

Detektion und Synthese eines liganden-gesteuerten Ionenkanals im mikrofluidischen Analysesystem

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Angelika Murr
Geboren am 13.07.1981 in Troisdorf

Mainz, 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zusammenfassung

Membranproteine spielen eine wichtige Rolle bei physiologischen Prozessen wie Signalweiterleitung oder Immunreaktion. Deshalb stehen sie im Fokus der pharmakologischen Wirkstoffentwicklung und es besteht großes Interesse, Membranprotein-basierte Biosensoren zu entwickeln, die sich z.B. als Screening-Plattformen eignen. Allerdings stellt die Handhabung von Membranproteinen wegen ihrer amphiphilen Struktur eine große Herausforderung dar. Membranproteine werden meist in Zellkultur oder in bakteriellen Expressionssystemen synthetisiert. Diese Verfahren liefern aber oft nur eine geringe Ausbeute und erlauben wenig Kontrolle über die Expressionsbedingungen. Als alternativer Ansatz bietet sich stattdessen die *in vitro* Synthese von Proteinen an, die in einer zellfreien Umgebung stattfindet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines miniaturisierten Analysesystems, das Aktivitätsmessungen an *in vitro* synthetisierten Ionenkanälen erlaubt. Dafür wurde ein Lab-on-Chip entwickelt, der elektrochemische und optische Nachweismethoden in parallelen Anätzen ermöglicht. Als amphiphile Umgebung für die Inkorporation von Membranproteinen wurden vier verschiedenen biomimetische Membranaufbauten hinsichtlich ihrer Dichtigkeit und ihrer Reproduzierbarkeit untersucht. Als Methode fanden insbesondere die Impedanzspektroskopie und die Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie Anwendung. Die *peptide cushioned Bilyer Lipid Membranes* (pcBLM) eignete sich dabei am besten für Untersuchungen an Membranproteinen.

Zur Detektion der Ionenkanalaktivität wurde eine neue Messmethode etabliert, die auf der Messung der Impedanz bei fester Frequenz basiert und u.a. eine Aussage über die Änderung des Membranwiderstandes bei Aktivierung erlaubt. Am Beispiel des nicotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) konnte gezeigt werden, dass sich die Aktivität von Ionenkanälen mit dem entwickelten Chip-System nachweisen ließ. Die Spezifität der Methode konnte durch verschiedene Kontrollen wie die Zugabe eines nicht-aktivierenden Liganden oder Inhibition des Rezeptors nachgewiesen werden.

Weiterhin konnte die *in vitro* Synthese des Ionenkanals $\alpha 7$ nAChR durch Radioaktivmarkierung nachgewiesen werden. Die Inkorporation des Rezeptors in die biomimetischen Membranen wurde mit Immunodetektion und elektrochemischen Methoden untersucht. Es zeigte sich, dass die funktionelle Inkorporation des $\alpha 7$ nAChR davon abhing, welcher biomimetische Membranaufbau verwendet wurde.

Abstract

Membrane proteins play important roles in various physiological processes like signal transduction or immunoreaction. Moreover they represent the vast majority of drug targets. This leads to a huge interest in developing membrane protein-based biosensors that can be used for example as screening platforms. Nevertheless the handling of membrane proteins is rather difficult due to their amphiphilic structure. Mostly they are expressed in cell lines or bacterial expression systems. This often results in low yields of purified protein and allows little control over the expression conditions. An alternative strategy is the *in vitro* expression of proteins in a cell-free environment.

The aim of the work was the development of a miniaturized analysis system that allows the activity detection of *in vitro* expressed ion channels. Therefore a lab-on-chip was developed that could be used simultaneously for electrochemical and optical detection. As amphiphilic environment for membrane proteins four biomimetic membranes were tested. Their density and reproducibility were examined by impedance spectroscopy and surface plasmon resonance spectroscopy. Among the four tested membranes the so called *peptide cushioned bilayer lipid membrane* (pcBLM) could be identified as the most suitable for ion channel detection.

For the measurement of ion channel activity a new electrochemical method was established that provides information about the changes in membrane resistance.

With the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) as a model protein it was demonstrated that the analysis system could be applied for the detection of ion channel activity. The specificity of the method was verified by different controls like addition of a non-binding ligand or inhibition of the protein.

The *in vitro* expression of the ion channel $\alpha 7$ nAChR was shown by radioactive labelling. The incorporation of the receptor was analysed by immunodetection and electrochemical methods. It was found that the functional incorporation of the $\alpha 7$ nAChR depended on the type of the biomimetic membrane.

1	MOTIVATION	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	2
2.1	Biomimetische Membranen	2
2.1.1	Die Zellmembran	2
2.1.2	Modellmembranen	3
2.1.3	Modellmembranen für Biosensoren	12
2.2	Membranproteine	14
2.2.1	Rezeptorproteine	14
2.2.2	Der nicotinic Acetylcholin Rezeptor (nAChR)	16
2.2.3	Die <i>in vitro</i> Synthese (IVS)	20
2.3	Mikrofluidische Analyse Systeme	25
2.3.1	Kurze Historie	25
2.3.2	Biosensoren	26
2.3.3	Vorteile von LoCs als Biosensoren	27
3	ZIEL DER ARBEIT	28
4	METHODEN	29
4.1	Elektrochemische Impedanz Spektroskopie (EIS)	29
4.1.1	Theorie der EIS	29
4.1.2	Interpretation der Daten	31
4.1.3	Auf der Suche nach dem richtigen Modell	37
4.1.4	Die elektrische Doppelschicht	40
4.1.5	Impedanzmessungen mit Biosensoren	42
4.2	Cyclische Voltammetrie (CV)	43
4.3	Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie (SPR, Surface Plasmon Resonance)	45
4.3.1	Oberflächenplasmonen und wie sie angeregt werden	45
4.3.2	Der SPR-Messaufbau	50
4.3.3	Scan-Messung und Kinetik-Messung	52
4.3.4	Oberflächenplasmonen verstärkte Fluoreszenzspektroskopie (SPFS, surface plasmon fluorescence spectroscopy)	53
4.4	Biomimetische Modellmembranen	56
4.5	Biochemische Methoden	65
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	69
5.1	Entwicklung und Charakterisierung einer mikrofluidischen Analyseplattform zur Detektion von Ionenkanälen	70
5.1.1	Der mikrofluidische Chip	70

5.1.2	Der Elektroden-Array	71
5.1.3	Zusammenfassung	82
5.2	Etablierung und Charakterisierung biomimetischer Membranen	83
5.2.1	Tethered Bilayer Lipid Membrane (tBLM) am Beispiel von Lipidvesikel-Spreitung auf DPTL	84
5.2.2	Peptide cushioned Bilayer Lipid Membrane (pcBLM) am Beispiel von Lipidvesikel-Anlagerung an cBSA	87
5.2.3	Solid supported Membrane (SSM) – Anlagerung einer Lipiddoppelschicht an eine hBLM am Beispiel von Lipidvesikel-Anlagerung auf ODT + DPhyPC	94
5.2.4	Block-Copolymere (BCP) am Beispiel von ABA Triblock-Copolymeren	97
5.2.5	Zusammenfassung	98
5.3	Etablierung einer elektrochemischen Messmethode zur Detektion der Aktivität von liganden-gesteuerten Ionenkanälen	100
5.4	Validierung des Chipsystems mittels Aktivitätsmessung an überexprimierten Membranproteinen	111
5.4.1	Aufbau einer biomimetischen Schicht mit Membranfragmenten	111
5.4.2	Proteinnachweis mittels Antikörperfärbung	114
5.4.3	Detektion der Aktivität eines liganden-gesteuerten Ionenkanals in Membranpräparationen	115
5.4.4	Zusammenfassung	126
5.5	In vitro Synthese und funktioneller Einbau des nAChR in biomimetische Membranen	129
5.5.1	Anwendbarkeit der IVS in mikrofluidischen Chipsystemen	129
5.5.2	<i>In vitro</i> Synthese des $\alpha 7$ nAChR	131
5.5.3	<i>In vitro</i> Synthese und funktioneller Einbau des nAChR in biomimetische Membranen	134
5.5.4	Zusammenfassung	148
6	ZUSAMMENFASSUNG	150
7	AUSBLICK	153
8	LITERATURVERZEICHNIS	155
9	ANHANG	I
9.1	A1 Chemikalien	i
9.2	A2 Plasmidkarte und Sequenzen	iii
9.3	A3 Mathematica	v

Abkürzungsverzeichnis

μTAS	micro total analysis system (Mikroanalyzesystem)
AE	Arbeitselektrode
AFM	atomic force microscope (Rasterkraftmikroskop)
BCP	Block-Copolymere
BLM	Black Lipid Membrane (Schwarzfilmmembran)
BTX	Bungarotoxin
Carb	Carbamoylcholinchlorid
cBLM	cushioned bilayer lipid membrane (gepolsterte Lipiddoppelschicht Membran)
cBSA	cationic bovine serum albumin (kationisches Rinder Serumalbumin)
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
COC	cyklisches Olefin Copolymer
CPE	constant phase element (konstantes Phasenelement)
CV	cyclic voltammetry (zyklische Voltammetrie)
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPhyPC	Diphytanoylphosphatidylcholin
DPTL	Diphytanyl-glycerol-tetraethylene glycol-lipoic acid ester lipid
EcEx	Expressionssystem aus E.coli
EIS	electrochemical impedance spevtrosopy (elektrochemische Impedanzspektroskopie)
EtOH	Ethanol
GE	Gegenelektrode
Glu	Glutamat
GluR-Mem	Membranfragmente mit Glutamatrezeptoren
GPCR	G-protein coupled receptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor)
GUV	giant unilamellar vesicles (riesige unilamellare Vesikel)
hBLM	hybrid bilayer lipid membrane (hybrid Lipiddoppelschicht Membran)
IVS	<i>in vitro</i> Synthese
LGIC	ligand gated ion channel (ligandengesteuerter Ionenkanal)
LoC	Lab-on-Chip
LUV	large unilamellar vesicles (große unilamellare Vesikel)

mGluR	metabolischer Glutamatrezeptor
MLV	multilamellar vesicles (multilamellare Vesikel)
MP	Membranprotein
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
Nic-Mem	Membranfragmente mit nikotinischen Rezeptoren
NMG	N-Methyl-D-Glucamin
ODT	Octadekanthiol
PBS	Phosphate buffered solution (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PC	Phosphatidylcholin
PDMS	Polydimethylsiloxan
RE	Referenzelektrode
rER	rauhe Endoplasmatische Retikulum
RetEx	Expressionssystem aus Retikulozyten
SAM	self-assembled monolayers (selbst-organisierte Monolagen)
sBLM	supported bilayer lipid membrane (unterstützte Lipiddoppelschicht Membran)
SDS- PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel-electrophoresis (Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid)
SP	surface plasmon (Oberflächenplasmon)
SPFS	surface plasmon fluorescence spectroscopy (Oberflächenplasmonen Fluoreszenz Spektroskopie)
SPR	surface plasmon resonance (Oberflächenplasmonen Resonanz)
SRP	signal recognition particels (Signalerkennungspartikel)
SSM	solid supported membran (Festkörpergestützte Membran)
SUV	small unilamellar vesicles (kleine unilamellare Vesikel)
tBLM	tethered bilayer lipid membrane (gebundene Lipiddoppelschicht Membran)
Torp-Mem	Membranfragmente aus Torpedo
VSV	Vesikuläres Stromatitis Virus

1 Motivation

Membranproteine spielen eine entscheidende Rolle in allen physiologischen Prozessen. 60 % aller Medikamente auf dem Markt greifen an Membranproteinen an ^[1]. So ist es nicht verwunderlich, dass der Erforschung ihrer Struktur und Funktionalität gerade in der pharmazeutischen Industrie viel Aufmerksamkeit gewidmet wird. Membranproteine können sowohl für Screeninganwendungen neuer Wirkstoffe als auch für Biosensoren zur Detektion kleinster Stoffmengen eingesetzt werden. Es besteht daher ein großer Bedarf an biomimetischen Plattformen, die die Handhabung von Membranproteinen außerhalb der komplexen zellulären Umgebung erlauben und gleichzeitig die Möglichkeit einer Detektion der Aktivität von Membranproteinen bieten. Für diesen Zweck wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene Strategien zur Erzeugung biomimetischer Modellmembranen entwickelt ^[2].

Ein kritischer Schritt bei der Anwendung von mit Membranproteinen funktionalisierten Modellmembranen ist der Einbau der Membranproteine. Denn die Synthese, Aufreinigung und Rekonstitution von Membranproteinen in Modellsysteme ist mit einigen Schwierigkeiten verbunden, da die korrekte Funktionalität der Proteine von ihrer strukturellen Integrität abhängt. Als alternativer Ansatz zeichnet sich hierbei die *in vitro* Synthese von Membranproteinen ab, bei welcher der zelluläre Kontext umgangen wird. Allerdings ist die *in vitro* Synthese und Inkorporation von Membranproteinen in Modellmembranen ein noch eher wenig erforschtes Gebiet.

Die Motivation dieser Arbeit liegt nun darin, die Anwendbarkeit von Membranproteinen in biomimetischen Membranen als Sensoreinheit in einem miniaturisierten Analysesystemen zu untersuchen, wobei das Analysesystem sowohl Anwendung als Screening-Plattform wie auch als Biosensor finden kann.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Biomimetische Membranen

Die Zelle wird oft als kleinste Einheit des Lebens bezeichnet. Ein Großteil der physiologischen Prozesse wie Signalweiterleitung, Wirkstoffbindung oder Immunreaktionen beinhaltet Vorgänge bei denen Membranproteine in der Zellmembran beteiligt sind. Die Untersuchung dieser Prozesse ist z.B. für die pharmazeutische Industrie von großem Interesse und stellt die Forschung vor einige Herausforderungen. So hängt die Funktionalität der Membranproteine von ihrer Struktur ab. Um die strukturelle Integrität der Proteine auch in vitro zu erhalten muss eine Umgebung zur Verfügung gestellt werden, die in ihren Eigenschaften der natürlichen Zellmembran ähnelt.

2.1.1 Die Zellmembran

Zellmembranen sind ein essentieller Bestandteil eines jeden Organismus und bilden die Barriere zwischen intra- und extrazellulär Raum. Die Zellmembran setzt sich aus verschiedenen Komponenten wie Lipiden, integralen Proteinen, Cholesterol oder Zuckern zusammen. Diese tragen zu den von vielfältigen Prozessen bei.

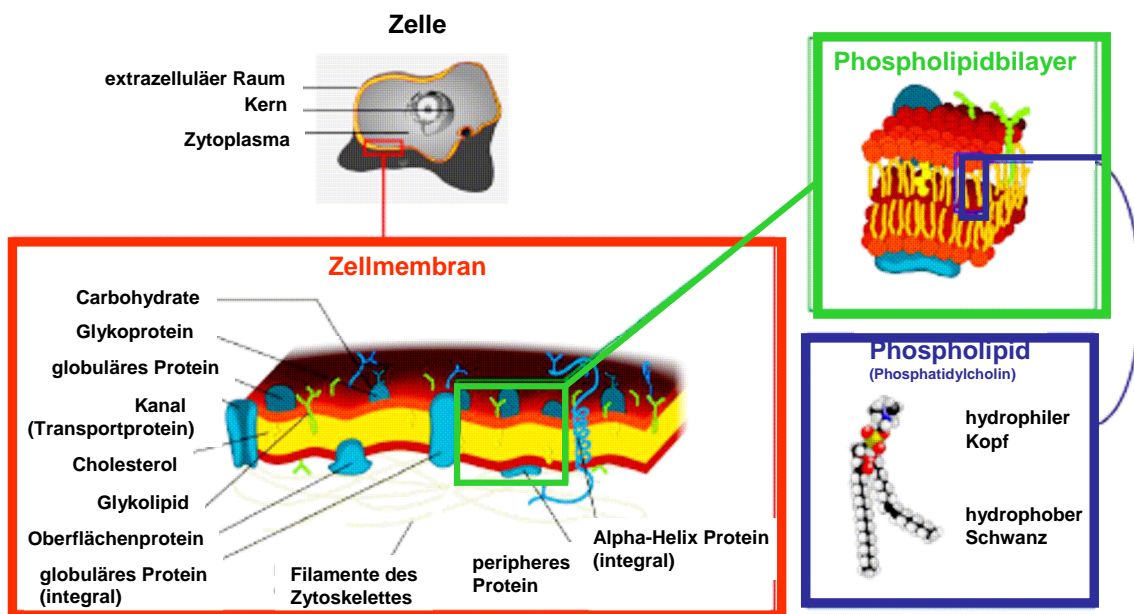


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Zellmembran und ihrer Komponenten ^[3]

Die Matrix der Zellmembran besteht aus Lipiden. Dies sind amphiphile Moleküle mit einem hydrophoben Schwanz aus zwei Alkylketten und einer hydrophilen Kopfgruppe. In biologischen Membranen kommen über 100 verschiedene Lipide vor, die sich in der Ladung der hydrophilen Kopfgruppe, der Länge und Komposition der hydrophoben Alkylketten sowie der Anzahl an ungesättigten Bindungen unterscheiden ^[4]. Auf Grund energetischer Effekte ordnen sich die Lipidmoleküle in wässriger Lösung so an, dass die hydrophile Gruppe nach außen weist und der hydrophobe Schwanz im inneren eingeschlossen wird. Die Zellmembran wird dabei von einer Lipiddoppelschicht (~ 5 nm) mit einem hydrophilen Äußeren und einem hydrophoben Kern gebildet ^[5].

Der Aufbau der Zellmembran kann durch das Fluid-Mosaik-Modell von Singer und Nicholson beschrieben werden ^[6], welches besagt, dass die Zellmembran ein fluides Mosaik darstellt, in dem Proteine lateral diffundieren können - wie in einer viskosen Flüssigkeit, die durch die Lipiddoppelschicht gebildet wird. Kanäle und Carrier ermöglichen den Transport von geladenen oder großen Molekülen über die Membran. Der Austausch mit der Umgebung kann jedoch nicht nur mittels Proteinen stattfinden. Auch die Lipiddoppelschicht wirkt wie einen hochspezifischen Filter für kleine Moleküle die je nach ihrer Lipophilie die Membran durchqueren können ^[7].

Die Zellmembran ist somit ein hoch komplexes Gebilde, dessen Funktion durch Zusammensetzung und Struktur der Komponenten bestimmt wird.

2.1.2 Modellmembranen

Für die Erforschung der Struktur und Funktion von Membranproteinen spielen Modellmembranen eine wichtige Rolle. Man spricht auch von künstlichen oder biomimetischen Membranen bzw. Lipiddoppelschichten, da sie die Zellmembranen nachbilden. Sie bieten die Möglichkeit eine kontrollierte Umgebung für Membranproteine zu schaffen, und diese dadurch für oberflächengebundene Messmethoden zugänglich zu machen, die bei lebenden Zellen nicht anwendbar sind. So können bestimmte Typen von Modellmembranen z.B. mit optischen oder elektrochemischen Methoden näher untersucht werden.

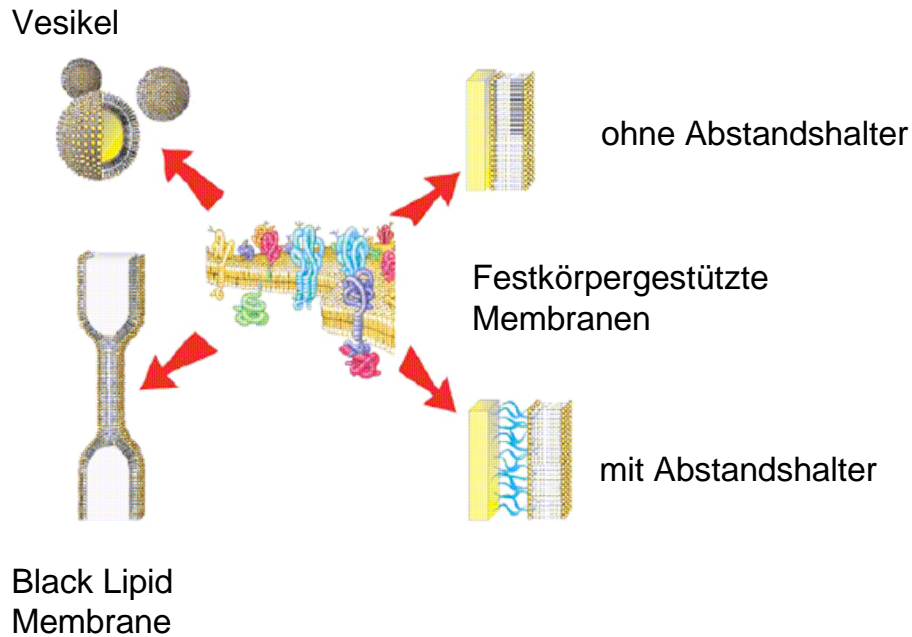


Abb. 2: Verschiedene Modellmembransysteme ^[8]

Abb. 2 zeigt eine Übersicht von Modellmembranen, die in der Forschung Verwendung finden und kurz näher erläutert werden.

(A) *Black Lipid Membranes (Schwarzfilmmembranen)*

Bereits 1962 stellten Müller et al. die erste BLM her ^[9]. Bei BLMs werden Phospholipide in einem organischen Lösungsmittel gelöst und über ein kleines Loch (typische Durchmesser ~100 μm) in einer Teflonfolie oder einem Polymerzylinder gestrichen. Dabei entsteht zuerst ein relativ dicker Lipidfilm (> 100 nm) der dann durch den höheren Wasserdruck von selber ausdünn, bis sich eine Lipiddoppelschicht gebildet hat (vgl. Abb. 3). Dieser Prozess kann optisch verfolgt werden, da sich wegen der Interferenz an der Grenzschicht zwischen Lipid und Wasser die Farbe der Lipidschicht mit ihrer Dicke ändert. Zunächst ist sie grau, schimmert dann bunt wie ein Ölfilm und wird letztendlich schwarz auf Grund von destruktiver Interferenz des an den beiden hydrophilen/hydrophoben Grenzschichten reflektierten Lichts. Daher der Name Black Lipid Membrane.

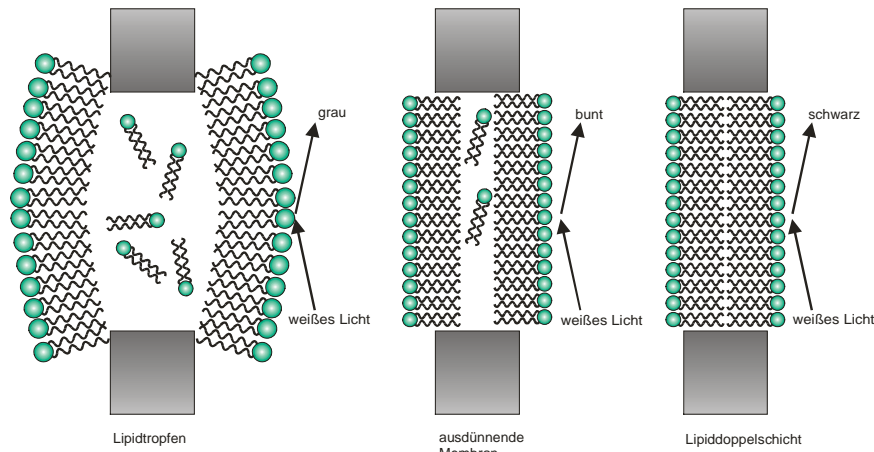


Abb. 3: Präparation einer Black Lipid Membrane (nach ^[5])

Nach Bildung der Doppelschicht verbleibt ein Rest an Lösungsmittel im hydrophoben Kern, der Funktion und Struktur inkorporierter Membranproteine beeinflussen kann. Von Montal et al wurde eine lösungsmittel-freie Methode vorgeschlagen ^[10]. Lipide in Lösungsmittel werden an einer Wasser / Luft Grenzfläche als monomolekularer Film aufgebracht. Wiederholtes Absenken der Öffnung durch diesen Film führt zur Bildung einer Lipiddoppelschicht, die nahezu kein Lösungsmittel enthält.

BLMs verfügen über gute isolierende Eigenschaften. Die Widerstände von mehreren M Ω sind denen von natürlichen Zellmembranen vergleichbar. In BLMs lassen sich auch Ionenkanäle und Transporter einbringen. Da beide Seiten der Lipiddoppelschicht leicht zugänglich sind, können elektrochemische und elektrophysiologische Methoden wie Patch-Clamp Verfahren angewandt werden ^[11].

Ein Nachteil der BLMs ist jedoch ihre geringe Stabilität. Da sie freispannend über einem Loch ruhen, reißen sie schnell bei Erschütterungen (mechanischen wie akustischen). Die Lebensdauer dieser BLMs ist auf wenige Stunden beschränkt. Daher wird versucht ihre Stabilität z.B. durch das Einbringen von Hydrogelen zu erhöhen ^[12].

(B) Vesikel

Unter Vesikeln versteht man sphärische Anordnungen von Lipiden in wässriger Lösung. Sie bilden sich bei einer Dispersion von Lipiden in Wasser ab einer bestimmten Konzentration. Diese nennt sich Mizellenbildungskonzentration und ist vom Lipidtyp abhängig.

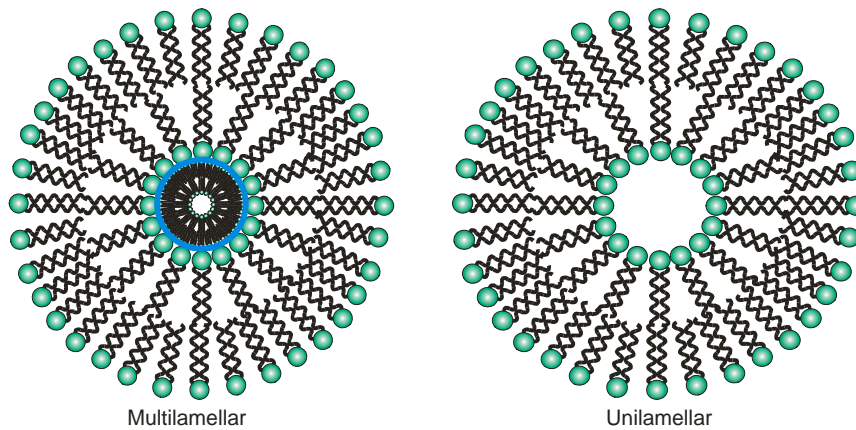


Abb. 4: Struktur multilamellarer und unilamellarer Vesikel

Man unterscheidet zwischen multilamellaren (MLV) und unilamellaren Vesikeln. MLVs sind mehrschichtige Vesikel bei denen die konzentrischen Sphären durch Wasserschichten von einander getrennt sind. Sie entstehen von selber in wässriger Lösung und haben oft eine sehr inhomogene Größenverteilung. Unilamellare Vesikel kann man nach ihrer Größe in kleine unilamellare Vesikel (SUV; small unilamellar vesicles) $\varnothing < 100$ nm, große unilamellare Vesikel (LUV; large unilamellar vesicles) $\varnothing 100$ nm - 1 μ m, und riesige unilamellare Vesikel (GUV; giant unilamellar vesicles) $\varnothing > 1$ μ m unterteilen.

SUVs werden v.a. bei der Untersuchung von Proteinen in Suspension und als Vorstufe der Vesikelfusion auf Oberflächen (s.u) verwendet. Man erhält sie wenn man eine Lipidlösung mit Ultraschall behandelt ^[13], sie mehrmals rasch einfriert und auftaut ^[14] oder durch eine Porenmembran drückt (extrudiert) ^[15]. Durch Extrudieren erhält man zusätzlich auch eine homogene Größenverteilung. SUVs können entweder als sogenannte Liposomen in Lösung verwendet werden oder auf Oberflächen fusionieren. LUVs und GUVs können für mikroskopische Untersuchungen wie z.B. Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden ^{[16],[17]}. Freie Liposomen eignen sich zwar für die Inkorporation von Proteinen, sind aber nur für eine beschränkte Anzahl an Messmethoden zugänglich. Mit Fluorophoren können u.a. Transportprozesse beobachtet werden. Die Messung von Ionenströmen bei Proteinaktivität ist jedoch nur bei einigen wenigen Ausnahmen möglich, wie z.B. Patch-Clamp-Messungen an GUVs ^[18].

Vesikel sind stabiler als BLMs und haben eine Lebensdauer von mehreren Tagen bis Wochen. Wenn eine örtliche Fixierung wünschenswert ist, können Vesikel auch an Oberflächen gebunden werden, z.B. mittels Oligonucleotid-Sequenzen ^[19] oder Biotin-Streptavidin Bindungen ^[20].

(C) Festkörpergestützte Membranen

Festkörpergestützte Membranen bieten eine Lösung für das Problem der mangelnden Stabilität von BLMs und Vesikeln. In ihrem Fall wird die Lipidschicht direkt auf einem festen Substrat wie Glas ^[21], Gold ^[22], Indiumzinnoxid (ITO, indium tin oxid) ^[23], Aluminiumoxid^[24] oder Polymer (z.B. COC) ^[25] aufgebracht. Der Kontakt und die starke Wechselwirkung zwischen Lipiden und Substrat führen zu einer hohen mechanischen Stabilität der Membran. Festkörpergestützte Membranen können mit verschiedenen Messmethoden wie Rasterkraftmikroskopie (AFM), Quarzmikrowage, Infrarotspektroskopie, Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie (SPR, surface plasmon resonance) oder elektrochemischer Impedanzspektroskopie (EIS) untersucht werden. ^[26] Die Wahl des Substrates hängt dabei von der angewandten Messmethode ab. Für optische Untersuchungen empfiehlt sich ein transparentes Substrat; für elektrochemische Charakterisierungen benötigt man dagegen ein leitendes Material wie Gold oder ITO.

Man unterscheidet, ob die Lipide direkt auf das Substrat aufgebracht werden (supported Bilayer Lipid membranes) oder durch einen Anker molecule daran angebunden sind (tethered Bilayer Lipid membranes).

Supported Bilayer Lipid Membranes (sBLMs)

Bei sBLMs ist die Lipiddoppelschicht im direkten Kontakt zum festen Substrat.

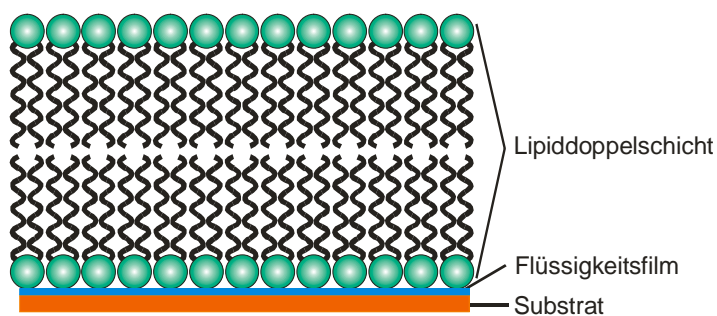


Abb. 5: Schematische Darstellung einer direkt auf eine Oberfläche aufgetragenen festkörpergestützten Membran (sBLM). Zwischen Substrat und Lipiddoppelschicht befindet sich ein dünner Flüssigkeitsfilm

Die Bildung von sBLMs erfolgt durch Physisorption. Die Lipide werden direkt auf die Substrat Oberfläche aufgebracht. Dies geschieht entweder durch die Fusion von Vesikeln ^{[27],[28]} oder durch Langmuir-Blodgett-Transfer (LB-Transfer) ^{[29],[30]} auf hydrophilen Oberflächen.

Beim LB-Transfer werden Lipide in unpolarem Lösungsmittel (meist Chloroform) gelöst und auf eine Wasser/Luft Grenzfläche aufgebracht. Die Lipide lagern sich dabei so an, dass der hydrophile Kopf zum Wasser weist und der hydrophobe Schwanz zur Luft. Das hydrophile Substrat wird nun bei definiertem Oberflächendruck in die Lösung getaucht und senkrecht wieder herausgezogen. Dabei übertragen sich die Lipide. Die Doppelschicht wird durch erneutes Eintauchen vervollständigt. Ein Vorteil des LB-Transfers ist, dass man auch asymmetrische Membranen erzeugen kann.

Der Mechanismus der Vesikelfusion ist noch nicht vollständig verstanden. Man vermutet, dass zunächst einzelne Vesikel an der Oberfläche adsorbieren. Diese fusionieren mit anderen Vesikeln in der Lösung zu größeren Vesikeln, welche auf Grund des Kontakts mit der Oberfläche einseitig abflachen. Abhängig von der Adhäsionskraft der Oberfläche und dem Krümmungsradius reißen die Vesikel auf und bilden flächige Lipiddoppelschicht-Stücke. Diese einzelnen Bereiche fusionieren wiederum, bis die gesamte Oberfläche bedeckt ist.^{[31]-[33]} Bei ausreichend hoher Vesikelkonzentration entsteht dadurch eine defektfreie Lipidschicht. Die Vesikelfusion wird u.a. von Temperatur, osmotischem Druck, Krümmungsradius und pH-Wert beeinflusst^{[34],[35]}.

Der Vorteil von sBLMs ist ihre hohe Stabilität. Im Gegensatz zu BLMs sind sie relativ unanfällig gegen Erschütterungen und reißen nicht so leicht ein. sBLMs schwimmen auf einem dünnen Wasserfilm (ca. 1 nm) zwischen Substrat und Lipiden. Daher ist eine laterale Beweglichkeit der Lipide gegeben, womit sie in ihrer Fluidität den natürlichen Membranen ähneln.

Hybrid Bilayer Lipid Membranes (hBLMs)

Eine Unterart der sBLM sind Hybridbilayer (hBLMs). Hierbei wird zuerst eine hydrophobe Monolage (z.B. Alkanthiole oder Thiolipide^{[36],[37]}) auf das Substrat aufgebracht. Die Doppelschicht kann durch die Zugabe von Vesikeln vervollständigt werden, die auf der hydrophoben Schicht spreiten (vgl. Abb.6)^[38]. Bei hBLMs besteht nur die obere Lage der Doppelschicht aus Lipiden.

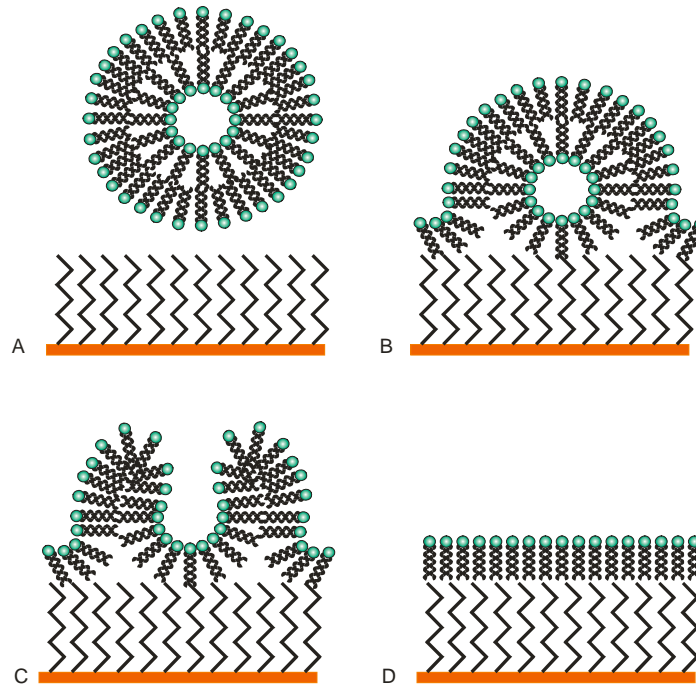


Abb. 6: Spreiten von Vesikeln auf einer hydrophoben Oberfläche: Zugabe von Lipidvesikeln auf hydrophobe Oberfläche, z.B. SAMs aus Alkanthiolen (A), Adsorbieren der Vesikel (B), Aufbrechen der adsorbierten Vesikel (C), Fusion der Lipide zu einer planaren Schicht (D)

Auch hBLMs sind sehr stabil. Im Gegensatz zu sBLMs haben sie jedoch eine eingeschränktere laterale Beweglichkeit, da nur die obere Lipidschicht fluide ist. Die kovalent gebundenen SAMs sind fest an ihrem Platz verankert. Dieser Umstand und das fehlende Flüssigkeitsreservoir machen hBLMs nur bedingt geeignet für die Inkorporation von Membranproteinen.

Cushioned Bilayer Lipid Membranes (cBLMs)

Ein großer Nachteil von sBLMs und hBLMs liegt in ihrer Nähe zum Substrat. Der geringe Abstand zwischen Lipiddoppelschicht und Oberfläche verhindert einen Einbau größerer Membranproteine mit ausgedehnten extrazellulären Domänen. Es wird versucht, diese Schwierigkeit zu umgehen, indem ein weiches Polster (englisch cushion) zwischen Membran und Substrat eingefügt wird, das gleichzeitig als Ionenreservoir dienen kann. Dies konnte schon erfolgreich mit Polymeren, Hydrogelen oder Peptiden gezeigt werden ^{[39]-[43]}. Allerdings haben diese cBLMs (cushioned Bilayer lipid Membranes, gepolstert Lipiddoppelschicht Membranen) keine besonders guten isolierenden Eigenschaften und der geringe Widerstand erschwert die elektrochemische Messung von Transportprozessen.

Tethered Bilayer Lipid Membranes (tBLMs)

Die direkte Nähe von sBLMs zum Substrat verhindert den Einbau funktioneller Membranproteine. Ein weiterer Ansatz neben den cBLMs dieses Problem zu lösen besteht darin einen Abstandshalter – den so genannten Spacer – zwischen Lipidschicht und Substrat einzufügen, über den die Membran an die Oberfläche gebunden wird, oder wie es auf Englisch heißt *tethered*. Die untere Lipidschicht ist kovalent an den Spacer gebunden.^{[44]-[46]}

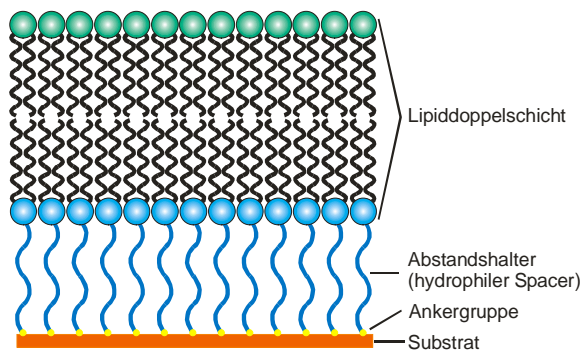


Abb. 7: Schematische Darstellung einer tethered Bilayer Lipid Membrane (tBLM). Die Lipiddoppelschicht ist durch einen kovalent an das Substrat gebundenen Abstandshalter von der Oberfläche entkoppelt

Ein hydrophiler Spacer bildet zu dem ein wässriges Reservoir unter der Lipidschicht, durch das der Einbau auch größerer Proteine in ihrer funktionellen Form ermöglicht wird. Als Spacer kommen Polymere, Polypeptidketten, Proteine, Amphiphile oder synthetische Lipide, die um einen hydrophilen Spacer verlängert wurden, in Frage. Die Spacer binden kovalent an die Oberfläche z.B. über Thiolbindungen an Gold^[48] oder über Silanbindungen an Oxidoberflächen^[49].

Verschiedene Strategien zum Aufbau von tBLMs wurden untersucht. Man kann zunächst ein Polymer oder Peptid anlagern und dann die Lipide durch aktivierte Bindungen (wie z.B. active ester coupling^[50]) anbinden. Ein erfolgreiches und etabliertes Verfahren ist jedoch die Bildung von Selbst-Organisierten Monolagen (SAMs, self-assembled monolayers)^{[51]-[53]}. Der Mechanismus der SAM Bildung ist noch nicht vollständig verstanden. Ein Modell von Poirer und Pylant aus dem Jahre 1996 stellt die Theorie auf, dass sich die Moleküle zunächst mit einer geringen Bedeckungsdichte an der Oberfläche anlagern. Wenn eine kritische Oberflächenbedeckung erreicht ist bilden sich gestreifte Inseln bis die gesamte Oberfläche bedeckt ist. Dann finden fest-fest Phasenübergänge statt bei denen Inseln mit hoher Packungsdichte entstehen die solange anwachsen, bis eine homogene Monolage entstanden ist (vgl. Abb. 8).^[54]

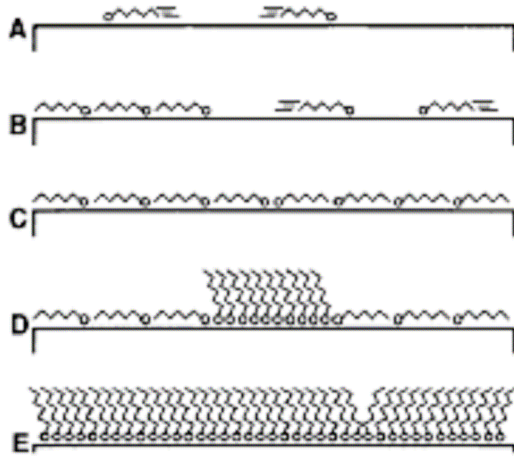


Abb. 8: Schema des Aufbaus selbst-organisierter Monolagen; Bindung mit geringer Oberflächenbedeckung (A), Erreichen einer kritischen Oberflächenbedeckung (B), Bedeckung der gesamten Oberfläche (C), Ausbilden von Inseln mit hoher Packungsdichte (D), Bildung einer homogenen Monolage (E) ^[54]

Dies heißt, dass die Bildung defektfreier SAMs abhängt vom Aufbau der Moleküle, ihrer Affinität untereinander, der Konzentration, der Inkubationszeit sowie der Oberflächenbeschaffenheit des Substrats. Außerdem bedeutet es, dass SAMs dicht-gepackte Schichten sind, was denn Einbau von Membranproteinen erschweren kann. Für tBLMs ist es daher wichtig einen Kompromiss zwischen defektfreien Schichten und ausreichendem Abstand zwischen den Spacermolekülen der SAMs zu finden ^[55].

Auf den SAMs kann die Lipiddoppelschicht durch Vesikelspreiten ^[38] oder schnellen Lösungsmittelaustausch (RSE, rapid solvent exchange) ^[56] vervollständigt werden. Das Spreiten der Vesikel läuft genauso ab wie bei den hBLMs (vgl. Abb. 6). Beim RSE werden in Ethanol gelöste Lipide auf den SAM gegeben, nach etwa 10 min wird mit wässrigem Medium gespült. Dabei bildet sich die obere Lage der Doppelschicht. Beide Methoden führen zu hoch-isolierenden Lipiddoppelschichten.

Im Gegensatz zu sBLMs ist bei tBLMs die untere Lage der Lipiddoppelschicht nur in einem eingeschränkten Maße fluide, da die an den Spacer gebundenen Moleküle an ihrem Platz verankert sind.

Der Vorteil von tBLMS liegt in ihrer hohen Stabilität und der Entkopplung von der Oberfläche. Die Spacerregion ermöglicht den funktionellen Einbau von Membranproteinen auch mit ausgedehnten extrazellulären Domänen ^{[57]-[59]} und stellt gleichzeitig ein wässriges Ionenreservoir zur Verfügung ^{[60],[61]}.

2.1.3 Modellmembranen für Biosensoren

Biosensoren erfordern immobilisierte und stabile Modellmembranen. Daher kommen für Sensoranwendungen insbesondere festkörpergestützte Membranen in Frage. Wird die biomimetische Membran mit inkorporierten Proteinen funktionalisiert, gibt es noch zusätzliche Anforderungen zu beachten. An die biomimetischen Schichten in Biosensoren stellt sich daher eine Vielzahl von Anforderungen, die oftmals im Widerspruch zu einander stehen.

- *Fluidität der Lipiddoppelschicht*

Die Schichten müssen fluide – also beweglich – genug sein, damit sich MPs einlagern können. Auch müssen die Schichten die Umlagerungen von MPs bei Aktivierung mitmachen und diese nicht dadurch verhindern, dass sie zu rigide sind.

- *Dichte der Lipiddoppelschicht*

Die Schicht sollte möglichst defektfrei und elektrisch dicht sein, um Leckströme von Ionen, die die eigentliche Aktivität der MPs überdecken könnten, zu vermeiden

- *Vorhandensein eine Ionenreservoirs*

Für ihre Aktivität benötigen MPs auf beiden Seiten der Lipidschicht ein Ionenreservoir, da die Aktivität der meisten MPs eine Verschiebung der Ionenkonzentrationen zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Raum zur Folge hat.

- *Immobilität der Lipiddoppelschicht*

Die biomimetische Schicht muss stabil mit der Sensoroberfläche verbunden sein, so dass sich die Proteine nicht von der Detektionsfläche entfernen oder gar vollständig lösen können und somit schwankende Konzentrationen einen Einfluss auf die Messung haben.

- *Entkopplung von der Oberfläche*

Die Membranen müssen von der Oberfläche entkoppelt werden, so dass ein direkter Kontakt mit einer festen Oberfläche oder die Wechselwirkung mit Metall die Proteine nicht sterisch behindert und Einfluss auf ihre Funktionalität hat.

Dies lässt sich vermeiden wenn zwischen der Lipidschicht und der Oberfläche ein Abstandshalter eingefügt wird.

- *Stabilität der Membran*

Um eindeutige Ergebnisse zu erhalten ist es nötig Messungen zu wiederholen oder über einen längeren Zeitraum verschiedene Messungen an derselben Oberfläche durchzuführen. Daher wird eine hohe Stabilität der Schichten gegen äußere Einflüsse (z.B. mechanische Erschütterungen, Scherkräfte) und gegen Altern angestrebt. Zudem könnte eine Stabilität der unfunktionalisierten Schichten gegen Luft wünschenswert sein, da dies die Lagerung vorgefertigter Schichten für spätere Screening-Anwendungen erleichtern würde.

Bei BLMs ist zwar die Fluidität gegeben und es kommt zu keiner Deformation der inkorporierten Proteine durch Oberflächen, jedoch sind diese Modellsysteme für Sensoranwendungen nicht stabil genug. Im Gegensatz dazu sind sBLMs und tBLMs stabil, aber die laterale Beweglichkeit ist bei tBLMs und die Entkopplung von der Oberfläche bei sBLMs nicht immer realisiert. Daher gibt es eine Vielzahl von Bemühungen diese Modellmembranen für die Verwendung in Biosensoren zu optimieren.

Es gilt aber auch zu bedenken, dass der Aufbau der Zellmembranen *in vivo* hoch komplex und die Zusammensetzung der Membran-Komponenten evolutionär für ihre jeweilige Funktion optimiert ist. Modellmembranen stellen zwangsläufig vereinfachte Systeme dar, die nur aus einer beschränkten Anzahl an Bestandteilen aufgebaut sind. Man muss daher darauf achten, dass das Modell die Realität nicht zu sehr vereinfacht, da auch Lipid- und Proteinspezies, die nicht berücksichtigt werden, einen Einfluss auf die Charakteristik der Membran haben.

2.2 Membranproteine

Membranproteine (MPs) spielen eine wichtige Rolle bei allen physiologischen Vorgängen – beim Stoffwechsel, der Signalwahrnehmung oder dem Hormonhaushalt. Aber auch bei der Therapie von Krankheiten kommt ihnen eine große Bedeutung zu z.B. als Wirkstoffrezeptoren. Etwa 60 % der Angriffsziele von Medikamenten sind MPs ^[1]. MPs stehen daher schon lange im Fokus der Forschung, um ihre Struktur, Funktionalität und Kontrollmechanismen besser zu verstehen.

Membranproteine machen ungefähr 30 % aller Proteine eines Organismus ^[62] aus. Sie kommen nicht gelöst vor, sondern sind immer mit Lipidmembranen assoziiert. Man unterscheidet dabei periphere und integrale MPs. ^[7]

Periphere MPs lagern durch elektrostatische Wechselwirkung oder Wasserstoffbrücken an den hydrophilen Kopfgruppen der Zellmembran an. Sie sind nur relativ schwach gebunden und lassen sich leicht durch Detergenzien oder pH-Änderungen ablösen. Sie stehen somit in keinem direkten Kontakt zum hydrophoben Inneren der Lipiddoppelschicht.

Integrale MPs durchspannen die Membran. Sie haben meist mehrere Transmembran-Domänen und extra- bzw. intrazelluläre Schleifen (engl. *loops*). Die Struktur der Transmembran-Domänen besteht hauptsächlich aus α -Helices. In seltenen Fällen finden sich auch β -Faltblätter. Integrale MPs sind fest in der Lipiddoppelschicht verankert und lassen sich nur schwer solubilisieren.

Der Anteil an MPs in der Zellmembran unterscheidet sich je nach Zelltyp. In der Plasmamembran von menschlichen Erythrocyten liegt er z.B. bei 49 % (w) in den Myelinzellen dagegen nur bei 18 % (w) ^[63]. Ihre Erforschung wird dadurch erschwert, dass sie *in vivo* nur in geringer Menge expremiert werden und daher schwer aufzureinigen und zu isolieren sind.

Zu den Membranproteinen gehören z.B. Strukturproteine, Enzyme oder Rezeptoren.

2.2.1 Rezeptorproteine

Rezeptorproteine dienen in erster Linie jeglicher Art der Signalweiterleitung. Sie können Hormone, Neurotransmitter oder andere Botenstoffe binden. Man unterscheidet G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR, G-Protein coupled receptors) und Ionenkanal-Rezeptoren.

GPCRs sind Rezeptorproteine mit sieben Transmembran-Domänen und bilden die größte Gruppe von Signalmolekülen. Bei Bindung eines spezifischen Liganden ändern sie ihre

Konformation. Sie können dann die α -Untereinheit von G-Proteinen binden und aktivieren. Dies führt nachgeschaltet zur enzymatischen Synthese von Second-Messenger-Molekülen (wie cAMP oder IP₃) und moduliert dadurch eine Signalkaskade. ^[63]

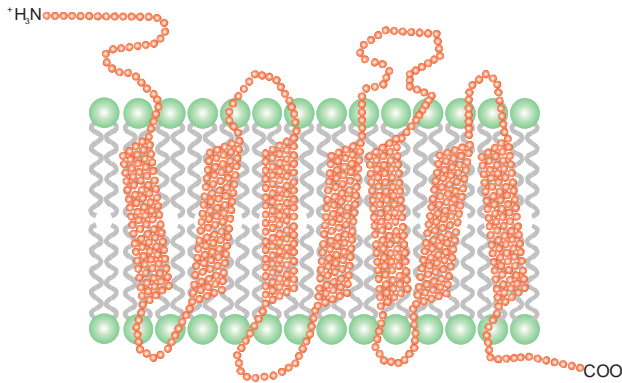


Abb. 9: Schematische Darstellung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors (GPCR) mit sieben Transmembran-Domänen

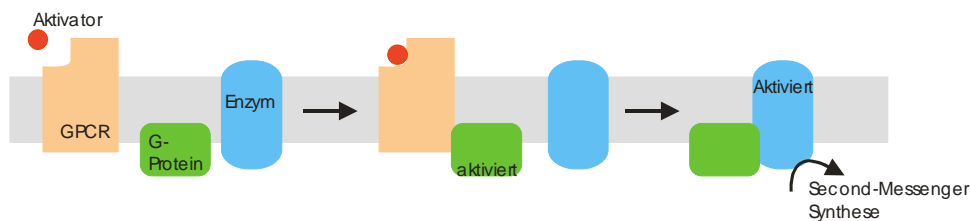


Abb. 10: Schematische Darstellung des Funktionsmechanismus eines GPCRs. Nach der Bindung des Aktivators aktiviert der GPCR ein G-Protein, dessen aktivierte Untereinheit eine enzymatisch katalysierte Second-Messenger-Kaskade in Gang setzt. (nach ^[63])

Beispiele für GPCR sind olfaktorische Rezeptoren, adrenerge Rezeptoren oder metabolische Glutamaterezeptoren ^[63].

Ionenkanal-Rezeptoren sind MPs die Poren in der Membran öffnen, durch die Ionen fließen können. Im Gegensatz zu anderen Ionenkanälen, wie z.B. spannungsgesteuerten Ionenkanälen, öffnen Ionenkanal-Rezeptoren bei Bindung eines aktivierenden Liganden (Aktivator).

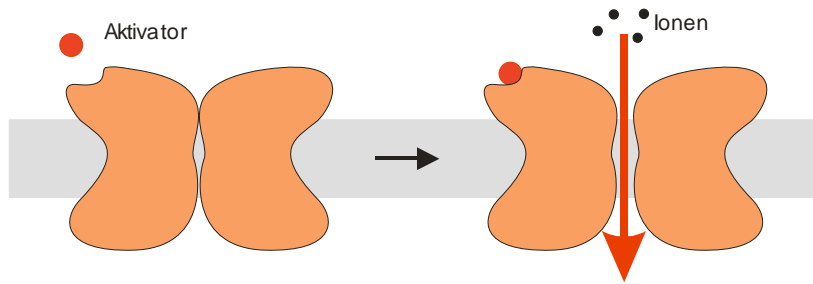


Abb. 11: Schematische Darstellung eines liganden-gesteuerten Ionenkanals. Nach Bindung des Aktivators öffnet eine Pore und Ionen können durch den Kanal fließen

Aktiviert Ionenkanäle führen direkt zu einem Ionenstrom durch die Membran. GPCRs ändern nur ihre Konformation. Die Wirkung (Änderung der Membranspannung bzw. Ionenströme) wird erst nachgeschaltet an einer anderen Komponente in der Zelle beobachtet.

2.2.2 Der nicotische Acetylcholin Rezeptor (nAChR)

Die nicotinischen Acetylcholine Rezeptoren (nAChRs) gehören zu den am Besten untersuchten Rezeptorproteinen. Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten, die sich mit der Struktur und der Funktionalität von nAChRs beschäftigen. Von besonderem Interesse ist die Gruppe der nAChRs auch, weil es sich bei Acetylcholin um einen wichtigen Neurotransmitter handelt.

Struktur des nAChR

Acetylcholin Rezeptoren (AChRs) unterteilen sich in zwei Untergruppen, die nicotinischen AChR (nAChR) und die muscarinen AChR (mAChR). Sie werden nach ihren Agonisten Nicotin oder Muscarin unterschieden. Der mAChR ist ein GPCR. Der nAChR kommt vor allem in Neuronen und Muskelzellen vor und ist ein liganden-gesteuerten Ionenkanal (LGIC).

Die LGICs sind MPs, die bei Bindung eines Liganden eine Pore in ihrer Mitte öffnen und Ionen passieren lassen.

Nach ihrer Struktur lassen sich LGICs in drei Klassen einteilen ^[64]

- Cys-loop Rezeptoren (Pentamer mit je vier Tranmembran-Domänen)
- Ionotrophe Glutamatrezeptoren (Tetramer mit je drei Tranmembran-Domänen)
- P2X Rezeptoren (Trimer mit je zwei Tranmembran-Domänen)

Die Cys-loop Rezeptoren bilden dabei die größte Gruppe, zu der auch der nAChR gehört.

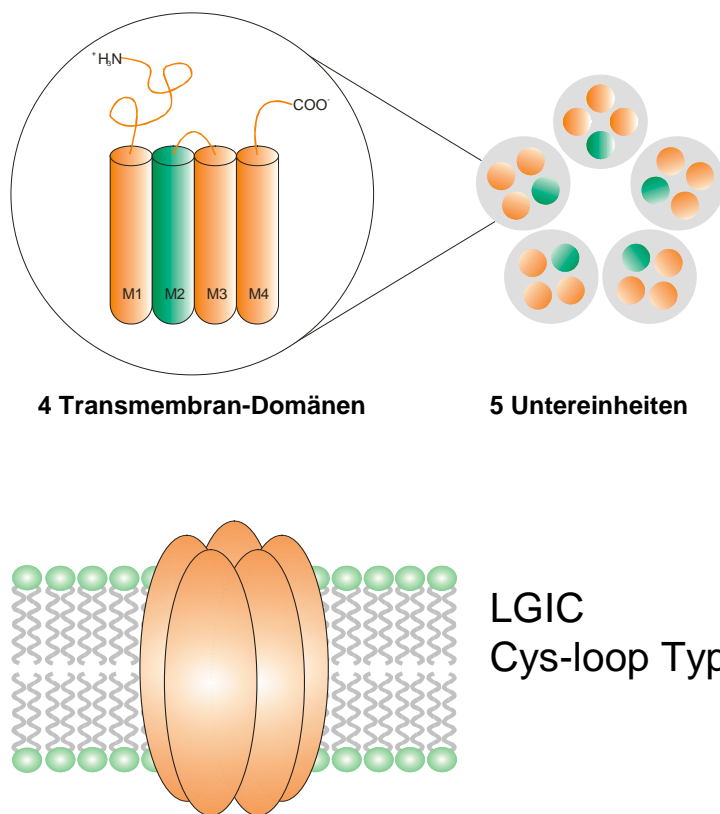


Abb. 12: Schematischer Aufbau eines Ionenkanals des Cys-loop Typs
oben: eine Untereinheit besteht aus vier Transmembran-Domänen,
fünf Untereinheiten lagern sich zu einem Pentamer zusammen
unten: Pentamere Struktur eines Cys-loop Ionenkanals

Die Cys-loop Rezeptoren haben alle eine pentamere Struktur, welche aus fünf Untereinheiten (α , β , γ , δ und ϵ) besteht, die eine Pore durch die Membran formen. Jede Untereinheit hat vier Transmembran-Domänen (M1, M2, M3 und M4). Die M2 Segmente bilden dabei die Poren. Ebenfalls gemeinsam ist allen Cys-loop Rezeptoren ein langer, extrazellulärer N-Terminus, an dem sich die Bindungsstelle für den Liganden befindet. LGIC kommen sowohl als Heteromere wie auch als Homomere vor. Beim nAChR kommen die Untereinheiten α und β in den Varianten $\alpha 1 - \alpha 9$ und $\beta 1 - \beta 4$ vor, die je nach Subtyp des nAChR in verschiedenen Kombinationen vorliegen. Ein Beispiel für einen homomeren nAChR ist der neuronale $\alpha 7$ nAChR. ^[65]

Abb. 13 zeigt die Kristallstruktur des nAChR mit einer Auflösung von 4 Å. Der Porendurchmesser beträgt an der schmalsten Stelle ungefähr 7 Å und ist damit weit genug, um hydratisierte monovalente Kationen passieren zu lassen. Die intrazelluläre Schleife hat eine Ausdehnung von 2 nm ^[63].

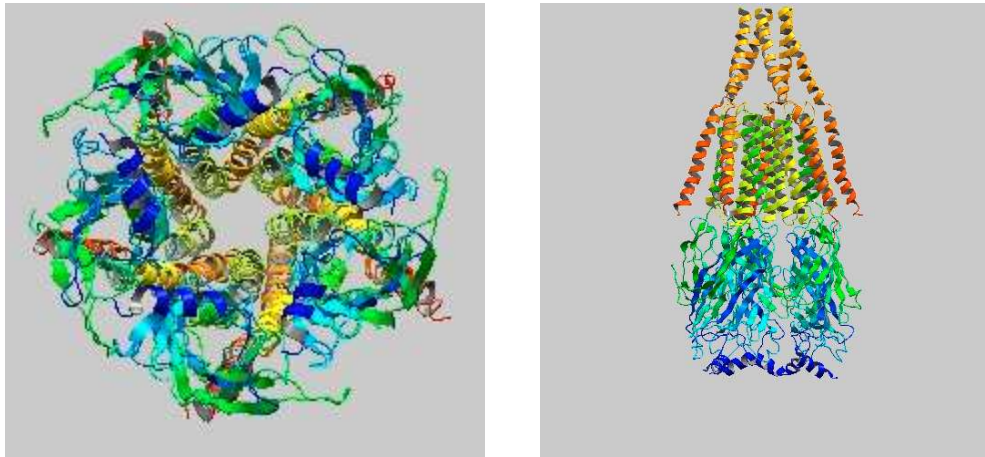


Abb. 13: Röntgenstruktur des nAChR (Auflösung 4 Å)^[66]
links: Draufsicht auf die Pore
rechts: Seitenansicht, unten extrazelluläre Domänen, oben Pore mit intrazellulären Schleifen

Die Bindungsstellen des nAChRs für Acetylcholin sind mit der α -Untereinheit assoziiert und befinden sich an der Kontaktstelle zwischen zwei Untereinheiten.^[67]

Die Homomere $\alpha 7$, $\alpha 8$ und $\alpha 9$, sowie nAChR aus Muskelzellen und aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens (*Torpedo*) werden durch das Schlangengift Bungarotoxin (BTX) inhibiert. BTX ist ein Polypeptid, das irreversibel und kompetitiv an nAChR bindet. Die Bindungsstelle für BTX befindet sich im extrazellulären N-Terminus.^[68]

Der nAChR ist auch pharmakologisch von großer Bedeutung. Er ist ein Angriffspunkt für Lokalanästhetika und hat einen nachweislichen Effekt bei Alzheimer, Schizophrenie, und Entzündungen.^{[67],[69]}

Syntheseweg des nAChR

Jede Untereinheit des nAChRs wird durch eine eigene mRNA codiert und als separate Polypeptidkette expremiert. Die Synthese von nAChR findet an Polyribosomen statt, die an das raue Endoplasmatische Retikulum (rER) binden. Dieser Vorgang wird durch eine Signalsequenz am AchR ausgelöst, was das Vorhandensein von Signal Recognition Particles (SRP) erfordert. Am rER wird dann die Signalsequenz entfernt, es erfolgt eine co-translationale Core-Glycosilierung und der N-Terminus wird gefaltet.^{[70]-[72]} Die korrekte Faltung der α -Untereinheit hat in Muskelzellen eine Erfolgsrate von ungefähr 30%^[68]. Der Rest der Polypeptidketten wird abgebaut. Bei der Faltung werden Disulfidbrücken zwischen Cysteinen im extrazellulären Bereich gebildet. Die für die post-translationalen Modifikationen nötigen Enzyme finden sich im rER. Nach der korrekten Faltung lagern sich die

Untereinheiten auf spezifischen – jedoch noch nicht vollständig bekannten – Wegen zu Pentameren zusammen. Die Synthese und Modifikation der Untereinheiten dauert ca. 30 min und die Zusammenlagerung zu Pentameren weitere 60 min, so dass die vollständige Expression des nAChR in 90 min abgeschlossen ist.

Die Synthese von nAChR benötigt eine Vielzahl von Cofaktoren und post-translationalen Modifikationen und ist zudem einer Vielzahl von Regulationen unterworfen, die noch nicht gänzlich verstanden sind ^[70]. Es hat sich jedoch gezeigt, dass z.B. die Expression von $\alpha 7$ nAChR in manchen heterologen Säugetiersystemen schwer zu bewerkstelligen war, was auf Fehlfaltung und Trapping im rER zurückgeführt wurde ^[73].

Kinetik des nAChR

Bei der Kinetik des nAChR unterscheidet man drei Stadien, geschlossen, offen und desensibilisiert.

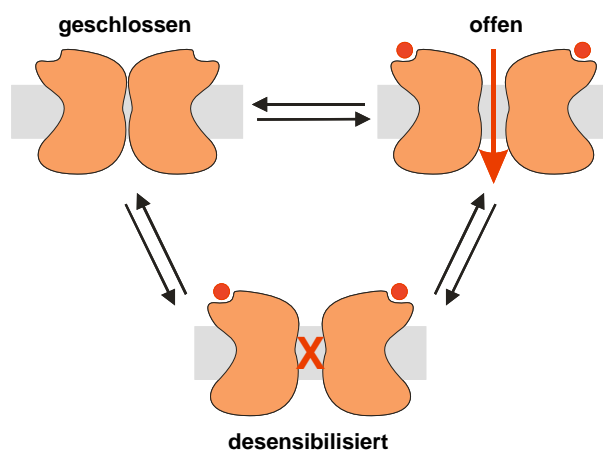


Abb. 14: Öffnungsmechanismus des nAChR. Bei Bindung von zwei Agonisten öffnet der Kanal; aus dem geöffneten Zustand geht er wieder in den geschlossenen Zustand über; oder es kommt bei ausreichend hoher Konzentration des Liganden zur Desensibilisierung, wobei der Kanal geöffnet aber nicht leitend ist (nach ^[74]).

Abb. 14 zeigt ein Schema des Öffnungsverhaltens von nAChR. Bei Bindung zweier Liganden öffnet der Kanal. Die Öffnungszeit beträgt etwa 0,7 – 12 ms. Danach schließt der Kanal wieder und ist für einen Zeitraum von 10 – 50 ms nicht wieder aktivierbar ^[75]. Eine Eigenart des nAChR ist, dass er desensibilisieren kann. Ist er längerer Zeit einer hohen Konzentration an Ligand ausgesetzt geht er in einen Zustand, in dem der Kanal zwar offen, aber nicht permeabel für Ionen ist.

Der $\alpha 7$ nAChR

Der $\alpha 7$ nAChR Subtyp ist ein Pentamer aus fünf $\alpha 7$ Untereinheiten im Zentralen Nervensystem. Er spielt eine Rolle bei der Entwicklung der Hippocampus-Funktion und der Modulation der Neurotransmission. Im ungeschnittenen, nicht-glycosilierten Zustand hat er eine Größe von 54 kDa. Nach Schneiden der Signal Sequenz beträgt die Größe 41 kDa und nach Glykosilierung 44 kDa ^{[70],[72]}. Allerdings wurde bei α -Untereinheiten des nAChR ein unerwartet schnelles Laufverhalten bei SDS-PAGE festgestellt. ^{[70],[72]} Die Zusammenlagerung von fünf α -Untereinheiten zu einem Homomer erfordert die Anwesenheit des Proteins Ric-3 oder post-translationale Prozessierung ^[76]. Die Permeabilität für Na^+ ist nur geringfügig kleiner als die von K^+ mit einem Verhältnis $P_{\text{K}}/P_{\text{Na}}$ von 1,2. Der $\alpha 7$ -nAChR ist ebenfalls permeabel für Ca^{2+} und zeigt eine rasche Desensibilisierung gegenüber Cholin ^{[67],[72]}. Der $\alpha 7$ -nAChR spielt eine Rolle bei Alzheimer, Schizophrenie und der Steuerung von T-Zellen des Immunsystems.

2.2.3 Die *in vitro* Synthese (IVS)

Um Struktur und Funktionalität von Proteinen untersuchen zu können müssen sie im experimentellen Maßstab expremiert und aufgereinigt werden. Dies geschieht zumeist *in vivo* in Zellkultur. Hierbei gibt es jedoch einige Nachteile wie geringe Ausbeute, komplizierte Reinigungsprozeduren oder störende Einflüsse des zellulären Metabolismus. ^[77]

Ein alternativer Ansatz ist die *in vitro* Synthese (IVS) von Proteinen, welche die gezielte Herstellung bestimmter Proteine ermöglicht. Im Gegensatz zur *in vivo* Synthese erlaubt die IVS daher die Untersuchung eines einzigen Rezeptor-Subtyps ohne die Störung durch intrinsische Rezeptoren und Kanäle wie sie in Zelllinien und Membranpräparationen vorkommen.

Allerdings ist es diffizil für die jeweiligen Proteine die geeigneten Synthesebedingungen zu finden. Gerade MPs haben oft einen komplizierten Syntheseweg der das Vorhandensein spezifischer Cofaktoren oder eine Vielzahl co- bzw. post-translationaler Modifikationen erfordert.

Die *in vitro* Synthese (IVS)

Die Handhabung von Membranproteinen (MPs) zur Analyse ihrer Struktur und Funktionalität wird durch ihren amphiphilen Charakter erschwert; denn MPs sind in Lösung nicht funktional. Ihre korrekte Faltung wird durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembranen

stabilisiert. Geringe Expressionsraten und ineffiziente Reinigungsverfahren sind weitere Schwierigkeiten. Dies hat zur Folge, dass bislang erst die Struktur von weniger als 100 MPs aufgeklärt werden konnte^[77]. Zudem führt eine nachträgliche Integration von rekombinanten Proteinen in Zellkultur teilweise zum Verlust der zellulären Integrität.

In jüngerer Zeit hat daher die *in vitro* Synthese (IVS) von Proteinen immer mehr an Bedeutung gewonnen^{[72],[78]-[81]}. Unter IVS versteht man die Expression von Proteinen ohne die Verwendung ganzer Zellen in Zellkultur. Stattdessen werden Expressionssysteme aus Zellextrakten oder rekombinante Systeme verwendet. Zunächst hauptsächlich für die Expression von löslichen Proteinen eingesetzt, arbeiten immer mehr Gruppen daran mit der IVS auch die kontrollierte Herstellung von Membranproteinen in den Griff zu bekommen.

Anfänglich wurde die IVS in einem Kompartiment durchgeführt. Die Proteinausbeute war sehr gering (~ ng/ml bis µg/ml), da die Reaktion durch den Verbrauch von Vorstufen und der Ansammlung von Abbauprodukten gehemmt wurde^[82]. Eine Lösung hierfür lieferte die Entwicklung eines zweigeteilten Ansatzes. Dabei wird der Ansatz durch eine semi-permeable Membran in zwei Kompartimente geteilt, die sogenannte reaction mixture (RM) und die feeding mixture (FM). In der RM findet Transkription und Translation statt; die FM sorgt für einen Nachschub an Vorstufen und die Entfernung von Abbauprodukten. Die Ausbeute konnte dadurch beträchtlich gesteigert werden (~ mg/ml).^[83]

Selbsthergestellte Expressionssysteme haben den Vorteil, dass man ihre Zusammensetzung sehr genau kennt und kontrollieren kann. Die Aufbereitung eines Zellextraktes ist jedoch mit einem nicht unerheblichen Aufwand verbunden. Mittlerweile sind aber auch verschiedene kommerzielle Expressionssysteme erhältlich, die die Arbeit vereinfachen. Allerdings ist dabei die genaue Zusammensetzung nicht bekannt. Diese Systeme sind auch meist Ein-Kompartiment-Ansätze, was die Proteinausbeute verringert.

Expressionssysteme für die *in vitro* Synthese

Die Wahl des geeigneten Expressionssystems hängt sowohl von der Natur des Proteins ab, als auch von seiner geplanten Verwendung. So werden z.B. Proteine aus Säugetieren am Besten in Expressionssystemen aus Säugetierzellen expremiert.

Man unterscheidet dabei zwischen prokariotischen Systemen (z.B. *E.coli*) und eukariotischen Systemen (z.B. Weizenkeimextrakt, Retikulozyten-Extrakt von Kaninchen).

In *E.coli* Expressionssystemen konnte bereits eine Vielzahl von MPs erfolgreich expremiert werden. Die Ausbeute an Protein ist im bakteriellen System im Allgemeinen höher als in den eukariotischen. Allerdings fehlt den prokariotischen Systemen die in Eukaryoten

vorhandenen Chaperone, die für die korrekte Faltung der MPs sorgen. Auch das Vorhandensein von Signal Recognition Particels (SRPs), die das Abtrennen der Signalsequenz am maturierten Protein auslösen, ist nicht bekannt. ^{[71],[78],[79]}

Weizenkeimextrakt gilt als relativ robustes Expressionssystem. Die Proteinausbeute hängt stark von der Qualität des Extraktes und seiner Aufreinigung ab, da Endospermgewebe Abbauenzyme und Translationsinhibitoren enthält. Zudem eignet sich das Weizenkeim-System schlecht für kombinierte Transkriptions/Translations-Ansätze. Es wird daher meist mit mRNA als Ausgangsmaterial verwendet. ^{[78],[79]}

Retikulozytenlysat von Kaninchen wird aus Blutzellen gewonnen und hat auf Grund seines Ursprungs aus Säugetierzellen die größte Ähnlichkeit mit menschlichen Zellen. In diesem System konnte ohne Zugabe weiterer Bestandteile eine Vielzahl von post-translationalen Modifikationen wie Glykosylierung, Abtrennung der Signalpeptidsequenz oder Acetylierung nachgewiesen werden. Allerdings ist die Proteinausbeute sehr gering und nur wenige Membranproteine konnten bisher in diesem System exprimiert werden. ^{[71],[79]}

Prinzip der *in vitro* Synthese

Es gibt kombinierte Expressionssysteme (*engl.* coupled) bei denen Transkription und Translation *in vitro* im Zellextrakt ablaufen. Bei diesen Systemen können als Ausgangsmaterial für die genetische Information cDNA (complementary DNA), mRNA (messenger RNA) oder PCR (Polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion) Produkte dienen. Abb. 15 zeigt den Ablauf der IVS am Beispiel von cDNA. Die cDNA wird in einen geeigneten Vektor (z.B. ein Plasmid) kloniert und dem Expressionssystem zugegeben. Die im Zellextrakt enthaltenen Polymerasen schreiben die cDNA in mRNA um – die Transkription findet *in vitro* statt. Danach wird an den Ribosomen das Protein synthetisiert – ebenfalls *in vitro*. Sofern die entsprechenden Cofaktoren vorhanden sind, erfolgen die co- und post-translationalen Modifikationen.

Im Anschluss kann das Protein entweder ausgefällt, mit Hilfe von Detergenzien in Lösung gehalten oder direkt in Vesikel (Proteoliposomen) bzw. biomimetische Membranen inkorporiert werden. ^{[77],[78]}

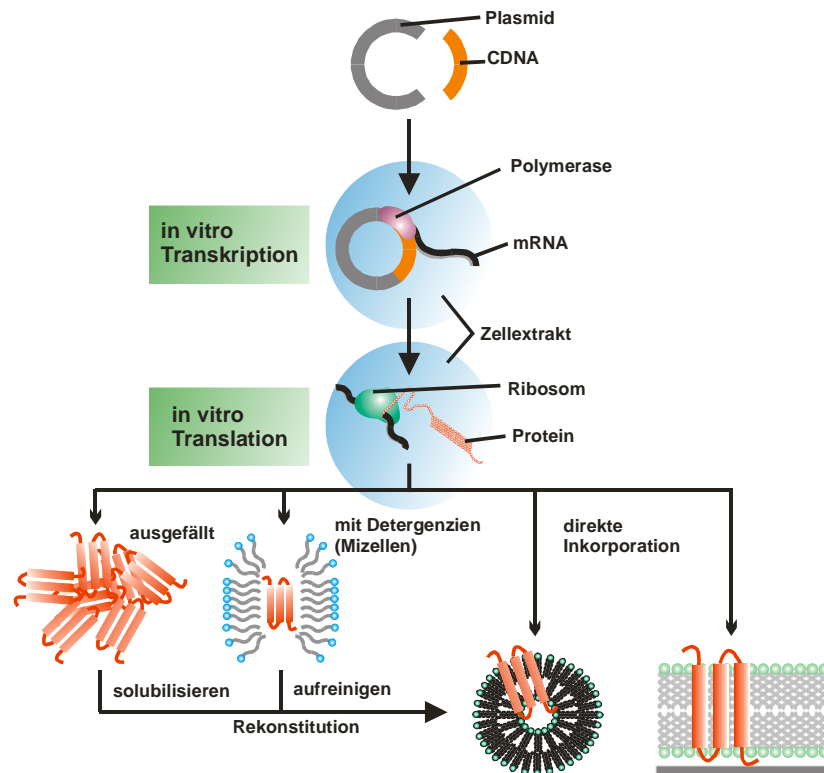


Abb. 15: Schematischer Ablauf der *in vitro* Synthese (IVS) aus cDNA. Die cDNA wird in einen geeigneten Vektor kloniert und dem Zellextrakt des Expressionssystems beigesetzt. Transkription und Translation finden *in vitro* statt. Das synthetisierte Protein kann ausgefällt, solubilisiert oder direkt in Vesikel oder Membranen inkorporiert werden

Vor- und Nachteile der *in vitro* Synthese

Die IVS bietet einige Vorteile gegenüber der Expression in Zellkultur ^{[77]-[79]}

- kontrollierte Expression

Durch die Zugabe von RNA bzw. DNA in ein ansonsten weitestgehend RNA bzw. DNA freies System wird hauptsächlich das gewünschte Protein expremiert. Die zusätzliche Expression intrinsischer Proteine einer Zellkultur findet nicht statt. Dies erlaubt eine genauere Kontrolle und erspart eine spätere Aufreinigung

- offenes System

Cofaktoren, die die Expression eines Proteins verstärken sowie andere Substanzen wie z.B. Proteaseinhibitoren, können jederzeit beigesetzt werden, um die Ausbeute zu erhöhen.

- kurze Dauer
Die komplette Expression des Proteins ist innerhalb von 90 min abgeschlossen. Dies ist eine beachtliche Zeitersparnis gegenüber dem konventionellen Weg, da die Kultivierung der Zellen, Lyse, Aufreinigung und Rekonstitution entfallen.
- geringes Volumen
IVS Systeme arbeiten bereits mit geringen Volumina von 25 oder 50 μ l. Dies macht sie geeignet für den Einsatz in miniaturisierten Systemen.
- keine toxischen Effekte
Toxische oder hemmende Effekte, die bei Überexpression in Zellen beobachtet werden, spielen keine Rolle. Außerdem können auch Proteine, die für bestimmte Zellen toxisch sind, im zellfreien System expremiert werden.
- unabhängig vom Zellmetabolismus
Der Zellstoffwechsel findet im Zellextrakt wenn überhaupt nur in sehr verminderter Form statt. Eine Verstoffwechslung von zugesetzten (Co-)Faktoren spielt daher nur eine minimale Rolle.

Allerdings hat die IVS auch Nachteile. Im Gegensatz zur Expression in Zellen fehlen in Zellextrakten teilweise Cofaktoren und die Fähigkeit post-translationale Modifikationen auszuführen, die für eine korrekte Expression benötigt werden.

Für jedes Protein stellt sich die Frage der Optimierung der IVS. Zu berücksichtigende Parameter sind dabei u.a. die Ionenkonzentration, die Qualität und Konzentration der Ausgangs-DNA oder die Verfügbarkeit von Energie^[77]. Die korrekte Faltung hängt z.B. auch von den reduzierenden Bedingungen ab, die die Bildung von Disulfidbrücken beeinflussen^{[70],[84]}.

In vielen Arbeiten wurde bisher nur gezeigt, dass das MP expremiert wird, also seine reine Existenz nachgewiesen, eine Verifizierung der Funktionalität ist dabei aber nicht immer gegeben.

2.3 Mikrofluidische Analyse Systeme

Analytische Untersuchungen z.B. im medizinischen Bereich (Bluttests, Antikörpernachweise, etc.) oder im Bereich der Umweltanalytik (Schadstoffnachweise, etc.) können z.T. nur mit großem Aufwand im Labor durchgeführt werden. Um Zeit und Kosten zu sparen wäre es wünschenswert diese Untersuchungen direkt vor Ort vornehmen zu können. Eine Möglichkeit dazu liegt in der Entwicklung von Lab-on-Chips (LoC) - auch Micro Total Analysis Systeme (μ TAS) genannt.

Wenn von LoCs die Rede ist, versteht man darunter miniaturisierte Systeme, die Probenverarbeitung und Analyse vereinen (Integration) und dabei mit geringen Probenvolumen auskommen (Miniaturisierung). Daher sind LoCs untrennbar mit dem Begriff Mikrofluidik und Mikrostrukturierung verbunden.

Mikrostrukturierung ist der Überbegriff für technische Verfahren, die es ermöglichen, Strukturen im μ -Meter Bereich und kleiner zu erzeugen. Dazu gehören z.B. Heißprägen, Laserablation oder Photolithographie. ^{[85],[86]}

Von Mikrofluidik spricht man, wenn man es mit fluidischen Systemen zu tun hat, bei denen mindestens eine Größe (Länge, Durchmesser oder Volumen) im Mikro-Bereich liegt.

Viele Vorteile der Miniaturisierung lassen sich mit dem Skalierungsgesetz (scaling law) erklären. Bei Miniaturisierung der Reaktionsstrukturen verändert sich das Volumen kubisch, die Oberfläche jedoch nur quadratisch. Das bedeutet, dass bei LoCs Oberflächeneffekte gegenüber Volumeneffekten dominanter werden. Zudem werden die Entfernungen kleiner, so dass physikalische Prozesse, die eine räumliche Komponente haben (z.B. Konzentrationsausgleich, Wärmetransport), schneller abgeschlossen sind. ^{[87],[88]} Die Miniaturisierung und Integration von LoCs bieten daher Vorteile, die später näher erläutert werden und die LoCs für Analysesysteme so interessant machen.

2.3.1 Kurze Historie

Das erste miniaturisierte Analysesystem war ein Gaschromatograph, der schon 1975 von Terry et al. vorgestellt wurde ^[89]. Es dauerte aber noch bis Anfang der 90er Jahre ehe die LoCs in den Fokus der Forschung rückten. In der Gruppe von Andreas Manz wurde nicht nur ein weiteres erfolgreiches Miniaturesystem für die Flüssigchromatographie entwickelt, sondern auch das Konzept der μ TAS und ihre Anwendungsmöglichkeiten in Worte gefasst ^[90]. Zu

dieser Zeit bestanden die meisten Systeme aus Silizium und Glas und dienten chemischen Nachweisverfahren.

Seit 1994 hat die Zahl der Arbeiten auf dem Gebiet der LoCs stark zugenommen. Neue Verfahren in der Mikrostrukturierung wie Rapid Prototyping oder Heißprägen (Hot Embossing) wurden entwickelt. Zudem wurden andere Materialien wie Elastomere oder cyclische Polymere verwendet und das Anwendungsgebiet wurde über rein chemische Analysen hinaus auf biologische Systeme erweitert. Auch die Detektionsmethoden wurden vielfältiger (z.B. optische oder elektrochemische Detektion) und Kommerzielle Systeme kamen auf den Markt. ^{[85],[91]}

2.3.2 Biosensoren

LoC Sensoren können auf verschiedenen Konzepten beruhen. Es gibt Gassensoren, chemische Sensoren oder Biosensoren. Unter einem Biosensor versteht man eine Analyseeinheit, die zur Detektion oder Quantifizierung eines biochemischen Moleküls dient. Man unterscheidet Biosensoren nach

- (1) der Rezeptoreinheit (z.B. Immunosensor mit Antikörpern, DNA-Chip),
- (2) dem Detektionsprinzip (z.B. elektrochemischer Sensor, Fluoreszenzsensor) oder
- (3) der Anwendung (z.B. medizinischer Sensor für Glukose-Nachweis).

Hinsichtlich der Rezeptoreinheit sind insbesondere DNA-Chips und Immunosensoren gut erforschte Systeme. DNA Chips werden bereits routinemäßig zum Nachweis genetischer und infektiöser Krankheiten in klinischen Laboren angewendet. Aber auch Protein-Chips gewinnen immer mehr an Bedeutung. Insbesondere Chips zur Detektion von Antikörperbindungen und enzymatischen Reaktionen spielen eine Rolle in der Diagnostik und sind kommerziell erhältlich. ^{[92],[93]}

Für die Detektion gibt es verschiedene Möglichkeiten. Man unterscheidet optische Sensoren (z.B. Fluoreszenz oder Oberflächenplasmonen ^[94] basiert), mechanische Sensoren (z.B. Schwingquarzsensoren ^[95]), magnetische Sensoren (z.B. basierend auf magnetischen beads ^[96]) oder elektrische Sensoren (z.B. FETs ^[97] oder amperometrische Sensoren ^[98]).

Neben ihrer Bedeutung in der klinischen Diagnostik werden Biosensoren auch in der Umweltanalytik, der Forensik oder zum Nachweis von biologischen und chemischen Kampfstoffen verwendet.

2.3.3 Vorteile von LoCs als Biosensoren

Auf Grund der Miniaturisierung und Integration bieten LoCs einige Vorteile gegenüber herkömmlichen Laborverfahren

- geringes Probenvolumen
LoCs kommen im Vergleich zu den meisten Standard-Laboransätzen mit einem geringen Probenvolumen aus. Dies bedeutet, dass sie sich auch für biologische Analysen eignen bei denen entweder die biologische Sensoreinheit oder der Analyt in kleinen Mengen vorliegen.
- besserer Wärmetransport
In LoCs erfolgt ein schneller Wärmetransport. Dies bedeutet, dass auch die Inkubationstemperatur einer biologischen Probe schnell im gesamten Ansatz erreicht wird.
- schnellerer Stofftransport
Die rasche Diffusion, führt dazu, dass das Analyten schnell an die Sensoroberfläche diffundieren und dort zu einer Reaktion führen. Es bedarf keiner langen Misch- oder Inkubationszeiten.
- niedrige Kosten
Die meisten Komponenten für LoCs lassen sich in Massenproduktion, z.B. durch Spritzguss oder Heißprägen, kostengünstig herstellen.
- geringeres Risiko von Verunreinigung
Da die Analyse in einem abgeschlossenen System abläuft, ist die Gefahr, dass Verunreinigungen eingeschleppt werden, geringer als bei offenen Ansätzen. Zudem erlauben es die niedrigen Herstellkosten LoCs als Wegwerfartikel für den Einmal-Gebrauch zu produzieren und verringern dadurch ebenfalls das Risiko von Verunreinigungen.
- gute Reproduzierbarkeit
Im LoC herrschen genau definierte Rahmenbedingungen und die Reaktionsparameter wie z.B. Probenvolumen lassen sich präzise kontrollieren. Dadurch ist die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit verschiedener Ansätze gegeben.

3 Ziel der Arbeit

Die Detektion und Identifizierung pharmakologisch relevanter Stoffe ist von großer Bedeutung für die medizinische Forschung. Dafür sind Screeningverfahren notwendig, die eine einfache, kostengünstige und schnelle Methode bieten, um eine Vielzahl von möglichen Wirkstoffen zu testen. Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Lab-on-Chip Systems zur Messung liganden-induzierter Aktivität von Ionenkanälen. Als Rezeptoreinheit soll dabei ein *in vitro* exprimierter Ionenkanal ($\alpha 7$ -nAChR) dienen, der in die biomimetische Membran der Sensoroberfläche inkorporiert wird.

Es soll zunächst ein Chipsystem etabliert werden, das die elektrochemische Detektion der Liganden/Rezeptor-Bindung ermöglicht. Dazu benötigt werden eine mikrofluidische Einheit und Elektroden. Die Elektroden sollen hinsichtlich der Eigenschaften, welche die biomimetischen Membranen beeinflussen können (Rauigkeit etc) charakterisiert werden.

Anschließend soll der Aufbau von verschiedenen biomimetischen Schichten im Chipsystem untersucht und diese hinsichtlich ihrer elektrochemischen Eigenschaften beurteilt werden. Hierbei sollen vier Membrantypen im Fokus der Untersuchung stehen: eine tBLM, ein cBLM mit einem Peptid als Abstandhalter, eine hBLM mit angelagerten Vesikeln und Block-Copolymere.

Zur Detektion der Rezeptoraktivierung soll die Funktion des Chipsystems verifiziert und eine geeignete elektrochemische Messmethode etabliert werden.

Zum Abschluss soll die *in vitro* Synthese (IVS) von Membranproteinen auf ihre Anwendbarkeit für LoCs untersucht werden. Dazu muss die Kompatibilität der IVS mit dem mikrofluidischen System überprüft werden. Als Beispiel für einen liganden-gesteuerten Ionenkanal dient der homomere $\alpha 7$ -Subtyp des nicotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR). Es wird getestet, ob sich der nAChR mit einem *in vitro* Expressionssystem synthetisieren lässt. Danach wird untersucht, ob er sich funktionell in biomimetische Membranen einbauen lässt, so dass die Aktivität mit dem vorgestellten Chipsystem detektierbar ist.

4 Methoden

4.1 Elektrochemische Impedanz Spektroskopie (EIS)

Die Elektrochemische Impedanz Spektroskopie (EIS) ist seit Jahren eine etablierte Technik in der Elektrochemie, der Festkörperphysik, aber auch den Materialwissenschaften zur Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften von Materialien und Grenzflächen. Sie findet Anwendung bei der Untersuchung von Halbleitern, Ionischen Leitern und Dielektrika.^{[99],[100]} Obwohl die EIS anfangs hauptsächlich bei der Charakterisierung von festen Materialien wie Batterien oder Brennstoffzellen eingesetzt wurde, finden sich in jüngerer Zeit immer mehr Arbeiten, die EIS als Detektionsmethode für Biochips benutzen^{[57],[101]}. Die meisten dieser Chips verwenden an die Elektrodenoberfläche gebundene Antikörper oder Proteine als Sensoreinheit.

Da die EIS eine nicht-invasive, markierungs-freie Technik ist, die es erlaubt biologische Systeme in ihrer natürlichen Umgebung zu untersuchen, eignet sie sich insbesondere auch zur Untersuchung von Membranproteinen in biomimetischen Membranen.

4.1.1 Theorie der EIS

4.1.1.1 Impedanz

Als Impedanz bezeichnet man den Wechselstromwiderstand Z eines Systems. Die Impedanz ergibt sich dabei aus den Anteilen von ohmschen Widerständen, Kapazitäten und induktiven Elemente. Wobei induktive Elemente im Folgenden nicht näher behandelt werden, da sie bei biologischen Systemen nicht vorkommen.

Im Gegensatz zum rein ohmschen Widerstand R hängt Z von der Frequenz der Wechselspannung ab und lässt sich als komplexe Zahl $Z = Z' + jZ''$ mit dem Realteil Z' und dem Imaginärteil Z'' ausdrücken (um Verwechslungen mit dem Strom I oder $i(t)$ vorzubeugen, wird im Folgenden die komplexe Zahl $\sqrt{-1}$ wie in der Elektrotechnik üblich mit j bezeichnet).

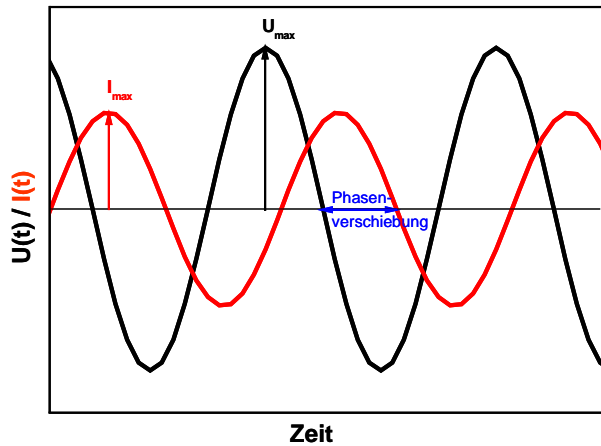


Abb. 16: Darstellung einer Sinusförmigen Wechselspannung und des daraus resultierenden Wechselstroms, sowie der Phasenverschiebung dazwischen.

Per definitionem ist die Impedanz $Z(\omega)$ das Verhältnis der zeitabhängigen Wechselspannung zum zeitabhängigen Wechselstrom und lässt sich bei einer linearen Beziehung zwischen Strom und Spannung ausdrücken als

$$Z(\omega) = \frac{u(t)}{i(t)} \quad (\text{Gl. 1})$$

mit $u(t) = U_{\max} \cdot \sin(\omega t)$ und $i(t) = I_{\max} \cdot \sin(\omega t + \varphi)$

wobei U_{\max} und I_{\max} die maximalen Amplituden von Spannung und Strom sind und φ die Phasenverschiebung.

Die komplexe Darstellung der Impedanz lässt sich sowohl in der Form

$$Z = Z' + jZ'' \quad (\text{Gl.2})$$

mit Z' als Realteil und Z'' als Imaginärteil von Z , als auch in der Eulerschen Darstellung

$$Z = |Z| \cdot (\cos \varphi + j \sin \varphi) \quad (\text{Gl.3})$$

bzw.

$$Z = |Z| \cdot e^{j\varphi} \quad (\text{Gl.4})$$

schreiben. Wobei $|Z|$ der Betrag der Impedanz und φ die Phasenverschiebung zwischen Strom und Spannung ist.

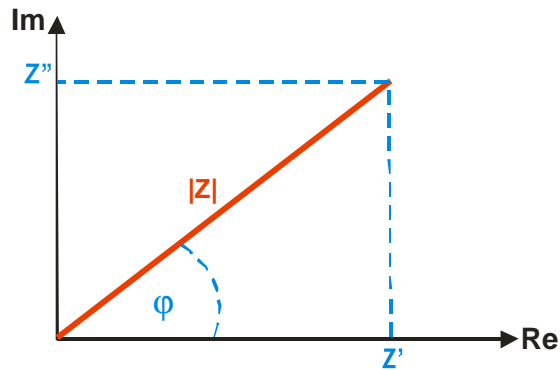


Abb. 17: Darstellung des Zusammenhanges von Z' , Z'' , $|Z|$ und φ einer komplexen Zahl im Zeigerdiagramm

Der Zusammenhang zwischen Z' und Z'' sowie $|Z|$ und der Phasenverschiebung φ wird in Abb. 17 deutlich.

4.1.1.2 Prinzip und Durchführung von EIS Messungen

Der klassische Aufbau eines EIS Experiments besteht aus drei Elektroden: der Arbeitselektrode (AE), deren Eigenschaften untersucht werden sollen; der Referenzelektrode (RE), gegenüber der das Potential der AE bestimmt wird und die Gegenelektrode (GE). Zwischen der GE und der AE fließt der Strom, damit das Potential an der RE stabil bleibt. Bei einem typischen EIS Experiment wird eine Wechselspannung $u(t)$ an die AE mit Bezug auf die RE angelegt. Zwischen AE und GE fließt dann ein Wechselstrom, dessen Amplitude und Phasenverschiebung gemessen wird. Die Amplitude der angelegten Wechselspannung sollte ausreichend klein sein (< 50 mHz) um einen linearen Zusammenhang zwischen Strom und Spannung zu gewährleisten.

4.1.2 Interpretation der Daten

$|Z|$ und φ bzw. Z' und Z'' reichen jedoch nicht aus, um die elektrischen Eigenschaften des Systems so wie deren mögliche Änderung quantitativ zu charakterisieren. Um EIS Daten auswerten zu können, muss man das System durch ein Ersatzschaltbild modellhaft beschreiben und die gemessenen Daten mit diesem Ersatzschaltbild anfitzen. Unter einem Ersatzschaltbild versteht man die Darstellung des Systems durch einen Schaltkreis, der dasselbe Impedanzspektrum hervorbringt. Dieses Schaltbild ist jedoch in jedem Fall eine

Vereinfachung der Realität, da viele kleinere Effekte, die im realen System eine Rolle spielen, im Impedanz Scan nicht aufgelöst werden können und daher vernachlässigt werden müssen.

Ein Ersatzschaltbild kann sich zusammensetzen aus den physikalischen Komponenten ohmscher Widerstand (R), Kapazität (C) und Induktivität (L), aber auch aus Komponenten, die keine elektrotechnische Entsprechung haben, und nur durch eine mathematische Funktion definiert sind, wie z.B. Constant Phase Element (CPE) und Warburg Element (W).

Für biologische Membranen sind v.a. ohmscher Widerstand, Kapazität und CPE von Bedeutung.

Ohmscher Widerstand (R)

Der ohmsche Widerstand wird oft auch einfach nur als Widerstand bezeichnet. Er ist nicht abhängig von der Frequenz und somit

$$Z = R \qquad Z' = R \qquad Z'' = 0$$

Die Phasenverschiebung eines idealen Widerstandes beträgt $\varphi = 0^\circ$

Kapazität (C)

Kapazitive Elemente haben die Eigenschaft Ladung zu trennen, wie z.B. Kondensatoren. Ihr Wert ist sowohl von der Fläche als auch vom Abstand bzw. der Dicke der Schicht abhängig. Nach der Kondensator-Gleichung ist die Kapazität

$$C = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon \cdot A}{d} \qquad \text{(Gl. 5)}$$

Wobei A die Fläche ist, d die Schichtdicke bzw. der Abstand zwischen den beiden Grenzflächen, ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante im Vakuum (8,854 pF/m) und ϵ die Dielektrizitätskonstante des Materials. Theoretisch lässt sich wenn ϵ bekannt ist, aus der Kapazität die Dicke der biomimetischen Schicht bestimmen. Praktisch stellt dies oft ein Problem dar und lässt sich nur näherungsweise realisieren, da ϵ meist unbekannt ist, da die Dielektrizitätskonstante u.a. von der Zusammensetzung der biomimetischen Schicht abhängt.

Die Impedanz einer Kapazität ist von der Frequenz abhängig und rein imaginär.

$$Z = \frac{1}{j\omega C} \qquad Z' = 0 \qquad Z'' = \frac{1}{\omega C}$$

Die Phasenverschiebung eines idealen Kondensators beträgt $\varphi = -90^\circ$

Constant Phase Element (CPE)

Reale Systeme weichen oft von idealen Kapazitäten ab und entsprechen eher einer Verteilung von Kapazitäten. Das CPE berücksichtigt dies durch einen Korrekturfaktor n

$$CPE = \frac{1}{T(j\omega)^n} \quad (\text{Gl. 6})$$

T ist dabei analog zu C eine zeitunabhängige Konstante.

Wie die Kapazität ist auch das CPE rein imaginär.

$$Z = \frac{1}{T(j\omega)^n} \quad Z' = 0 \quad Z'' = \frac{1}{T\omega^n}$$

n kann dabei Werte zwischen -1 und 1 annehmen. -1 entspricht einer idealen Induktivität, 0 entspricht einem idealen ohmschen Widerstand und 1 entspricht einer idealen Kapazität.

Über die physikalische Entsprechung des CPEs gibt es verschiedene Theorien. So können z.B. Unebenheiten auf der Oberfläche, mikroskopische chemische Inhomogenitäten oder Adsorption von Ionen zu Abweichungen vom idealen Verhalten führen ^{[102],[103]}.

Aus den Konstanten T und n des CPEs lässt sich für eine Parallelschaltung von R und C zusammen mit dem Wert für R die entsprechende Kapazität C bestimmen

$$C = \frac{(T \cdot R)^{\frac{1}{n}}}{R} \quad (\text{Gl. 7})$$

4.1.2.1 Darstellungsarten der EIS Daten

In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Möglichkeiten zur graphischen Darstellung von EIS-Daten. Welche Variante man bevorzugt hängt davon ab, auf welchen Aspekt man den Schwerpunkt legt. ^[100]

Ein paar der wichtigsten Darstellungsformen werden im Folgenden am Beispiel einer Parallelschaltung von Widerstand R_m und Kapazität C_m mit einem seriellen Widerstand R_{el} und einer nachgeschalteten Kapazität C_{sc} erläutert, die auch als vereinfachtes Ersatzschaltbild für biomimetische Membranen dient.

Die wichtigsten Variablen dabei sind

die Impedanz $Z = Z' + jZ''$ und

die komplexe Leitfähigkeit, die Admittanz $Y = \frac{1}{Z}$ mit $Y = Y' + jY''$.

Bode Plot

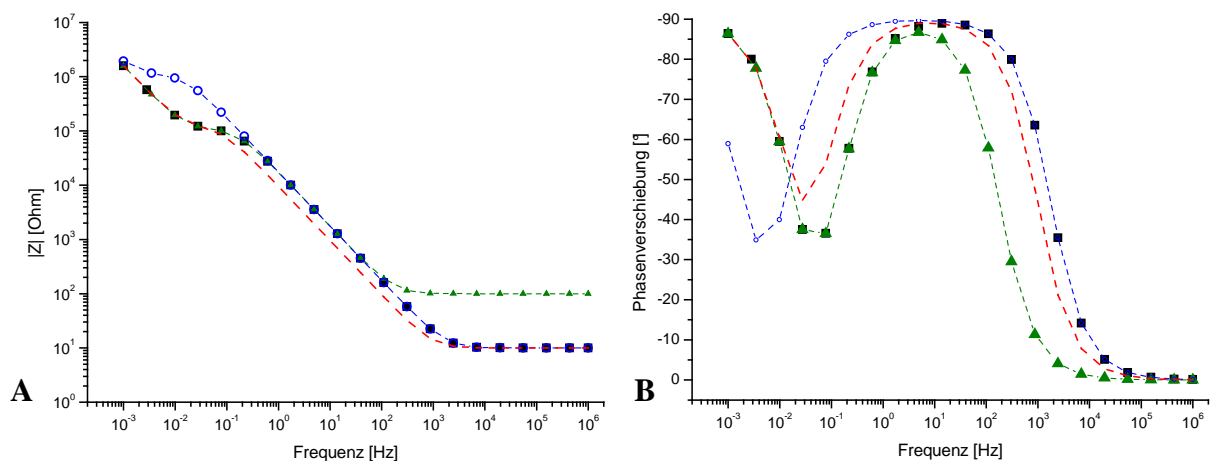
Beim Bode Plot (Abb. 18 A und B) wird die Phasenverschiebung φ und der Betrag der Impedanz $|Z|$ logarithmisch gegen die Frequenz aufgetragen. Aus der Phasenverschiebung kann man direkt ersehen, welche Frequenzbereiche von R bzw. C dominiert werden. Bei einer Phasenverschiebung von -90° herrschen die kapazitiven Einflüsse vor. Bei Frequenzen mit einer Phasenverschiebung von 0° verhält sich das System wie ein reiner ohmscher Widerstand. Die Plateaus von $|Z|$ entsprechen den Werten der Widerstände.

Nyquist Impedanz Plot

Beim Nyquist Impedanz Plot (Abb. 18 D) wird der Imaginärteil Z'' linear gegen den Realteil Z' aufgetragen. Jedes RC-Element wird durch einen Halbkreis repräsentiert. Die Schnittstellen der Halbkreise mit der Z' -Achse spiegeln die Werte des ohmschen Widerstandes wieder. Ein Nachteil ist, dass die Frequenzabhängigkeit bei dieser Darstellung nicht mehr deutlich wird. Ein Vorteil der Nyquist Plots ist, dass die Form der Halbkreise einen Rückschluss auf die Charakteristik der Komponenten zulässt. Ein perfekter Halbkreis, dessen Mittelpunkt auf der Z' -Achse liegt, rührt von einer idealen Kapazität im RC-Element her. Ein abgeflachter Halbkreis oder einer, dessen Mittelpunkt unterhalb der Achse liegt, deutet auf ein CPE Element hin.

(Frequenzreduzierter) Admittanz Plot

Beim Admittanz Plot (Abb. 18 C) wird Y''/ω linear gegen Y'/ω aufgetragen. Jedes RC-Element wird auch hier durch einen Halbkreis repräsentiert. Die Schnittstellen der Halbkreise mit der Y''/ω -Achse spiegeln die Werte der Kapazität wieder. Dabei findet man die niedrigen Kapazitäten bei den hohen Frequenzen.



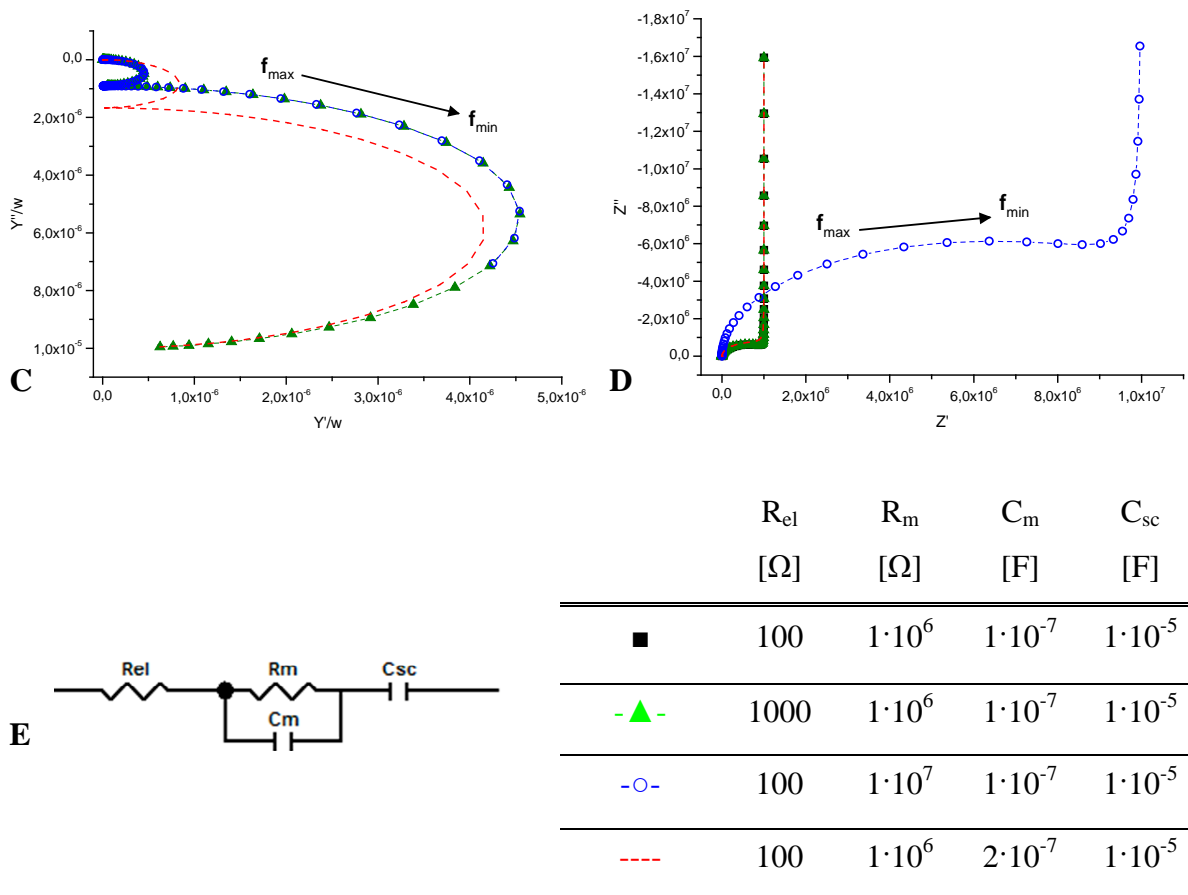


Abb. 18: Verschiedene Darstellungsmöglichkeiten von Daten einer Impedanz-Messung: Bode-Plot $|Z|$ (A), Bode-Plot Phasenverschiebung (B), frequenzreduzierter Admittanz-Plot (C), Nyquist Impedanz-Plot (D). Die Kurven ergeben sich für das zugrunde liegende Ersatzschaltbild eines $R(RC)C$ -Elementes mit den aufgeführten Werten (E).

Abb. 18 zeigt die Impedanzspektren in den unterschiedlichen Darstellungsformen am Beispiel einer einfachen $R(RC)C$ -Schaltung und verdeutlicht gleichzeitig, welche Änderungen in welcher Darstellungsform am besten repräsentiert werden. Zu sehen sind die Auswirkungen einer Änderung des Elektrolytwiderstandes R_{el} (-▲-), des Membranwiderstandes R_m (-○-) und der Membrankapazität C_m (---).

Den besten Überblick über das System gibt der Bode Plot, da in ihm die Frequenzabhängigkeit am deutlichsten zu erkennen ist. Die Impedanz wird bei verschiedenen Frequenzen von verschiedenen elektrochemischen Charakteristiken dominiert. Eine Phasenverschiebung von -90° und Steigung von -1 bei $|Z|$ bedeutet die Dominanz eines kapazitiven Elementes. Ein Plateau bei $|Z|$ zeigt einen ohmschen Widerstand an. Im Nyquist Impedanz Plot und im Admittanz Plot ist die Frequenzabhängigkeit nicht ersichtlich und die Frequenzen müssten extra gekennzeichnet werden. Außerdem dominieren auf Grund der linearen Skalierung die hohen Impedanzen. So ist eine Änderung von R_{el} nur im Bode Plot als

parallele Verschiebung von $|Z|$ bei hohen Frequenzen zu beobachten. Im Admittanz Plot werden die Kapazitäten betont. Eine Änderung von C_m zeigt sich in einer Verschiebung des Schnittpunktes mit der Y''/ω -Achse. Die kleinere Kapazität C_m lässt sich dabei im höher frequenten Bereich bestimmen. Änderungen von R_m zeigen hier keine Auswirkung. Sie werden dafür deutlich im Nyquist Impedanz Plot dargestellt. Eine Erhöhung von R_m führt zu einer Vergrößerung des Halbkreises von Z'' gegen Z' . Der größere Widerstand R_m lässt sich bei niedrigen Frequenzen bestimmen. Im Bode Plot ist eine Änderung von R_m bei Frequenzen unter 1 Hz zu erkennen. Änderungen von C_m zeigen sich als parallele Verschiebung des Bereiches mit der Steigung -1.

Z'' gegen f

Dies ist eine seltener anzutreffende Darstellungsart, bei welcher der Imaginärteil der Impedanz logarithmisch gegen die Frequenz f aufgetragen wird (vgl. Abb. 19). Das Maximum von $|-Z''|$ liegt bei der charakteristischen Frequenz $f_c = 1/\tau = 1/RC$ und hat einen Betrag von $R/2$. Man kann aus diesem Plot die charakteristische Frequenz eines RC-Elements bestimmen und gleichzeitig Veränderungen von R beobachten.

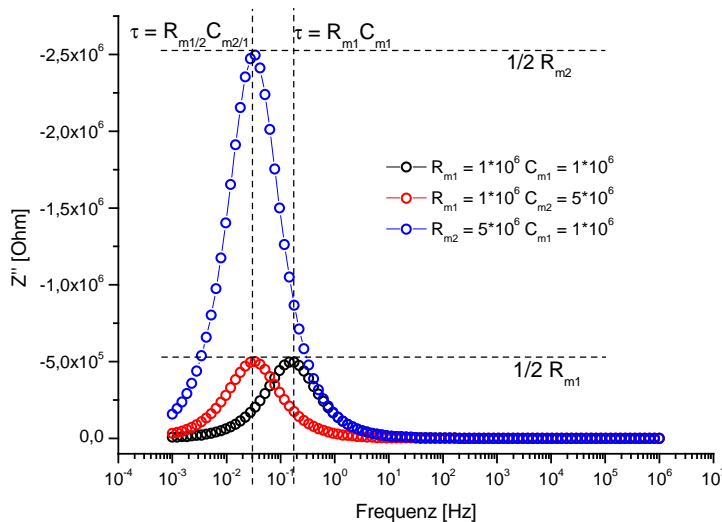


Abb. 19: Darstellung von Z'' gegen den Logarithmus der Frequenz für ein RC-Element. Eingezeichnet sind die charakteristische Frequenz $f_c = 1/\tau$ und $1/2 R$.

4.1.2.2 Datenerfassung und Auswertung

EIS Messungen erfolgen mit einem Potentiostaten und einem Frequenzanalysator. In der vorliegenden Arbeit wurden die Messungen mit einem μ Autolab (ECO Chemie; Utrecht,

Niederlande) mit eingebauten FRA-Modul (Frequency Response Analyzer) durchgeführt. Die Impedanz Scans wurden im Frequenzbereich zwischen 10 kHz und 5 mHz (mit einer logarithmischen Verteilung von 30 Messpunkten) bei einem DC-Potential von 0 V und einer AC-Amplitude von 10 mV gemessen. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm ZView (Version 2.90, Scribner Associates, USA).

Aus dem Kurvenverlauf im Bode- sowie im Admittanz Plot lassen sich Rückschlüsse auf das System ziehen. In Kombination mit der theoretischen Vorstellung der Charakteristik der Oberfläche lässt sich daraus ein Ersatzschaltbild generieren. Dieses Ersatzschaltbild dient als Grundlage der Fits bei der Auswertung. Bei der Wahl des Ersatzschaltbildes gilt es zu bedenken, dass viele unterschiedliche Kombinationen von Schaltelementen zum selben Impedanzverlauf führen. Um verlässliche und v.a. vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, sollte jedoch immer ein möglichst einfaches Modell mit möglichst wenig Unbekannten gewählt werden.

Um die Impedanzdaten anzufitten muss zunächst eine vernünftige Abschätzung der Ausgangswerte vorgenommen werden. Für ein R(RC)C Ersatzschaltbild lassen sich aus der $|Z|$ -Kurve des Bode-Plots zwei Widerstände R_m und R_{el} ablesen, wo die Steigung der Kurve 0 beträgt (vgl. Abb. 18 A). Dabei entspricht das Plateau im höher frequenten Bereich dem vorgeschalteten Elektrolytwiderstand R_{el} . Im Admittanz-Plot sind zwei Schnittpunkte mit der Y''/ω -Achse zu erkennen, wobei sich der zweite Halbkreis, der C_{sc} darstellt, meist nur durch Extrapolation ergibt. Diese Werte werden als Ausgangswerte für den Fit eingesetzt. Über einen Algorithmus auf Basis der kleinsten Quadrate (least square fit) werden die Werte der einzelnen Elemente des Ersatzschaltbildes bestimmt.

4.1.3 Auf der Suche nach dem richtigen Modell

Wie bereits erwähnt, können Impedanzmessungen nur interpretiert werden, wenn ihnen ein zutreffendes Modell des untersuchten Systems zu Grunde gelegt wird. Daher empfiehlt es sich, bei der Auswertung von Impedanzdaten von Biosensoren ein wenig Zeit auf die wohlüberlegte Wahl des am besten geeigneten Ersatzschaltbildes zu verwenden.

Eine natürliche Zellmembran kann als Parallelschaltung eines Widerstandes R_m mit einer Kapazität C_m dargestellt werden. Der Widerstand verdeutlicht darin das Hindernis, das Lipidschichten dem Durchtritt von Ionen entgegen setzen. Die Kapazität beruht auf der Eigenschaft der Zellmembran, Ladung zu trennen. Dazu kommt noch eine serielle Komponente R_{el} , der Widerstand des Elektrolyten. Bei Modellmembranen an Oberflächen

findet sich noch ein zusätzliches RC-Glied, das von der der Grenzschicht an der Elektrodenoberfläche herrührt, mit R_{sc} und C_{sc} . Bei dichten Membranen fällt $R_{sc}C_{sc}$ kaum ins Gewicht. Bei tBLMs mit einer ausgeprägten Spacerregion kann sich im Ionenreservoir jedoch eine ausgeprägte Helmholtz-Doppelschicht ausbilden.

Welches Ersatzschaltbild verwendet wird hängt vom Aufbau der biomimetischen Membran ab.

Das ideale Modell ^[104]

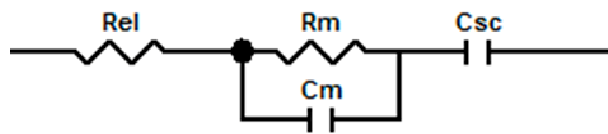


Abb. 20: Ersatzschaltbild für eine ideale biomimetische Membran mit einem RC-Element.

Im idealen Fall ist die biomimetische Membran defektfrei und hoch isolierend. Sie kann dann durch eine Parallelschaltung von R_m und C_m bzw. CPE_m dargestellt werden, mit dem Elektrolytwiderstand R_{el} in Serie und einer nachgeschalteten Kapazität C_{sc} . R_{sc} ist hierbei nicht unterscheidbar. Die Verwendung eines CPEs berücksichtigt, dass es sich bei einer Lipiddoppelschicht um ein inhomogenes System handelt, deren hydrophile und hydrophobe Regionen unterschiedliche elektrochemische Eigenarten aufweisen. Daher wird die Membran wie eine Verteilung von Kapazitäten behandelt.

Das festkörpergestützte Modell ^[105]

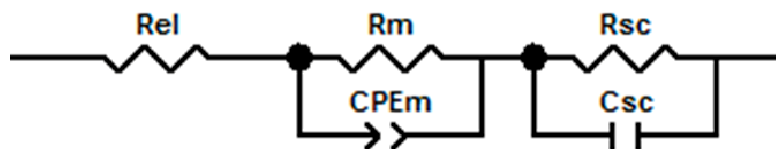


Abb. 21: Ersatzschaltbild für eine festkörpergestützte Membran mit zwei RC-Elementen.

Hierbei wird zusätzlich zur Membran auch noch die Grenzschicht der Elektrode berücksichtigt. Gerade bei ausgedehnten Ionenreservoirs unterhalb der Membran kann diese nämlich nicht mehr vernachlässigt werden. Auch biomimetische Schichten aus mehreren

Lagen mit unterschiedlichen elektrischen Eigenschaften können durch zwei hintereinander geschaltete RC-Glieder beschrieben werden.

Bei tBLMs oder cBLMs mit Abstandshalter ist dieses Modell zu bevorzugen. Es wurde in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich für die Charakterisierung der biomimetischen Schichten verwendet. Der kapazitiven Verteilung innerhalb der Lipiddoppelschicht wird dabei durch die Verwendung eines CPEs Rechnung getragen. Dieses Modell eignet sich auch zur Beschreibung von Monolagen auf rauhen Elektrodenoberflächen. Auf Grund dieser Rauigkeit kann bei solchen Systemen der Beitrag der Grenzfläche Elektrode / Monolage nicht vernachlässigt werden.

Das Diffusionsmodell ^[106]

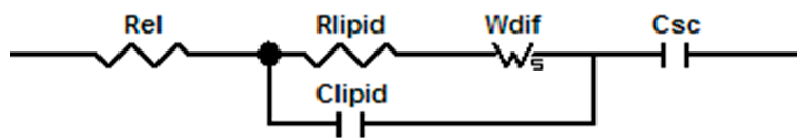


Abb. 22: Ersatzschaltbild für eine biomimetische Membran, die die Diffusion von Ionen erlaubt.

In einem System, das den Durchtritt von Ionen durch die Membran erlaubt (z.B. Lipiddoppelschicht mit eingebauten Poren), muss auch die Diffusion permeabler Ionen berücksichtigt werden. In diesem Fall findet das Randles Ersatzschaltbild Anwendung. Dem Membranwiderstand R_m in Serie nachgeschaltet beinhaltet es noch ein Warburg-Element, das die Diffusion von Ionen simuliert. Das Problem dieses Modells ist die große Anzahl an unbekanntenen Variablen des Warburg-Elements in der zugrunde liegenden Gleichung und die daraus resultierende Ungenauigkeit der Fitergebnisse. Es findet daher in der vorliegenden Arbeit keine Anwendung.

Das Defekt Modell ^[107]

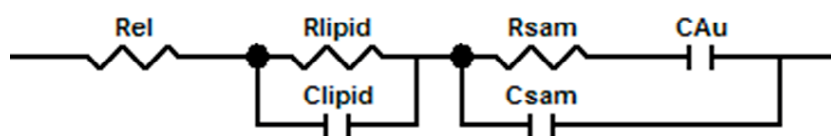


Abb. 23: Ersatzschaltbild einer biomimetischen Membran mit Defektstellen.

Defekte in der Lipiddoppelschicht führen dazu, dass die elektrochemischen Charakteristiken der darunterliegenden Lagen prominenter zu Tage treten. Um bei tBLMs „Löcher“ in der äußeren Lipidschicht zu berücksichtigen, wurde von Jenkins et al. ein Modell verwendet, das ebenso wie das festkörpergestützte Modell aus zwei hintereinandergeschalteten RC-Elementen besteht. Zusätzlich liegt aber der Widerstand der Monolage in Serie mit einer Kapazität, die für die Grenzschicht an der Elektrode steht.

Auch dieses Modell fand in der vorliegenden Arbeit keine Anwendung. Da das hauptsächliche Augenmerk auf der Charakteristik der Lipidschicht lag, wurden Spacerregion und Elektrodengrenzschicht als eine Einheit betrachtet.

4.1.4 Die elektrische Doppelschicht

Ideal polarisierte Elektroden (IPE) sind Elektroden, bei denen kein Ladungstransfer über die Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt stattfinden kann; ein Beispiel dafür ist eine Goldelektrode in physiologischem Puffer. Eine solche IPE verhält sich wie ein Kondensator, und es bildet sich eine elektrochemische Doppelschicht.

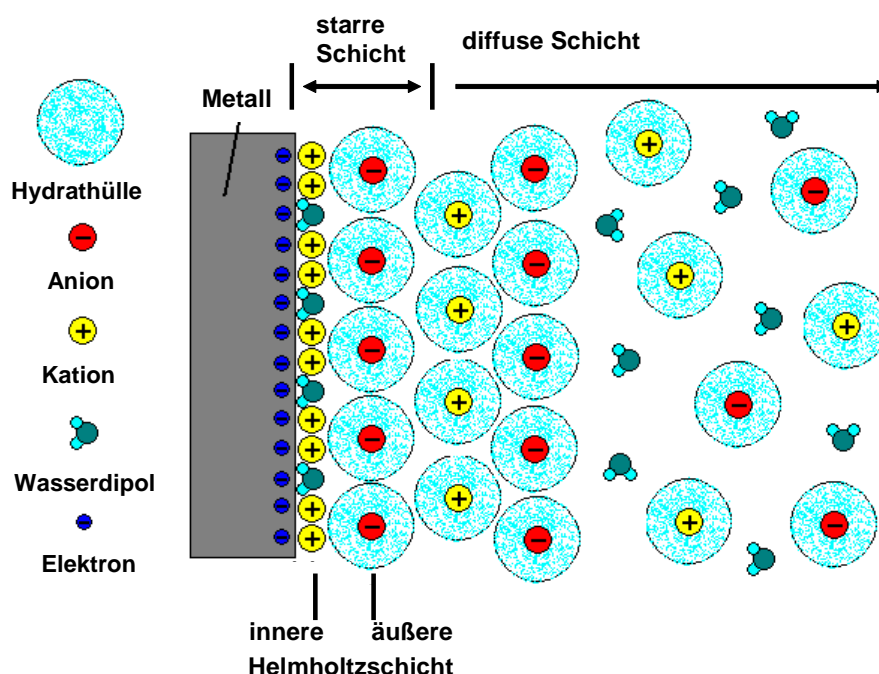


Abb. 24: Schematische Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht nach dem Gouy-Chapman Modell. Spezifisch adsorbierte Ionen bilden die Helmholtzschicht direkt über der Elektrode. Unspezifisch adsorbierte Ionen bilden die diffuse Schicht; die Verteilung der Ionen variiert mit dem Abstand zur Elektrode.^[108]

Ein einfaches Modell dieser Doppelschicht wurde von Helmholtz vorgeschlagen, bei dem sich eine Lage Ionen direkt an der Elektrodenoberfläche anlagert. Dieses Modell wurde mit der Zeit weiter verfeinert und im differenzierten Gouy-Chapman Modell zusammengefasst. Hierbei wird zwischen unterschiedlichen Bereichen unterschieden. Direkt über der Elektrode bildet sich eine starre Schicht spezifisch adsorbierter Ionen und Lösungsmittel – die innere Helmholtzschicht. Gelöste Ionen können sich dieser Schicht nur bis zu einem bestimmten Abstand annähern. Man spricht hierbei von unspezifischer Adsorption. Auf Grund von thermischer Bewegung sind die gelösten, unspezifisch adsorbierten Ionen in der diffusen Doppelschicht verteilt. ^[99]

4.1.5 Impedanzmessungen mit Biosensoren

Zur großen Klasse der elektrochemischen Biosensoren gehören neben den amperometrischen und voltammetrischen auch die Impedanz-Biosensoren. Im Gegensatz zu den ersten beiden, bei denen eine angelegte Gleichspannung die Bedingungen an der Sensoroberfläche verändert, wird bei einem auf Impedanz basierenden Biosensor im AC-Gleichgewicht gemessen.

Als Technik zur Charakterisierung von Oberflächen bietet die EIS vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten beim Einsatz in Biosensoren. Sie ist kostengünstig, eignet sich für Miniaturisierungen und kommt ohne Markierungen aus.

Impedanz-Biosensoren lassen sich weiter unterteilen in faradaysche und nicht-faradaysche Sensoren. Bei den faradayschen Biosensoren wird die Reaktion des Systems auf die Zugabe einer redox-aktiven Spezies beobachtet. Hierbei wird Ladung über die Elektrodengrenzfläche transportiert. Im Gegensatz dazu fließen in nicht-faradayschen Sensoren transiente Ströme ohne Ladungstransfer (z.B. beim Umladen von Kondensatoren). Sie benötigen keine zusätzlichen Reagenten und eignen sich daher eher für die Anwendung bei biologischen Systemen in physiologischen Pufferlösungen. Die Änderungen der Impedanz können dabei unterschiedliche Ursachen haben, wie Verdrängung von Wasser, Änderungen der dielektrischen Eigenschaften oder elektrostatische Abstoßung^[109].

Die meisten nicht-faradayschen Sensoren sind Affinitäts-Biosensoren und detektieren die Bindung von Antigenen an Antikörper oder Einzelstrang-DNA an Oligotide. Diese Bindungsereignisse lassen sich als Änderungen der Kapazität messen, da alle an die Oberfläche angelagerten Bestandteile zur Doppelschichtkapazität beitragen^{[110],[111]}. So nutzen z.B. Immunosensoren aus, dass die Zunahme der Schichtdicke bei Antigenbindung zu einem Absinken der Kapazität führt. Jüngere Arbeiten beschäftigen sich auch mit der Möglichkeit, die Aktivität von Ionenkanälen mit impedimetrischen Biosensoren zu messen^{[112],[113]}. Dabei handelt es sich aber zumeist um permanent offene Kanäle, und somit um ein quasi-stabiles System. Noch wenig erforscht ist die Anwendbarkeit von Impedanztechniken für die Aktivitätsmessung an liganden-gesteuerten Ionenkanälen.

4.2 Cyclische Voltammetrie (CV)

Cyclische Voltammetrie ist eine elektrochemische Methode, bei der durch Anlegen einer Sägezahnspannung der resultierende Strom gemessen wird. CV wird vor allem zur Untersuchung von Redox-Reaktionen verwendet. Dabei werden faradaysche und nicht faradaysche Prozesse unterschieden.

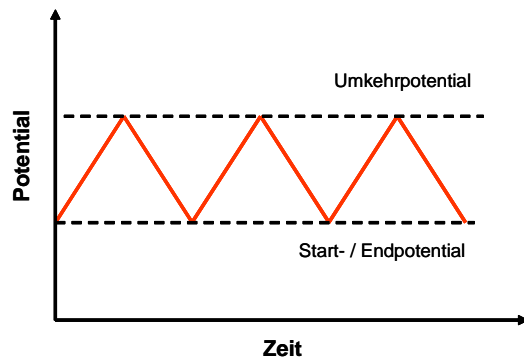


Abb. 25: Verlauf einer bei der cyclischen Voltammetrie angelegten Sägezahn- bzw. Dreiecksspannung.

Wichtige Parameter bei der CV sind die Potentialstufen und die Scan Rate. Die Scan-Rate v wird in V/s angegeben. Sie beschreibt die Änderung der Gleichspannung.

Nicht-faradaysche Ströme sind kapazitiver Art. Es findet keine elektrochemische Reaktion statt. Aus der Scan-Rate $v = \frac{\partial U}{\partial t}$, die die zeitliche Änderung der Spannung U beschreibt, und dem resultierenden Strom I lässt sich dann die Kapazität C eines Systems ermitteln.

Es gilt

$$\partial Q = C \cdot \partial U \quad \text{und} \quad \partial Q = I \cdot \partial t$$

$$v = \frac{\partial U}{\partial t} = \frac{I}{C} \quad \Rightarrow \quad C = \frac{I}{v} \quad (\text{Gl.18})$$

Faradaysche Ströme werden durch elektrochemische Reaktionen hervorgerufen. Bei der CV in einem Elektrolyten, der eine redox-aktive Spezies enthält, treten im CV-Diagramm charakteristische Peaks auf. Das Redox-Paar tauscht Elektronen mit dem Metall der Elektrode aus. Die Peakhöhe beschreibt dabei den Grenzstrom der Oxidation bzw. Reduktion.

Nach der Randles-Sevcik Gleichung gilt für den maximalen Strom ^[122]

$$i_{p,\max} = 2,69 \cdot 10^5 \cdot c \cdot A \cdot \sqrt{n^3 D \cdot v} \quad (\text{Gl.19})$$

Dabei ist $i_{p,\max}$ der maximale Peak-Strom, c die Konzentration des Redox-Paares, A die Elektrodenfläche, n die Zahl der transferierten Elektronen pro Molekül, D die Diffusionskonstante und v die Scan-Rate.

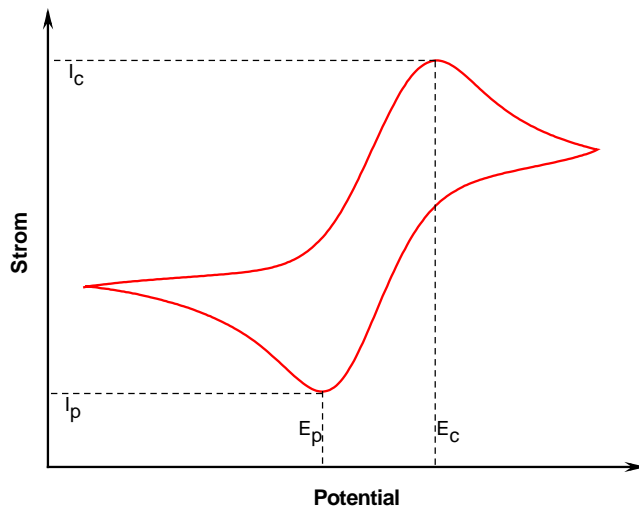


Abb. 26: Beispielhafter Verlauf eines cyclischen Voltammogramms an einer Gold-Elektrode in Kaliumhexacyanoferrat ($K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$).

Wird die Elektrode gegenüber dem Elektrolyten durch ein Dielektrikum isoliert – z.B. eine defektfreie biomimetische Membran – kann an diesen Stellen kein Elektronentransfer stattfinden. Wenn die Zusammensetzung des Elektrolyten und die Scan-Rate gleich bleiben, reduziert sich die Peakhöhe entsprechend der zugänglichen Elektrodenfläche.

4.3 Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie (SPR, Surface Plasmon Resonance)

Bei der Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie (SPR, surface plasmon resonance) handelt es sich um eine optische Methode zur Untersuchung von Oberflächen. Sie wird vor allem eingesetzt bei der Charakterisierung von molekularen Wechselwirkungen wie dem Binden von Antikörpern oder der Anlagerung von Analyten an Sensoroberflächen. Zudem eignet sich SPR für die Charakterisierung dünner Filme oder kinetischer Prozesse wie das Schwellen oder Schrumpfen leitfähiger Polymere. ^{[114],[115]}

Der Vorteil von SPR liegt darin, dass es eine nicht invasive Methode darstellt, die markierungsfreie Messungen an biologischen Systemen erlaubt.

4.3.1 Oberflächenplasmonen und wie sie angeregt werden

Oberflächenplasmonen (SPs, surface plasmons) sind Schwingungen des quasi-freien Elektronengases an der Grenzfläche zwischen einem Metall und einem Dielektrikum mit unterschiedlichen Brechungsindices n . Plasmonen können durch elektromagnetische Wellen (wie Licht) bestimmter Wellenlänge unter einem bestimmten Einfallswinkel angeregt werden, wenn Energie und Impuls der einfallenden Welle gleich denen des Plasmons sind.

Für das Verständnis der Entstehung und der Anregungsbedingungen von SPs sind die Totalreflexion, evaneszente Felder und die Dispersionsrelation von Bedeutung. ^{[114],[115]}

Totalreflexion

Wenn Licht von einem optisch dichteren Medium 2 in ein optisch dünneres Medium 1 ($n_1 < n_2$) eindringt, so kommt es bei einem kritischen Winkel θ_c zur Totalreflexion. θ_c bestimmt sich durch die Snellius Gleichung zu

$$n_1 \cdot \sin \theta_1 = n_2 \cdot \sin \theta_2$$
$$\sin \theta_c = \frac{n_1}{n_2} \quad (\text{Gl. 8})$$

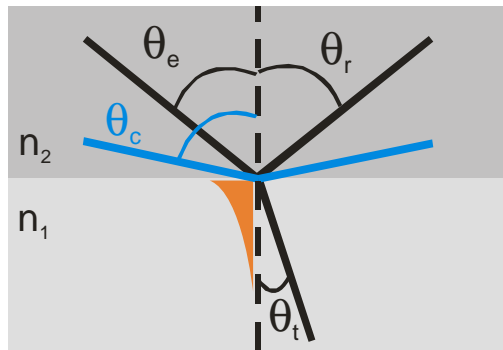


Abb. 27: Schematische Darstellung der Totalreflexion bei Ausbreitung von Licht aus einem Medium mit n_2 in ein Medium mit n_1 (wobei $n_2 > n_1$). Dabei ist θ_e der Einfallswinkel, θ_r der Winkel des reflektierten Strahls, θ_t der Winkel des transmittierten Strahls und θ_c der kritische Winkel ab dem Totalreflexion auftritt. Ebenfalls eingezeichnet ist das evaneszente Feld (orange), das bei Totalreflexion im optisch dünneren Medium entsteht.

Bei Totalreflexion entsteht auf der gegenüber liegenden Seite der Grenzfläche im optisch dünneren Medium 1 ein evaneszentes Feld. Durch Aufbringen einer Metallschicht auf der Grenzfläche kann dieses evaneszente Feld verstärkt werden – bei Gold ungefähr um das 15 – 20-fache ^[115].

Evaneszente Felder

Trifft eine Welle aus Medium 2 auf ein Medium 1, in dem sie sich nicht ausbreiten kann, wie es z.B. bei der Totalreflexion der Fall ist, so fällt die Feldstärke an der Grenzfläche nicht abrupt auf Null ab. Entsprechend der Stetigkeitsbedingung, gibt es eine Komponente der Feldstärke im Medium 2, die exponentiell abklingt. Die Abklinglänge l beträgt dabei

$$l = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{(n \cdot \sin \theta)^2 - 1}} \quad (\text{Gl. 9})$$

wobei λ die Wellenlänge des anregenden Lichtes ist. Als Faustformel kann man für die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes von der halben Wellenlänge ausgehen.

Dispersionsrelation

Die Dispersionsrelation hilft dabei zu verstehen, unter welchen experimentellen Bedingungen Plasmonen angeregt werden können. Sie zeigt den Zusammenhang zwischen Kreisfrequenz ω und Wellenvektor k (vgl. Abb. 28).

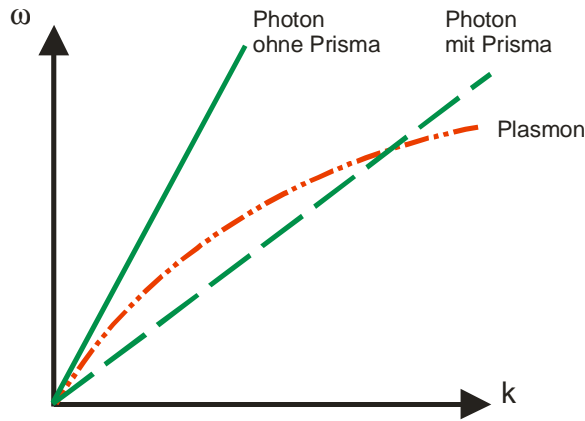


Abb. 28: Dispersionsrelationen von Photonen ohne Prismenkopplung (—) und mit Prismenkopplung (- - -) sowie von Plasmonen (- . - .). Nähere Erläuterungen siehe Text (nach ^[114]).

Für die Anregung von SPs mit Licht ist nur die Komponente $k_{\text{ph},z}$ des Wellenvektors senkrecht zur Oberfläche relevant. SPs können daher nur mit transversal polarisiertem Licht angeregt werden.

Die Feldverteilung elektromagnetischer Wellen wird durch die Maxwell Gleichungen beschrieben. Für ein homogenes isotropes Medium, bei dem Ladungs- und Stromdichte gleich Null sind, lauten sie für das elektrische Feld \vec{E} und das magnetische Feld \vec{H}

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0 \quad \vec{\nabla} \times \vec{E} + \frac{\mu}{c} \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} = 0 \quad (\text{Gl.10})$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{H} = 0 \quad \vec{\nabla} \times \vec{H} - \frac{\varepsilon}{c} \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} = 0 \quad (\text{Gl.11})$$

Wobei c die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum, ε die Dielektrizitätszahl und μ die Suszeptibilität ist. Daraus ergibt sich an einer Grenzschicht Metall (m) / Dielektrikum (d) in der yz -Ebene für das elektrische Feld an der Grenzschicht ($x = 0$)

$$E_{zd} = \frac{ic}{\varepsilon_d \omega} ik_{xd} H_{yd} \quad (\text{Gl.12})$$

$$E_{zm} = -\frac{ic}{\varepsilon_m \omega} ik_{xm} H_{ym} \quad (\text{Gl.13})$$

Durch die Kontinuitätsbedingung an der Oberfläche gilt

$$E_{zd} = E_{zm} \quad H_{zd} = H_{zm}$$

Was als einzige nicht triviale Lösung zu der Bedingung

$$\frac{k_{xd}}{k_{xm}} = -\frac{\epsilon_d}{\epsilon_m} \quad (\text{Gl.14})$$

führt. Dies bedeutet, dass Plasmonen nur an der Grenzschicht von Materialien auftreten können, deren Dielektrizitätskonstanten ϵ_d und ϵ_m unterschiedliche Vorzeichen haben. Diese Bedingung ist bei der Verwendung eines Dielektrikums und eines Metalls erfüllt, da Metalle im optischen Frequenzbereich negative Dielektrizitätskonstanten haben.

Zudem muss an der Grenzfläche zwischen Metall und Dielektrikum die Kontinuitätsbedingung $k_{zd} = k_{zm}$ erfüllt sein und man erhält die Dispersionsrelation

$$k_{SP} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \cdot \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad \text{für den Wellenvektor des Plasmons und} \quad (\text{Gl.15})$$

$$k_{\text{photon}} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d} \quad \text{für den Wellenvektor des Photons} \quad (\text{Gl.16})$$

Daraus folgt, dass der Wellenvektor des Photons im Dielektrikum immer kleiner ist als der der Plasmonen. Abb. 28 zeigt die Dispersionsrelationen. Man kann transversal polarisiertes Licht also nicht direkt zur Anregung von Plasmonen verwenden. Stattdessen muss das Licht durch ein Medium mit höherer Brechzahl „eingekoppelt“ werden. Eine Möglichkeit dazu ist die Verwendung eines Prismas mit der Dielektrizitätskonstante ϵ_{prisma} . 1968 wurden von Otto und Kretschmann sowie Raether zwei Varianten zur optischen Anregung mit Prismen vorgeschlagen. Auf Grund ihrer vielseitigeren Anwendbarkeit wird die sogenannte Kretschmann Konfiguration (vgl. Abb. 29) in den meisten prismenbasierten SPR-Messaufbauten verwendet ^[116].

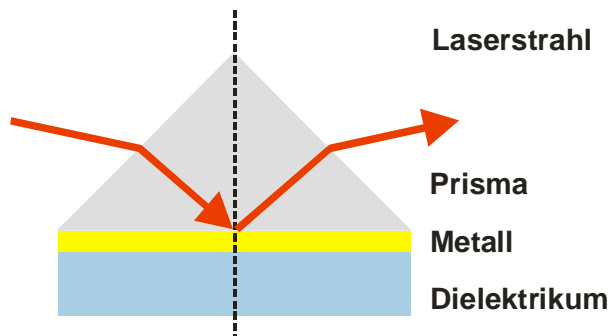


Abb. 29: Kretschmann-Konfiguration.
Auf einem hochbrechenden Prisma ist ein dünner Metallfilm aufgebracht (ca. 50 nm), auf dessen anderer Seite sich das Dielektrikum befindet.

Hierbei wird auf die Unterseite eines hochbrechenden Prismas ein dünner Metallfilm aufgetragen. Alternativ und für die bessere Wiederverwertbarkeit kann der Metallfilm auf einen Glasträger aufgebracht werden, der über Indexöl mit dem Prisma verbunden wird. Die Dispersionsrelation des Photons nimmt dann die Form

$$k_{\text{Photon}} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_{\text{Prisma}}} \cdot \sin \theta_e \quad (\text{Gl.17})$$

an. Der Wellenvektor k ist jetzt vom Einfallswinkel θ_e abhängig. Das Photon verfügt über ein größeres Moment, welches eine Überschneidung mit dem Moment des Plasmons hat. SP Anregung ist möglich (vgl. Abb. 28).

Anregung von Plasmonen durch Totalreflexion

Es ist also mit Totalreflexion möglich, an einer Grenzschicht Dielektrikum/Metall Plasmonen anzuregen. Beim korrekten Winkel θ_r überlappt das evaneszente Feld der Totalreflexion des einfallenden Lichts mit dem Plasmon und es kommt zur Resonanz. Stellt man die Intensität des reflektierten Lichts gegen den Einfallswinkel dar, zeigt sich die Plasmonenanregung als Abfall der Intensität.

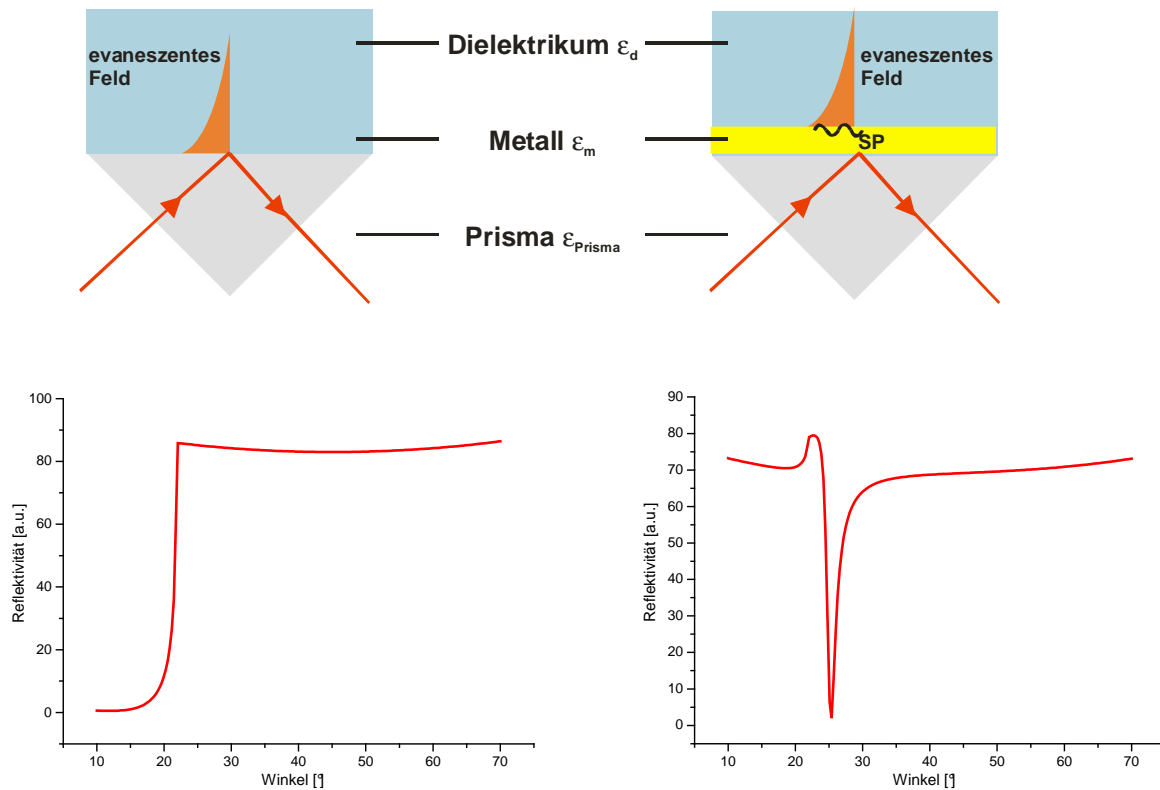


Abb. 30: Darstellung der Intensität des reflektierten Lichts (Reflektivität) in Abhängigkeit vom Einfallswinkel ($\theta_c \approx 22^\circ$)
 links: an einer Grenzfläche Glas/Dielektrikum (Totalreflexion)
 rechts: an einer Grenzfläche Metall/Dielektrikum mit Einkopplung durch ein Prisma (abgeschwächte Totalreflexion), beim Resonanzwinkel θ_r wird ein Minimum der Reflektivität beobachtet

Abb. 30 zeigt den Intensitätsverlauf bei Totalreflexion einmal an der Grenzschicht Glas/Dielektrikum und einmal Metall/Dielektrikum mit Einkopplung durch ein Prisma. Die Lage des Minimums ist dabei von der Dielektrizitätskonstante des Dielektrikums ϵ_d abhängig.

4.3.2 Der SPR-Messaufbau

Die Messzelle ist nach der Kretschmann Konfiguration aufgebaut. Die Unterseite bildet ein Quarzglas, in das die Zuläufe eingelassen sind. Die Reaktionskammer der Messzelle wird durch einen PDMS-Spacer definiert. Die Oberseite bildet ein Glasträger (BK7; Metzler) mit einer aufgedampften Goldschicht ($d = 50 \text{ nm}$ mit Aufdampfanlage Edwards 600) auf den mit Immersionsöl ($n = 1,7$) das Prisma (LaSFN9, $n = 1,84$, Schott) aufgesetzt wird. Die Glasträger

werden vor dem Bedampfen gereinigt (15 min Ultraschall in 2 % Hellmanex, 15x spülen mit Reinstwasser, 10 min Ultraschall in EtOH, 15x spülen mit Reinstwasser)

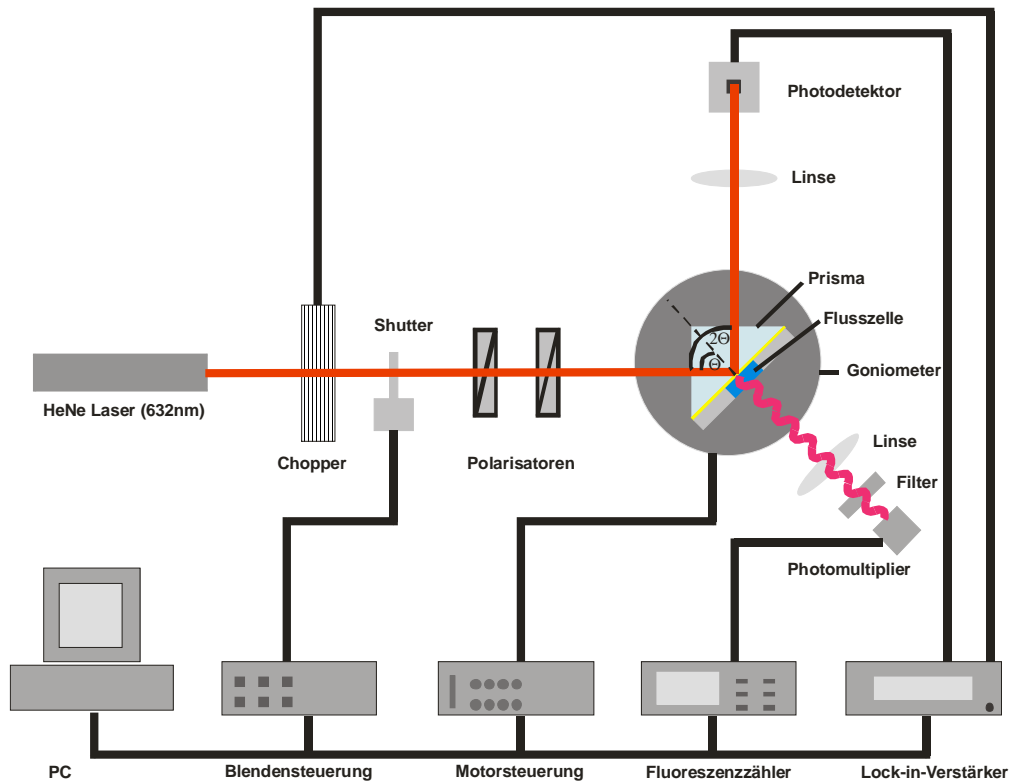


Abb. 31: Aufbau des verwendeten SPR-Messgerätes. Erläuterungen siehe Text.

Abb. 31 zeigt den schematischen Aufbau eines SPR-Setups, das am MPI-P, Mainz aufgebaut und für die vorliegende Arbeit verwendet wurde.

Als Lichtquelle dient ein HeNe-Laser ($\lambda = 632 \text{ nm}$). Der Strahl wird zunächst durch einen Chopper geführt, der der Lock-in Detektion dient. Danach sorgen zwei Polaristoren für die transversale Polarisation des Lichts und die Abschwächung der Intensität, bevor der Laser auf das Prisma und die Probe trifft. Die Probe ist auf einem Goniometer befestigt, das die Einstellungen des Winkels mit einer Genauigkeit von $0,001^\circ$ erlaubt. Das reflektierte Licht wird durch eine Sammellinse geführt und mit einer Photodiode detektiert. Photomultiplier, Filter und zweite Linse werden für die weiter unten beschriebenen Fluoreszenzmessungen benötigt.

Die Verwendung eines Goniometers erlaubt verschiedene Messmethoden wie den Winkel-Scan oder die Kinetik-Messung bei festem Winkel.

4.3.3 Scan-Messung und Kinetik-Messung

Mit der Scan-Messung kann die Lage des Minimums bestimmt werden. Hierbei wird die Intensität des reflektierten Lichts (Reflektivität) als Funktion des Einfallswinkels θ gemessen. Änderungen im Brechungsindex durch Adsorption oder Bindung von Molekülen an die Oberfläche führen zu einer Verschiebung des Resonanzwinkels θ_r . Abb. 32 (links) zeigt eine typische Scan-Messung. Die hohe Reflektivität bei Winkeln unterhalb des kritischen Winkels ($\theta < \theta_c$) erklärt sich dabei dadurch, dass die Goldschicht wie ein Spiegel wirkt.

Die Verschiebung des Minimums um $\Delta\theta_r$ ist proportional zu Brechungsindex n und der Schichtdicke d

$$\Delta\theta_r \sim n \cdot d$$

Ist der Brechungsindex bekannt, kann die Schichtdicke bestimmt werden. Die Auswertung der Daten erfolgt dabei mit der Software Winspall^[117] (Jürgen Worm, MPI-P Mainz). Mit diesem Programm lassen sich Fit-Kurven für die gemessenen Daten bestimmen, denen die Fresnel-Gleichungen zu Grunde liegen. Allerdings ist es für Biomoleküle schwierig, den genauen Brechungsindex zu bestimmen, da sie keine dichten Schichten bilden. Man geht daher von Annahmen aus und vergleicht die Unterschiede der Messungen anstatt absolute Werte zu ermitteln. Tabelle 1 fasst die zum Fitten verwendeten Werte zusammen.

	Angenommene Schichtdicke [nm]	Brechungsindex	Adsorptionskoeffizient
LaSFN9	∞	1,85	0
Gold	50	0,2	3,2 – 3,4
Peptide		1,4 ^[118]	0
Alkanthiole		1,44 ^[119]	0
Lipide		1,45	0
Luft	∞	1	0
Pufferlösung	∞	1,33	0

Tab. 1: Verwendete Ausgangsparameter für das Fitten der SPR-Daten.

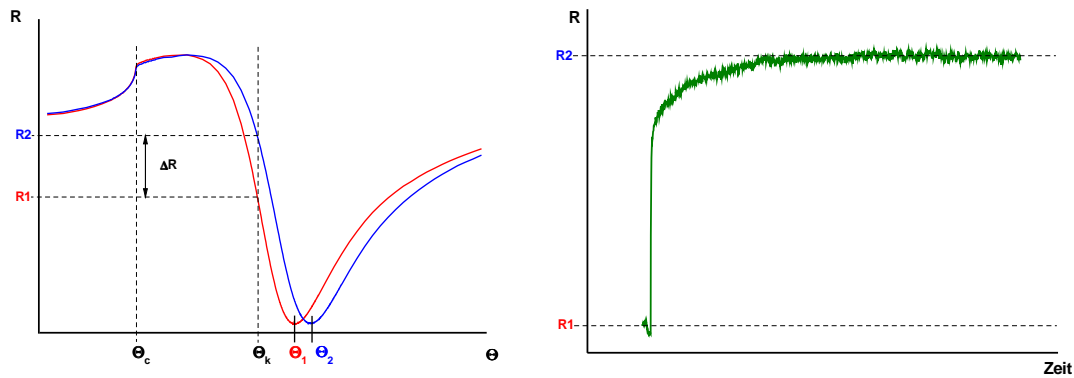


Abb. 32: Beispielhafte Darstellung einer Scan-Messung (links) und einer Kinetik-Messung (rechts) vor (rot) und nach (blau) Anlagerung von Molekülen auf der Oberfläche. In der Scan-Messung ist die Verschiebung des Resonanzwinkels θ_1 bzw. θ_2 zu erkennen. Die Kinetik-Messung zeigt die Veränderung der Reflektivität über die Zeit bei festem Winkel θ_k

Wenn bei konstantem Winkel gemessen wird, kann man die Veränderung der Reflektivität über die Zeit beobachten und Kinetiken messen (vgl. Abb. 32 (rechts)). Der Winkel wird dabei so gewählt, dass die Reflektivität ungefähr 30 % beträgt, da dann die Änderungen der Reflektivität nahezu linear ist und sehr stark vom Brechungsindex abhängt, was diese Methode sehr sensibel macht.

4.3.4 Oberflächenplasmonen verstärkte Fluoreszenzspektroskopie (SPFS, surface plasmon fluorescence spectroscopy)

Die Sensitivität von SPR-Messungen stößt an ihre Grenzen, wenn ein Analyt keine dichten Schichten bildet oder Schichten die zu dünn sind, als dass sie zu einer Änderung der Reflektivität führen würden ^{[115],[120]}. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen ist die Verwendung von Fluoreszenz-Markern in Verbindung mit der SPR Spektroskopie. Bei der SPFS wird das durch SPR erzeugte evaneszente Feld dazu verwendet, Fluoreszenz-Farbstoffe in direkter Nähe der Oberfläche anzuregen. Die Verwendung von SPFS wurde 1991 von Attridge et al. zuerst berichtet ^[121]. Trotz einiger Fortschritte in der Methode hinsichtlich der Detektionsgrenze, hat sie sich jedoch noch nicht weitläufig durchgesetzt.

Fluoreszenz ist die Emission eines Photons durch ein Molekül. Es handelt sich dabei um einen drei-stufigen Prozess, der bei Fluorophoren oder Fluoreszenzfarbstoffen (meist Polyaromaten oder heterocyclische Moleküle) auftritt.

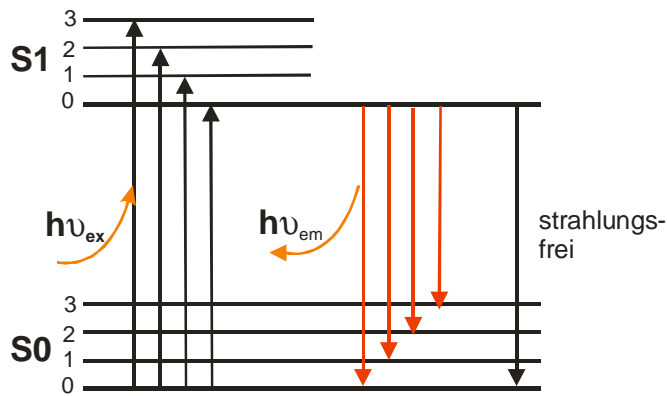


Abb. 33: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm. Ersichtlich sind die Absorptions- und Emissionsschritte, die bei Absorption eines Photons der Wellenlänge $h\nu_{ex}$ zur Fluoreszenz von Licht der Wellenlänge $h\nu_{em}$ führt.

Abb. 33 zeigt das Energie-Diagramm bei einem Fluoreszenz-Prozess. Als erstes wird das Fluorophor durch Absorption eines Photons bestimmter Frequenz ν_{ex} in einen angeregten Energiezustand $E = h\nu_{ex}$ versetzt. Durch schnelle interne Konversionen relaxiert das Fluorophor auf das niedrigste Schwingungsniveau des angeregten Zustandes. Dies passiert mit Relaxionszeiten von 10^{-12} s bevor Emission stattfindet. Vom niedrigsten angeregten Zustand fällt der Fluorophor wieder in den Grundzustand zurück, wobei die überschüssige Energie als Strahlung (Fluoreszenz) abgegeben wird. Die typische Lebenszeit der Fluoreszenz beträgt etwa 10^{-8} s. Da der Rückfall in den Grundzustand aus dem untersten angeregten Niveau erfolgt, hat das emittierte Licht eine kleinere Frequenz als das für die Anregung benötigte. Es ist also langwelliger; man spricht daher von einer Rot-Verschiebung. Dies erlaubt eine Unterscheidung zwischen der emittierten und der absorbierten Strahlung.

Es ist zu beachten, dass Energie nicht nur als Strahlung freigesetzt werden kann, sondern auch strahlungsfrei über Quenching, Resonanz Energie Transfer, etc.

Bei SPFS wird der Fluoreszenz-Farbstoff durch das evaneszente Feld des Plasmons angeregt. Die Anregung folgt dabei der Feldstärke und erreicht ihr Maximum beim Resonanzwinkel θ_r der SPs. Man beobachtet die Intensitätsspitze der Fluoreszenz jedoch bei einem geringfügig kleineren Winkel als das Minimum der Reflektivität. Diese Verschiebung erklärt sich durch Dämpfung auf Grund von Verlusten im Metall.

Da das evaneszente Feld wie beschrieben exponentiell abfällt, ist die Fluoreszenzanregung bei SPFS stark vom Abstand abhängig. Bei einer Eindringtiefe des evaneszenten Feldes von wenigen 100 nm in das Dielektrikum werden nur Fluorophore nahe der Oberfläche angeregt.

Fluorophore die sich weiter entfernt in der Bulkphase befinden werden nicht angeregt. Dies erlaubt es, nur gebundene Analyten zu detektieren.

Es ist jedoch zu beachten, dass ein ausreichender Abstand zwischen Fluorophor und Metall gewährleistet ist. Metall ist ein hervorragender Quencher, so dass ein Abstand mindestens größer als der Förster-Radius eingehalten werden muss. Ansonsten geht die Energie über Resonanztransfer verloren und wird nicht als Fluoreszenz abgestrahlt.

Das bedeute, dass das Fluorophor sich beim verwendeten System im optimalen Fall zwischen 5 nm und 100 nm von der Oberfläche entfernt befinden sollte.

Der Messaufbau für SPFS Messungen gleicht weitgehend dem für SPR-Messungen und erlaubt eine gleichzeitige Durchführung von Scan-Messungen bzw. Kinetik-Messungen und Fluoreszenz-Messungen. Zur Detektion wird die Fluoreszenzstrahlung auf der Rückseite der Messzelle auf einen Photomultiplier fokussiert. Ein vorgeschalteter Interferenzfilter ($\lambda = 670$ nm) filtert dabei die anregende Laserstrahlung heraus und lässt nur die Fluoreszenzstrahlung passieren. Hinzugefügt ist außerdem ein programmierbarer Shutter der bei Kinetik-Messungen zwischen der Erfassung der einzelnen Messpunkte den Laserstrahl blockiert, um ein Ausbleichen des Fluoreszenz-Farbstoffes zu verhindern.

4.4 Biomimetische Modellmembranen

Wie bereits in Abschnitt 2.1.2 dargestellt gibt es verschiedene Arten von biomimetischen Membranen. Im Folgenden soll auf die vier in dieser Arbeit verwendeten Modellmembranen näher eingegangen werden. Dabei werden ihre Vor- und Nachteile sowie die Präparationsmethoden beschrieben.

(A) *Tethered Bilayer Lipid Membrane (tBLM)*

am Beispiel von Lipidvesikel-Spreitung auf DPTL

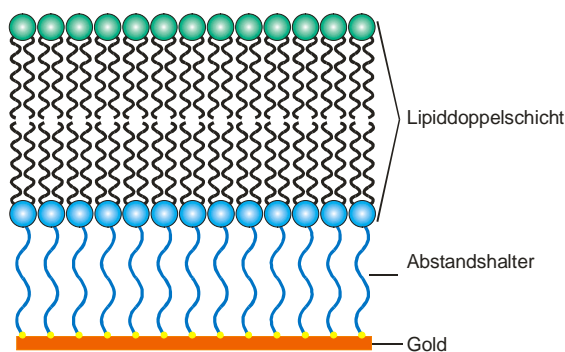


Abb. 34: Schematische Darstellung einer tBLM auf Gold mit Abstandshalter

tBLMS haben den Vorteil, dass sie fest an der Sensoroberfläche verankert sind. Die Lipiddoppelschicht ist dabei durch einen Abstandshalter am Anker-molekül von der Oberfläche entkoppelt ^[44]. Die tBLMS verfügen daher über ein Ionenreservoir zwischen Lipiddoppelschicht und Substrat. Sie sind hoch stabil, allerdings hängt ihre Fluidität stark von der Struktur der verwendeten Moleküle ab. Zudem kann eine zu dichte Packung der Spacerregion den Einbau von Proteinen erschweren.

Bei einer tBLM wird als erstes eine Monolage auf einem festen Substrat erzeugt. Monolagen können auf verschiedenen Wegen z.B. mittels Selbst-Organisation oder Langmuir Blodgett Film Transfer präpariert werden ^[2]. SAMs erfreuen sich einer großen Beliebtheit da sie sowohl einfach als auch mit wenig Ausgangssubstrat herzustellen sind. Allerdings hängt die Qualität der SAMs stark von der Oberflächenbeschaffenheit des Substrats ab.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Monolage DPTL (Diphytanyl-glycerol-tetraethylen glycol lipic acid ester lipid) verwendet, das von Schiller et al. erstmals synthetisiert wurde ^[130], und im gestreckten Zustand eine theoretische Länge von 5 nm hat.

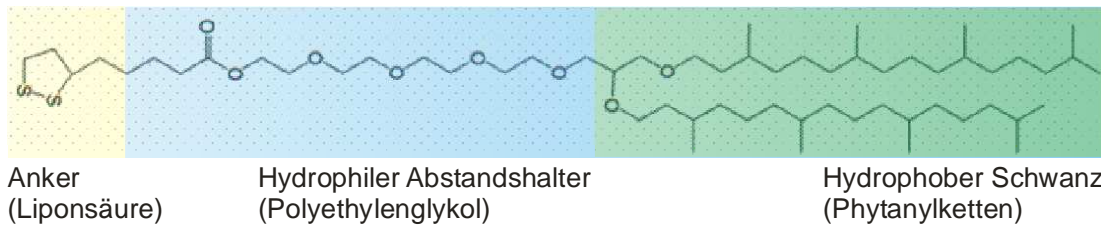


Abb. 35: Strukturformel von Diphytanyl-glycerol-tetraethylen glycol lipoic acid ester lipid (DPTL) mit Kennzeichnung der Ankergruppe, des hydrophilen Abstandhalters (Spacer) und der hydrophoben Kette

Bei DPTL handelt es sich um ein synthetisches Molekül mit einer Liponsäure als Anker, einer hydrophilen Spacerregion aus Tetraethylenglykol und einem hydrophoben Schwanz aus Phytanylketten. Dieser hydrophobe Schwanz bildet die untere Hälfte der Lipiddoppelschicht, welche durch die Spreitung von Lipidvesikeln vervollständigt wird. Für die Lipidvesikel wurde Phosphatidylcholin (PC) verwendet.

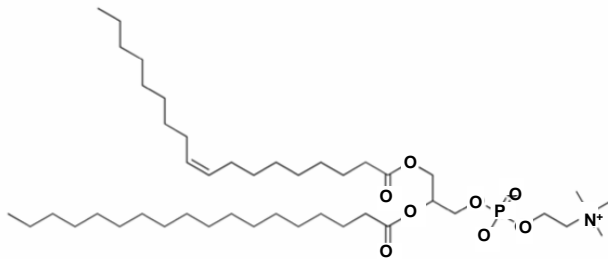


Abb. 36: Strukturformel von Phosphatidylcholin (PC)

Präparation

SAM-Präparation

- gereinigten Elektroden-Array für 24 h in einer 0,2 mg/ml DPTL-Lösung in EtOH (abs) inkubieren
- den Array mit EtOH abspülen und mit N₂ trocken blasen

Vesikel-Präparation

- In Chloroform gelöste Lipide in ein mit 2%iger Hellmanex-Lösung gereinigtes Glasröhrchen geben und mit N₂ trocknen, bis das Lösungsmittel vollständig entfernt wurde und ein einlagiger Lipidfilm an der Gefäßwand zurück bleibt.
- Diesen in PBS auf eine Endkonzentration von 2 mg/ml Lipid-Lösung verdünnen und durch Vortexen resuspendieren.

- Die Lösung bei 50°C für 1 h im Ultraschallbad behandeln.
Es entsteht eine trübe Lösung.
- Extrudieren mit einem Hand-Extruder 21x durch eine Polycarbonatmembran (Poren-Ø 50 nm) bis eine klare Vesikel-Lösung von SUVs entsteht.

Die Vesikel wurden unmittelbar vor ihrer Verwendung hergestellt, da SUVs ansonsten dazu tendieren zu fusionieren, aggregieren oder an der Gefäßwand zu adsorbieren.

Lipiddoppelschicht-Präparation

- Herstellen einer Phosphatidylcholin (PC) Vesikel-Lösung (2 mg/ml in PBS)
- Die extrudierte Vesikel-Lösung in den Reaktionsraum auf die SAM spülen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren.
- Nach Inkubation mit Puffer spülen (100 µl/min, 2 min)

(B) Peptide cushioned bilayer lipid membrane (pcBLM)

am Beispiel von Lipidvesikel-Anlagerung an cBSA

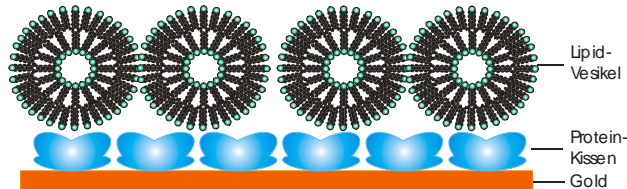


Abb. 37: Schematische Darstellung einer pcBLM mit einem Proteinkissen und angelagerten Vesikeln

Bei den pcBLM übernimmt ein Peptid oder Protein die Rolle des Spacer-Moleküls. Es wird durch Adsorption oder eine chemische Bindung, wie z.B. eine Thiolbindung, auf der Oberfläche verankert. Die Lipidschicht kann z.B. durch Aktivierung einer reaktiven Gruppe im Peptid (z.B. aktive ester coupling) oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen angelagert werden. Der Vorteil einer pcBLM mit Protein ist, dass die komplexere Tertiär- und Quartärstrukturen des Proteins großräumige Ionenreservoirs bieten und gleichzeitig eine flächige Anlagerung von Vesikeln ermöglichen. Dies ist z.B. bei den weiter oben gezeigten tBLMs aus DPTL mit dessen linearer Struktur nicht gegeben, da hierbei die Monolage dichter gepackt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Abstandhalter kationisiertes BSA (cBSA-113) verwendet. cBSA ist eine Modifikation des natürlich vorkommenden Rinder Serumalbumins (BSA, bovine serum albumin) in das zusätzliche positive Ladungen eingebracht wurden. Das

verwendete cBSA-113 wurde am MPI-P, Mainz von Dr. Klaus Eisele synthetisiert. BSA ist ein knäuförmiges Protein mit den Abmessungen 5,5 nm x 5,5 nm x 9 nm, das eine hohe Affinität zu den meisten Oberflächen wie Glas, Kunststoff oder Gold ^[134] hat. Es wird in der Molekularbiologie daher oft zum blockieren, also dem Absättigen freier Bindungsstellen, verwendet.

Die Lipiddoppelschicht wird durch Vesikel-Anlagerung erzeugt. Dabei ist mit einer gemischten Schicht aus intakten und fusionierten Vesikeln zu rechnen.

Präparation

Alle Befüllungs- und Spülvorgänge erfolgen mit einer Flussrate von $v = 100 \mu\text{l}/\text{min}$.

- Elektroden-Array unmittelbar nach der Reinigung in einen mikrofluidischen Chip einbauen
- Befüllen der Reaktionskammer mit cBSA-113 (0,01 mg/ml in PBS)
- für 3 h bei RT inkubieren
- 2 min mit PBS spülen
- Vesikelpräparation s.o (vgl. Abschnitt 4.4 (A))
- Befüllen der Reaktionskammer mit Vesikel-Lösung (2 mg/ml PC in PBS)
- bei +4°C oder Raumtemperatur über Nacht inkubieren
- 2 min mit PBS spülen

(C) Solid supported Membrane (SSM) - Anlagerung einer Lipiddoppelschicht an eine hBLM am Beispiel von Lipidvesikel-Anlagerung auf ODT + DPhyPC

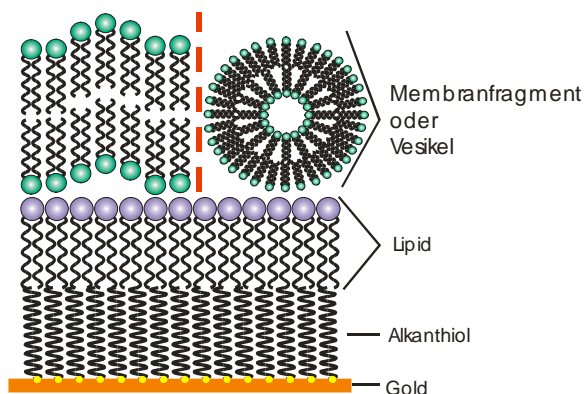


Abb. 38: Schematische Darstellung einer SSM auf einer hBLM mit angelagerten Membranfragmenten oder Vesikeln..

Bei einer hBLM wird eine Lipidschicht auf eine hydrophobe Monolage aufgebracht. Auf einen Abstandshalter wird verzichtet. Der direkteste Ansatz ist das Spreiten von Vesikeln. Für die hydrophobe Monolage gibt es mittlerweile eine Vielzahl von Varianten, u.a. werden zunächst Alkanthiole über Thiolbindungen an Gold verankert ^[104].

Ein Vorteil von hBLMs ist ihre hohe Stabilität. Der größte Nachteil ist das Fehlen einer Spacer-Region und somit eines Ionenreservoirs und der Entkopplung mit der Oberfläche. Proteineinbau kann durch den Kontakt zum festen Substrat behindert werden.

Eine Variante ist die von Fendler et al. vorgeschlagene Architektur der SSM (solid supported membrane) ^{[137],[138]}. Hierbei wird auf eine Goldoberfläche zunächst ein SAM aus Alkanthiol aufgebracht und mit in Dekan gelösten Lipiden zu einer hBLM vervollständigt. Auf dieser hBLM werden Membranfragmente oder Vesikel angelagert. Die genaue Struktur an der Oberfläche sowie die Art der Bindungen sind noch nicht geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass die Lipide oder Membranfragmente mit der hydrophilen Gruppe der Lipide der hBLM elektrostatisch wechselwirken.

Als Alkanthiol wird Octadecanthiol (ODT) verwendet. ODT ist ein Alkan mit 18 C-Atomen und einem Schwefel-Atom am Ketten-Ende. Es ist löslich in unpolaren Lösungsmitteln wie Ethanol und Isopropanol und bildet auf Gold-Oberflächen hochgeordnete und dichte SAMs. Die zweite Schicht der hBLM besteht aus Diphytanoyl-Phosphatidylcholin (DPhyPC).

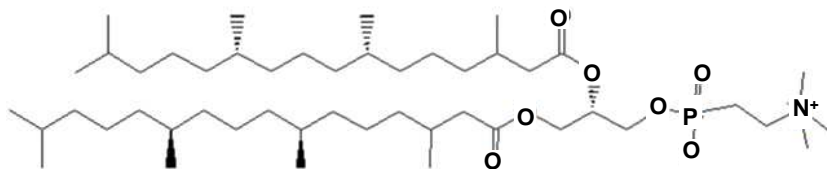


Abb. 39: Strukturformel von Diphytanoyl-Phosphatidylcholin (DPhyPC), einem Lipid aus Archaeobakterien.

Präparation

Das verwendete Protokoll geht mit leichten Abwandlungen auf Fendler und Schulz vom MPI für Biophysik in Frankfurt zurück und wurde auch von der Firma IonGate Biosciences GmbH (Frankfurt-Höchst, Deutschland) kommerziell benutzt ^{[137],[138]}.

- gereinigten Elektroden-Array für 24 h in 1 mM ODT Lösung in Isopropanol inkubieren
- Array mit Isopropanol und Reinstwasser abspülen
- mit N₂ trocken blasen und in den mikrofluidischen Chip einsetzen
- Lipidlösung zur Bildung der hBLM
 - DPhyPC in Chloroform und Octadecylamin in Chloroform im Verhältnis 60 : 1 (w/w) in einem Glasröhrchen mischen
 - Entfernen des Lösungsmittels unter N₂-Strom
 - Lösen in n-Decan mit einer Konzentration von 15 mg/ml DPhyPC
- Lipidlösung in PBS 1:100 verdünnen und in Reaktionsraum einspülen
- für 45 min bei +4°C inkubieren
- mit Reinstwasser spülen (100 µl/min, 2 min)
- Vesikelpräparation s.o (vgl. Abschnitt 4.4 (A))
- Befüllen der Reaktionskammer mit Vesikel-Lösung (2 mg/ml PC in PBS)
- bei +4°C oder Raumtemperatur über Nacht inkubieren
- mit PBS spülen (100 µl/min, 2 min)

(D) Block-Copolymere (BCP)

am Beispiel von ABA Triblock-Copolymeren

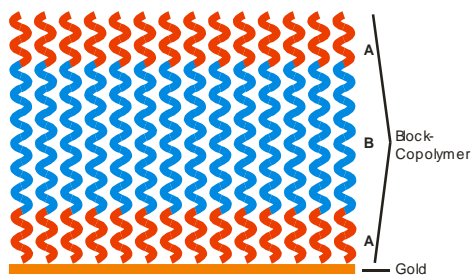


Abb. 40: Schematische Darstellung einer biomimetischen Membran aus Triblock-Copolymeren.

Polymer-Doppelschichten verhalten sich in vielerlei Hinsicht wie natürliche Membranen. Daher können sie sich ebenfalls für die Erzeugung biomimetischer Schichten eignen. Meier et al. zeigten die erfolgreiche Inkorporation des Membranprotein OmpF in freispannende Polymermembranen ^[140]. Sogar Bacteriorhodopsin und F₀F₁-ATPase konnten bereits funktionell in Polymer-Vesikel rekonstituiert werden ^[141]

Für biomimetische Membranen besonders interessant sind dabei Block-Copolymere (BCPs).

Bei BCPs handelt es sich um synthetische Polymere, deren Monomere in regelmäßigen Sequenzen angeordnet sind. Belegrou et al. haben gezeigt, dass sich aus BCPs membranähnliche Schichten auf Oberflächen herstellen lassen ^[142]. Diese sind insofern als biomimetisch zu bezeichnen, als dass sie amphiphilen Charakter aufweisen. BCPs zeichnen sich zudem durch ihre hohe Stabilität auch gegen Luft aus.

Allerdings haben BCPs eine wesentlich größere hydrophobe Kettenlänge als Lipide, so dass der innere Bereich der BCP-Membranen deutlich dicker ist als der von Lipidmembranen. Dennoch zeigen viele Experimente den Transport von Ionen über die Polymermembran, was bedeutet, dass Membranproteine die BCP-Schichten durchspannen können. Als Erklärung hierfür dient das „Matratzenmodell“. Es besagt, dass die Schichtdicke der Membran um inkorporierte Proteine herum abnimmt. Theoretisch ist eine funktionelle Rekonstitution in Schichten möglich, die doppelt so dick sind wie die Proteine. ^{[143],[144]}

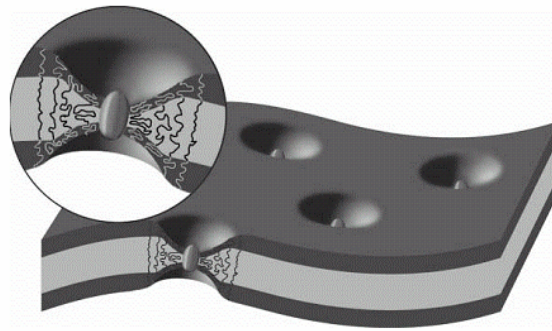


Abb. 41: Abnahme einer BCP-Membran um inkorporierte Membranproteine ^[144]

Der funktionelle Einbau von Proteinen in Polymere wurde bisher an freispannenden Membranen oder Vesikeln demonstriert. Bei einer Anlagerung auf Goldelektroden fusionieren die BCPs und bilden sBLMs ohne ein ausgedehntes Ionenreservoir. Durch das Ausdünnen der Membran könnte jedoch ausreichend Platz für die Inkorporation von MPs gegeben sein.

Präparation

Die verwendeten BCPs gehören zum Typ ABA, bei dem zwei identische Sequenzen eine dritte umschließen. Sie bestehen aus PMOXA12-PDMS57-PMOXA12 (Poly-2-methyl-2-oxazolin (PMOXA) und Polydimethylsiloxan (PDMS)), wobei PDMS den hydrophoben Teil darstellt und PMOXA den hydrophilen.

Alle Befüllungs- und Spülvorgänge erfolgen mit einer Flussrate von $v = 100 \mu\text{l}/\text{min}$.

- BCP-Lösung
 - 5 mg BCP (kristallin) in 50 μl EtOH (abs) lösen
 - Entfernen des Lösungsmittels unter N_2 -Strom für 3 h
 - in 1 ml Reinstwasser resuspendieren
- Elektroden-Array unmittelbar nach der Reinigung in einen mikrofluidischen Chip einbauen
- Befüllen der Reaktionskammer mit BCP (5 mg/ml in Reinstwasser)
- über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren
- 2 min mit PBS spülen

(E) Biomimetische Membranen mit Membranpräparationen aus Zzellkultur
am Beispiel von Membranfragment-Anlagerung an cBSA

Es wurden die folgenden Membranpräparationen mit überexprimierten Membranproteinen verwendet:

- *nAChR in Torpedo marmorata (Torp-Mem)*

Hierbei handelt es sich um die nAChR reiche Membran des elektrischen Organs eines Zitterrochens. Die Proben wurden im Labor von Maurice Göldner (Universität Straßburg) präpariert und aufgereinigt. Die nAChR Subtypen in Torpedo lassen sich durch α -Bungarotoxin (BTX) inhibieren.

Die Rezeptorexpression beträgt 5,5 nmol pro mg Protein. ^[137]

Allerdings enthalten Torpedo Präparationen auch andere intrinsische Proteine wie z.B. Glutamatrezeptoren ^[152].

- *Nicotinische Rezeptoren in IMR-32 Zellen (Nic-Mem)*

Hierbei handelt es sich um eine Mischung aus überexprimierten nAChR (hauptsächlich Subtyp $\alpha 7$ und $\alpha 3$), die auf Bindungsaffinität mit BTX getestet wurden.

Die Rezeptorexpression beträgt 0,16 pmol pro mg Protein. ^[153]

Andere Rezeptortypen können bei dieser Präparation vernachlässigt werden.

- *Glutamatrezeptor mGluR5a in CHO Zellen (GluR-Mem)*

Hierbei handelt es sich um einen überexprimierten metabolischen Glutamatrezeptor. GluR5a ist ein GPCR mit sieben Transmembran-Domänen, der bei Aktivierung IP₃ aktiviert und nachgeschaltet zur Öffnung von Ca²⁺ und K⁺-Kanälen führt.

Die Rezeptorexpression beträgt 0,98 pmol pro mg Protein. ^[154]

Andere Rezeptortypen können bei dieser Präparation vernachlässigt werden.

Präparation

Alle Befüllungs- und Spülvorgänge erfolgen mit einer Flussrate von $v = 100 \mu\text{l}/\text{min}$.

Vorbereitung der Membranfragmente

- Membranpräparationen als 20 μl Aliquots bei -80°C gelagert
- Verdünnen mit PBS auf eine Endkonzentration von 0,2 mg/ml Protein
- 3x 10 s Ultraschall (maximale Leistung)

pcBLM Präparation

- Elektroden-Array unmittelbar nach der Reinigung in einen mikrofluidischen Chip einbauen
- Befüllen der Reaktionskammer mit cBSA113 (0,01 mg/ml in PBS)
- für 3 h bei RT inkubieren
- 2 min mit PBS spülen
- Befüllen der Reaktionskammer mit Membranfragment-Lösung
- bei $+4^\circ\text{C}$ oder RT über Nacht inkubieren
- 2 min mit PBS spülen

4.5 Biochemische Methoden

(A) Antikörpernachweis mittels Chemilumineszenz

Die Antikörpernachweise wurden mit dem WesternBreeze Chemiluminescence Kit (Invitrogen, Deutschland) durchgeführt.

Dafür wurden folgende Lösungen verwendet

Blocking Lösung

Blocker Diluent A	1 ml
Blocker Diluent B	2 ml
Reinstwasser	7 ml

Waschlösung

Wash solution	1 ml
Reinstwasser	15 ml

Der Antikörpernachweis wurde direkt im Chipsystem durchgeführt, bei einer Flussrate von $v = 100 \mu\text{l}/\text{min}$

- 2 min spülen mit Reinstwasser
- Blocking Lösung für 30 min inkubieren
- 2 min spülen mit Reinstwasser
- Antikörper 1:100 in Blocking Lösung verdünnen, für 1,5 h inkubieren
- 2 min spülen mit Waschlösung
- Antikörper (2° Antibodysolution) für 1 h inkubieren
- 2 min spülen mit Waschlösung
- Chemiluminescence substrate einspülen
- Belichten für etwa 50 min (LAS3000, Fujifilm)

(B) SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese dient der Trennung von Proteinen und wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt

Probe	5 μ l
LDS-Samplebuffer (4x)	4 μ l
Reducing agent (10x)	1,6 μ l
Nuclease freies Wasser	5,4 μ l

15 min bei 37°C

10 % Bis-Tris Gel in MES-SDS-Laufpuffer

bei 200 V für 35 min laufen lassen

(C) Radioaktiv-Blot

Verwendet wird ein Gel der SDS-Gelelektrophorese (s. o.)

- Gel kurz in Wasser legen
- Gel auf 3MM Wathman Papier transferieren und mit Frischhaltefolie abdecken
- bei 80°C für 2 h trocknen
- belichtet bei -80°C für 18 h (Kodak BioMax MR Film)

(D) Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau dient dem schneiden der Plasmide zur Detektion des cDNA Inserts. Das Insert des verwendeten Plasmides hat an seinen Enden Schnittstellen für die Endonucleasen NotI und NcoI. Verwendet wurden Restriktionsenzyme der Firma New England BioLabs mit den dazugehörigen Puffersystem.

Plasmid-DNA	5 µl
Endonuclease NcoI	1 µl
Endonuclease NotI	1 µl
Puffer 3	5 µl
BSA	0,5 µl
Nuclease freies Wasser	37,5 µl

bei 37°C für 90 min Reaktion starten

bei 65°C für 20 min Reaktion stoppen

(E) Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Trennung von DNA und wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt

Probe (aus Restriktionsverdau)	10 µl
Loading Buffer	2 µl

1%-iges Agarose Gel in TAE-Puffer mit 0,1% SYBR Safe

bei 120 V für 40 min laufen lassen

(F) In vitro Expression

Die IVS von nAChR wurde mit kommerziellen Systemen durchgeführt. In dieser Arbeit verwendet wurden Zelllysate aus E.coli und aus Retikulozyten von Kaninchen. Die Probenvorbereitung erfolgt analog zu der Standardpräparation.

Retikulozytenlysate (RetEx)^[155]

TnT Quick Coupled Transcription/Translation System; Promega GmbH, Deutschland

TnT® T7 Quick Master Mix	40 µl
Methionin (1 mM)	1 µl
cDNA	1,5 µg
Nuclease freies Wasser	add 50 µl

Inkubieren bei 30°C für 90 min

E-coli Extrakt (EcEx)^[156]

S30 T7 High Yield Expression System; Promega GmbH, Deutschland

S30 Premix Plus	20 µl
T7 S30 Extrakt, circular	18 µl
cDNA	1,5 µg
Nuclease freies Wasser	add 50 µl

Inkubieren bei 37°C für 90 min

Positiv Kontrolle mit Luciferase^[155]

TnT Quick Coupled Transcription/Translation System; Promega GmbH, Deutschland

TnT® T7 Quick Master Mix	40 µl
Methionin (1 mM)	1 µl
Luciferase Control DNA (c = 0,5 µg/µl)	1 µg
Luciferase Assay Reagenz	7 µl
Nuclease freies Wasser	add 50 µl

Inkubieren bei 30°C für 90 min

5 Ergebnisse und Diskussion

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines Lab-on-Chips bzw. mikrofluidischen Chipsystems, das die Messung der Aktivität von liganden-gesteuerten Ionenkanälen (LGIC) ermöglicht.

Mikrofluidische Membranprotein-Chipsysteme, die zur Messung der Aktivität von LGIC dienen, sollten folgende Bestandteile haben:

- Das mikrofluidische Chipsystem, welches Sensor- und Detektoreinheit mit einander verbindet, sowie die Schnittstellen zur Steuerung der Experimente bereitstellt.
Für elektrochemische Detektionsverfahren bedeutet das, dass Elektroden in die Reaktionskammern integriert sein müssen. Für optische Methoden ist Transparenz im entsprechenden Wellenlängenbereich erforderlich.
- Sensoroberflächen, die die Immobilisierung sowie die funktionelle Integration von Membranproteinen ermöglichen und deren Struktur stabilisieren.
- Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, die entweder *in vivo* oder *in vitro* synthetisiert und auf die Sensoroberfläche aufgebracht werden.

Im Folgenden wird auf diese drei Punkte (Chipsystem, Sensoroberfläche, Ionenkanäle) näher eingegangen.

Dabei wird zuerst der mikrofluidische Chip näher beschrieben und der Elektroden-Array charakterisiert.

Dann folgen Untersuchungen der verwendeten biomimetischen Membranen hinsichtlich ihrer elektrochemischen Eigenschaften.

Im dritten Abschnitt wird die prinzipielle Eignung eines impedanz-basierten Chipsystems für die Detektion von LGIC am Beispiel von *in vivo* expremierten nAChR gezeigt. Dabei wird auch die verwendete Messmethode näher beschrieben und auf die Interpretation der Daten eingegangen.

Im letzten Teil dieses Kapitels wird untersucht, ob sich der $\alpha 7$ nAChR *in vitro* synthetisieren und funktional in die biomimetischen Membranen des mikrofluidischen Chipsystems einbauen lässt.

5.1 Entwicklung und Charakterisierung einer mikrofluidischen Analyseplattform zur Detektion von Ionenkanälen

5.1.1 Der mikrofluidische Chip

5.1.1.1 Chipmaterial

Das mikrofluidische Chipsystem ermöglicht die Probenhandhabung sowie die Detektion. Abb. 42 zeigt das verwendete Chipsystem. Es besteht aus dem mikrofluidischen Chip und einem Elektroden-Array.

Der Chip ist aus cyclischem Olefin Copolymer (COC). COC ist ein Polymer, dass im Spritzgussverfahren zu Blöcken gegossen werden kann. Kanäle, Reaktionskammern und Zugänge wurden mittels Fräsen oder Bohren in das Polymer eingebracht. Aufgrund seiner Materialeigenschaften wie

- gute Biokompatibilität
- optische Transparenz
(91% Transmission bei einer Wandstärke von 2 mm für $\lambda = 300 - 900$ nm)
- Beständigkeit gegen Ethanol, Isopropanol, Aceton und alle wässrigen Medien
- Temperaturbeständigkeit
- elektrisch isolierend
- Autoklavierbarkeit

eignet sich COC ^[123] für die Herstellung von Biochips.

Kanaldesign

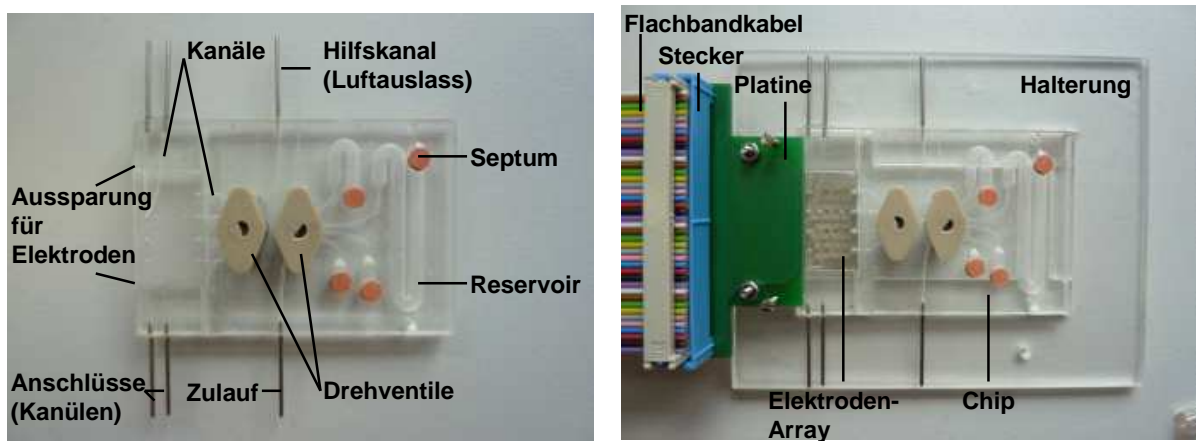


Abb. 42: Mikrofluidisches Chipsystem (nähere Details im Text)
links: Chip mit Kanälen, Ventilen und Zugängen;
rechts: Chip mit eingeklebten Elektroden und Kontaktierung Federkontaktstifte und Platine

Der verwendete Chip (64 mm x 43 mm) verfügt über vier separate Reaktionsräume über den Elektroden (vgl. Abb. 43), in denen die proteinhaltigen Sensorschichten aufgebaut werden und die über Kanäle befüllbar sind; zwei Drehventile, die den Fluidfluss lenken und vier Vorratskammern, die eine Lagerung und Temperaturanpassung der Lösungen erlauben, bei der vorliegenden Arbeit aber noch keine Anwendung fanden. Ein fünfter Hilfskanal ermöglicht, beim Wechsel von Lösungen zunächst die zwischen den zwei Flüssigkeiten entstehende Luftblase aus dem System zu entfernen, ohne dass sie in einen Reaktionsraum geraten kann. Die Herstellung des Chips erfolgte am Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH; Mainz, Deutschland.

Ein mikrofluidischer Chip für Screening-Anwendungen sollte die Möglichkeit für parallele Ansätze bieten. D.h. er sollte über von einander unabhängige Reaktionsräume verfügen, die zwar mit denselben Lösungen befüllt werden können, bei denen ein Vermischen dieser Lösungen jedoch ausgeschlossen ist. Dies wird durch die Verwendung von Drehventilen realisiert. Die Drehventile ermöglichen das separate Befüllen eines einzelnen Reaktionsraumes, während die anderen Reaktionsräume vom Fluidfluss abgeschnitten sind.

Als Zugang zu den Kanälen dienen Dosiernadeln. Sie werden mit Sekundenkleber (UHU[®] plus schnell fest) über seitliche Bohrungen in die Kanäle geklebt und gestatten das Anschließen von Schläuchen. Der Transport der Fluide kann dann entweder durch eine Spritzenpumpe oder eine Peristaltikpumpe erfolgen. Für die vorliegende Arbeit wurde eine Peristaltikpumpe verwendet, da diese den Durchlauf eines quasi unbegrenzten Volumens erlaubt.

Die Reaktionsräume über den Elektroden werden durch eine medizinische Klebefolie (Kanalfolie) definiert. Die Kanäle wurden mit einem CO₂-Laser geschnitten und haben jeweils eine Abmessung von 14 mm x 1 mm bei einer Höhe von 150 µm. Dies ergibt pro Kanal ein Probenvolumen von etwa 2,1 µl. Die Kanalfolie ist beidseitig klebend und bildet eine dichte Verbindung zwischen Chip und Array. Die Ablösbarkeit ermöglicht nach Reinigung des Chips mit Lösungsmittel eine mehrmalige Verwendung des Chips.

5.1.2 Der Elektroden-Array

Bei einem mikrofluidischem Chipsystem für elektrochemische Messungen sind die Elektroden von zentraler Bedeutung. Die Elektroden sind als Array von 4 x 4 angeordnet. Das Elektrodenmaterial wurde strukturiert auf 1 mm dicke Glaswafer aufgesputtert, die danach zu 21 mm x 23 mm großen Arrays geschnitten wurden.

<i>Arbeitselektroden</i>	150 nm Gold auf 10 nm Titan 1 mm x 1 mm jeweils vier unabhängige Elektroden pro Kanal
<i>Referenzelektrode</i>	150 nm Silber auf 10 nm Titan 0,2 mm x 1 mm eine Referenzelektrode pro Array
<i>Gegenelektroden</i>	150 nm Gold auf 10 nm Titan 0,2 mm x 1 mm eine Gegenelektrode pro Kanal

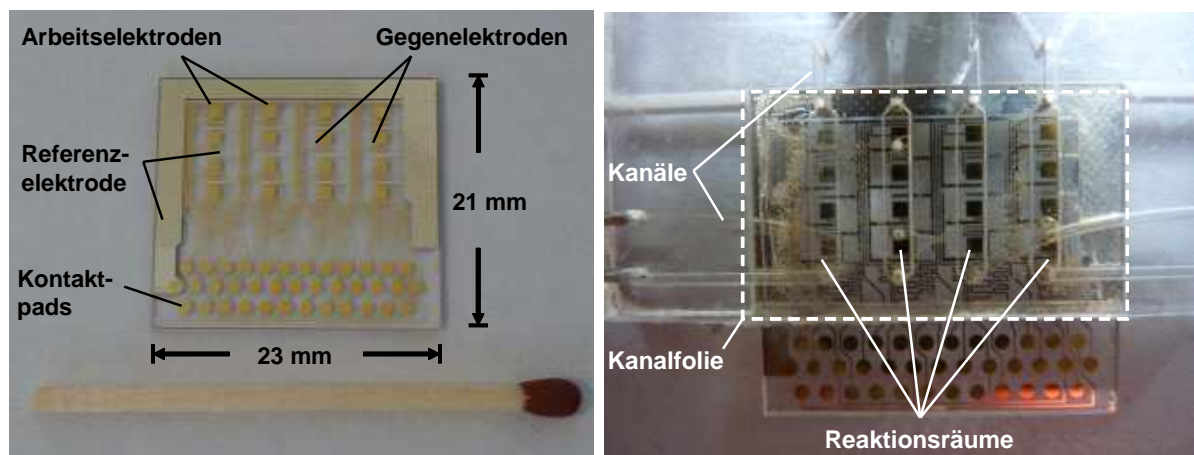


Abb. 43: links: Elektrodenarray mit Arbeitselektroden, Gegenelektroden und Referenzelektrode sowie Kontaktpads
recht: in den Chip eingeklebter Elektrodenarray mit Kanalfolie zur Definition der Reaktionsräume

Die Herstellung erfolgt am Institut für Mikrotechnik Mainz als mehrstufiger Photolithographie-Prozess mit Schattenmasken. Die fertig gesputterten Elektroden werden mit einem Schutzlack (AZ6632) beschichtet, um sie gegen Oxidation zu schützen. Dies erlaubt eine längere Lagerung der Elektroden ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen. Der Schutzlack lässt sich durch Spülen mit Aceton und Isopropanol leicht entfernen. Die Elektroden sind durch SU8 voneinander isoliert, um Rückkopplungen zu verhindern. Die Kontaktierung erfolgt über Federkontaktstifte an Kontaktpads. Dabei ist die Geometrie der Leiterbahnen so gewählt, dass sie für jede Elektrode mit dazugehörigem Kontaktpad dieselbe Länge hat.

Der Aufbau von biomimetischen Membranen auf Elektroden erfordert eine saubere Oberfläche. Daher wurde zunächst eine geeignete Reinigungsmethode für die Elektroden-

Arrays identifiziert (Abschnitt A). Die gereinigten Elektroden wurden dann hinsichtlich ihrer Eignung für Biosensoren überprüft. Wichtige Parameter, die in den folgenden Abschnitten näher untersucht wurden, waren dabei:

- Rauigkeit der Oberfläche (Abschnitt B)
- Stabilität gegenüber der Referenz (Abschnitt C)
- Homogenität der Kapazität (Abschnitt D)

(A) *Reinigung der Elektroden*

Die Elektroden müssen unmittelbar vor Gebrauch gereinigt werden. Zum einen können noch Restverunreinigungen des Herstellungsprozesses die Eigenschaften beeinflussen. Zum anderen lagern sich z.B. schwefelhaltige Verbindungen in der Raumluft sofort an der Goldfläche an, sobald diese nicht mehr unter schützenden Bedingungen (Schutzlack, Argonatmosphäre o.ä.) aufbewahrt wird.

In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Reinigung von Goldelektroden beschrieben^[124]. Beispiele dafür sind:

- Plasmareinigung (z.B. Sauerstoff, Argon)
- UV-Bestrahlung
- Königswasser
- Kaliumhydroxyd + Wasserstoffperoxid (KOH + H₂O₂)
- Elektrochemische Reinigung in Schwefelsäure (H₂SO₄ + CV)

Sauerstoffplasma und alle anderen Reinigungsmethoden, die Silber angreifen, wurden ausgeschlossen, da der gesamte Array der Reinigungsprozedur unterworfen ist. Die Referenzelektrode würde ansonsten durch die Reinigung chemisch verändert werden.

Getestet wurden Argon-Plasma, H₂SO₄ + CV und KOH + H₂O₂. Um die Effektivität der Reinigung zu beurteilen, wurde die Kapazität C_{sc} der Grenzsicht Elektrode/Puffer betrachtet. C_{sc} wurde bestimmt durch Impedanzmessung an gereinigten und ungereinigten Elektroden.

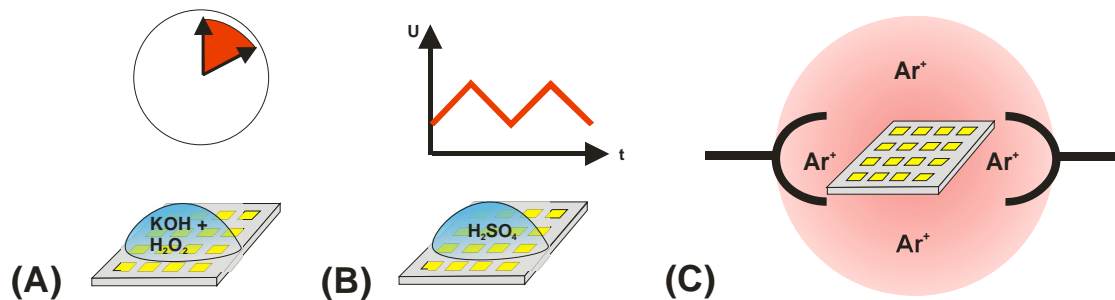


Abb. 44: Verschiedene Reinigungsmethoden für Goldelektroden
Inkubation in KOH + H₂O₂ (A), cyclische Voltammetrie in H₂SO₄ (B), Argon-Plasma (C),

Der Elektroden-Array wurde für 10 min in 50 mM KOH + 25 % H₂O₂ inkubiert. Diese Behandlung führte zu keiner signifikanten Reinigung der Oberfläche.

Für die elektrochemische Reinigung in 0,5 M H₂SO₄ wurde zunächst für 10 s ein anodisches Potential von 1,6 V gegenüber Silber angelegt. Dabei bildete sich eine Goldoxid-Schicht, welche durch 40 voltammetrische Zyklen (Potentialbereich: -0,2 V bis 1,6 V; Scan-Rate 0,5 V/s) wieder abgelöst wurde.^[125] Diese Prozedur führte zwar zu einer Reinigung der Oberfläche, allerdings war der Erfolg beschränkt. Die Kapazität C_{sc} stieg auf Werte um $84 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, was über dem für reines Gold zu erwartenden Wert ($30 - 40 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ^{[107],[126]}) liegt. Dies könnte auf eine zusätzliche Aufräuhung der Oberfläche hindeuten. Dadurch würde nämlich die tatsächliche Elektrodenfläche größer, was aber bei der Berechnung der spezifischen Kapazität keine Berücksichtigung findet, für die immer von der geometrischen Elektrodenfläche von 1 mm^2 ausgegangen wurde. Ein zusätzlicher Nachteil war, dass die Elektroden bereits einer Lösung ausgesetzt wurden und vor dem Einkleben in den Chip oder dem Eintauchen in eine SAM-Lösungen erst wieder getrocknet werden mussten.

Bei der Reinigung mit Argon-Plasma wurde der Elektroden-Array für 5 min einem Argon-Plasma ausgesetzt (310 W, 0,2 mbar). Dieser Prozess ist ein rein physikalisches Verfahren, bei dem Verunreinigungen mechanisch entfernt werden und keine chemische Veränderung der Oberfläche erfolgt.

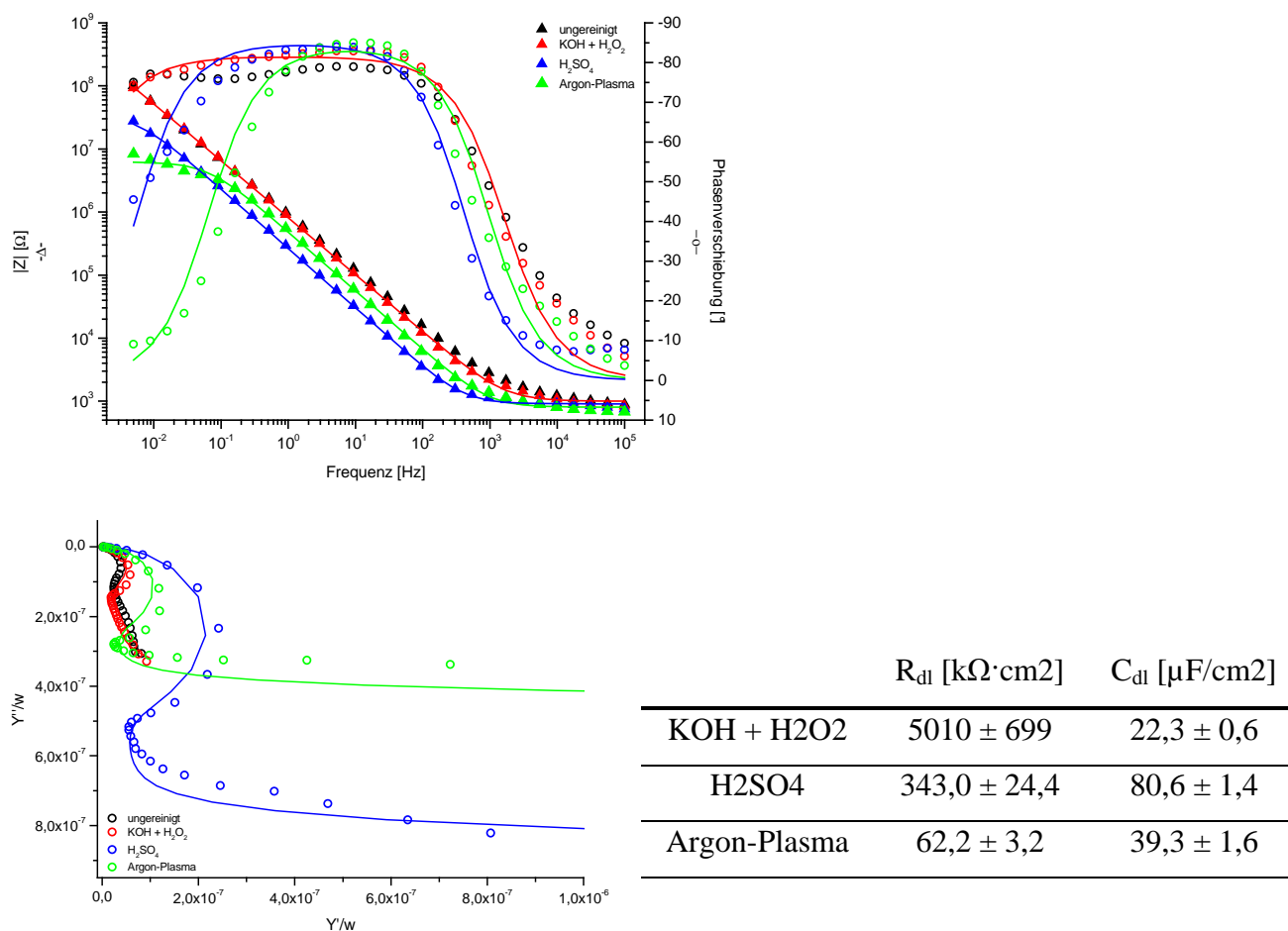


Abb. 45: Impedanz-Scans an Goldelektroden nach Reinigung mit unterschiedlichen Methoden oben: Bode-Plot, unten: Admittanz-Plot; jeweils mit Fitkurven (durchgehende Linie) Die Tabelle gibt die gefitteten Werte für R_{dl} und C_{dl} an mit der jeweiligen Fitgenauigkeit

Abb. 45 zeigt den Vergleich der Impedanzmessungen an reinen Goldelektroden unmittelbar nach verschiedenen Reinigungsprozeduren. Deutlich zu erkennen ist, dass bei den ungerinigten Elektroden nicht nur ein RC-Element zu erkennen ist, das die Elektroden / Elektrolyt-Grenzschicht darstellt, sondern mehrere. Dies belegt, dass sich auf ungerinigten Elektroden noch Schichten aus dem Herstellungsprozess befinden. Daher konnte die ungerenigte Elektrode auch nicht mit einem R(RC) Ersatzschaltbild beschrieben werden, was einen direkten Vergleich mit den gereinigten Elektroden verhinderte. Auch die mit KOH + H₂O₂ gereinigte Elektrode zeigt Admittanz-Plot eine deutliche Abweichung vom Verlauf eines R(RC) Elements.

Die große Fitgenauigkeit bei den beiden chemischen Reinigungsverfahren zeigt, dass das Ersatzschaltbild für eine reine Goldelektrode nicht wirklich zutrifft. D.h. nach der Reinigung weicht die Oberfläche immer noch stark vom idealen Verhalten ab. Zudem erkennt man bei der Reinigung mit KOH + H₂O₂, dass das Verhalten bei niedrigen Frequenzen rein kapazitiv ist, so dass sich kein genauer Widerstand R_{sc} bestimmen lässt.

Aus dem Vergleich der untersuchten Reinigungsmethoden ergab sich, dass die Reinigung mit Argon-Plasma sowohl von der Effektivität als auch von der praktischen Handhabung am geeignetsten war. Alle Versuche wurden daher mit Elektroden-Arrays durchgeführt, die mit Argon-Plasma gereinigt worden waren.

(B) Rauhigkeit der Oberfläche

Die Rauigkeit der Oberfläche wurde als ein entscheidender Parameter für die Bildung von festkörpergestützten biomimetischen Membranen mit hoher Dichte, d.h. großem Widerstand, identifiziert. Sie spielt insbesondere eine Rolle für die Qualität von SAMs. Je kleiner die Rauigkeit desto weniger Defektstellen gibt es in diesen Schichten.

Um die Elektroden Arrays dahingehend zu charakterisieren wurden von Dr. J. Dorn Aufnahmen mit einem Rasterkraftmikroskop (AFM, atomic force microscope) gemacht.

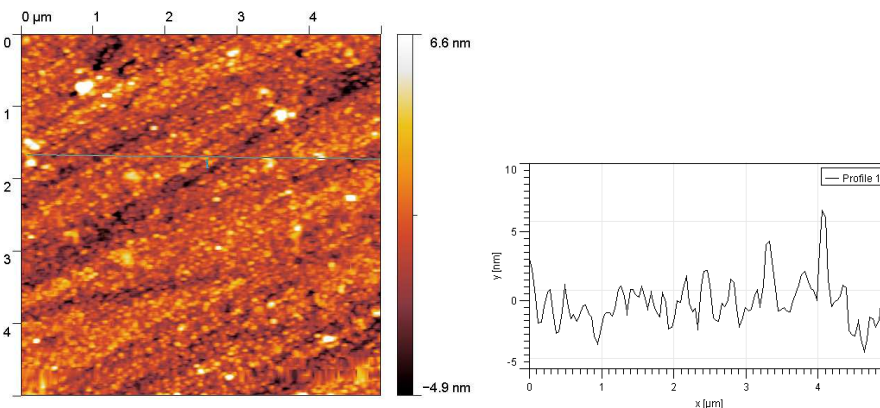


Abb. 46: AFM-Aufnahme der reinen Goldelektrode und Profil (Nanowizard AFM (JPK Instruments, Berlin, Deutschland); Tapping-Modus; Siliziumnitrid Cantilever nominellen Federkonstante 0,32 N/m (Veeco Instruments, Deutschland); Scan-Rate 1,3Hz, Auflösung 512 x 512 Pixeln) aufgenommen von Dr. Jan Dorn (MPI-P, Mainz).

Die Rauigkeit der Elektroden ist mit 1,68 nm auf einer Fläche von 5 μm x 5 μm um etwa das 2,5-fache größer als bei template stripped gold, das in früheren Arbeiten als Substrat für SAMs verwendet wurde. Dies lässt sich mit dem Herstellungsprozess erklären. Durch den Aufdampfprozess kommt es zu Unebenheiten auf der Oberfläche.

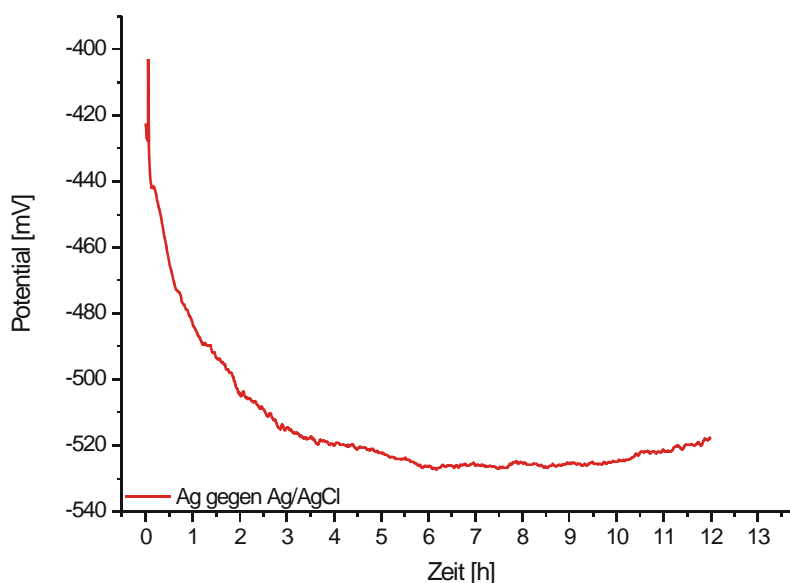
Einen weiteren Hinweis auf die Rauigkeit liefern Impedanz-Scans der Gold-Elektroden. Der Exponent des CPEs gibt Hinweise auf die Homogenität der Oberfläche. Er beträgt 1 für einen idealen Kondensator und 0 für einen idealen ohmschen Widerstand. Werte zwischen 0,99 und 0,5 deuten auf eine Verteilung kapazitiver Elemente also auf Elektroden mit zunehmender Oberflächenrauigkeit hin. Für die Elektroden-Arrays wurden Korrekturfaktoren von $n = 0,86 - 0,95$ ermittelt.

In früheren Arbeiten wurde bereits das Verhältnis der tatsächlichen Elektrodenfläche zur geometrischen Elektrodenfläche verglichen ^[125]. Die tatsächliche Elektrodenfläche lässt sich aus der an der Reduktion einer Goldoxid-Monoschicht beteiligten Ladung ermitteln. Der Rauigkeitsfaktor (tatsächliche Fläche / geometrischer Fläche) wurde zu $1,84 \pm 0,13$ bestimmt, was in guter Übereinstimmung mit aus der Literatur bekannten Werten für gesputterte Dünnschicht-Elektroden auf Glassubstraten ist ^[127].

(C) Stabilität der Referenzelektrode

Die Referenzelektrode bestimmt das Potential, gegenüber dem die elektrochemischen Messungen durchgeführt werden. Weit verbreitet ist die Anwendung einer Ag/AgCl Elektrode. Ag/AgCl Elektroden haben ein stabiles Halbzellenpotential, das sich nicht über die Zeit ändert. Es ist lediglich geringfügig von der Temperatur abhängig (ca. 0,5 bis 1,0 mV/°C).^[128]

Verwendet werden können jedoch auch so genannte Pseudo-Referenzelektroden, z.B. aus Silber. Bei Pseudo-REs handelt es sich um Elektroden aus reinem Metall. Es stellt sich ein stabiles - allerdings unbekanntes - Potential ein, das von der Elektrolytzusammensetzung abhängig sein kann.^[128] Wenn man Änderungen in Kapazität und Widerstand der biologischen Schichten untersuchen will, ist es nicht nötig, das absolute Potential zu kennen. Wichtig ist es, einen festen Bezugspunkt zu haben. D.h. das Potential der RE muss nicht bekannt, aber konstant sein.



(A)

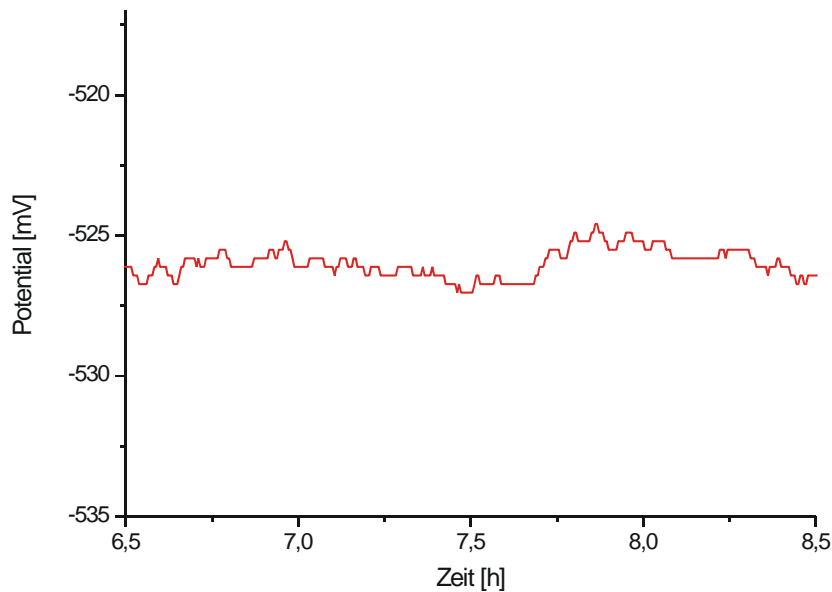


Abb. 47: Messung des Potentials einer Ag Pseudo-Referenzelektrode gegen eine Ag/AgCl-Elektrode in PBS (A) und ein vergrößerter Abschnitt der gleichen Messung, welcher die Stabilität über einen Zeitraum von 2 h zeigt (B).

Um die Stabilität der Ag Pseudo-RE der Elektrodenarrays zu überprüfen, wurde ihr Potential gegenüber einer Ag/AgCl Standard-RE (World Precision Instruments, Deutschland) in PBS-Puffer gemessen, demselben Puffer der auch für spätere Messungen an biologischen Systemen als physiologischer Puffer diente. Als GE wurde ein gewundener Pt-Draht verwendet. Die Messung erfolgte in einer zylindrischen Messzelle mit einem Volumen von 1 ml. Nach einer anfänglichen Equilibrierung lag das Potential der Pseudo-RE aus Silber bei -526 mV gegenüber der Standard-RE aus Ag/AgCl. In der elektrochemischen Spannungsreihe hat Ag/AgCl gegenüber der Normal-Wasserstoff-Elektrode ein Potential von $E_0 = +0,22 \text{ V}$ ^[128] und Silber ein Potential von $E_0 = +0,8 \text{ V}$ ^[129]. Dies ergibt ein Potential von Ag gegenüber Ag/AgCl von $E = 0,58 \text{ V}$. Dies liegt in guter Übereinstimmung mit den für die Elektrodenarrays ermittelten Werten. Das negative Vorzeichen des gemessenen Potentials erklärt sich durch die regional unterschiedlichen Konventionen, da dem verwendeten Messgerät samt Software die amerikanische Vorzeichendefinition zu Grunde liegt. Die Abweichungen vom theoretisch zu erwartenden Wert können durch die Zusammensetzung der Pufferlösung bedingt sein. Wie zuvor bereits erwähnt hängt das Potential einer Pseudo-RE von den Ionenkonzentrationen im Elektrolyten ab. Zudem wurde die Messung über Nacht durchgeführt. Leichte Schwankungen der Raumtemperatur und damit auch der Elektrolyttemperatur können das Potential beeinflussen.

Aus der in Abb. 47 gezeigten Messung wird aber deutlich, dass nach der Anfangsphase die Schwankung des Elektrodenpotentials gering ist. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt, dass das Potential in einem Zeitraum von 2 h nur innerhalb von 2,4 mV schwankt.

Ein weiteres Zeichen für die Stabilität der Pseudo-RE ist, dass sich der Elektrolytwiderstand bei den Impedanz-Scans über die Zeit nicht verändert. Der Widerstand an der Grenzfläche Arbeitselektrode / Elektrolyt kann sich durch Anlagerungen von Molekülen an die AE verändern. Der Elektrolytwiderstand R_{el} sollte davon unberührt bleiben.

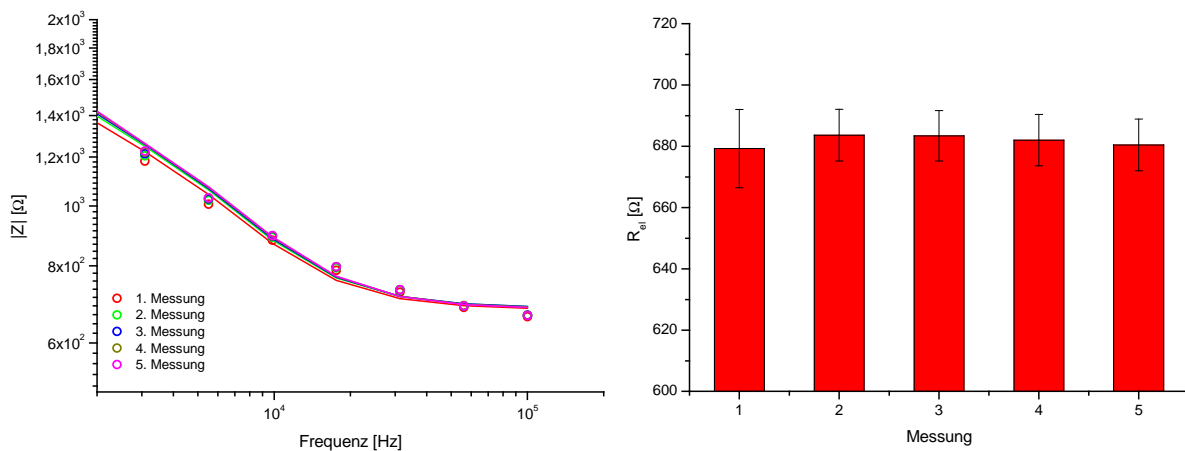


Abb. 48: Sechs aufeinanderfolgende Impedanz-Scans in BSA/PBS mit Fitkurven (durchgehende Linie) und die gefitteten Werte für R_{el} mit Fitgenauigkeit

Abb. 48 zeigt aufeinander folgende EIS Scans in einer BSA/PBS Lösung, die zu einer Anlagerung an das Gold der AE und somit zu einer Änderung des Widerstandes der Grenzfläche führen. Für verlässliche Ergebnisse darf sich die Charakteristik der RE dadurch jedoch nicht ändern. Ob dies der Fall ist lässt sich daran feststellen, ob die für R_{el} ermittelten Werte gleich bleiben. Dargestellt ist hier nur der hochfrequente Bereich, der von R_{el} abhängt. Es zeigte sich, dass R_{el} im Rahmen der Fehlergenauigkeit über die Zeit stabil bleibt.

Homogenität der Elektroden

Damit die Messungen auf verschiedenen Elektroden vergleichbar sind, müssen die Werte für Kapazität und Widerstand des reinen Goldes von Array zu Array so wie innerhalb eines Arrays homogen sein. Denn nur dann herrschen für den Aufbau der biomimetischen Membranen vergleichbare Ausgangsbedingungen, so dass ihre elektrochemischen Eigenschaften mit einander verglichen werden können.

Die Kapazität an der reinen Goldschicht in Puffer ist auf die Ausbildung eine Helmholtz-

Schicht an der Elektrodenoberfläche so wie auf die strukturellen Eigenschaften der Elektrodenoberfläche (Rauhigkeit, Geometrie der Oberfläche, mikroskopische Ladungsverteilungen) zurückzuführen^[109].

Reine Goldoberflächen haben eine Kapazität C_{sc} von etwa $40 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ^[107], wobei dieser Wert je nach Quellenangabe schwanken kann. Je kleiner der C_{sc} Wert ist, desto stärker sind Verunreinigungen auf der Oberfläche. Die Qualität der Elektroden hängt in erster Linie vom Herstellungsprozess ab. Je genauer und reproduzierbarer dieser ist, desto homogener sind die einzelnen Elektroden-Arrays. Eine weitere Rolle spielt die Reinigung der Elektroden, bevor sie in den Messaufbau eingesetzt werden können.

Um die Vergleichbarkeit der Elektroden zu überprüfen, wurden Impedanz-Scans an den einzelnen Elektroden eines Arrays so wie an denselben Elektrodenpositionen verschiedener Arrays aufgenommen.

Sobald die gereinigten Elektroden mit Pufferlösung in Kontakt kommen, lagern sich Verunreinigungen an der Oberfläche ab und es bildet sich eine Ionen-Doppelschicht. Um eine Vergleichbarkeit zu geben, wurden die Elektroden daher zunächst für 30 min in PBS-Puffer inkubiert.

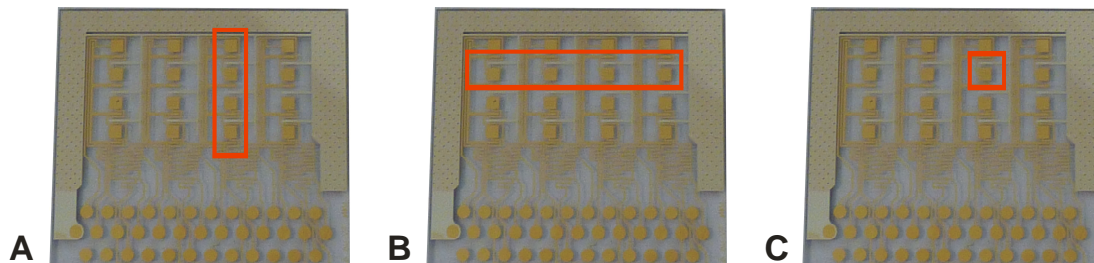


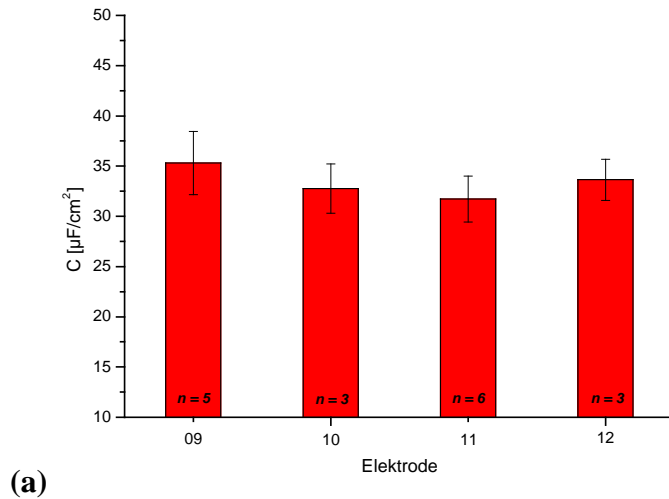
Abb. 49: Drei verschieden Varianten Elektroden zusammen zu fassen und zu vergleichen gleiche Elektrodenspalte (A), gleiche Elektrodenzeile (B), gleiche Elektrodenposition (C)

Um die Homogenität der Arrays zu charakterisieren, wurden Messungen wie in Abb. 49 gezeigt, auf drei verschiedene Arten zusammengefasst:

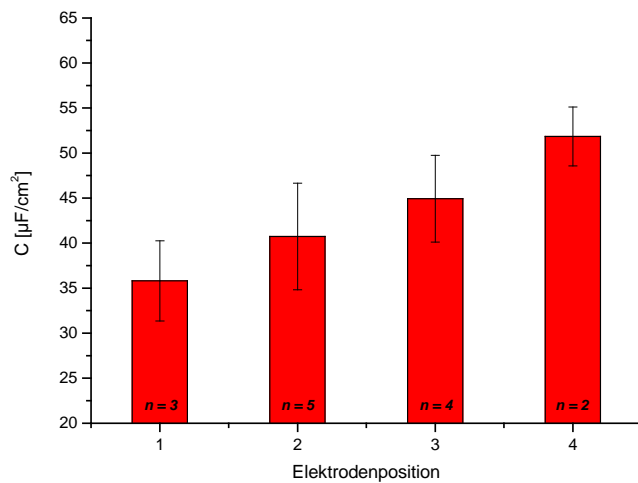
Unterschiede innerhalb einer Elektrodenspalte (gleicher Reaktionsraum)

Unterschiede innerhalb einer Elektrodenzeile (gleiche Flussweite)

Unterschiede zwischen verschiedenen Arrays (gleiche Elektrodenposition)



(a)



(b)

Abb. 50: Vergleich der Kapazitäten der Goldelektroden auf verschiedenen Arrays. (Genauere Erklärung der Elektrodenbezeichnung siehe Text)

(a): Die vier verschiedenen Elektroden in einer Zeile, sowie gleichzeitig die Mittelwerte der Kapazität an einer Elektrodenposition

(b): Die vier verschiedenen Elektroden in einer Spalte

Abb. 50 (a) zeigt die Streuung der Kapazitäten an einer Elektrodenposition auf verschiedenen Arrays von verschiedenen Wafern. Die Werte variieren zwar leicht von Array zu Array ($\sim \pm 7\%$), weisen aber keine drastischen Schwankungen auf. Man kann daher davon ausgehen, dass es durch den Herstellungsprozess bedingte Unterschiede der Elektrodenqualität gibt, diese aber im vertretbaren Rahmen bleiben und die Arrays für Biosensoren benutzbar sind.

Für die Kapazität ergeben sich bei den Elektrodenarrays Werte zwischen $28,0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und $41,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und für den Korrekturfaktor Werte zwischen 0,86 und 0,95.

Abb. 50 (a) zeigt zudem die Kapazitäten der Elektroden einer „Zeile“. Hierbei fällt auf, dass die Elektroden am Rand eine höhere Kapazität aufweisen als die in der Mitte.

Abb. 50 (b) zeigt die Kapazitäten der Elektroden innerhalb eines Kanals bei Messung in allen vier Kanälen. Die Elektroden-Arrays wurden immer auf dieselbe Art in derselben Position Plasma-behandelt. Der Array stand jedes Mal senkrecht in der Plasmakammer. Elektrodenposition 1 bezeichnet dabei die Elektrode am unteren Ende des Arrays vor den Kontaktpads und Elektrodenposition 4 die am oberen Rand. Es fällt auf, dass es einen tendenziellen Anstieg der Kapazität von Position 1 nach Position 4 gibt. Da dies bei allen Arrays unabhängig von ihrer Position auf dem Wafer während des Herstellungsprozesses zu beobachten war, lässt sich dies am wahrscheinlichsten auf die Reinigung zurückführen. Scheinbar ist die Plasmareinigung an den Rändern des Arrays effektiver.

5.1.3 Zusammenfassung

Der mikrofluidische Chip, der in dieser Arbeit verwendet wird, eignet sich für vier parallele Ansätze mit jeweils einem Reaktionsvolumen von etwa 2,1 μl .

Die Reaktionen finden auf Elektroden-Arrays mit je 4 x 4 Goldelektroden mit einer geometrischen Fläche von 1 mm^2 statt.

Die Verwendung von Argon-Plasma erwies sich als eine effektive und reproduzierbare Methode, um die Elektroden-Arrays zu reinigen. Daher wurde sie im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit angewendet.

Die Rauigkeit der Goldelektroden betrug etwa 1,6 nm. Es konnte gezeigt werden, dass die Elektroden auf unterschiedlichen Arrays hinsichtlich ihrer Kapazität (28,0 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ bis 41,2 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$) vergleichbar waren.

Zudem war auch die Stabilität der Pseudo-REs gegeben. Sie wiesen ein Potential von ungefähr -520 mV gegenüber Ag/AgCl auf.

5.2 Etablierung und Charakterisierung biomimetischer Membranen

Als biomimetische Membranen wurden in der vorliegenden Arbeit eine tethered Bilayer Lipid Membrane (tBLM), eine protein cushioned Bilayer Lipid membrane (pcBLM), eine hybrid Bilayer Lipid membrane (hBLM) / Solid supported Membrane (SSM) sowie Block-Copolymere (BCP) mit jeweils einem beispielhaften Aufbau verwendet. Sie wurden hinsichtlich ihrer Dichtigkeit sowie der Schichtdicke mit Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie sowie elektrochemischen Techniken charakterisiert.

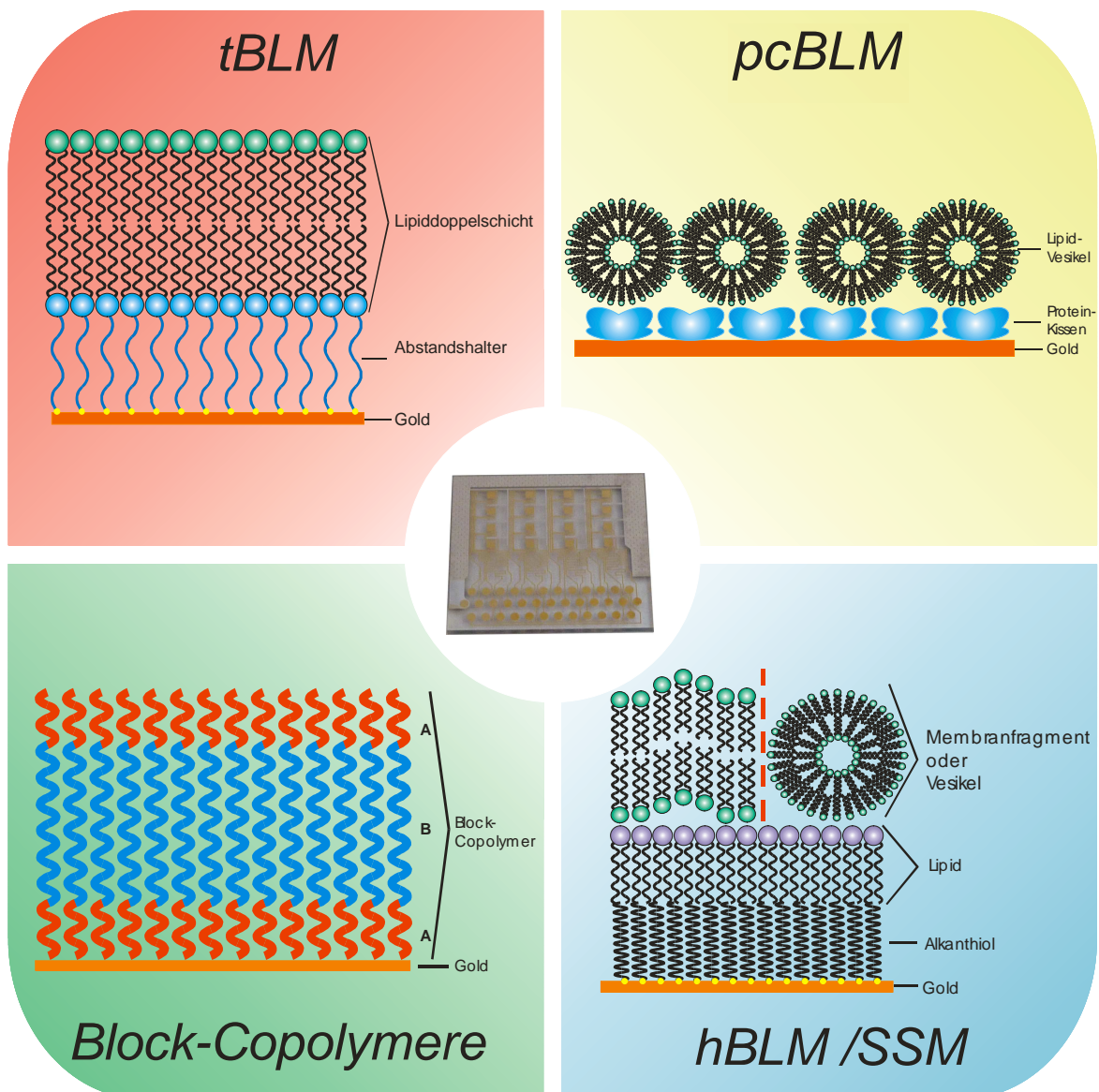


Abb. 51: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten biomimetischen Modellmembranen

5.2.1 Tethered Bilayer Lipid Membrane (tBLM) am Beispiel von Lipidvesikel-Spreitung auf DPTL

Die tBLMs mit dem Abstandshalter Diphytanyl-glycerol-tetraethylen-glycol-liponsäure Lipid (DPTL) (vgl. Abb. 51 oben links) wurden nach der in Abschnitt 4.4 (A) beschriebenen Methode präpariert. Sie haben sich in früheren Arbeiten als dichte und elektrisch gut isolierende Membranen erwiesen ^[131]. Jedoch ist bei diesem Typ von biomimetischer Membran die Qualität stark abhängig von Defektstellen in der Monolage, da eine Spreitung der Vesikel am Besten auf defektfreien, ebenen Monolagen erfolgt. Die Defektstellen in der Monolage korrespondieren auch mit der Rauigkeit der Oberfläche. Da die Kettenlänge von DPTL theoretisch 5,0 nm beträgt, reichen bereits Unebenheiten in der Goldoberfläche von wenigen Nanometern aus, damit die Unregelmäßigkeiten in der Monolage ein Vesikelspreiten erschweren. Andere Arbeiten verwenden daher als Träger Template stripped gold (TSG), das sich durch eine geringe Rauigkeit auszeichnet ^[132]. Die für die mikrofluidischen Chips verwendeten Elektroden sind jedoch gesputtert. Daher wurde zunächst überprüft, ob eine ausreichende Bedeckung mit DPTL gegeben ist.

Betrachtungen über die Bedeckungsdichte lassen sich auf zwei Arten anstellen:

- über die Kapazität der Schicht
- über die Peaks eines Redoxpaares

Jenkins et al. haben eine Methode präsentiert, wie sich aus den theoretisch zu erwartenden sowie aus den tatsächlich gemessenen Kapazitäten die Bedeckungsdichte Θ bzw. der Anteil an Defektstellen bestimmen lässt ^[107].

$$\begin{aligned} C_m &= C_{SAM} + C_{Au} \quad \Rightarrow \quad C_m = \Theta \cdot C_{SAM} + (1 - \Theta) \cdot C_{Au} \\ \Rightarrow \quad \Theta &= \frac{C_m - C_{Au}}{C_{SAM} - C_{Au}} \end{aligned} \quad (\text{Gl.20})$$

Hierbei ist C_m die gemessene Kapazität, C_{Au} die Kapazität der reinen Goldelektrode ($40 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ^[107]) und C_{SAM} die theoretische Kapazität einer defektfreien Monolage. C_{SAM} errechnet sich nach der Kondensatorformel zu $C_{SAM} = 0,37 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ bei einer Dicke der DPTL Monolage von 5 nm und einer Dielektrizitätskonstante ϵ von 1,45.

Für die Bedeckung der Elektroden ergibt sich damit ein Wert von etwa 91 %. Diese Bedeckungsdichte liegt unter der auf TSG erreichten Bedeckung von über 98 %. Dennoch

wird sie als ausreichend betrachtet, um weiterhin für den Aufbau einer tBLM geeignet zu sein. Jenkins et al zeigten, dass Vesikelspreitung auf Monolagen mit einer Bedeckungsdichte von 70 % verwertbare Membranen erzeugte ^[107].

Ob mit DPTL dichte Schichten erzeugt werden, lässt sich auch mit Hilfe der cyclischen Voltammetrie (CV) untersuchen. Ein Redox-Paar wie Kaliumhexacyanoferrat ($K_3Fe(CN)_6$ / $K_4Fe(CN)_6$) zeigt in einem cyclischen Voltammogramm auf reinem Gold deutlich ausgeprägte Redox-Peaks. Wird den Elektronen jedoch der Übertritt ins Gold durch eine isolierende Schicht – wie sie eine SAM aus DPTL darstellt – verwehrt, verringern sich diese Peaks. Bei vollständiger Bedeckung der Elektrode mit einer isolierenden Lipidschicht verschwinden sie ganz.

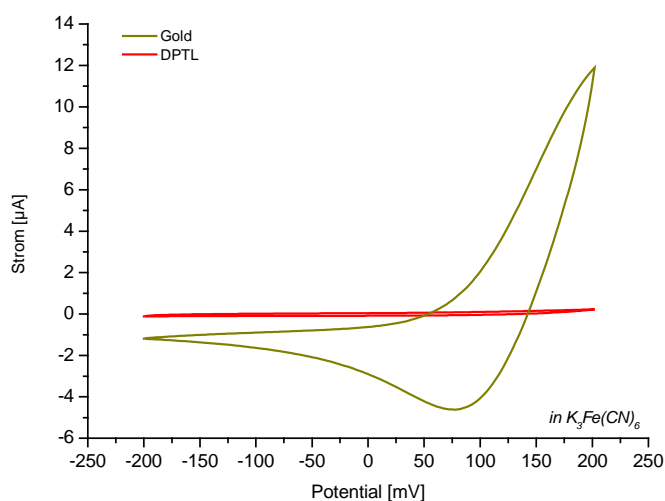
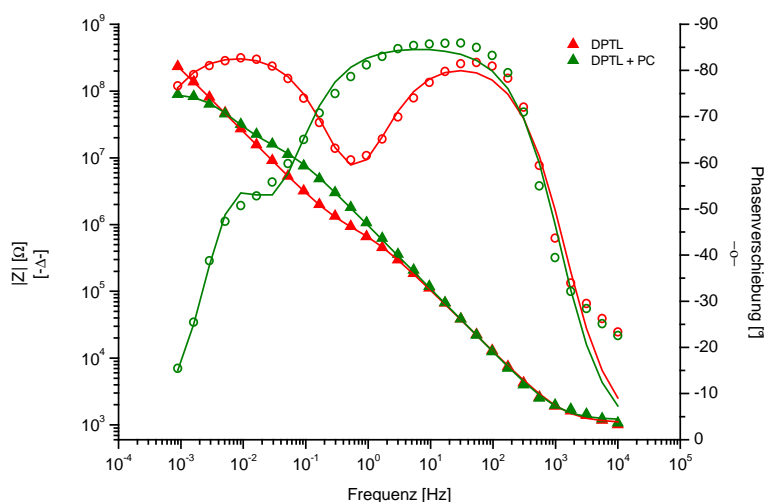


Abb. 52: Cyclisches Voltammogramm an Au und DPTL in $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, Scan-Rate 0,05 V/s.

Abb. 52 zeigt das Voltammogramm an einer mit DPTL beschichteten Elektrode im Vergleich zu einer reinen Gold-Elektrode (Peakhöhe 4,62 μA). Der Redox-Peak geht bei DPTL auf 0,11 μA zurück. Dies entspricht einem Rückgang um 97 %.

Biomimetische Schichten auf DPTL-Basis auf den gesputterten Elektroden der Arrays sind daher durchaus realisierbar. Allerdings ist mit höheren Kapazitäten und niedrigeren Widerständen als auf TSG zu rechnen, da Defekte in den SAMs die Bildung einer perfekten Lipiddoppelschicht verhindern.



	R_m [$\text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$]	C_m [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]
DPTL	$8,5 \pm 0,7$	$4,01 \pm 0,4$
DPTL + PC	$119,0 \pm 13,0$	$2,79 \pm 0,1$

Abb. 53: Impedanz-Scans an einer DPTL Monolagen (rot) und an der tBLM aus DPTL + PC (grün) in PBS, jeweils mit Fitkurven (durchgehende Linie)
Die Tabelle gibt die gefitteten Werte für R_m und C_m an mit der jeweiligen Fitgenauigkeit

Abb. 53 zeigt die Impedanz-Scans der Bildung einer PC-Lipiddoppelschicht auf einer DPTL-Monolage. Deutlich zu erkennen ist das Vorhandensein von zwei RC-Elementen in der Monolage. Eines repräsentiert die hydrophobe Lage, das andere die hydrophile Spacer-Region.

Zudem zeigte sich, dass die Widerstände der Doppelschicht unter $1 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ liegen und damit unter den Werten die in früheren Arbeiten berichtet wurden. Hierbei spielt jedoch auch die Größe der Elektroden eine Rolle. Vockenroth et al. konnten an aufgedampften Elektroden zeigen, dass der spezifische Widerstand sich mit der Elektrodenfläche ändert ^[133]. Für kreisförmige Elektroden mit einem Durchmesser von $4000 \mu\text{m}$ maßen sie einen Widerstand von $29 \text{ M}\Omega$ für eine Lipiddoppelschicht auf DPTL-Basis, was einem spezifischen Widerstand von $3,6 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ entspricht; für Elektroden mit einem Durchmesser von $80 \mu\text{m}$ erreichten sie zum ersten Mal einen absoluten Widerstand im Gigaohm Bereich von $1,4 \text{ G}\Omega$, was einem spezifischen Widerstand von $70 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ entspricht. Bereits hier zeigte sich, dass der absolute Widerstand zwar bei kleinerer Elektrodenfläche steigt, der spezifische auf die Fläche bezogene Widerstand jedoch sinkt. Was bedeutet, dass sich auf kleineren Elektroden weniger perfekte Lipiddoppelschichten ausbilden. Dies lässt sich damit erklären, dass auf der kleineren Fläche Defekte einen größeren Einfluss haben. Zudem hat es den Anschein, dass

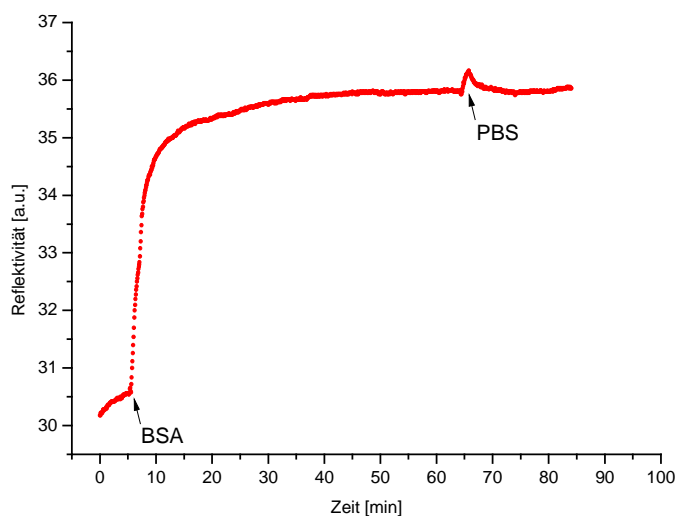
sich auf den rauheren Elektroden des Arrays zwar DPTL-SAMs ausbilden, wie die CV Messungen zeigen, die Unebenheiten jedoch ein homogenes Spreiten der Vesikel verhindern, so dass keine hoch-isolierenden Lipiddoppelschichten entstehen.

Aber nicht nur die Struktur der Elektroden ist für die Anzahl der Defekte verantwortlich. DPTL ist nicht unbegrenzt stabil und die Lösungen verändern sich im Laufe der Zeit; es kommt zu Verunreinigungen. Hierbei spielen auch die Lagerbedingungen eine Rolle, sowie die Reinheit der Substrate, die in die Lösung getaucht werden und ebenfalls Verunreinigungen einschleppen können. Zudem hatte es den Anschein, dass auch klimatische Bedingungen während der Selbstorganisation die Qualität der Monolage beeinflussen. Dies bedeutet, dass die Reproduzierbarkeit der DPTL Schichten nur in gewissen Grenzen gegeben ist. Sie lag bei der vorliegenden Arbeit unter 50%.

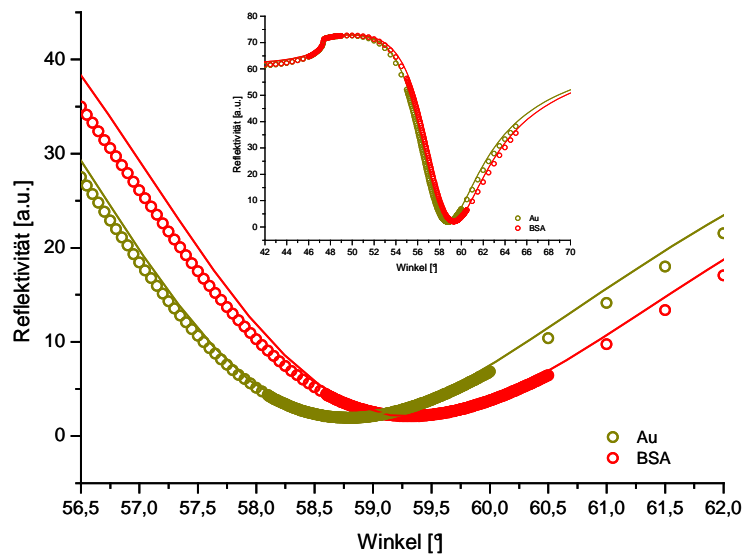
5.2.2 Peptide cushioned Bilayer Lipid Membrane (pcBLM) am Beispiel von Lipidvesikel-Anlagerung an cBSA

Die peptide cushioned Bilayer Lipid Membranes (pcBLM) (vgl. Abb. 51 oben rechts) wurden nach der in Abschnitt 4.4 (B) beschriebenen Methode präpariert.

Abb. 54 (a) zeigt eine SPR-Kinetik der Anlagerung von cBSA an Gold. Man erkennt den schnellen Anstieg nach Zugabe von BSA und dass die finale Dicke bereits nach etwa 40 min erreicht ist. Es hat sich gezeigt, dass es eine Abhängigkeit der optischen Schichtdicke von der BSA Konzentration gibt. Dabei erwiesen sich Konzentrationen von 0,02 und 0,01 mg/ml als am effektivsten ^[134].



(a)



(b)

Abb. 54: SPR-Messungen; 0,01 mg/ml cBSA auf Gold.

- (a) Kinetik-Messung 0,01 mg/ml cBSA in PBS auf Gold, die Pfeile markieren die Spülvorgänge (0,1 μ l/min).
- (b) Scan-Messungen; Gold in PBS (o), cBSA in PBS (o); Fitkurven (durchgehende Linie).

Aus den SPR-Scans (Abb. 54 (b)) lässt sich die Bedeckungsdichte Γ berechnen nach der Formel ^[135]

$$\Gamma = \frac{(n - n_0) \cdot d}{\frac{\partial n}{\partial c}} \quad (\text{Gl.21})$$

Hierbei ist n der Brechungsindex von BSA ($n = 1,4$), n_0 der Brechungsindex von PBS ($n_0 = 1,33$), dn/dc das Brechungsindexinkrement von BSA ($dn/dc = 1,84$ ^[136]) und d die ermittelte Schichtdicke. Aus mehreren Scans konnte eine mittlere Schichtdicke von $4,3 \pm 1,1$ nm bestimmt werden. Daraus ergibt sich eine Bedeckungsdichte von 165 ng/cm^2 . Mit den angeführten Abmessungen (vgl. Abschnitt 4.4 (B)) liegt die theoretische Bedeckungsdichte von BSA je nach Orientierung bei 231 ng/cm^2 bzw. 386 ng/cm^2 . Die prozentuale Bedeckung auf Gold bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml liegt daher zwischen 70 % und 40 %.

Ein Vergleich der SPR Messungen in Abb. 54 mit den Impedanz-Scans in Abb. 55 zeigt, dass sich dort nach 40 min Widerstand und Kapazität noch weiter ändern. Allerdings werden nach dem Spülen mit Puffer für R_m und C_m Werte gemessen, die wieder denen nach etwa 60 min

entsprechen und das unabhängig von der letztendlichen Inkubationszeit. Dies deutet darauf hin, dass sich das cBSA während der Inkubation in mehreren Lagen auf der Oberfläche anlagert. Allerdings scheint nur die Wechselwirkung zwischen Gold und einer Monolage BSA stark genug gegenüber dem Spülen zu sein.

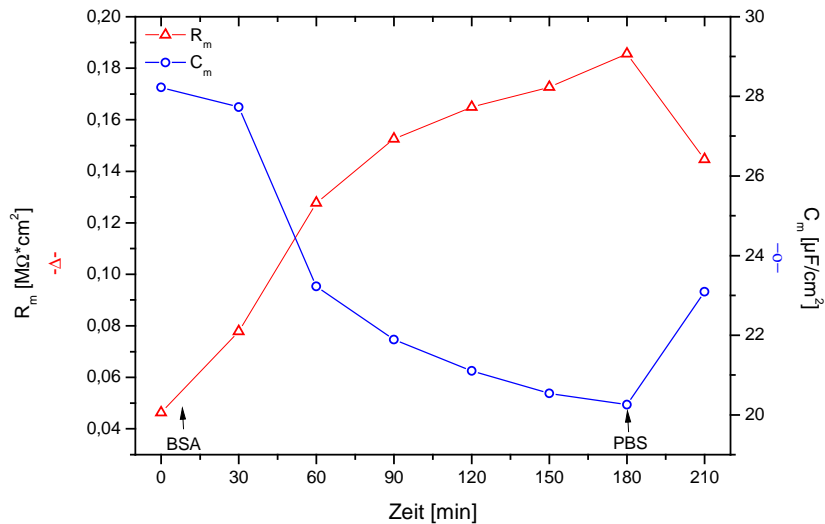
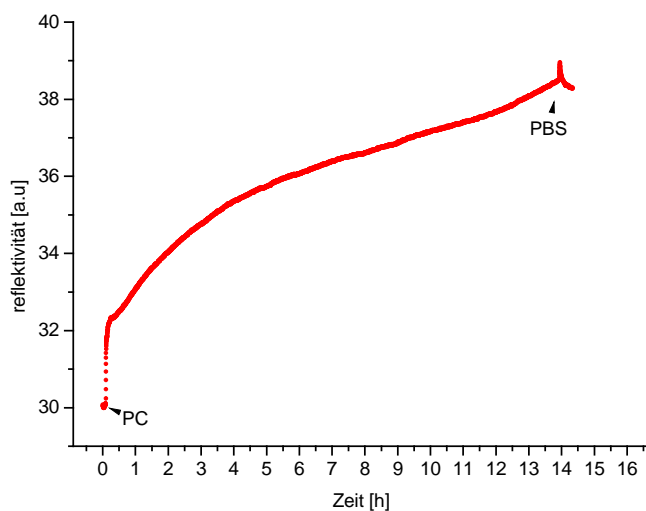
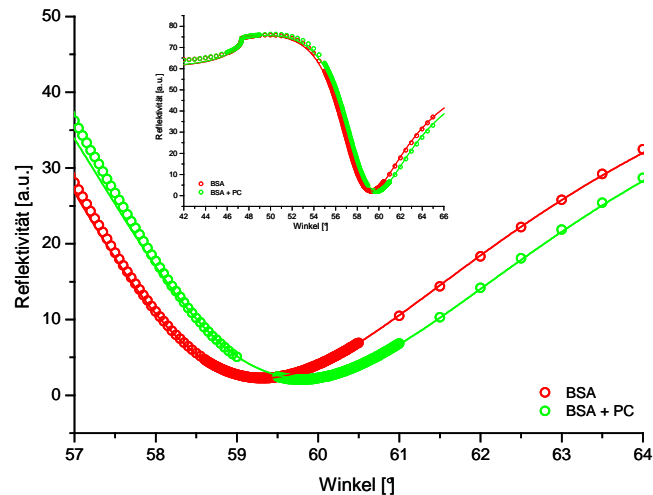


Abb. 55: Aus aufeinanderfolgenden Impedanz-Scans bestimmte Werte für R_m (- Δ -) und C_m (- \circ -) bei der Anlagerung von cBSA (0,01 mg/ml) in PBS an Gold.

Eine mittlere Schichtdicke von $4,3 \pm 1,1$ nm schafft eine ausreichende Entkopplung von der Oberfläche und Platz für die Transmembran-Domänen der MPs. Die hohe Kapazität der BSA-Schicht deutet auf eine lockere Bedeckung der Oberfläche hin.



(a)



(b)

Abb. 56: SPR-Messungen; 2 mg/ml PC auf cBSA (0,01 mg/ml)

(a) Kinetik-Messung 2 mg/ml PC in PBS auf BSA, die Pfeile markieren die Spülvorgänge (0,1 µl/min)

(b) Scan-Messungen; cBSA in PBS (o), PC (o), Fitkurven (durchgehende Linie)

Abb. 56 (a) zeigt die SPR-Kinetik einer Anlagerung von PC-Vesikeln an BSA. Zunächst ist ein schneller Anstieg der Reflektivität bei Zugabe der Vesikel zu beobachten, was sich auf Anlagerung der Vesikel so wie einen Unterschied im Brechungsindex der Pufferlösung zurückführen lässt. Danach steigt die Reflektivität aber noch langsam weiter an, ohne dass ein Plateau erreicht wird. Dies deutet darauf hin, dass durch Fusion von angelagerten Vesikeln und Umlagerung von Lipiden die optische Dichte zunimmt. Nach Inkubation über Nacht und anschließendem Spülen mit PBS beträgt die Verschiebung des Resonanzwinkels etwa $0,5^\circ$. Da es sich bei den Brechungsindices für die Lipide um berechnete Annahmen handelt, ist eine aus den Scans ermittelte Schichtdicke nicht als absoluter Wert zu verstehen und gibt daher keinen gesicherten Aufschluss darüber, ob es sich bei dieser biomimetischen Schicht eher um intakte oder fusionierte Vesikel handelt. Man kann jedoch die Verschiebung des Resonanzwinkels qualitativ dazu verwenden, um die Anlagerung von PC an BSA mit anderen biomimetischen Schichten aus Vesikeln zu vergleichen.

Weitere Informationen, ob es sich um Anlagerung intakter Vesikel oder Fusion handelt, lassen sich aus Impedanz-Scans gewinnen. Dazu wurden während der Inkubation der PC-Lösung auf BSA mehrere Impedanz-Messungen nacheinander durchgeführt. Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Protokoll, bei dem die Anlagerung der Vesikel bei $+4^\circ\text{C}$ erfolgte, wurden diese Messungen aus praktischen Gründen jedoch bei Raumtemperatur durchgeführt.

Abb. 57 zeigt die Änderung von R_m und C_m bei Zugabe von PC-Vesikeln (2 mg/ml in PBS) auf cBSA während der Inkubation in Vesikel-Lösung.

Da es sich bei cBSA um ein geladenes Molekül handelt ist davon auszugehen, dass für die Anlagerung der Vesikel und die Stabilität der daraus entstehenden Schicht die Ladung der Lipide ebenfalls eine Rolle spielt. In der vorliegenden Arbeit, wurde das zwitterionische Lipid Phosphatidylcholin verwendet, bei dem kein abstoßender Effekt der positiven Teilladung gegenüber dem kationisierten BSA beobachtet werden konnte.

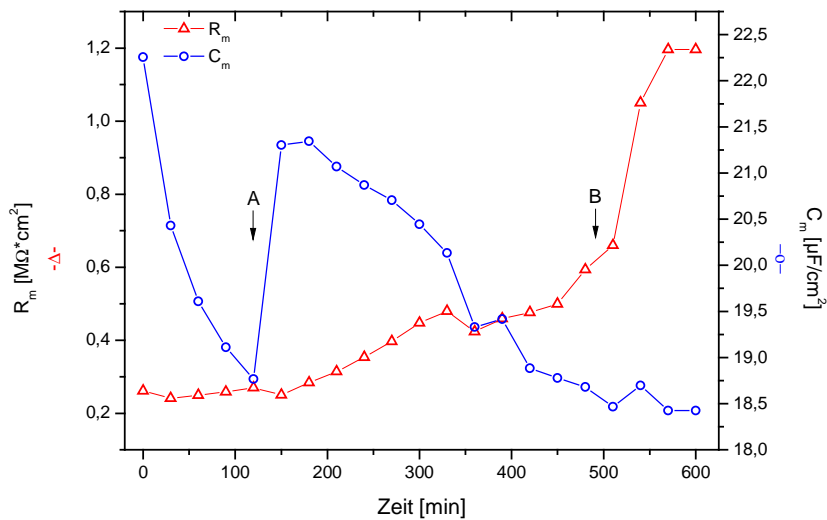
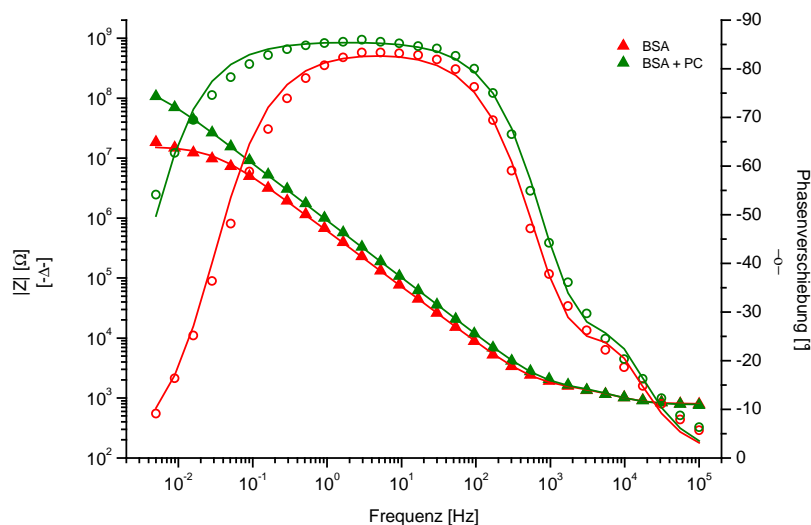


Abb. 57: Aus während der Anlagerung nacheinander gemessenen Impedanz-Scans bestimmte Werte für R_m (- Δ -) und C_m (- \circ -) bei der Anlagerung von PC (2 mg/ml) in PBS an cBSA (Nähere Erklärung siehe Text)

Zunächst fällt die Kapazität schnell ab, was auf eine rasche Zunahme der Schichtdicke hindeutet, wie sie bei Anlagerung sphärischer Vesikel zu erwarten ist. Gleichzeitig bleibt der Widerstand nahezu unverändert. Es hat sich also noch keine dichte Membran gebildet. Nach etwa 2 h steigt die Kapazität plötzlich wieder (A). D.h. die Schichtdicke ist gesunken. Da gleichzeitig ein Ansteigen von R_m beobachtet werden konnte, deutet dies auf eine zunehmende Fusion der angelagerten Vesikel hin. Statt der sphärischen Vesikel fände man nun flachere Bereiche mit einer Lipiddoppelschicht vor. Nach ca. 7,5 h hat sich C_m bei etwa $18,5 \mu F/cm^2$ eingependelt, R_m steigt jedoch noch weiter (B) auf $1,2 M\Omega \cdot cm^2$. dies deutet auf Umlagerungen der Lipide an der Oberfläche hin, was zu einer dichteren Schicht führt, ohne Zunahme der Schichtdicke.

In Abb. 58 ist ein Vergleich von Impedanz-Scans an BSA und BSA + PC-Vesikeln zu sehen.



	R_m [$M\Omega \cdot cm^2$]	C_m [$\mu F/cm^2$]
BSA	$0,16 \pm 0,004$	$29,6 \pm 0,5$
BSA + PC	$2,15 \pm 0,09$	$19,1 \pm 0,1$

Abb. 58: Impedanz-Scans an BSA auf Gold (rot) und an angelagerten PC-Vesikeln (grün) in PBS, jeweils mit Fitkurven (durchgehende Linie)
Die Tabelle gibt die gefitteten Werte für R_m und C_m an mit der jeweiligen Fitgenauigkeit

Für die cBSA Schichten wurden Widerstände im Bereich von etwa $40 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ bis zu wenigen Hundert $\text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ beobachtet. Die Kapazität lag mit Werten zwischen $25 - 40 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$ nur geringfügig unter der von reinem Gold. Dies lässt sich damit erklären, dass BSA keine dichten homogenen Schichten bildet, sondern dazwischen wässrige Kompartimente bestehen bleiben - was als Ionenreservoir durchaus so gewünscht ist. Durch Anlagerung der Vesikel sinkt die Kapazität noch weiter auf Werte zwischen ungefähr $20 - 25 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$, was eine Zunahme der Schichtdicke anzeigt. Allerdings zeigen diese Kapazitäten auch deutlich an, dass es sich bei dieser biomimetischen Schicht eindeutig nicht um eine planare defektfreie Lipiddoppelschicht ($C_m < 1 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$) handelt. Die SUVs fusionieren nicht zu einer homogenen geschlossenen Schicht. Das vesikuläre System bleibt teilweise bestehen, Defekte beeinflussen die elektrochemische Charakteristik des Systems. Der Widerstand steigt nach Zugabe der Vesikel jedoch von unter $0,5 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ auf Werte von $R_m = 1,4 - 4,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$, was in Anbetracht der aufgelockerten Packung des Abstandshalters BSA erstaunlich hoch ist.

Um die isolierenden Eigenschaften der BSA + PC Schicht zu überprüfen wurden wieder CV-Messungen in $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$ vorgenommen.

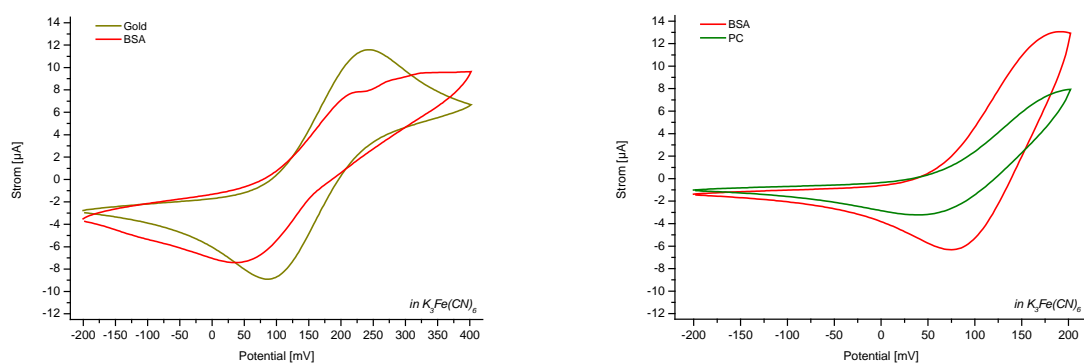


Abb. 59: Cyclisches Voltammogramm an Au (gelb) und BSA (rot) in $K_3Fe(CN)_6$, Scan-Rate 0,1 V/s (links), und an BSA (rot) und PC (grün) in $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$, Scan-Rate 0,1 V/s (rechts)

Abb. 59 zeigt, dass bereits cBSA zu einer Abnahme um 31 % des Redox-Peaks ($-6,14 \mu A$) gegenüber der reinen Gold-Elektrode ($-8,90 \mu A$) führt. Dies stimmt mit den aus den SPR-Messungen bestimmten Bedeckungsdichten bei einer seitlichen Orientierung des BSA überein. Nach Vesikel-Anlagerung kommt es zu einer stärkeren Abnahme ($-3,23 \mu A$) um noch einmal etwa 50 %. Der Peak verschwindet aber nicht gänzlich, was verdeutlicht, dass durch pcBLMs mit cBSA + PC keine völlige Isolierung bzw. keine vollständige Bedeckung möglich ist. Es war bei Kapazitäten von über $20 \mu F/cm^2$ allerdings auch nicht zu erwarten, dass dies der Fall wäre.

5.2.3 Solid supported Membrane (SSM) – Anlagerung einer Lipiddoppelschicht an eine hBLM am Beispiel von Lipidvesikel-Anlagerung auf ODT + DPhyPC

Die hybrid Bilayer Lipid Membrane (hBLM) mit angelagerten Vesikeln (vgl. Abb. 51 unten rechts) wurden nach der in Abschnitt 4.4 (C) beschriebenen Methode präpariert.

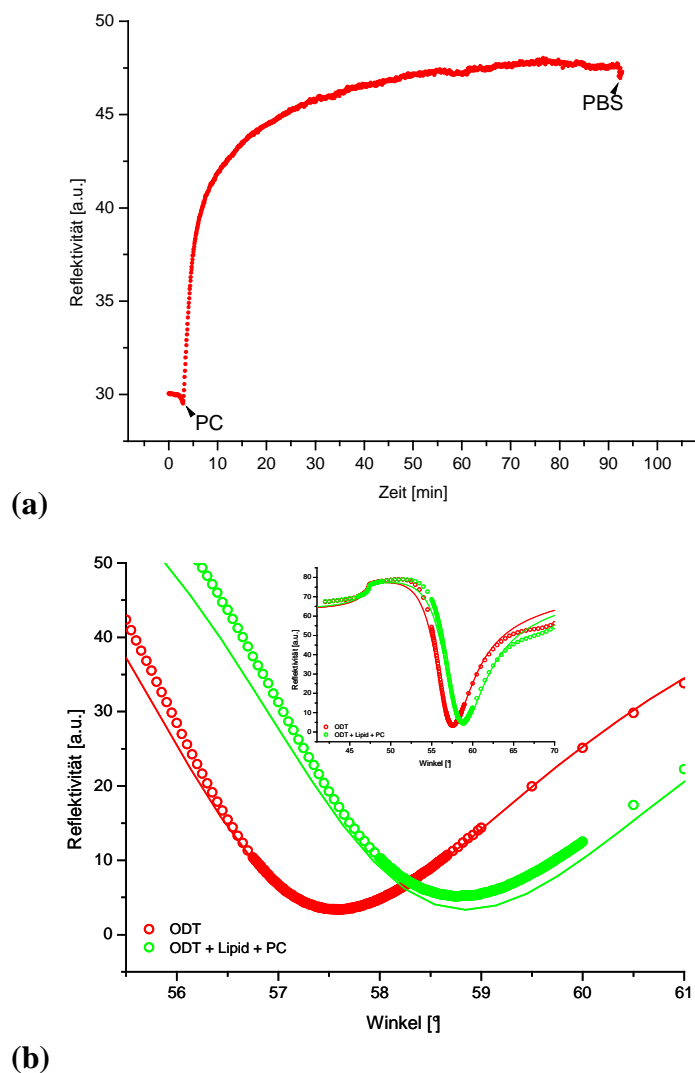


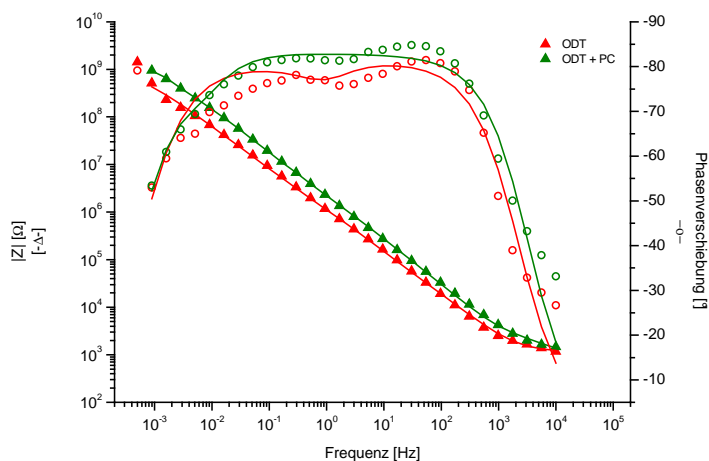
Abb. 60: SPR-Messungen; 2 mg/ml PC auf ODT/DPhyPC
 (a) Kinetik-Messung 2 mg/ml PC in PBS auf ODT/DPhyPC, die Pfeile markieren die Spülvorgänge (0,1 μ l/min)
 (b) Scan-Messungen; ODT/DPhyPC in PBS (o), PC (o), Fitkurven (durchgehende Linie)

In Abb. 60 (a) ist eine SPR Kinetik der Anlagerung von PC-Vesikeln auf der hBLM zu sehen. Die Zugabe der Vesikel führt bereits in den ersten Minuten zu einem raschen Anstieg, der

dann stark abflacht. Nach ca. 60 min ist keine Veränderung der optischen Dichte mehr zu erkennen. Die Zugabe von Vesikeln führt zu einer Verschiebung des Resonanzwinkels um $+1,2^\circ$ gegenüber ODT. Diese starke Verschiebung lässt sich dadurch erklären, dass zunächst eine Lipidmonoschicht (etwa 2 nm) die hBLM vervollständigt, wobei hierfür keine Vergleichsmessung vorliegt, da die Anlagerung von DPhyPC in Dekan/PBS ohne Spülen erfolgt. Vergleicht man die Anlagerung der Vesikel an die hBLM qualitativ mit der Anlagerung an BSA ergibt sich bei Zugrundelegen der Beziehung $\Delta\theta \sim n \cdot d$, dass die Schichtdickenzunahme für die SSM ungefähr 2,5 mal größere ist als bei BSA, wo angenommen wird, dass sich durch Fusion der Vesikel eine Lipiddoppelschicht bildet. Dies deutet darauf hin, dass die Vesikel auf der hBLM nicht vollständig fusionieren, sondern abflachen und Multilagen bilden.

Die Impedanz-Messungen in Abb. 61 zeigen, dass der Widerstand der Monolage mit Werten von $2,4 - 11,6 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ bereits deutlich über denen der tBLMs und pcBLMs liegt. Er steigt nach Aufbringen der Vesikel auf $7,4 - 19,4 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$.

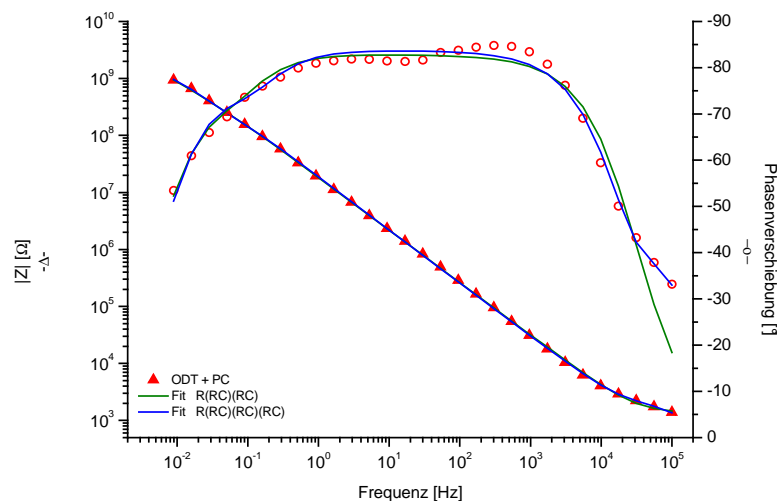
Aus der Kapazität von durchschnittlich $3,2 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$ der Monolage ergibt sich bei einer theoretischen Kapazität einer ODT-SAM von $0,45 \text{ }\mu\text{F}$ (theoretische Länge von ODT $2,8 \text{ nm}^{[139]}$) eine Bedeckungsdichte von etwa 93 %.



	R_m [$\text{M}\Omega \cdot \text{cm}^2$]	C_m [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]
ODT	$5,0 \pm 0,5$	$3,21 \pm 0,6$
ODT + PC	$19,4 \pm 2,3$	$1,66 \pm 0,1$

Abb. 61: Impedanz-Scans an ODT auf Gold (rot) und an ODT/DPhyPC mit angelagerten PC-Vesikeln (grün) in PBS, jeweils mit Fitkurven (durchgehende Linie). Die Tabelle gibt die gefitteten Werte für R_m und C_m an mit der jeweiligen Fitgenauigkeit.

Es fällt auf, dass die Fitkurve auf Grund des $R_{el}(R_m C_m)(R_{sc} C_{sc})$ Ersatzschaltbildes weniger gut mit den real gemessenen Daten übereinstimmt als dies bei der tBLM und der pcBLM der Fall war. Eine Erklärung dafür könnte der mehrschichtigere Aufbau der hBLM/SSM sein. Hierdurch wird eine zusätzliche Schichtkomponente eingeführt, die nicht als eigenständiges RC-Element berücksichtigt wird. Da die Präparationsmethode (Anlagerung von DPhyPC in Dekan ohne Spülen) eine separate Messung dieser Schicht verhindert, konnte nicht unterschieden werden welche Veränderungen auf die Lipidschicht und welche auf die Zugabe der Vesikel zurückzuführen ist. Außerdem bleibt bei den hier verwendeten SSMs immer ein Rest Lösungsmittel in der biomimetischen Schicht zurück, der ebenfalls die elektrochemische Charakteristik beeinflussen kann. Obwohl der Fehler bei den Fitergebnissen mit bis zu 7 % damit zwar größer wurde als bei den anderen biomimetischen Membransystemen, wurde auf eine Anpassung des Modells verzichtet, um eine Vergleichbarkeit der Systeme zumindest teilweise zu ermöglichen. Außerdem zeigte sich, dass eine Modifizierung des Ersatzschaltbildes die Genauigkeit der Ergebnisse nicht signifikant verbesserte. Abb. 62 zeigt die Messung an einer ODT/DPhyPC + PC Schicht, wobei einmal mit dem Modell $R(RC)(RC)$ und einmal mit dem Modell $R(RC)(RC)(RC)$ gefittet wurde.



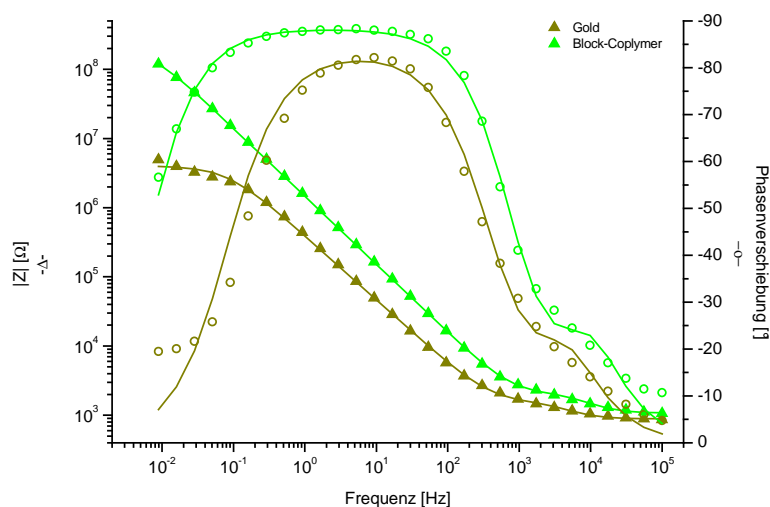
ODT + PC	R_m [$M\Omega\text{ cm}^2$]		C_m [$\mu\text{F/cm}^2$]	
	Wert	Fehler	Wert	Fehler
$R(RC)(RC)$	19,4	$\pm 2,3$	1,66	$\pm 0, 1$
$R(RC)(RC)(RC)$	18,5	$\pm 1,0$	1,56	$\pm 0, 2$

Abb. 62: Impedanz-Scan an SSM/hBLM mit Fitkurven basierend auf zwei unterschiedlichen Ersatzschaltbildern; $R(RC)(RC)$ (grün), $R(RC)(RC)(RC)$ (blau)

5.2.4 Block-Copolymere (BCP) am Beispiel von ABA Triblock-Copolymeren

Die Schicht aus Block-Copolymeren (vgl. Abb. 51 unten links) wurden nach der in Abschnitt 4.4 (D) beschriebenen Methode präpariert.

Abb. 63 zeigt den Vergleich der Impedanzmessungen an reinem Gold und einer biomimetischen Membran aus BCP. Die finale Kapazität sinkt auf durchschnittlich $13,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Die Werte für den Widerstand R_m liegen zwischen $0,6$ und $2,4 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$.



	R_m [$\text{M}\Omega \cdot \text{cm}^2$]	C_m [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]
Au	$0,04 \pm 0,002$	$48,3 \pm 1,5$
BCP aba	$2,15 \pm 0,09$	$11,2 \pm 0,1$

Abb. 63: Impedanz-Scans an Gold (gelb) und BCP (grün) in PBS, jeweils mit Fitkurven (durchgehende Linie)
Die Tabelle gibt die gefitteten Werte für R_m und C_m an mit der jeweiligen Fitgenauigkeit

Aus den Kapazitäten der BCP-Schichten ergibt sich ein Bedeckungsgrad von etwa 70 % bei einer theoretischen Länge der BCPs zwischen 8 und 10 nm ^[145]. Der Bedeckungsgrad liegt somit unter dem von DPTL. In Abb. 64 ist eine CV-Messung von BCP in $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ zu sehen. Es zeigt eine Verminderung des Redox-Peaks um 71 % ($-1,44 \mu\text{A}$) gegenüber reinem Gold ($-4,97 \mu\text{A}$). Die relativ hohen Widerstandswerte deuten jedoch darauf hin, dass die BCP-Membranen eine hohe Dichtigkeit haben.

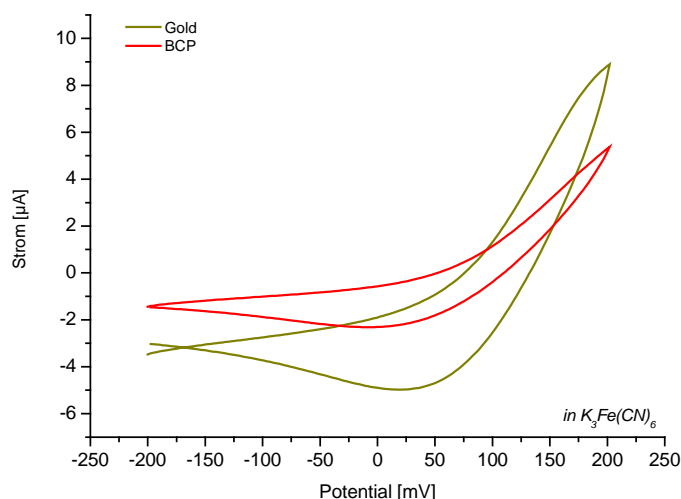


Abb. 64: Cyclisches Voltammogramm an Au (-) und BCP (-) in $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, Scan-Rate 0,05 V/s

5.2.5 Zusammenfassung

Jede der biomimetischen Schichten hat Vor- und Nachteile. In Tabelle 2 sind die Werte für Widerstand und Kapazität der biomimetischen Membranen zusammengefasst. Aufgeführt sind die Bereiche in denen R_m und C_m liegen, da die Werte bei den einzelnen Membranarchitekturen teilweise merkbar von Präparation zu Präparation schwankten.

	R_m [$M\Omega \cdot cm^2$]		C_m [$\mu F/cm^2$]		Bedeckungsgrad
tBLM DPTL + PC	0,006 - 0,008	0,03 - 0,25	3,7 - 4,1	2,6 - 2,9	91 - 97 %
pcBLM cBSA + PC	0,11 - 0,33	1,4 - 4,2	27,2 - 39,9	19,1 - 25,3	~70 %
hBLM/SSM ODT + PC	2,7 - 5,1	7,8 - 19,4	2,7 - 3,4	1,7 - 2,4	92 - 94 %
BCP		0,6 - 2,1		11,9 - 22,8	~70 %

Tab. 2: Zusammenfassung der Membranwiderstände R_m und Membrankapazitäten C_m sowie des Bedeckungsgrades der ersten Monolage für die verschiedenen biomimetischen Membranen. In der Tabelle sind die Bereiche aufgeführt, in denen die ermittelten Werte für R_m und C_m lagen.

tBLM tethered Bilayer Lipid Membrane
 pcBLM polymer cushioned Bilayer Lipid Membrane
 hBLM/SSM hybrid Bilayer Lipid Membrane/ Solid Supported Membrane
 BCP Block-Copolymere

Die Reproduzierbarkeit bei den tBLMs und den SSMs ist eher mäßig. Bei den tBLMs kann es darauf zurückgeführt werden, dass die Rauigkeit der Elektroden und die daraus resultierende unebene DPTL-Monolage ein Spreiten der Vesikel erschwert. Bei ODT liegt das Problem in der Präpartionsmethode. Die zweite Lage der hBLM wird in Lösungsmittel aufgebracht. Das Chipsystem ist allerdings nicht beständig gegen reines Decan. Der verdünnte Ansatz der Lipidlösung kann jedoch zu Schwierigkeiten bei der Anlagerung führen. In Decan bilden sich inverse Micellen des Lipides, die mit der hydrophoben Gruppe des Alkanthiols wechselwirken. In der Verdünnung ist die Lösung eher wässrig und die Effektivität der Anlagerung wird gemindert. Zudem sind bei beiden Architekturen zwei dominante RC-Glieder unterscheidbar, was eine isolierte Betrachtung des Membranwiderstandes für die Aktivitätsmessung an MPs erschwert. Für beide Architekturen stellt sich die Frage, ob die Strukturen der Moleküle unterhalb der Lipiddoppelschicht einen Einbau von MPs erlauben. Bei DPTL deuten die zyklischen Voltammogramme auf eine dichte Packung der Monolage hin, was sich für ausgedehnte extrazelluläre Domänen von MPs als problematisch erweisen kann. Bei den hBLM/SSMs ist durch die hBLMs kein Ionenreservoir unter den angelagerten Lipiden gegeben. Allerdings weisen SPR-Scans auf die Ausbildung von Lipidmultilagungen hin, so dass in den Zwischenbereichen ein wässriges Reservoir möglich ist.

Die BCPs bilden Membranen mit Widerständen im Megaohm-Bereich. Allerdings deuten die Kapazitäten und cyclischen Voltammogramme auf eine nicht vollständige Bedeckung der Elektroden hin.

Als vielversprechend für Sensoranwendungen zeigen sich die pcBLMs aus cBSA mit angelagerten Vesikeln. Mit Membranwiderständen über $2\text{ M}\Omega$ haben sie eine hohe Dichtigkeit. SPR-Scans und Impedanz-Messungen deuten darauf hin, dass die Vesikel fusionieren und somit eine planare Schicht bilden. Das Vorhandensein eines Ionenreservoirs zeigt sich in der geringen Abnahme des Redox-Peaks in $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ an cBSA, was eine gute Durchlässigkeit dieser Schicht anzeigt. Außerdem vorteilhaft bei den pcBLMs war ihre gute Reproduzierbarkeit. Durch die eher knäulförmige Struktur des cBSA hat die Rauigkeit der Elektroden kaum Einfluss auf die Fusion der Lipidvesikel.

5.3 Etablierung einer elektrochemischen Messmethode zur Detektion der Aktivität von liganden-gesteuerten Ionenkanälen

Zur Messung der Aktivität von Ionenkanälen hat sich über die Zeit eine Vielzahl von Methoden etabliert, wie z.B. Patch-Clamp, Ca^{2+} -Imaging oder FRET (Förster Resonanz Energie Transfer) ^[146] - deren Anwendbarkeit teilweise von der Art des Ionenkanals abhängig ist. Allen Ionenkanälen gemeinsam ist jedoch, dass bei Aktivität ein Ionenstrom fließt. Ein Klassiker zum Messen des Ionenstroms ist die Patch-Clamp Methode ^[147]. Bei dieser von Sackmann und Neher 1976 vorgestellten Methode wird ein Stück der Zellmembran mit einer dünnen Glaskapillare, die eine Elektrode enthält angesaugt. Zwischen Kapillare und Zellmembran bildet sich eine hochisolierende Verbindung, das sogenannte *Gigaseal* aus. Dies erlaubt die Messung von Strömen im Picoampère-Bereich, was mit der Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals korrespondiert. Die Patch-Clamp Methode ermöglichte somit zum ersten Mal die Untersuchung des Öffnungsverhaltens eines einzelnen Ionenkanals. Bei all seinen Vorteilen hat Patch-clampen allerdings auch ein paar Nachteile. Das Ansaugen der Membran, das für den unerlässlichen dichten Kontakt zwischen Zellmembran und Elektrode nötig ist, ist ein diffiziler Prozess, der Zeit und Können erfordert. Zudem sind solche Gigaseals auch nur für einen begrenzten Zeitraum stabil. In jüngster Zeit gab es einige Arbeiten zur Automatisierung des Patch-Clamp Verfahrens auf Chips ^{[148],[149]}. Allerdings werden hierbei meist freispannende Membranen über Aperturen erzeugt, da die Patch-Clamp Methode auf ausreichend große Ionenreservoirs zu beiden Seiten der Lipidschicht angewiesen ist. Da mit Gleichspannung gearbeitet wird, würde es ansonsten rasch zu einem einseitigen Verarmen an Ionen und damit zum Erliegen der Aktivität kommen. Das Patch-Clamp Verfahren eignet sich daher nur bedingt für die Anwendung an festkörper-gestützten Membranen.

Es galt somit zunächst für Aktivitätsmessungen in dem zuvor etablierten Chipsystem eine geeignete Methode zu identifizieren. Die direkteste Aussage zur Aktivität liganden-gesteuerter Ionenkanäle liefert eine Messung des Stromes oder der Änderung der Leitfähigkeit. Eine Änderung der Leitfähigkeit über die Membran bedeutet eine Änderung des Membranwiderstandes R_m . R_m lässt sich bestimmen durch elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) wie sie in Kapitel 4.1 vorgestellt wurde und bereits für die Charakterisierung der biomimetischen Schichten Anwendung fand.

Ein Nachteil der EIS liegt in der verhältnismäßig langen Dauer von etwa 20 min für eine Messung (10^5 bis $5 \cdot 10^{-3}$ Hz) gegenüber den Öffnungszeiten der Kanäle von wenigen Millisekunden. Da im Fall des mikrofluidischen Chipsystems mit einer Elektrodenfläche von 1 mm^2 jedoch ohnehin kein einzelner Kanal, sondern jeweils ein ganzes Ensemble betrachtet wird, wäre dies noch kein Ausschlusskriterium für die Impedanzspektroskopie. Gerade bei den niedrigen Frequenzen mit Messzeiten von bis zu 200 s (bei 5 mHz) wird aber auch der Einfluss der Diffusion immer dominanter, was bei undichteren Schichten zur Verfälschung der Ergebnisse führen kann.

Weiterhin problematisch ist auch, dass bei der EIS Widerstand und Kapazität nicht direkt gemessen werden, sondern über Ersatzschaltbilder als Fitwerte mit einer gewissen Unsicherheit ermittelt werden. Bei einer geringen Menge an Protein und damit auch einer geringen Änderung der Leitfähigkeit lassen sich dann nur schwer gesicherten Aussagen über die Aktivität der Proteine treffen.

Eine weitere Möglichkeit mit Impedanz-Messungen Informationen über die Änderungen von R und C zu erhalten, besteht darin, bei einer festen Frequenz die Impedanz über die Zeit zu messen - ein Verfahren das im Weiteren als Zeit-Scans bezeichnet wird.

Dem liegt die Überlegung zu Grunde, dass sich jedes System durch ein Ersatzschaltbild und die dazugehörige Gleichung für die Impedanz

$$Z_{RC} = Z'_{RC} + Z''_{RC} \quad (\text{Gl.22})$$

beschreiben lässt, aus der die Unbekannten für ohmschen Widerstand und Kapazitäten bei bekannter Frequenz bestimmt werden können.

Für eine biomimetische Membran auf einer Elektrode, die durch das Ersatzschaltbild $R_{el}(R_m C_m)(R_{sc} C_{sc})$ (vgl. Abb. 21) repräsentiert wird, gilt:

$$Z' = R_{el} + \frac{R_m}{(1 + \omega R_m C_m)^2} + \frac{R_{sc}}{(1 + \omega R_{sc} C_{sc})^2} \quad (\text{Gl.23})$$

$$Z'' = -\frac{\omega C_m R_m^2}{(1 + \omega R_m C_m)^2} - \frac{\omega C_{sc} R_{sc}^2}{(1 + \omega R_{sc} C_{sc})^2} \quad (\text{Gl.23})$$

Die treibende Kraft des Ionenstroms

Ionenkanäle ermöglichen Ionen den Durchtritt durch die Membran. Damit Ionen aber überhaupt von einer Seite auf die andere wandern, muss es jedoch nicht nur einen Weg, sondern auch einen Antrieb dafür geben. In Zellen ist dies das Membranpotential. Es entsteht dadurch, dass auf Grund einer unterschiedlichen Verteilung der Ionenkonzentrationen im intra- und extrazellulär Raum eine Spannung aufgebaut wird, die beim Öffnen von permeablen Kanälen einem Ausgleich entgegen strebt.

In einem artifiziellen Modellsystem muss nun ebenfalls eine antreibende Kraft – ein Gradient - vorliegen. Dafür bieten sich grundsätzlich zwei Möglichkeiten

Konzentrationsgradient oder

Spannungsgradient

Bei planaren Schichten, wie sie im mikrofluidischen Chipsystem auf den Gold-Elektroden vorliegen, lässt sich die Konzentrationen auf beiden Seiten der Lipidschicht nicht unabhängig von einander einstellen. Daher muss die treibende Kraft ein Spannungsgradient sein. Da Impedanzmessungen jedoch mit Wechselspannung erfolgen, ist in jedem Fall eine Spannung zwischen Arbeitselektrode (AE) und Referenzelektrode (RE) gegeben. Während der Messung liegt über die Membran eine Spannung von $V_{\max} = 10 \text{ mV}$ mit wechselnder Polung an (vgl. 4.1.2.2). Dies hat auch den Vorteil, dass der Ionenfluss regelmäßig die Richtung ändern kann, was ein Verarmen des Elektrolyten an permeablen Ionen verhindert. Ansonsten hätte man das Problem, dass Aktivität nur über den begrenzten Zeitraum detektierbar wäre, den es bräuchte, bis Spannungsgradient und Konzentrationsgradient im Gleichgewicht sind.

Bestimmung der geeigneten Messfrequenz

Biologischen Schichten – gerade wenn sie durch Ionenkanäle zu einem kinetischen System werden – lassen sich nicht in jedem Fall durch ein simples Modell darstellen. Allerdings lassen sich viele Elemente zu einer vereinfachten Darstellung zusammenfassen. Einige der biomimetischen Membrane haben mehrerer RC Elemente, wie bereits gezeigt wurde, da hier nicht nur die Lipidschicht sondern auch noch die Spacerregion bzw. das Ionenreservoir präsent sind. Impermeable Ionenkanäle, die erst bei Aktivierung einen Ionenstrom durchlassen, verändern in erster Linie das $R_m C_m$ -Element. Da jedes RC-Element eine Zeitkonstante $\tau = R_m \cdot C_m$ und damit eine charakteristische Frequenz $f_c = 1/\tau$ hat ^[100], die sich bei Änderungen von R_m oder C_m verschiebt, liegt es nahe diese Frequenz für die Messungen auszuwählen. Für eine ideale Membran mit $C = 0,8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und $R = 10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ ergibt sich

$t = 125$ mHz. Etwaige Einflüsse anderer RC-Elemente z.B. die Raumladung $R_{sc}C_{sc}$ spielen bei dieser Frequenz dann eine untergeordnete Rolle.

Für Messungen am gleichen Typ der biomimetischen Schichten sollte die gleiche Frequenz verwendet werden. Damit bleibt der Einfluss der Diffusion im Elektrolyten vergleichbar.

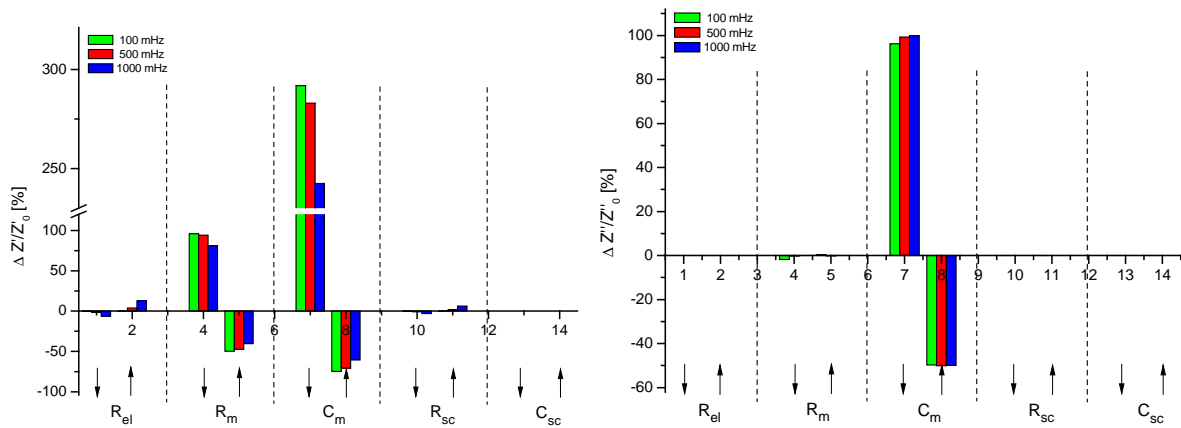


Abb. 65: Einfluss einer Verdopplung (\uparrow) oder einer Halbierung (\downarrow) von R_{el} , R_m , C_m , R_{sc} und C_{sc} auf Z' und Z'' bei drei verschiedenen Frequenzen. Als Ausgangswerte wurden $R_{el} = 1000 \Omega$, $R_m = 1 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^2$, $C_m = 10 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $R_{sc} = 500 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^2$ und $C_{sc} = 5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ angenommen

Abb. 65 zeigt ein Beispiel für die relative Änderung von Z' bzw. Z'' bei Änderung einer der Komponenten des Ersatzschaltbildes $R_{el}(R_m C_m)(R_{sc} C_{sc})$ bei unterschiedlichen Frequenzen. Ausgegangen wird dabei von Werten wie sie bei der Charakterisierung der biomimetischen Membranen für die pcBLM aus BSA und PC-Vesikeln gefunden wurden. Bei $R_m = 1 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^2$ und $C_m = 10 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ergibt sich eine charakteristische Frequenz von $f_c = 100$ mHz. Z'' wird unter diesen Bedingungen bei allen Frequenzen hauptsächlich von C_m dominiert. Z' wird sowohl von R_m als auch von C_m beeinflusst. Bei höheren Frequenzen, machen sich aber auch Änderungen von R_{el} und R_{sc} bemerkbar. Änderungen von C_{sc} können bei allen drei Frequenzen vernachlässigt werden. Für die Aktivitätsmessung des Ionenkanals ist die Änderung des Widerstandes R_m von besonderem Interesse. Bei gleicher Änderung von R_m ist die relative Änderung von Z' bei 100 mHz am größten. Sie wird kleiner je weiter man sich von der charakteristischen Frequenz entfernt.

Abb. 66 zeigt die Impedanzmessung von BSA mit angelagerten Membranfragmenten aus Torpedo (vgl. Abschnitt 5.4.1) in der Darstellungsform $-Z''$ gegen die Frequenz f . Man findet die charakteristische Frequenz f_c des Systems beim Maximum von $|Z''|$. Da eine Änderung des Widerstandes R_m eine Verschiebung des Maximums von $|Z''|$ sowie eine Änderung des

Betrages zur Folge hat, ist eine sinnvolle Messung in dem Bereich möglich, wo die Steigung von Z'' am größten ist und die Methode damit am sensitivsten bei kleinen Änderungen.

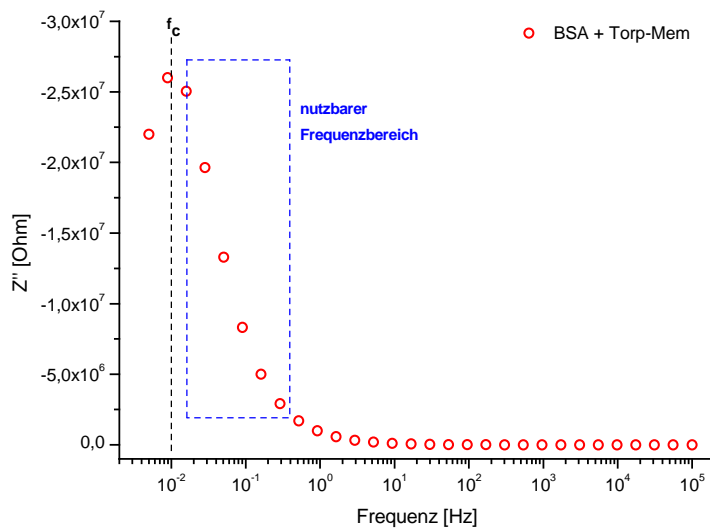


Abb. 66: Impedanz-Scan von cBSA (0,01 mg/ml) mit angelagerten Membranfragmenten aus *Torpedo marmorata* in PBS. Aufgetragen ist Z'' gegen die Frequenz. Daraus lässt sich die charakteristische Frequenz beim Maximum von $|Z''|$ bestimmen.

Die Frequenz wurde nur so niedrig wie nötig gewählt – d.h. immer etwas größer als die charakteristische Frequenz, um die Messzeiten kurz zu halten.

Damit ergaben sich für die verschiedenen Schichten folgende geeigneten Frequenzen:

- tethered Bilayer Lipid Membrane (tBLM) 500 mHz
DPTL + PC
- Solid Supported membrane (SSM/hBLM) 100 mHz
ODT + DphyPC + PC
- peptide cushioned Bilayer Lipid Membrane (pcBLM) 100 mHz
cBSA + PC
- peptide cushioned Bilayer Lipid Membrane (pcBLM) 500 mHz und 100 mHz
cBSA + Membranfragmente
- Block-Copolymer Schicht 100 mHz

Bestimmung von R und C

Auch bei Zeit-Scans sind R und C wie bei allen Impedanzmethoden nicht direkt zugänglich. Da zu einer angelegten Wechselspannung bekannter Frequenz und Amplitude das Ausgangssignal von Strom und Spannung gemessen wird, lassen sich die Phasenverschiebung

sowie der Betrag der Impedanz direkt bestimmen, bzw. der Realteil Z' und der Imaginärteil Z'' . Auch dem Zeit-Scan liegt nun das durch ein Ersatzschaltbild dargestellte Modell der Membran zu Grunde. Man kann hierbei – wie oben dargelegt - von einem vereinfachten Modell der biomimetischen Schicht ausgehen, das nur aus $(R_m C_m)$ besteht und $(R_{sc} C_{sc})$ sowie R_{el} ignoriert. Dies ist möglich, da die Daten bei der charakteristischen Frequenz von $R_m C_m$ erfasst werden. Raumladungselemente oder Beiträge der Abstandshalter spielen eine untergeordnete Rolle.

Für jedes Schaltbild lassen sich Z' und Z'' auch als Gleichung darstellen. Für eine Parallelschaltung von R und C gilt ^[100]:

$$Z' = \frac{R_m}{(1 + \omega R_m C_m)^2} \quad (Gl.24)$$

$$Z'' = -\frac{\omega C_m R_m^2}{(1 + \omega R_m C_m)^2} \quad (Gl.25)$$

Da man die Frequenz f selber festlegt ergibt sich ein Gleichungssystem von zwei Gleichungen mit zwei Unbekannten, das mit Hilfe eines Algebraprogrammes (Mathematica, Wolfram) gelöst werden kann. Beachtet werden muss hierbei jedoch, dass die Frequenz f der Messung in Hertz angegeben wird und die Frequenz im Gleichungssystem als Kreisfrequenz mit $1/s$. D.h. die Frequenz f muss vor Einsetzen in die Gleichung noch in die Kreisfrequenz $\omega = 2\pi f$ umgerechnet werden.

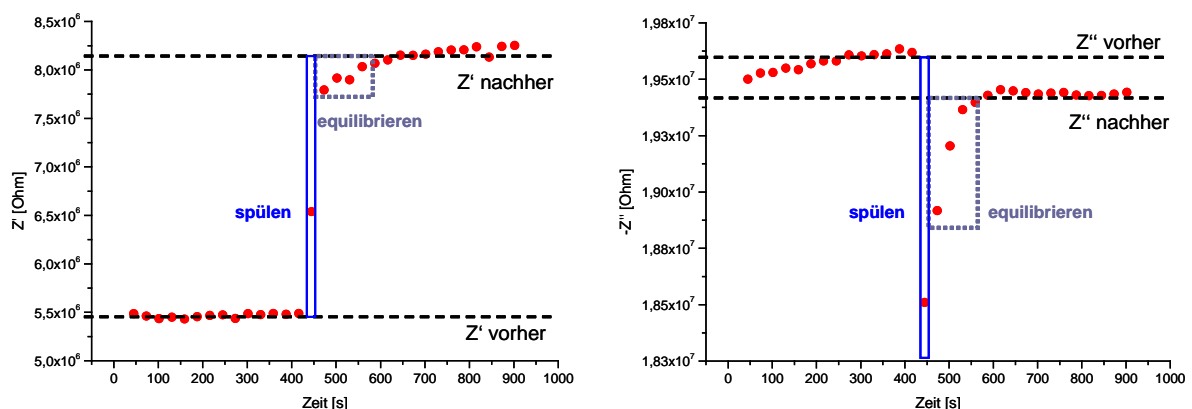


Abb. 67: Beispiel einer Zeit-Scan Messung von cBSA mit angelagerten Membranfragmenten in NaCl/Tris. Aufgetragen ist der Realteil Z' (links) und der Imaginärteil Z'' (rechts) der Impedanz gegen die Zeit. Die Messung erfolgte bei 500 mHz. Nach 400 s wurde mit NaCl/Tris + 100 mM Carbamoylcholin gespült.

Z' und Z'' erhält man direkt aus den Zeit-Scans. Für die Berechnung von R und C wird jeweils der Mittelwert von Z' bzw. Z'' in Pufferlösung 1 (vor Spülen) und Pufferlösung 2 (nach Spülen) gebildet. Diese Werte werden in das Gleichungssystem eingesetzt, das nach R und C gelöst wird. Abb. 67 zeigt beispielhaft wie die erfassten Messdaten aussehen. Nach dem Spülen benötigt das System eine kurze Zeit, bis es sich wieder im Gleichgewicht befindet.

Es bleibt die Frage nach dem Fehler von R und C . Z' und Z'' sind keine exakten Werte, sondern Mittelwerte mit einer Standardabweichung. Eine direkte Fehlerrechnung mittels Fehlerfortpflanzung ergibt sich aus den Gleichungen ^[150].

$$\sigma_{Z'} = \sqrt{\left(\frac{\partial Z'}{\partial R} \cdot \sigma_R\right) \cdot \left(\frac{\partial Z'}{\partial C} \cdot \sigma_C\right)} \quad (\text{Gl.26})$$

$$\sigma_{Z''} = \sqrt{\left(\frac{\partial Z''}{\partial R} \cdot \sigma_R\right) \cdot \left(\frac{\partial Z''}{\partial C} \cdot \sigma_C\right)} \quad (\text{Gl.27})$$

Dabei werden die errechneten Werte für R und C eingesetzt, sowie die Standardabweichungen $\sigma_{Z'}$ und $\sigma_{Z''}$ von Z' und Z'' (vgl. Anhang). Es zeigte sich bei Messungen, mit größerer Standardabweichung, dass der prozentuale Fehler für R und C unter 1% lag.

Um Fehlinterpretationen möglichst auszuschließen, wurde weiterhin betrachtet, in welchem Bereich die Werte von R und C lagen, wenn man die maximalen und minimalen Werte, die für Z' und Z'' gemessen wurden, einsetzt. Daraus ergibt sich eine Größenordnung der Unsicherheit von R bzw. C . Beispielhaft wird dies für den Widerstand an einem Zeit-Scan demonstriert, bei dem die größten Streuungen auftraten.

Z'	MW	min	min	max	max
Z''	MW	min	max	min	max
R_m vorher [$10^7 \Omega$]	2,615	2,610	2,648	2,584	2,622
Abweichung [%]		0,19	-1,27	1,17	-0,28
R_m nachher [$10^7 \Omega$]	2,545	2,554	2,564	2,532	2,542
Abweichung [%]		-0,37	-0,77	0,50	0,11

Tab. 3: Berechnung des Membranwiderstandes R_m nach Gl. 24 und Gl. 25 mit den größten und kleinsten für Z' und Z'' bestimmten Werten. Zusätzlich angegeben ist die Abweichung zu dem Widerstandswert, der aus den Mittelwerten von Z' und Z'' bestimmt wurde.

Dieses Beispiel in Tabelle 3 zeigt, dass auch wenn man den gesamten Bereich berücksichtigt, in dem der genaue Wert für Z' und Z'' liegen kann, die maximalen und minimalen Werte von R um weniger als 1,5 % von dem Wert abweichen, der aus den Mittelwerten berechnet wurde. Als tatsächliche Änderungen des Widerstandes werden daher nur Ergebnisse angesehen, bei denen $|\Delta R|$ mindestens 3 % des Ausgangswertes beträgt

Die Änderung der Kapazität

Die Kapazität der Grenzschicht Lipid/Elektrolyt wurde bisher vernachlässigt und vereinfacht mit der Kapazität der Lipiddoppelschicht zu einer einzigen Kapazität zusammen gefasst – der Membrankapazität C_m . Dies ist jedoch nicht ganz korrekt, da auch Helmholtzschicht und diffuse Doppelschicht einen Beitrag leisten und mit der Kapazität der Lipiddoppelschicht in Reihe liegen.^{[60],[111]} Somit setzt sich die Membrankapazität zusammen aus

$$\frac{1}{C_m} = \frac{1}{C_{dl}} + \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_{diff}} \quad (\text{Gl.28})$$

dabei ist C_{dl} die Kapazität der Lipiddoppelschicht, C_H die Helmholtzkapazität und C_{diff} die Kapazität der diffusen Doppelschicht. C_{diff} ist meist so groß, dass sie vernachlässigt werden kann. C_m wird dann noch von zwei Faktoren bestimmt – der Kapazität der (inneren) Helmholtzschicht C_H und der Kapazität der Lipiddoppelschicht C_{dl} . C_H hängt von der Ladungsdichte an der Grenzschicht ab. Da $C \sim Q$ ist, führt eine Bindung von geladener Liganden an die Proteine in der biomimetischen Schicht zu einem Anstieg von C_H , was letztendlich in einem Anstieg von C_m resultiert. Miura et al. konnten für SAMs auf Goldelektroden zeigen, dass die Komplexbildung von K^+ -Ionen mit Ether Gruppen zu einem Anstieg der Kapazität führte^[151]. Die Dicke der Helmholtzschicht bleibt unverändert bei einer Moleküllage. C_m dagegen wird auch durch die Dicke der biomimetischen Schicht bestimmt. Bei Bindung eines Liganden nimmt die Schichtdicke zu und C_{dl} sinkt, was in einem Absinken von C_m resultiert.

Ob der Einfluss von C_H oder von C_{dl} dominiert hängt dabei von dem prozentualen Anteil an Protein mit gebundenem Liganden und der Größe des Liganden ab.

Zudem ist der kapazitive Anteil der Impedanz eine frequenzabhängige Größe. Wie in Abschnitt 4.1.2.1 gezeigt, kann man die Membrankapazität C_m bei hohen Frequenzen bestimmen und die Kapazität der Raumladung bei niedrigen. Daher lassen sich bei 500 mHz

bzw. 100 mHz keine absoluten Aussagen über den tatsächlichen Wert der Kapazität einer biomimetischen Membran treffen.

Die Betrachtung der Leitfähigkeit

Geht man wie bisher weiterhin davon aus, dass das System durch ein RC-Element beschrieben werden kann, dann korrespondiert der Realteil der Admittanz Y' mit $1/R_m = G_m$ also mit der Leitfähigkeit der Membran. Cornell et al. präsentierten auf diesem Prinzip einen Ionenkanal-Schalter mit Gramicidin ^[101]. Für diesen Ionenkanal-Schalter inkorporierten sie immobile und mobile Gramicidin Halbkanäle in eine tBLM. Die immobile Hälfte ist an die Goldoberfläche gebunden. Die mobile Hälfte ist fluide in der oberen Lipidschicht gelagert. Sie sind biotiniert und über Streptavidin an ebenfalls biotinierte Antikörperfragmente F_{ab} gekoppelt. Ohne Analyt konnten die mobilen Halbkanäle frei diffundieren und leitende Poren bilden. Bei Zugabe von Thyroid-stimulierenden Hormonen (THS) konnten mehrer F_{ab} Fragmente an ein THS binden und wurden dadurch immobilisiert. Cornell et al. beobachteten, dass THS zu einem Absinken der Admittanz führte, was als Verringerung der Leitfähigkeit verstanden werden kann.

Für die Leitfähigkeit der biomimetischen Membran gilt:

$$G_v = G_m \tag{Gl.29}$$

$$G_n = G_m + G_p \tag{Gl.30}$$

wobei G_v die Leitfähigkeit vor der Aktivierung, G_n die Leitfähigkeit nach der Aktivierung, G_m die Leitfähigkeit der Lipiddoppelschicht und G_p die Leitfähigkeit der geöffneten Ionenkanäle ist. G_p ergibt sich dabei zu

$$G_p = g_i \cdot n \tag{Gl.31}$$

aus der Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals g_i mal der Anzahl n der offenen Kanäle. Da $G = 1/R$ ist lässt sich aus den berechneten Widerständen das Verhältnis an geöffneten Kanälen zwischen verschiedenen Messungen bestimmen gemäß

$$\frac{\frac{1}{R_{n,1}} - \frac{1}{R_{v,1}}}{\frac{1}{R_{n,2}} - \frac{1}{R_{v,2}}} \cdot n_2 = n_1 \tag{Gl.32}$$

Weitere Ffaktoren, welche die Messung beeinflussen

Da EIS keine direkte Messmethode ist, man also nicht unmittelbar den Strom über die Membran misst, sondern seine Informationen durch die Anwendung eines geeigneten Modells erhält, muss man sich Gedanken darüber machen, welche Faktoren die Messung noch beeinflussen können.

- Temperatur
Impedanzmessungen sind von der Temperatur abhängig, daher sollte darauf geachtet werden, die Temperatur während den Messungen konstant zu halten.
- Elektrolytzusammensetzung
Gerade bei Verwendung einer Pseudo-Referenzelektrode können die gemessenen Potentiale von der Polarisierung im Elektrolyten abhängen. Die Elektrolytzusammensetzung ändert sich bei Zugabe des Liganden und auch die Ionenkonzentrationen im ionischen Reservoir können sich im Laufe der Experimente verändern, z.B. wenn Ionen Kanäle durchqueren können oder mit abweichenden Pufferlösungen gespült wird.
- Einfluss des ionischen Reservoirs
Ladungen der Moleküle, die als Abstandhalter zwischen Lipiddoppelschicht und Substrat dienen, können die Charakteristik der biomimetischen Membranen beeinflussen ^{[60],[61]}.

Bevor diese Effekte genauer untersucht und verstanden worden sind, muss man ihren Einfluss qualitativ berücksichtigen. Und zwar zum einen, in dem Pufferwechsel bei unterschiedlichen Elektroden nach einem vergleichbaren Vorgehen ablaufen. Zum anderen in dem die Einflüsse von Liganden im Elektrolyten in Relation zu negativ Kontrollen (gleicher Schichtaufbau, jedoch ohne dasselbe Protein) beurteilt werden.

Man sollte jedoch immer daran denken, dass sich das System durch die Messung verändern kann, und sich somit auch eventuell die charakteristische Frequenz verschiebt. Dies ist nicht grundlegend problematisch, da die Messungen ohnehin nur in der Nähe dieser Frequenz erfolgten. Allerdings heißt das auch, dass sich aus der reinen graphischen Darstellung von Z' und Z'' keine eindeutige Aussage treffen lässt, sondern diese immer der mathematischen Betrachtung vorbehalten bleibt.

Durchführung der Zeit-Scans und Auswertung

Für die Aktivitätsmessung der nAchR Ionenkanäle wurde die Zeit-Scan Methode angewandt. Zur Vorbereitung einer Messung wurde die Reaktionskammer mit Puffer ohne Ligand gefüllt. Die zweite Pufferlösung mit derselben Ionenzusammensetzung und mit Ligand wurde bereits in den Zulauf gefüllt und die Ventile auf den Kanal eingestellt, in dem dann die Messung erfolgte. Bei diesem Vorgang wurde das Chipsystem stark bewegt und durch die Erschütterungen das Gleichgewicht an der Grenzschicht gestört. Es zeigte sich, dass es nach der Vorbehandlung etwa 300 s dauerte, bis sich das System wieder equilibriert hatte und Z' sowie Z'' annähernd konstante Werte annahmen (vgl. Abb. 68).

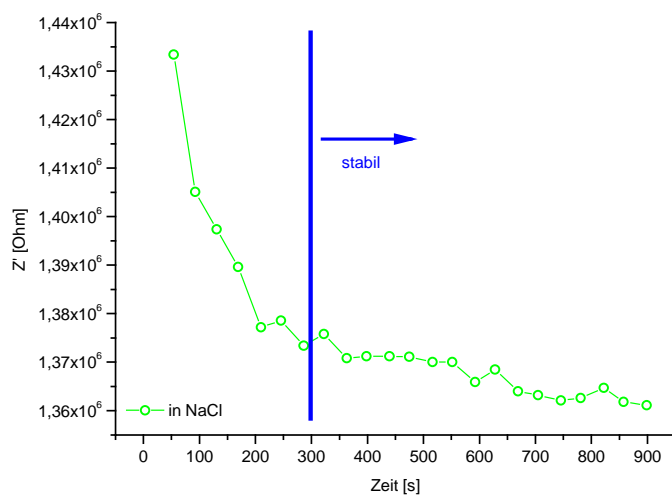


Abb. 68: Zeit-Scan des Realteils der Impedanz Z' an cBSA + Nic-Mem in 100 mM NaCl/Tris bei 100 mHz

Daher wurde nach jeder Vorbereitung der Messung zunächst 10 min gewartet um ein konstantes Signal zu gewährleisten. Auch das Einspülen der zweiten Pufferlösung sorgte für eine Störung, die nichts mit einer eigentlichen Proteinaktivität zu tun hat. Deshalb wurden nach dem Einspülvorgang die Messpunkte der ersten 60 s für die Auswertung ignoriert. Danach war kein Einfluss des Flusses mehr erkennbar. Das Einspülen von Puffer 2 erfolgte jeweils für 20 s mit einer Flussrate von 100 μ l/min.

Da, wie bereits angemerkt, der Realteil der komplexen Leitfähigkeit Y' einen direkteren Rückschluss auf die Änderung des Membranwiderstandes zulässt, wird Y' in dieser Arbeit für die graphische Repräsentation der Messungen verwendet. R_m und C_m wurden stets aus dem Real- und dem Imaginärteil Z' bzw. Z'' errechnet.

5.4 Validierung des Chipsystems mittels Aktivitätsmessung an überexprimierten Membranproteinen

Mit Membranpräparationen aus Zellkulturen, die überexprimierte Rezeptoren enthalten, sollte untersucht werden, ob sich das Chipsystem mit biomimetischen Membranen für die Messung der Aktivität liganden-gesteuerter Ionenkanäle eignet; ob die Zugabe eines spezifischen Liganden wie Carbamoylcholinchlorid an der nAChR haltigen Sensorfläche ein signifikant unterscheidbares Signal hervorruft und wenn dies der Fall ist, ob dieses Ergebnis sich an derselben Elektrode wiederholen lässt. Zudem wurde näher betrachtet, welchen Einfluss die Pufferzusammensetzung und die Art des zugegebenen Liganden auf die gemessene Aktivität hatten.

5.4.1 Aufbau einer biomimetischen Schicht mit Membranfragmenten

Von den zuvor vorgestellten Schichtsystemen eignen sich die pcBLM aus BSA und die hBLM / SSM mit ODT für die Untersuchungen an in Zelllinien synthetisiertem Protein, da sie eine einfache Anlagerung von Vesikeln bzw. Membranfragmenten mit überexprimierten Proteinen ermöglichen. Auf Grund der besseren Reproduzierbarkeit wurden die Messungen an in Zellkultur synthetisierten nAChR mit pcBLMs durchgeführt. Es wurden dabei folgende Membranpräparationen verwendet:

- nAChR in *Torpedo marmorata* (Torp-Mem)
- nicotinsche Rezeptoren in IMR-32 Zellen (Nic-Mem)
- Glutamat Rezeptor mGluR5 in CHO Zellen (GluR-Mem)

Der Aufbau der biomimetischen Schichten mit Membranfragmenten erfolgte wie in Abschnitt 4.4 (E) beschrieben und wurde mit EIS und SPR beobachtet. Die Beschichtung mit BSA erfolgte analog der bereits dargestellten Methode (vgl. 5.2.2) und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

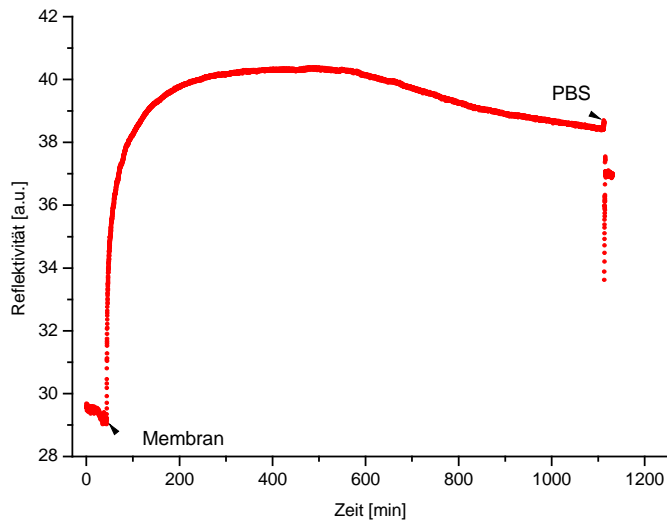


Abb. 69: SPR Kinetik-Messung Membranpräparation aus Torpedo (0,2 mg Protein/ml) in PBS auf cBSA (0,01 mg/ml); die Pfeile markieren die Spülvorgänge (0,1 μ l/min) [Messung durchgeführt von Katharina Thiers]

Die mit SPR gemessene Kinetik der Anlagerung von Torpedo-Membranen an cBSA (vgl. Abb. 69) ähnelt der bereits gezeigten Kinetik einer PC-Vesikel Anlagerung an cBSA. SPR-Scans ergaben für Torpedo-Membranen eine nur etwa halb so große optische Dicke wie für Membranen mit nicotinischem Rezeptor (Nic-Mem). Da die Lipiddoppelschichten aber bei beiden Präparationen eine annähernd gleiche tatsächliche Dicke haben sollten, deutet dies auf eine geringere Bedeckungsdichte bei den Torp-Mem hin.

Die Anlagerung wurde auch mit EIS untersucht (vgl. Abb. 70). Nach Zugabe der Membranfragmente sank die Kapazität rasch ab und hat sich nach ca. 250 min bei einem Wert von ungefähr $22 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ eingependelt. Gleichzeitig war der Widerstand deutlich auf fast $1 \text{ M}\Omega$ gestiegen. Nach etwa 350 min sank die Kapazität erneut auf beinahe $20 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Der Widerstand stieg jedoch nicht weiter an, sondern fiel eher ab. Nach Spülen stieg die Kapazität wieder deutlich auf über $22 \mu\text{F}/\text{cm}^2$; also auf Werte wie vor dem zweiten Abfall. Auch der Widerstand sank deutlich. Die Membranpräparationen lagen als Fragmente vor und nicht als extrudierte Vesikel. Im Gegensatz zu den PC-Vesikeln war daher auch keine Fusion, sondern nur eine Anlagerung zu erkennen. Das zweistufige Absinken der Kapazität könnte von einer Anlagerung der Membranen als Multilagen herrühren, die jedoch nicht stabil gegenüber Spülen waren.

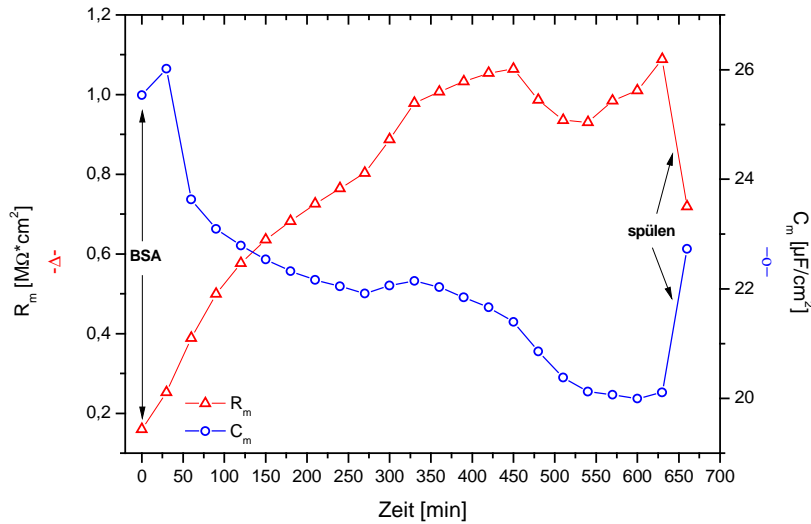
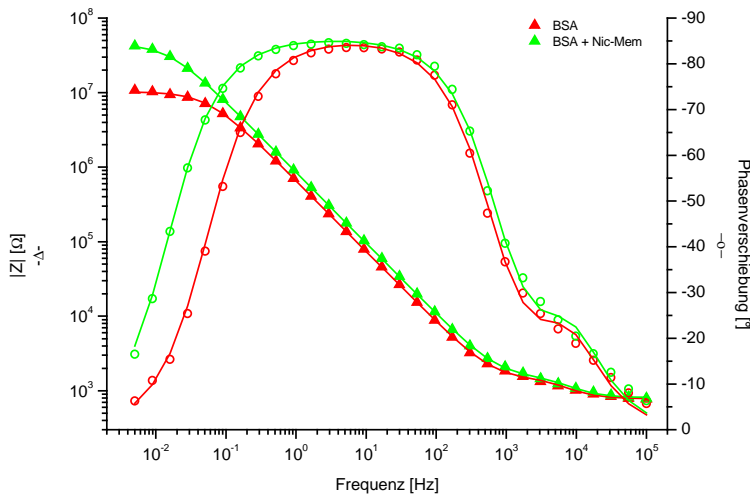


Abb. 70: Aus aufeinanderfolgenden Impedanz-Scans bestimmte Werte für R_m (Δ) und C_m (\circ) bei der Anlagerung von Nic-Mem (0,2 mg Protein/ml) in PBS an cBSA. (nähere Erklärung siehe Text)

Abb. 71 zeigt den Vergleich der Impedanz-Scans an BSA und BSA mit angelagerten Nic-Mem Fragmenten.



	R_m [$M\Omega \cdot cm^2$]	C_m [$\mu F/cm^2$]
BSA	$0,159 \pm 0,002$	$25,5 \pm 0,2$
BSA + Nic	$0,719 \pm 0,002$	$22,7 \pm 0,2$

Abb. 71: Impedanz-Scans an cBSA auf Gold (rot) und an angelagerten Membranfragmenten mit nicotinischem Rezeptor (grün) in PBS, jeweils mit Fitkurven (durchgehende Linie) Die Tabelle gibt die gefitteten Werte für R_m und C_m an mit der jeweiligen Fitgenauigkeit

Die durchschnittlichen Kapazitäten von Torp-Mem ($26,4 \pm 4,6 \mu F/cm^2$) und Nic-Mem ($25,1 \pm 4,7 \mu F/cm^2$) und PC-Vesikeln auf cBSA ($25,2 \pm 2,8 \mu F/cm^2$) liegen in derselben

Größenordnung, was darauf hindeutet, dass sich vergleichbar dicke Lipiddoppelschichten ausbilden.

Der Widerstand R_m ist bei den Torp-Mem mit ca. $0,23 \pm 0,12 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ und bei den Nic-Mem mit ca. $0,61 \pm 0,16 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ niedriger als bei BSA + PC mit über $2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$.

Membranpräparationen aus Zellen enthalten intrinsische Rezeptoren und Kanälen, die im Vergleich zu reinen Lipidvesikeln zu Leckströmen und damit einem geringeren Membranwiderstand führen können. Zum anderen wurden die Lösungen der Membranfragmente nach der Konzentration an Protein angesetzt, so dass die Menge an Lipiden zwischen den drei biomimetischen Membranen variieren kann.

5.4.2 Proteinnachweis mittels Antikörperfärbung

Bevor die Aktivität eines Proteins untersucht wurde, sollte überprüft werden, dass das betreffende Protein in den Membranpräparationen überhaupt vorhanden war. Dafür wurde ein Nachweis mittels eines spezifischem monoklonalen Antikörpers aus Maus gegen die α -Untereinheit des nAChR durchgeführt. Statt eines Elektrodenarrays wurde ein $26 \text{ mm} \times 21 \text{ mm}$ großes Glassubstrat in den mikrofluidischen Chip eingesetzt. Der Schichtaufbau erfolgte wie bei den pcBLMs mit Membranfragmenten bzw. PC-Vesikeln beschrieben (vgl. Abschnitt 4.4 (D) und (E)). Dabei wurde reines cBSA-113, sowie cBSA-113 mit angelagerten Phosphatidylcholin-Vesikeln, angelagerten Membranfragmenten mit nicotinischen Rezeptoren und angelagerten Membranfragmenten mit dem Glutamatrezeptor mGluR5a untersucht.

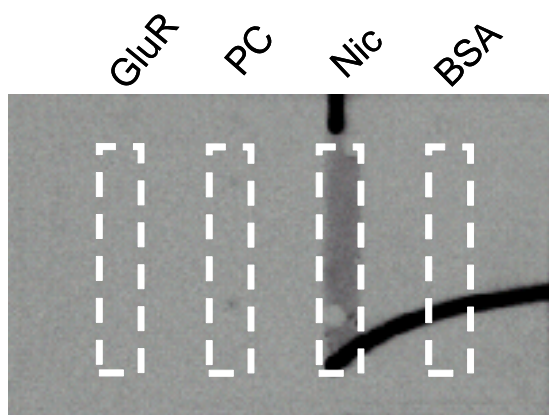


Abb. 72: Antikörpernachweis des nAChR im mikrofluidischen Chipsystem von links: Membranfragmente mit mGluR5a auf cBSA, PC-Vesikel auf cBSA, Membranfragmente mit nicotinischer Rezeptor auf cBSA, cBSA; 1. Antikörper: monoklonaler Anti-nAChR aus Maus.

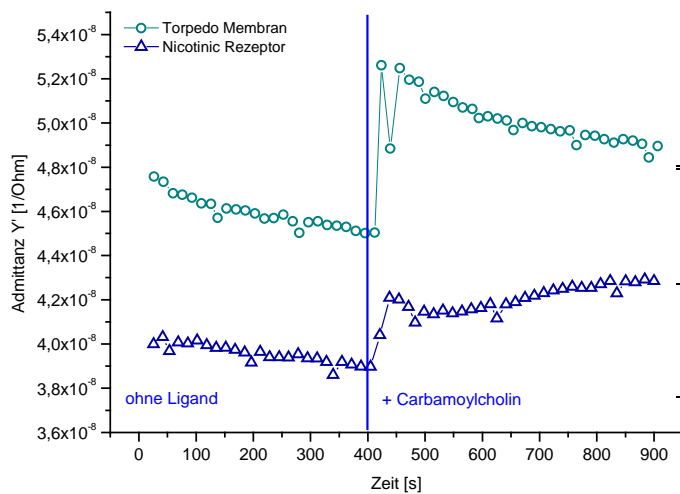
Die Antikörpermarkierung zeigt das Vorhandensein von nAChR in der nicotinischen Rezeptor Membranpräparation. In den CHO Membranen mit mGluR5a ist kein nAChR im detektierbaren Bereich vorhanden. D.h. die mGluR5a Präparation eignet sich als Negativ-Kontrolle, da kein nAChR die Ergebnisse an diesen Membranschichten beeinflusst.

5.4.3 Detektion der Aktivität eines liganden-gesteuerten Ionenkanals in Membranpräparationen

Um zu Verifizieren, dass gemessene Veränderungen wirklich auf die Aktivität des untersuchten Proteins zurückzuführen sind, wurde zunächst beobachtet, wie sich das System bei Aktivierung verhält und ob die detektierte Aktivität wiederholbar ist. Danach wurden Kontrollen mit unterschiedlicher Elektrolytzusammensetzung zum Vergleich herangezogen.

(I) Aktivierung des Proteins

Zunächst gilt es zu überprüfen, ob die Zugabe einer Pufferlösung mit permeierenden Ionen und einem spezifischen Aktivator für den nAChR eine detektierbare Veränderung des Membranwiderstandes zur Folge hat. Dafür wird einer Na⁺-haltigen Pufferlösung der Ligand Carbamoylcholinchlorid (Carb) zugesetzt. Bei Carbamoylcholin handelt es sich um ein Analogon des Acetylcholins, das an den nAChR bindet und diesen aktiviert. Carb hat jedoch eine größere Stabilität in wässriger Lösung.



		Torp	Nic
		NaCl	NaCl
R	vorher	2,20	2,54
	nachher	2,01	2,38
C	vorher	1,49	1,36
	nachher	1,55	1,41

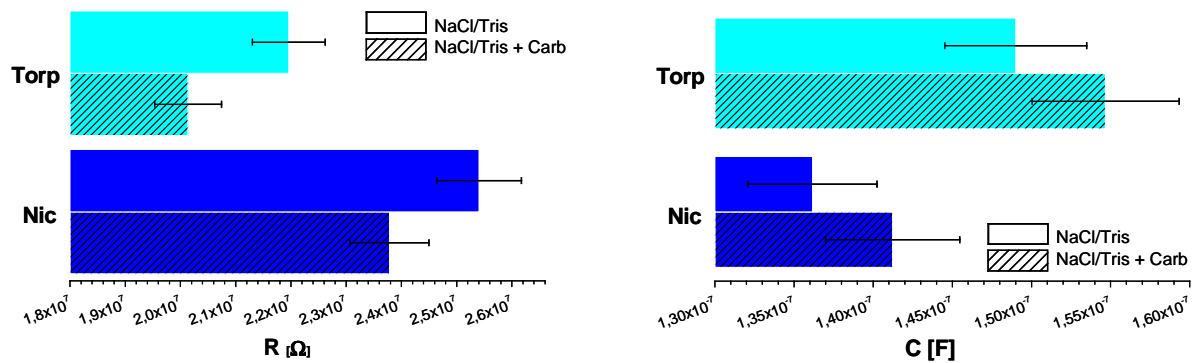


Abb. 73: Zeit-Scan der Aktivierung von nAChR in Torpedo-Membran (o) und in Membranfragmenten mit nicotinischem Rezeptor (o) in 100mM NaCl/Tris. Die Aktivierung erfolgt durch 100 μ M Carbamoylcholin. Abgebildet ist der Realteil der Admittanz Y' . Die Tabelle fasst die berechneten Werte für R_m und C_m vor und nach Aktivierung zusammen. Die Balkendiagramme verdeutlichen die Änderung von R_m und C_m , wobei der Fehlerbalken den Vertrauensbereich von 3 % angibt.

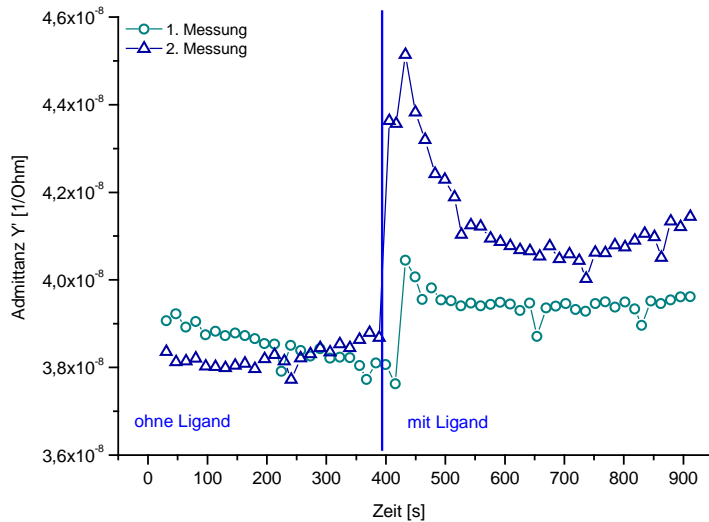
Abb. 73 zeigt beispielhaft die Aktivierung einer nicotinischen Membran und einer Torpedomembran. Der Membranwiderstand sank nach Zugabe von Carb um 8,6 % bei Torp-Mem bzw. 6,1 % bei Nic-Mem.

Eine Abschätzung der der Anzahl durchschnittlich geöffneten Ionenkanäle, lässt sich aus den bestimmten Membranwiderständen R_m mit Hilfe von Gl. 32 (S. 108) treffen. Daraus ergab sich, dass bei den Torp-Mem durchschnittlich mehr als doppelt so viele nAChRs aktiv sind wie bei den Nic-Mem. Dies erklärt sich dadurch, dass die Torp-Mem eine deutlich größere Anzahl an Rezeptoren enthalten. Geschmälert wird dieser Effekt dadurch, dass sich bei den Torp-Mem anscheinend weniger Membranfragmente an das BSA angelagert haben (vgl. SPR-Messungen in 5.4.1). Zudem war die Präparation aus Torpedo schon älter als die Nic-Mem Präparation, so dass mit einem Aktivitätsverlust der Proteine zu rechnen war.

Weiterhin fällt auf, dass die Kapazität steigt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass sich bei Aktivierung der nAChRs die Kanäle öffnen und einen Durchtritt der Ionen erlauben. Was in etwa denselben Effekt hat wie eine Vermehrung der Defektstellen, die der ursprünglichen Kapazität parallel geschaltet sind. Und da die Kapazität von mit wässrigem Elektrolyten gefüllten Poren größer ist als die einer intakten Lipiddoppelschicht (ca. $40 \mu\text{F}/\text{cm}^2$)^[107], steigt die Gesamtkapazität (vgl. Gl.20, S.107). Die entspricht einem Anstieg der Gesamtdielektrizitätskonstante der biomimetischen Schicht.

(II) Wiederholbarkeit der Aktivierung

Vergleichende Messungen an einer Membran – insbesondere wenn sie eine Inhibition einschließen – machen nur Sinn, wenn sich die Aktivierung auch wiederholen lässt. Ansonsten hätte ein Rückgang des Signals nach Zugabe eines Inhibitors keine Aussagekraft. Daher wurde untersucht, ob das Signal nach Liganden Zugabe an nicotinischen Rezeptoren erneut gemessen werden kann.



		1	2
R	vorher	2,61	2,62
	nachher	2,54	2,45
C	vorher	1,58	1,56
	nachher	1,62	1,59

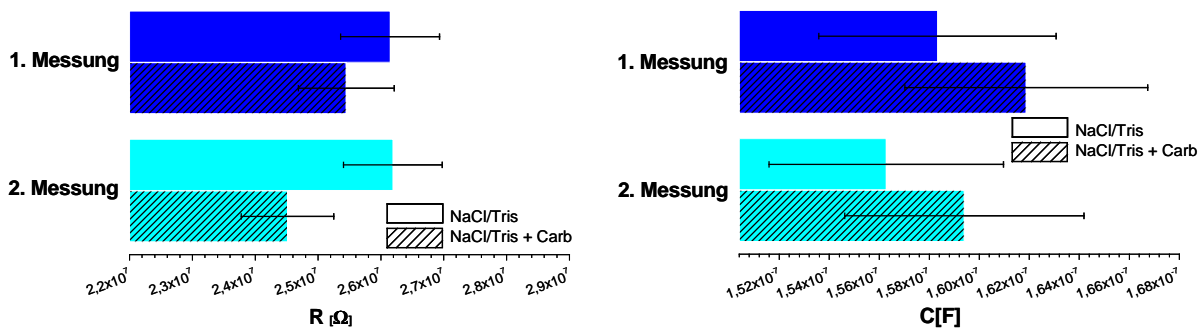


Abb. 74: Zeit-Scan der wiederholten Aktivierung von nAChR an Membranfragmenten mit nicotinischem Rezeptor 1. Messung (o) und 2. Messung (o) in 100mM NaCl/Tris. Die Aktivierung erfolgt durch 100 μ M Carbamoylcholin. Abgebildet ist der Realteil der Admittanz Y' . Die Tabelle fasst die berechneten Werte für R_m und C_m vor und nach Aktivierung zusammen. Die Balkendiagramme verdeutlichen die Änderung von R_m und C_m wobei der Fehlerbalken den Vertrauensbereich von 3 % angibt.

Abb. 74 zeigt die wiederholte Aktivierung an ein und derselben Oberfläche. Auch beim zweiten Mal ist ein deutlicher Rückgang des Widerstandes zu beobachten. Selbst wenn zwischen den aktivierenden Versuchen andere Pufferlösungen eingespült wurden (z.B.

NMG⁺), bei denen kein Absinken des Widerstandes beobachtet wurde, kehrte das Signal bei einer erneuten Messung in NaCl/Tris und NaCl/Tris + Carb wieder zurück.

Bei wiederholter Bestimmung von R und C in NaCl schwankten die Werte um weniger als 1 %, so dass sie innerhalb der weiter oben dargelegten Fehlergenauigkeit konstant blieben. D.h. dass die biomimetischen Membranen durch die verschiedenen Pufferlösungen nicht irreversibel verändert wurden und die Aktivierung der liganden-gesteuerten Ionenkanäle reproduzierbar war.

Nachdem eine Änderungen der Membraneigenschaften bei Zugabe von Carbamoylcholin nachgewiesen wurde, sollte mit den folgenden Kontrollen überprüft werden, ob diese Änderungen tatsächlich auf eine spezifische Aktivität des nAchR zurück zu führen sind.

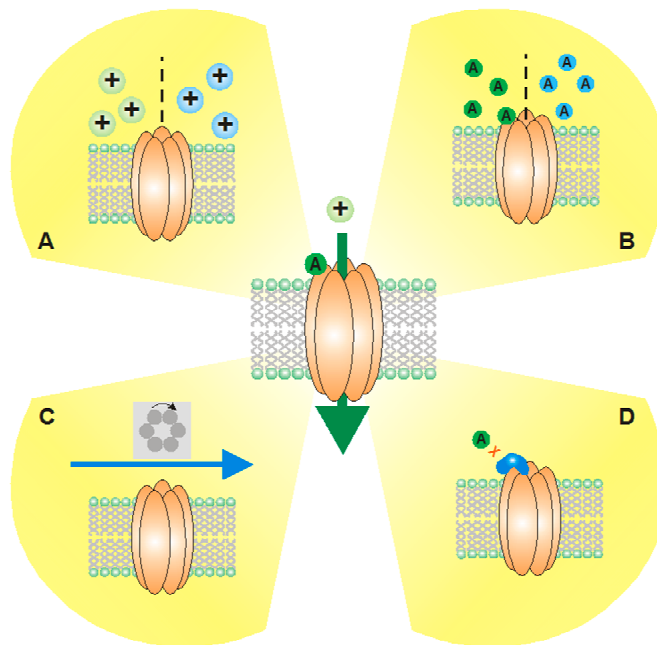


Abb. 75: Faktoren, die einen Einfluss auf die Aktivität eines liganden-gesteuerten Ionenkanals haben können: Ionenzusammensetzung im Elektrolyten (A); Art des Liganden (B); Scherkräfte auf Grund des Spülvorganges (C); Inhibition des Ionenkanals durch einen Antagonisten (D)

- Einfluss des Spülvorganges (s. III)
- Einfluss des Liganden (s. IV)
- Einfluss der permeablen Ionen (s. V)
- Inhibition des Proteins (s. VI)

(III) Einfluss des Spülvorgangs

Abb. 76 zeigt eine Messung an einer Nic Membran mit einem Pufferwechsel von 100 mM NaCl/Tris auf 100 mM NaCl/Tris. Dadurch soll beurteilt werden, ob die beim Fluss über die Membranen entstehenden Scherkräfte das System verändern.

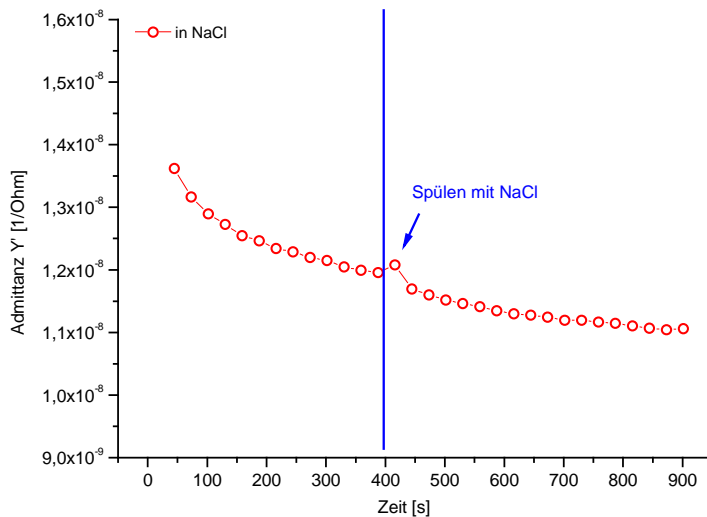


Abb. 76: Zeit-Scan eines Spülvorgangs in NaCl/Tris. Nach 400 s wurde für 20 s mit demselben Puffer gespült. Abgebildet ist der Realteil der Admittanz Y'

Während des Spülvorgangs erkennt man eine Änderung der Admittanz Y' , die jedoch sofort nach Abschalten der Pumpe verschwindet. Durch den Fluss über die Oberfläche alleine kommt es also zu keiner anhaltenden Änderung in der $R_m C_m$ -Charakteristik.

(IV) Einfluss des Liganden

Der Ligand könnte eventuell bereits durch seine Ladung einen Einfluss auf die Impedanz des Systems haben. Um dies zu untersuchen wurde die Messung in aktivierender Lösung (NaCl/Tris + Carb) sowohl am nicotinischen Rezeptor als auch am mGluR5a durchgeführt. Carbamoylcholin aktiviert nicht den mGluR5a. Bei der Probe mit mGluR5a lässt sich dabei im Vergleich zur Membranpräparation mit nicotinischen Rezeptoren kein Absinken des Widerstandes erkennen (vgl. Abb. 77).

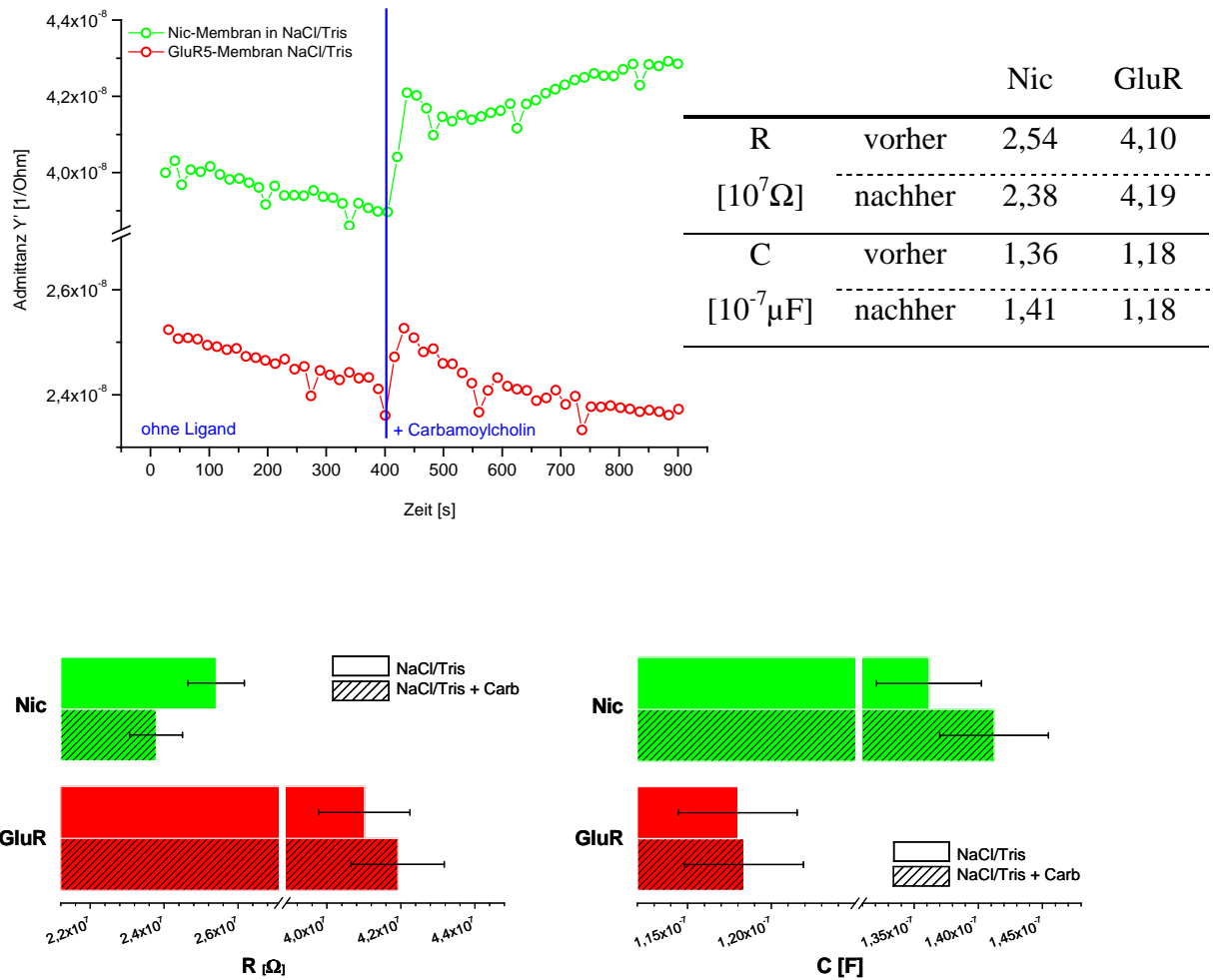
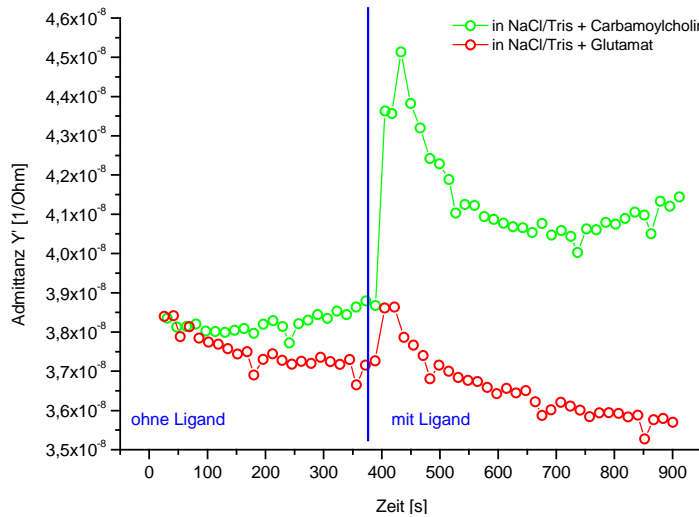


Abb. 77: Zeit-Scan des Effektes von $100 \mu\text{M}$ Carbamylcholin auf Membranfragmente mit nicotinischem Rezeptor (o) und auf Membranfragmente mit Glutamatrezeptor mGluR5a (o) in 100mM NaCl/Tris. Abgebildet ist der Realteil der Admittanz Y' . Die Tabelle fasst die berechneten Werte für R_m und C_m vor und nach Aktivierung zusammen. Die Balkendiagramme verdeutlichen die Änderung von R_m und C_m , wobei der Fehlerbalken den Vertrauensbereich von 3 % angibt.

Ob ein liganden-spezifisches Signal von nAChR vorliegt, lässt sich auch überprüfen wenn zu der Nic-Mem ein nicht-bindender und nicht-aktivierender Ligand wie z.B. Glutamat (Glu) zugegeben wird. Glutamat ist das Salz der Aminosäure Glutaminsäure. Es ist ein wichtiger Neurotransmitter im zentralen Nervensystem und aktiviert die metabolischen Glutamatrezeptoren (z.B. mGluR5a) sowie die ionischen Glutamatrezeptoren (z.B. NMDA-Rezeptoren). Eine Bindung an nAChR ist nicht bekannt.



		Carb	Glu
R	vorher	2,62	2,68
	nachher	2,45	2,77
<hr/>			
C	vorher	1,56	1,59
	nachher	1,59	1,57

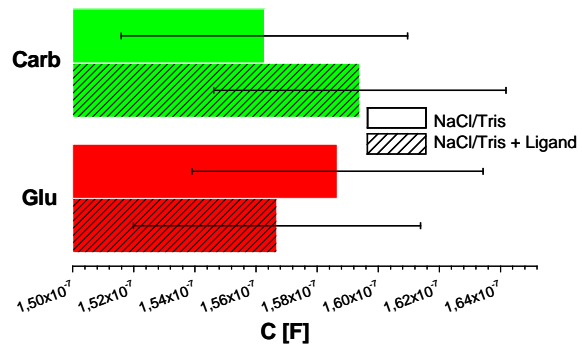
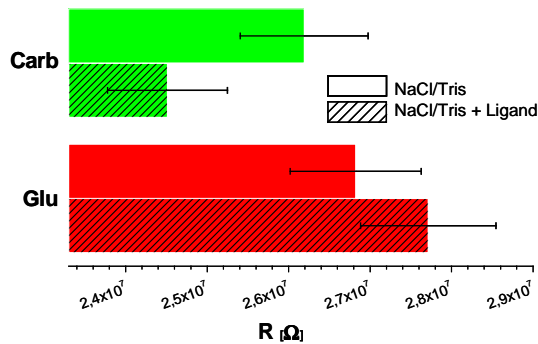


Abb.78: Zeit-Scan des Effektes unterschiedlicher Liganden auf Membranfragmente mit nicotinischem Rezeptor, 100 μM Carbamoylcholin (o) und 10 μM Glutamat (o) in 100 mM NaCl/Tris. Abgebildet ist der Realteil der Admittanz Y' . Die Tabelle fasst die berechneten Werte für R_m und C_m vor und nach Aktivierung zusammen. Die Balkendiagramme verdeutlichen die Änderung von R_m und C_m , wobei der Fehlerbalken den Vertrauensbereich von 3 % angibt.

Abb.78 zeigt die Messung von nAChR in NaCl/Tris + Glu. Es ist kein Absinken des Widerstandes zu beobachten. Auch die Kapazität wird durch die Zugabe von Glu nur im geringen Maße beeinflusst.

(V) Einfluss der Ionenzusammensetzung in der Pufferlösung

Der Ladungstransport über die Membran erfolgt durch Ionen. D.h. dass die Zusammensetzung und die Leitfähigkeit des Elektrolyten das Ergebnis beeinflussen. MPs zeichnen sich durch spezifische Leitfähigkeiten für unterschiedliche Ionensorten aus. Ein Signal, das seinen Ursprung in der Aktivität von MPs hat muss daher eine Abhängigkeit von der Ionenzusammensetzung des Puffers aufweisen.

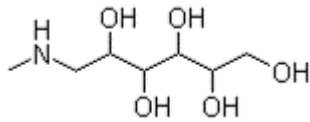
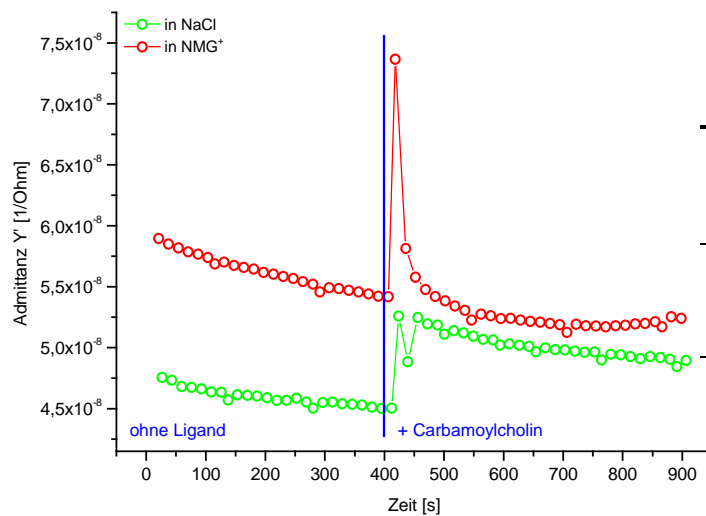


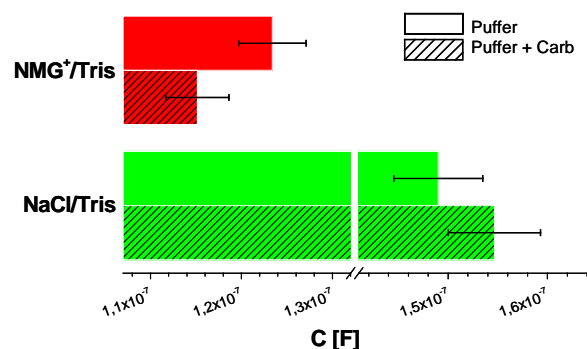
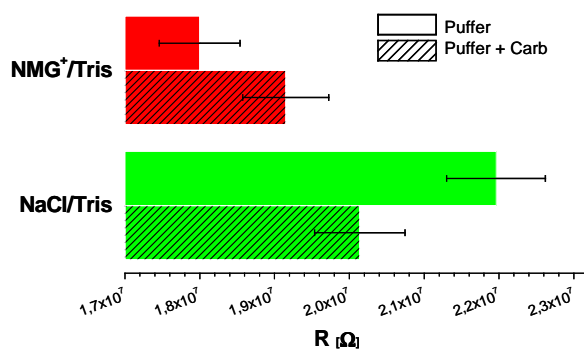
Abb. 79: Strukturformel von N-Methyl-D-Glucamin (NMG).

Der nAChR ist permeabel für monovalente Kationen, allerdings variieren die Leitfähigkeiten für die einzelnen Ionenarten (Na^+ , K^+ , Li^+) von Subtyp zu Subtyp. Das bedeutet, dass sich für Rezeptorgemische wie sie in den Membranpräparationen vorliegen, die Leitfähigkeitsreihe nicht genau vorhersagen lässt. Allen Subtypen gemeinsam ist jedoch eine gute Leitfähigkeit für Na^+ (ca. 50 pS pro Kanal). N-Methyl-D-Glucamin (NMG^+) ist in der Elektrophysiologie verbreitet als Substitut für Na^+ . Durch die Aufnahme eines Protons am Stickstoff liegt NMG in wässriger Lösung teils positiv geladen vor. Es hat eine vergleichbare osmotische Aktivität wie Na^+ ist aber nicht membrangängig und kann Na^+ -Kanäle wie z.B. den nAChR nicht permeieren. Es wird daher verwendet, wenn der Einfluss von Na^+ untersucht werden soll oder Na^+ toxisch für das untersuchte System ist. [137]

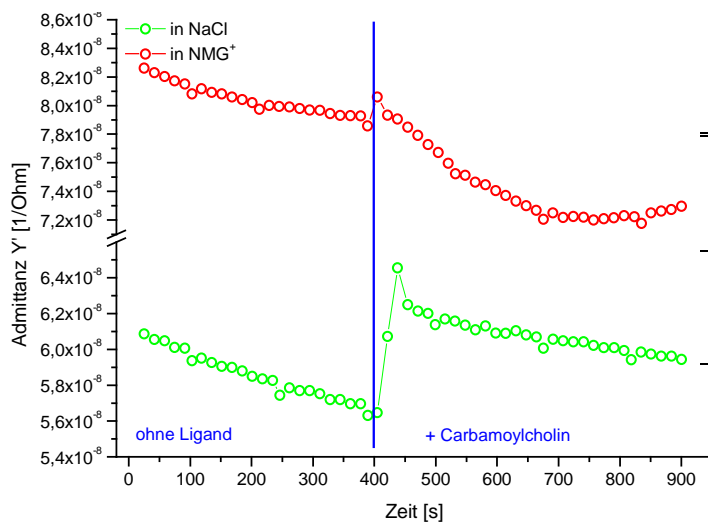
(a)



Torp-Mem		NaCl	NMG^+
R	vorher	2,20	1,80
	nachher	2,01	1,91
C	vorher	1,49	1,23
	nachher	1,55	1,15



(b)



Nic-Mem		NaCl	NMG ⁺
R	vorher	1,72	1,24
	nachher	1,65	1,35
C		1,76	1,22
[10 ⁻⁷ μF]	vorher	1,79	1,40
	nachher	1,79	1,40

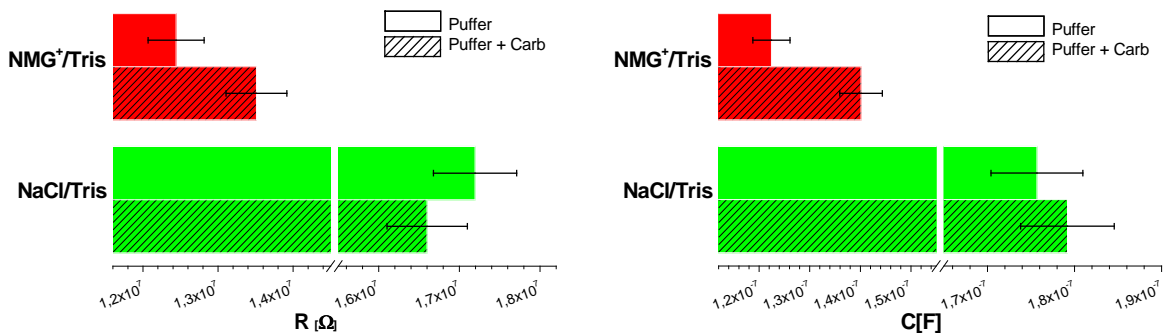
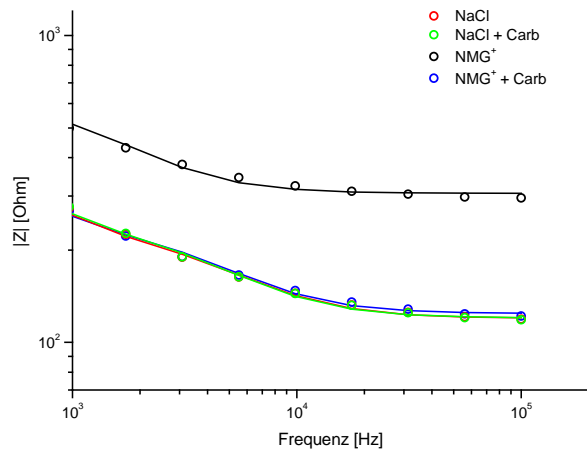


Abb. 80: Zeit-Scan des Effektes unterschiedlicher Elektrolytzusammensetzung auf Membranfragmente aus Torpedo (a) und Membranfragmente mit nicotinischem Rezeptor (b) bei Aktivierung mit 100 μM Carbamoylcholin in 100 mM NaCl/Tris (o) und 100 mM NMG/Tris (o). Abgebildet ist der Realteil der Admittanz Y' . Die Tabelle fasst die berechneten Werte für R_m und C_m vor und nach Aktivierung zusammen. Die Balkendiagramme verdeutlichen die Änderung von R_m und C_m , wobei der Fehlerbalken den Vertrauensbereich von 3 % angibt.

Durchgeführt wurden Messungen an nAChR in NMG⁺/Tris + Carb im Vergleich zu Messungen in NaCl/Tris + Carb an einer Torp-Mem und einer Nic-Mem. In NMG⁺ führt die Zugabe des Liganden zu keiner Verringerung des Widerstandes (vgl. Abb. 80).

Bemerkenswert ist aber das unterschiedliche Verhalten der Kapazitäten. Im Gegensatz zu den übrigen Messungen führt NMG⁺/Tris + Carb bei den Torp-Mem zu einer Verringerung der Kapazität. Bei den Nic-Mem dagegen zu einer deutlichen Erhöhung. Die Erhöhung von C bei den Nic-Mem lässt sich durch die höhere Ladungsdichte in der Grenzschicht zum Elektrolyten bei Bindung des Liganden erklären. Bei Torp-Mem scheint aber ein anderer Einfluss die dominantere Rolle zu spielen. Gemeinhin bedeutet eine Verringerung der Kapazität eine Zunahme der Schichtdicke. Bei den Torp-Mem ist die Rezeptorzahl höher als bei den Nic-Mem. Dadurch steigt die Anzahl der gleichzeitig gebundenen Liganden, und der

Flächenanteil mit einer größeren Schichtdicke (Membran + Ligand) nimmt zu. Wie in Abschnitt 5.3 (vgl. S.107) dargelegt führt dies bei einer ausreichend hohen Bedeckungsdichte zu einem Absinken der Gesamtkapazität C . Die Messungen an den biomimetischen Schichten in NMG^+ deuten daher darauf hin, dass das Carbamoylcholin an $n\text{AChRs}$ bindet, es jedoch zu keinem Ionenfluss durch die Kanäle kommen kann, da keine permeierende Ionensorte vorhanden ist.



	R_{el} [Ω]
NaCl	1194 ± 38
NaCl + Carb	1198 ± 32
NMG^+	3058 ± 41
NMG^+ + Carb	1241 ± 16

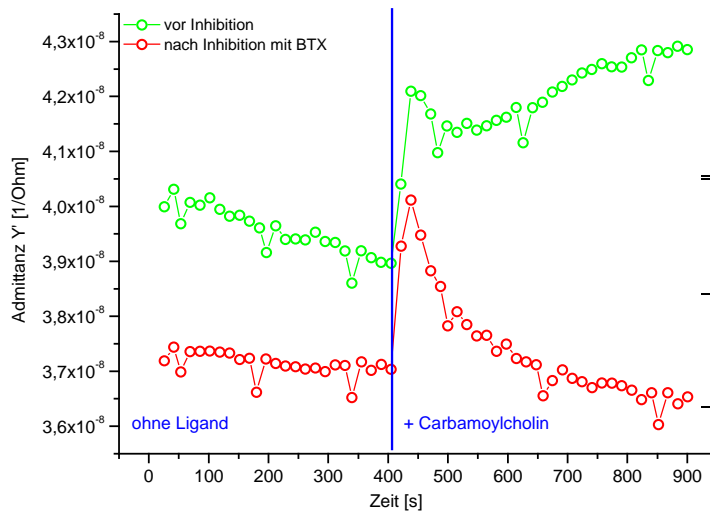
Abb. 81: Impedanz-Scans an Membranfragmenten mit nicotinischem Rezeptor an BSA in unterschiedlichen Elektrolyten 100 mM NaCl/Tris (o), 100 mM NaCl/Tris + 100 μM Carbamoylcholin (o), 100 mM NMG/Tris (o), 100 mM NMG/Tris + 100 μM Carbamoylcholin (o), Fitkurven (durchgehende Linie). Abgebildet ist der hochfrequente Bereich, aus dem sich der Elektrolytwiderstand R_{el} bestimmen lässt. Die Tabelle gibt die gefitteten Werte für R_{el} mit der jeweiligen Fitgenauigkeit

Der scheinbare Anstieg im Widerstand R_m lässt sich mit einer Veränderung des Elektrolytwiderstandes R_{el} erklären. NMG-Puffer hat einen höheren Widerstand als NaCl (vgl. Abb. 81). Im Gegensatz zu den Versuchen mit NaCl hat bei NMG^+ die Zugabe von Carb ein deutliches Absinken von R_{el} zur Folge. Ein Blick auf Abb. 65 zeigt, dass ein Sinken von R_{el} ein Sinken von Z' bewirkt, was tendenziell einem Anstieg von R_m gleicht. Wenn es keine Veränderungen von R_m gibt, die diesen Effekt ansonsten überlagern würden, kann es bei nicht genauer Kenntnis der Änderung von R_{el} rechnerisch zu einer irrtümlichen Änderung von R_m kommen. Dies ist jedoch nicht problematisch, da die Auswirkung in keinem Fall zu einer falsch-positiven Annahme einer Aktivität führen würde.

(VI) Inhibition des Proteins

Ob ein proteinspezifisches Signal vorliegt, lässt sich auch durch Zugabe eines Antagonisten überprüfen. α -Bungarotoxin (BTX) ist ein spezifischer Inhibitor für nAChR. Bei BTX handelt es sich um ein Schlangengift, das irreversibel an die α -Untereinheit des nAChR bindet. Nach Inkubationszeiten von 40 min wurde eine vollständige Hemmung bei Torpedo-Präparationen gezeigt^[137].

Für die Versuche mit BTX wurde eine 100 nM Lösung BTX in NaCl/Tris auf eine Nic-Mem gegeben und 40 min inkubiert. Diese Lösung wurde vor Beginn der Messung nicht entfernt. Zur Aktivierung wurde eine Lösung von 100 nM BTX in NaCl/Tris + 100 mM Carb verwendet.



		ohne BTX	mit BTX
R [10 ⁷ Ω]	vorher	2,54	2,70
	nachher	2,38	2,71
C [10 ⁻⁷ μF]	vorher	1,36	1,41
	nachher	1,41	1,42

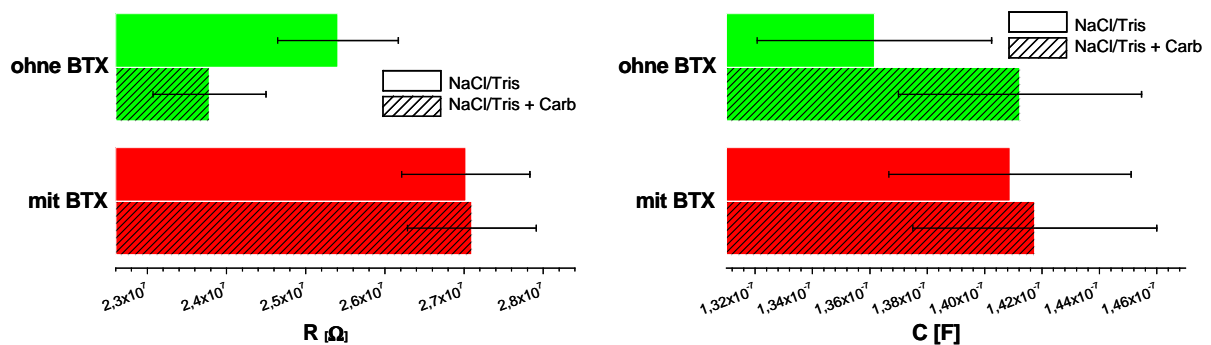


Abb. 82: Zeit-Scan des Effektes der Inhibition von nAChR mit Bungarotoxin (BTX) bei Aktivierung mit 100 μ M Carbamoylcholin an Membranfragmente mit nicotinischem Rezeptor; ohne BTX (o) und mit 100 nM BTX (o) in 100 mM NaCl/Tris. Abgebildet ist der Realteil der Admittanz Y' . Die Tabelle fasst die berechneten Werte für R_m und C_m vor und nach Aktivierung zusammen. Die Balkendiagramme verdeutlichen die Änderung von R_m und C_m , wobei der Fehlerbalken den Vertrauensbereich von 3 % angibt.

In Abb. 82 ist die Wirkung von BTX auf eine Membran mit nicotinischem Rezeptor zu sehen. Z' und Z'' zeigen zwar immer noch eine Reaktion auf die Zugabe von Carb, aber die Berechnung ergibt keine Verringerung des Widerstandes. Auch die Änderung der Leitfähigkeit, liegt deutlich unter der zuvor ohne Inhibitor beobachteten. Eine geringe Änderung der Leitfähigkeit, die noch zu erkennen ist, lässt sich damit erklären, dass die nicotinsche Rezeptoren ein Gemisch von Subtypen sind, die nicht alle im selben Maße von BTX gehemmt werden. Dies kann dazu führen, dass es zu keiner vollständigen Inhibition kommt.

5.4.4 Zusammenfassung

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse durch unterschiedliche Güte der Schichten beeinflusst wurden, wurden vier verschiedenen Messungen – Aktivierung mit spezifischem Liganden, Zugabe eines nicht-bindenden Liganden, Zugabe des spezifischen Liganden in Elektrolyt ohne permeierende Ionen, Inhibition des Proteins – an ein und derselben Schicht durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 83 zusammengestellt. Zudem ist noch die Negativ-Kontrolle an GluR5a unter aktivierenden Bedingungen abgebildet. Es zeigte sich, dass nur die Kombination von spezifischem Liganden und permeierenden Ionen ein erkennbares Absinken des Membranwiderstandes zur Folge hatte. Zudem nahm die Kapazität zu, wenn der Ligand bindet.

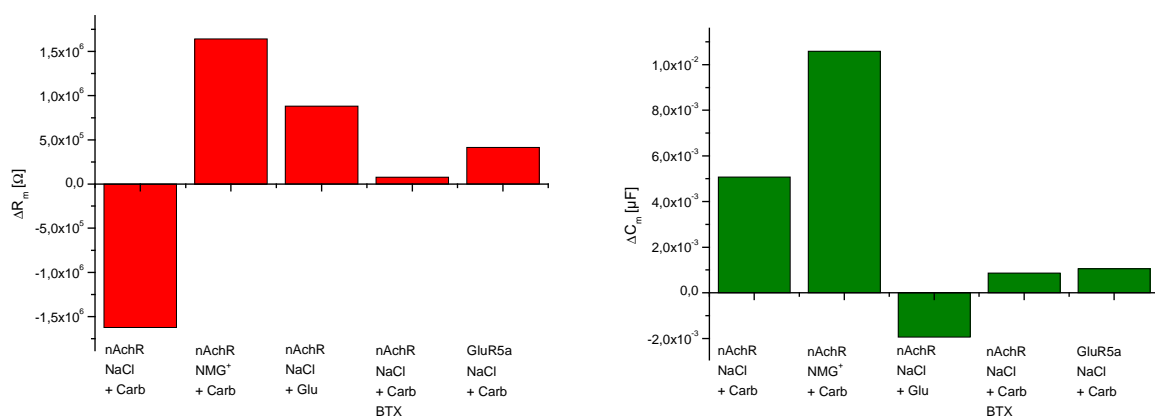


Abb. 83: Änderung von Widerstand ΔR_m und Kapazität ΔC_m wie sie aus den Zeit-Scans bestimmt wurden, bei Zugabe eines Liganden (100 μ M Carbamoylcholin oder 10 μ M Glutamat) in unterschiedlichen Elektrolyten (100 mM NaCl/Tris oder 100 mM NMG/Tris) und nach Inhibition mit 100 nM BTX. Die Versuche mit nAChR erfolgten alle auf derselben biomimetischen Schicht aus cBSA und Membranfragmenten mit nicotinischem Rezeptor. Ein Kontrollversuch erfolgte an einem separaten Ansatz mit cBSA und Membranfragmenten mit mGluR5a

Abb. 84 fasst die durchschnittlichen Änderungen von R und C an nAChRs zusammen, die bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen gemessen wurden. Dabei wird zwischen nAChRs in Torp-Mem und in Nic-Mem unterschieden, wobei bei den Torp-Mem von einer höheren Anzahl an Rezeptoren auszugehen ist. Es fiel auf, dass nur die Kombination NaCl + Carbamoylcholin (permeierende Ionen – spezifischer Aktivator) zu einem Absinken des Widerstandes führte. Der Effekt war bei den Torp-Mem stärker, was auf die größere Anzahl an nAChRs zurückzuführen ist. Auch der Anstieg der Kapazität ist bei den Torp-Mem stärker ausgeprägt. Dies kann zum einen mit der größeren Anzahl an gebundenen Liganden zusammenhängen und zum anderen mit der größeren Anzahl an geöffneten Kanälen. Wenn die Ionenkanäle Öffnen und Ionen permeieren können, dann wirken sie wie Poren in der Membran und die Gesamt-Dielektrizität der Membran steigt. Die Kapazität wird hierbei hauptsächlich bestimmt durch den Zusammenhang

$$C_m = \Theta \cdot C_{Kanal} + (1 - \Theta) \cdot C_{dl} \quad (Gl.33)$$

Wobei C_{dl} die Kapazität der isolierenden Lipiddoppelschicht ist und C_{Kanal} die Kapazität der beim öffnen der nAChRs geschaffenen Poren, deren Betrag wie bei Defektstellen größer ist als C_{dl} , und Θ der Anteil der Oberfläche, an den Ligand gebunden ist.

In NMG⁺ ist bei Zugabe von Carbamoylcholin ein deutlicher Unterschied zwischen Torp-Mem und Nic-Mem bei den Kapazitäten zu beobachten. Bei Torp-Mem sinkt die Kapazität und bei Nic-Mem steigt sie. Auch das lässt sich mit der unterschiedlichen Anzahl an Rezeptoren erklären (vgl. Abschnitt 5.4.3 (V)) und legt die Deutung nahe, dass Carbamoylcholin an die Proteine in der biomimetische Membran bindet, es aber zu keinem Ionenfluss über die Membran kommt.

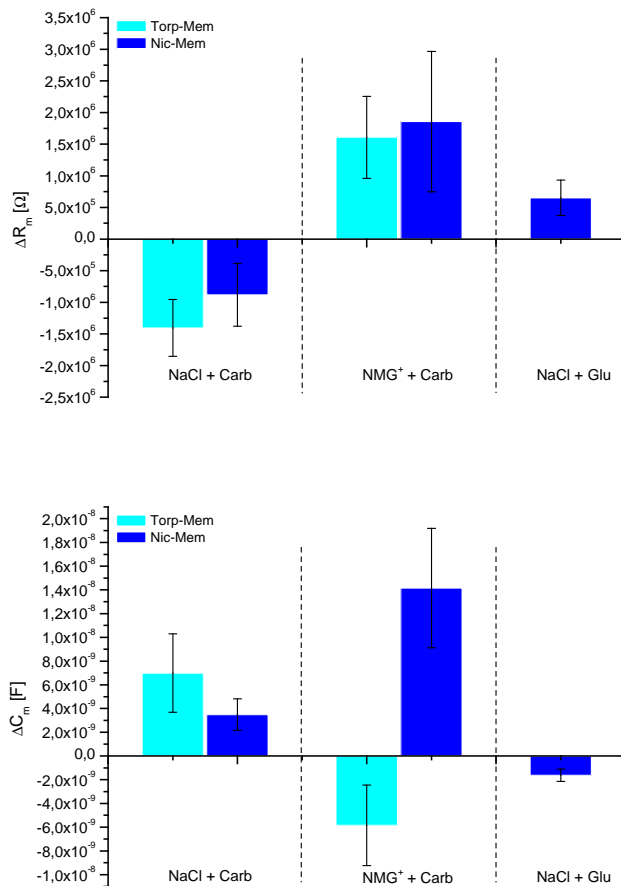


Abb. 84: Vergleich der durchschnittlichen Änderung des Widerstandes ΔR_m (oben) und der Kapazität ΔC_m (unten) wie sie aus den Zeit-Scans bestimmt wurden bei Membranfragmenten aus Torpedo (hellblau) und Membranfragmenten mit nicotinischem Rezeptor (dunkelblau) nach Zugabe von $100 \mu\text{M}$ Carbamoylcholin in 100 mM NaCl/Tris oder 100 mM NMG/Tris. Zusätzlich abgebildet ist die Änderung nach Zugabe des nicht-bindenden Liganden Glutamat in 100 mM NaCl/Tris.

5.5 *In vitro* Synthese und funktioneller Einbau des nAChR in biomimetische Membranen

Die *in vitro* Synthese (IVS) von Proteinen ermöglicht die gezielte Herstellung bestimmter Proteine. Im Gegensatz zur *in vivo* Synthese erlaubt die IVS daher die Untersuchung eines einzigen Rezeptor-Subtyps ohne die Störung durch intrinsische Rezeptoren und Kanäle wie sie in Zelllinien und Membranpräparationen vorkommen.

Allerdings ist es diffizil für die jeweiligen Proteine die geeigneten Synthesebedingungen zu finden. Gerade MPs haben oft einen komplizierten Syntheseweg, der das Vorhandensein spezifischer Cofaktoren oder eine Vielzahl co- bzw. post-translationaler Modifikationen erfordert. ^{[77]-[79]}

Wenn die IVS von MPs in ein Chipsystem integriert werden soll, setzt dies zum einen voraus, dass die IVS in der Chipumgebung erfolgreich durchgeführt werden kann und zum andern, dass sich das entsprechende Protein auch *in vitro* synthetisieren lässt.

5.5.1 Anwendbarkeit der IVS in mikrofluidischen Chipsystemen

Es stellt sich die Frage, ob die IVS durch die geometrischen Bedingungen oder die Materialeigenschaften des mikrofluidischen Chips beeinträchtigt wird. Das Oberflächen-zu-Volumen Verhältnis (O/V) könnte einen Einfluss auf die Effizienz der IVS haben. Bei Standard Reaktionsgefäßen mit 1,5 ml beträgt das O/V etwa 1,5:1. Im verwendeten mikrofluidischen Chipsystem ist das O/V etwa 10x größer und liegt bei ca. 15:1.

Um die Eignung des mikrofluidischen Chipsystem für die IVS zu untersuchen, wurde ein Kontrollexperiment mit Luciferase durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.5 (F)). Bei der Luciferase handelt es sich um ein lösliches Protein (61 kDa), dass bei Zugabe von Luminol leuchtet und dessen enzymatische Aktivität keine post-translationale Prozessierung oder Modifikation erfordert. Die Aktivität kann somit über eine direkte Chemilumineszenzmessung im optisch transparenten Chipsystem erfolgen. Die Intensität der Lumineszenz erlaubt eine qualitative Abschätzung der Effektivität der IVS.

Die IVS wurde als 50 µl Ansatz in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt und in 2 x 25 µl aufgeteilt. Ein 25 µl-Ansatz wurde vor der Inkubation in den Chip gefüllt der andere wurde im Reaktionsgefäß inkubiert. Die Reaktionskammer des Chips hat mit nicht ganz 2,1 µl ein wesentlich geringeres Volumen als die verbliebenen 25 µl des Standard-IVS Ansatzes. Um

trotzdem Menge und Geometrie der Probe vergleichbar zu halten, wurde ein Teil des im Reaktionsgefäß inkubierten Ansatzes vor dem Lumineszenz-Nachweis ebenfalls in eine Reaktionskammer des Chips gefüllt. Die IVS wurde im Chip sowohl mit als auch ohne Zugabe von cDNA durchgeführt.

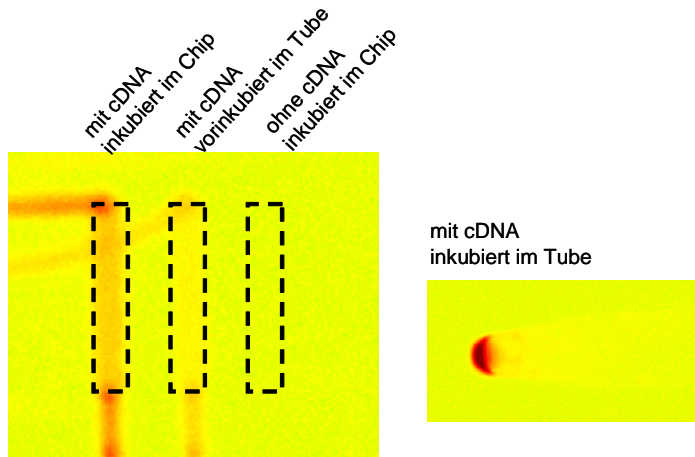


Abb. 85: Chemilumineszenz-Aufnahme der Luciferase-Aktivität von links: Luciferase im Chip *in vitro* synthetisiert, Luciferase im Reaktionsgefäß *in vitro* synthetisiert, Kontrolle IVS-Mixtur ohne cDNA; die Luciferase Assay Reagenz wurde bereits während der Synthese zugesetzt. Das rechte Bild zeigt den Rest des Ansatzes im Reaktionsgefäß. Belichtet mit LAS3000, FujiFilm

Die Aktivität der im Chip synthetisierten Luciferase ist deutlich stärker als die der vorinkubierten Kontrolle im selben Volumen (Abb. 85). Dies deutet auf eine höhere Effizienz der IVS im mikrofluidischen Chipsystem hin.

5.5.2 *In vitro* Synthese des $\alpha 7$ nAChR

Als Modellsystem für einen liganden gesteuerten Ionenkanals diente der $\alpha 7$ Subtyp des nAChR. Das Ausgangsmaterial für die IVS war die cDNA von $\alpha 7$ aus Maus (Chrna7; GenBank Accession Number NM_007390) im Plasmid TNT (Promega), die am MPI für Biochemie, Martinsried kloniert wurde. Für einen erleichterten Nachweis mittels Antikörpern wurde der cDNA des Proteins eine Sequenz angefügt, die einen VSV-Tag (Vesiculäres Stromatitis Virus) codiert. Es lagen zwei verschiedene Varianten der DNA vor – bei einer war der VSV-Tag am N-terminalen Ende des Proteins (pTNT- $\alpha 79$ -N-VSV) beim anderen am C-terminalen (pTNT- $\alpha 79$ -C-VSV).

Ein Restriktionsverdau der Plasmid-DNA mit NcoI und NotI und anschließende Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Abb. 86) zeigte, dass zwei unterschiedliche Varianten vorlagen deren Bandenmuster mit den theoretischen Größen übereinstimmte (1548 bp für VSV Tag am C-terminalen Ende bzw. 1837 bp für VSV-Tag am N-terminalen Ende). Eine Sequenzanalyse (GENterprise, Mainz) bestätigte, dass es sich bei dem eingefügten Insert tatsächlich um die für den $\alpha 7$ nAChR codierende Sequenz handelte.

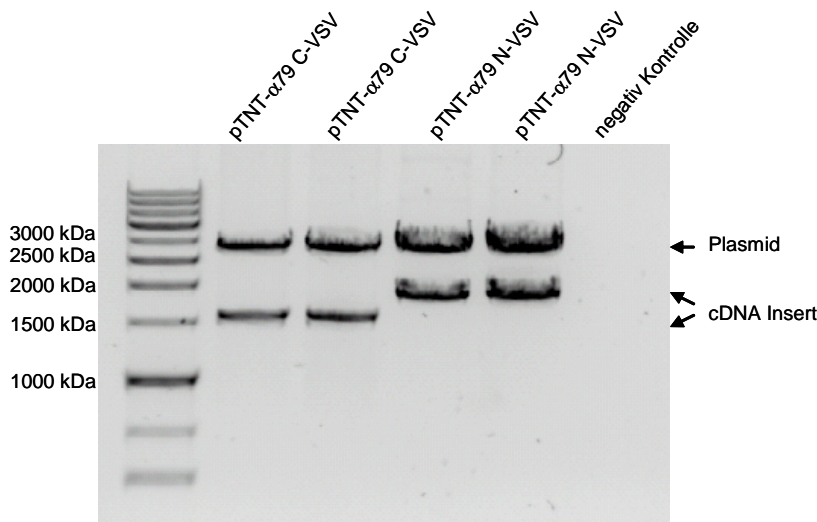


Abb. 86: Agarose-Gelelektrophorese (1%iges Gel in TAE-Puffer gefärbt mit SyberSAFE) der Plasmid-DNA nach Restriktionsverdau. von links: Marker Hyper Ladder III, 2x pTNT mit cDNA $\alpha 79$ -C-VSV, 2x pTNT mit cDNA $\alpha 79$ -N-VSV, negativ Kontrolle ohne cDNA.

Vor einer Untersuchung der Funktionalität wurde zunächst die Existenz des Proteins nachgewiesen.

Ein etabliertes Verfahren zum Proteinnachweis ist die Gelelektrophorese (SDS-PAGE Abschnitt 4.5 (B)). Der eigentliche Nachweis kann z.B. über Antikörper-Bindung oder Radioaktiv-Markierung erfolgen. Dabei hat die Radioaktiv-Markierung die niedrigere Detektionsschwelle. Zudem wird das Problem der unspezifischen Bindungen von Antikörpern umgangen. Bei der Radioaktiv-Markierung von *in vitro*-synthetisiertem Protein wird dem IVS-Reaktionsansatz radioaktives Methionin ($[^{35}\text{S}]\text{Methionin}$) zugegeben, welches in das Protein eingebaut wird.

Getestet wurde dabei die Expression in zwei unterschiedlichen IVS-Systemen, einem Retikulozyten-Extrakt aus Kaninchen Blut (RetEx) und einem Zellextrakt aus *E.coli* (EcEx). Das Säugetier-System wurde verwendet, da es sich bei dem verwendeten nAChR ebenfalls um ein Protein aus einem Säugetier handelt. Zudem ist bekannt, dass das RetEx im Gegensatz zum EcEx Signal Recognition Particels (SRPs) enthält, die für die Expression von nAChR benötigt werden. Das EcEx wurde verwendet, da es sich gezeigt hatte, dass viele nicht bakterielle Proteine im prokariotischen System expremiert werden.

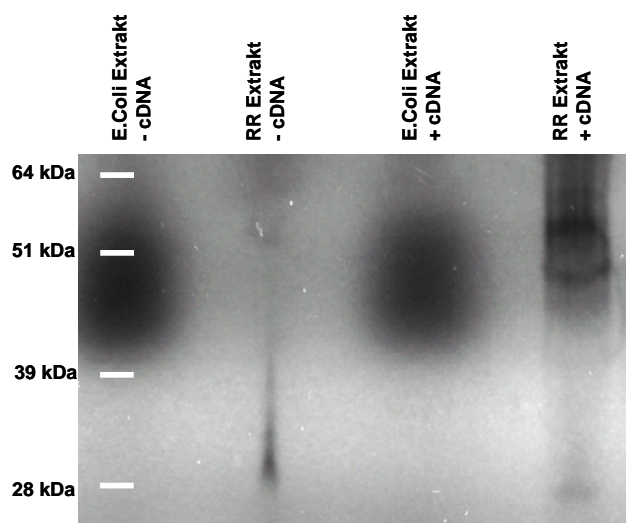


Abb. 87: Radioaktiv-Plot der IVS von $\alpha 7$ -nAChR in verschiedenen Expressionssystemen (Retikulozytenlysate (RR) und *E.coli* Extrakt) mit und ohne cDNA, die IVS erfolgte gemäß dem Standardprotokoll, wobei jedem Ansatz $1 \mu\text{l}$ ^{35}S -Methionin ($10 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) zugegeben wurde. Marker: SeeBlue Plus

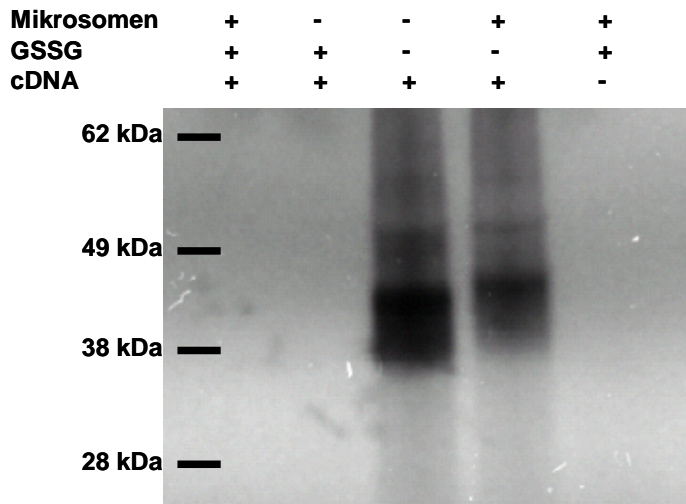


Abb. 88: Radioaktiv-Plot der IVS von $\alpha 7$ nAChR im Retikulozyten Expressionssystem bei unterschiedlichen Bedingungen. 17 μ l TNT MasterMix, 0,5 μ l 35 S-Methionin (10 μ Ci/ μ l), 1,5 μ g cDNA, 1,5 μ l canine Pankreas-Mikrosomen, 2 mM GSSG, mit nuclease freiem Wasser auf 25 μ l auffüllen. Zugabe (+), keine Zugabe (-). Marker: SeeBlue Plus

Abb. 87 zeigt einen Radioaktiv-Plot der IVS von nAChR in den beiden Expressionssystemen. Die Synthese von nAChR konnte mittels radioaktiver Markierung nur im RetEx nachgewiesen werden. Allerdings ist dabei zu bedenken, dass der EcEx im Gegensatz zum RetEx bereits Methionin enthält, so dass nicht gewährleistet ist, dass auch wirklich [35 S]Methionin in ein expremiertes Protein eingebaut wird.

Im EcEx findet sich sowohl in der positiv wie auch in der negativ Kontrolle eine ausgedehnte unspezifische Bande im Bereich zwischen 40 und 50 kDa. Die Ursache ist nicht gänzlich klar. Vermutlich handelt es sich dabei um ein Expressionssystem spezifisches Phänomen. Das freie Methionin lagert sich an irgendeine Komponente des Zellextrakts an. Zudem überlagert diese Färbung auch eventuelle Proteinbanden die bei 54 kDa, 44 kDa oder 41 kDa für $\alpha 7$ -Monomere zu erwarten wären.^{[70],[72]}

Im RetEx sieht zeigt sich dagegen ein deutlicher Unterschied zwischen den Proben mit und ohne cDNA. Mit cDNA sind Banden bei ungefähr 44 kDa und 54 kDa zu sehen. Zudem erscheint eine Bande bei 28 kDa. Dabei könnte es sich um ein Abbauprodukt handeln.

Abb. 88 zeigt einen Radioaktiv-Plot von *in vitro*-synthetisiertem nAChR unter verschiedenen Bedingungen: Mit und ohne Zugabe von caninen Pancreas-Mikrosomen die post-translationale Modifikationen ermöglichen und unter Zugabe von Glutathion (GSSG), um das Redoxpotential zu erhöhen, was einen Einfluss auf die Bildung von Disulfidbrücken hat.

Im Gegensatz zu früheren Arbeiten^[70], wurde bei Zugabe von GSSG keine Expression beobachtet. Dies könnte daran liegen, dass für die gewählten IVS-Ansätze die GSSG

Konzentration und damit die oxidierenden Bedingungen noch optimiert werden müssen – diese Proben werden daher im Folgenden nicht weiter diskutiert. Ohne GSSG ließ sich der nAChR jedoch nachweisen.

Die Bande bei etwa 51 kDa entspricht dabei dem ungeschnittenen, nicht glykosilierten Protein. Sie findet sich in beide Proben (Spalte 3 und 4), erscheint ohne Zugabe von Mikrosomen jedoch etwas stärker. Das Abschneiden der Signalsequenz erfordert Signal Recognition Particels (SRPs). SRPs sind im RetEx vorhanden. Ihre Funktion erfordert allerdings ein Anlagern an Membrane.

Das vollständig prozessierte Protein (geschnitten und glykosiliert) ist bei etwa 44 kDa zu erwarten. Im RetEx mit Mikrosomen findet sich eine stärkere Bande, die dieser Größe entspricht. Ohne Zugabe von Mikrosomen findet sich noch eine Bande geringerer Größe (ca. 41 kDa). Dabei könnte es sich um eine geschnittene, unglykosilierte Form des nAChR handeln. Da der nAChR in SDS-PAGEs ein unnatürlich schnelles Laufverhalten zeigt und auch die Markerbanden nicht exakt sind, sind die tatsächlichen Größen der Fragmente nicht exakt benennbar und somit auch nicht eindeutig ihren Synthesestadien zuzuordnen. Was sich jedoch gezeigt hat, ist dass im reinen IVS-Mix anscheinend nur eine teilweise post-translationale Modifizierung stattfindet. Ein Teil des expremierten Proteins wird nicht vollständig prozessiert. Allerdings scheint auch ohne Zugabe von Mikrosomen eine Synthese von vollständig gereiftem Protein (44 kDa) möglich.

In jedem Fall jedoch lässt die Existenz des Proteins alleine aber noch keinen gesicherten Rückschluss auf seine Funktionalität zu.

5.5.3 *In vitro* Synthese und funktioneller Einbau des nAChR in biomimetische Membranen

Im Bezug auf den Einbau von *in vitro* synthetisiertem Protein hat jede der vorgestellten biomimetischen Membranen Vor- und Nachteile.

tBLM aus DPTL-Monolagen und Vesikel-Spreitung:

Die Erzeugung einer planaren Lipidschicht definiert zwei eindeutige Elektrolytkompartimente. Dadurch erfolgt ein gerichteter Transport der Ionen, ohne dass vesikuläre Zwischenräume bei der Ladungsverteilung beteiligt sind. Die feste Verankerung der Monolage liefert eine stabile Membran. Auf der anderen Seite kann der dichte Spacer den

Einbau des Proteins behindern und zu einem verringerten Ionenreservoir führen. Außerdem hatte es sich gezeigt, dass die Reproduzierbarkeit der Schichten nur eingeschränkt erreicht werden kann, so dass vergleichende Messungen erschwert werden.

hBLM/SSM aus angelagerten Vesikeln auf ODT/DPhyPC:

Der hohe Widerstand R_m erlaubt bereits die Detektion geringer Änderungen der Leitfähigkeit. D.h. wenige gleichzeitig aktive Proteine würden ausreichen, um ein eindeutig unterscheidbares Signal zu erzeugen. Auf der anderen Seite führt der hohe Widerstand auch zu einer niedrigen charakteristischen Frequenz (teilweise < 10 mHz), was lange Messzeiten und damit einen zunehmenden Einfluss der Diffusion bedeutet. Außerdem beeinträchtigt die Verwendung von Lösungsmitteln die Integrität der Klebeverbindung zwischen Chip und Elektroden-Array. Der restliche Lösungsmittelanteil in der hBLM kann einen Einfluss auf Struktur und Funktion inkorporierter Proteine haben.

pcBLM aus BSA mit angelagerten Vesikeln:

Die pcBLMs ließen sich gut reproduzieren und zeigten bei den Messungen mit Membranpräparationen, dass sie sich grundsätzlich für die Detektion von MPs eignen. Die sehr einfache und gut kontrollierbare Präparationsmethode ist ein Vorteil für Screening-Anwendungen im größeren Umfang. Allerdings bedeuten die gegenüber den hBLM/SSM niedrigeren Widerstandswerte R_m , dass eine größere Anzahl aktiver Ionenkanäle vorhanden sein muss, um ein vergleichbares Signal zu erzeugen.

BCP:

Sie sind hoch stabil und können mit großer Reproduzierbarkeit auf die Oberfläche aufgebracht werden. Allerdings bieten diese Schichten kein Ionenreservoir. Die amphiphilen Schichten aus BCPs sind dicker als die Lipiddoppelschicht der Zellmembranen. Daher muss sich noch zeigen, ob ein funktioneller Einbau von größeren MPs wie dem nAChR in diese Schichten überhaupt möglich ist.

Die Versuche zur IVS wurden in allen Membransystemen gemäß den Protokollen in Kapitel 4.5 (F) vorgenommen. Aber nur bei den Schichten in denen ein positives Signal bei Aktivierung gemessen werden konnte, wurde eine genauere Charakterisierung vorgenommen. Der Nachweis der Existenz von nAChR erfolgte mittels Antikörper und Chemilumineszenz direkt im mikrofluidischen Chip oder mittels Oberflächenplasmonen-

Fluoreszenzspektroskopie (SPFS) in der Flusszelle. Die Messungen der Aktivität erfolgten mit Zeit-Scans.

Zudem wurde mit EIS untersucht, ob die Inkubation in Anwesenheit des Zellextraktes einen Einfluss auf die Integrität der biomimetischen Membranen hatte. In den Zellextrakten befinden sich Membranfragmente der Präparation, die mit den Schichten interagieren und sich an diese anlagern können. Möglicherweise dringt der Zellextrakt auch in die biomimetische Membran und verändert die Dielektrizitätskonstante der Schichten.

(A) IVS von $\alpha 7$ nAChR in eine tethered Bilayer Lipid Membrane (tBLM)

Die tBLMs aus DPTL zeigten am deutlichsten eine stark ausgeprägte Spacerregion in den Impedanz-Scans. Daher ist bei diesen Schichten mit der deutlichsten Veränderung insbesondere der C_{sc} Elemente bei Zugabe des IVS zu rechnen. Es wurde untersucht, ob die Zugabe der iv-Mixtur einen Einfluss auf die Membranintegrität hat. Abb. 89 zeigt drei Messungen an einer tBLM aus einer Monolage DPTL und gespreiteten PC-Vesikel nach der Inkubation mit Zellextrakt ohne cDNA. Das System wurde nach der Inkubation mit Puffer bei Raumtemperatur gespült und equilibrieren gelassen, so dass ein Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Impedanzmessung ausgeschlossen werden konnte. Die Messungen erfolgten in einem Zeitraum von 20 h.

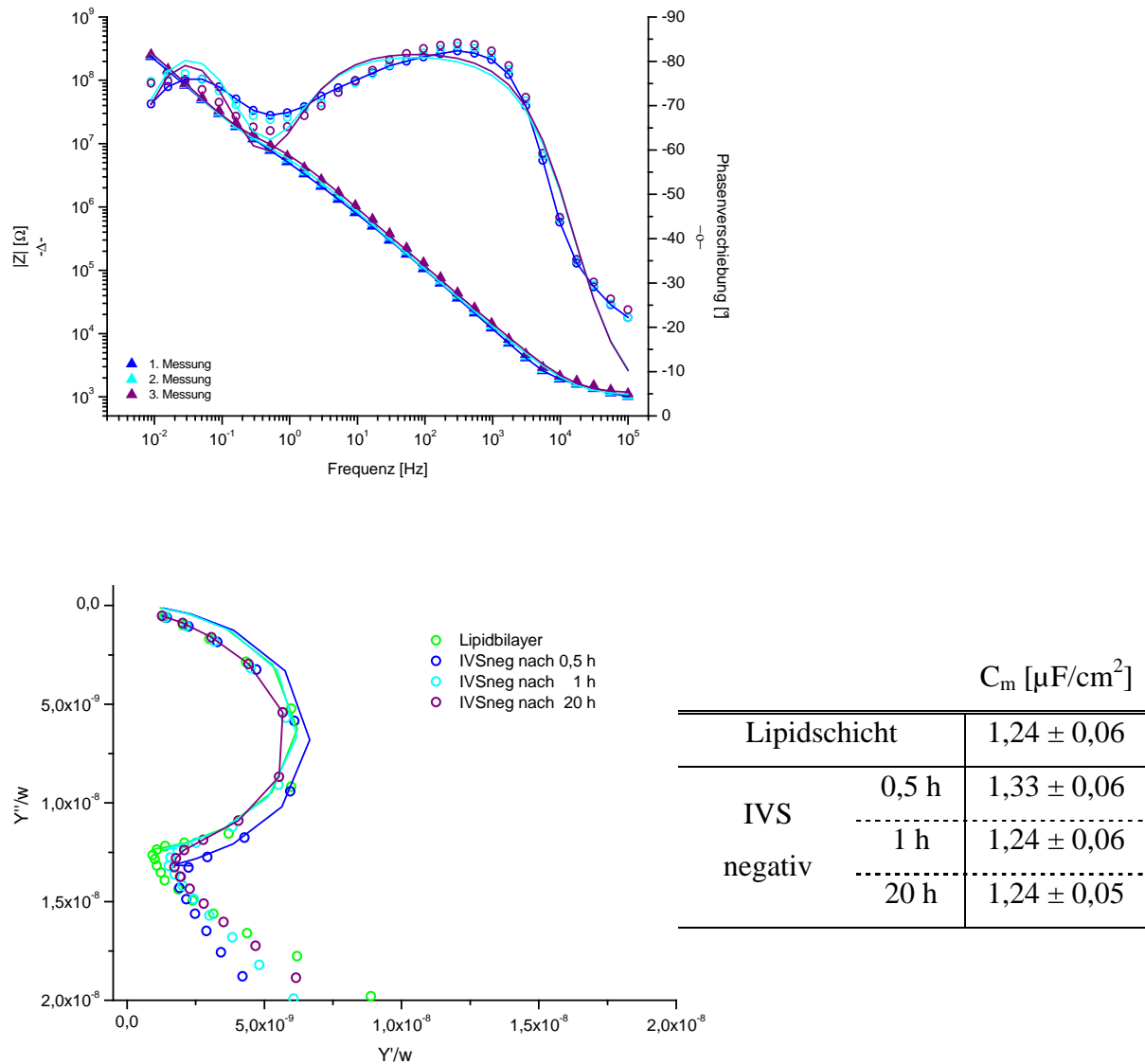


Abb. 89: Einfluss der IVS-Mixtur ohne cDNA auf eine tBLM aus DPTL und PC; Bode-Plot (oben) und frequenzreduzierter Admittanz-Plot (unten) mit Fitkurven (durchgehende Linie). Die Tabelle fasste die Membrankapazitäten C_m und ihre Fitgenauigkeit zusammen, die aus dem hoch-frequenten Bereich des Admittanz-Plots bestimmt wurden.

Einen Hinweis darauf, ob die Integrität der Membran erhalten bleibt, liefert die Kapazität der Membran C_m . Dafür wurde der hochfrequente Bereich der Messung näher betrachtet, aus dem sich C_m bestimmen lässt (vgl. 4.1.2.1) und mit einem R(RC) Ersatzschaltbild angefitet. Nach der IVS ist die Kapazität zunächst größer als zuvor. Eine Zunahme der Kapazität bei einer zuvor stabilen Membran deutet auf die Entstehung von Defektstellen hin. Da die Kapazität jedoch wieder auf ihren Ausgangswert zurückging, hat sich die Membran, z.B. durch Lipidumlagerungen, regeneriert. Die Zugabe des IVS-Extrakts führt also zu keiner dauerhaften Schädigung der tBLM.

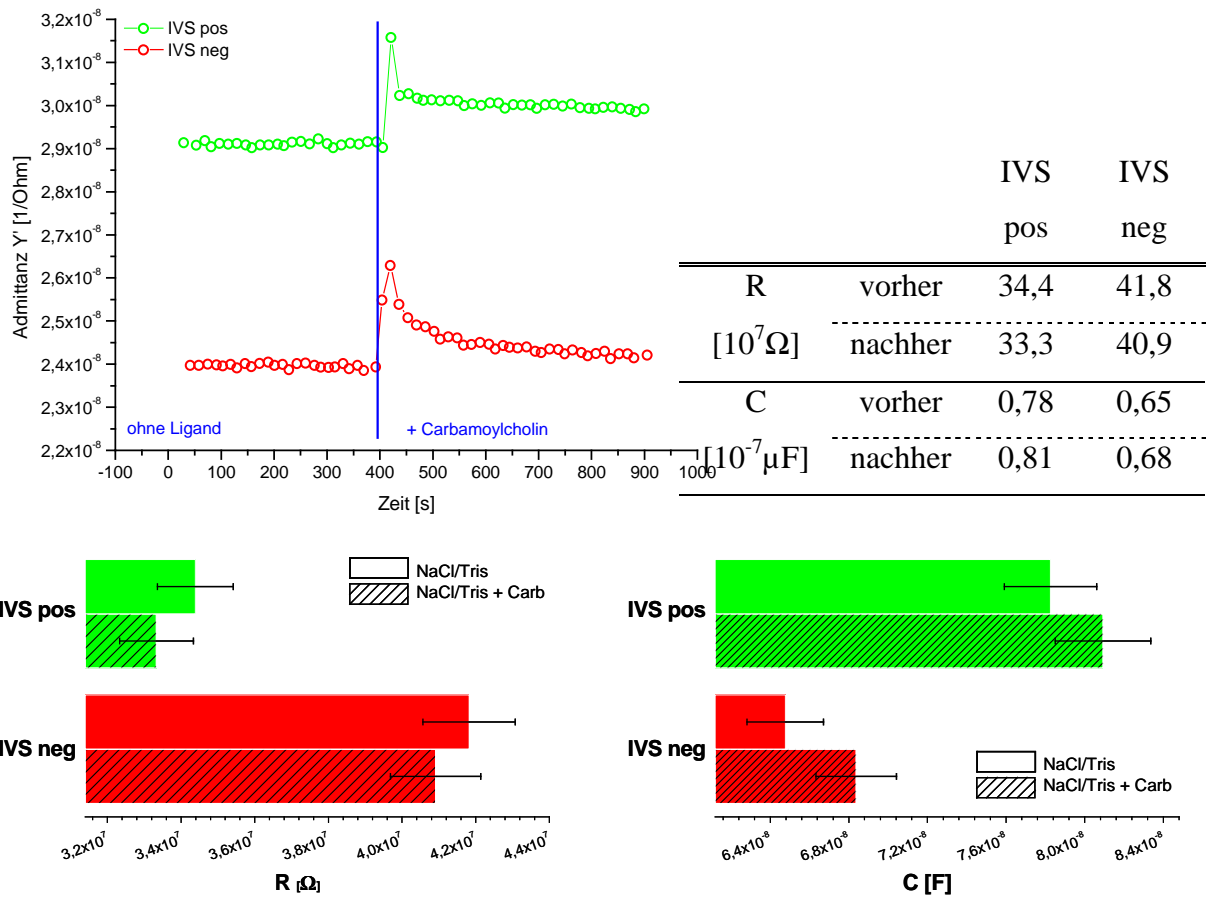


Abb. 90: Zeit-Scan der Aktivierung 100 μM Carbamoylcholin an tBLM aus DPTL und PC nach IVS mit cDNA (\circ) und ohne cDNA (\circ) in 100 mM NaCl/Tris. Abgebildet ist der Realteil der Admittanz Y' . Die Tabelle fasst die berechneten Werte für R_m und C_m vor und nach Aktivierung zusammen. Die Balkendiagramme verdeutlichen die Änderung von R_m und C_m wobei der Fehlerbalken den Vertrauensbereich von 3 % angibt.

Die Time Scans an IVS in tBLMs mit ohne Zugabe von cDNA zeigen eine ähnliche Änderungen der Leitfähigkeit bei Aktivierung (Abb. 90). Bei den errechneten Werten für R_m und C_m lässt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen positiv und negativ Probe feststellen.

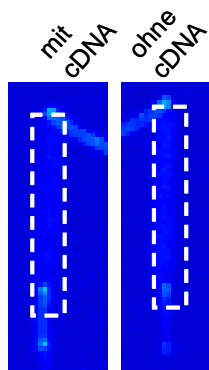


Abb. 91: Chemilumineszenz-Aufnahme der Antikörpermarkierung nach IVS von nAChR im Kaninchen Retikulozytenlysate in tBLM aus DPTL und PC mit und ohne cDNA im mikrofluidischen Chipsystem. Nachweis mittels monoklonale Antikörper Anti-VSV aus Maus

Auch die Kontrolle mit Antikörpermarkierung (Abb. 91) weist keinen deutlichen Unterschied zwischen dem positiven und dem negativen Ansatz auf.

IVS von $\alpha 7$ -nAChR in eine hybrid Bilayer Lipid Membrane / Solid Supported Membrane (hBLM/SSM)

Zum Nachweis von *in vitro* synthetisiertem nAChR in den SSMs wurde die Bindung eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpers mittels SPFS nachgewiesen. Dazu wurde als erstes eine hBLM/SSM (ODT / DPhyPC – PC-Vesikel) wie in Abschnitt 4.4 (C) beschrieben in der SPR-Flusszelle präpariert. Die Detektion erfolgte dann mit einer zweifachen Antikörperbindung. Als erster Antikörper wurde ein monoklonaler Antikörper aus Maus gegen den VSV-Tag (1:100 in PBS) verwendet. Der zweite Antikörper war ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff CY5 gekoppelter Anti-Maus Antikörper. Eine schematische Darstellung der Antikörperbindung ist in Abb. 92 zu sehen.

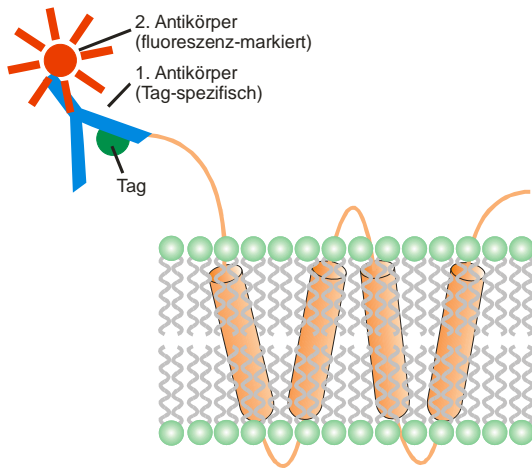


Abb. 92: Schematische Darstellung der Antikörper-Bindung bei einer SPFS-Messung

Es lag eine Variante der cDNA vor mit dem Tag am N-Terminus und eine mit dem Tag am C-Terminus. Da sich aber beide Enden des Proteins auf derselben Seite der Membran befinden, lässt sich über die unterschiedlichen Varianten keine Aussage zur Orientierung des Proteins in der biomimetischen Membran machen.

Abb. 93 zeigt SPFS Scans an einer hBLM/SSMs. Die IVS erfolgte in der Flusszelle für 90 min bei 30°C.

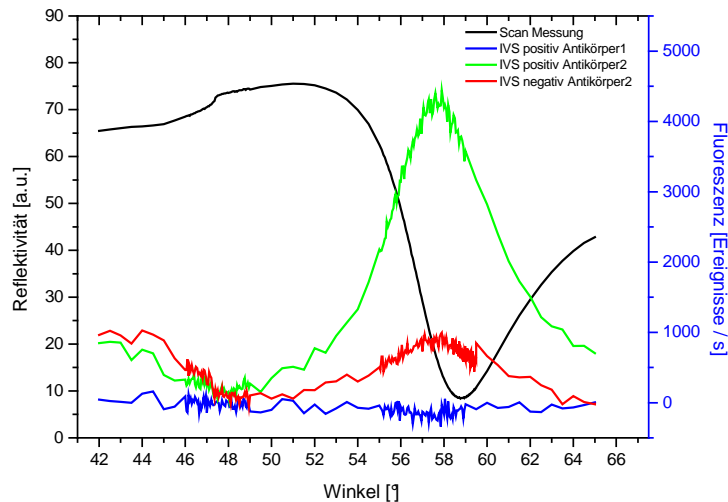


Abb. 93: SPFS-Scans an hBLM/SSMs aus ODT, DPhyPC und PC-Vesikeln nach IVS mit (grün) und ohne (rot) cDNA. Nach Präparation der Membran wurde die Oberfläche erst mit Blocking Solution (vgl. Protokoll im Anhang) für 30 min inkubiert, spülen mit PBS (0,1 μ l/min für 10 min), 1. Antikörper monoklonaler Anti-VSV aus Maus für 90 min inkubiert, spülen mit PBS (0,1 μ l/min für 10 min), 2. Antikörper Anti-Maus Cy5 markiert für 15 min inkubiert, spülen mit PBS (0,1 μ l/min für 10 min). Zusätzlich ist ein SPFS-Scan nach Inkubation mit dem 1. Antikörper (blau) zu sehen.

Die Fluoreszenz ist bei cDNA-Zugabe im Vergleich zur negativ Kontrolle sichtbar erhöht.

Die SSM ließen sich auf Grund ihres Lösungsmittelanteils, der das Material des Chips angriff im mikrofluidischen System schlecht reproduzieren. Zudem ließ die Dichtigkeit des Chips mit der Zeit nach. Dieses Phänomen wurde bei den anderen Membran-Architekturen nicht in dieser Form beobachtet und wird ebenfalls auf das Lösungsmittel zurückgeführt. Die SSM-Schicht erwies sich daher mit dem vorliegenden Präparationsverfahren als nicht geeignet für die IVS, da die Integrität des Systems über einen längeren Zeitraum nicht gegeben war.

IVS von $\alpha 7$ nAChR in Block-Copolymeren (BCP)

Die biomimetischen Schichten aus BCP wurden wie in Abschnitt 4.4 (D) beschrieben präpariert. Der Nachweis der Proteinsynthese erfolgte mittels Antikörpermarkierung (vgl. Abb. 94). Dabei konnte der nAChR bei Verwendung des RetEx nicht nachgewiesen werden. Bei Verwendung des EcEx war ein deutlicher Unterschied zwischen dem Ansatz mit und dem Ansatz ohne cDNA zu erkennen.

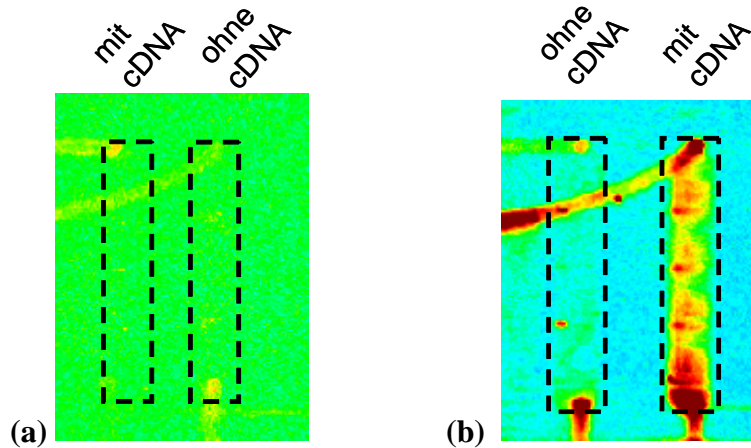
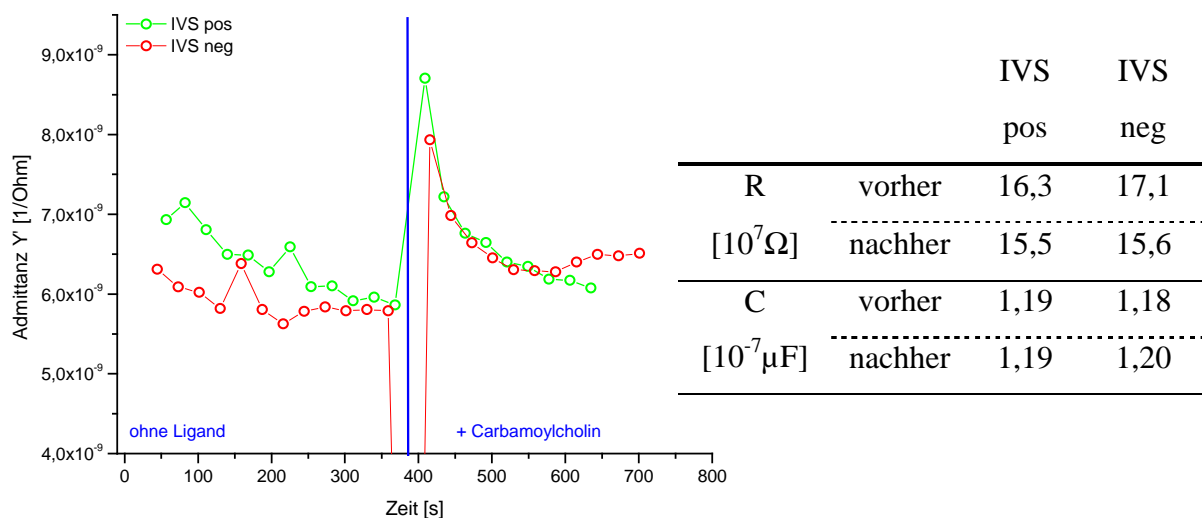


Abb. 94: Chemilumineszenz-Aufnahme der Antikörpermarkierung nach IVS von nAChR in biomimetischen Membranen aus BCP mit und ohne cDNA im mikrofluidischen Chipsystem; durchgeführt in unterschiedlichen Expressionssystemen: Retikulozytenlysate (a), E.coli Extrakt (b). 1. Antikörper monoklonale Anti-VSV aus Maus

In den Zuläufen ist im EcEx ebenfalls Chemilumineszenz in der positiven Probe zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass sich die BCPs nicht nur auf den Elektroden, sondern auch am Polymer des Chips anlagern. Innerhalb der Reaktionsräume ist allerdings ein deutlicher Unterschied zwischen den Elektrodenflächen und den Räumen dazwischen zu erkennen. Es findet also kein Aufbau einer biomimetischen Schicht auf dem isolierenden SU8 statt, so dass die Elektroden weiterhin separiert bleiben und keine überspannende Membran entsteht.

Da bei Verwendung des RetEx keine Expression beobachtet werden konnte, wurden die Aktivitätsmessungen mit dem bakteriellen Expressionssystem durchgeführt.



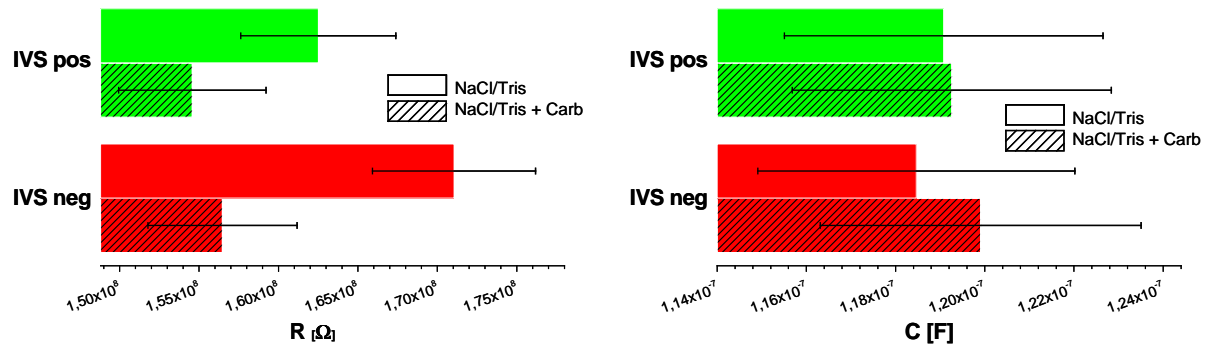
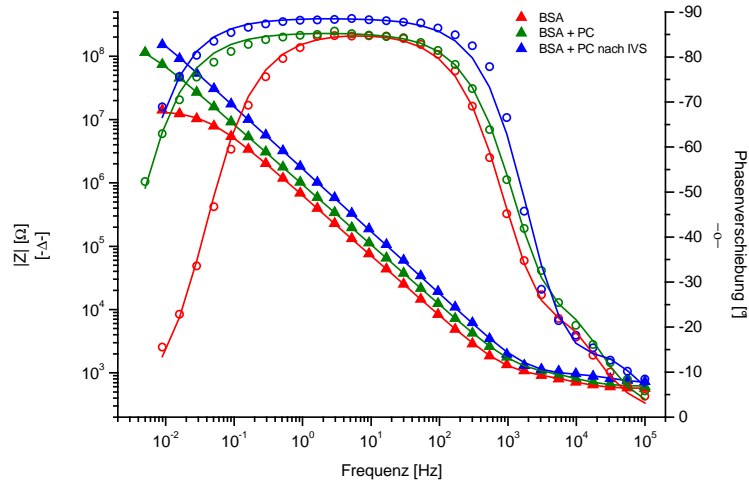


Abb. 95: Zeit-Scan der Aktivierung $100 \mu\text{M}$ Carbamoylcholin an biomimetischen Membranen aus BCP nach IVS mit cDNA (o) und ohne cDNA (o) in 100mM NaCl. Abgebildet ist der Realteil der Admittanz Y' . Die Tabelle fasst die berechneten Werte für R_m und C_m vor und nach Aktivierung zusammen. Die Balkendiagramme verdeutlichen die Änderung von R_m und C_m , wobei der Fehlerbalken den Vertrauensbereich von 3 % angibt.

In Abb. 95 ist die Leitfähigkeit einer funktionalisierten BCP Schicht bei Aktivierung mit NaCl + Carb im Vergleich zur negativ Kontrolle (IVS ohne Zugabe von cDNA) zu sehen. Sowohl die positiv als auch die negativ Probe zeigte die gleiche Reaktion auf die Zugabe des Liganden. Die IVS Proben reagierten nach Durchführung der IVS stets mit einem Absinken des Widerstandes auf die Zugabe von Carbamoylcholin – unabhängig davon, ob Proteinsynthese und –einbau stattfinden konnten oder nicht. Dies deutet nicht darauf hin, dass in BCP Schichten mit EcEx funktionelle nAChRs expremiert werden konnten.

IVS von $\alpha 7$ nAChR in eine peptid cushioned Bilayer Lipid Membranes (pcBLM)

Wie in Kapitel 5.2.2 gezeigt war bei pcBLMs aus cBSA und Phosphatidylcholin-Vesikeln keine vollständige Bedeckung gegeben. Der Widerstand über die biomimetische Schicht war zwar hoch, aber die ebenfalls hohe Kapazität von über $20 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ zeigte an, dass es sich um keine defektfreie planare Membran handelte. Dies bedeutet, dass es keine undurchlässige Trennschicht zwischen Spacer-Region und IVS-Mixtur gibt. Bestandteile der IVS-Mixtur konnten in Kontakt mit dem BSA gelangen.



	R_m [$M\Omega \cdot cm^2$]	C_m [$\mu F/cm^2$]
BSA	0,14	29,5
BSA + PC	1,9	22,5
BSA + PC nach IVS	4,2	10,4

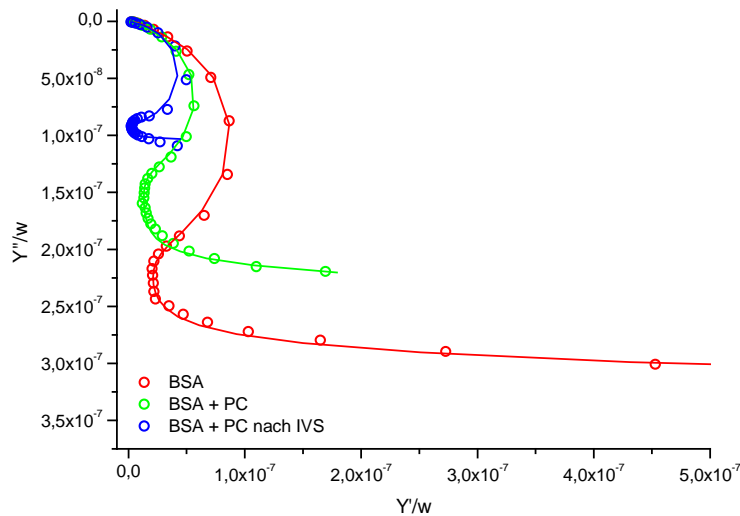


Abb. 96: Einfluss der IVS-Mixtur ohne cDNA auf eine pcBLM aus BSA und PC-Vesikeln; Bode-Plot (oben) und frequenzreduzierter Admittanz-Plot (unten) mit Fitkurven (durchgehende Linie). Die Tabelle fasste den Membranwiderstand R_m und die Membrankapazitäten C_m sowie ihre Fitgenauigkeit zusammen

In Abb. 96 wird der Einfluss des IVS-Mixtur auf die Charakteristik der biomimetischen Schicht deutlich. Es fällt auf, dass die Kapazität sank und der Widerstand stieg. Dies ließ sich damit erklären, dass Membranfragmente oder andere Bestandteile wie Proteine im Zellextrakt an das BSA anlagern. Diese zeigten dann dasselbe Verhalten wie die Membranfragmente aus Kapitel 5.3.2 und die PC-Vesikel, mit denen die Schichten aufgebaut werden. Da es sich bei

den Membranfragmenten ebenfalls um Lipidkompositionen handelt ist diese Ergebnis nicht verwunderlich. Ein weiterer Grund für die Zunahme von R_m könnte darin liegen, dass die angelagerten PC-Vesikel ihren Zustand veränderten. Die IVS-Mixturen können in ihrer Osmolarität von PBS – worin die Vesikel präpariert und angelagert wurden – abweichen. Dies kann zu einer fortgesetzten Fusion der Vesikel führen, die noch eine zeitlang anhält, bis sich die Schicht wieder stabilisiert.

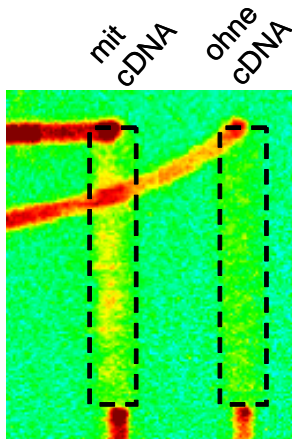


Abb. 97: Chemilumineszenz-Aufnahme der Antikörpermarkierung nach IVS von nAChR im Kaninchen Retikulozytenlysat in pcBLM aus cBSA und PC-Vesikeln mit und ohne cDNA im mikrofluidischen Chipsystem.
1. Antikörper monoklonale Anti-VSV aus Maus

Der im RetEx *in vitro* synthetisierte nAChR konnte in der positiv Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 97). Die Aufnahmen deuten darauf hin, dass sich die Anlagerung von Vesikeln und damit die Möglichkeit zur Inkorporation des Proteins nicht nur auf den Gold-Elektroden abspielte, sondern ebenfalls auf den Gegenelektroden sowie in den Zuläufen. Aber auch hier war keine Antikörper-Bindung in den Bereichen zwischen den Elektroden, die mit SU8 isoliert sind, zu finden. Das bedeutet, dass die Elektroden auch nach Aufbringen der biomimetischen Membranen von einander separiert bleiben und keine Elektroden übergreifende Bedeckung erfolgt.

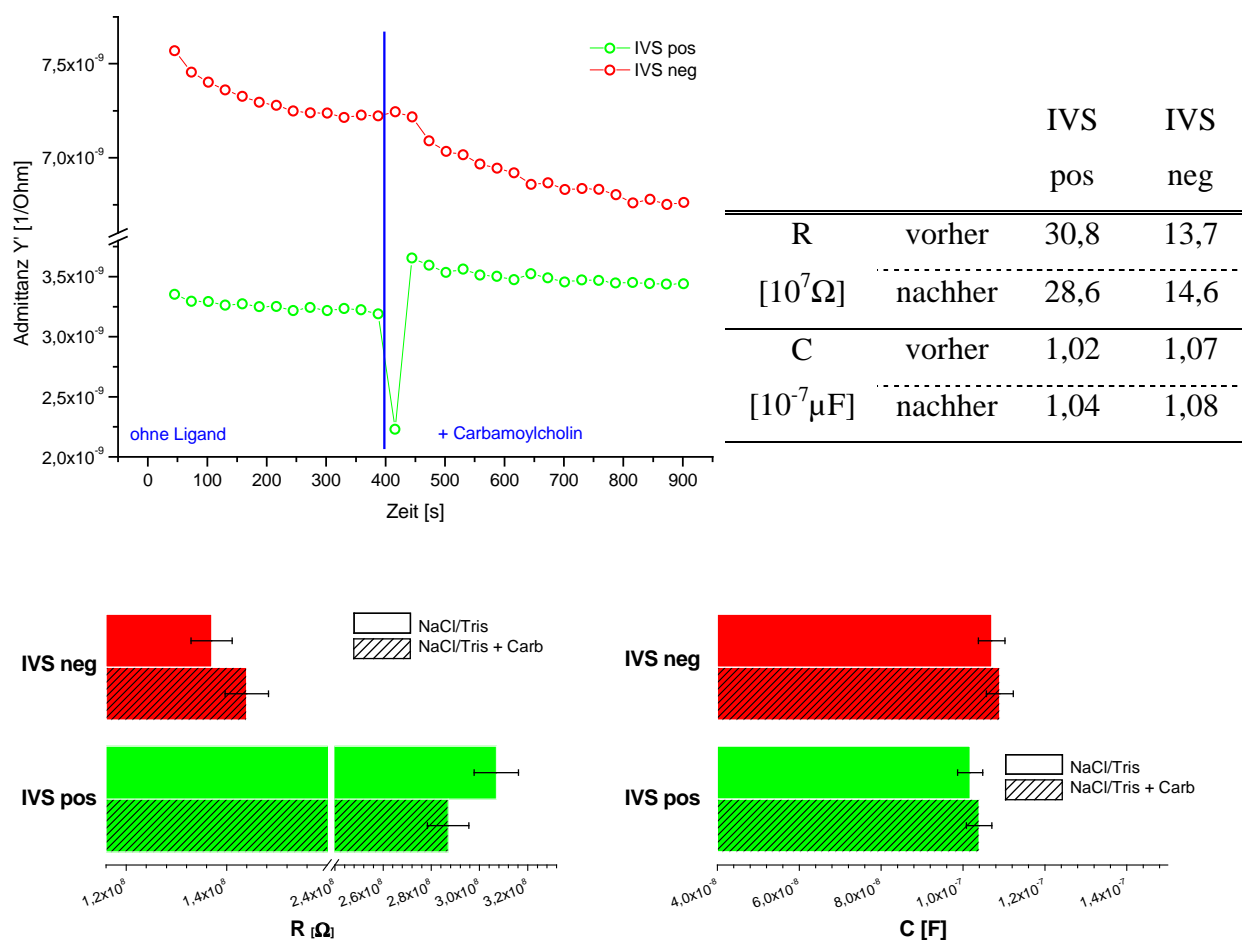


Abb. 98: Zeit-Scan der Aktivierung mit 100 μM Carbamoylcholin an pcBLM aus cBSA und PC-Vesikeln nach IVS mit cDNA (\circ) und ohne cDNA (\circ) in 100mM NaCl/Tris. Abgebildet ist der Realteil der Admittanz Y' . Die Tabelle fasst die berechneten Werte für R_m und C_m vor und nach Aktivierung zusammen. Die Balkendiagramme verdeutlichen die Änderung von R_m und C_m , wobei der Fehlerbalken den Vertrauensbereich von 3 % angibt.

Abb. 98 zeigt die Aktivitätsmessung an pcBLMs nach IVS. Bei den Versuchen mit cDNA konnte ein geringfügiges Sinken von R_m beobachtet werden, was bei den negativ Kontrollen nicht festgestellt werden konnte.

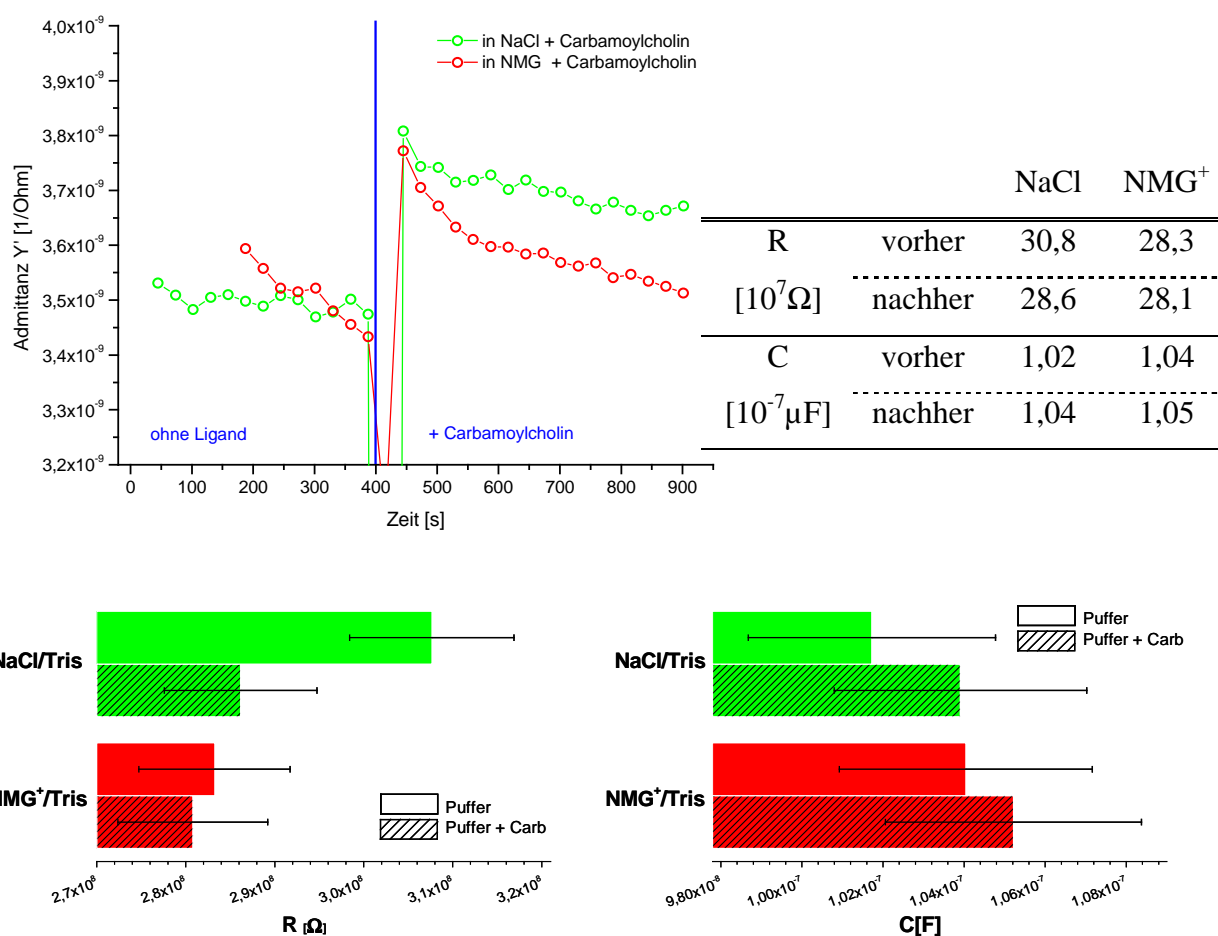


Abb. 99: Zeit-Scan der Aktivierung mit 100 μM Carbamoylcholin an pcBLM aus cBSA und PC-Vesikeln nach IVS mit cDNA in 100 mM NaCl/Tris (o) und in 100 mM NMG/Tris (o). Abgebildet ist der Realteil der Admittanz Y' . Die Tabelle fasst die berechneten Werte für R_m und C_m vor und nach Aktivierung zusammen. Die Balkendiagramme verdeutlichen die Änderung von R_m und C_m , wobei der Fehlerbalken den Vertrauensbereich von 3 % angibt.

Abb. 99 zeigt den Vergleich von IVS mit cDNA bei Aktivierung in NaCl/Tris und NMG⁺/Tris. Es zeigt, dass im Puffer mit dem nicht-permeierenden NMG⁺ die Zugabe von Carbamoylcholin zu keinem signifikanten Abfall des Widerstandes führte ($\Delta R_m < 1\%$).

Eine Inhibition mit BTX zeigte keinen Einfluss auf die vermutliche Aktivität des Proteins (Abb. 100). Der Widerstand sank auch nach Inkubation mit BTX bei Zugabe von Carbamoylcholin. Dies bedeutet, dass das *in vitro* synthetisierte Protein keine Bindungsfähigkeit für BTX aufweist. Die Affinität für BTX entsteht durch post-translationale Faltung^[70]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwar Protein hergestellt wurde, welches jedoch nicht vollständig funktional ist.

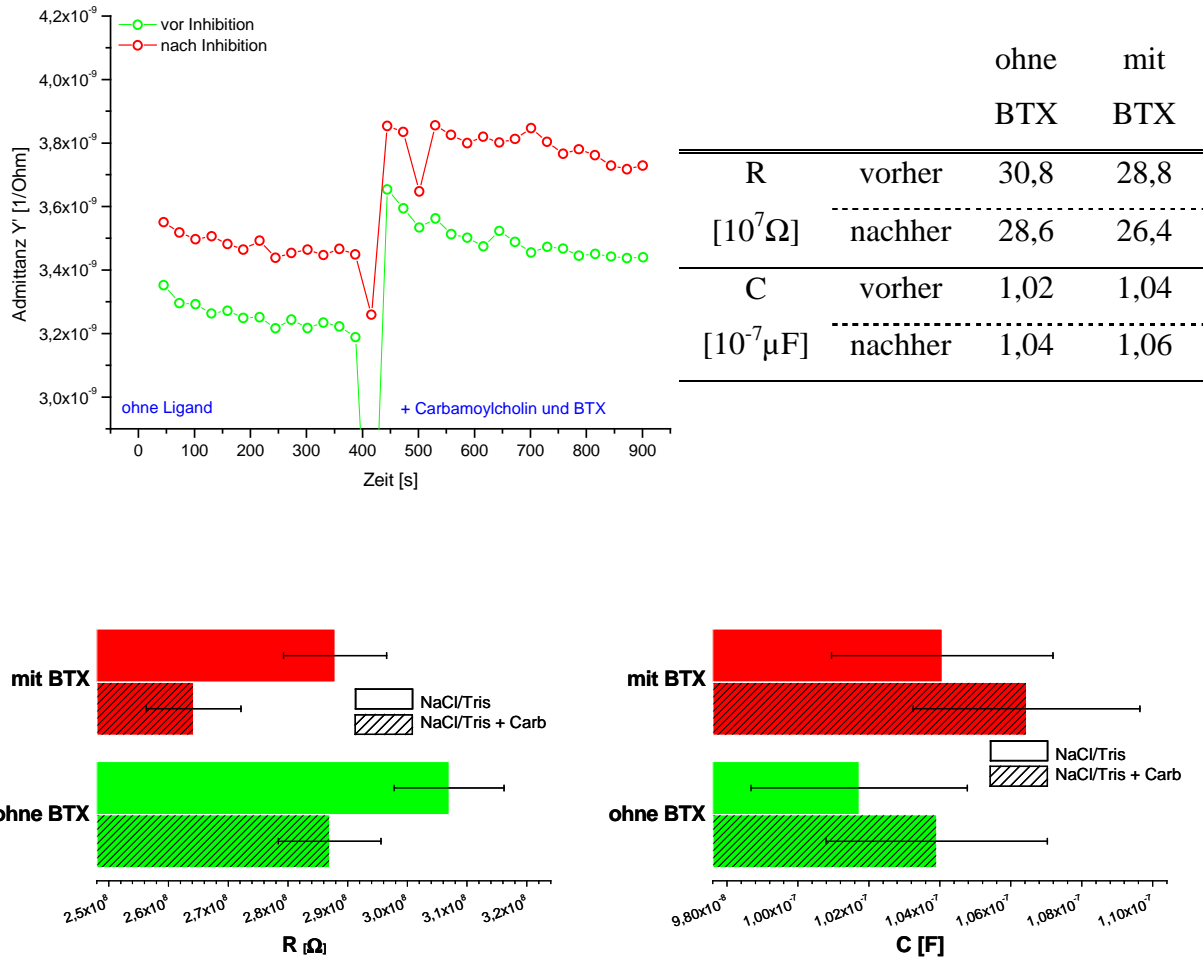


Abb. 100: Zeit-Scan der Aktivierung mit 100 μM Carbamoylcholin an pcBLM aus cBSA und PC-Vesikeln nach IVS mit cDNA ohne BTX (o) und nach 40 min Inkubation mit 100 nM BTX (o) in 100 mM NaCl/Tris. Abgebildet ist der Realteil der Admittanz Y' . Die Tabelle fasst die berechneten Werte für R_m und C_m vor und nach Aktivierung zusammen. Die Balkendiagramme verdeutlichen die Änderung von R_m und C_m , wobei der Fehlerbalken den Vertrauensbereich von 3 % angibt.

Die Anzahl der offenen Kanäle war bei den pcBLMs nach der IVS etwa 20-mal kleiner als bei den Torp-Mem. Ein Grund für die geringere Aktivität könnte darin liegen, dass durch IVS weniger Proteine exprimiert wurden als *in vivo* in Torpedo. Ein weiterer Grund wäre, dass nicht alle für die Funktionalität notwendigen post-translationalen Modifikationen stattfanden. In anderen Gruppen ^{[71],[72]} wurde die post-translationale Modifikation von *in vitro* synthetisiertem nAChR unter Zugabe von Mikrosomen des Endoplasmatischen Retikulums aus caninem Pankreas oder Wachtel Oviducten demonstriert. Die Proteine wurden hierbei in die Mikrosomen inkorporiert. Ein eventueller Einbau des synthetisierten Proteins in Modellmembranen erfolgte über die Fusion der Mikrosomen. Dies bedeutet jedoch, dass man mit dieser Methode ein Stückweit die Kontrolle über die Zusammensetzung der biomimetischen Membranen abgibt und auf die Anwesenheit von ER-Stücken angewiesen ist.

5.5.4 Zusammenfassung

Es konnte am Beispiel der Luciferase gezeigt werden, dass sich Proteine grundsätzlich im mikrofluidischen System exprimieren lassen. Die geometrischen Bedingungen scheinen einen positiven Effekt auf die Ausbeute zu haben. Für die Expression von nAChR gestaltete sich die funktionelle IVS mit gleichzeitiger Inkorporation in eine biomimetische Schicht jedoch schwieriger.

Zum einen zeigte sich in Radioaktiv-Plots, dass die Anwesenheit von Cofaktoren einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die post-translationale Modifikation des Proteins hat. Im reinen IVS-Extrakt wurden auch unvollständig prozessierte Stufen des Proteins gefunden.

Zum anderen spielt die Beschaffenheit der biomimetischen Sensoroberfläche eine Rolle für eine erfolgreiche und funktionelle Inkorporation. In Schichten, mit einem beschränkten Ionenreservoir (tBLM, BCP) ließ sich keine gesicherte Proteinaktivität feststellen.

In den auf BSA basierenden peptide cushioned Bilayer Lipid Membranes (pcBLMs) konnte eine Aktivität festgestellt werden, die es bei der Kontrolle ohne cDNA nicht gab. Die Inhibition mit BTX war jedoch nicht erfolgreich, was auf ein nicht völlig korrekt exprimiertes Protein hindeutet. Im Gegensatz zu Expression in Zellen gibt es in den IVS Ansätzen scheinbar keine Mechanismen, die für den Abbau fehlerhafter oder falsch gefalteter Proteine sorgen.

In den tethered Bilayer Lipid Membranes (tBLMs) und den Block-Copolymer-Membranen (BCPs) konnte im Vergleich zu den negativ Kontrollen keine eindeutige Aktivität festgestellt werden. Da die Expression des nAChR im Retikulozytenextrakt nachgewiesen wurde, gibt es zwei Gründe, warum keine Aktivität detektiert werden konnte. Entweder wurde das Protein nicht in die biomimetische Schicht eingebaut, oder es wurde zu wenig funktionelles Protein exprimiert.

Der Syntheseweg des nAChRs ist kompliziert und vielen Kontrollmechanismen unterworfen. Die co- und post-translationale Modifikationen bedeuten, dass der nAChR während der Synthese in verschiedenen Zwischenstufen vorliegt, die nicht oder nur teilweise funktionell sind. So bildet sich die Fähigkeit BTX zu binden erst als einer der letzten Schritte heraus. Fehlen nun Faktoren, die für diese Modifikationen benötigt werden, oder sind sie nur im geringen Maße im Expressionssystem vorhanden, verringert sich die Ausbeute an funktionellem Protein. Die pcBLM wies von den für die Aktivitätsmessungen nach IVS im Chipsystem verwendeten Modellmembranen den höchsten Membranwiderstand auf. Hier werden weniger aktive Kanäle benötigt um ein detektierbares Signal zu generieren.

D.h. selbst wenn in alle Membranarchitekturen gleichviel funktionelle nAChRs eingebaut wurden, kann es sein, dass in den Schichten mit geringem Widerstand R_m , die Menge an Protein nicht ausreicht um einen merkbaren Unterschied zu machen. Die zweite Erklärung ist, dass das Protein nicht oder nicht funktionell eingebaut wurde. Die tBLMs sind fest mit der Oberfläche verankert. Wenn die Abstandshalter zu dicht gepackt sind, kann es sein, dass das Protein auf Grund seiner ausgedehnten extrazellulären Domänen keinen Platz findet. Ähnliches gilt für die BCPs. Hier gibt es überhaupt keinen Abstandshalter zur Goldoberfläche. Ein ausreichender Raum für extrazelluläre Domänen könnte jedoch durch das Ausdünnen der Schicht entstehen, wobei das Reservoir zwischen Oberfläche und Membran sehr gering wäre.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte die Entwicklung einer mikrofluidischen Analysesystem zur elektrochemischen Detektion der Aktivität von liganden-gesteuerten Ionenkanälen am Beispiel des $\alpha 7$ nAChR demonstriert werden.

Dazu wurde ein Chip mit einem integrierten Elektroden-Array verwendet. Der Chip bestand aus cyclischem Olefin Copolymer und verfügte über vier separate Reaktionsräume mit jeweils einem Volumen von etwa 2,1 μl . Auf den Elektroden-Arrays befanden sich 4 x 4 von einander unabhängigen Gold-Elektroden (Elektroden-Fläche 1 mm x 1 mm). Die Elektroden wurden näher charakterisiert hinsichtlich ihrer Oberflächenbeschaffenheit und ihrer Homogenität. Die Elektroden hatten eine Rauigkeit von etwa 1,6 nm. Nach Reinigung der Arrays mit Argon Plasma zeigten die Elektroden eine gute Vergleichbarkeit hinsichtlich ihrer kapazitiven Eigenschaften. Die Kapazität der reinen Goldelektroden lag zwischen ungefähr 30 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ und 40 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Es viel jedoch auf, dass es zu Unterschieden zwischen den einzelnen Arrays kam, die auf das Herstellverfahren und die Reinigung zurückzuführen sind. Zudem konnte die Stabilität der Pseudo-Referenzelektrode in physiologischem Puffer gezeigt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass sich das mikrofluidischen Chipsystem für den reproduzierbaren Aufbau von biomimetischen Membranen eignet. Dies wurde an vier verschiedenen Membranarchitekturen demonstriert: einer tethered Bilayer Lipid Membrane (tBLM) auf Basis des synthetischen Moleküls DPTL und der Spreitung von Phosphatidylcholin (PC)-Vesikeln; einer peptide cushioned Bilayer Lipid Membrane (pcBLM) aus PC-Vesikeln mit einem Peptidkissen aus modifiziertem BSA; einer Solid Supported Membrane (SSM) aus PC-Vesikeln auf einer hybrid Bilayer Lipid Membrane (hBLM) aus Octadecanithiol (ODT) und Diphytanoyl-Phosphatidylcholin (DphyPC) sowie einer biomimetischen Schicht aus amphiphilen Triblock-Copolymeren (BCP).

Es zeigte sich bei den tBLM, dass die hohe Oberflächenrauigkeit einen Einfluss auf die Qualität der Schichten hatte. Die Bedeckungsdichte lag bei der Monolage der tBLMs bei ungefähr 94 %. Als problematisch stellte sich allerdings die Reproduzierbarkeit dar.

Die SSMs erwiesen sich auf Grund ihres Lösungsmittel Anteils als weniger geeignet für das verwendete Chipsystem als lösungsmittel-freie Membranarchitekturen. Sie wiesen zwar den höchsten Membranwiderstand der betrachteten Schichten auf, ließen sich aber schlecht reproduzieren und beeinträchtigten die Integrität des Chipsystems.

Die BCP-Membranen ließen sich dagegen gut reproduzieren. Der Widerstand lag im Megaohm-Bereich. Cyclische Voltammetrie Messungen mit $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$ zeigten jedoch, dass der Bedeckungsgrad bei etwa 70 % lag und die Schicht Defekte aufwies. Die pcBLMs aus an BSA angelagerten PC-Vesikeln lieferten gut reproduzierbare biomimetische Membranen mit Widerständen von wenigen Megaohm. Die Rauigkeit der Elektrodenoberfläche spielte hierbei keine Rolle, da sie durch die BSA-Schicht ausgeglichen wurde. EIS-Messungen deuteten darauf hin, dass die Vesikel an der Oberfläche miteinander fusionieren und zumeist teilweise planare Lipiddoppelschichten bilden. Cyclische Voltammetrie Messungen zeigten, dass sich keine vollständig isolierende Membran bildet. Dennoch erscheinen diese pcBLMs auf Grund ihrer guten Reproduzierbarkeit und der im Vergleich zu den anderen Schichten ausreichend hohen Membranwiderstände, sowie des großen Ionenreservoirs geeignet für Sensoranwendungen.

Die Detektion der Ionenkanal-Aktivität wurde am Beispiel des nAChR demonstriert, bei dem es sich um einen liganden-gesteuerten Ionenkanal handelt. Zur Interpretation der Daten wurde die in dieser Arbeit als Zeit-Scan bezeichnete Methode etabliert und angewendet. Sie basiert auf der Messung der Impedanz eines Systems bei fester Frequenz über die Zeit. Hierbei konnten zunächst die Rahmenbedingungen für Messung und Auswertung bestimmt werden, so dass sich das Verfahren auch auf komplizierte biomimetische Membranen anwenden ließ. Mit dieser Methode wurden der Widerstand der Membran R_m und die Kapazität der Membran C_m bestimmt. Dabei war zu beachten dass C_m bei niedrigen Frequenzen nicht nur von der Charakteristik der Lipidschicht, sondern auch von der (Helmholtz-)Doppelschicht an der Grenzfläche Membran / Elektrolyt beeinflusst wird. C_m ändert sich also mit der Anzahl an geöffneten Poren (Änderung von ϵ), der Ladungen an der Oberfläche (Änderung von Q) sowie der Dickenänderung bei Ligandenbindung (Änderung von d).

Um die Anwendbarkeit von Chip und Messverfahren zu verifizieren, wurden Membranpräparationen mit überexprimierten nAChRs verwendet. Deren Verhalten wurde den Messungen am GPCR mGluR5a als Negativ-Kontrolle gegenüber gestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des spezifischen Liganden Carbamoylcholin ein Sinken des Membranwiderstandes der nAChR enthaltenden Membranarchitekturen zur Folge hatte. Kontrollversuche mit nicht-aktivierenden Liganden oder nicht permeierenden Ionen, sowie Messungen an mGluR5a mit Carbamoylcholin führten zu keinem vergleichbaren Ergebnis. Zudem führte eine Inhibition der nAChR-haltigen Membran mit dem spezifischen Antagonisten Bungarotoxin zu einem Rückgang der Aktivität. Daraus lässt sich ableiten, dass

die detektierten Änderungen des Membranwiderstandes R_m auf die Funktionalität des nAChRs zurück zu führen sind.

Des Weiteren wurde die *in vitro* Synthese (IVS) eines funktionellen $\alpha 7$ nAChR untersucht. Um die prinzipielle Verträglichkeit der IVS von Proteinen mit dem mikrofluidischen Chipsystem zu demonstrieren, wurde das lösliche Protein Luciferase im Chip synthetisiert und mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Dabei konnte eine erhöhte Ausbeute gegenüber dem Standardansatz im Reaktionsgefäß festgestellt werden.

Die erfolgreiche IVS von nAChR wurde mit Radioaktiv-Plots demonstriert. Von den beiden untersuchten Expressionssystemen (bakterielles System aus *E.coli* und Retikulozytenlysat von Kaninchen) konnte die Expression des nAChRs nur im Retikulozyten-Expressionssystem nachgewiesen werden. Es zeigte sich zudem, dass die Zugabe von caninen Mikrosomen zu weiteren post-translationalen Modifikationen führte. Die genaue Auswirkung, der unterschiedlichen Modifizierungen des IVS Protokolls auf die Funktionalität des Proteins konnte bisher noch nicht genauer untersucht werden.

Die Aktivitätsmessungen an biomimetischen Membranen, auf denen eine IVS von nAChR durchgeführt wurde, führten je nach Schichttyp zu unterschiedlichen Ergebnissen. In tBLMs und BCPs konnte kein Absinken des Widerstandes bei Zugabe des Liganden beobachtet werden. Zusätzliche Chemilumineszenzmessungen zur Antikörperbindung zeigten kein Vorhandensein des Proteins im RetEx. In den auf BSA basierenden pcBLMs ließ sich eine Reaktion auf den spezifischen Liganden beobachten. Bei vergleichbaren Experimenten mit pcBLMs, bei denen die IVS ohne Zugabe von cDNA durchgeführt wurde (negativ Kontrolle), blieb eine Änderung des Membranwiderstandes aus. Eine Inhibition mit Bungarotoxin führte jedoch zu keiner Veränderung des beobachteten Signals. Dies legt die Vermutung nahe, dass der nAChR *in vitro* synthetisiert und auch in die biomimetische Membran inkorporiert werden kann, dass die Expressionsbedingungen aber noch zu optimieren sind, um eine vollständig funktionale Struktur des Proteins zu erhalten.

7 Ausblick

Die Aktivitätsmessung von Ionenkanälen mittels Impedanzanalysen in einem mikrofluidischen Chipssystem hat sich als prinzipiell anwendbar erwiesen. Allerdings gibt es noch einige ungeklärte Fragen, die eine nähere Betrachtung erfordern.

Prinzipiell lassen sich mögliche weitere Untersuchungen in drei Bereiche einteilen: Die technischen Fragestellungen hinsichtlich des Analysesystems, die Optimierung und Charakterisierung der biomimetischen Membranen und die kontrollierte Expression und Inkorporation von Membranproteinen. Im Folgenden sollen einige offene Fragestellungen kurz angerissen werden:

Technische Aspekte

Ein kritischer Punkt des Analysesystems sind die Elektroden. Hierbei gibt es Verbesserungspotential sowohl für die Referenz- als auch für die Arbeitselektrode. Die Referenzelektrode ist zurzeit permanent im Reaktionsraum integriert. Eine Trennung würde eine größere Vergleichbarkeit bei verschiedenen Versuchen erlauben. Gerade bei der Erzeugung von selbstorganisierten Monolagen (SAMs) aus Molekülen mit Schwefelanker besteht ansonsten die Gefahr, dass sich die Moleküle auch an die Silberelektrode anlagern.

Elektroden mit einer geringeren Rauigkeit wären geeigneter für die Bildung von tethered Bilayer Lipid Membranes (tBLM). Dies würde eine größere Auswahl der Synthesestrategien für die biomimetischen Membranen erlauben.

Eine weitere Möglichkeit, Impedanzspektroskopie für Screeninganwendungen mit Biosensoren nutzbar zu machen, wäre die Nutzung von Fourier-transformierten Verfahren, bei denen die Anregung als „weißes Rauschen“ erfolgt. Dies würde eine kürzere Dauer der Messungen erlauben. Auch wäre es lohnenswert die Möglichkeiten einer Integration des potentiostatischen Schaltkreises in das Chipssystem näher zu untersuchen, um eine größere örtliche Unabhängigkeit zu erreichen.

Biomimetische Membranen

Für die Herstellung biomimetischer Membranen gibt es eine Vielzahl von Ansätzen. Die Optimierung dieser Schichten ist ein wesentlicher Punkt bei der Entwicklung von Biosensoren. Dabei ist es wichtig zu verstehen, welchen Einfluss die Bestandteile der biomimetischen Membran auf den Einbau und die Aktivität von Membranproteinen haben.

Ein interessanter Aspekt ist die Frage, welchen Einfluss die Lipidzusammensetzung auf die Qualität der Membran hat. Es ist davon auszugehen, dass die Ladung der Lipide ihre Anlagerung an Oberflächen und ihr Fusionsverhalten beeinflusst. Durch die richtige Wahl der Lipidkomposition, könnten sich daher Membranen mit höheren Widerständen erzeugen lassen. Auch die Wirkung von Cholesterol würde sich zu untersuchen lohnen. Cholesterol ist ein Bestandteil der Zellmembran, der für eine höhere Dichtigkeit und eine gleichzeitige Fluidität sorgt. Daher könnte ein optimierter Cholesterol-Anteil die elektrochemischen Eigenschaften verbessern.

Die Stabilität der Schichten ist für Biosensoren von wesentlicher Bedeutung. Hier können Alternativen zu natürlichen Lipiden Anwendung finden. Gerade Block-Copolymere bieten vielversprechende Ansätze für Schichten, die auch gegen Luft stabil sind.

In vitro Synthese von Proteinen

Ein generelles Problem von funktionalisierten biomimetischen Membranen ist die Frage, wie man die Proteine inkorporiert.

Die in vitro Synthese von Membranproteinen ist noch ein weites unerforschtes Feld voller Möglichkeiten. Die grundsätzliche Machbarkeit ist zwar durchaus gegeben, allerdings gilt es für jedes Protein die Reaktionsbedingungen zu optimieren. Die erfolgreiche Expression alleine kann nicht mit Funktionalität gleichgesetzt werden. Daher wäre es interessant, den Einfluss der Synthese Bedingungen auf die co- und post-translationalen Modifikationen des nAchR näher zu betrachten. Hierbei wären besonders die Zugabe von Mikrosomen, Redoxpotential, Art des Expressionssystems und Zugabe von Faktoren, die die Effizienz steigern (z.B. Proteaseinhibitoren), zu erwähnen.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Yildirim M. A., Goh K.-I., Cusick M. E., et al., "Drug - target network", *Nature Biotechnology* (2007) Vol. 25, S. 1119-1126.
- [2] Köper I., "Insulating tethered bilayer lipid membranes to study membrane proteins", *Molecular BioSystems* (2007) Vol. 3, S. 651-657.
- [3] *Wikipedia*. Verfügbar unter: http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_membrane
- [4] Makino K., Shibata A., "Surface Properties of Liposomes Depending on their Composition" in *Advances in Planar Lipid Bilayers* (2006), Vol.4, Leitmannova Liu, Ed., ed: Elsevier, S.49-77.
- [5] Steinem C., Janshoff A., "Modellmembranen auf Oberflächen", *Chemie in unserer Zeit* (2008) 42, S.116-127.
- [6] Singer S. J., Nicolson G. L., "Fluid Mosaic Model of Structure of Cell-Membranes", *Science* (1972) Vol. 175, S. 720-731.
- [7] Streyer L., *Biochemie* (1999), korrigierter Nachdruck der 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- [8] Köper I., Schiller S. M., Giess F., et al., "Functional tethered bimolecular lipid membranes (tBLMs)" in *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* (2006) Vol. 3, A. Leitmannova Liu, Ed., ed: Elsevier, S. 37-53.
- [9] Mueller P., Rudin D. O., Ti Tien H., et al., "Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System", *Nature* (1962) Vol. 194, S. 979-980.
- [10] Montal M., Mueller P., "Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1972) Vol. 69, S. 3561-3566.
- [11] Winterhalter M., "Black lipid membranes", *Current Opinions in Colloid Interface Science* (2000) Vol. 5, S. 250-255.
- [12] T.-J. Jeon, N. Malmstadt, J. L. Poulos, J. J. Schmidt, „Black lipid membranes stabilized through substrate conjugation to a hydrogel“, *Biointerphases* (2008), Vol 3(2), FA96-100.
- [13] Papahadjopoulos D., Watkins J. C., "Phospholipid model membranes. II. Permeability properties of hydrated liquid crystals", *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* (1967), Vol.135(4), S. 639-652.

- [14] Hope M. J., Bally M. B., Webb G., Cullis P. R., "Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterisation of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential", *Biochimica et Biophysica Acta* (1985), Vol. 812, S. 55-65.
- [15] MacDonald R.C. , MacDonald I.R., Menco B.P.M., Takeshita K., Subbarao N. K., Hu L.-R., „Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles”, *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* (1991) Vol. 1061(2), S. 297-303.
- [16] Kahya N., Scherfeld D., Bacia K., et al., "Probing Lipid Mobility of Raft-exhibiting Model Membranes by Fluorescence Correlation Spectroscopy", *Journal of Biological Chemistry* (2003) Vol. 278, S. 28109-28115.
- [17] Korlach J., Schwille P., Webb W. W., et al., "Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1999) Vol. 96, S. 8461-8466.
- [18] Riquelme G., Lopez E., Garcia-Segura L. M., Ferragut J. A. and Gonzalez-Ros J. M., "Giant liposomes: a model system in which to obtain patch-clamp recordings of ionic channels" *Biochemistry* (1990) Vol. 29, S. 11215–11222.
- [19] Patel A. R., Frank C. W., „Quantitative Analysis of Tethered Vesicle Assembly by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: Binding Dynamics and Bound Water Content”, *Langmuir* (2006), Vol. 22(18), S. 2587-2599.
- [20] Yoshina-Ishii C, Boxer S.G., "Arrays of Mobile Tethered Vesicles on Supported Lipid Bilayers", *Journal of the American Chemical Society* (2003) Vol. 125, S. 3696-3697.
- [21] Galush W. J., Shelby S. A., Mulvihill M. J., Tao A., Yang P. D., Groves J. T., "A Nanocube Plasmonic Sensor for Molecular Binding on Membrane Surfaces", *Nano Letters* (2009) Vol. 9(5), S. 2077-2082.
- [22] Chen M. H., Li M., Brosseau C. L., Lipkowski J., "AFM Studies of the Effect of Temperature and Electric Field on the Structure of a DMPC-Cholesterol Bilayer Supported on a Au(111) Electrode Surface", *Langmuir* (2009), Vol. 25(2), S. 1028-1037.
- [23] Gritsch S., Nollert P., Jähnig F., Sackmann E., „Impedance Spectroscopy of Porin and Gramicidin Pores Reconstituted into Supported Lipid Bilayers on Indium-Tin-Oxide Electrodes”, *Langmuir* (1998), Vol. 14, S. 3118-3125.

- [24] Groves J. T., Ulman N., Boxer S. G., "Micropatterning Fluid Lipid Bilayers on Solid Supports", *Science* (1997), Vol. 275(5300), S. 651-653.
- [25] Hochrein M. B., Reich C., Krause B., Rädler J. O., Nickel B., „Structure and Mobility of Lipid Membranes on a Thermoplastic Substrate“, *Langmuir* (2006), Vol. 22, S. 538-554.
- [26] Sackmann, E., Tanaka M., "Supported membranes on soft polymer cushions: fabrication, characterization and applications" *Trends in Biotechnology* (2000), Vol. 18, S. 58-64.
- [27] Brian A. A., McConnell H. M., "Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1984), Vol. 81, S. 6159-6163.
- [28] McConnell H. M., Watts T. H. Weis., R. M., et al., "Supported Planar Membranes in Studies of Cell-Cell Recognition in the Immune-System", *Biochimica et Biophysica Acta*, (1986) Vol. 864, S. 95-106.
- [29] Blodgett, K., „Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface“, *Journal of the American Chemical Society* (1935), Vol. 57, S. 1007-1022.
- [30] Zasadzinski J. A., Viswanathan R., Madsen L., et al., "Langmuir-Blodgett films", *Science* (1994), Vol. 263, S. 1726-1733.
- [31] Richter R. P., Berat R., Brisson A. R., „Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View“, *Langmuir* (2006), Vol. 22, S. 3497-3505.
- [32] Vockenroth I. K., Rossi C., Shah M. R., Köper I., "Formation of tethered bilayer lipid membranes probed by various surface sensitive techniques", *Biointerphases* (2009), Vol. 4(2), S. 19-26.
- [33] Schönherr H., Johnson J. M., Lenz P., Frank C. W., Boxer S. G., „Vesicle Adsorption and Lipid Bilayer Formation on Glass Studied by Atomic Force Microscopy“, *Langmuir* (2004), Vol. 20, S. 11600-11606.
- [34] Reimhult E., Höök F., Kasemo B., „Intact Vesicle Adsorption and Supported Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature, and Osmotic Pressure“, *Langmuir* (2003), Vol. 19, S. 1681-1691.
- [35] Cevc G., Richardsen H., "Lipid vesicles and membrane fusion", *Advanced Drug Delivery Reviews* (1999), Vol. 38, S. 207-232.
- [36] Plant A. L., "Supported Hybrid Bilayer Membranes as Rugged Cell Membrane Mimics", *Langmuir* (1999), Vol. 15, S. 5128-5135.
-

- [37] Lingler S., Rubinstein I., Knoll W., Offenhäusser A., “Fusion of small unilamellar lipid vesicles to alkanethiol and thiolipid self-assembled monolayers on gold” *Langmuir* (1997), Vol. 13, S. 7085-7091.
- [38] Kalb, E., Frey S., Tamm L.K., “Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers”, *Biochimica et Biophysica Acta* (1992), Vol. 1103, S. 307-316.
- [39] Spinke J., Yang J., Wolfv, Liley M., Ringsdorf H., Knoll W., „Polymer-supported bilayer on a solid substrate”, *Biophysical Journal*, (1992), Vol. 63, S. 1667-1671.
- [40] Wong J.Y., Majewski J., Seitz M., Park C.K., Israelachvili J.N., Smith G.S., “Polymer-cushioned bilayers I. A structural study of various preparation methods using neutron reflectometry”, *Biophysical Journal* (1999), Vol. 77(3), S. 1445 – 1457.
- [41] Majewski J., Wong J.Y., Park C.K., Seitz M., Israelachvili J.N., Smith G.S., “Structural studies of polymer-cushioned lipid bilayers”, *Biophysical Journal* (1998), Vol. 75(5), S. 2363 – 2367.
- [42] Sackmann E., “Supported Membranes: Scientific and Practical Applications”, *Science* (1996), Vol. 271(5245), S. 43–48.
- [43] Kühner M., Tampé R., Sackmann E, “Lipid mono- and bilayer supported on polymer films: composite polymer-lipid films on solid substrates”, *Biophysical Journal* (1994), Vol. 67(1), S. 217 – 226.
- [44] Knoll, W., Frank C.W., Heibel C., Naumann R., Offenhäusser A., Rühle J., Schmidt E.K., Shen W.W., Sinner A., “Functional tethered lipid bilayers”, *Reviews in Molecular Biotechnology* (2000), Vol. 74, S. 137-158.
- [45] Tanaka M., Sackmann E., „Polymer-supported membranes as models of the cell surface“, *Nature* (2005), Vol. 29, S. 656-663.
- [46] Bunjes N., Schmidt E. K., Jonczyk A., et al., "Thiopeptide-Supported Lipid Layers on Solid Substrates", *Langmuir* (1997), Vol. 13, S. 6188-6194.
- [47] Naumann C.A., Prucker O., Lehmann T., Rühle J., Knoll W., Frank C.W., “The Polymer-Supported Phospholipid Bilayer: Tethering as a new approach to substrate-membrane stabilization”, *Biomacromolecules* (2002), Vol. 3, S. 27-35.
- [48] Seitz M., Ter-Ovanesyan E., Hausch M., et al., "Formation of tethered supported bilayers by vesicle fusion onto lipopolymer monolayers promoted by osmotic stress", *Langmuir* (2000), Vol. 16, S. 6067-6070.

- [49] Wagner M. L., Tamm L. K., "Tethered polymer-supported planar lipid bilayers for reconstitution of integral membrane proteins: Silane-polyethyleneglycol-lipid as a cushion and covalent linker", *Biophysical Journal*, (2000), Vol. 79, S. 1400-1414.
- [50] Robelek R., Lemker E. S., Wiltschi B., Kirste V., Naumann R., Oesterheld D., Sinner E. K., „Inkorporation von in vitro synthetisierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in ein peptidfixiertes artifizielles membransystem“, *Angewandte Chemie* (2007), Vol. 119, S. 611-614
- [51] Whitesides, G.M., Mathias J.P., Seto C.T., “Molecular self-assembly and nanochemistry: A chemical strategy for the synthesis of nanostructures”, *Science* (1991), Vol. 254, S. 1312-1319.
- [52] Bigelow, W.C., D.L. Pickett, and W.A. Zismann, “Oleophobic monolayers: films adsorbed from solution in non-polar liquids”. *Journal of Colloid Sciences* (1946). Vol. 1, S. 513-538.
- [53] Schwartz, D.K., “Mechanisms and Kinetics of Self-Assembled Monolayer Formation”, *Annual Review of Physics and Chemistry* (2001), Vol. 52, S. 107-137.
- [54] Poirier G. E., Pylant E. D., “The Self-Assembly Mechanism of Alkanethiols on Au(111) “, *Science* (1996), Vol. 272(5265), S. 1145-1148.
- [55] McGillivray D. J., Valincius G., Vanderah D. J., et al., "Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes", *Biointerphases* (2007), Vol. 2, S. 21-33.
- [56] Buboltz J. T., Feigenson G. W., “A novel strategy for the preparation of liposomes: Rapid solvent exchange”, *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* (1999), Vol. 1417(2), S. 232-245.
- [57] Terretaz S., Vogel H., “Investigating the function of ion channels in tethered lipid membranes by impedance spectroscopy”, *MRS Bulletin* (2005), Vol. 30, S. 207–210.
- [58] Naumann, R., Schmidt E.K., Jonczyk A., Fendler K., Kadenbach B., Liebermann T., Offenhäuser A., Knoll W., “The peptide-tethered lipid membrane as a biomimetic system to incorporate cytochrome c oxidase in a functionally active form”, *Biosensors & Bioelectronics* (1999), Vol. 14, S. 651-662.
- [59] Wagner M. L., Tamm L. K., "Tethered polymer-supported planar lipid bilayers for reconstitution of integral membrane proteins: Silane-polyethyleneglycol-lipid as a cushion and covalent linker," *Biophysical Journal* (2000), Vol. 79, S. 1400-1414.

- [60] Raguse B., Braach-Maksvytis V., Cornell B. A., et al., "Tethered Lipid Bilayer Membranes: Formation and Ionic Reservoir Characterization", *Langmuir* (1998), Vol. 14, S. 648-659.
- [61] Krishna G., Schulte J., Cornell B. A., et al., "Tethered Bilayer Membranes Containing Ionic Reservoirs: The Interfacial Capacitance", *Langmuir* (2001), Vol. 17, S. 4858-4866.
- [62] Janshoff A., Steinem C., „Transport across artificial membranes – an analytical perspective“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2006), Vol. 385, S. 433-451.
- [63] Lodish H., et al., *Molekulare Zellbiologie* (1996), 2. Auflage, Verlag Walter de Gruyter, Berlin
- [64] Collingridge G. L., Olsen R. W., Peters J., Spedding M., "A nomenclature for ligand-gated ion channels", *Neuropharmacology* (2009), Vol. 56, S. 2-5.
- [65] Barry P. H., Lynch J. W., "Ligand-Gated Channels", *IEEE Transactions on Nanobioscience* (2005), Vol. 4(1), S. 70-80.
- [66] aus Protein Datenbank (http://www.pdbj.org/emnavi/emnavi_detail.php?id=pdb-2bg9)
nach: Unwin N., "Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4 Å Resolution", *Journal of Molecular Biology* (2005), Vol. 346(4), S. 967-989.
- [67] Dani J. A., Bertrand D., „Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System“, *Annual Reviews of Pharmacological Toxicology* (2007), Vol. 47, S 699-729.
- [68] Merlie J. P., Lindstrom J., "Assembly In Vivo of Mouse Muscle Acetylcholine Receptor: Identification of an α Subunit Species That May Be an Assembly Intermediate", *Cell* (1983), Vol. 34, S. 747-757.
- [69] Taly A., Corringer P.-J., et al., „Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system“, *Nature Reviews* (2009), Vol.8, S. 733-750.
- [70] Shtrom S. S., Hall Z. W., „Formation of a Ligand-binding Site for the Acetylcholine Receptor in Vitro“, *The Journal of Biological Chemistry* (1996), Vol. 271(41), S. 25506-25514.
- [71] Anderson D. J., Walter P., Blobel G., "Signal Recognition Protein Is Required for the Integration of Acetylcholine Receptor δ Subunit, a Transmembrane Glycoprotein, into the Endoplasmic Reticulum Membrane", *Journal of Cellular Biology* (1982), Vol. 93, S. 501-506.

- [72] Lyford L. K., Rosenberg R. L., „Cell-free Expression and Functional Reconstitution of Homo-oligomeric $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors into Planar Lipid Bilayers“, *The Journal of Biological Chemistry* (1999), Vol. 274(36), S. 25675-25681.
- [73] Cooper S. T., Millar N. S., “Host Cell-Specific Folding and Assembly of the Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 7$ Subunit”, *Journal of Neurochemistry* (1997), Vol. 68, S. 2140-2151.
- [74] Salamone F., Zhou M., “Aberrations in Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure, Function, and Expression: Implications in Disease”, *McGill Journal of Medicine* (2000), Vol. 5, S.90-97.
- [75] Meyer B. J., Wong B. S., Morris C. E., Lecar H., “Successive openings of the same acetylcholine receptor channel are correlated in time”; *Biophysical Journal* (1983), Vol. 42, S. 109-114.
- [76] deJonge W. J., Ulloa L., “The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation”, *British Journal of Pharmacology* (2007); Vol. 151, S. 915-929.
- [77] Klammt C., Schwarz D., et al., „Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein”, *The FEBS Fournal* (2006), Vol. 273, S. 4141-4153.
- [78] Schwarz D., Dötsch V., Bernhard F., “Production of membrane proteins using cell-free expression systems“, *Proteomics* (2008), Vol. 8, S. 3933-3946.
- [79] Junge F., Schneider B., Reckel S., Schwarz D., Dötsch V., Bernhard F., „Large-scale production of functional membrane proteins“, *Cellular and Molecular Life Sciences* (2008), Vol. 65, S. 1729-1755.
- [80] Märki I., Leutenegger M., Geissbühler M., Robelek R., Sinner E. K., Lasser T., „Imaging of G protein-coupled receptors in solid-supported planar membranes at the single molecule level“, *Proceedings of SPIE 6862, 68620X* (2008), Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers.
- [81] Klammt C., Schwarz D., et al., „Cell-free production of G protein-coupled receptors for functional and structural studies“, *Journal of Structural Biology* (2006), Vol. 158, S. 482-493.
- [82] Borsook H., „Protein turnover and incorporation of labeled amino acids into tissue proteins in vivo and in vitro“, *Physiological Reviews* (1950), Vol. 30, S. 206-219.
-

- [83] Kim D. M., Choi C. Y., “A semicontinuous prokaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane” *Biotechnology Progresses* (1996), Vol. 12, S. 645-649.
- [84] Ryabova L. A., Desplancq D., Spirin A. S., Plückthun A., “Functional antibody production using cell-free translation: Effects of protein disulfide isomerase and chaperones”, *Nature Biotechnology* (1997), Vol. 15, S. 79-84.
- [85] Reyes D. R., Iossifidis D., Auroux P.-A., Manz A., “Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology”, *Analytical Chemistry* (2002), Vol. 74, S. 2623-2636.
- [86] Becker H., Gärtner C., “Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2008), Vol. 390, S. 89-111.
- [87] Janasek D., Franzke J., Manz A., „Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems“, *Nature* (2006), Vol. 442, S. 374-380.
- [88] Dittrich P. S., Manz A., Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery”, *Nature* (2006), Vol. 5, S. 210-218.
- [89] Terry S. C., Jerman J. H., Angell J. B., “A gas chromatographic air analyzer fabricated on silicon wafer”, *IEEE Transactions on Electron Devices* (1997), ED26(2), S. 1880-1886.
- [90] Manz A., Garber N, Widmer H. M., “Miniaturized total chemical analysis system: a novel concept for chemical sensing”, *Sensors and Actuators* (1990), B1, S. 244-248.
- [91] Vilkner T., Janasek D., Manz A., „Micro Total Analysis Systems. Recent Developments“, *Analytical Chemistry* (2004), Vol. 76(12), S. 3373-3385.
- [92] Lee T. M. H., “Over-the-Counter Biosensors: Past, Present, and Future”, *Sensors* (2008), Vol. 8, S. 5535-5559.
- [93] Verpoorte E., “Microfluidic chips for clinical and forensic analysis”, *Electrophoresis* (2002), Vol. 23, S. 677-712.
- [94] Hoa X. D., Kirk A. D., Tabrizian M., „Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress”, *Biosensors and Bioelectronics* (2007), Vol. 23, S. 151-160.
- [95] Sota H., Yoshimine H., et al., “A Versatile Planar QCM-Based Sensor Design for Nonlabeling Biomolecule Detection”, *Analytical Chemistry* (2002), Vol. 74(15), S. 3592-3598.
- [96] Gijssels M. A. M., “Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications”, *Microfluidics and Nanofluidics* (2004), Vol 1(1), S. 22-40.

-
- [97] Kim D. S., Park J. E., et al., „An extended gate FET-based biosensor integrated with a Si microfluidic channel for detection of protein complexes”, *Sensors and Actuators B: Chemical* (2006), Vol. 17(2), S. 488-494.
- [98] Sylvia Kwakye, Vasily N. Goral, Antje J. Baeumner Electrochemical microfluidic biosensor for nucleic acid detection with integrated minipotentiostat”, *Biosensors and Bioelectronics* (2006), Vol. 21, S. 2217-2223.
- [99] Barsoukov E., Macdonald J. R. (ed.), *Impedance Spectroscopy* (2005), Second Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- [100] Orazem M. E., Tribollet B., *Electrochemical Impedance Spectroscopy* (2008), John Wiley & Sons, Inc.
- [101] Cornell B.A., Braach-Maksvytis V. L. B., et al., “A biosensor that uses ion-channel switches”, *Nature* (1997), Vol. 387, S. 580-587.
- [102] de Levie R., “The influence of surface roughness of solid electrodes on electrochemical measurements” *Electrochimica Acta* (1965), Vol. 10(2), S. 113-130.
- [103] Pajkossy T. J., “Impedance of rough capacitive electrodes”, *Electroanalytical Chemistry* (1994), Vol. 364(1-2), S. 111-125.
- [104] Steinem C., Janshoff A., Ulrich W. P., et al., "Impedance analysis of supported lipid bilayer membranes: A scrutiny of different preparation techniques," *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, (1996), Vol. 1279, S. 169-180.
- [105] Wiegand G., Arribas-Layton N., “Electrical Properties of Supported Lipid Bilayer Membranes”, *Journal of Physical Chemistry* (2002), Vol. 106, S. 4245-4254.
- [106] Steinem C., Janshoff A., Galla H.-J., Sieber M., „Impedance analysis of ion transport through gramicidin channels incorporated in solid supported lipid bilayers”, *Bioelectricchemistry and Bioenergetics* (1997), Vol. 42, S.213-220.
- [107] Jenkins A. T. A., Bushby R. J., et al., “Ion-Selective Lipid Bilayers Tethered to Microcontact Printed Self-Assembled Monolayers Containing Cholesterol Derivates”, *Langmuir* (1998), Vol. 14(17), S. 4675-4678.
- [108] aus: <http://www.elektroniktutor.de/bauteile/goldcap.html> (©Detlef Mietke)
- [109] Daniels, J. S., Pourmand N., „Label-free Impedance Biosennnsors: Opportunities and Challenges”, *Electroanalysis* (2007), Vol. 19(12), S. 1239-1257.
- [110] Lisdat F, Schäfer D., „The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2008), Vol. 391, S. 1555-1567.
- [111] Berggren C., Bjarnason B., Johansson G., „Capacitive Biosensors“, *Electroanalysis* (2001), Vol. 13(3), S. 173-180.
-

- [112] Naumowicz M., Kotynska J., Petelska A., Figaszewski Z., "Impedance analysis of phosphatidylcholine membranes modified with valinomycin", *European Biophysical Journal* (2006), Vol. 35, S. 239-246.
- [113] Michalke A., Galla H.-J., Steinem C., „Channel activity of a phytotoxin of *Clavibacter michiganense* ssp. *nebraskense* in tethered membranes", *European Biophysical Journal* (2001), Vol. 30, S. 421-429.
- [114] Knoll W., "Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves" *Annual Review of Physical Chemistry* (1998), Vol. 49, S. 569-638.
- [115] Schasfoort R. B. M., Tudos A. J. (Ed.), *Handbook of Surface Plasmon Resonance* (2008); The Royal Society of Chemistry
- [116] Kretschmann E., Raether H., "Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light" *Zeitschrift Fur Naturforschung Part a-Astrophysik Physik Und Physikalische Chemie*,(1968), Vol. A 23, S. 2135-2136.
- [117] J. Worm. (2001), <http://www.mpip-mainz.mpg.de/knoll/soft/>.
- [118] Sinner E.K., Reuning U., Kok F.N., Sacca B., Moroder L., Knoll W., Oesterhelt D., "Incorporation of integrins into artificial planar lipid membranes: characterization by plasmon enhanced fluorescence spectroscopy", *Analytical Biochemistry* (2004), Vol. 333 (2), S. 216-224.
- [119] Sai T. P., Raychandhuri A. K., "Adhesion behaviour of self-assembled alkanethiol monolayers on silver at different stages of growth", *Journal of Physics D: Applied Physics* (2007), Vol. 40, S. 3182-3189.
- [120] Liebermann T., Knoll W., "Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* (2000), Vol. 171, S. 115-130.
- [121] Attridge, J.W., Daniels P. B., Deacon J. K., Robinson G.A., Davidson G. P., "Sensitivity enhancement of optical immunosensors by the use of a surface plasmon resonance fluoroimmunoassay", *Biosensors & Bioelectronics* (1991), Vol. 6, S. 201-214.
- [122] Zanello P., *Inorganic Electrochemistry: Theory, Practice and Application* (2003), The Royal Society of Chemistry
- [123] Datenblatt *Topas*[®] *Cyclic Olefin Copolymer (COC)*, (2006), Topas Advanced Polymers, Frankfurt-Höchst, Deutschland
- [124] Fischer L. M., Tenje M., et al., "Gold cleaning methods for electrochemical detection applications", *Microelectronic Engineering* (2009), Vol. 86, S. 1282-1285.

- [125] Henry O. Y., Fragoso A., Latta D., et al., “Design and testing of a packaged microfluidic cell for the multiplexed electrochemical detection of cancer markers”, *Electrophoresis* (2009), Vol. 30, S. 3398-3405.
- [126] Piela B., Wrona P. K., “Capacitance of the gold electrode in 0.5 M H₂SO₄ solution: a.c. impedance studies”, *Journal of Electroanalytical Chemistry* (1995), Vol. 388(1-2), S. 69-79.
- [127] Douglass E. F., Driscoll P. F., Liu D., Burnham N. A., Lambert C. R., McGimpsey W. G., “Effect of Electrode Roughness On the Capacitive Behavior of Self-Assembled Monolayers”, *Analytical Chemistry* (2008), Vol. 80(20), S. 7670–7677.
- [128] Bott A. W., “Practical Problems in Voltammetry 3: Reference Electrodes for Voltammetry”, *Current Separations* (1995), Vol. 14(29), S. 64-68.
- [129] Meschede D. (Hrsg.), *Gerthsen Physik* (2002), 21. völlig neubearbeitete Auflage, Springer Verlag, Berlin
- [130] Schiller, S.M., Naumann R., Lovejoy K., Kunz H., Knoll W., “Archaea analogue thiolipids for tethered bilayer lipid membranes on ultrasmooth gold surfaces”, *Angewandte Chemie* (2003), Vol. 42, S. 208-211.
- [131] Vockenroth I. K., Ohm C., Robertson J. W. F., McGillivray D. J., Lösche M., Köper I., “Stable insulating tethered bilayer lipid membranes”, *Biointerphases* (2008), Vol. 3(2), FA68-FA73.
- [132] Naumann R., Schiller S. M., Giess F., et al. „Tethered Lipid Bilayers on Ultraflat Gold Surfaces“, *Langmuir* (2003), Vol. 19, S. 5435-5443.
- [133] Vockenroth I. K., Fine D., Dodabalapur A., Jenkins A. T. A., Köper I., “Tethered bilayer lipid membranes with giga-ohm resistances”, *Electrochemistry Communications* (2008), Vol. 10, S. 323-328.
- [134] Ritz S., Eisele K., Dorn J., Ding S., Vollmer D., Pütz S., Weil T., Sinner E. K., „Cationized Albumin-Biocoatings for the Immobilization of Lipid Vesicles“, *Biointerphase* (2010), Vol. 5(3) S. FA78-FA87.
- [135] Volklein F., Brantzen S., Knoll W., Menges B., “A new sensor for the thermo-optical detection of surface plasmon resonance”, *Sensors and Actuators A (Physical)* (2007), Vol. 135 (2), S. 492-501.
- [136] Vollmer F., Braun D., et al., „Protein detection by optical shift of a resonant microcavity”, *Applied Physics Letters* (2002), Vol. 80(21), S. 4057-4059.
- [137] Schulz P, Dueck B., Mourot A., Hatahet L., Fendler K., “Measuring Ion Channels on Solid Supported Membranes”, *Biophysical Journal* (2009), Vol. 97, S. 388-396.
-

- [138] Schulz P, Garcia-Celma J. J., Fendler K., "SSM-based electrophysiology", *Methods* (2008), Vol. 46. S-97-103.
- [139] Kim D. H., Noh J., Hara M., Lee H, "An Adsorption Process Study of the Self-Assembled Monolayer Formation of Octadecanethiol Chemisorped on Gold Surfaces", *Bulletin of the Korean Chemistry Society* (2001), Vol. 22(3), S. 276-280.
- [140] Meier W., Nardin C., Winterhalter M., "Reconstitution of channel proteins in (polymerized) ABA triblock copolymer membranes" *Angewandte Chemie-International Edition* (2000), Vol. 39, S. 4599-4602.
- [141] Choi H.-J., Montemagno C.D., "Artificial Organelle: ATP Synthesis from Cellular Mimetic Polymersomes" *Nano Letters* (2005), Vol. 5, S. 2538-2542.
- [142] Belegriinou, S., Dorn, J., Kreiter, M., Kita-Tokarczyk, K., Sinner, E. K., Meier, W. "Biomimetic supported membranes from amphiphilic block copolymers", *Soft Matter* (2010), Vol. 6, S. 179-186.
- [143] Pata V., Dan N., "The Effect of Chain Length on Protein Solubilization in Polymer-Based Vesicles (Polymersomes)", *Biophysical Journal* (2003), Vol. 85, S. 2111-2118.
- [144] Mecke A., Dittrich C., Meier W., „Biomimetic membranes designed from amphiphilic block copolymers”, *Soft Matter* (2006), Vol. 2, S. 751-759.
- [145] Onaca O, Nallani M., Ihle S., Schenk A., Schwaneberg U., „Functionalized Nanocompartments (Synthosomes): Limitations and prospective applications in industrial biotechnology”, *Biotechnology Journal* (2006), Vol. 1, S. 795-805.
- [146] Park M. K., Tepikin A. V., Petersen O. H., „What can we learn about cell signalling by combining optical imaging and patch clamp techniques?”, *European Journal of Physiology* (2002); Vol. 44(3), S. 305-316.
- [147] Neher, E., Sackmann B., "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres", *Nature* (1976), Vol. 260, S. 799-801.
- [148] Pantoja R., Nagaraj J. M., et al., "Silicon chip-based patch-clamp electrodes integrated with PDMS microfluidics", *Biosensors and Bioelectronics* (2004), Vol. 20, S. 509-517.
- [149] Chen C., Folch A., "A high-performance elastomeric patch clamp chip", *Lab on Chip* (2006), Vol. 6, S.1338-1345.
- [150] Papula L., *Mathematik für Ingenieure und Naturwissenschaftler Band 3* (2001), 4. verbesserte Auflage, Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig.

- [151] Miura Y., Kimura S., Kobayashi S., Imanishi Y., Umemura J., “Cation Recognition by Self-Assembled Monolayers of Oriented Helical Peptides Having a Crown Ether Unit”, *Biopolymers (Peptide Science)* (2000), Vol. 55, S. 391-398.
- [152] Mitsacos A., Giompres P. E., “L-Glutamate Binding Sites in the Cerebellum and Electric Lobes of *Torpedo marmorata*”; *Compendium of Biochemical Physiology* (1988), Vol. 90C(1), S. 281-284.
- [153] Technical Data Sheet zu Membranpräparation nicotinischer Rezeptor in IMR-32 Zellen, *human Nicotinic Acetylcholine Receptor*, PerkinElmer Inc, USA.
- [154] Technical Data Sheet zu Membranpräparation Glutamat Rezeptor in CHO Zellen, human Glutamate mGlu_{5A} Receptor, PerkinElmer Inc, USA.
- [155] Protokoll in vitro Synthese mit Expressionssystem aus Retikulozytenlysat, *Technical Manual TNT Quick Coupled Transcription Translation System*, Part# TM045 (2009), Promega Corporation, USA
- [156] Protokoll in vitro Synthese mit Expressionssystem aus E.coli Extrakt, *Technical Manual S30 T7 High-Yield Protein Expression System*, Part# TM306 (2008), Promega Corporation, USA

9 Anhang

9.1 A1 Chemikalien

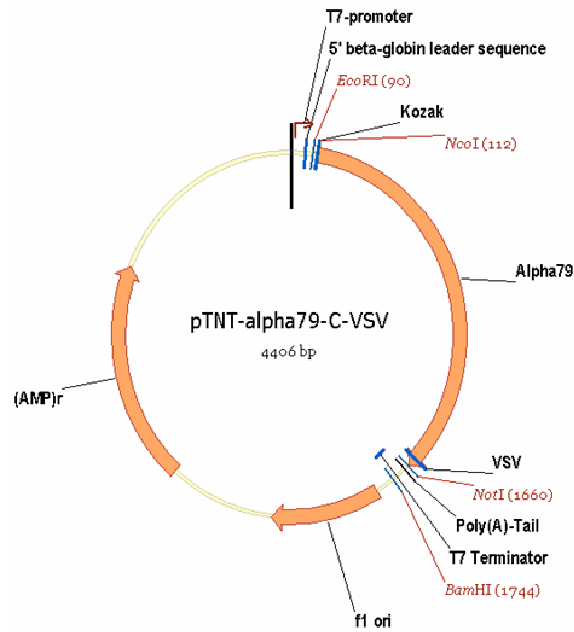
	MW [g/mol]	Hersteller	Artikel- Nummer
Aceton		Fluka, Schweiz	
Decan		Sigma-Aldrich, Deutschland	
Ethanol (abs)		Sigma-Aldrich, Deutschland	
Isopropanol		Fluka, Schweiz	

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline		Invitrogen, Deutschland	14190
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	292,24	Sigma-Aldrich, Deutschland	
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	380,35	Roth, Deutschland	3054.1
Kaliumchlorid	74,5	Sigma-Aldrich, Deutschland	
Kaliumhexacyanoferrat(II) trihydrat (K ₄ Fe(CN) ₆)	422,39	Sigma-Aldrich, Deutschland	P3289
Natriumchlorid	58,44	Riedel.de.Haen	
N-Methyl-D-Glucamin (NMG)	195,22	Sigma-Aldrich, Deutschland	M2004
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)		VWR, Deutschland	28808294

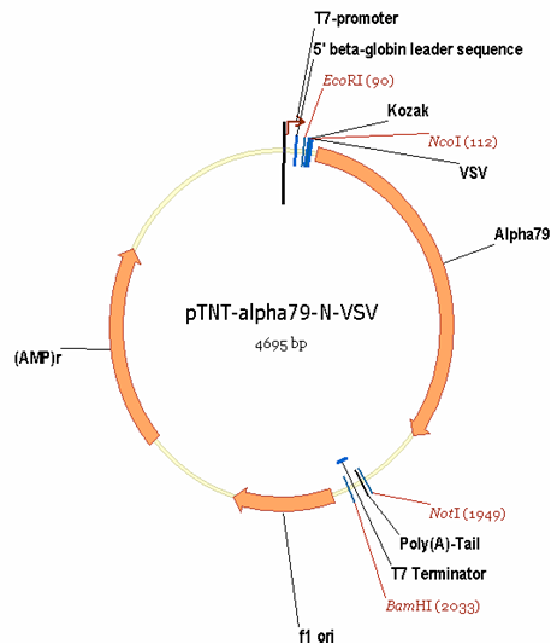
Octadecanthiol	286,58	Sigma-Aldrich, Deutschland	O1858
2,3-di-O-Phytanyl-glycerol-1- tetraethylene glycol-D,L- Liponsäureester (DPTL)		sythetisiert am Max-Planck- Institut für Polymerforschung Mainz, Deutschland	
1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3- phosphocholine (DPhyPC)	846,26	Avanti polar lipids, USA	850356
3-sn-Phosphatidylcholin Lösung (PC)	ca 780	Fluka, Schweiz	61757

Octadecylamine	269,51	Sigma-Aldrich, Deutschland	74750
S30 T7 High Yield Protein Expression System (Expressionssystem aus E.coli)		Promega GmbH, Deutschland	L1110
TnT®Quick Coupled Transcription/Translation System (Expressionssystem aus Reticulozyten)		Promega GmbH, Deutschland	L1170
Membranpräparation nAChR reich aus Torpedo marmorata		Gruppe von Maurice Goeldner Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives Université de Strasbourg	
Membranpräparation Human Nicotinic Receptors in IMR-32 Zellen		PerkinElmer, Deutschland	RBHNICM400UA
Membranpräparation Human Glutamate mGlu5a Receptor in CHO Zellen		PerkinElmer, Deutschland	ES-555-M400UA
Carbamoylcholin Chlorid (99%)	182,65	Sigma- Aldrich, Deutschland	240-9
L-Glutaminsäure	147,13	Sigma- Aldrich, Deutschland	G8415
α -Bungarotoxin		Sigma- Aldrich, Deutschland	T3019
WesternBreeze™ Chemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit		Invitrogen, Deutschland	46-7003
Monoclonal Anti-Nicotinic Acetylcholine Receptor, $\alpha 7$ Subunit (Clone mAb 306)		Sigma- Aldrich, Deutschland	M-220
Ms X Rb IgG-Cy5		Chemicon International, USA	Ap188s
Monoclonal Anti-VSV Glycoprotein antibody (Clone P5D4 IgG)		Roche, Schweiz	11667351001

9.2 A2 Plasmidkarte und Sequenzen



(A) *pTNT-alpha79-C-VSV*
(VSV-Tag am C-Terminus, Insert 1548 bp zwischen *NotI* und *NcoI* Schnittstellen)



(B) *pTNT-alpha79-N-VSV*
(VSV-Tag am C-Terminus, Insert 1837 bp zwischen *NotI* und *NcoI* Schnittstellen)

Sequenz $\alpha 7$ (NM_007390)

136								CGG	CCG	GCG	GGG	AGG	CAT	CTG	GCT	GGC
								GCC	GGC	CGC	CCC	TCC	GTA	GAC	CGA	CCG
181	TCT	GGC	CGC	GGC	GCT	GCT	GCA	CGT	GTC	CCT	GCA	AGG	CGA	GTT	CCA	
	AGA	CCG	GCG	CCG	CGA	CGA	CGT	GCA	CAG	GGA	CGT	TCC	GCT	CAA	GGT	
226	GAG	GAG	GCT	GTA	CAA	GGA	GCT	GGT	CAA	GAA	CTA	CAA	CCC	GCT	GGA	
	CTC	CTC	CGA	CAT	GTT	CCT	CGA	CCA	GTT	CTT	GAT	GTT	GGG	CGA	CCT	
271	GAG	GCC	GGT	GGC	CAA	CGA	CTC	GCA	GCC	GCT	CAC	CGT	GTA	CTT	CTC	
	CTC	CGG	CCA	CCG	GTT	GCT	GAG	CGT	CGG	CGA	GTG	GCA	CAT	GAA	GAG	
316	CCT	GAG	CCT	CCT	GCA	GAT	CAT	GGA	TGT	GGA	TGA	GAA	GAA	CCA	AGT	
	GGA	CTC	GGA	GGA	CGT	CTA	GTA	CCT	ACA	CCT	ACT	CTT	CTT	GGT	TCA	
361	TTT	AAC	CAC	CAA	CAT	TTG	GCT	ACA	AAT	GTC	TTG	GAC	AGA	TCA	CTA	
	AAA	TTG	GTG	GTT	GTA	AAC	CGA	TGT	TTA	CAG	AAC	CTG	TCT	AGT	GAT	
406	TTT	GCA	GTG	GAA	CAT	GTC	TGA	GTA	CCC	CGG	AGT	GAA	AAA	TGT	TCG	
	AAA	CGT	CAC	CTT	GTA	CAG	ACT	CAT	GGG	GCC	TCA	CTT	TTT	ACA	AGC	
451	TTT	TCC	AGA	TGG	CCA	GAT	TTG	GAA	ACC	AGA	CAT	TCT	CCT	CTA	TAA	
	AAA	AGG	TCT	ACC	GGT	CTA	AAC	CTT	TGG	TCT	GTA	AGA	GGA	GAT	ATT	
496	CAG	TGC	AGA	TGA	ACG	CTT	TGA	TGC	CAC	ATT	CCA	CAC	CAA	CGT	CTT	
	GTC	ACG	TCT	ACT	TGC	GAA	ACT	ACG	GTG	TAA	GGT	GTG	GTT	GCA	GAA	
541	GGT	GAA	TGC	ATC	TGG	GCA	TTG	CCA	GTA	TCT	CCC	TCC	AGG	CAT	ATT	
	CCA	CTT	ACG	TAG	ACC	CGT	AAC	GGT	CAT	AGA	GGG	AGG	TCC	GTA	TAA	
586	CAA	GAG	CTC	CTG	CTA	CAT	CGA	TGT	ACG	CTG	GTT	CCC	TTT	TGA	TGT	
	GTT	CTC	GAG	GAC	GAT	GTA	GCT	ACA	TGC	GAC	CAA	GGG	AAA	ACT	ACA	
631	GCA	GCA	GTG	CAA	ACT	GAA	GTT	TGG	GTC	CTG	GTC	CTA	TGG	AGG	GTG	
	CGT	CGT	CAC	GTT	TGA	CTT	CAA	ACC	CAG	GAC	CAG	GAT	ACC	TCC	CAC	
676	GTC	CTT	GGA	CCT	GCA	GAT	GCA	AGA	GGC	AGA	TAT	CAG	CAG	CTA	TAT	
	CAG	GAA	CCT	GGA	CGT	CTA	CGT	TCT	CCG	TCT	ATA	GTC	GTC	GAT	ATA	
721	CCC	CAA	TGG	AGA	ATG	GGA	TCT	CAT	GGG	AAT	CCC	TGG	CAA	AAG	GAA	
	GGG	GTT	ACC	TCT	TAC	CCT	AGA	GTA	CCC	TTA	GGG	ACC	GTT	TTC	CTT	
766	TGA	GAA	GTT	CTA	TGA	ATG	CTG	CAA	AGA	GCC	ATA	CCC	AGA	TGT	CAC	
	ACT	CTT	CAA	GAT	ACT	TAC	GAC	GTT	TCT	CGG	TAT	GGG	TCT	ACA	GTG	
811	CTA	CAC	AGT	AAC	CAT	GCG	CCG	TAG	GAC	ACT	CTA	CTA	TGG	CCT	CAA	
	GAT	GTG	TCA	TTG	GTA	CGC	GGC	ATC	CTG	TGA	GAT	GAT	ACC	GGG	GTT	
856	CCT	GCT	CAT	TCC	TTG	TGT	GCT	CAT	TTC	AGC	CCT	GGC	TTT	GCT	GGT	
	GGA	CGA	GTA	AGG	AAC	ACA	CGA	GTA	AAG	TCG	GGA	CCG	AAA	CGA	CCA	
991	GAT	CAT	GCC	AGC	AAC	ATC	TGA	TTC	CGT	GCC	CTT	GAT	AGC	ACA	GTA	
	CTA	GTA	CGG	TCG	TTG	TAG	ACT	AAG	GCA	CGG	GAA	CTA	TCG	TGT	CAT	
1036	CTT	CGC	CAG	CAC	CAT	GAT	CAT	CGT	GGG	CCT	CTC	AGT	GGT	CGT	GAC	
	GAA	GCG	GTC	GTG	GTA	CTA	GTA	GCA	CCC	GGA	GAG	TCA	CCA	GCA	CTG	
1081	AGT	GAT	TGT	GCT	GCG	ATA	TCA	CCA	CCA	TGA	CCC	TGA	TGG	TGG	CAA	
	TCA	CTA	ACA	CGA	CGC	TAT	AGT	GGT	GGT	ACT	GGG	ACT	ACC	ACC	GTT	
1126	AAT	GCC	TAA	GTG	GAC	CAG	GAT	CAT	TCT	TCT	GAA	TTG	GTG	TGC	ATG	
	TTA	CGG	ATT	CAC	CTG	GTC	CTA	GTA	AGA	AGT	CTT	AAC	CAC	ACG	TAC	
1171	GTT	TCT	GCG	CAT	GAA	GAG	GCC	GGG	AGA	GGA	CAA	GGT	GCG	GCC	GGC	
	CAA	AGA	CGC	GTA	CTT	CTC	CGG	CCC	TCT	CCT	GTT	CCA	CGC	CGG	CCG	
1216	TTG	TCA	GCA	CAA	GCC	TCG	GCG	CTG	CAG	CCT	GGC	CAG	TGT	GGA	GCT	
	AAC	AGT	CGT	GTT	CGG	AGC	CGC	GAC	GTC	GGA	CCG	GTC	ACA	CCT	CGA	
1261	GAG	CGC	AGG	TGC	GGG	GCC	ACC	CAC	CAG	CAA	TGG	CAA	CCT	GCT	CTA	
	CTC	GCG	TCC	ACG	CCC	CGG	TGG	GTG	GTC	GTT	ACC	GTT	GGA	CGA	GAT	
1306	CAT	TGG	CTT	CCG	AGG	CCT	GGA	GGG	CAT	GCA	CTG	TGC	CCC	AAC	TCC	
	GTA	ACC	GAA	GGC	TCC	GGA	CCT	CCC	GTA	CGT	GAC	ACG	GGG	TTG	AGG	
1351	AGA	CTC	TGG	GGT	CGT	GTG	TGG	TCG	TTT	GGC	CTG	CTC	CCC	AAC	ACA	
	TCT	GAG	ACC	CCA	GCA	CAC	ACC	AGC	AAA	CCG	GAC	GAG	GGG	TTG	TGT	
1396	TGA	TGA	GCA	CCT	CAT	GCA	TGG	TAC	ACA	CCC	CTC	TGA	TGG	GGA	CCC	
	ACT	ACT	CGT	GGA	GTA	CGT	ACC	ATG	TGT	GGG	GAG	ACT	ACC	CCT	GGG	
1441	CGA	CCT	GGC	CAA	GAT	CCT	GGA	GGA	GGT	CCG	CTA	CAT	CGC	CAA	CCG	
	GCT	GGA	CCG	GTT	CTA	GGA	CCT	CCT	CCA	GGC	GAT	GTA	CGC	GTT	GGC	
1486	CTT	CCG	CTG	CCA	GGA	TGA	GAG	TGA	GGT	GAT	CTG	CAG	TGA	GTG	GAA	
	GAA	GGC	GAC	GGT	CCT	ACT	CTC	ACT	CCA	CTA	GAC	GTC	ACT	CAC	CTT	
1531	GTT	TGC	GGC	CTG	TGT	GGT	GGA	CCG	CTT	GTG	CCT	CAT	GGC	CTT	TTC	
	CAA	ACG	CCG	GAC	ACA	CCA	CCT	GGC	GAA	CAC	GGA	GTA	CCG	GAA	AAG	
1576	GGT	TTT	TAC	CAT	CAT	CTG	CAC	CAT	CGG	CAT	CCT	CAT	GTC	AGC	CCC	
	CCA	AAA	ATG	GTA	GTA	GAC	GTG	GTA	GCC	GTA	GGA	GTA	CAG	TCG	GGG	
1621	AAA	CTT	TGT	GGA	GGC	TGT	GTC	CAA	AGA	CTT	TGC					
	TTT	GAA	ACA	CCT	CCG	ACA	CAG	GTT	TCT	GAA	ACG					

9.3 A3 Mathematica

I Berechnung von R und C

```

Clear[w1] (* Frequenz, bei der gemessen wurde *)
Clear[R1] (*Widerstand vorher*)
Clear[C1] (*Kapazität vorher*)
Clear[R2] (*Widerstand nachher*)
Clear[C2] (*Kapazität nachher*)

w1 = 3141 * 10^-3; (* oder 628*10^-3 *)

Solve[
  {R1 / (1 + (w1 * R1 * C1)^2) == 154543.33 (* MW Z' vorher *),
    ((-1) * (w1 * C1 * (R1^2)) / (1 + (w1 * R1 * C1)^2)) == -1.99902 * 10^6
    (* MW -Z'' vorher *)},
  {R1, C1}]

Solve[
  {R2 / (1 + (w1 * R2 * C2)^2) == 151687.6 (* MW Z' nachher *),
    ((-1) * (w1 * C2 * (R2^2)) / (1 + (w1 * R2 * C2)^2)) == -1.95503 * 10^6
    (* MW -Z'' nachher *)},
  {R2, C2}]

Out[16]= {{C1 -> 1.58317 * 10^-7, R1 -> 2.60119 * 10^7}}
Out[17]= {{C2 -> 1.61872 * 10^-7, R2 -> 2.53491 * 10^7}}

```

II Berechnung der Standardabweichung σ von R und C

Clear[w1] (* Frequenz, bei der gemessen wurde *)

Clear[Rd] (* Standardabweichung von R *)

Clear[Cd] (* Standardabweichung von C *)

Clear[R1] (* errechneter Wert für R *)

Clear[C1] (* errechneter Wert für C *)

D[(R1 / (1 + (w1*R1*C1)^2)), R1] (* Ableitung Z' nach R *)

D[(R1 / (1 + (w1*R1*C1)^2)), C1] (* Ableitung Z' nach C *)

D[(-1)*(w1*C1*(R1^2)) / (1 + (w1*R1*C1)^2), R1] (* Ableitung Z'' nach R *)

D[(-1)*(w1*C1*(R1^2)) / (1 + (w1*R1*C1)^2), C1] (* Ableitung Z'' nach C *)

$$-\frac{2 Q1^2 R1^2 w1^2}{(1 + Q1^2 R1^2 w1^2)^2} + \frac{1}{1 + Q1^2 R1^2 w1^2}$$

$$-\frac{2 Q1 R1^3 w1^2}{(1 + Q1^2 R1^2 w1^2)^2}$$

$$\frac{2 Q1^3 R1^3 w1^3}{(1 + Q1^2 R1^2 w1^2)^2} - \frac{2 Q1 R1 w1}{1 + Q1^2 R1^2 w1^2}$$

$$\frac{2 Q1^2 R1^4 w1^3}{(1 + Q1^2 R1^2 w1^2)^2} - \frac{R1^2 w1}{1 + Q1^2 R1^2 w1^2}$$

w1 = 3141*10^-3; (* Frequenz in [1/s] *)

R1 = 26513400; (*errechneter Wert für Membranwiderstand *)

C1 = 1.36227*10^-7; (*errechneter Wert für Kapazität *)

$$\text{Solve}\left[\left\{\text{Sqrt}\left[\left(\left(-\frac{2 C1^2 R1^2 w1^2}{(1 + C1^2 R1^2 w1^2)^2} + \frac{1}{1 + C1^2 R1^2 w1^2}\right) * Rd\right)^2 + \left(\left(-\frac{2 C1 R1^3 w1^2}{(1 + C1^2 R1^2 w1^2)^2}\right) * Cd\right)^2\right]\right\} ==$$

1815.88 (*Standardabweichung des Mittelwertes von Z'*),

$$\text{Sqrt}\left[\left(\left(\left(\frac{2 C1^3 R1^3 w1^3}{(1 + C1^2 R1^2 w1^2)^2} - \frac{2 C1 R1 w1}{1 + C1^2 R1^2 w1^2}\right) * Rd\right)^2 + \left(\left(\frac{2 C1^2 R1^4 w1^3}{(1 + C1^2 R1^2 w1^2)^2} - \frac{R1^2 w1}{1 + C1^2 R1^2 w1^2}\right) * Cd\right)^2\right)\right] == \mathbf{8064.97}$$

(*Standardabweichung des Mittelwertes von Z''*)

{Rd, Cd}

$$\left\{\{Rd \rightarrow -147013., Cd \rightarrow -4.81034 \times 10^{-10}\}, \{Rd \rightarrow -147013., Cd \rightarrow 4.81034 \times 10^{-10}\}, \{Rd \rightarrow 147013., Cd \rightarrow -4.81034 \times 10^{-10}\}, \{Rd \rightarrow 147013., Cd \rightarrow 4.81034 \times 10^{-10}\}\right\}$$

Lebenslauf

Danksagung
