

POREN-BASIERTE SENSOREN

# Simultane Einzelmolekülanalyse – komplett automatisiert

Gepusht von Fortschritten auf den Gebieten der Mikrosystemtechnik, Nanotechnologie und Biotechnologie erleben künstliche Zellmembranen als Träger für isolierte Membranproteine seit ca. zehn Jahren eine Renaissance. Die an der Universität Freiburg/Brsg. ausgegründete Ionera GmbH hat ein vollautomatisiertes System entwickelt, das die simultane hochauflösende Einzelmolekülanalyse an 16 porenbildenden Membranproteinen in künstlichen Membranen erlaubt.

BEATE PEISELER-SUTTER

Biomembranen bestehen in erster Linie aus Phospholipiden, integralen Transmembranproteinen und peripheren Proteinen, die in Richtung Extrazellularraum zusätzlich Zuckerreste tragen können. Die Lipide bilden eine selbstorganisierte Doppelschicht, weil die kleinen polaren Phosphatgruppen nach aussen gerichtet mit der wässrigen Umgebung Wasserstoffbrücken eingehen, während sich die langen unpolaren Fettsäureschwänze vom wässrigen Milieu weg nach Innen hin und untereinander durch Van-der-Waals-Kräfte stabilisiert zu einem fluiden Verband zusammenlagern. Biomembranen fungieren als Barrieren, die Zellen in Form halten und von ihrer Umgebung abgrenzen. Zwar können sie von einigen kleinen lipophilen Molekülen durch Diffusion überwunden werden.

## Biologische Nanoporen

Der Austausch von Wasser, Ionen und grössere Molekülen erfordert aber Durchtrittspforten, porenbildende Membranproteine, sogenannte biologische Nanoporen. Ein Beispiel sind Aquaporine, die den Austausch von Wasser ermöglichen. Der Austausch von Natrium-, Kalium-, Calcium-, Magnesium- und Chlorid-Ionen erfolgt über spezialisierte Ionenkanäle. Sie sind normalerweise geschlossen, sodass in der Zelle eine Ionenkonzentration aufrechterhalten wird, die von derjenigen der äusseren Umgebung abweicht. Das damit einhergehende elektrostatische Membranpotenzial treibt verschiedenste biochemische Vorgänge an, ausserdem sind Ionenkanäle essenziell für die elektrische Erregbarkeit von Nerven- und Muskelzellen. Entweder öffnen und schliessen sie sich membranpotenzialabhängig



Jan Behrends, Professor am Institut für Physiologie der Universität Freiburg. (Bild: B. Peiseler-Sutter)

(spannungsgesteuerte Ionenkanäle), oder sie tragen Rezeptoren und reagieren auf das Andocken spezifischer Botenstoffe mit einer Konformationsänderung und kurzzeitiger Öffnung (ligandengesteuerte Ionenkanäle). Pro Sekunde strömen dann Ionen in der Grössenordnung von zehn Millionen durch den passenden Kanal in die Zelle: Ein spannendes Ereignis, das Elektrophysiologen dank der nobelpreisgewürdigten Patch-Clamp-Messtechnik an einzelnen Membranflecken (Patch) oder ganzen Membranen lebender Zellen verfolgen können (Whole-Cell-Konfiguration).

## Detektion: Molekül in Pore löst Widerstandspuls aus

Nachdem die knifflige Patch-Clamp-Technik zur Jahrtausendwende automatisiert und parallelisiert werden konnte, rücken die

Ionenkanäle und Porine nun ins Visier der Mikrosystemtechniker und Nanotechnologen, die sie als molekulare Bauteile in nanoskopischen Porensensoren zur hochauflösenden Einzelmolekülanalyse verwenden möchten. Ein porenbildendes Membranprotein wird dazu in eine künstliche planare Membran, eine sogenannte black lipid-membrane, eingebaut, die zwei Elektrolyt-gefüllte Kompartimente trennt. Über zwei Elektroden wird eine Spannung angelegt und von einem potentiostatischen Rückkopplungsverstärker konstant gehalten. In der Folge fliesst ein der Porenleitfähigkeit proportionaler Strom von ca. einem bis einigen 100 Pikoampère durch die Pore, dem der zur Spannungserhaltung nötigen Ausgleichsstrom entspricht (Spannungsklemme, engl. voltage clamp). Verfährt sich ein zu detektierendes bzw. zu analysierendes Molekül in der Pore, kommt es zu einem kurzzeitigen Stromabfall, der als Widerstandspuls gemessen wird (Widerstandspulsdetektor). Zahlreiche Experimente mit verschiedensten Poren und unterschiedlichsten Analyten haben gezeigt, dass der Widerstandspuls, bedingt durch spezifische molekulare Interaktionen im Porenrinnen, Rückschlüsse auf das zu analysierende Molekül erlaubt, z. B. auf dessen Grösse. Was sich mit Ionenkanälen und Porinen alles detektieren und unterscheiden lässt – Wasserstoff von Deuterium-Ionen, Einzelstrang-RNA und -DNA, kleine organische Moleküle, spezifische Zucker, Polyethylenglykol-(PEG)-Oligomere, usw. – haben Wissenschaftler vom National Institute of Standards and Technology in Gaithersburg, Maryland, 2008 im Fachmagazin «Annual Review of Analytical Chemistry» zusammengetragen.

## Schnelle DNA-Sequenzierung möglich

Die Hoffnungen der Forscher reichen bis zur schnellen, zerstörungsfreien DNA-Sequenzierung an nur einem DNA-Strang ohne vorherige Amplifikation durch PCR: «6000 s to sequence an entire human genome!», haben die Autoren errechnet. Noch sind allerdings diverse Hürden zu überwinden. Ein Hauptproblem ist der geringe Sig-

# ILMAC<sup>///</sup> LOUNGES

Meet the Community

**23.–25.09.2014**  
**Messe Basel**

Pharma

Food

Laboratory

Biotech

Cleanroom

**ILMAC Lounges in Basel**  
**Jetzt anmelden auf**  
**[www.ilmac-lounges.ch](http://www.ilmac-lounges.ch)**

Eine Kooperation der Partner



inspire

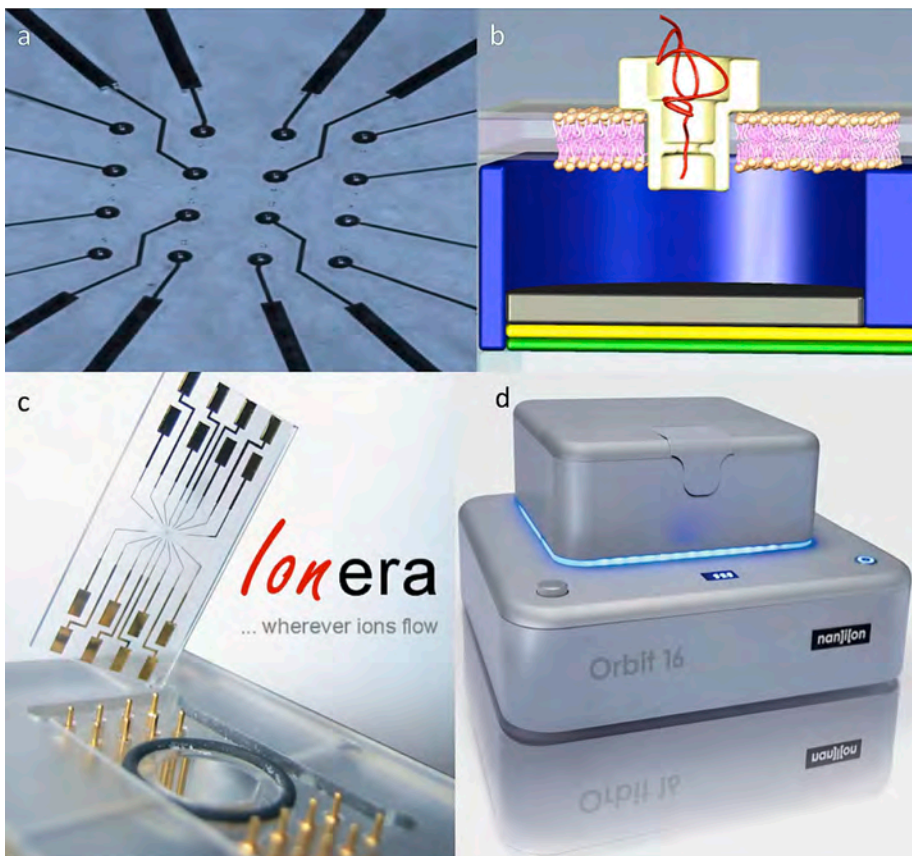
nal-Rausch-Abstand bzw. die geringe Zeitauflösung der Messung.

Mit dem Ziel, die porenbasierte Einzelmolekülanalyse sensibler, effizienter und auch unerfahrenen Experimentatoren zugänglich zu machen, haben Elektrophysiologen und Mikrosystemtechniker aus den Forschungsgruppen von Jan Behrends, Professor am Institut für Physiologie, und Jürgen Rühle, Professor am Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK) der Universität Freiburg, den Versuchsaufbau in ein mikrostrukturiertes Array-Format auf Mikrochipbasis übersetzt. Unterstützt werden sie dabei u. a. durch das Förderprogramm «EXIST - Existenzgründungen aus der Wissenschaft» des deutschen Bundesministeriums für Wirtschaft und Energie. Inzwischen wurden alle Schritte, angefangen beim Aufbau der Lipiddoppelschicht bis hin zur elektrischen Messung, automatisiert. Im Januar 2014 erfolgte die Firmengründung. Dr. Gerhard Baaken, der sich dem Technologietransferprojekt bereits während seiner Doktorarbeit am IMTEK widmete, führt die Geschäfte der frisch gegründeten Ionera Technologies GmbH. Sein

Team will das System bis zur Marktreife weiterentwickeln, der Vertrieb soll anschliessend von Partnerfirmen übernommen werden, darunter die 2002 in München von Behrends und Kollegen gegründete Firma Nanion Technologies GmbH. «Unsere Arbeitsgruppe war die erste, die die Patch-Clamp-Technik in ein Chip-basiertes Format übersetzen konnte. Inzwischen hat die Firma Nanion, eine Ausgründung der Universität München, Tochterunternehmen in den USA und China und beschäftigt an die 50 Mitarbeiter», freut sich Elektrophysiologe Behrends. 2004 folgte er einem Ruf nach Freiburg und kontaktierte am dortigen IMTEK den Grenzflächenexperten Jürgen Rühle. Behrends Idee: Der Patch-Clamp-Technik zu echter Hochdurchsatztauglichkeit zu verhelfen, indem u. a. die zur Messung nötigen Elektroden miniaturisiert würden.

#### Vollautomatisiertes System

«Wir haben dann zunächst zwecks Vereinfachung mit künstlichen Membranen experimentiert und nach einer extremen Miniatur-

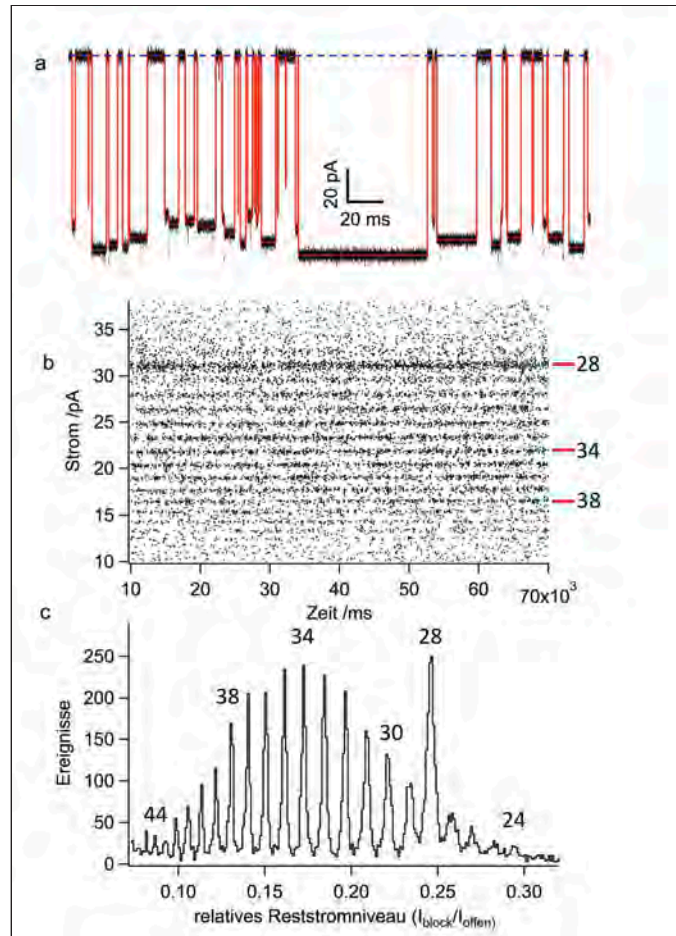


Ioneras MECA-Chip und das Messgerät Orbit-16 von Nanion. a) Die 16 Microelektrodenkavitäten des Arrays sind auf einer zentralen Fläche von 800 x 800 µm angeordnet. b) Schema einer Mikroelektrodenkavität. c) MECA Chip in der Gesamtansicht mit Kontaktpins und Messkammer. d) Das erste Messgerät für die MECA-Chiptechnologie, der Orbit-16, eine generische Plattform für parallele Messungen an synthetischen Membranen.

(Bilder: a–c: Uni Freiburg; c: Ionera Technologies; d: Nanion Technologies)

risierung der Elektroden ein so stabiles System erhalten, dass eine Verwendung zur hochauflösenden Einzelmolekülanalyse mit biologischen Nanoporen auf der Hand lag», erklärt Behrends. Herzstück der sogenannten Micro Electrode Cavity Array-(MECA)-Technologie ist eine Anordnung aus 16 unabhängig adressierbaren, Mikroelektrodenkontaktierten zylindrischen Vertiefungen (Micro Electrode Cavities, MECs) mit einem Volumen von weniger als einem Pikoliter, die im Abstand von nur 200 Mikrometern zueinander auf einem Glaswafer angeordnet werden. Eine der beiden nicht polarisierbaren, nanoporösen Silber/Silberchlorid-Mikroelektroden wird am MEC-Boden elektrochemisch aus Silbernitrat abgeschieden und anschliessend chloriert. Sie ist über koplare mikroskopische Goldleiterbahnen mit dem Verstärker verbunden und durchmisst lediglich 10 bis 50 Mikrometer, was sehr rauscharme Gleichstrommessungen erlaubt. Die MECs werden fotolithografisch aus fotosensitivem SU-8-Fotolack realisiert, eine Adhäsionsschicht und die Goldleiterbahnen werden mittels Elektronenstrahlverdampfung abgeschieden. Die von Ionera patentierte «Spread-Technologie» erlaubt den gleichzeitigen Aufbau von 16 Lipiddoppelschichten durch fernbedientes «Pinseln» mittels eines winzigen Magnetrührfischchens, das auf den MECs Taumelbewegungen ausführt: Eine automatisierte Variante der 1963 im «Journal of Physical Chemistry» von Paul Müller, Donald Rudin und Kollegen publizierte Methode zur Erzeugung einzelner bimolekularer Lipidmembranen in wässrigen Systemen. Nanion hat für Ionera das Aufnahmegerät Orbit 16 gebaut, welches den MECA 16-Chip aufnimmt, für die Kontaktierung, Fluidik und Temperaturkontrolle sorgt und die simultane Aufnahme der Messdaten erlaubt. Die Membranen werden auf einfachen Knopfdruck hin erzeugt. Ausserdem integriert das Gerät einen Anschluss für jeden beliebigen Einzel- oder Mehrkanalverstärker.

«Einzig bei der Rekonstitution der Membranporen begegnen wir noch Problemen, hier kämpfen wir sozusagen mit der Poisson-Verteilung und sehen neben dem gewünschten Einbau von nur einer Pore pro MEC auch den Einbau von mehreren Poren sowie porenfreie Membranen», räumt Behrends ein. Im Fall von alpha-Hämolyisin, das von dem Bakterium *Staphylococcus aureus* als wasserlösliches Protein ausgeschieden und an der Membran infizierter Wirtszellen in mehreren Stufen zum funktionstüchtigen



**Einzelmolekül-Massenspektrometrie mithilfe von biologischen Nanoporen.**  
 a) Aufzeichnung des Ionenstroms durch eine einzelne alpha-Hämolyisin-Pore in Gegenwart von polydisperser Poly(ethylenglycol) mit einer mittleren Molmasse von 1500 g/mol (PEG-1500) sowie einem Zusatz eines weitgehend monodispersen PEG mit 28 Wiederholeinheiten (PEG-28, MW=1251 g/mol).  
 b) Sequenzielle Darstellung der Stromniveaus von ca. 10 000 Blockadeereignissen während einer Messung über eine Minute.  
 c) Histogramm der auf den Offenstrom normierten Reststromniveaus während der Blockaden.

(Bilder: Tianyang Zheng, Gerhard Baaken, Jan C. Behrends, Uni Freiburg, und Ionera Technologies).

Heptamer zusammengesetzt wird, liesse sich der Einbau aber bereits sehr gut kontrollieren, verrät der Elektrophysiologe. Die alpha-Hämolyisin-Pore, eines der ersten in der Literatur beschriebene membranporenbildenden Toxine, kann z.B. zur hochauflösenden Massenspektrometrie polydisperser PEG-Mischungen eingesetzt werden. Inzwischen sind über hundert Toxine bekannt, die ihre Virulenz durch Porenbildung in Wirtsmembranen entfalten. Ausserdem gibt es resistente Bakterien, die Antibiotika mittels transmembranärer Pumpsysteme effizient und wenig substratspezifisch über die Zellmembran wieder aus ihrem Zellinneren hinausbefördern können.

#### Ziel: Innovative Medikamente

Im Rahmen des Programms «New Drugs for Bad Bugs» der europäischen «Initiative für Innovative Medikamente» sollen Forscher aus Industrie und Akademie bei dem Projekt «Translocation» molekularbiologische Prozesse des Antibiotika-Transports über bakterielle Zellwände und Membranen sowie bakterielle Resistenzmechanismen erforschen. «Nanion ist als Projektpartner bereits mit von der Partie, viel-

leicht kann auch Ionera einsteigen», hofft Behrends. Der Freiburger Start-up lässt erste Geräte am Technion in Haifa, am University College in London, an der Technischen Universität in München (TUM) und demnächst an den Universitäten von Evry und Cergy bei Paris erproben. Die Gruppe von TUM-Professor Friedrich Simmel nutzt das Gerät z.B. zur Untersuchung künstlicher Membrankanäle aus selbstassozierten DNA-Nanostrukturen, Stichwort «scaffolded DNA-Origami». Die Designer-Poren verhalten sich wie natürliche Ionenkanäle und können zur Unterscheidung einzelner DNA-Moleküle eingesetzt werden, wurde 2012 im Fachjournal *Science* berichtet. Natürlich nutzt auch Behrends Gruppe die MECA-Technologie. Zusammen mit dem Strassburger Polymerchemiker Jean-François Lutz vom Institut Charles Sadron sollen Nanoporen u.a. als Massenspektrometer zur Analyse genau definierter Co-Block-Polymere eingesetzt werden. Das Fernziel: Die während der Synthese in das Polymer hineingesteckten Informationen wieder verlässlich auszulesen und dabei mehr über die molekularen Interaktionen in Membranporen herauszufinden. ■