

# GeSiM 1995-2015

Bioinstrumente und Mikrofluidik

## Abstracts



GESIM

## 29. September 2015

- 8:30 Anmeldung
- 9.00 Begrüßung  
Die fünf Plattformen der GeSiM mbH  
*Steffen Howitz, Großberkmannsdorf*
- 9:30 3D-Plotten – eine geeignete additive Fertigungstechnik für die Herstellung komplexer Biomaterial-Scaffolds und von Tissue-Engineering-Konstrukten  
*Michael Gelinsky, TU Dresden*
- 9.55 Integration von Automatisierungshardware in zellbiologischen Workflows im Kontext der regenerativen Medizin  
*Michael Gepp, Fraunhofer IBMT, Sankt Ingbert*
- 10.20 Additive Fertigung von bioartifiziellen Geweben  
*Annika Wenz, Universität Stuttgart*
- 10.45 Kaffeepause
- 11.15 Additive Fertigung hochleistungskeramischer Komponenten – von gezielt porös bis multifunktionell  
*Tassilo Moritz, Fraunhofer IKTS, Dresden*
- 11.40 Direkte Druckmethoden für metallische und metalloxidische Nano- und Mikrostrukturen aus anorganischen Vorläuferverbindungen  
*Julia Grothe, TU Dresden*
- 12.05 Automated Radiosynthesizers: Technologies, Customers Needs and Market Opportunities  
*Fedor Zhuravlev, Hevesy Laboratory, Technical University of Denmark, Roskilde (Dänemark)*
- 12.30 Imbiss, Demonstration von GeSiM-Geräten
- 13.40 Werkzeuge zur Bewältigung technologischer Herausforderungen bei der Nutzung von zellbasierten Verfahren in der Biomedizin  
*Claus Duschl, Fraunhofer IZI-BB, Potsdam*
- 14.05 Mikrofluidisches System für die Magnet-basierte Separation immunologisch relevanter Zellen aus Blut  
*Gunter Gastrock, Institut für Bioprozess- und Analysen-messtechnik e.V., Heilbad Heiligenstadt*
- 14.30 Der Optische Strecker – Zellen stressen im Laserlicht  
*Christoph Faigle, TU Dresden*
- 14.55 Kaffeepause
- 15.25 Synthese und Anwendung von Sensorpartikeln in der Mikrofluidik  
*J. Michael Köhler, TU Ilmenau*
- 15.50 Der Multi-Organ-Chip als erfolgreiche Anwendung der MicCell-Plattform  
*Frank Sonntag, Fraunhofer IWS, Dresden*
- 16.15 Schnelle Sepsisdetektion mit Hilfe eines mikrofluidischen Sorters  
*Harald Mathis, Fraunhofer FIT, Sankt Augustin*
- 17.00 Stadtbesichtigung Dresden, anschließend Abendessen im historischen „Fischhaus“

## 30. September 2015

- 9.00 Verarbeitung von vitalen dentalen Stammzellen mittels Drop-on-Demand-Technologie  
*Robert Mau, Universität Rostock*
- 9.25 Zell-instruktive starPEG-Heparin-Hydrogel-Arrays  
*Uwe Freudenberg, Leibniz Institute of Polymer Research Dresden, Max Bergmann Center of Biomaterials*
- 9.50 Parallele On-Chip-Synthese und -Analyse von Peptiden mit GeSiM Nano-Plotter und MicCell  
*Niels Rückendorf, Forschungszentrum Borstel*
- 10.15 Integration of Reagents in Microfluidics Using Inkjet Spotting for Diagnostic Applications  
*Onur Gökce, IBM Research GmbH, Rüschlikon (Schweiz)*
- 10.40 Kaffeepause
- 11.10 Nano-Plotter zur DNA-Chip-Herstellung mit streifenförmigen Sondenorten  
*Alfred Kick, Kurt-Schwabe-Institut e. V. Meinsberg, Waldheim*
- 11.35 Die Zeptosens-Reverse-Phase-Protein-Array-Plattform  
*Daniel Guthy, Novartis Institutes for Biomedical Research, Basel (Schweiz)*
- 12.00 Microarrays: Neue Methoden und Anwendungen  
*Rebecca Bongartz und Johanna-Gabriela Walter, Leibniz Universität Hannover*
- 12.25 Zufrieden mit der Oberfläche?  
*Fridtjof Lechhart, PolyAn GmbH, Berlin*
- 12.50 Nachweis von Hepatitis-C-Virus in Serumproben mittels „Single Electrode Redox Cycling“ auf Goldelektroden-Arrays  
*Eric Nebling, Fraunhofer ISIT, Itzehoe*
- 13.15 Imbiss, Veranstaltungsende

Programmänderungen vorbehalten

## **3D-Plotten – eine geeignete additive Fertigungstechnik für die Herstellung komplexer Biomaterial-Scaffolds und von Tissue Engineering-Konstrukten**

Michael Gelinsky<sup>1</sup>, A. Rahul Akkineni<sup>1</sup>, Yongxiang Luo<sup>1</sup>, Kathleen Schütz<sup>1</sup>,  
Sophie Brüggemeier<sup>1</sup>, Tilman Ahlfeld<sup>1</sup>, Felix Krujatz<sup>2</sup>, Anja Lode<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung, Medizinische Fakultät der TU Dresden und Universitätsklinikum Dresden, Fetscherstr. 74, 01307 Dresden

<sup>2</sup>Institut für Bioverfahrenstechnik, TU Dresden, Postfach, 01062 Dresden

Kontakt: Prof. Dr. Michael Gelinsky, michael.gelinsky@tu-dresden.de; tu-dresden.de/med/tfo

Die Anwendung von Verfahren der additiven Fertigung (engl. *additive manufacturing*) in der Biomedizin erlebt aktuell eine rasante Entwicklung. Besonders geeignet erscheinen Extrusions-basierte Methoden wie das 3D-Plotten zu sein, da mit diesen viele verschiedene (Bio-)Materialien verarbeitet werden können, keine hohen Temperaturen bzw. ein hoher Energieeintrag (wie beispielsweise beim selektiven Lasersintern) notwendig sind und sich die Verfahren leicht unter sterilen Bedingungen durchführen lassen – eine Grundvoraussetzung dafür, auch lebende Zellen mit in den Druckvorgang integrieren zu können („Bioprinting“).

Am Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung der TU Dresden wurden in den letzten Jahren unter Verwendung von BioScaffoldern der Firma GeSiM mbH viele verschiedene, bei Raumtemperatur pastöse Biomaterialien erfolgreich zu 3D-Scaffolds verarbeitet. Erstmals konnte beispielsweise demonstriert werden, dass sich durch Verplotten eines neuartigen mineralischen Knochenzementes reine Calciumphosphat-Strukturen mit vorgegebener Porosität erzeugen lassen, die nicht durch einen Sinterprozess stabilisiert werden müssen. In einer anderen Arbeit wurden zweischichtige Strukturen aus Calciumphosphat-Zement und einem Biopolymer-Hydrogel hergestellt, wie sie beispielsweise für die Behandlung von Defekten an Gewebegrenzflächen (Knochen/Knorpel oder Knochen/Weichgewebe) benötigt werden. Das Verfahren des 3D-Plottens wurde weiterhin erstmals erfolgreich für die Erzeugung sowohl hohler Biopolymer-Stränge als auch solcher mit Kern-Mantel-Struktur eingesetzt. Die Gruppe konnte demonstrieren, dass sich lebende humane Stammzellen ohne signifikanten Vitalitätsverlust zusammen mit Alginate-basierten Hydrogel-Mischungen zu 3D-Konstrukten mit klinisch relevanten Dimensionen verdrucken und anschließend über längere Zeit weiter kultivieren lassen.

Zuletzt wurde in Zusammenarbeit mit der AG von Prof. Bley (Inst. für Bioverfahrenstechnik der TU Dresden) zum ersten Mal gezeigt, dass sich auch lebende Mikroalgen mit dem Verfahren des 3D-Plottens problemlos verarbeiten lassen („*green bioprinting*“).

Weiterführende Informationen und unsere Publikationen zum Thema 3D-Plotten finden sich im Internet, erreichbar über den link [www.biofabrikation.de](http://www.biofabrikation.de).

# Integration von Automatisierungshardware in zellbiologischen Workflows im Kontext der regenerativen Medizin

Michael M. Gepp\*, Ina Meiser\*, Benjamin B. Fischer\* und Heiko Zimmermann\*<sup>°</sup>

\* Fraunhofer IBMT, Abt. Medizinische Biotechnologie, Ensheimer Str. 48 66386 St. Ingbert

<sup>°</sup> Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Biotechnologie, Universität des Saarlandes, 66123 Saarbrücken

korrespondierender Autor: heiko.zimmermann@ibmt.fraunhofer.de

Die Entwicklung und Untersuchung von Modellsystemen in Verbindung mit medizinisch relevanten Zellen bilden die Basis für Grundlagenforschung z.B. bei neuronalen oder kardiologischen Erkrankungen, sowie von neuartigen Ansätzen der personalisierten Medizin. Die Generierung (Reprogrammierung) von pluripotenten Stammzellen aus adultem Gewebe [1] eröffnete diesem Forschungsgebiet vollkommen neue Möglichkeiten, beispielsweise durch die Generierung von patientenspezifischen pluripotenten Stammzellen, die in vitro in die Zellen differenziert werden können, die letztendlich das Ziel einer zukünftigen Therapie sein sollen. Trotz dieser Fortschritte verlangt die Kultivierung dieser Zellen einen hohen Standard, um die Pluripotenz dieser Zellen zu erhalten, aber auch bei Bedarf große Zellzahlen generieren zu können. Bei den Modellsystemen hat sich im Laufe der letzten Jahre der Trend durchgesetzt, dreidimensionale Modelle für die Untersuchungen zu nutzen, da diese die in-vivo-Situation besser abbilden können als zweidimensionale Modelle [2]. Eine exzellente Methode für solche Modellsysteme ist die Kultivierungsform des „hängenden Tropfens“, in dem Zellen ohne Adhäsionsmöglichkeiten oder optional mit Adhäsionsmöglichkeiten (sog. Mikroträger) kultiviert werden können [3]. Eine manuelle Handhabung dieser Kulturen ist zwar möglich, jedoch mit hohem zeitlichem Aufwand verbunden. Durch die Kombination von neuartigen Zellkultursubstraten für die 3D-Kultur, sowie dem Einsatz von Pipettierrobotern (GeSiM Nanoplotter), konnten die manuellen Schritte mit diesem Automatisierungssystem nahezu vollständig abgebildet und damit die Basis für darauf aufbauende Screening-Verfahren geschaffen werden.

Neben den genutzten Zellen stellt die Konstruktion von artifiziellen Umgebungen ein weiterer wichtiger Zweig in der regenerativen Medizin dar. Hydrogel-basierte Gerüststrukturen aus ultra hoch viskosem Alginat bieten den Vorteil, dass Zellen sowohl darin immobilisiert, als auch darauf kultiviert werden können. Ein daraus abgeleitetes innovatives Verfahren stellt die sog. 2D-Verkapselung dar, mit der adhärenz Zellen unter einer Alginatschicht immobilisiert werden können [4]. Ferner konnte gezeigt werden, dass Gerüststrukturen aus Alginat mit Hilfe des  $\mu$ -Contact-Printings, sowie dem 3D-Drucker hergestellt werden können.

Im diesem Vortrag soll insgesamt auf die automatisierte Kultivierung von humanen Stammzellen, als auch die Konstruktion von Gerüststrukturen aus Alginat-Hydrogelen fokussiert werden.

## Literatur:

[1] Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **2007**, 131, 861-872

[2] Baker, B. M. & Chen, C. S. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J. Cell Sci.*, **2012**, 125, 3015-3024

[3] Meiser, I.; Sébastien, I. & Neubauer, J. C., Automatisierte Kultivierung von induziert pluripotenten Stammzellen, *BIOspektrum, Springer*, **2013**, 19, 523-526

[4] Gepp, M. M.; Ehrhart, F.; Shirley, S. G.; Howitz, S. & Zimmermann, H. Dispensing of very low volumes of ultra high viscosity alginate gels: a new tool for encapsulation of adherent cells and rapid prototyping of scaffolds and implants *Biotechniques*, **2009**, 46, 31-43

# Additive Fertigung von bioartifiziellen Geweben

Eva Hoch<sup>1</sup>, Annika Wenz<sup>1</sup>, Achim Weber<sup>1,2</sup>, T. Hirth<sup>1,2</sup>, Günter E.M. Tovar<sup>1,2</sup>, Kirsten Borchers<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universität Stuttgart, Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP, Stuttgart, Deutschland

<sup>2</sup> Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, Stuttgart, Deutschland

Natürliche Gewebe erfüllen im Organismus hochkomplexe Aufgaben. Ihre Formen und Funktionen haben sich im Laufe der Evolution immer weiter verfeinert und sind in vielerlei Hinsicht optimiert. Um künstliche Gewebe aufzubauen, die ebenso gut funktionieren wie die natürlichen, benötigen wir Herstellungsprozesse, die uns hinsichtlich der Formgebung möglichst keine Grenzen setzen. Mithilfe additiver Fertigungsverfahren könnte in Zukunft der Aufbau von individuell zugeschnittenem, bioartifiziellem Gewebeersatz aus patienteneigenen Zellen und geeigneten Biomaterialien möglich sein. Entsprechende Biomaterialien müssen einerseits druckbar sein und andererseits zu Matrices mit angemessenen biologischen und mechanischen Eigenschaften vernetzt werden können.

Die vorliegende Studie befasst sich mit der Entwicklung von Biotinten für den Aufbau von Gewebemodellen mittels additiver Fertigungsverfahren. Dafür wurden zunächst Biopolymere aus der natürlichen extrazellulären Matrix, beispielsweise Gelatine, Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure, durch Derivatisierung mit Methacrylsäureanhydrid mit vernetzbaren Gruppen versetzt [1]. Um die Viskosität der Lösungen an die Anforderungen verschiedener Drucktechnologien anzupassen, wurde die Gelatine zusätzlich mit Acetylgruppen funktionalisiert [2]. Die Tinten wurden durch UV-Bestrahlung zu Hydrogelen vernetzt und deren Festigkeit und Quellbarkeit untersucht. Die dargestellten Biotinten sind für die Verarbeitung von lebenden Zellen mit verschiedenen Druckverfahren, beispielsweise mit dem GeSiM Mikrodispenser, und somit für den Aufbau von Gewebemodellen geeignet.

[1] E. Hoch, C. Schuh, T. Hirth, G. Tovar, K. Borchers, J Mater Sci: Mater Med 2012, 23:2607–2617

[2] E. Hoch, T. Hirth, G. Tovar, K. Borchers, J Mater Chem B 2013, 3, 5675-85.

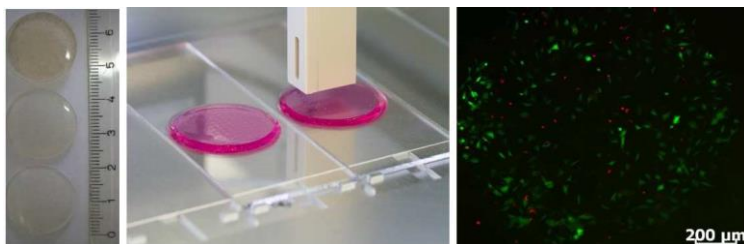


Abbildung 1: Gelatine-Hydrogele mit unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften (links). Inkjet-Druck von zellhaltigen Gelatine-basierten Biotinten (Mitte). Knorpelzellen nach erfolgtem Inkjet-Druck (grün: 200 µm)

## **Additive Fertigung hochleistungskeramischer Komponenten – von gezielt porös bis multifunktionell**

Tassilo Moritz\*, Hans-Jürgen Richter, Uwe Scheithauer, Matthias Ahlhelm, Eric Schwarzer  
Fraunhofer-Institut für Keramische Technologien und Systeme (IKTS), Winterbergstr. 28,  
01277 Dresden

Die additive Fertigung ist für Kunststoffe und Metalle ein etablierter Prozess und wird vielfältig industriell umgesetzt. Auch für Keramiken gewinnen additive Fertigungsverfahren, das heißt, Fertigungsverfahren, bei dem das Werkstück element- oder schichtweise aufgebaut wird, immer mehr, insbesondere auch unter dem Aspekt der Ressourcenschonung, an Bedeutung. Sie stehen gleichwohl erst am Anfang der technischen Umsetzung.

Das derzeitige Design von keramischen Bauteilen wird bislang in erster Linie durch die Möglichkeiten der konventionellen Formgebung bestimmt. Additive Fertigungsverfahren gestatten jedoch, Bauteilgeometrien herzustellen, die mit herkömmlichen keramischen Formgebungsverfahren nicht realisierbar sind, wie beispielsweise Komponenten mit komplexen inneren Kanälen.

Ein wesentlicher Vorteil additiver Fertigungsverfahren besteht weiterhin darin, dass es sich um werkzeugfreie Formgebungsmethoden handelt, womit auch individualisierte Einzelstücke oder Kleinserien ohne hohe Werkzeugkosten effizient gefertigt werden können.

Neben der geometrischen Vielfalt bieten additive Verfahren auch die prinzipielle Möglichkeit, Bauteile mit orts aufgelöstem Eigenschaftsprofil herzustellen, indem die Werkstoffzusammensetzung an jedem beliebigen Punkt des Bauteils variiert wird. Damit werden neue, geometrisch und funktional komplexe Keramikkomponenten als Individualteil oder Kleinserie, für technische und medizinische Anwendungen verfügbar sein.

Der Beitrag zeigt Vorteile und Nachteile der Additiven Fertigung sowie Entwicklungstrends auf. Vergleichend werden verschiedene pulverbasierte und suspensionsbasierte Verfahren vorgestellt und Auswahlkriterien für deren Anwendung genannt. Insbesondere soll auf die Eignung von Additiven Formgebungsverfahren zur Erzeugung patientengerechter Knochenersatzbauteile und neuartiger mikrofluidischer Systeme eingegangen werden.

# Direkte Druckmethoden für metallische und metalloxidische Nano- und Mikrostrukturen aus anorganischen Vorläuferverbindungen

Julia Grothe<sup>a</sup>, Julia Fritsch<sup>a</sup>, Benjamin Schumm<sup>b</sup>, Florian Wisser<sup>a</sup>, Kai Eckhardt<sup>a</sup>, Stefan Kaskel<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Technische Universität Dresden, Bergstrasse 66, 01069 Dresden, Germany

<sup>b</sup> Fraunhofer IWS, Winterbergstraße 28, 01277, Dresden, Germany

Nano- und Mikrostrukturen anorganischer Materialien gewinnen zunehmend an Bedeutung für vielfältige Anwendungen z.B. im Bereich der Mikroelektronik und für optoelektronische Bauteile. Derartige Strukturen können wahlweise über sog. „*Top-Down*“- oder auch „*Bottom-Up*“-Strategien erzeugt werden. Während bei den *Top-Down*-Strategien üblicherweise zunächst kompakte Schichten erzeugt werden, die dann nachträglich strukturiert werden, benötigen *Bottom-Up*-Strategien keine anschließenden Ätzschritte und sind daher weniger zeitaufwändig, umweltfreundlicher und materialsparend, was insbesondere bei der Verwendung von Edelmetallen oder seltenen Erden eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Ressourceneffizienz darstellt.

Durch die Herstellung geeigneter Vorläuferverbindungen können sowohl Metalle, als auch Metalloxide mittels direkter Drucktechniken strukturiert im Nano- und Mikrometerbereich erhalten werden.

Silber- oder Platinstrukturen konnten durch direktes Drucken von metallischen Tinten basierend auf metallorganischen [2, 3] oder polymeren Präkursoren [4, 5] erzeugt werden. Durch die Strukturierung in der Nano- und Mikrometerskala konnten dadurch transparente und semitransparente Elektroden mit hervorragenden Leitfähigkeiten zur Anwendung in optoelektronischen Bauteilen erhalten werden.

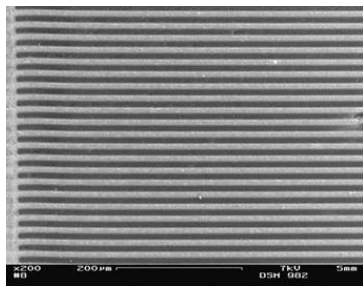


Abb 1. REM Aufnahme einer Silberlinienstruktur aus einem polymeren Präkursor

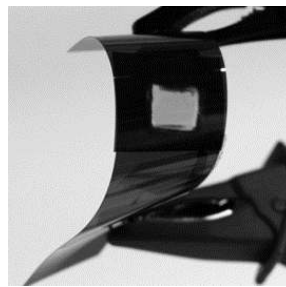


Abb. 2. Foto eines semitransparenten Elektrolumineszenzbauteils mit strukturierter Silberelektrode

Die Anwendung neuer Sol-Gel-Präkursoren ermöglicht die Herstellung strukturierter Metalloxidschichten, die zur Verbesserung von Lichtmanagement in organischen Leuchtdioden verwendet werden können.

## Referenzen:

- [1] J. Fritsch, B. Schumm, R. Biedermann, J. Grothe, S. Kaskel, *Europ. J. Inorg. Chem.* 5 (2012), 878-883.
- [2] J. Fritsch, F. M. Wisser, K. Eckhardt, V. Bon, G. Mondin, B. Schumm, J. Grothe, S. Kaskel, *J. Phys. Chem. Solids* 74 (2013), 1546–1552.
- [3] B. Schumm, F. M. Wisser, G. Mondin, F. Hippauf, J. Fritsch, J. Grothe, S. Kaskel, *J. Mater. Chem. C* 1(4) (2013), 638-645.
- [4] F. M. Wisser, B. Schumm, A. Meier, T. Engel, J. Grothe, G. Kickelbick, S. Kaskel, *J. Mater. Chem. C* 1(13) (2013) 2477–2484

## **Automated radiosynthesizers: technologies, customers needs and market opportunities**

**Presented by:** Dr. Fedor Zhuravlev, Hevesy Laboratory, Technical University of Denmark

**Language:** English

**Abstract:** This talk will explore the modern state of automated radiosynthesizers from technology point of view as well as the current customer needs. The emerging market opportunities and related technologies will be put in the context of ongoing collaboration between GeSiM and DTU.



# Werkzeuge zur Bewältigung technologischer Herausforderungen bei der Nutzung von zellbasierten Verfahren in der Biomedizin

Claus Duschl, Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie, Institutsteil für Bioanalytik und Bioprozesse, Am Mühlenberg 13, 14476 Potsdam

Die Anforderungen und Erwartungen an Verfahren zur Nutzung von Zellen für therapeutische und diagnostische Anwendungen sind enorm. In diesem Kontext herrscht ein großer Bedarf an Prozessen und *in vitro* Testmethoden, die den dabei erforderlichen hohen Anforderungen an die Qualität des Zellmaterials gerecht werden und gleichzeitig stringente ökonomische Kriterien erfüllen. In diesem Beitrag werden dazu zwei Technologien vorgestellt. Im ersten Teil werden Beschichtungen aus thermoresponsiven Polymeren für die Kontrolle der Ablösung von adhären Zellen von ihrem Kultivierungssubstrat diskutiert. Der zweite Teil ist der Dielektrophorese als Methode zur berührungslosen Manipulation von Zellen gewidmet.

Die effiziente, nichtinvasive und zugleich orts aufgelöste Steuerung der Zelladhäsion spielt in vielen Protokollen zur Prozessierung von Zellen eine zentrale Rolle. Über die Zell-Substrat-Interaktion lässt sich das Verhalten von adhären Zellen steuern. Als Beispiele sind Migration, Proliferation oder Differenzierung genannt. Darüber hinaus können mit diesem Ansatz schonende und effizientere Prozessabläufe bei der Zellkultivierung etabliert werden und somit kann der Einsatz konventioneller Methoden, wie der Proteinverdau durch Trypsin vermieden werden. Bei den hier beschriebenen Beschichtungen aus thermoresponsiven Polymeren wie poly(N-isopropylacrylamid) wird die Zelladhäsion durch Temperaturänderungen kontrolliert. Diese Polymerschichten vermitteln bei Zellkulturtemperatur (37 °C) die Zelladhäsion. Werden die Zellsubstrate unterhalb einer Phasenübergangstemperatur, z. B. auf Raumtemperatur abgekühlt, werden die Oberflächen protein- und zellrepellent. Die Zellen lösen den Oberflächenkontakt auf und können abgespült bzw. geerntet werden. Bisher erforderte diese elegante Methode jedoch einen hohen Prozessierungsaufwand und ist dadurch unflexibel und kostenintensiv. Aus diesem Grund entwickelten wir ein Konzept, die thermoresponsiven Polymere so einfach und robust wie möglich auf Kunststoff sowie Glas zu immobilisieren. Über elektrostatische getriebene Adsorption geladener thermoresponsiver Mikrogele wurden so a) homogene Beschichtungen über Ausschleudern und b) erstmals lokale Beschichtungen durch Spotting von Volumina im Nanoliterbereich oder durch Mikrokontaktdruckverfahren erzeugt. Dank der einfachen Herstellungsmethoden können sowohl die homogenen wie auch die strukturierten Schichten mittels etablierter Prozesse in mikrofluidische Zellchips integriert werden. Die orts aufgelöste Steuerung der Zelladhäsion mittels thermoresponsiver Polymerbeschichtungen in offenen oder in mikrofluidischen Systemen sollte so in Zukunft einfach zu bewerkstelligen sein. Als Beispiel für eine wichtige Anwendung dieser Methode wurde ein Zellmigrationsassay etabliert.

Mit Hilfe von Dielektrophorese und Mikrofluidik lassen sich Suspensionszellen manipulieren. Dazu werden hochfrequente elektromagnetische Felder in Lab-On-Chip-Systemen generiert. Durch eine geschickte Kombination von Mikroelektroden und fluidischen Mikrokanälen lassen sich in den Chips wichtige Aufgaben erledigen: Mikrometergenaue Positionierung und Zusammenführung von Zellen und Zellclustern für die Mikroskopie, Sortieren verschiedener Zellpopulationen, Aktivierung von Zellen mittels funktionalisierter Mikroartikel und Fusion von präzise ausgerichteten Zellpaaren. In diesem Beitrag werden neue Anwendungen diskutiert.

## **Mikrofluidisches System für die Magnet-basierte Separation immunologisch relevanter Zellen aus Blut**

Gunter Gastrock<sup>1</sup>, Jörg Schemberg<sup>1</sup>, Joachim Bertram<sup>2</sup>, Steffen Howitz<sup>3</sup>,  
Andreas Grodrian<sup>1</sup>, Robert Römer<sup>1</sup>, Tobias Förster<sup>1</sup>, Karen Lemke<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V.  
Rosenhof  
D-37308 Heilbad Heiligenstadt  
[www.iba-heiligenstadt.de](http://www.iba-heiligenstadt.de)

<sup>2</sup> Institut für Bioanalytik GmbH  
Rudolf-Wissell-Str. 28  
D-37079 Göttingen  
[www.iba-lifesciences.com](http://www.iba-lifesciences.com)

<sup>3</sup> GeSiM Gesellschaft für Silizium-Mikrosysteme mbH  
Bautzner Landstrasse 45  
D-01454 Grosserkmannsdorf  
[www.gesim.de](http://www.gesim.de)

Das im Rahmen eines vom BMBF (Projekträger VDI/VDE-IT, FKz: 16 SV3743) geförderten Forschungsprojektes entwickelte mikrofluidische System integriert die Technologie der biomagnetischen Zellseparation mit möglichen klinischen Anwendungen wie beispielsweise Pränatal- oder Tumordiagnostik. Wesentlicher Vorteil gegenüber den etablierten Konzepten ist die kontinuierliche, automatisierbare Probenprozessierung, die den Probendurchsatz deutlich erhöht und eine Limitierung hinsichtlich des Blutvolumens umgeht. Zusätzlich ist eine Verringerung der eingesetzten Magnetbeadkonzentration in Abhängigkeit von der Zielzellkonzentration möglich. Dies gewährleistet eine deutliche Kostenreduktion pro Messzyklus. Kernstück ist ein chip-basiertes mikrofluidisches Separationsmodul (Chipprozessierung durch GeSiM mbH), in dessen Chipkanal aus einer vorab gemischten und inkubierten Blut-Magnetbead-Suspension die Zielzell-Magnetbead-Komplexe mit Hilfe rotierender Permanentmagneten in eine Pufferphase überführt werden. Durch die anschließende direkte Anbindung an ein Durchflusszytometer wird eine schnelle und sensitive Detektion bzw. Separation der relevanten Zellen für die pränatale und Tumordiagnostik gewährleistet. Die Automatisierung der einzelnen Verfahrensschritte erlaubt es, das System für die Diagnostik im klinischen Routinebetrieb einzusetzen.

## Der Optische Strecker – Zellen stressen im Laserlicht

Autoren: Christoph Faigle<sup>1</sup>, Franziska Lautenschläger<sup>2</sup>, Graeme Whyte<sup>2</sup>, Jochen Guck<sup>1</sup>

1. Biotechnologisches Zentrum, Technische Universität Dresden.
2. Cavendish Laboratory, Department of Physics, University of Cambridge, UK

Abstract:

Der „Optische Strecker“ ist ein mikrofluidisches System, das einzelne Zellen kontaktfrei mithilfe von Lasern verformt, um deren viskoelastische Eigenschaften zu ermitteln. Je nach Aufgabenbereich haben wir verschiedene Methoden, basierend auf mikrofluidischen und optischen Vorrichtungen, entwickelt. Das Grundkonzept ist dabei jeweils ein mikrostrukturierter Chip, der in ein handelsübliches Mikroskop integriert werden kann. Schon vor einiger Zeit wurden mechanische Parameter als relevante Indikatoren für biologische Funktionen und Krankheiten erkannt. So wurde beispielsweise gezeigt, dass gewisse Krebszellen verformbarer als gesunde Zellen sind. Die Herausforderung besteht darin, Methoden zur Messung dieser Parameter zu entwickeln, die das System Zelle nicht beeinflussen. Der Vorteil hierbei ist, dass im Gegensatz zu Standardmessmethoden der Molekularbiologie die Zellen nicht aufwendig mit fluoreszierenden Markern oder ähnlichem behandelt werden müssen. Grundversionen des optischen Streckers existieren schon seit einigen Jahren, die es ermöglichen, homogene Zellpopulationen zu vermessen. Jedoch konnte man bis anhin nur Durchschnittswerte für jede Population errechnen. Um inhomogene Zellpopulationen, zum Beispiel Blutproben, zu charakterisieren, ist es jedoch nötig, jede einzelne Zelle zu betrachten und zusätzliche Parameter, seien es mechanische oder sonstige, wie der Brechungsindex, zu messen. Zudem ist es von Vorteil, interessante Subpopulationen zu extrahieren, um sie daraufhin mit bekannten molekularbiologischen Verfahren näher zu untersuchen. Exemplarisch wurden unsere Geräte mit Zellarten unterschiedlicher mechanischer Eigenschaften getestet, um ihre Anwendbarkeit in der Praxis zu prüfen. Diese Methoden bieten die Möglichkeit eines vielseitigen Geräts, das sowohl in der klinischen Diagnostik als auch in der zellbiologischen Forschung Anwendung finden kann.

Prof. Dr. J. Michael Köhler, TU Ilmenau, Institute of Micro- and Nanotechnologies/ Institute of Chemistry and Biotechnology, PF 10 05 65, D- 98684 Ilmenau, Germany  
phone 49- (0) - 3677 - 69 - 3700, fax - 69 - 3179 [michael.koehler@tu-ilmenau.de](mailto:michael.koehler@tu-ilmenau.de)

## **Synthese und Anwendung von Sensorpartikeln in der Mikrofluidik**

Nikunj Kumar Visaveliya\*, Jialan Cao\*, Andrea Knauer\*, Ch. Serra +, Stefan Nagl# und J. Michael Köhler\*

(\* TU Ilmenau, + Univ. Strasbourg, # Univ. Leipzig)

Die bequeme Kontrolle von Volumenflussraten, kurze Misch- und Verweilzeiten sowie eine hohe Reproduzierbarkeit in den Strömungsverhältnissen und in der Bildung von Tropfen machen mikrofluidische Systeme prädestiniert für die Synthese von Mikro- und Nanopartikeln mit hoher Homogenität. Das betrifft einen weiten Bereich von Partikelgrößen und ein Materialspektrum, das von Metallen über Halbleiter und anorganische Dielektrika bis zu Polymeren reicht. Darüber hinaus bietet die Mikrofluidik sehr gute Voraussetzungen für den Aufbau von zusammengesetzten Partikeln.

Besonders interessant für die Anwendung in der Mikrofluidik sind optische Sensor-Partikel, die eine berührungsfreie Auslesung von Stoffinformationen erlauben. Im Vortrag werden Strategien und Beispiele zur Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln in unterschiedlichen Größenbereichen und Materialklassen diskutiert und Anwendungen von pH- und Sauerstoff-Sensorpartikeln in miniaturisierten toxikologischen Screenings sowie von SERS-Sensorpartikeln vorgestellt.

# Der Multi-Organ-Chip als erfolgreiche Anwendung der MicCell-Plattform

Florian Schmieder, Mathias Buseck, Udo Klotzbach, Frank Sonntag

Fraunhofer-Institut für Werkstoff- und Strahltechnik IWS Dresden, Winterbergstr. 28, 01277 Dresden

In enger Kooperation zwischen GeSiM, TU Berlin, TissUse und Fraunhofer IWS wurde basierend auf der MicCell-Technologie eine Perfusions-Mikrobioreaktor-Plattform entwickelt und erfolgreich etabliert. Diese verbindet auf einem Chip mehrere Reservoirs, Zellkulturkammern sowie eine Mikropumpe in einem gemeinsamen mikrofluidischen Kreislaufsystem. Die Plattform ermöglicht die Interaktion mehrerer Organoide in einem gemeinsamen Kreislauf und wird bereits in Form von Multi-Organ-Chips erfolgreich für die systemische, tierversuchsfreie Substanztestung eingesetzt. Die Plattform setzt sich aus einem Basischip und anwendungsspezifischen Zellkulturmodulen zusammen. Der Betrieb der integrierten, pneumatisch aktuierten Mikropumpen und -ventile erfolgt über ein externes Steuerungssystem. Bei den ersten Basischips handelte es sich um modifizierte MicCell-Systeme mit freistehenden PDMS-Membranen. Die Technologie wurde weiterentwickelt. Aktuell bilden Multilagensysteme aus hochtransparenten, laserstrukturierten Polymer- und Elastomerfolien die Grundlage der Basischips. Sie verfügen über definierte Schnittstellen zur Ankopplung anwendungsspezifischer Zellkulturmodule. Dabei handelt es sich um komplexe Polymerbauteile, die durch additive Fertigungsverfahren realisiert werden und maßgeschneiderte Mikrofluidikstrukturen für die Kultivierung der anwendungsspezifischen Organoide bereitstellen. Für die perfundierte Kultivierung von Scaffolds wurde beispielsweise ein Zellkulturmodul etabliert, in dem oben, unten und an den Seiten eine fluidische Abdichtung zwischen Scaffold und Flusszelle realisiert wird, sodass das Medium durch das Scaffold hindurchfließen muss.

Synergien mit anderen GeSiM-Gerätefamilien:

Die Kombination von Perfusions-Mikrobioreaktor-Plattform und BioScaffolder eröffnet neue Möglichkeiten im Bereich Tissue Engineering und 3D-Zellkultivierung. Komplexe Scaffolds können direkt in die Zellkulturmodule hinein gedruckt und anschließend unter Perfusion kultiviert werden.

Die Kombination mit der Plattform D bietet die Möglichkeit eine Farm von Perfusions-Mikrobioreaktoren automatisiert zu prozessieren. Die Chips befinden sich auf der temperierten Arbeitsplatte zwischen den beiden Portalen. Der frei positionierbare, oben angeordnete Dosierkopf übernimmt das Fluidhandling und der frei positionierbare, unten angeordnete Sensorkopf die nicht-invasive online-Überwachung.

## Schnelle Sepsisdetektion mit Hilfe eines mikrofluidischen Sorters

Autor: Harald Mathis

Coautoren: Anja Linneman, Marc Dröge, Christian Müller, Steffen Krüger

Jährlich erkranken allein in Deutschland ca. 150.000 Patienten an Sepsis, von denen 60.000 aufgrund einer zu spät eingeleiteten Antibiotikatherapie versterben. Mit 60.000 Todesfällen p.a. ist die Sepsis die dritthäufigste Todesursache und rangiert damit in der Inzidenzrate direkt hinter dem akuten Herzinfarkt. Die mit einer Sepsiserkrankung einhergehenden intensivmedizinischen Kosten liegen jährlich bei ca. 1,77 Mrd. € (30% des Budgets für die gesamte Intensivmedizin). Hierzu addieren sich die durch Arbeitsausfall bedingten Kosten von 4,5 Mrd. € p.a.. Da eine Sepsis bei schneller Einleitung einer gezielten Antibiotikatherapie innerhalb von Stunden gut zu behandeln ist, liegt der Grund für den häufig tödlichen Verlauf dieser Erkrankung (40 % Letalität) im Mangel an schnellen diagnostischen Verfahren. Nach Stand der Technik müssen vor Einleitung einer selektiven Antibiotikatherapie die im Blut vorhandenen Pathogene isoliert, kultiviert und mit Antibiotika behandelt werden, um deren Wirksamkeit zu testen. Aufgrund der erforderlichen Kulturschritte und der benötigten Mengen gezüchteter Erreger dauert dieses Vorgehen bis zu 3 Tage. Aus der hohen Mortalitätsrate lässt sich unmittelbar das Marktinteresse an einem Schnelltestverfahren ableiten, mit dem die Sepsis verursachenden Erreger identifiziert und ihre Sensitivität auf Antibiotika in wenigen Stunden nachgewiesen werden können.

Das SALUS-System ist ein Schnelltest-System, das aus 5 Einheiten besteht: 1. einem mikrofluidischen Sorter 2. einem Vorkultiviermodul 3. einem Wachstumsmonitor 4. einem Detektionsmodul und 5. einer Software-Suite, die alle Daten zu Informationen verdichtet. Mit Hilfe des SALUS-Systems kann der gesamte Prozess von der Bakterienidentifikation bis zum Resistenztest von bis zu 100h auf 9h reduziert werden. Wir präsentieren KONzeption und Ergebnisse (Messungen und Simulationen) zum SALUS-System.

Ref.: [1](#) Abschlussbericht second international congress "sepsis and multiorgan dysfunction", Weimar 7.-10. Sept. 2005

# Verarbeitung von vitalen dentalen Stammzellen mittels Drop-on-Demand-Technologie

R. Mau<sup>1\*</sup>, K. Kriebel<sup>2</sup>, H. Lang<sup>2</sup>, H. Seitz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lehrstuhl für Fluidtechnik und Mikrofluidtechnik, Universität Rostock

<sup>2</sup>Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Universität Rostock

\*robert.mau@uni-rostock.de

Die Drop-on-Demand-Technologie bietet ein großes Potenzial, das insbesondere für das Tissue Engineering von Nutzen sein kann. Beispielsweise besteht die Möglichkeit, Zellen ortsselektiv und präzise auf Scaffolds zu dosieren. Im Rahmen einer Vorstudie sind vitale dentale Stammzellen (hDFSCs) mit dem Gesim Nanoplotter 2.1 verarbeitet worden. Hierzu wurde eine Zellsuspension von  $6,6 \times 10^6$  Zellen/ml in DMEM mit 10 % FCS (fetal calf serum) hergestellt. Der Durchmesser der einzelnen Zellen bewegt sich ca. zwischen 10 bis 20  $\mu\text{m}$ . Der Nanoplotter ist für den Versuch mit dem piezoelektrischen Einzeltropfenerzeuger Gesim NanoTip HV ausgestattet worden. Dieser stellt nominell ein Tropfenvolumen von 400 pl bereit und wurde mit einer Spannung von 75 V, einer Pulsweite von 50  $\mu\text{s}$  und einer Frequenz von 500 Hz betrieben. Es sind 50.000 Tropfen über einer Zeit von 100 Sekunden dosiert worden. Die Tropfenerzeugung wurde anhand einer geräteinternen Stroboskopkamera vor und nach der Dosierung kontrolliert. Um die Zellvitalität der hDFSCs nach der Dosierung beurteilen zu können, ist eine Färbung mit Trypan Blue vorgenommen worden.

Im Ergebnis wurde ein Abfall des Tropfenvolumens während des Dosierprozesses von 347 pl auf 224 pl festgestellt. Die Richtung des Tropfenausstoßes blieb stabil. Es ist nicht auszuschließen, dass Zellagglomerationen die Verarbeitung beeinflussen. Ein signifikanter Einfluss des Verarbeitungsprozesses auf die Zellvitalität wurde nicht festgestellt.

In Bezug auf die Ergebnisse dieser Vorstudie ist das Drop-on-Demand-Verfahren mit dem benannten Versuchsaufbau für die Verarbeitung von hDFSCs geeignet. Gegenstand weiterer Untersuchungen sollten die Prozessparameter für eine optimale Dosierung sein. Im Fazit kann das Potenzial der Drop-on-Demand-Technologie für das Tissue Engineering bestätigt werden.

Unser Dank gilt der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Rostock für ihre Unterstützung unserer Forschung mit hDFSCs. Ebenfalls möchten wir dem Ministerium für Wirtschaft, Bau und Tourismus Mecklenburg-Vorpommerns danken, welches die Finanzierung des Gesim Nanoplotters 2.1 aus Mitteln des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) bereitgestellt hat.

# Zell-instruktive starPEG-Heparin-Hydrogel-Arrays — Cell instructive starPEG-heparin hydrogel arrays

Uwe Freudenberg<sup>a,b</sup>, Ralf Zimmermann<sup>a</sup>, Eike Müller<sup>a</sup>, Carsten Werner<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Leibniz Institute of Polymer Research Dresden, Max Bergmann Center of Biomaterials  
Dresden, Hohe Strasse 6, 01069 Dresden, Germany.

<sup>b</sup>Technische Universität Dresden, Center for Regenerative Therapies Dresden,  
Tatzberg 47, 01307 Dresden, Germany.

The independent adjustment of mechanical and biomolecular properties of hydrogels is one of the current challenges in the development of a new generation of cell-instructive materials for tissue engineering. Based on a recently developed biohybrid gel material that can be crosslinked under physiological conditions utilizing star-shaped poly(ethylene glycol) and heparin<sup>1</sup> we developed two independent routes to create spatially controlled array structures. Solvent-assisted demolding was applied to reliably fabricate microstructures within these biohybrid hydrogels with small feature sizes down to 3  $\mu\text{m}$  and low gel stiffness down to shear moduli of 1 kPa. Regiospecific adhesion ligand immobilization, presentation of growth factors as well as secondary gel deposition for cell embedding allow for a versatile customization of the resulting microcavity arrays to enable advanced cell culture studies.

Furthermore, we demonstrate how such two-component hydrogels with spatially varying properties can be built up on the basis of an inkjet technology and how cell behavior can be guided by the presentation of mechanical and biochemical cues. In detail, we show how zonal hydrogel scaffolds can be fabricated (layer by layer) out of two fast-reacting building blocks by dispensing small droplets (~400 pL) of the polymer solutions simultaneously onto the same spot. By presenting results for starPEG-heparin and starPEG hydrogels we demonstrate how these scaffolds can be tailored in material composition, mechanical properties and biofunctionalization. Finally, we show how different cell types can be embedded within these instructive matrices utilizing the printing process with a good viability.

(1) Tsurkan, M. V.; Chwalek, K.; Prokoph, S.; Zieris, A.; Levental, K. R.; Freudenberg, U.; Werner, C. *Adv. Mater. Weinheim* **2013**, *25*, 2606–2610.



## Parallele On-Chip Synthese und Analyse von Peptiden mit GeSiM Nanoplotter und MicCell

Niels Röckendorf, Andreas Frey

*Forscherguppe Mukosale Immunologie & Diagnostik, Programmbereich Asthma und Allergie, Forschungszentrum Borstel, Airway Research Center North (ARCN), Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL).*

Peptidarrays werden seit langem in der Grundlagenforschung zum Beispiel für Epitopkartierungen bei immunologischen Fragestellungen eingesetzt. Zunehmend wird die Technologie auch in der Nahrungsmittelanalytik und im klinischen Bereich für die Diagnostik und die personalisierten Medizin interessant. Die Miniaturisierung der Peptidarrays wird in diesem Umfeld aus Gründen der begrenzten Verfügbarkeit klinischer Isolate weiter vorangetrieben. Membranbasierte Arraysysteme werden im Zuge dieser Entwicklung mehr und mehr durch glasbasierte Aufbauten ersetzt, in denen minimale Mengen der von Patienten gewonnenen biologischen Materialien mit einer maximalen Anzahl definierter Peptide in Kontakt gebracht werden können.

Für Fragestellungen in der personalisierten Medizin wurde in Zusammenarbeit mit der GeSiM GmbH ein Lösungsansatz entwickelt, der die ortsgerichtete Synthese definierter Peptidsequenzen auf Glas-Mikrokapillarplatten ermöglicht. Bei diesem Verfahren können Lösungen von Fmoc-Aminosäurebausteinen *in situ* mit Hilfe des Nanoplotters angemischt, aktiviert und auf reaktive Syntheseareale der Mikrokapillarplatte gespottet werden. Auf diese Weise können pikomolare Mengen von bis zu 900 verschiedenen Peptiden an definierten Positionen an der Oberfläche der Kapillarplatte hergestellt und direkt in fluoreszenzoptischen Screeningverfahren verwendet werden. Die Kapillarplatte dient dabei zunächst als Synthesegefäß, kann in einem nachfolgenden Prozessschritt aber auch direkt als feste Phase für den biologischen Test eingesetzt werden. Erforderliche Wasch- und Inkubationsschritte finden dabei in einer voll automatisierten, chemisch inerten GeSiM-Reaktionskammer statt. Bei diesem Konzept können Einzelexemplare maßgeschneiderter Peptidbibliotheken hergestellt werden, die z.B. auf bestimmte Patienten angepasst sind.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit maßgeschneiderter Peptidarrays auf Mikrokapillarplatten besteht in der generationsweisen Optimierung von Peptidliganden durch molekulare Evolution. Für diese Technologie müssen minimale Mengen *in silico* erzeugter Peptide synthetisiert werden, die in arraybasierten Verfahren auf ihre Eignung für einen vorgegebenen Zweck untersucht werden. Ungeeignete Kandidaten können schnell aussortiert werden, ohne sie in größerer Menge herstellen zu müssen. Unter Anwendung einer auf dem GeSiM Nanoplotter basierten „Evolutionsplattform“ konnten wir in nur 10 Optimierungsrunden die Affinität von Peptidliganden zu einer molekularen Zielstruktur um den Faktor 100 steigern.

Zur Analyse der Wechselwirkung unterschiedlichster Proteinproben mit Peptidarrays auf planaren Glasoberflächen kann mit der GeSiM MicCell eine elegante Lösung zur Minimierung des Probenverbrauchs gefunden werden. Ein mäanderförmiges mikrofluidisches Kanalsystem in einem PDMS Formteil wird auf den Glasträger mit dem Peptidarray aufgesetzt und z.B. von einer kleinen Menge der Serumprobe eines Patienten durchströmt. Die Probe wird dabei mit jedem Peptidspot innerhalb des Arrays in Kontakt gebracht und die Interaktion von Serumbestandteilen mit den immobilisierten Peptiden kann beispielsweise mit spektroskopischen Analysemethoden untersucht werden. In einem gemeinsamen Forschungsprojekt des Forschungszentrums Borstel mit der GeSiM und weiteren Partnern wurden die Grundlagen für dieses Verfahren erarbeitet, das gewonnene Know-How wird zurzeit in die Entwicklung mikrofluidischer POC Testsysteme eingebracht.

## **Integration of reagents in microfluidics using inkjet spotting for diagnostic applications**

Onur Goekce, Yuksel Temiz and Emmanuel Delamarche  
IBM Research GmbH, 8803 Rueschlikon, Switzerland  
<http://www.research.ibm.com/labs/zurich/st/bioscience/>

### **Abstract**

We are at the turning point where microfluidic concepts are increasingly well implemented into devices for point-of-care testing applications. Yet, precise flow of samples and integration of reagents in microfluidic devices are challenging to implement. We will present our concepts for microfluidic-based assays wherein flow control is carefully implemented using capillary-driven or active pumping flow using a library of microfluidic functional elements. The particular challenge of integrating reagents is solved by inkjet spotting detection probes into new classes of structures, which we call “orthogonal flow mixers” and “reagent integrators”. These new structures are able to hold nanogram to picogram quantities of probes and can release them very accurately in streams of samples. Key for this is the ability of inkjet spotters to localize small amounts of reagents with high spatial accuracy inside microfluidic structures. We foresee exciting applications for microfluidic devices having integrated reagents ranging from the multiplexed detection of analytes related to respiratory tract infections to portable immunodiagnostic devices for numerous purposes.

# Nano-Plotter zur DNA-Chip-Herstellung mit streifenförmigen Sondenorten

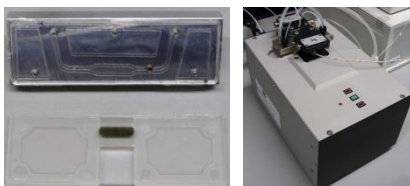
Alfred Kick<sup>1</sup>, Michael Mertig<sup>1,2</sup>

kick@ksi-meinsberg.de, michael.mertig@tu-dresden.de

Kurt-Schwabe-Institut für Mess- und Sensortechnik e. V. Meinsberg, Kurt-Schwabe-Straße 4, 04736 Waldheim  
Technische Universität Dresden, Professur für Physikalische Chemie, Mess- und Sensortechnik, 01062 Dresden

Die DNA-Sequenzanalyse ist insbesondere für die medizinische Diagnostik, Lebensmittelindustrie und Forensik sehr hilfreich und erforderlich. Dafür werden häufig DNA-Chips eingesetzt. Schnelle und parallele Nachweise mit einem geringen Probenvolumen sollen dabei einen hohen Durchsatz ermöglichen. DNA-Chips sind Biosensoren mit einer hohen Anzahl unterschiedlicher Sondenorte. Auf diesen Sondenorten sind einzelsträngige DNA-Sonden mit definierten Nucleobasen-Sequenzen immobilisiert.

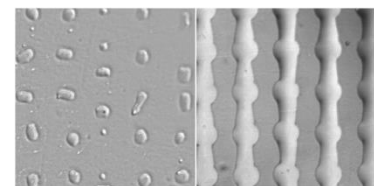
In den vorgestellten Arbeiten erfolgt die Detektion basierend auf der optischen Methode der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR). Die Detektion auf SPR-Chips erfolgt markierungsfrei, indem Brechzahländerungen in einer etwa 200 nm dicken, oberflächennahen Schicht der Analyselösung an einem 50 nm dünnen Goldfilm ausgewertet werden. Es wird eine Mikrofluidik (Bild 1, links) verwendet, um die Hybridisierung der Syntheseprodukte aus Polymerase-Kettenreaktionen auf den SPR-Chips zu untersuchen [1]. Das verwendete SPR-Spektrometer (Bild 1, rechts) liefert gemittelte Signale streifenförmiger Sondenorte auf goldbeschichteten Kunststoffchips. Daher ergibt sich die Herausforderung, die Sonden-Lösungen homogen auf streifenförmige Bereiche zu verteilen. Die Mikroarrays werden mit Hilfe des Mikropipettiersystems Nano-Plotter 2.1 der GeSiM mbH hergestellt (Bild 2). Lösungen thiolmodifizierter DNA-Sonden werden direkt auf eine unbehandelte Goldoberfläche aufgetragen. Dabei ist die Zusammensetzung der Lösungen entscheidend für die Sondendichte und die örtliche Präzision des Mikroarrays. So kann durch Zusatz von 5 % Glycerin die Beschichtung deutlich homogener erfolgen. Streifenförmige Sondenorte auf einer homogenen Goldoberfläche werden durch das Absetzen der Tropfen in zwei Durchgängen realisiert. Nach dem Verdunsten, wird im zweiten Durchlauf die Sondenlösung zwischen die Positionen der Tropfen des ersten Durchlaufs aufgetragen. Die Tropfen haben ein Volumen von etwa 50 pl (Bild 3).



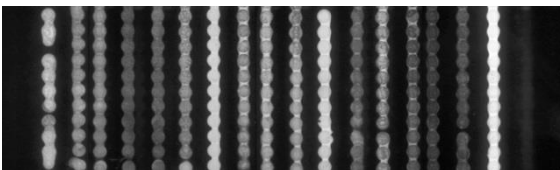
**Bild 1:** Links: Mikrofluidischer Kanal (PDMS, 120 µm hoch und 3 mm breit), SPR-Chip (76 mm × 26 mm × 4 mm), integrierte Optik und Goldfilm. Rechts: SPR-Spektrometer.



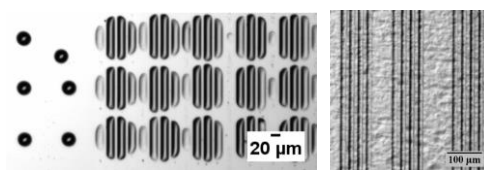
**Bild 2:** SPR-Chips im Nano Plotter bei der Mikroarrayherstellung. Oben links: Rückstände nach der Immobilisierung.



**Bild 3:** Rückstände ohne Glycerin (links), mit 5% Glycerin (rechts). Abstand zwischen Tropfenpositionen: 100 µm. Versatz um 50 µm entlang der Streifen im zweiten Durchlauf.



**Bild 4:** Fluoreszenzaufnahme eines DNA-Mikroarrays nach der Hybridisierung und Färbung mit YOYO®-1-iodid. Mitte-zu-Mitte-Abstand der Sondenorte: 140 µm.



**Bild 5:** Rückstände auf hydrophob/hydrophil strukturierten Goldoberflächen. Streifenbreite: 7 µm (hydrophob) und 15 µm (hydrophil). Links: Flächig gedrucktes Octadecylmercaptan links im Bild, getrennt abgesetzte Tropfen. Rechts: SPR-Chip, in zwei Durchläufen aufgetragene Lösungen.

Auf den SPR-DNA-Chips werden die Tropfen im Abstand von 72 µm abgesetzt. Im zweiten Durchlauf wird um 36 µm entlang der Streifen versetzt und der Mitte-zu-Mitte-Abstand zwischen den Sondenorten beträgt 140 µm (Bild 4), das entspricht 60 parallelen Streifen pro Chip. Auf diesen Mikroarrays können Hybridisierungen mehrerer unterschiedlicher DNA-Sequenzen in Echtzeit analysiert werden [2]. Eine zuvor durch Mikrokontaktdruck hydrophil/hydrophob strukturierte Oberfläche ermöglicht außerdem eine gute Kontrolle der Flüssigkeitsmorphologie und damit eine homogene Beschichtung. Sogar streifenförmiger Sondenorte auf Mikroarrays können realisiert werden (Bild 5).

[1] N. Danz, A. Kick, F. Sonntag, S. Schmieder, B. Höfer, U. Klotzbach, M. Mertig, Surface plasmon resonance platform technology for multi parameter analyses on polymer chips, *Eng. Life Sci.* **2011**, 11, 566-572.

[2] A. Kick, M. Bönsch, B. Katzschner, J. Voigt, A. Herr, W. Brabetz, M. Jung, F. Sonntag, U. Klotzbach, N. Danz, S. Howitz and M. Mertig, DNA microarrays for hybridisation detection by surface plasmon resonance spectroscopy, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 26, 1543-1547.

# **Die Zeptosens-Reverse-Phase-Protein-Array-Plattform —**

## **The Zeptosens Reverse Phase Protein Array Platform**

Autorenliste:

Mitko Ristov, Patrick Hauser, Daniel Guthy

Novartis Institutes for Biomedical Research, Oncology

Abstract:

Antibodies have played an important role in targeted protein detection for many decades, from early applications in precipitation assays, through milestones like the development of the ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) and Western blotting techniques to today's miniaturized chip-based systems where samples can be interrogated for expression of hundreds of proteins simultaneously.

Here we describe the use of the antibody based reverse phase protein array platform from Zeptosens (Bayer Technology Services) for the measurement of protein expression and post-translational modifications in cell lines, tissue and tumor samples. The multiplexing capabilities and the minute sample amount requirements are key advantages of the PWG (planar wave guide) technology based system.

## Microarrays: Neue Methoden und Anwendungen

Rebecca Bongartz, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl

*Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover, Callinstr 5., 30167 Hannover*

Microarray-Technologien sind bisher im Wesentlichen auf die Untersuchungen von Proteom, Transkriptom sowie Genom beschränkt. Derzeit wird versucht, sie auch für weitere Zielstrukturen wie zum Beispiel Zellen oder kleine Moleküle nutzbar zu machen.

Lebendzell-Microarrays bestehen aus unfixierten, lebenden Zellen. Sie ermöglichen es, direkt die Interaktionen zwischen Zellen und ihrer Umgebung (z.B. lösliche Faktoren oder Wirkstoffe) zu charakterisieren. Am Institut für Technische Chemie wurden Lebendzell-Microarrays für verschiedene Zelllinien sowie Primärzellen etabliert. Dabei ist es gelungen, Zellen mit einer Viabilität von ca. 80% auf Microarrays zu drucken, wobei die Zellen aus diesem Prozess unverändert hervorgehen. Dies wurde für Stammzellen demonstriert, die auf den Microarrays zu Knochen-, Knorpel- und Fettzellen differenziert werden konnten.<sup>[1]</sup> Durch die geringe notwendige Zellzahl kann z.B. mit den aus einer Patientenprobe isolierten Zellen eine Vielzahl verschiedener Stimulationen durchgeführt werden. Daher sind Lebendzell-Microarrays eine vielversprechende Plattform für biomedizinische und diagnostische Anwendungen.

Auch die Detektion kleiner Moleküle ist von Interesse, da diese als Metabolite wichtige Einblicke in den Stoffwechsel geben können und auch weitere relevante Targets wie z.B. Antibiotika oder Pestizide darstellen. Um die Detektion kleiner Moleküle mittels Microarrays aufzuzeigen, wurde ein Aptamer-basierter Assay für die Modellsubstanz Ethanolamin entwickelt. Dazu wurde das Aptamer auf dem Microarray immobilisiert und mit einem fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid, das zur Targetbindungsstelle des Aptamers komplementär ist, hybridisiert.<sup>[2]</sup> Die Bindung von Ethanolamin an das Aptamer führt zu einer Verdrängung des komplementären Oligonukleotids, die als Verringerung des Fluoreszenzsignals ausgelesen werden kann. Dieses Prinzip kann auf weitere Aptamere übertragen werden, wodurch Microarrays zur simultanen Detektion verschiedener kleiner Moleküle generiert werden können.

[1] Development and optimization of living cell microarrays for primary and stem cells: Application as miniaturized biotesting system, R. Bongartz, S. Timur, T. Scheper, F. Stahl, J Biotechnol, under peer-review

[2] Identification of the target binding site of ethanolamine binding aptamers and its exploitation for ethanolamine detection, A. Heilkenbrinker, C. Reinemann, R. Stoltenburg, A. Jochums, J.-G. Walter, F. Stahl, S. Zimmermann, B. Strehlitz, T. Scheper, Anal Chem, 2015, 87 (1), 677-685

## Zufrieden mit der Oberfläche?

Dr. Christian Heise, Dr. Uwe Schedler, Fridtjof Lechhart

PolyAn GmbH, Berlin

*„Gott erschuf den Festkörper, der Teufel die Oberfläche“ (Wolfgang Pauli, Physik-Nobelpreis 1945)*

Die Oberflächeneigenschaften der verwendeten Materialien haben einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität von Microarrays und anderen Anwendungen bei denen Moleküle an der festen Phase immobilisiert werden. Die Größe, Form und Eigenschaften abgesetzter Tropfen hängen nicht nur von der Oberflächenrauigkeit oder der Porosität des verwendeten Trägers ab (glatte Oberfläche vs. poröse Membran) sondern auch von der Dimension und den Benetzungseigenschaften aufgebracht (Polymer-)Schichten. Für die Immobilisierung von biochemischen Substanzen hat zudem der Bindungsmechanismus (Adsorption vs. kovalente Bindung / ungerichtete vs. gerichtete Bindung), die Reaktivität sowohl der Oberfläche als auch des Biomoleküls sowie die Entstehung unerwünschter Nebenprodukte einen entscheidenden Einfluss auf die Menge, Zugänglichkeit und Aktivität gebundener Moleküle und damit letztendlich auf deren molekulare Erkennung im Assay.

Im Vortrag wird auf die genannten Zusammenhänge anhand von Beispielen näher eingegangen. Ausgewählte Struktur-Eigenschaftsbeziehungen werden dargestellt.

# Nachweis von Hepatitis-C-Virus in Serumproben mittels „Single Electrode Redox Cycling“ auf Goldelektroden-Arrays

Lars Blohm<sup>a</sup>, Simone Holz<sup>a</sup>, Gundula Piechotta<sup>a</sup>, Jörg Albers<sup>a</sup>, Christiane Püttmann<sup>b</sup>, Christina Dammers<sup>c,d</sup>, Michael Kleines<sup>e,1</sup>, Alexander Krüttgen<sup>e,2</sup>, Georg Melmer<sup>f</sup>, Jörg Nähring<sup>d</sup>, Stefan Barth<sup>b,d</sup>, [Eric Nebling<sup>a</sup>](#)

<sup>a</sup> Fraunhofer ISIT, Dept. Biotechnical Microsystems, Fraunhoferstraße 1, 25524 Itzehoe, Germany

<sup>b</sup> University Hospital Aachen, Institute for Applied Medical Engineering, Dept. of Experimental Medicine and Immunotherapy, Pauwelsstraße 20, 52074 Aachen, Germany

<sup>c</sup> RWTH Aachen University, Institute of Biology VII, Molecular Biotechnology, Worringerweg 1, 52074 Aachen, Germany

<sup>d</sup> Fraunhofer IME, Dept. of Pharmaceutical Product Development, Forckenbeckstraße 6, 52074 Aachen, Germany

<sup>e</sup> University Hospital Aachen, Division of Virology, Department of Medical Microbiology, 52057 Aachen, Germany

<sup>f</sup> Pharmedartis GmbH, Forckenbeckstraße 6, 52074 Aachen, Germany

<sup>1</sup> Medical University IBK, Division of Virology, Department of Hygiene, Microbiology, Social Medicine, Fritz-Pregl-Straße 3, 6020 Innsbruck, Austria

<sup>2</sup> Medizinisches Versorgungszentrum Dr. Stein und Kollegen, Wallstraße 10, 41061 Mönchengladbach, Germany

**Generell:** Die in vitro Diagnostik nimmt in der medizinischen Versorgung eine zunehmend zentrale Rolle ein. Dazu tragen insbesondere die Erkenntnisse der molekularen Medizin und Genomforschung der letzten Jahre bei. Gleichzeitig gibt es einen Trend, neben der zentralen Diagnostik in großen Laboren wieder näher an den Patienten heranzurücken und eine Analyse auch komplexer Parameter vor Ort durchzuführen. Dies spart Zeit und ist in vielen Fällen kostengünstiger. Besonders marktrelevant sind hierbei mikrofluidische Nachweissysteme, die neben einer Miniaturisierung auch einen hohen Automatisierungsgrad und die Möglichkeit zur Multiparameteranalyse bieten. Käufliche Tests wie standardisierte Immunoassays (ELISAs) im Mikrotiterplattenformat sind hingegen oft zeitintensiv und aufgrund ihres Handlings meistens nur zentral im Labor durchführbar.

**System:** Am Fraunhofer Institut für Siliziumtechnologie wird dieses Testsystem für den schnellen, dezentralen und kostengünstigen Nachweis von Blutparametern auf der Basis der elektrischen Biochiptechnologie entwickelt. Die Leistungsfähigkeit zeigt das System am Beispiel der Detektion von Hepatitis-C-Virus-(HCV)-Infektionen aus verdünnten Serum- oder Vollblutproben. Der qualitative und quantitative Nachweis der Antikörper gegen das Virus erfolgt mittels eines ELISAs direkt auf einem Goldelektroden-Arraychip binnen 15 Minuten und es kann somit deutlich zwischen infizierten und nicht infizierten Proben unterschieden werden.

**Prinzip:** Auf mehrere Goldelektroden dieses Arrays werden unterschiedliche HCV-Antigene mittels piezoelektrischer Mikrodosieretechnik aufgebracht. Weitere Elektroden dienen als interne Positiv- und Negativkontrolle. Die Immobilisierung dieser Antigene erfolgt durch Thiol-Gold-Wechselwirkung und durch hydrophobe Anlagerung. Die automatisch verdünnten Proben gelangen mittels einer automatisierten Fluidik auf den Chip, wo die Serum-Antikörper gegen HCV auf den mit HCV-Antigenen belegten Elektroden binden. Eine anschließende Enzymmarkierung der gebundenen Antikörper und das Generieren eines elektrochemisch aktiven Substrats ermöglicht die parallele und positionsspezifische Auslesung der Chips mittels „Single Electrode Redox Cycling“.

Gesellschaft  
für Silizium-Mikrosysteme mbH  
Bautzner Landstraße 45  
01454 Radeberg, Germany  
Tel. +49 (0)351 - 2695 322  
Fax +49 (0)351 - 2695 320  
info@gesim.de  
**www.gesim.de**

**GESIM**

