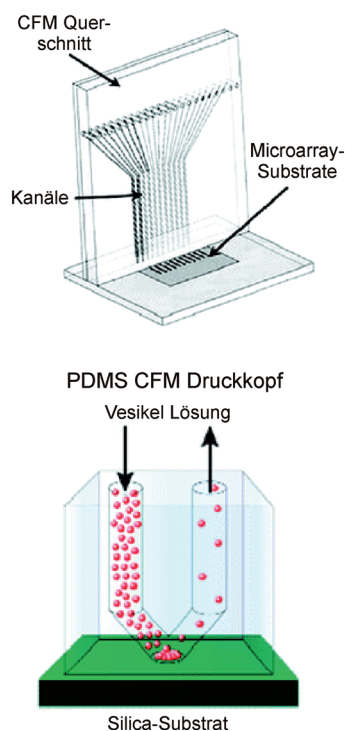


Abbildung 12. Doppel-/Multikapillarpipetten für die Lokalisierung von Flüssigkeiten. a) Theta-förmige Mikrofluidik-Doppelkapillarsonde zum Lysieren ausgewählter Zellen und Entnehmen von Zellysate. b) Einzelzellen-Patch-Clamp-Implementierung eines Fluoreszenz-Aufnahmeassays. Das Diagramm zeigt die Stromantwort gegen die Zeit bei wiederholter Aktivierung ausgewählter Ionenkanäle in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters. Die Flüssigkeits-Rezirkulation exponiert selektiv einzelne Zellen gegenüber einer Membranblebbinglösung (unten). c) CFM-Vorrichtung und Detaildarstellung des Abgabekopfs in Kontakt mit einem Substrat bei der Doppelschicht-Herstellung. Abdruck aus: (a) Lit. [63], Copyright 2009 Elsevier; (b) Lit. [64], Copyright 2010 American Chemical Society; (c) Abdruck aus Lit. [68], Copyright 2008 American Chemical Society.

Die Zeitauflösung der Infusion war sehr gut steuerbar, wunschweise konnten sogar oszillierende Strömungen erzeugt werden. Dies war für bestimmte Anwendungen der Arzneimitteldosierung von Nutzen. Eine ähnliche PDMS-MFP wurde kürzlich von Han und Mitarbeitern^[67] verwendet, um die Zellkinase-Aktivität in adhärenen Zellen zu messen.

Ein weiterer Ansatz lokaler Chemie wurde von Smith et al.^[68] beschrieben, die ein dreidimensionales Mikrofluidsystem verwendeten, um mikrostrukturierte Lipiddoppelschicht-Felder zur Untersuchung von Protein-Ligand- und Protein-Membran-Wechselwirkungen in Zellmembranen zu erzeugen. Mikrostrukturierte Lipiddoppelschicht-Felder werden für biophysikalische Untersuchungen und Sensoren verwendet.^[69] Die Vorrichtung konnte Merkmale von Zellmembranen wie Fluidität und Biokompatibilität aufrechterhalten. Ein Feld von fluiden Lipidmembranen wurde unter Verwendung eines Mikropotters mit kontinuierlichem Fluss (CFM; Abbildung 12c) auf Glassubstrate aufgebracht. Die Entstehung einer Doppelschicht auf dem Glassubstrat wurde mit Fluoreszenzmikroskopie bestätigt. Die Erholung der Fluoreszenz nach Fotobleichungs-Experimenten belegte die Fluidität der Doppelschichten. Die flexible Beschaffenheit der mikrostrukturierten Lipiddoppelschicht-Felder wurde durch verschiedene fluoreszenzmarkierte Lipide belegt, die ein Multikomponenten-Lipidfeld bildeten. Verwandte Verfahren, wie z.B. Mikrokontaktdrucken, wurden verwendet, um Lipiddoppelschichten für membranbiophysikalische Untersuchungen, Hochdurchsatz-Screenings und die Sondierung lebender Zellen mit synthetischen Membranwechselwirkungen zu erzeugen.^[70]

Eine Variante der MFP/Doppelpipette wurde von Routenberg und Reed^[71] entwickelt und für die lokale Manipulation von Halbleiterwafern verwendet. Die Vorrichtung wurde von den Autoren ebenfalls als Mikrofluidsonde bezeichnet, es gibt aber einen grundlegenden Unterschied zur ursprünglich entwickelten MFP.^[55] Die MFP nach Routenberg und Reed^[71] arbeitet in einem „Kontaktmodus“, d. h., sie bildet kurzzeitig einen Fluidpfad, wenn die Sonde in Kontakt mit der Oberfläche steht. Die Sonde wird auf eine analoge Weise wie eine elektrische Nadelsonde verwendet, bei der eine Mikropositionierungsvorrichtung dazu dient, die Sonde in mechanischen Kontakt mit dem Wafer zu bringen, um einen geschlossenen Kanal zu bilden. Fluide treten durch Schläuche an der Oberseite der Sonde ein und aus. Da keine Notwendigkeit besteht, die Sondenspitze permanent an den Wafer zu binden oder sich auf Selbstadhäsion zu verlassen, muss die Kontaktfläche nur geringfügig größer sein als der gewünschte Fluidkanal. Diese Vorrichtung wurde für Nano-raht-basierte Feldeffekttransistormessungen verwendet.

Es gibt mehrere Wege zur Herstellung von MFPs und Kapillarsonden, die von der Verwendung von Polymeren bis hin zu herkömmlicher Mikrotechnologie reichen. Kürzlich entwickelten Corgier und Juncker^[72] einen einfachen Ansatz zur Herstellung einer solchen Vorrichtung in Form einer polymeren, mikrotechnologisch hergestellten elektrochemischen Nanosonde (MEN) mit nanometergroßen Elektroden. Die Sonde und die Elektroden wurden durch Einbetten nanometerdicker Metallleitungen zwischen Schichten UV-härtbarer Haftpolymere hergestellt, anschließend wurden die

MENs getrennt und abgelöst. Mit den MENs könnten hydrodynamisch fokussierte Flüssigkeiten für die Wechselwirkung mit biologischen Oberflächen hergestellt werden.

4. Ausblick

Es gibt überraschend vielfältige Anwendungen, die eine lokale Manipulation biologischer Grenz-/Oberflächen erfordern, und ein Überblick über die Literatur zur Mikrofluidik mit Schwerpunkt auf lokaler (Bio)chemie an biologischen Oberflächen ist also zeitgerecht. Unser Kurzaufsatz behandelt die Grundlagen dieser Thematik und führt mehrere dafür relevante Vorrichtungen und Verfahren auf. Es gibt viele Varianten der Implementierung solcher Vorrichtungen für die Mikrofluidik im „offenen Raum“, und mehrere bahnbrechende Arbeiten wurden bereits beschrieben.

Wir erwarten, dass die Kombination verschiedener Analyseverfahren für biologische Oberflächen mit der Mikrofluidik im offenen Raum diverse Vorteile mit sich bringt und z. B. in der Pharmazie, der Biotechnologie und der Diagnostik Anwendung finden wird. Analyseverfahren, die bereits an biologischen Oberflächen angewendet werden, sind die lokale Oberflächenplasmonenresonanz zum Nachweis molekularer Bindungsvorgänge und von Veränderungen der Molekülkonformation,^[73] die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie zum Nachweis biomolekularer Wechselwirkungen in Echtzeit^[74] und die Sekundärionen-Massenspektrometrie und laserinduzierte Abbauspektroskopie für die lokale Material- und Gewebeanalyse.

In einer Welt, in der den Biowissenschaften und der medizinischen Forschung die Handhabung von Flüssigkeiten inhärent ist, sollten Mikrofluidik-Technologien zur Steuerung der Abgabe und Handhabung von Flüssigkeiten über mehrere Größenordnungen an Volumen (Mikro- bis Femtoliter) und mit mikrometeregenauer Positionierung allgegenwärtig werden. Es ist nur eine Frage der Zeit, bis dies geschieht. Wir sind überzeugt, dass Verfahren, die zur Manipulation und Analyse biologischer Oberflächen unter physiologischen Bedingungen fähig sind, enorme Auswirkungen auf den Gebieten der Oberflächenchemie, Biophysik, Diagnostik, Medizin und Biologie haben werden.

Wir danken M. Hitzbleck für Diskussionen und V. Vogel (ETH Zürich), M. Despont und W. Riess für ihre anhaltende Unterstützung. Wir danken D. Juncker, M. Qasaimeh, S. Takayama und D. Klennerman für die Bereitstellung von Teilen der Abbildungen.

Eingegangen am 6. März 2012

Übersetzt von Dr. Thomas Steiner, Neu-Ulm

- [1] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. von Stetten, R. Zengerle, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1153–1182.
- [2] P. S. Dittrich, A. Manz, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, 5, 210–218.
- [3] B. G. Chung, K.-H. Lee, A. Khademhosseini, S.-H. Lee, *Lab Chip* **2012**, 12, 45–59.

- [4] D. B. Weibel, W. R. DiLuzio, G. M. Whitesides, *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 209–218.
- [5] A. C. von Philippsborn, S. Lang, A. Bernard, J. Loeschinger, C. David, D. Lehnert, M. Bastmeyer, F. Bonhoeffer, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1322–1328.
- [6] G. M. Whitesides, J. Deutch, *Nature* **2011**, *469*, 21–22.
- [7] T. M. Squires, R. J. Messinger, S. R. Manalis, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 417–426.
- [8] J. S. Kuo, D. T. Chiu, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2011**, *4*, 275–296.
- [9] K. E. Healy, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 700–702.
- [10] B. Sakmann, E. Neher, *Annu. Rev. Physiol.* **1984**, *46*, 455–472.
- [11] L. Gervais, N. de Rooij, E. Delamarche, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, H151–H176.
- [12] C. E. Sims, N. L. Allbritton, *Lab Chip* **2007**, *7*, 423–440.
- [13] J. El-Ali, P. K. Sorger, K. F. Jensen, *Nature* **2006**, *442*, 403–411.
- [14] M. L. Kovarik, P. C. Gach, D. M. Orloff, Y. Wang, J. Balowski, L. Farrag, N. L. Allbritton, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 516–540.
- [15] A. Kumar, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1994**, *10*, 1498–1511.
- [16] A. Bernard, J. P. Renault, B. Michel, H. R. Bosshard, E. Delamarche, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1067–1070.
- [17] D. A. Hall, J. Ptacek, M. Snyder, *Mech. Ageing Dev.* **2007**, *128*, 161–167.
- [18] D. Weinrich, P. Jonkheijm, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7744–7751.
- [19] C. J. Bettinger, R. Langer, J. T. Borenstein, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5406–5415.
- [20] A. B. Theberge, F. Courtois, Y. Schaerli, M. Fischlechner, C. Abell, F. Hollfelder, W. T. S. Huck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5846–5868.
- [21] F. Mugele, J.-C. Baret, *J. Phys. Condens. Matter* **2005**, *17*, R705–R774.
- [22] M. Abdelgawad, A. R. Wheeler, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 920–925.
- [23] M. T. Guo, A. Rotem, J. A. Heyman, D. A. Weitz, *Lab Chip* **2012**, DOI: 10.1039/C2LC21147E.
- [24] M. S. Kim, T. Kim, S.-Y. Kong, S. Kwon, C. Y. Bae, J. Choi, C. H. Kim, E. S. Lee, J.-K. Park, *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10441.
- [25] M. J. Søe, F. Okkels, D. Sabourin, M. Alberti, K. Holmstrøm, M. Dufva, *Lab Chip* **2011**, *11*, 3896–3907.
- [26] S. Takayama, E. Ostuni, P. LeDuc, K. Naruse, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *Nature* **2001**, *411*, 1016.
- [27] C.-H. Hsu, C. Chen, A. Folch, *Lab Chip* **2004**, *4*, 420–424.
- [28] G. Binnig, H. Rohrer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 606–614.
- [29] R. D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong, C. A. Mirkin, *Science* **1999**, *283*, 661–663.
- [30] D. S. Ginger, H. Zhang, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 30–45.
- [31] K. Kim, N. Moldovan, H. D. Espinosa, *Small* **2005**, *1*, 632–635.
- [32] A. Meister, M. Gabi, P. Behr, P. Studer, J. Vörös, P. Niedermann, J. Bitterli, J. Polesel-Maris, M. Liley, H. Heinzelmann, et al., *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2501–2507.
- [33] K. H. Kim, R. G. Sanedrin, A. M. Ho, S. W. Lee, N. Moldovan, C. A. Mirkin, H. D. Espinosa, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 330–334.
- [34] A. Schulte, W. Schuhmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8760–8777.
- [35] D. Momotenko, F. Cortes-Salazar, A. Lesch, G. Wittstock, H. H. Girault, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 5275–5282.
- [36] E. Descamps, T. Leichlé, B. Corso, S. Laurent, P. Mailley, L. Nicu, T. Livache, C. Bergaud, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1816–1821.
- [37] L. Ying, *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 702–706.
- [38] A. Bruckbauer, L. Ying, A. M. Rothery, D. Zhou, A. I. Shevchuk, C. Abell, Y. E. Korchev, D. Klenerman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8810–8811.
- [39] A. Bruckbauer, P. James, D. Zhou, J. W. Yoon, D. Excell, Y. Korchev, R. Jones, D. Klenerman, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 3120–3131.
- [40] O. P. Hamill, *Pfluegers Arch.* **2006**, *453*, 333–351.
- [41] A. I. Shevchuk, J. Gorelik, S. E. Harding, M. J. Lab, D. Klenerman, Y. E. Korchev, *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1759–1764.
- [42] P. Novak, C. Li, A. I. Shevchuk, R. Stepanyan, M. Caldwell, S. Hughes, T. G. Smart, J. Gorelik, V. P. Ostanin, M. J. Lab, et al., *Nat. Meth.* **2009**, *6*, 279–281.
- [43] Y. E. Korchev, Y. A. Negulyaev, C. R. W. Edwards, I. Vodyanov, M. J. Lab, *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 616–619.
- [44] R. B. Gennis, *Biomembranes. Molecular Structure and Function*, Springer, New York, **1989**.
- [45] J.-C. Baret, *Lab Chip* **2012**, *12*, 422–433.
- [46] S. Hardt, T. Hahn, *Lab Chip* **2012**, *12*, 434–442.
- [47] H. Tavana, A. Jovic, B. Mosadegh, Q. Y. Lee, X. Liu, K. E. Luker, G. D. Luker, S. J. Weiss, S. Takayama, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 736–741.
- [48] H. Tavana, B. Mosadegh, S. Takayama, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 2628–2631.
- [49] H. Tavana, B. Mosadegh, P. Zamankhan, J. B. Grothberg, S. Takayama, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 2509–2516.
- [50] M. E. Taga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 14549–14554.
- [51] P. D. Straight, R. Kolter, *Annu. Rev. Microbiol.* **2009**, *63*, 99–118.
- [52] C. M. Waters, B. L. Bassler, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, *21*, 319–346.
- [53] T. Yaguchi, S. Lee, W. S. Choi, D. Kim, T. Kim, R. J. Mitchell, S. Takayama, *Analyst* **2010**, *135*, 2848–2852.
- [54] D. Chen, W. Du, Y. Liu, W. Liu, A. Kuznetsov, F. E. Mendez, L. H. Philipson, R. F. Ismagilov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 16843–16848.
- [55] D. Juncker, H. Schmid, E. Delamarche, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 622–628.
- [56] R. D. Lovchik, U. Drechsler, E. Delamarche, *J. Micromech. Microeng.* **2009**, *19*, 115006.
- [57] C. M. Perrault, M. A. Qasaimeh, T. Brastaviceanu, K. Anderson, Y. Kabakibo, D. Juncker, *Rev. Sci. Instrum.* **2010**, *81*, 115107.
- [58] G. V. Kaigala, R. D. Lovchik, U. Drechsler, E. Delamarche, *Langmuir* **2011**, *27*, 5686–5693.
- [59] R. D. Lovchik, G. V. Kaigala, M. Georgiadis, E. Delamarche, *Lab Chip* **2012**, DOI: 10.1039/C2LC21016A.
- [60] A. Queval, N. R. Ghattamaneni, C. M. Perrault, R. Gill, M. Mirzaei, R. A. McKinney, D. Juncker, *Lab Chip* **2010**, *10*, 326–334.
- [61] M. A. Qasaimeh, T. Gervais, D. Juncker, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 464.
- [62] K. V. Christ, K. T. Turner, *Lab Chip* **2011**, *11*, 1491–1501.
- [63] H. Shiku, T. Yamakawa, Y. Nashimoto, Y. Takahashi, Y.-S. Torisawa, T. Yasukawa, T. Ito-Sasaki, M. Yokoo, H. Abe, H. Kambara, et al., *Anal. Biochem.* **2009**, *385*, 138–142.
- [64] A. Ainla, E. T. Jansson, N. Stepanyants, O. Orwar, A. Jesorka, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 4529–4536.
- [65] A. Ainla, G. D. M. Jeffries, R. Brune, O. Orwar, A. Jesorka, *Lab Chip* **2012**, DOI: 10.1039/C2LC20906C.
- [66] O. Feinerman, E. Moses, *J. Neurosci. Methods* **2003**, *127*, 75–84.
- [67] A. Sarkar, S. Kolitz, L. Cheow, D. Lauffenburger, J. Han, *Proc. 15th Inter. Conf. Minat. Syst. Chem. Life Sci.* **2000**, *2*, 1394–1396.
- [68] K. A. Smith, B. K. Gale, J. C. Conboy, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7980–7987.
- [69] E. T. Castellana, P. S. Cremer, *ChemInform* **2007**, *38*, 429–444.
- [70] J. S. Hovis, S. G. Boxer, *Langmuir* **2001**, *17*, 3400–3405.
- [71] D. A. Routenberg, M. A. Reed, *Lab Chip* **2010**, *10*, 123–127.
- [72] B. P. Corgier, D. Juncker, *Sens. Actuators B* **2011**, *157*, 691–696.
- [73] J. N. Anker, W. P. Hall, O. Lyandres, N. C. Shah, J. Zhao, R. P. V. Dwyne, *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 442–453.
- [74] S. Hudson, G. Chumanov, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 679–686.