

# Entwicklung eines Biochips für elektrophysiologische Untersuchungen von Ionenkanälen

vorgelegt von  
**Niels Fertig**  
aus Hamburg  
April 2002



Dissertation am  
Center for NanoScience und an der Sektion Physik  
Lehrstuhl für experimentelle Halbleiterphysik  
Prof. Dr. J. P. Kotthaus  
Ludwig-Maximilians-Universität, München

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Motivation . . . . .	2
<b>2</b>	<b>Präparation</b>	<b>10</b>
2.1	Verwendete Substrate . . . . .	10
2.1.1	Silizium . . . . .	10
2.1.2	Kristallines Quarz . . . . .	11
2.1.3	Glas . . . . .	14
2.1.4	Amorphes Quarz . . . . .	15
2.2	Methoden der Mikro- bzw. Nanostrukturierung . . . . .	17
2.2.1	Ätzen latenter Ionenspuren . . . . .	18
2.2.2	Sputtern mit fokussiertem Ionenstrahl . . . . .	33
2.2.3	Reaktives Ionenätzen . . . . .	35
2.2.4	Laserablation . . . . .	37
<b>3</b>	<b>Experimente</b>	<b>44</b>
3.1	Modelle des Ladungstransports durch Ionenkanäle . . . . .	44
3.2	Experimenteller Aufbau . . . . .	50
3.2.1	Klassisches Patch Clamp . . . . .	50
3.2.2	Integration des Patch Clamp Chip im Setup . . . . .	53
3.3	Experimente mit artifiziellen Lipidmembranen . . . . .	56
3.3.1	Biophysik von Lipidmembranen . . . . .	57
3.3.2	Präparation von freitragenden Lipidmembranen . . . . .	60
3.3.3	Gramicidin . . . . .	63
3.3.4	Alamethicin . . . . .	68
3.4	Experimente an Zellen . . . . .	71
3.4.1	Ganzzelleableitungen . . . . .	75
3.4.2	N1E-115 Neuroblastomzellen . . . . .	77

3.4.3	CHO Zellen . . . . .	81
3.5	Kombinierte elektrische und optische Experimente an Einzelkanälen . . . . .	88
3.5.1	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer . . . . .	91
3.5.2	Fluoreszenzmarkierte Gramacidine . . . . .	93
3.5.3	Optischer Aufbau . . . . .	99
3.5.4	Korrelation optischer und elektrischer Aktivität . . . . .	99
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>106</b>
4.1	Patch Clamp Chips . . . . .	106
4.2	Lipidmembranen in mikrostrukturierten Aperturen . . . . .	110
4.3	Sealausbildung bei Experimenten an Zellen . . . . .	111
4.3.1	Zelladhäsion an Festkörpern oder das Ziel ist der Seal	112
4.3.2	Automatisierte Sealbildung . . . . .	114
4.4	Optimierte Messbedingungen beim Patch Clamp Chip . . . . .	116
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>119</b>
5.1	Zusammenfassung . . . . .	119
5.2	Ausblick . . . . .	120

# Kapitel 1

## Einleitung

Die Kombination von physikalischen und biologischen Methoden und Technologien gewinnt in den sogenannten Life Sciences zunehmend an Bedeutung. Bei vielen Herausforderungen der Biotechnologie, der Biosensorik oder der Pharmakologie haben sich physikalische Messtechniken und Problemlösungsstrategien als sehr erfolgreich erwiesen.

Ein herausragendes Beispiel biophysikalischer Methodik ist die Patch Clamp Technik [Neh 76, Neh 78b, Neh 92a, Neh 92b, Sak 95b]. Auf dem physikalischen Prinzip der Strom- bzw. Spannungsmessung beruhend, hat die Patch Clamp Technik unser Verständnis der Funktion von Ionenkanälen, mit Ionenkanälen gekoppelten Proteinen und Rezeptoren, sowie deren Bedeutung in komplexen Zusammenhängen der Zellfunktion ausserordentlich erweitert. Auf der Patch Clamp Technik basierend haben sich darüberhinaus verschiedene wissenschaftliche Anwendungen ergeben, welche den klassischen Einsatzbereich der Physiologie, Pharmakologie oder Neurologie bereits verlassen haben. Diese sind unter anderem sowohl im Bereich der Biotechnologie [Kas 96, Ake 99], in der Biosensorik [Tie 90, Kie 91, Ott 93, Ott 96, Cor 97], sowie auch in der Untersuchung von Zell-Halbleiterhybriden [Wei 96, Par 99] zu finden.

Bei der Untersuchung von Porenbildnern [Woo 92, Son 96] in künstlichen Lipidmembranen kommt das gleiche Messprinzip zum Einsatz und bildet auch dort die Grundlage für weiterführende biophysikalische Untersuchungen [Bez 94, Gu 99, Kor 00]. Entsprechende Theorien zur Funktionsweise von Ionenkanälen [Eis 98a, Eis 98b, San 98], sowie theoretische Beschreibungen physikalischer Phänomene im Zusammenhang mit Ionenkanälen [Lub 99] lassen sich durch Einzelkanaluntersuchungen mittels der Patch

Clamp Technik sehr präzise überprüfen.

Neben den Erkenntnissen über die Ionenkanalproteinstruktur [Unw 93, Unw 95, Doy 98] durch z.B. Röntgenstrukturanalysen an kristallisiertem Protein, lassen sich durch gezielte Veränderungen der Aminosäuresequenzen des Kanalproteins durch die sogenannte site directed mutagenesis [Stü 89, McC 94] Kanalmutanten erstellen, deren Funktionalität mittels der Patch Clamp Technik evaluiert werden kann. Auf diese Weise lassen sich höchst aussagekräftige Untersuchungen zur Struktur-Funktionsbeziehung der Ionenkanalproteine durchführen.

Die Patch Clamp Technik ist eine äusserst vielseitige, in den verschiedensten Bereichen der Life Sciences eingesetzte Methode, deren Bedeutung für die Life Sciences, nicht zuletzt wegen ihrer Einzelmolekülaufösung, weiterhin steigt.

## 1.1 Motivation

In der klassischen Patch Clamp Technik werden Glaspipetten verwendet, die in dafür entwickelten Ziehgeräten, sogenannten Pullern, auf feine Öffnungsdurchmesser von etwa einem Mikrometer gezogen werden. Dies geschieht durch Erhitzen einer Glaskapillare bis an die Schmelztemperatur und kontrolliertes Ziehen an beiden Enden der Kapillare in mehreren Schritten (Abb. 1.1).

Die Glaspipette wird mit Elektrolytlösung befüllt, welche durch eine Elektrode im Pipetteninneren kontaktiert und mit einem Verstärker verbunden wird (Abb. 1.2). Die Pipettenspitze wird mit einem Mikromanipulator auf die Membran einer Zelle aufgesetzt wobei die Zellmembran durch leichten Unterdruck in die Pipettenspitze eingesaugt wird. In der die Zelle umgebenden Elektrolytlösung ist die Gegenelektrode positioniert, so dass ein geschlossener Stromkreis über die Zellmembran definiert ist. Aufgrund des elektrisch sehr dichten Widerstandes von einigen  $G\Omega$ , dem sogenannten  $G\Omega$ -Seal, zwischen Zellmembran und Glaspipette kann der Zelle nun ein bestimmtes Haltepotential aufgeprägt werden. Daher lassen sich sehr kleine Ströme über die Zellmembran messen.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die Patch Clamp Technik mittels planarer Chiptechnologie auszuführen. Es sollte die Glaspipette, die üblicherweise für die Patch Clamp Technik eingesetzt wird, durch einen mikrostrukturierten Patch Clamp Chip ersetzt werden (Abb. 1.2). Der Patch Clamp Chip sollte nicht nur die Funktion der Pipette übernehmen, sondern

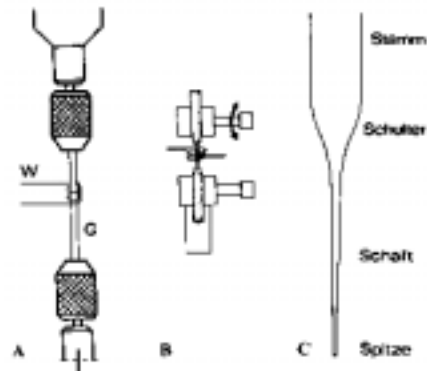


Abbildung 1.1: Typische Anordnung eines Ziehgeräts (Pullers) für Patch Clamp Pipetten. Eine Glaskapillare wird fest in eine Heizdrahtwendel montiert (1.) und nach Erhitzen mit definierter Kraft auf einen feinen Öffnungsdurchmesser ausgezogen (2., siehe Abb. 1.2).

aufgrund seiner Geometrie messtechnische Vorteile bieten sowie eine erhöhte Funktionalität der Messsonde erlauben.

Eine Limitation bei der Patch Clamp Technik ist die begrenzte Bandbreite von einigen kHz, mit denen die Experimente durchgeführt werden können. Aufgrund des Hintergrundrauschens muss das Messsignal tiefpassgefiltert werden, um das notwendige Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erzielen. Lässt man Bandbreiten von einigen zehn kHz zu, so geht das gemessene Stromsignal, das oft nur wenige pA beträgt, im Hintergrundrauschen unter. Die Dynamik von Konformationsänderungen der Kanalproteine, die letztlich verantwortlich für das Öffnen und Schliessen des Kanals sind, läuft jedoch nicht nur auf Zeitskalen von ms ab, sondern auch weitaus schneller. Eine Zielvorgabe bei der Entwicklung der Patch Clamp Technik war daher die Minimierung des Hintergrundrauschens [Ben 95, Rae 92b, Lev 98], um zu höheren Filterfrequenzen und damit zu höherer Dynamik der Messungen zu gelangen. Insbesondere ist dies auch relevant für die Untersuchung der Leitwerte von potentiellen Subzuständen [Läu 85] des Ionenkanals, die bei gegebenem Hintergrundrauschen und entsprechend begrenzter Zeitauflösung des Experiment nicht detektiert werden können. Im Gegenteil können nicht aufgelöste Subzustände im Leitwert dazu führen, daß die Messung verrauschter erscheint, da das ständige Wechseln zwischen nicht-aufgelösten, aber unter-

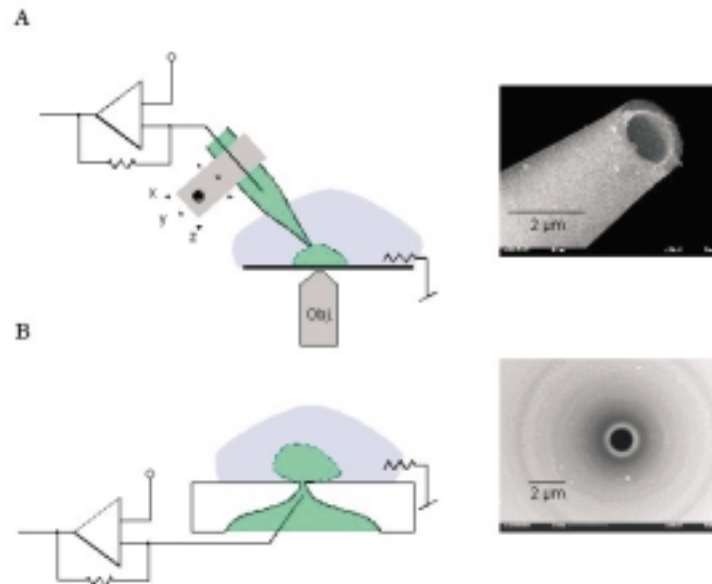


Abbildung 1.2: In dieser Grafik wird die klassische Patch Clamp Technik skizziert (A) und mit dem neuen Ansatz des chip-basierten Messens (B) verglichen. Die übliche Glaspipette wird durch einen mikrostrukturierten, planaren Chip ersetzt. Die beiden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen jeweils die feine Öffnung der Pipettenspitze bzw. im Chip.

schiedlichen Stromniveaus als Rauschen detektiert wird [Läu 85].

Neben vielen Parametern, welche das Rauschen in der Patch Clamp Messung beeinflussen, sind der Serienwiderstand der Glaspipette, sowie deren Kapazität relevant [Lev 98]. Der Serienwiderstand der Pipette ist der elektrische Widerstand der zwischen dem elektrolytgefüllten Pipetteninneren und dem die Pipette umgebenden Elektrolytbad gemessen wird. In Abb. 1.4 ist die Situation graphisch dargestellt. Das thermische Spannungsrauschen des Serienwiderstands der Pipette in Reihe geschaltet mit jeglicher Kapazität z.B. der Zellmembran oder der Pipette selber, ergibt ein Stromrauschen in der Messung. Ebenso führt jede Kapazität der Anordnung, die in Reihe mit dem thermischen Spannungsrauschen der Eingangsspannung

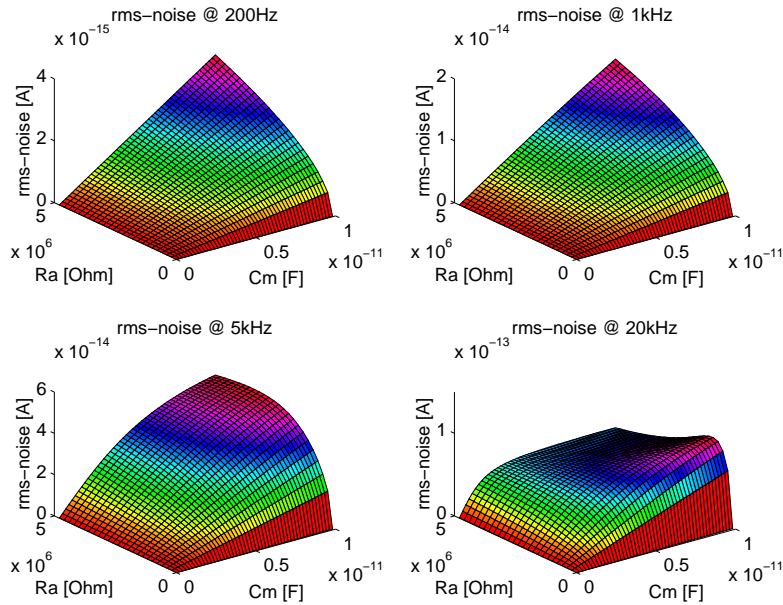


Abbildung 1.3: *Quantitative Simulation der aus Serienwiderstand und Kapazität der Messsonde resultierenden Rauschkomponente. Die Berechnungen sind für verschiedene Frequenzbänder durchgeführt, die Abschneidefrequenz ist jeweils angegeben. Die deutliche Zunahme des Rauschens für steigende Kapazität und Widerstand, sowie auch bei steigender Bandbreite ist zu beachten.*

des Vorverstärkers ist, zu einem Stromrauschen.

Bei normalen Patch Pipetten liegt der Serienwiderstand der Pipette in Standard-Ringerlösung je nach Spitzenöffnungsdurchmesser bei einigen  $M\Omega$  bis zu einigen zehn  $M\Omega$ . Die Kapazität der einfachen Pipette beträgt einige pF. Im Vergleich dazu ist der Serienwiderstand beim Patch Clamp Chip aus Glas reduziert aufgrund des relativ kurzen Kanals im Glassubstrat von etwa  $20 \mu\text{m}$ , der lange Hals wie bei der Pipette entfällt. Typische Serienwiderstände für Aperturen im Chip von einem Mikrometer Durchmesser liegen bei etwa 3-5  $M\Omega$ . Durch die geeignetere Geometrie des Chips im Vergleich zur Pipette ist die Kapazität von einigen pF bei der Pipette unter ein pF beim Chip reduziert worden. Es entfallen z.B. die dünnen Wände wie bei der Pipette, die maßgeblich für die Kapazität verantwortlich sind.



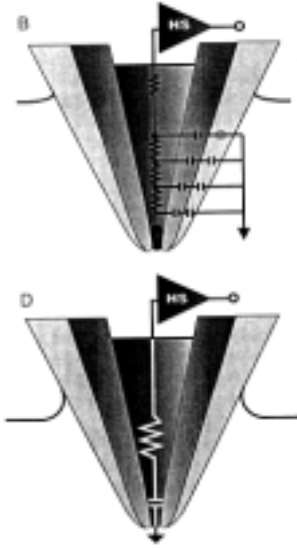


Abbildung 1.4: Einfaches Ersatzschaltbild der Patch Pipette. Der Vorverstärker (headstage, HS) misst den Strom über die Pipettenspitze, wobei durch die Reihenschaltung des Serienwiderstandes der Pipette mit der Kapazität der Pipettenwand (B) und der Kapazität der Zellmembran in der Pipettenspitze (D) Rauschen induziert wird.

Wie stark sich die beiden Parameter Serienwiderstand und Kapazität der Messsonde auf das Rauschen auswirken, ist in der Simulation in Abb. 1.3 visualisiert. Dort wird für verschiedene Größen der Parameter die entsprechende Rauschkomponente berechnet [Won 90], wobei zu betonen ist, daß dies lediglich eine von vielen Rauschkomponenten bei der Patch Clamp Messung ist. Die spektrale Dichte  $S_i$  des Stromrauschens lässt sich nach Ref. [Won 90] wie folgt berechnen:

$$S_{i(f)}^2 = 4kT \cdot (2\pi f R_a C_m)^2 / [R_a \cdot (1 + (2\pi f R_a C_m)^2)], \quad (1.1)$$

mit  $f$  als der Abschneidefrequenz des Tiefpassfilters,  $k$  der Boltzmann Konstante und  $T$  der Temperatur. Die positive Auswirkung der Verringerung

von Kapazität und Serienwiderstand auf das Rauschniveau geht eindeutig aus der Berechnung hervor. Da sich das Gesamtrauschen  $R_{ges}$  aus der Summe der einzelnen, quadrierten Rauschkomponenten ergibt :

$$R_{ges} = \sqrt{R_1^2 + R_2^2 + \dots + R_n^2}, \quad (1.2)$$

dominiert die jeweils größte Rauschkomponente. Insbesondere bei Experimenten an künstlichen Lipidmembranen, bei denen die Kapazität der Membran selber besonders ins Gewicht fällt, ist die in Abb. 1.3 berechnete Rauschkomponente die dominierende.

Die planare Chipgeometrie bietet jedoch nicht nur Vorteile bei elektrischen Messungen, sondern ist insbesondere auch für die Anwendung von Rastersondenverfahren geeignet. Mechanische Rastersondenverfahren wie die Rasterkraftmikroskopie (AFM) [Bin 86] lassen sich auf der planaren Oberfläche des Chips leicht einsetzen. Mit Pipetten gepatchte Zellen und Membranflecken wurden verschiedentlich mit AFM-Methoden untersucht, wobei das AFM sowohl als Mittel zur Bildgebung als auch zur quantitativen Untersuchung der Zelldynamik eingesetzt wurde [Hör 95, Zha 01]. Der experimentelle Zugang wird durch die Verwendung der planaren Patch Clamp Chips deutlich vereinfacht. Da sowohl mit der Patch Clamp Technik als auch mit der Rasterkraftspektroskopie Einzelmolekülaufösung erreicht wird [Rad 92, Gim 99], erlaubt die Kombination dieser Methoden sehr detaillierte, hochaufgelöste Untersuchungen z.B. zu Struktur-Funktionsbeziehungen von Ionenkanalproteinen. Das gleiche gilt auch für die Kombination von Patch Clamp und optischen Rastersondenverfahren wie der Nahfeldmikroskopie mittels sehr spitzer Lichtfasern (SNOM) [Tra 94, Lew 99]. Mit optischen Nahfeldmethoden lässt sich zudem auch Spektroskopie in der Zelle betreiben [Lei 01].

Die in dieser Arbeit entwickelten Biochips sind ein erster Schritt auf dem Weg zum integrierten Proteomik-Chip, der eine Vielzahl komplexer Untersuchungen auf kleinstem Raum und in kürzester Zeit ermöglichen wird. Patch Clamp ist eine wichtige Methode bei der Untersuchung von Ionenkanalproteinen, viele weitere werden ebenfalls auf einem Proteomik-Chip integriert sein, so dass dieser als Proteinanalyse-Werkbank dienen wird. Die Entwicklungen hin zu hochintegrierten lab-on-chip Anwendungen machen enorme Fortschritte [Bla 98, Advalytix] und die weitere Kombination verschiedener Techniken bietet kaum überschaubare Möglichkeiten. Insbesondere die Kombination von zum Teil recht aufwendigen, mit klassischen Methoden der

Halbleiterlithographie gefertigten Festkörperchips und flexiblen Polymerchips, hergestellt durch vergleichsweise einfache Soft Lithography [Xia 98], hat ein grosses Potential für den lab-on-chip Bereich. Im Fall der hier vorgestellten Patch Clamp Chips kann z.B. mithilfe der Soft Lithography eine PDMS-Schicht strukturiert werden, welche auf den Biochip aufgelegt wird und Mikrofluidikfunktionen übernimmt. Die potentiellen Anwendungen von Patch Clamp Chips mit einer Matrix von Aperturen und entsprechenden Mikrofluidikkomponenten zur Applikation von Wirkstoffen liegen im sogenannten (High Throughput) Screening (HTS) [Den 98, Gon 99, Mir 99, Xu 01], also den frühen Phasen der Pharmakaentwicklung. Patch Clamp wird seit langem im Drug Screening eingesetzt, es stellt den absoluten Gold Standard bei der Evaluation von Ionenkanal-aktiven Substanzen dar. Der entscheidende Nachteil der Patch Clamp Technik ist dabei der hohe technische und personelle Aufwand, die Komplexität der Untersuchung, sowie der geringe Durchsatz. Die Automatisierung und vor allem Parallelisierung der Patch Clamp Technik sind daher ein lang ersehntes Ziel der Pharmaindustrie.

Die Arbeit ist wie folgt gegliedert:

- Das **Kapitel 2** beschreibt die Herstellung der Patch Clamp Chips, wobei auf verschiedene Substrate und Prozessierungstechniken detailliert eingegangen wird.
- In **Kapitel 3** werden die durchgeführten Experimente vorgestellt. Es werden die verwendeten Messmethoden sowie grundlegende Zusammenhänge bezüglich der Untersuchungen erläutert.
- In **Kapitel 4** werden die experimentellen Ergebnisse beschrieben und ausführlich diskutiert. Zunächst werden die Ergebnisse der Untersuchungen an künstlichen Lipidmembranen dargestellt. Desweiteren werden die elektrophysiologische Charakterisierung von Zellen und abschliessend die Resultate der kombinierten elektrischen und fluoreszenz-optischen Experimente an einzelnen Ionenkanälen aufgezeigt.

- Das **Kapitel 5** fasst die Ergebnisse zusammen und gibt einen Ausblick auf zukünftige Experimente und technologische Anwendungen der vorgestellten Entwicklungen.

## Kapitel 2

# Präparation

Ziel der Präparation ist es, aus einem planaren Substrat Proben herzustellen, welche die Funktion der Patch Clamp Pipette übernehmen können. Einfach ausgedrückt bedeutet dies, eine feine Öffnung in einen Chip einzubringen. Diese Öffnung soll maßgeblich einer Pipettenspitze nachempfunden sein, da nicht nur Aperturgrösse, sondern auch Parameter wie Oberflächenrauigkeit, Geometrie der Öffnung oder chemische Beschaffenheit der Oberfläche eine Auswirkung auf die Eignung der Proben haben.

### 2.1 Verwendete Substrate

In dieser Arbeit wurden verschiedene Substrate verwendet, um Patch Clamp Chips herzustellen, ebenso wurden verschiedene Methoden der Strukturierung evaluiert. Im folgenden sind die entwickelten Strukturierungsverfahren für die verschiedenen Materialien, sowie ihre jeweiligen Vor- und Nachteile beschrieben. Insbesondere werden Mikrostrukturierungsmethoden für Glas vorgestellt, da sich Glas als optimales Substrat für Patch Clamp Chips erwiesen hat.

#### 2.1.1 Silizium

Silizium ist als Ausgangsmaterial für Patch Clamp Chips interessant, da sich gegebenenfalls die Patch Clamp Einheit mit auf dem Halbleiterchip integrierter Elektronik z.B. zur Vorverstärkung des Messsignals verbinden liesse. Zudem sind Methoden zur Bearbeitung und Strukturierung von Silizium als Standardmaterial der Halbleiterindustrie weit entwickelt und etabliert. In

Vorarbeiten wurde daher von uns und anderen [Fer 00a, Fer 00b, Schm 00] ein Siliziumchip für die Patch Clamp Technik entwickelt. Es wird hier nur kurz die Prozessierung und soweit notwendig, die daraus resultierende Geometrie der Siliziumchips dargestellt, eine detaillierte Beschreibung findet sich in [Fer 99].

Am geeignetsten sind niedrig n- bis undotierte, beidseitig polierte Siliziumwafer. Diese werden beidseitig durch Chemical Vapour Deposition (CVD)-Verfahren mit stressarmem Siliziumnitrid beschichtet, als besonders geeignet hat sich hier Low Pressure CVD erwiesen. Mit Hilfe von optischer Lithographie wird eine Ätzmaske auf der Rückseite der Proben definiert, welche durch Reaktives Ionenätzen in das Siliziumnitrid übertragen wird. Durch anisotropes Ätzen in KOH wird in das Silizium-(100) Substrat ein sogenannter V-Graben geätzt, so daß auf der Chipoberseite ein freitragender Siliziumnitridfilm entsteht. In diesen Siliziumnitridfilm wird wieder mit optischer oder auch Elektronenstrahlolithographie und Reaktivem Ionenätzen eine feine Apertur eingebracht. Die Geometrie der Proben sowie typische Strukturgrößen sind in Abb. 2.1 dargestellt.

### 2.1.2 Kristallines Quarz

Die dielektrischen Eigenschaften von Quarz sind besonders gut; amorphes Quarzglas ist daher ein Material das bereits zur Herstellung von Pipetten für rauscharme Patch Clamp Messungen benutzt wird [Lev 93]. Der relativ hohe Schmelzpunkt des Quarzes (ca. 1600 Grad Celsius) erfordert jedoch zur Pipettenherstellung einen Laserpuller (z.B Sutter Instruments), da mit normalen Heizwendelpullern keine ausreichend hohen Temperaturen erreicht werden können. Die Pipettenherstellung ist daher vergleichsweise aufwendig.

Aufgrund der rauscharmen Eigenschaften von Quarz sowie der erwiesenen Fähigkeit mit Quarzpipetten Seals zu erhalten, wurde Quarz als Ausgangsmaterial für Patch Clamp Chips verwendet. Dabei wurde zunächst kristallines Quarz eingesetzt, da die Kristallstruktur für eine relativ einfache anisotrope Strukturierung notwendig ist. Ausgehend von kristallinen Quarzwafern (Krystec, Berlin) im z-Schnitt (00001) mit 200  $\mu\text{m}$  Dicke, wurden etwa 5x5 mm große Chips gesägt. In Analogie zur Prozessierung von Silizium (100) wurde auch hier ein anisotropes, naßchemisches Ätzverfahren in Flußsäure etabliert [Von 83, Dan 90, Hed 93]. Aufgrund der Kristallstruktur des z-Schnitt Quarzes ergeben sich nicht einfache V-Gräben wie beim Silizium, sondern äusserst komplexe Ätzfiguren, die sehr stark von der Geo-

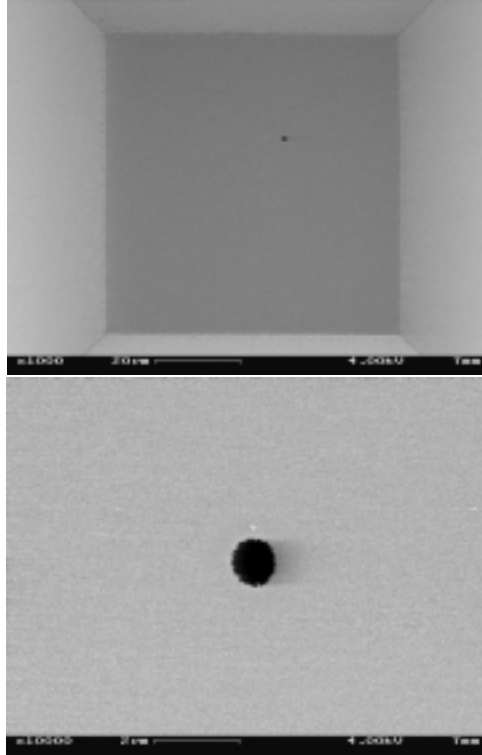


Abbildung 2.1: *Freitragender Siliziumnitridfilm auf Siliziumsubstrat mit feiner Apertur, die durch optische Lithographie definiert wurde.*

metrie der Ätzmaske, der Orientierung der Ätzmaske zur Kristallstruktur sowie vom Ätzmedium abhängen [Ran 98]. Bei Verwendung entsprechender Parameter ist es jedoch möglich, im wesentlichen grabenförmige Strukturen zu erzeugen (Abb. 2.2). Ein weiterer Unterschied zur Siliziumprozessierung liegt in den verwendeten Ätzmedien: im Gegensatz zu KOH wird bei Quarz HF verwendet. Flußsäure ist ein sehr aggressives Medium, das relativ hohe Ätzraten aufweist. Desweiteren unterätzt Flußsäure stark, es werden auch dünne, durch Ätzmasken geschützte Schichten lateral geätzt. Dies verhindert die Verwendung einer auf dem Quarz aufgetragenen isolierenden Schicht, wie z.B. das Siliziumnitrid im Fall des Siliziumchips. Es können daher durch Grabenätzen keine freitragenden Schichten hergestellt werden,

da die aggressive Flußsäure diese ebenfalls in sehr kurzer Zeit durchätzt. Die sehr attraktive Option, in einem zweiten Lithographieschritt eine kleine

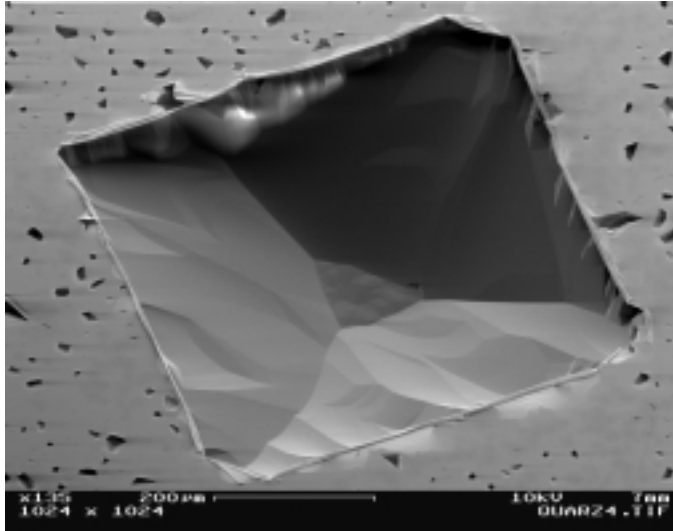


Abbildung 2.2: *Anisotrop geätzter Graben in z-cut Quarz.*

Apertur in einer freitragenden Schicht zu definieren, entfällt, und folglich muss bei Quarz direkt durch anisotropes Ätzen eine feine Öffnung im Substrat selber definiert werden. Dies wurde versucht, indem die Größe und Geometrie der Ätzmaske optimiert wurden, um einen Graben zu ätzen, der gerade durch den Quarzchip hindurch geht, aber eben nur eine sehr kleine Öffnung schafft [Mey 00]. Dieser Zugang gestaltet sich als schwierig, da Variationen in der Dicke des Substrats und bereits kleine Verschiebungen der Ätzmaskenorientierung zur Kristallstruktur zu deutlichen Veränderungen der erreichten Ätztiefen bei gleicher Ätzmaske führen. Routinemäßig können mit diesem Ansatz Öffnungsdurchmesser von etwa  $100\ \mu\text{m}$  erreicht werden, die besten Ergebnisse lagen bei etwa  $5\ \mu\text{m}$  [Mey 00].

Um kleinere Aperturdurchmesser zu erreichen, wurden verschiedene Ansätze evaluiert. Zum Einen wurde beidseitig auf dem Quarzchip Ätzmasken verschiedener Größen aufgebracht, so daß ein Ätzgraben nach einigen  $10\ \mu\text{m}$  verendet und dann eine Öffnung mit dem weitergeätzten Graben der gegenüberliegenden Seite bildet (Abb. 2.3). Es ist damit nicht mehr die exakt passende Größe und Form der Ätzmaske notwendig, sondern





Abbildung 2.3: *Schema der beidseitigen Ätztechnik für die Prozessierung von Quarz.*

durch entsprechend zeitgenaues Stoppen des Ätzvorganges kann die Größe der Apertur bestimmt werden. Mit dieser Art der Prozessierung können deutlich kleinere Öffnungen erzielt werden, die Durchmesser im unteren Mikrometer-, bzw. auch Sub-Mikrometerbereich aufweisen (Abb. 2.4). Ein Nachteil bei diesem Verfahren besteht darin, daß die durch das Ätzen hervorgerufene Rauigkeit des Grabenbodens bis zu 10-20  $\mu\text{m}$  betragen kann, da sich eine Vielzahl von feinen Pyramidenspitzen ausbildet (Abb. 2.5). Es gibt daher keine fest definierte Oberfläche mehr, sondern eben nur ein Oberflächenniveau mit der Ungenauigkeit der Rauigkeit von bis zu 20  $\mu\text{m}$ . Ein genaues Stoppen des Ätzvorganges beim Durchbruch des Ätzgrabens durch die Oberfläche der gegenüberliegenden Seite ist daher nicht einfach und erfordert eine entsprechende Kontrolle.

In einem weiteren Ansatz wurde eine relativ kleine Ätzmaske einseitig verwendet, so daß der entstehende Ätzgraben kurz vor dem Durchätzen des Chips verendet, also ein sogenanntes Sackloch entsteht. In einem zweiten Schritt wurde nun die dem Graben gegenüberliegende Seite vollständig heruntergeätzt (thinning) und, sobald das Sackloch erreicht war, gestoppt. Auf diese Weise wurde ebenfalls die Anforderung von der exakt passenden Ätzmaske auf ein entsprechend zeitgenaues Ätzprotokoll verlagert. Bei all diesen Verfahren, die eine Ätzprozessierung von beiden Seiten beinhalten, ergeben sich aufgrund der Oberflächenrauigkeit durch den Ätzprozess verschiedene Geometrien der dreieckigen Apertur (siehe Abb. 2.6).

### 2.1.3 Glas

Ein wesentliches Ziel bei der Herstellung von Patch Clamp Chips ist es, eine möglichst runde Apertur zu definieren. Die Öffnungen von Patch Clamp Pipettenspitzen sind zwar nicht perfekt kreisförmig, jedoch im wesentlichen rund,

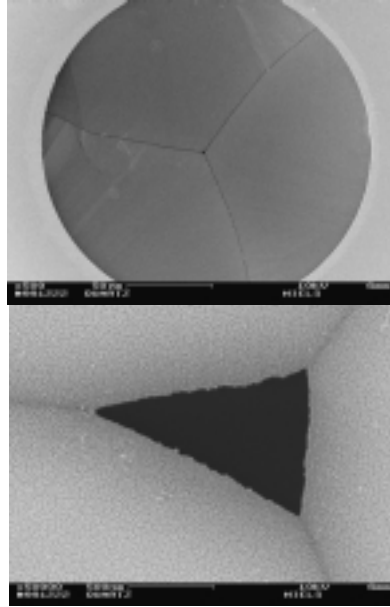


Abbildung 2.4: *Anisotrop geätzte Apertur in kristallinem Quarz.*

bzw. gerundet. Die beschriebene Prozessierung von kristallinem Quarz erlaubt wegen der Kristallstruktur des Quarzes nur die Definition von dreieckigen Löchern. Um sehr kleine und runde Aperturen zu ermöglichen, wurden sogenannte latente Ionenspuren in Glas aufgeätzt. Bei diesem Verfahren wird ein schweres, hochenergetisches Ion durch Glas hindurch geschossen und zerstört dabei lokal die elektronische Struktur des Substrates [Tou 98]. Die dabei entstehende latente Spur im Glas hat eine deutliche höhere Ätzrate als das umgebende ungestörte Material. Daher bildet sich beim nasschemischen Ätzen der bestrahlten Probe entlang der Ionenspur ein konischer Ätzkegel. In Abb. 2.7 ist der Prozess schematisch dargestellt und in Abb. 2.8 ist eine aufgeätzte Ionenspur zu sehen.

#### **2.1.4 Amorphes Quarz**

Amorphes Quarz, also reines  $\text{SiO}_2$  mit nur sehr kurzreichweitiger Ordnungsstruktur, lässt sich ganz analog zum Glas mit dem Aufätzen latenter Ionen-

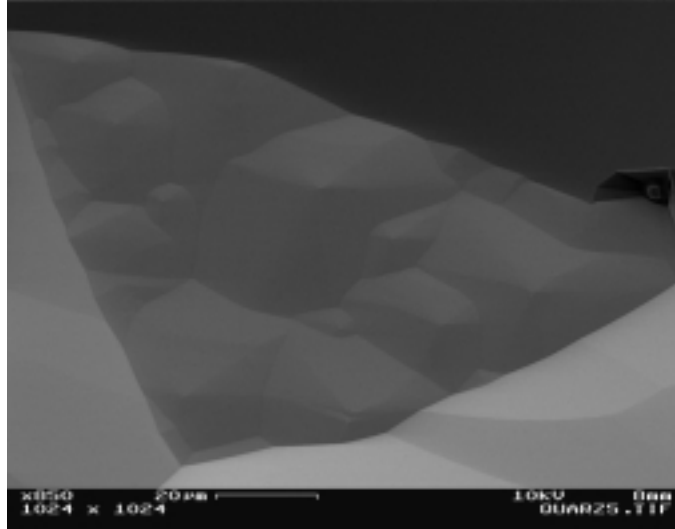


Abbildung 2.5: *Oberflächenrauigkeit des Quarzes aufgrund der nass-chemischen Prozessierung. Entsprechend der Kristallstruktur des z-cuts bilden sich feine Spitzen die mehrere Mikrometer Höhe haben.*

spuren strukturieren [Tou 90]. Der entscheidende Unterschied liegt in der um etwa einen Faktor 100 kleineren Ätzrate des Quarzes im Vergleich zum Borosilikatglas. Die Prozessierung bleibt jedoch gleich, für Quarz wird lediglich höher konzentrierte Flußsäure verwendet. Es stellt sich allerdings ein anderes Verhältnis von Substratätzrate  $v_b$  zu Ionenspurätzrate  $v_t$  ein. Aufgrund des kleineren  $v_b$  des Quarzes und eines recht konstanten  $v_t$  ergibt sich ein deutlich kleinerer Winkel des aufgeätzten konischen Kegels entlang der Ionenspur. Im Vergleich zu etwa 70 Grad beim Borosilikatglas beträgt der Öffnungswinkel der Apertur in Quarzglas etwas unter 30 Grad. Übliche Öffnungswinkel von Pipettenspitzen liegen im Bereich von 10-30 Grad [Sne 69, Sak 95a], so daß die Aperturen in Quarz der Pipettenspitze ähnlicher sind als bei den Borosilikatproben.

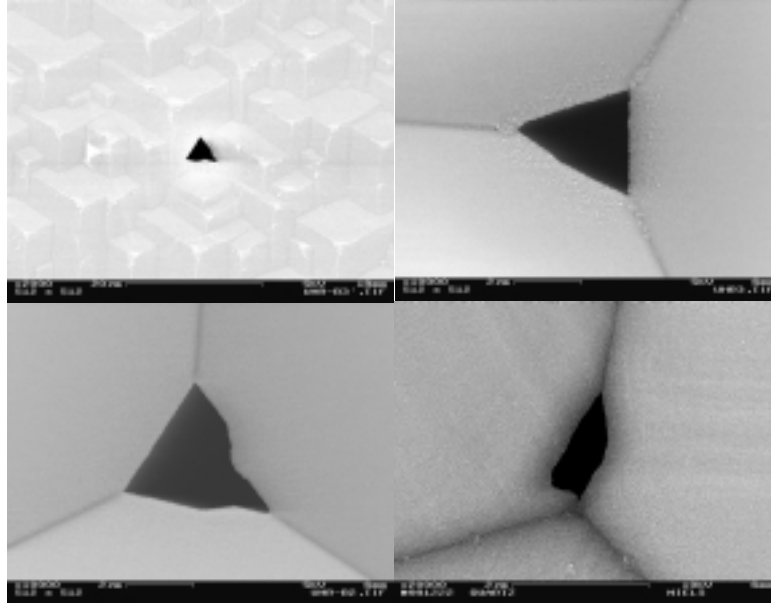


Abbildung 2.6: Anisotrop geätzte Löcher nach thinning-Verfahren. Aufgrund der Oberflächenrauigkeit des geätzten Quarzes ergeben sich unregelmässige Geometrien der Aperturen. (links oben: Oberseite des Chips; sonst Unterseite)

## 2.2 Methoden der Mikro- bzw. Nanostrukturierung

In diesem Abschnitt sollen die verschiedenen Techniken, die in dieser Arbeit eingesetzt, bzw. entwickelt wurden, um vornehmlich Borosilikatglasproben zu strukturieren, beschrieben und die jeweiligen Vor- und Nachteile dargestellt werden. Die meisten der hier verfolgten Ansätze haben im Rahmen von Kooperationen mit externen Instituten und Einrichtungen stattgefunden, da die Mikro-, bzw. Nanostrukturierung von Glas nicht zu den Standardprozessen gehört. Viele der in der Halbleiterstrukturierung üblichen Prozesse lassen sich nicht ohne weiteres auf Glassubstrate übertragen, so daß hier neuartige Verfahrenstechniken untersucht wurden.

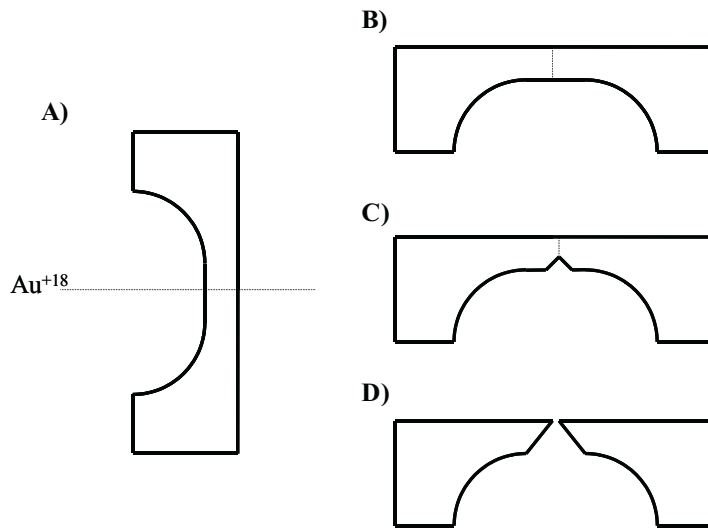


Abbildung 2.7: *Das Prinzip der Ionenspurätztechnik, links das Bestrahlen des vorstrukturierten Substrates mit einem beschleunigten Ion und rechts verschiedene Stadien beim Aufätzen der latenten Ionenspur.*

### 2.2.1 Ätzen latenter Ionenspuren

#### Bestrahlungseinrichtung

Glassubstrate wurden für diese Arbeit am UNILAC (Universal Linear Accelerator) der GSI (Gesellschaft für Schwerionenforschung mbH) mit schweren Ionen bestrahlt. Im folgenden wird kurz auf die Funktionsweise des Linearbeschleunigers und den Spurbildungsprozess eingegangen. Aus einer Ionenquelle werden Ionen durch eine Gleichspannung extrahiert und auf etwa 0,5% der Lichtgeschwindigkeit vorbeschleunigt. Die Ionenquelle befindet sich auf einem Potential von 320 kV in einem geerdeten Faradaykäfig. Nach der Vorbeschleunigung werden die Ionen magnetisch nach ihren Massen getrennt und das gewünschte Isotop in den Linearbeschleuniger eingeschleust. Im ersten Abschnitt des Linearbeschleunigers wird der Ionenstrahl in Teilchenpaketen mit Hilfe von Quadropolmagneten durch 120 zylindrische Driftröhren gelenkt. Nach Durchlaufen der 30 m langen Beschleunigungsstrecke haben die Ionen eine spezifische Ionenenergie von ca. 5% der Lichtgeschwindigkeit. Die Ionen passieren nun einen 13 m langen Abschnitt

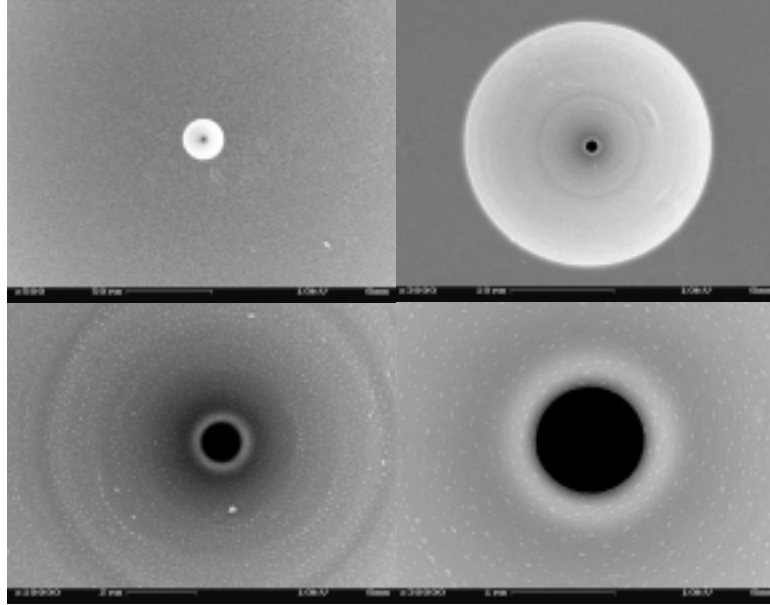


Abbildung 2.8: *Rasterelektronische Aufnahmen einer aufgeätzten Ionen-  
spur.*

in dem sie in einem Gasstrahl bzw. einer dünnen Folie weitere Elektronen abstreifen ('stripping'). Nach Bohr werden alle Elektronen abgestreift, deren Umlaufgeschwindigkeit kleiner als die Fluggeschwindigkeit des entsprechenden Ions ist. Dabei erhöht sich die mittlere Ionenladung bei Gold z.B. auf +18, wodurch bei gleichbleibender Beschleunigungsspannung ein höherer Energieübertrag auf die Ionen möglich ist. Das so entstandene Ladungsspektrum wird nun wiederum magnetisch gefiltert, um die gewünschte, meist intensitätsreichste, Ionenladung zu selektieren. Im letzten Abschnitt werden die Ionen auf 50 m Strecke auf etwa 15% der Lichtgeschwindigkeit beschleunigt, was einer spezifischen Energie von ca. 11,5 MeV/Nukleon entspricht. In Abb. 2.9 ist eine Beschleunigungsanlage schematisch dargestellt.

An einem Strahlplatz können nun automatisiert Proben in den Strahlengang eingebracht und mit Ionen bestrahlt werden. Entsprechend den Fluenzen im Strahlengang und der Dauer der Bestrahlung können Proben mit 1 bis zu einigen  $10^{11}$  Ionen pro  $\text{cm}^2$  bestrahlt werden. Für die Anwendungen in dieser Arbeit ist vornehmlich die Einzelionenbestrahlung von Bedeutung.

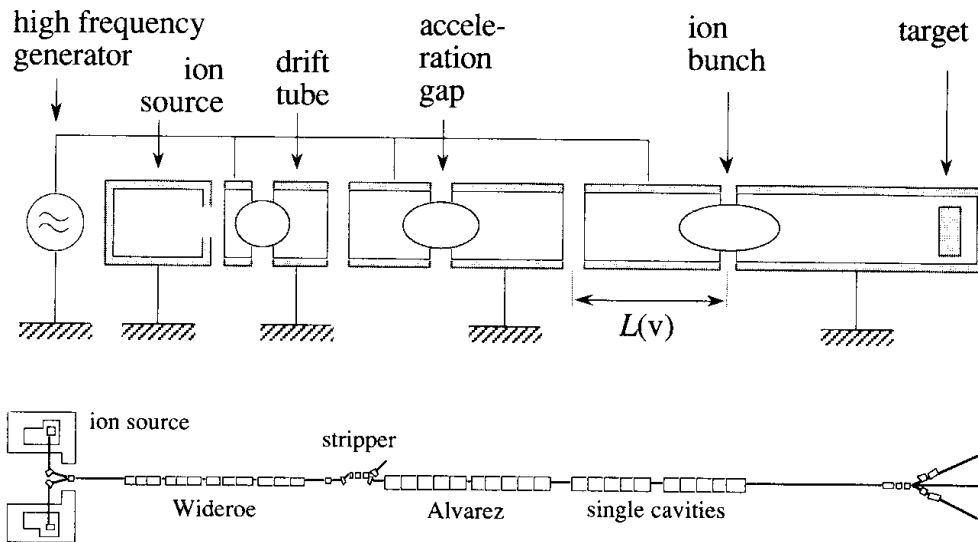


Abbildung 2.9: Aufbau der Beschleunigungsanlage. Ionen einer bestimmten Phase werden beschleunigt und bilden sogenannte Bündel (ion bunch).

Dabei wird vor der zu bestrahlenden Probe eine Blende mit wenigen  $100 \mu\text{m}$  Durchmesser montiert und die Fluenz des Ionenstrahls stark abgeschwächt, so dass im Mittel 1 Ion pro Sekunde die Blende passiert. Die Dicke der Probe muss kleiner als die Reichweite des Ions im Substrat sein, damit ein auftreffendes Ion auch die Probe passiert und vom dahinter liegenden Halbleiterdetektor registriert werden kann. Wird ein Ion registriert, schliesst eine elektrostatisch kontrollierte Blende innerhalb von  $0,15 \text{ ms}$  den Strahlengang und verhindert so das Auftreffen weiterer Ionen auf der Probe. In dieser Arbeit wurde vornehmlich mit Gold-Ionen gearbeitet, die bei Energien von  $11,5 \text{ MeV/u}$  in Borosilikatglas eine Reichweite von etwa  $80 \mu\text{m}$  haben. Daher wurden die zu bestrahlenden Bereiche der Glaschips lokal auf unter  $80 \mu\text{m}$  Dicke ausgedünnt. Es wurden verschiedene Ätzmasken aus Gold mit optischer Lithographie auf den Glasproben aufgebracht und mit 10 %iger Flußsäure die entsprechende Struktur in das Glas geätzt. In Abb. 2.10 ist eine solche vorstrukturierte Probe mit bereits aufgeätzter latenter Ionenspur abgebildet.

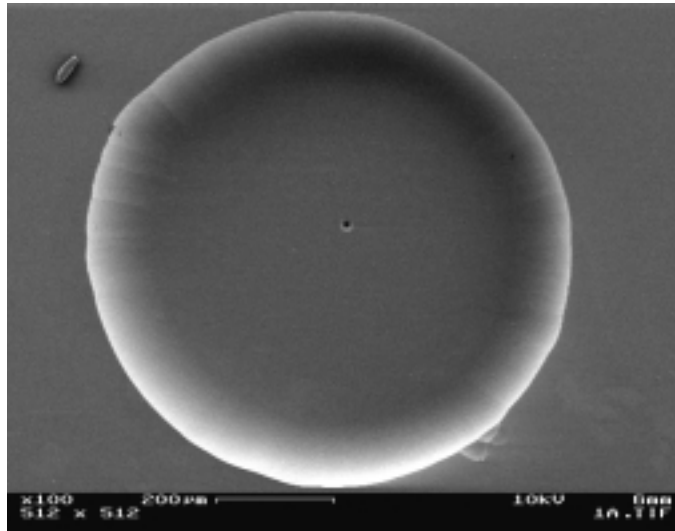


Abbildung 2.10: Vorstrukturierte Glasprobe mit aufgeätzter Ionenspur.

### Spurbildung in Festkörpern

Ein beschleunigtes Ion verliert beim Passieren eines Festkörpers durch verschiedene Prozesse seine Energie [Spo 90, Tra 99]. Je nach Materialdichte, elektronischer Struktur, kinetischer Energie des Ions etc. sind entsprechende Verlustmechanismen dominierend. Das in den Festkörper eintretende Ion bewirkt durch sein Coulomb-Feld eine Anregung und Ionisierung der Substratatome. Durch die ausgelösten Targetelektronen werden Elektronenkaskaden erzeugt, die eine radiale Reichweite von maximal einem Mikrometer quer zur Ausbreitungsrichtung des Ions haben. Angeregte Elektronen verursachen Brüche in der Substratstruktur und freie Radikale. Durch die gegenseitige Abstoßung der in der Ionenspur verbleibenden, positiv geladenen Ionen wird eine atomare Kaskade ausgelöst, die eine Reichweite von etwa 10 nm besitzt und zu deplacierten Atomen und Leerstellen führt. Mit den entsprechenden Umordnungs- und Relaxationsprozessen führt dies zur Ausbildung eines chemisch und physikalisch veränderten Bereiches (Abb. 2.11). Im folgenden sind verschiedene Modelle und Mechanismen zum Ener-



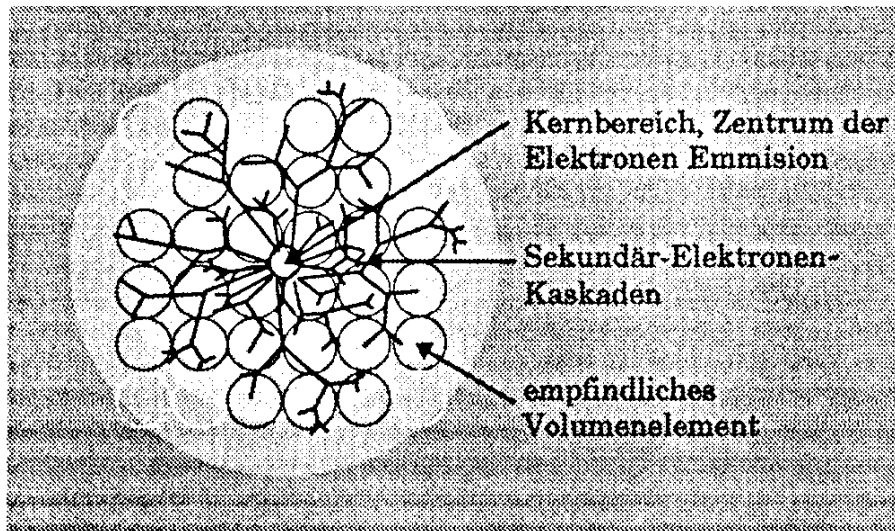


Abbildung 2.11: Die durch das passierende Ion veränderte Substratstruktur. Dargestellt sind Kernbereich und Halo. Die senkrecht zur Ionenbahn emittierten Targetelektronen geben ihre Energie mittels Elektronenkaskaden an die als Kreise angedeuteten Volumenelemente ab.

gieübertrag und zur Ausbildung einer Ionenspur detailliert dargestellt.

### Energieübertrag

Der Energieverlust oder die Bremskraft des Ions ist als die abgegebene Energie  $dE$  pro Wegstrecke  $dx$  definiert. Der totale Energieverlust setzt sich zusammen aus nuklearem und elektronischem Energieverlust:

$$(dE/dx)_{total} = (dE/dx)_n + (dE/dx)_e, \quad (2.1)$$

In Abb. 2.12 ist der qualitative Verlauf des Energieverlusts als Funktion der Ionenenergie in doppellogarithmischer Auftragung dargestellt [Spo 90].

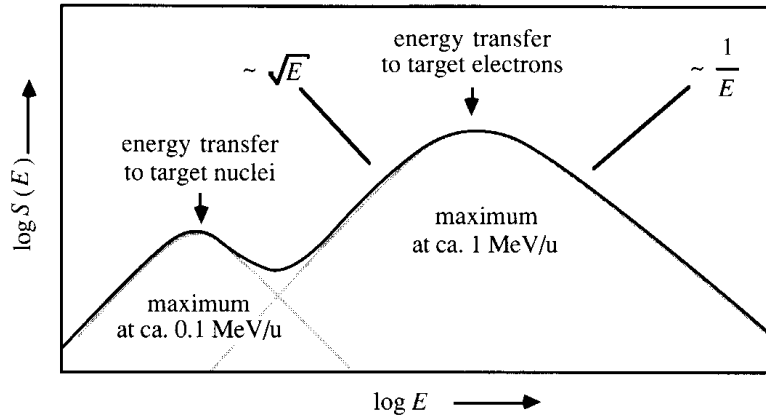


Abbildung 2.12: *Energieverlustfunktion des passierenden Ions.*

### Mittlere Ionenladung

Das in ein Substrat eingedrungene Ion verliert entlang seines Weges Elektronen, falls seine Geschwindigkeit die seiner Orbitalelektronen übersteigt. Daraus resultiert eine effektive Ladung  $Z^*$ , die durch die folgende empirische Formel beschrieben wird:

$$Z^* = Z \times (1 - e^{(-130 \times \beta / Z^{2/3})}), \quad (2.2)$$

mit  $Z$ =Kernladung,  $\beta$ =Geschwindigkeit  $v_I$  des Ions relativ zur Lichtgeschwindigkeit  $c$ . Bei einer hohen Ionengeschwindigkeit ( $\beta$  gegen 1) gilt  $Z^* = Z$ , d.h. das Atom ist sämtlicher Elektronen beraubt. Wird ein Ion in Materie abgebremst, kann es entsprechend der obigen Gleichung wieder Elektronen aufnehmen.

### Nuklearer Energieverlust

Bei Energien kleiner 100 keV/u wird die Wechselwirkung zwischen Ion und Targetatomen wenige Mikrometer vor dem Verenden der Ionenspur dominant. Die Wechselwirkungen lassen sich als elastische Stöße beschreiben,

welche zu deplacierten Atomen und Leerstellen führen. Der nukleare Energieverlust ist bei den für diese Arbeit durchgeführten Bestrahlungen vernachlässigbar, da die Ionenenergien immer weit über 1 MeV/u lagen, bzw. die Probendicke so gewählt wurde, dass die Ionen nicht innerhalb der Probe zur Ruhe kommen.

### Elektronischer Energieverlust

Der elektronische Energieverlust hängt von der Ionengeschwindigkeit  $v_I$  ab. Bei hohen Geschwindigkeiten ist der Energieübertrag gering, da die Wechselwirkungszeit des Ions mit den Targetelektronen sehr kurz ist. Wird das Ion abgebremst, erhöht sich die Wechselwirkungsdauer und der Energieverlust pro Strecke steigt mit  $1/v_I^2$  an. Das Maximum des elektronischen Energieverlustes, der sogenannte Bragg-Peak, liegt bei etwa 1 MeV/u. Unterhalb des Bragg-Peaks fällt die Energie mit  $v_I$  ab. Der Bereich des Bragg-Peaks wird mit semi-empirischen Theorien beschrieben [Spo 90].

### Reichweite

Schwere Ionen übertragen höhere Energien auf das Target und eignen sich daher zur Materialmodifikation besser als leichte Ionen. Da bei der Wechselwirkung des Projektilions mit den Targetelektronen die elementaren Energie- und Impulsüberträge im Vergleich zu der Projektilenergie klein sind, wird das Ion quasi-kontinuierlich abgebremst und dabei wenig aus seiner geradlinigen Bahn abgelenkt. Es besitzt eine Reichweite  $R$ , die durch den Energieverlust bestimmt wird:

$$R = \int_0^E (-dE/dx)_{total}^{-1} dE, \quad (2.3)$$

Mit Hilfe des TRIM-Programms (Transport of Ions in Matter) [Zie 85] lassen sich Reichweitebestimmungen für verschiedene Energien, Ionen und Targetsubstrate durchführen. Für die Registrierung eines Ions im Halbleiterdetektor der Einzelionenbestrahlung ist weiterhin eine Restenergie von etwa 2 MeV/u notwendig.

## Modelle der Spurentstehung

Im folgenden werden zwei mögliche Mechanismen vorgestellt, durch welche die an das Elektronensystem des Festkörpers abgegebene Energie zur Ausbildung einer Ionenspur führt. Seitz und Koehler [Sei 56] schlugen 1956 das Thermal Spike Modell vor, das Coulomb-Explosion Modell wurde 1965 von Fleischer, Price und Walker [Fle 65] vorgeschlagen. Letzteres diente vor allem der Erklärung, warum damals Spuren von Spaltfragmenten nur in Isolatoren beobachtet werden konnten.

### Coulomb-Explosion

Durch sein Coulomb-Feld ionisiert das schnelle, schwere Ion die Targetatome entlang seiner Bahn. Die  $\delta$ -Elektronen verlassen den Bereich entsprechend ihrer kinetischen Energie und zurück bleiben positiv geladene Targetatome, die sich aufgrund von Coulomb-Kräften explosionsartig abstoßen und somit ihre ursprünglichen Gitterplätze verlassen. Dazu ist es notwendig, dass die Rekombinationszeit zwischen Targetatomen und freien Elektronen größer ist als die Zeit für die Abstoßung der ionisierten Targetatome untereinander. Spuren in Isolatoren werden von diesem Modell gut beschrieben, da die Elektronendichte und Beweglichkeit klein und somit eine schnelle Rekombination nicht möglich ist. Die verdrängten Targetatome neutralisieren sich schließlich und die lokalen Gitterspannungen relaxieren. Es bildet sich eine zylinderförmige Störungszone, der Kernbereich, in dem eine hohe Konzentration von Leerstellen vorliegt, sowie eine Randzone mit auf Zwischengitterplätzen befindlichen Targetatomen (Abb. 2.13 ).

### Thermal Spike

Bei diesem Modell wird davon ausgegangen, dass die Energieabgabe des Ions zu einer zeitbegrenzten Temperaturerhöhung (thermal spike) im Bereich um die Spur führt. Die Ausdehnung dieses Bereiches entspricht der mittleren Reichweite der  $\delta$ -Elektronen. Die räumliche und zeitliche Ausbreitung der Temperatur wird durch die Wärmeleitungsgleichung beschrieben. Der Prozess ist in zwei Schritte unterteilt. Als erstes wird die Energie des Ions entlang der Spur auf die Targetelektronen übertragen, was eine lokale Aufheizung des Elektronengases durch Wechselwirkung mit sich bringt. Diese Energie wird im zweiten Schritt an das Atomgitter abgegeben. Da sich Atomgitter und Elektronensystem nicht im thermischen Gleichgewicht

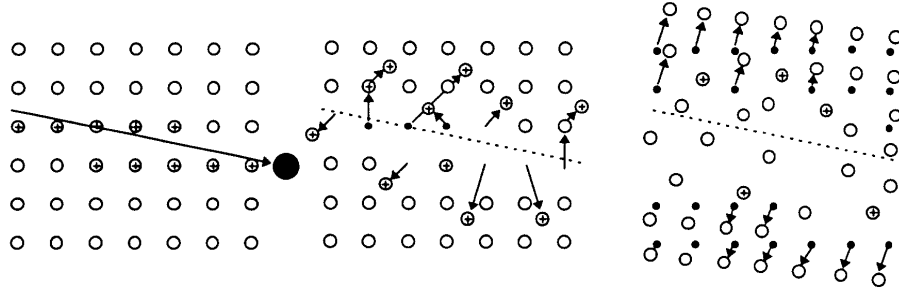


Abbildung 2.13: *Das Coulomb-Explosions Modell [Fle 65] zur Entstehung von latenten Spuren. Das schwere Ion durchquert das Substrat und ionisiert dabei die Targetatome (links). Der gestörte Bereich ist instabil, die angeregten Atome stoßen sich durch Coulomb Kräfte voneinander ab und werden auf Zwischengitterplätze gedrängt. Im Spurbereich entstehen Leerstellen (Mitte). Die lokalen Spannungen relaxieren, zurück bleibt die latente Spur (rechts).*

befinden, wird die räumliche und zeitliche Ausbreitung der Elektronentemperatur und der Gittertemperatur durch zwei gekoppelte, nichtlineare Gleichungen beschrieben, wobei Zylindergeometrie zugrunde gelegt wird. Die Gleichungen sind wegen der nichtlinearen Abhängigkeit der Parameter von der Temperatur nicht analytisch lösbar.

Das Thermal Spike Modell zielt darauf ab, durch Kenntnis der thermodynamischen Eigenschaften eines Materials den zeitlichen Verlauf der Gittertemperatur in zylinderförmigen Volumina als Funktion des Abstandes  $r$  von der Ionenspur zu bestimmen. Bei niedrigem Schmelzpunkt und starker Kopplungskonstante kann das Material lokal schmelzen und sich bei schnellem Abkühlen eine amorphe Phase - die latente Spur - bilden.

Die atomaren Defekte, die aufgrund des Durchgangs eines Ions erzeugt wurden, bilden eine physikalisch und chemisch veränderte Zone, deren Durchmesser etwa 10 nm beträgt. In diesem Kernbereich ist die Substratstruktur stark gestört und weist eine verminderte Dichte auf. Die elektronischen Effekte im Randbereich von etwa einem Mikrometer führen zur Bildung von Radikalen und Punktdefekten. Latente Spuren in Gläsern oder Polymeren sind bei Raumtemperatur über Jahre hinweg stabil, da sich kein thermodynamisches Gleichgewicht einstellen kann.

## Spurätztechnik

Die durch den Durchgang eines Ions erzeugten latenten Spuren besitzen eine deutlich höhere Ätzrate als das umgebene, ungestörte Substrat. Die atomaren Defekte und die gestörte elektronische Struktur entlang der Ionenspur bieten für ein Ätzmedium viele Angriffspunkte, so dass chemische Reaktionen hier schneller ablaufen. Die Situation ist in Abb. 2.14 schematisiert. Je nach Substratmaterial und Ätzmedium ist die Ätzrate der latenten Spur  $v_t$  gegenüber der normalen Materialätzrate  $v_b$  leicht bis stark erhöht. Durch das Verhältnis der beiden Ätzraten  $v_t/v_b$  ist die Selektivität des Ätzprozesses bestimmt. Für ein amorphes Substrat ist die Ätzrate isotrop, d.h. bei glei-

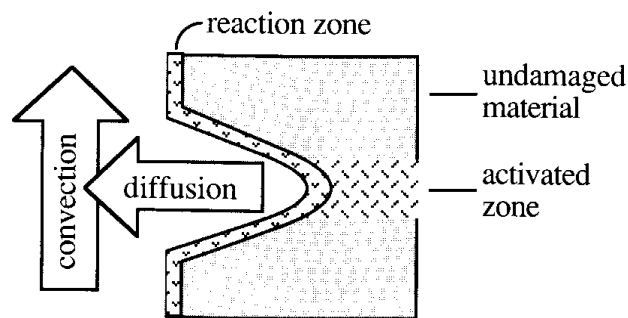


Abbildung 2.14: Prinzip der Spurätztechnik. Die relevanten Parameter sind die Dichte der Strahlungsschäden entlang der Spur, die Reaktionsrate zwischen Substrat und Ätzmedium und der Abtransport der Ätzprodukte durch Diffusion und Konvektion.

chen Ätzbedingungen unabhängig vom Ort. Durch die latente Spur und die entsprechende Selektivität lässt sich nun ein amorphes Material anisotrop ätzen. Generell wird die Temperaturabhängigkeit der Ätzrate durch die Arrheniusgleichung beschrieben:

$$v \sim e^{-(E_A/kT)}, \quad (2.4)$$

mit  $v$  = Reaktionsgeschwindigkeit,  $E_A$  = Aktivierungsenergie,  $k$  = Boltz-

mannkonstante,  $T$  = Temperatur. Je nach Aktivierungsenergie für die Material- und Spurätzrate lässt sich die Temperaturveränderung die Selektivität variieren.

### Porengeometrie

Werden die latenten Spuren aufgeätzt, bilden sich in Abhängigkeit von bestrahltem Substrat, Ätzmedium und Prozessparametern verschiedene Geometrien des Ätzkanals aus. Bei kristallinen Substraten können durch entsprechende Anisotropien des Ätzprozesses komplexe Strukturen entstehen. Für die Betrachtung in dieser Arbeit sind allerdings vorwiegend amorphe Substrate relevant, so dass im Folgenden die Parameter der Geometriebildung von aufgeätzten Ionenspuren in amorphen Materialien erläutert werden.

Die Geometrie der geätzten Pore wird durch das Verhältnis von Spurätzrate  $v_t$  und Materialätzrate  $v_b$  bestimmt. In Abb. 2.15 ist der Ätzprozess für eine senkrecht verlaufende Ionenspur dargestellt. Es wird vorausgesetzt, dass die Spurätzrate während des Ätzvorganges entlang der Spur konstant ist. Dies ist in den hier verwendeten Proben der Fall, die verbleibende Restreichweite der passierten Ionen ist relativ gross und innerhalb der Probendicke ändert sich  $dE/dx$  wenig. Der durch die Ionenspur anisotrop verlaufende

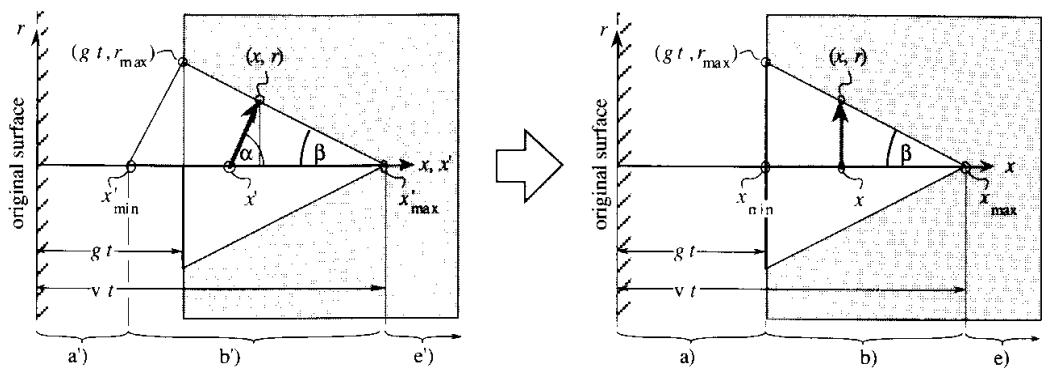


Abbildung 2.15: Geometrie einer geätzten Ionenspur. Der Öffnungswinkel  $\phi$  der Pore wird durch das Verhältnis von Material- und Spurätzrate bestimmt.

Ätzprozess führt zur Ausbildung eines kegelförmigen Grabens entlang der latenten Spur. Die lineare Ätzung entlang der Kernspur wird durch die Spurätzrate  $v_t$  beschrieben. Die Spitze des Ätzkegels hat nach der Zeit  $t$  die Strecke  $l$  durchlaufen. Simultan wird das ungestörte Volumen durch die isotrope Materialätzung mit der Ätzrate  $v_b$  abgetragen, so dass die Länge des Ätzkegels wie folgt beschrieben werden kann

$$l = (v_t - v_b)t, \quad (2.5)$$

Wird über die Länge der Ionenspur hinaus weitergeätzt, so ergibt sich eine Abrundung des aufgeätzten Kegels entsprechend einer Kugelwellenüberlagerung (siehe Abb. 2.16). Innerhalb des Ätzkegels wird das umlie-

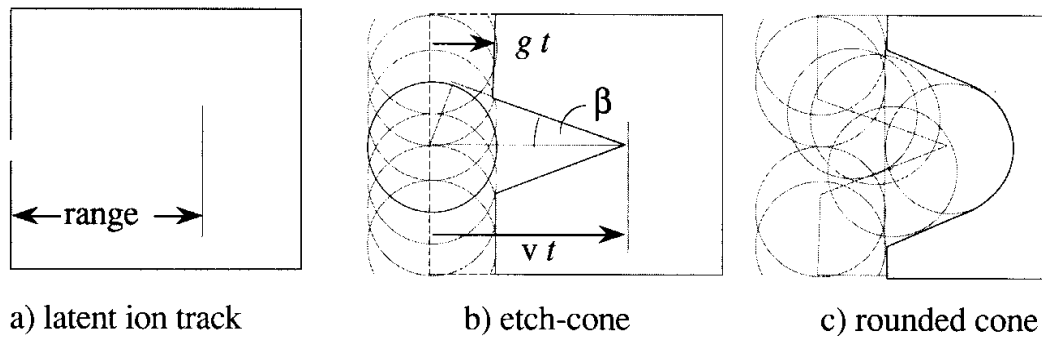


Abbildung 2.16: Die verschiedenen Stadien beim Spurätzen. Links nur die im Substrat verwendende, latente Spur, in der Mitte die aufgeätzte Spur und rechts das Resultat für einen über die Länge der Ionenspur weitergeätzten Prozess. Die konische Struktur der Spur geht aufgrund des nun isotropen Ätzprozesses in eine spherische Geometrie über.

gende Material ebenfalls mit  $v_b$  abgetragen. Der Ätzkegel wird durch den Halbwinkel  $\phi$  charakterisiert, welcher durch:

$$\sin\phi = v_b t / l = v_b t / v_t t = v_b / v_t, \quad (2.6)$$



beschrieben wird. Das Verhältnis von Spurätzrate und Materialätzrate , die Selektivität, wird im Folgenden mit  $\alpha$  bezeichnet:

$$\alpha = v_t/v_b, \quad (2.7)$$

Aus der Geometrie (Abb. 2.15) geht hervor, dass:

$$\tan\alpha = d_o/2l, \quad (2.8)$$

Mit Gleichung 2.6 folgt:

$$\tan\alpha = \sin\phi/\cos\phi = v_b/\sqrt{(v_t^2 - v_b^2)}, \quad (2.9)$$

Gleichsetzen von 2.8 und 2.9 ergibt:

$$d_o = 2v_b l/\sqrt{(v_t^2 - v_b^2)}, \quad (2.10)$$

Nach Einsetzen von Gleichung 2.5 folgt der Zusammenhang:

$$d_o = 2v_b t\sqrt{(v_t - v_b/v_t + v_b)}, \quad (2.11)$$

Die Materialätzrate lässt sich sowohl durch die Dickenabnahme  $\Delta D$  der Probe als auch durch die Zunahme des Porendurchmessers  $\Delta d$  bestimmen. Es gilt:

$$v_b = \Delta D / 2\Delta t, v_b = \Delta d / 2\Delta t, \quad (2.12)$$

Die mittlere Spurätzrate  $v_t$  kann durch die Durchbruchzeit  $t_D$  bei gegebener Probendicke ermittelt werden:

$$v_t = D / 2t_D, \quad (2.13)$$

Aus den Gleichungen ergibt sich der Probendurchmesser  $d_o$  an der Oberfläche zu:

$$d_o = 2 v_b t \sqrt{(\alpha - 1/\alpha + 1)}, \quad (2.14)$$

Da generell die Spurätzrate höher als die Materialätzrate ist, bilden sich bei Ätzung der latenten Spur Kegel entsprechenden Winkels aus. Ist z.B.  $v_t \gg v_b$  so ist  $\alpha$  nahe 1, es bilden sich also zylinderförmige Ätzporen. Dies ist zum Beispiel für verschiedene in NaOH geätzte Ionenspuren in Polymere der Fall. Für flussäuregeätzte Ionenspuren in Glas ist der Halbwinkel  $\phi$  etwa 35 Grad, bei Quarz etwa 14 Grad.

### Evaluation der Methode

Wie bereits oben eingehend beschrieben, ist die nasschemische Strukturierung mit Hilfe von latenten Ionenspuren sehr erfolgreich für die Herstellung von Aperturen im Sub-Mikrometerbereich eingesetzt worden.

Das Verfahren ist für eine Vielzahl von Materialien einsetzbar, und je nach Materialeigenschaften und verwendeten Ätzmedien ergeben sich verschiedenste Ätzstrukturen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Untersuchungen an mit Ionen bestrahlten Polymerfolien durchgeführt. Polycarbonat-(PC)- und Polyethylenterephthalat-(PET)-folien mit 10-30  $\mu$ m Dicke wurden sowohl mit einzelnen Ionen als auch mit Fluenzen von  $10^3$ - $10^8$  Ionen pro

cm<sup>2</sup> bestrahlt. Als Ätzmedium für diese Polymere wurde stark konzentrierte NaOH und KOH (jeweils 15 molar) eingesetzt. Die Polymere selber weisen dabei sehr geringe Ätzraten auf, die Ionenspuren werden bei Raumtemperatur mit einigen 10 nm pro Minute geätzt. Durch das Verhältnis von  $v_b/v_t$  annähernd Null ergeben sich Ätzkegel mit Öffnungswinkel nahe Null, also zylinderförmige Poren. Mit diesem Ansatz wurden Porendurchmesser von unter 20 nm erreicht Abb. 2.17, Poren mit Durchmesser zwischen 0.5-1 Mikrometer lassen sich routinemässig in Polymerfolien herstellen. Neben

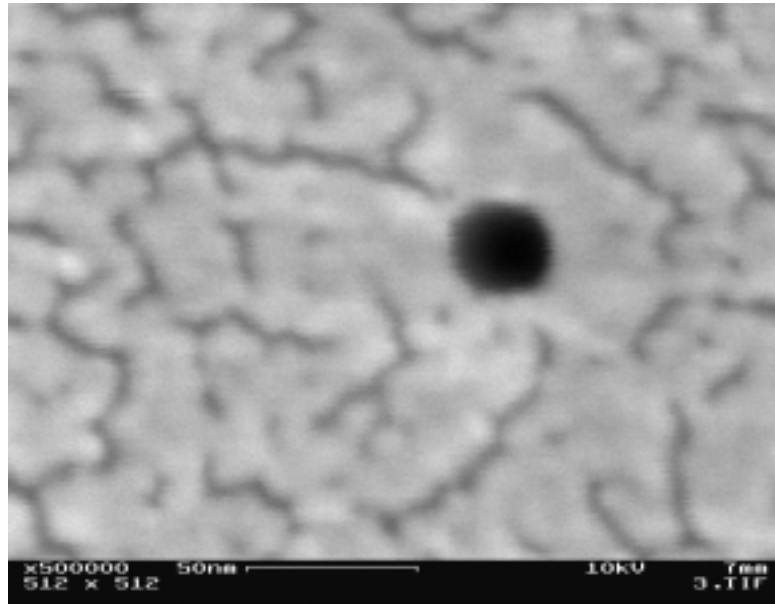


Abbildung 2.17: *Aufgeätzte Ionenspur mit sehr kleinem Durchmesser in Polycarbonatfolie.*

der Möglichkeit, ein einzelnes Ion durch eine Probe zu schießen, kann man natürlich auch einen Bereich der Probe, bzw. die gesamte Probe flächig mit vielen Ionen bestrahlen. Je nach Fluenz des Strahls beschleunigter Ionen und Dauer der Bestrahlung können auf diese Weise mehr oder weniger hohe Dichten latenter Spuren, d.h. Ionenspuren pro Fläche, im Substrat erzeugt werden. Man kann somit die Probe beliebig stark perforieren und auf diese Weise zum Beispiel feine Filterelemente herstellen (Abb. 2.18). Sind die Spuren im Substrat so dicht, daß beim Aufätzen ein Überlappen der

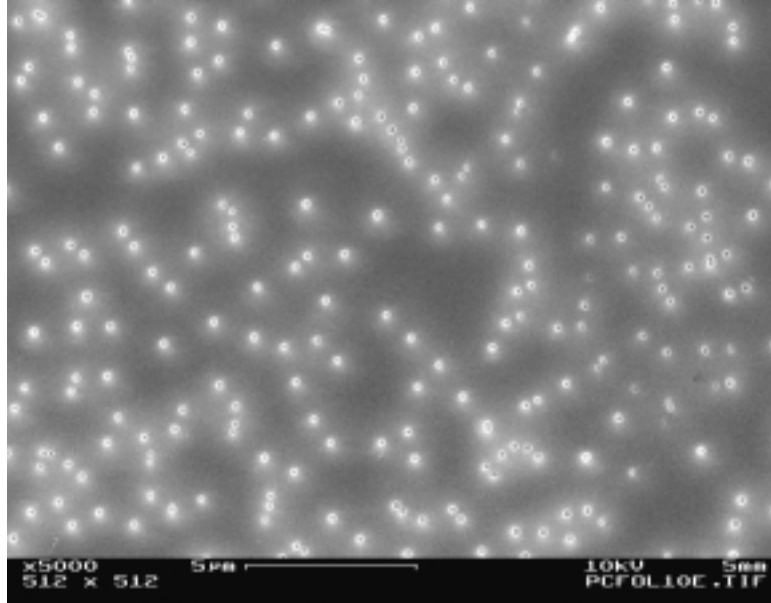


Abbildung 2.18: Polycarbonatfolie mit hoher Fluenz bestrahlt. Die aufgeätzten Poren sind stochastisch verteilt, haben aber einen einheitlichen Durchmesser.

Ätzkrater auftritt, so kann man den bestrahlten Bereich vollständig durch Ätzen entfernen (Abb. 2.19). Dadurch lassen sich mit Hilfe von ionenundurchlässigen Metallmasken beliebige Strukturen in ein Substrat einstrahlen und entsprechend aufätzen. Interessant ist auch, dass durch das Einstrahlen der Ionen unter einem beliebigen Winkel dieser Winkel auch in die Strukturen im Substrat übertragen werden kann, da sich die Ionen geradlinig im Probenmaterial ausbreiten. Dadurch lassen sich amorphe Materialien ebenfalls anisotrop ätzen [Spo 96].

### 2.2.2 Sputtern mit fokussiertem Ionenstrahl

Zur Herstellung von feinen Aperturen wurde ebenfalls eine sehr fortgeschrittene Sputtertechnik verwendet, das Sputtern mit fokussiertem Ionenstrahl (Focused Ion Beam, FIB). FIB ist eine Trockenätztechnik, bei der ionisierte Prozessgase z.B.  $\text{Ar}^+$  beschleunigt und mittels einem entsprechenden Lin-



Abbildung 2.19: *Ionenspurätzen als maskenlose Lithographie, hier Glasprobe, die durch eine bienenwabenhörmige Metallmaske hindurch mit hoher Fluenz bestrahlt wurde.*

senssystem fokussiert werden. Mit Hilfe des Linsensystems ist es möglich, den Ionenstrahl gezielt abzulenken und so kontrolliert auf einer Probenoberfläche zu verfahren. Der Ionenstrahl lässt sich bei optimal justierten Anlagen auf wenige nm genau fokussieren. An der Stelle, wo die Ionen auf die Probenoberfläche treffen, findet durch physikalisches Sputtern ein Materialabtrag statt, d.h. Probenmaterial wird aus der Oberfläche durch die energiereichen Ionen herausgeschlagen. Für die Anwendung der FIB-Technik in dieser Arbeit wurde mit der Arbeitsgruppe von Prof. Wieck, Universität Bochum, kooperiert. Die verwendete Anlage hat eine Fokusgenauigkeit von etwa 100 nm.

Generell ist das Arbeiten mit der FIB-Technik besonders für das Strukturieren dünner Schichten geeignet. Der Materialabtrag ist aufgrund der geringen Fluenz eines stark fokussierten Ionenstrahls sehr gering, in Glas wurden Sputterraten von etwa 10-12 nm/min erreicht. Zudem sind erreichbare Aspektverhältnisse relativ klein. Sollen etwa Schichtdicken tiefer als 100 nm strukturiert werden, verliert die FIB-Technik deutlich an Auflösung. Realistische Aspektverhältnisse liegen also bei Werten um eins, was zur Ober-

flächenstrukturierung bei vielen Anwendungen völlig ausreichend ist. Die in dieser Arbeit mit dem FIB bearbeiteten Proben waren wie folgt vorstrukturiert: Auf amorphes Glassubstrat mit 200  $\mu\text{m}$  Dicke wurde eine Au-Ätzmaske (rund, Durchmesser 300-500  $\mu\text{m}$ ) mit optischer Lithographie aufgebracht und die Probe nasschemisch mit Flusssäure lokal ausgedünnt. Um Öffnungen im Sub-Mikrometerbereich zu realisieren und um die Prozessdauer des FIB-Sputterns klein zu halten, wurden Glasmembranen mit 1-2  $\mu\text{m}$  Restdicke hergestellt. In die Glasmembranen wurde mit dem fokussierten Ionenstrahl zunächst eine weitere Ausdünnung auf einer Fläche von etwa 5x5  $\mu\text{m}$  vorgenommen. In diese nun ausgesprochen dünne Glasmembran wurde dann mit maximal fokussiertem Strahl eine kleine Apertur eingebracht. In Abb. 2.20 sind die Ergebnisse dieser Technik dargestellt, man erkennt sehr deutlich den kleinen, ausgedünnten Bereich und die zentral eingebrachte Apertur. An der sehr präzisen Definition der Ecken des ausgedünnten Bereiches lässt sich schon die hohe Auflösung dieser Technik erkennen. In einem sehr aufwendigen und technisch sehr fortgeschrittenen Aufbau ist es bereits möglich, die vom Ionenstrahl produzierten Strukturen in-situ zu untersuchen und sogar zu manipulieren, womit Strukturgebung auf der Nanometerskala sehr gut realisierbar ist [Li 01]. Für die Bearbeitung einer Probe mit dem FIB sind leider mehrere Stunden notwendig, zum einen für die genaue Justierung und Fokussierung, zum anderen für den Sputterprozess selber. Das macht diese Technik leider sehr unattraktiv für die Herstellung einer grösseren Anzahl von Proben. Ein weiteres Problem ergibt sich aus der notwendigen Ausdünnung der Glasmembranen auf wenige  $\mu\text{m}$ . Glasschichten mit so geringen Dicken sind mechanisch recht empfindlich und daher für spätere Anwendungen nur bedingt geeignet.

### 2.2.3 Reaktives Ionenätzen

Eine weitere Möglichkeit zur Nanostrukturierung liegt in Trockenätzverfahren. Das Reaktive Ionenätzen (Reactive Ion Etching, RIE) ist ein Trockenätzverfahren, das sowohl chemischen als auch physikalischen Charakter hat. Für den Ätzprozeß wird die Reaktionskammer zunächst evakuiert, dann mit Prozessgas gefüllt (z.B.  $\text{CF}_4$ ,  $\text{SF}_6$ ,  $\text{CCl}_2\text{F}_2$ ) und durch Anlegen einer Hochfrequenzleistung wird ein Plasma erzeugt. Die Abtragung der zu ätzenden Schicht findet zum Einen durch Einwirkung aktivierter und reaktiver Gase statt, diese chemische Komponente des Ätzvorganges ist isotrop und wird als Plasmaätzen bezeichnet. Zum Anderen wird die zu ätzende Schicht mit energiereichen Ionen aus dem Plasma beschossen und dadurch zerstäubt.

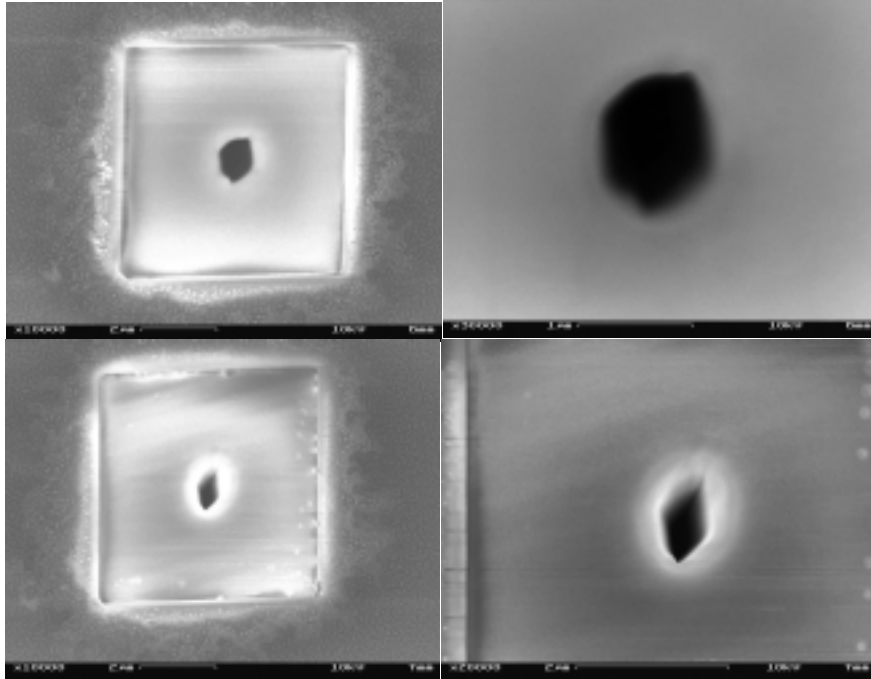


Abbildung 2.20: *Verschiedene Bohrungen in Glasmembranen mit der Focused Ion Beam Technik vorgenommen.*

Diese physikalische Komponente ist relativ unselektiv und anisotrop. Die Ätzrate für Glas der verfügbaren RIE-Anlage bei maximal anwendbarer Leistung (ca. 500W) liegt bei etwa 20-25 nm/min. Um Glasmembranen von etwa 10-15  $\mu\text{m}$  Dicke zu durchätzen, wären dementsprechend einige Stunden notwendig, also unzumutbar lange für Anlage und Benutzer. Zudem ist, da die verwendete Anlage eine dominierende physikalische Komponente hat, nur eine sehr geringe Selektivität gegenüber einer Ätzmaske gegeben. Es muß also eine Hartmaske aus z.B. Nickel oder Chrom verwendet werden, in die entsprechend eine feine Apertur eingebracht werden muss. Bei der benötigten Schichtdicke für die Hartmaske ist eine Sub-Mikrometer Apertur nicht mehr nasschemisch herzustellen, und damit ist die erreichbare Auflösung letztlich limiert. Es bleibt nur die Möglichkeit, die Glasmembranen weiter auszudünnen, jedoch sind bei wünschenswerter Restdicke von kleiner gleich 2  $\mu\text{m}$  die mechanischen Eigenschaften der Membranen sehr

schwach. Reaktives Ionen-Ätzen ist daher nur sehr bedingt einsetzbar, um feine Aperturen in Glas zu erstellen. Allerdings wurde es in dieser Arbeit nutzbringend zur Herstellung lokaler Erhebungen, bzw. Absenkungen auf planaren Glaschips eingesetzt. Die lokalen Erhebungen wurden rund um eine zuvor hergestellte Apertur angebracht, um den Rand einer Pipettenspitze zu imitieren und so die Zelladhäsion zu verbessern. In Abb. 2.21 sind mit Reaktivem Ionen-Ätzen hergestellte Adhäsionsringe dargestellt.

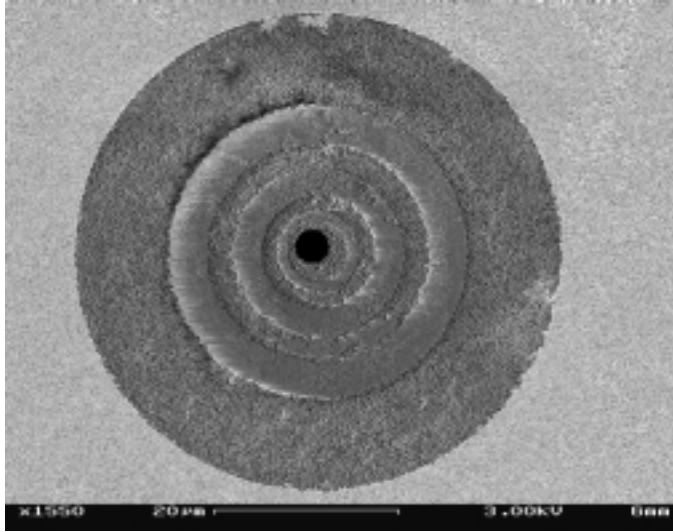


Abbildung 2.21: Mit Lithographie und Reaktivem Ionenätzen hergestellte Oberflächenstrukturierungen zur verbesserten Zelladhäsion.

#### 2.2.4 Laserablation

Eine vielversprechende Technologie zur Herstellung feiner Aperturen in Glas ist die Laserablation mit einem Excimerlaser. Mittels eines fokussierten Laserstrahls wird Material von der Oberfläche der zu strukturierenden Probe abgetragen. Die Wellenlänge des verwendeten Laserlichtes muss auf die Absorptionseigenschaften der Probe abgestimmt werden, um einen möglichst guten Energieübertrag zu gewährleisten. Ebenso muss die Energiedichte des Laserstrahls einen materialspezifischen Schwellwert überschreiten, um wohldefinierte Ablation zu ermöglichen.



Bei der Laserablation wird Probenmaterial durch die vom Laserstrahl übertragene Energie evaporiert, es findet eine Art Oberflächenexplosion auf der Probe statt. Ist die Energiedichte des Strahls zu gering, treten unerwünschte Schmelzphänomene auf, die die Auflösung dieses Strukturierungsverfahrens deutlich herabsetzen. Üblicherweise werden Excimerlaser zur Ablation mit Pulsdauern von einigen ns betrieben. Dabei wird je nach Probenmaterial etwa eine Schichtdicke von 10-100 nm pro Puls abgetragen. Um eine noch bessere Auflösung zu erreichen, werden fs-Lasersysteme eingesetzt, unter anderem auch, da bei solch extrem kurzen Laserpulsen fast kein Aufschmelzen des Probenmaterials mehr stattfindet. Meist reichen aber ns-Pulse aus, um eine Energiediffusion in nicht-bestrahlte Bereiche und somit ein Aufschmelzen zu verhindern.

Excimerlaser sind Gaslaser, der Name entstammt der Abkürzung **excited dimer** für angeregte zwei-atomige Moleküle wie Xe<sub>2</sub>, welches in den ersten Systemen als Lasergas eingesetzt wurde. Neuere Excimerlaser verwenden Edelgashalogenid-Gase wie ArF oder KrF als Lasermedium. Üblicherweise wird für die Materialbearbeitung mit dem Excimerlaser eine Maske und eine abbildende Optik verwendet. Für die Struktur, die ablatiert werden soll, wird zunächst eine entsprechende, um einen Faktor 5-10 grössere Maske hergestellt. Diese Maske wird durch eine Projektionslinse verkleinernd auf die Probenoberfläche abgebildet. Die optischen Elemente müssen der Energiedichte des Laserstrahls während der Illumination standhalten, daher werden wegen der geringen Absorption meist Quarzgläser für die Linsen verwendet. In Abb. 2.22 ist eine solche abbildende Optik schematisch dargestellt. Beim Ablatieren einer Probe findet naturgemäss ein Materialabtrag statt, so dass sich die effektive Probenoberfläche während der Ablation verschiebt. Entsprechend muss die Projektionslinse eine Tiefenschärfe ('depth of focus', DoF) gewährleisten, der in der gleichen Grössenordnung wie die Tiefe der Bohrung liegt. Die Projektionslinsen sind optimiert, um eine bestimmte Auflösung (numerische Apertur, NA) und Tiefenschärfe zu erreichen, diese Grössen stehen bei einer Linse in folgender Beziehung zueinander:

$$DoF = \pm(blur/2NA), \quad (2.15)$$

und

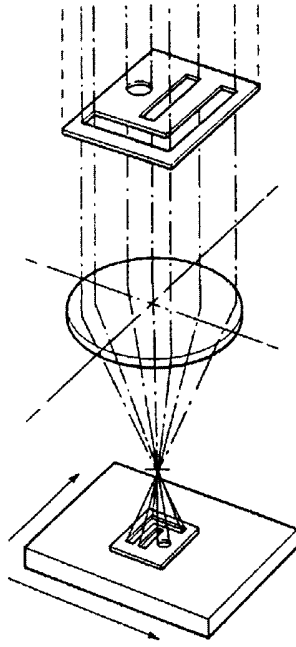


Abbildung 2.22: *Typische, abbildende Optik für die Mikrostrukturierung mittels Maske und Excimerlaser.*

$$blur = \lambda/NA \text{ (Beugungsbegrenzung)}, \quad (2.16)$$

Eine hohe Auflösung für sehr kleine Strukturen kann also nur für den Preis einer kleinen Tiefenschärfe erkaufte werden. In Abb. 2.23 ist die Situation geometrisch dargestellt. Glassubstrate für die Mikroperforation mittels Laserablation wurden ebenfalls nasschemisch vorstrukturiert. Es wurden wie bereits beschrieben Glasmembranen durch lokales Ausdünnen des Substrates erzeugt, jedoch ist eine Restdicke von 10-20  $\mu\text{m}$  ausreichend, um Aperturen mit Sub-Mikrometer Durchmesser zu erhalten. Es können also mit der Laserablation Aspektverhältnisse von 15-20 erreicht werden. Die recht starke Dicke der Glasmembranen verleiht diesen eine ausreichend me-

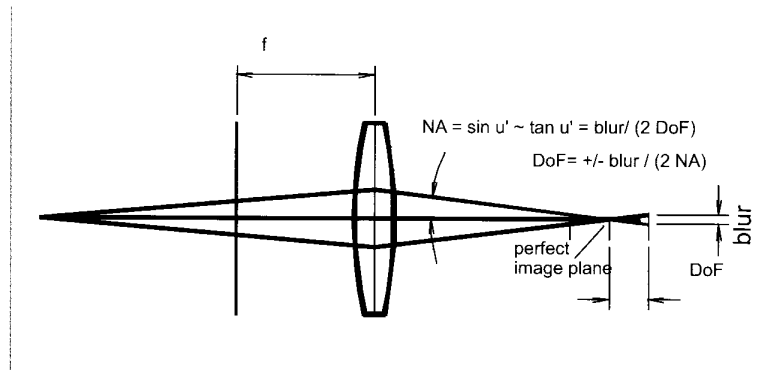


Abbildung 2.23: Die geometrische Bedeutung der Tiefenschärfe: sie gibt den Abstand von der optimalen Bildebene für eine bestimmte Unschärfe des perfekten Bildes an.

chanische Stabilität. Die Proben lassen sich zum Beispiel im Ultraschallbad (240W, 10 % Leistung) reinigen, ohne dabei Schaden zu nehmen. Vergleichbare Glasmembranen mit Restdicken von kleiner  $5 \mu\text{m}$  zerbrechen instantan in Ultraschall dieser Leistung. Die Absorption von Glas ist im sichtbaren Wellenlängenbereich annähernd Null, steigt aber zum ultravioletten Bereich hin deutlich an. Zur Laserablation ist daher ein KrF-Laser mit 248 nm Wellenlänge aufgrund zu schwacher Absorption nicht geeignet, aber für die in dieser Arbeit verwendeten Borosilikatgläser ist ein ArF-Laser mit 193 nm gut verwendbar.  $F_2$ -Laser haben mit 157 nm zwar die kürzeste Wellenlänge, jedoch absorbiert in diesem Bereich der Sauerstoff in der Luft, so dass man im Vakuum, bzw. im Prozessgas wie Stickstoff arbeiten muss. Zudem ist eine deutlich aufwendigere, nicht-absorbierende Optik notwendig. Der entsprechend höhere Aufwand eines  $F_2$ -Laser im Vergleich zum ArF-Laser lohnt sich nicht, da die verfügbare Leistung des  $F_2$ -Lasers um einen Faktor 8 bis 10 kleiner ist und so die schwächere Absorption der 193 nm Wellenlänge durch höhere, verfügbare Leistung ausgeglichen wird.

Die Laserablation wurde in Kooperation mit dem Laser Zentrum Hannover durchgeführt. Es wurde ein ArF-Laser (TUI-Laser, Excistar 500) eingesetzt, der eine mittlere Energie von 8 mJ pro Puls zur Verfügung stellt und mit einer Pulsrate von 200 Hz betrieben wird. Es wurde eine abbildende Optik verwendet, die eine entsprechende Maske verkleinert auf der Probenoberfläche

abbildet. Um auf der Probenvorderseite eine Öffnung von  $1\ \mu\text{m}$  Durchmesser zu generieren, wurde die Probe von der zuvor ausgedünnten Rückseite bestrahlt. Auf der Strahleintrittsseite ist der Durchmesser der Bohrung etwa  $8\text{-}10\ \mu\text{m}$ , auf der Austrittsseite bis zu unter einem Mikrometer (Abb. 2.25). Zum Perforieren der auf  $20\ \mu\text{m}$  ausgedünnten Glasmembran sind etwa 100-

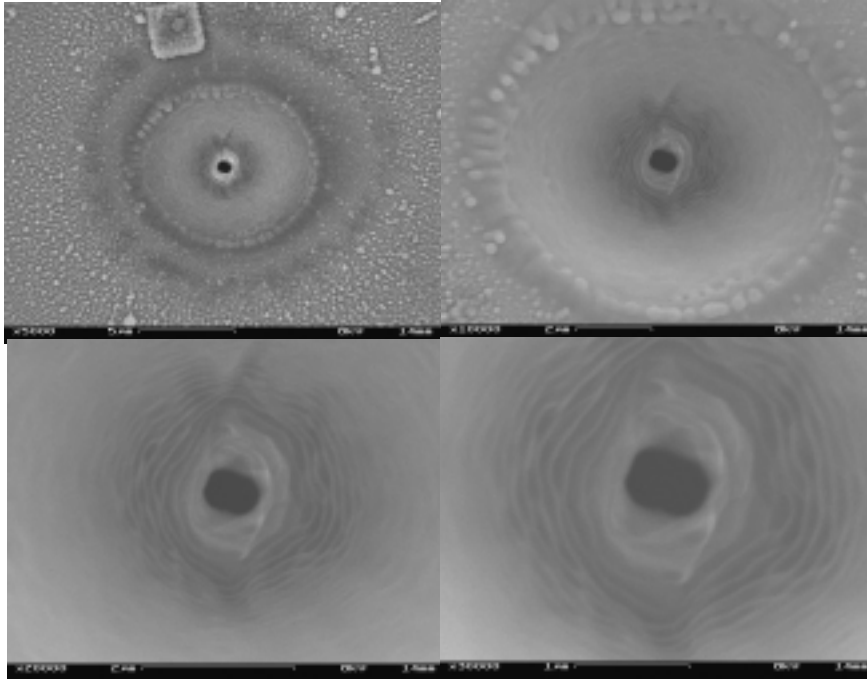


Abbildung 2.24: *Verschiedene Vergrößerungen eines laser-gebohrten Loches, deutlich zu sehen sind die Ablationsstufen, die durch die einzelnen Laserpulse entstehen.*

200 Pulse notwendig. Die zur Ablation erforderliche Energiedichte auf der Probe beträgt etwa  $100\text{-}150\ \text{J}/\text{cm}^2$ . In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 2.24 sind deutlich die Abtragstufen der einzelnen Laserpulse zu erkennen. Ein Ausbrechen der Laserbohrung auf der Austrittsseite wurde nicht festgestellt. Die verwendete Maske ist kreisförmig, jedoch sind viele der Bohrungen mehr oval geformt, da bereits kleinste Fehljustierungen bei diesen hohen Anforderungen zu Abbildungsfehlern führen können. Insbesondere ist beim Durchbohren mehrerer Proben in einem Substratstück

ein leichter Versatz zum Beispiel der z-Ebene beim Verfahren des Substrats kaum vermeidbar.

Um die durch Ablationsprozesse aufgeraute Oberfläche an den In-

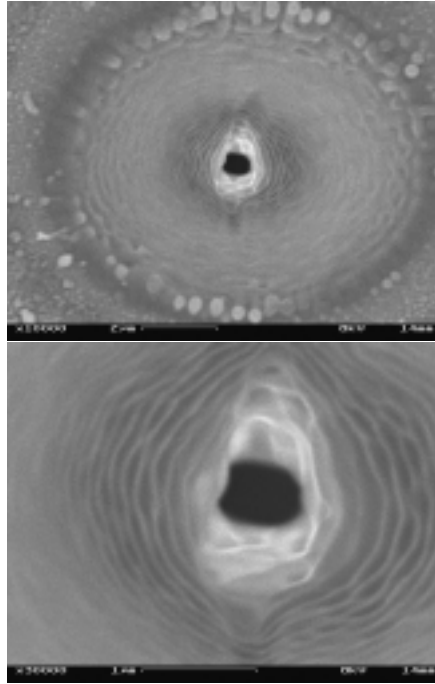


Abbildung 2.25: Mit ArF-Laser hergestellte Apertur in Glas.

nenwänden der Mikropore zu glätten, wurden verschiedene Versuche unternommen. Zunächst wurde analog zum Feuerpolieren von Patch-Clamp Pipetten eine Heizwendel verwendet, um das Glas anzuschmelzen und so Strukturunebenheiten zu relaxieren und zu glätten. Da die Heizwendel jedoch im Vergleich zur Apertur sehr gross ist, etwa in der Grössenordnung des gesamten Glaschips, sind Aufheizprozesse schwer kontrollierbar und führen zum Aufschmelzen der ganzen Struktur.

Um eine Energiezufuhr nur an der Glasoberfläche zu erreichen, wurde ein Rapid Thermal Annealing (RTA) System eingesetzt, das den Energieübertrag durch UV-Licht realisiert. Mit der verwendeten Anlage ist es möglich, die Proben innerhalb sehr kurzer Zeit (Sekunden) auf mehrere hundert Grad Celsius aufzuheizen und kontrolliert wieder abzukühlen. Trotz Variation

der Aufheiz- und Abkühlparameter führte auch dieser Ansatz nicht zum Erfolg, da nicht wie erwartet vornehmlich Licht/Energie an der Oberfläche absorbiert wurde, sondern auch in tiefer gelegenen Schichten, bzw. der Temperatureausgleich zwischen Oberfläche und tieferen Bereichen sehr schnell stattfindet. Es wurden auch hier globale Verformung durch die Schmelzprozesse festgestellt, die nicht einmal auf den ausgedünnten Bereich des Glaschips begrenzt war. Insbesondere wurden die prozessbedingten Stufen in der Apertur durch das Annealing nicht egalisiert, wie sich leicht durch Rasterelektronenmikroskopie feststellen lässt.

Eine weitere Möglichkeit zur lokalen Aufheizung und entsprechendem Annealing ist die Verwendung eines CO<sub>2</sub>-Laserstrahls, der auf den Bereich der Apertur fokussiert wird. Das Glas absorbiert die Wellenlänge des CO<sub>2</sub>-Lasers, so dass lokal Energie zugeführt werden kann. Dieser Ansatz wurde jedoch nicht verfolgt, da sich für die spätere Anwendung der Proben zeigt, dass eine kreisrunde Apertur nicht unbedingt notwendig ist, solange keine scharfen Ecken in der Öffnung auftreten.

Mit Hilfe der Laserablation lassen sich eine Vielzahl verschiedener Materialien strukturieren. Die verwendete Wellenlänge des Lasers muss dabei jeweils den Absorptionseigenschaften und Ablationsschwellwerten des Substrates angepasst werden. Entsprechende Anwendungen finden sich im lab-on-a-chip Bereich, bzw. überall wo feine Kanäle für die Mikrofluidik benötigt werden [Lab 98] und vor allem in der Herstellung wohldefinierter Lochmatrizen für Tintenstrahlköpfe [Row 95]. Im Kontext dieser Arbeit ist unter anderem die Mikroperforation von Polymeren [Schm 98, Hir 01], insbesondere Polytetrafluoroethylen (PTFE oder Teflon) interessant. Perforierte Teflonfolien werden seit langem für Messungen an künstlichen Lipidmembranen verwendet (siehe Kapitel 3). Es werden verschiedene Methoden zur Perforation eingesetzt, vornehmlich mechanischer Natur. Die Grösse der Apertur ist dabei auf Durchmesser grösser als 30  $\mu\text{m}$ , meist 150  $\mu\text{m}$  begrenzt. Messtechnisch sind oft kleinere Durchmesser wünschenswert, so dass auch hier die Laserablation eine Verbesserung darstellen kann, da z.B. mit F<sub>2</sub>-Lasern Strukturgrössen kleiner als ein Mikrometer in Teflon erreichbar sind [Her 93, Fie 99]. Desweiteren kann die Laserablation zum Reinigen von Mikrostrukturen verwendet werden, z.B. um Ätzreste oder prozessbedingte Rauigkeiten zu glätten [Cou 98].

## Kapitel 3

# Experimente

In diesem Abschnitt werden die experimentellen Gegebenheiten und die mit den Patch Clamp Chips durchgeführten Untersuchungen beschrieben. Einleitend werden Modelle des Ladungstransports durch Ionenkanäle diskutiert. Im folgenden werden der Messaufbau und kurz die Messmethoden der Patch Clamp Technik erklärt. Nach der Darstellung des chip-basierten Versuchsaufbaus werden Experimente an künstlichen Lipidmembranen und Porenbildnern mit Patch Clamp Chips beschrieben. Ein weiterer experimenteller Schwerpunkt ist die Arbeit mit Zellen. Es werden Messungen verschiedener Ionenkanaltypen in der Ganzzellkonfiguration gezeigt und die Erfahrungen mit der chip-basierten Elektrophysiologie evaluiert. Folglich werden zwei Hauptgruppen von Experimenten dargestellt, zum einen Versuche an künstlichen Lipidmembranen, zum anderen Arbeiten mit Zellen.

### 3.1 Modelle des Ladungstransports durch Ionenkanäle

Um zu Überleben, benötigen alle Organismen eine schützende Abgrenzung gegen ihre Umwelt. Für den fundamentalen Fall der Zelle wird dies durch die Zellmembran erreicht. Biologische Membranen haben eine geringe dielektrische Konstante  $\epsilon = 2$  im Vergleich zu Wasser mit  $\epsilon = 80$ , so dass sie eine hohe Potentialenergiebarriere für Ionen darstellen. Durch eine einfache Abschätzung ergibt die Born'sche Eigenenergie eine Energiebarriere von etwa 65 kT für die Passage eines Ions durch die Membran, was diese Passage äusserst unwahrscheinlich macht [Par 69]. Ionen können die Membran

jedoch durch Ionenkanäle passieren und erreichen dabei Transferraten von  $10^{6-8}$  Ionen/s [Hil 92]. Die Messung der hohen Transportraten führte zu der Hypothese der wassergefüllten Poren in der Membran, durch welche die Eigenenergiebarriere für Ionen stark herabgesetzt wird. Die Potentialbarriere eines wassergefüllten Kanals mit 4 Å Durchmesser beträgt aufgrund der abstossenden Kräfte der Oberflächenladungen im Kanal etwa 4 kT. Abschirmungseffekte durch Ionen in der Umgebung können die Potentialbarriere weiter verringern.

In physiologisch relevanten Bereichen von Spannungen  $V$  kleiner als 150 mV sind die Strom-Spannungsbeziehungen von Ionenkanälen typischerweise linear, d.h.:

$$I = G \cdot V, \quad (3.1)$$

mit  $I$  = Strom,  $G$  = Leitwert und  $V$  = Spannung. Bei höheren Spannungen treten jedoch Abweichungen vom Ohm'schen Gesetz auf. Eine weitere typische Eigenschaft von Ionenkanälen ist der zunächst lineare Anstieg ihrer Leitwerte mit zunehmender Ionenkonzentration bis hin zu einem Sättigungsniveau bei sehr hohen Konzentrationen. Dieses Verhalten wird durch die Michaelis-Menten Gleichung beschrieben [Hil 92]:

$$G = G_{max}/(1 + c_s/c), \quad (3.2)$$

mit  $G_{max}$  = maximaler Leitwert und  $c_s$  = Sättigungskonzentration beim Halbmaximum des Leitwerts.

Ionenkanäle sind aufgrund ihrer radialen Ausdehnung Objekte im Zwischenbereich von mikroskopischen und nanoskopischen Systemen. Das interne Volumen eines Ionenkanals kann sehr klein sein, es beträgt z.B. im Fall eines Kaliumkanals, dem KcsA-Kanal, nur etwa  $2000 \text{ \AA}^3$  [Hil 92]. Die Grösse der physiologisch relevanten Ionen liegt bei wenigen Å, der Kristallradius von z.B.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Cl}^-$  ist etwa 1-2 Å. Im Gegensatz zum Elektronentransport in mesoskopischen Systemen haben die Ladungsträger bei ionischem Transport jedoch grosse Massen von einigen  $10^{-26}$  kg. Die de Broglie Wellenlänge eines Ions ist daher klein im Vergleich zur Kanalstruk-



tur.

Ein direkter Vergleich des Ionentransports mit dem von Elektronen in mesoskopischen (Halbleiter)-Systemen ist z.B. aufgrund der unterschiedlichen Massen der Ladungsträger nicht ohne weiteres möglich, jedoch können grundlegende Konzepte aus der Mesoskopik angewendet werden: Der Leitwert ( $G$ ) eines rechteckigen, zweidimensionalen Leiters ist durch seine Breite ( $B$ ) und Länge ( $L$ ) bestimmt:

$$G = \sigma \cdot B/L, \quad (3.3)$$

wobei  $\sigma =$  Leitfähigkeit eine Materialeigenschaft ist, die nicht von den Dimensionen des Leiters abhängt. Reduziert man die Dimensionen  $B$  und  $L$  des Leiters jedoch sehr stark, so beginnt die Leitfähigkeit vom ohmschen Verhalten abzuweichen. Unter ohmschen Verhalten ist hier auf diffusen Transport beruhendes ohmsches Verhalten zu verstehen, der Transport also von Streuprozessen dominiert und nicht ballistisch ist.. Ein Leiter zeigt unter normalen Bedingungen ein ohmsches Verhalten solange seine Dimensionen deutlich grösser als jede einzelne der folgenden drei charakteristischen Längenskalen sind: (1) die de Broglie Wellenlänge des Ladungsträgers, (2) die mittlere freie Weglänge  $L_{Im}$ , also die Strecke die der Ladungsträger zurücklegen kann, bevor sein ursprünglicher Impuls zerstört ist und (3) die Phasenrelaxationslänge, also die Strecke die zurückgelegt werden kann, bevor die ursprüngliche Phase des Ladungsträgers zerstört ist.

Die mittlere freie Weglänge zwischen zwei Stößen eines Ions in Lösung beträgt etwa  $0.1 \text{ \AA}$  [And 96]), wobei nicht bei jedem Zusammenstoss der Impuls des Ions vollständig zerstört wird. Die Relaxationszeit  $\tau_{Im}$  des Impulses ist mit der Kollisionszeit  $\tau_K$  durch folgende Beziehung verknüpft:

$$1/\tau_{Im} \sim 1/\tau_K \cdot \alpha_{Im}, \quad (3.4)$$

wobei der Faktor  $\alpha_{Im}$  die Qualität des Zusammenstosses beschreibt:  $\alpha_{Im} = 1$  ist ein inelastischer Stoss,  $\alpha_{Im} = 0$  ein total elastischer. Wird bei einem Zusammenstoss zweier Ionen ihre Ausbreitungsrichtung nur um einen kleinen Winkel gestreut, so ist Impulsverlust eines individuellen Stosses nur

gering und  $\alpha_{Im}$  klein. Die mittlere freie Weglänge  $L_{Im}$  ist dann durch die Geschwindigkeit  $v_{Ion}$  der Ionen bestimmt:

$$L_{Im} = v_{Ion} \cdot \tau_{Im}. \quad (3.5)$$

Die mittlere freie Weglänge  $L_{Im}$  der Ionen kommt damit den Ausdehnungen der Kanalstruktur recht nahe, so dass nicht uneingeschränkt von ohmschen Verhalten des Ionenkanals ausgegangen werden kann. Daher wird in dieser Arbeit nicht von der Leitfähigkeit eines Ionenkanals, was ohmsches Verhalten voraussetzen würde, sondern von dem Leitwert eines Kanals die Rede sein.

Nachdem vor mehr als 100 Jahren begonnen wurde, das Ruhepotential von Nerven- und Muskelzellen mit der Elektro-Diffusionstheorie zu beschreiben, wurde der Ionentransport über biologische Membranen traditionell mit der Nernst-Planck Elektro-Diffusionsgleichung modelliert. In der Mitte der 50er Jahre wurden die Grenzen der Theorie bei der Berechnung des  $K^+$ -Transports in spannungsabhängigen Kaliumkanälen bemerkt, was zur Idee des single-file Transports führte [Hod 55]. Es wurden nun auch Ion-Ion Wechselwirkungen innerhalb der Membran explizit in den Nernst-Planck Flussgleichungen durch die Poissongleichung berücksichtigt [Bru 65]. Es wurde deutlich, dass Ionenkanäle nicht nur wassergefüllte Poren in der Membran waren: sie konnten Ionen konzentrieren und der Transport zeigte ein Sättigungsverhalten. Letzteres wurde nicht befriedigend in der Nernst-Planck Gleichung berücksichtigt, was zur Entwicklung von Ratengleichungen zur Beschreibung der Ionenpermeation führte [Läu 73].

Ratengleichungen ermöglichen es, die Kinetik der Ionenbewegung mit der Solvationsenergie des Ions im Kanal in Beziehung zu setzen. Voraussetzung dafür ist, dass die Ratenkonstante  $r$  für den Übergang über eine Energiebarriere durch ein physikalisches Modell beschrieben werden kann. Das am häufigsten verwendete Modell ist die Eyring-Übergangs-Zustand-Theorie (TST, Transition State Theory); in ihrer einfachsten Form:

$$r = (kT)/h \cdot e^{-(E/kT)}, \quad (3.6)$$

mit  $k$  = Boltzmannkonstante,  $T$  = Temperatur,  $h$  = Planckkonstante und  $E$  = Energiebarriere. Dies beinhaltet einen Beitrag  $\delta \cdot z \cdot e \cdot V$  von der elektrischen Potentialdifferenz zwischen Barrierenmaximum und -minimum, wobei  $z$  = Valenz,  $e$  = Elementarladung,  $\delta$  = der Teil des Potentials, der zwischen Minimum und Maximum abfällt. Eine grundsätzliche Beschränkung der Ratengleichungen liegt darin, dass die mittlere freie Weglänge in kondensierten Phasen etwa  $0.1 \text{ \AA}$  beträgt, was deutlich kleiner ist als die Strecke die ein Ion bei der Passage eines Ionenkanals zurücklegen muss. Der Ionen transport durch einen Kanal beinhaltet also eine Vielzahl elementarer Schritte, die zu einem einzelnen Übergang zusammengefasst werden können. Die Elementarschritte ereignen sich mit einer Häufigkeit von etwa  $10^{13} s^{-1}$  (ausgehend von einer mittleren freien Weglänge von  $0.1 \text{ \AA}$  und einer thermischen Geschwindigkeit von etwa  $10^4 \text{ cm/s}$  [And 96]), was vergleichbar mit  $(kT)/h \approx 6 \cdot 10^{12} s^{-1}$  ist. Nach der Standard Diffusionstheorie ohne Energiebarriere ist die Häufigkeit einer erfolgreichen Passage von  $1 \text{ \AA}$  nur etwa  $10^{11} s^{-1}$ , also 2 Größenordnungen geringer als die Häufigkeit der Elementarschritte. Zur korrekten Beschreibung der Strom-Spannungsbeziehung eines Kanals werden Ratengleichungen mit etwa 10 Elementarschritten benötigt. Bei Verwendung hinreichend vieler Elementarschritte gehen Ratengleichungen in Diffusionsmodelle über.

Die Kräfte, die auf Ionen im Kanal und in der Nähe des Kanals wirken, bestimmen letztlich die Transporteigenschaften durch den Ionenkanal. Die mikroskopische Berechnung dieser Kräfte ist aufgrund der langreichweitigen Coulomb-Wechselwirkungen und des grossen Dipolmoments der Wassermoleküle recht schwierig. Zur Zeit ermöglichen nur elektrostatische Kontinuumsmodelle die praktikable Berechnung der Kräfte in Permeationsprozessen insoweit, als dass sich verlässlich der Leitwert eines Ionenkanals bestimmen lässt. Es werden Wasser, Ionenkanalproteine und Lipidmembran als kontinuierliche Medien mit homogener Dielektrizitätskonstante behandelt. Sind die Positionen der fixierten Ladungen eines Proteins und mobile Ionen im Wasser durch eine Ladungsdichte  $\rho$  spezifiziert, so wird das Potential  $\varphi$  und das elektrische Feld  $E$  durch die Lösung der Poissongleichung bestimmt:

$$\epsilon_0 \nabla \cdot [\epsilon(r) \nabla \varphi(r)] = -\rho(r). \quad (3.7)$$

Durch die Lösung der Poisson-Gleichung erhält man ein statisches Potentialenergieprofil mit Ionen an festen Positionen. In einer Elektrolytlösung wird das Coulombfeld eines Ions jedoch durch Gegenionen abgeschirmt. In der Beschreibung von Permeation durch Ionenkanäle mithilfe der Poisson-Boltzmann-Gleichung wird dieser Effekt berücksichtigt. Die Poisson-Boltzmann-Theorie beschreibt ein Kontinuumsystem in dem fixierte, externe Ladungen in einem dielektrischen Medium, repräsentiert durch eine Ladungsdichte  $\rho_{ex}$ , von beweglichen Ionen der Dichte  $\rho_{el}$  umgeben sind. Die Hauptvoraussetzung dieser Theorie ist, dass im Gleichgewicht die Verteilung der beweglichen Ladungen im System durch den Boltzmann-Faktor gegeben ist:

$$\rho_{el}(r) = \sum_{\nu} z_{\nu} e n_{0\nu} e^{[-z_{\nu} e \varphi(r)/T]}, \quad (3.8)$$

mit  $n_{0\nu}$  = Dichte des Ionentyps  $\nu$  und  $z_{\nu}$  = Ladung dieses Ionentyps. In der Praxis wird die Poisson-Boltzmann-Gleichung numerisch gelöst.

Die einfachsten Permeationstheorien, welche die Ionenkanalstruktur berücksichtigen, sind die Nernst-Planck- und Poisson-Nernst-Planck-Gleichungen [?, Eis 98b]. In diesen Kontinuums-Theorien wird der Fluss  $J_{\nu}$  jedes einzelnen Ionentyps durch die Nernst-Planck-Gleichung beschrieben, welche die Diffusion aufgrund eines Konzentrationsgradienten mit der eines Potentialgradienten kombiniert:

$$J_{\nu} = -D_{\nu}(\nabla n_{\nu} + (z_{\nu} e n_{\nu})/kT \cdot \nabla \varphi), \quad (3.9)$$

mit  $n_{\nu}$  = der Dichte und  $D_{\nu}$  = dem Diffusionskoeffizient des Ionentyps  $\nu$ . Hier wurde die Einstein-Relation benutzt, um die Leitfähigkeit durch den Diffusionskoeffizienten auszudrücken:

$$\sigma = (z e n / kT) \cdot D. \quad (3.10)$$

Um eine selbstkonsistente Methode zu erhalten, sollte das Potential durch die Lösung der Poisson-Gleichung bestimmt werden. In der Poisson-Nernst-Planck Theorie werden die Gleichungen 3.7 und 3.9 gleichzeitig gelöst und man erhält das Potential, die Ionenkonzentration und den Ionenfluss in dem untersuchten System. Aufgrund ihrer Nicht-Linearität sind die Poisson-Nernst-Planck Gleichungen analytisch sehr schwer zu lösen, abgesehen von einigen sehr speziellen Fällen wie z.B. der klassischen Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung [Hil 92].

## 3.2 Experimenteller Aufbau

Es wird der Messplatz mit allen notwendigen Geräten und Einrichtungen beschrieben, die für die Patch Clamp Technik, sowohl mit Pipette als auch mit Chip, relevant sind und die in dieser Arbeit verwendet wurden. Zunächst wird auf die normale, pipetten-basierte Messtechnik eingegangen und dann die Modifikationen zur Anwendung von Patch Clamp Chips dargestellt.

### 3.2.1 Klassisches Patch Clamp

Die konventionellen Patch Pipetten werden wie bereits beschrieben aus Glas-kapillaren gezogen, wobei die Pipettenspitze in einem zweiten Schritt nochmals angeschmolzen werden kann, um den Öffnungsdurchmesser weiter zu verringern und die Glasoberfläche zu egalisieren. Das sogenannte Feuerpolieren der Pipettenspitze wird mit einer kleinen Heizdrahtwendel unter optischer Vergrößerung durchgeführt und wird vor allem bei Pipetten für Einzelkanalexperimente eingesetzt. In Abb. 3.1 ist eine typische, nicht feuerpolierte Pipette abgebildet. [Cor 83, Rae 92a, Sak 95a]. Ein guter Überblick über verwendete Glastypen und Pipettenherstellung allgemein findet sich in [Cor 83, Rae 92a, Sak 95a].

Die Pipetten werden mit Elektrolytlösung gefüllt und in einer Halterung am Vorverstärker fest montiert. Hierbei verbindet eine Ag/AgCl-Elektrode den Verstärkereingang mit der leitfähigen Elektrolytlösung. Der Vorverstärker samt Pipette ist auf einem Mikromanipulator angebracht, der über eine externe Steuerung manövriert werden kann. Die am Boden einer Petrischale angewachsenen Zellen befinden sich in einem Bad aus Extrazellulärmedium. Die Petrischale ist in einer Halterung in einem Mikroskop fest installiert. Die Pipette wird in die Badlösung gebracht und mittels des Manipulators wird die Pipettenspitze auf die Membran einer Zelle aufgesetzt. Durch Anlegen eines leichten Unterdruckes ist es möglich, elektrisch äusserst dichte

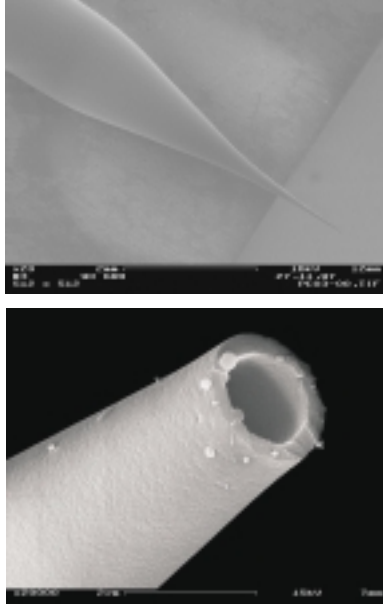


Abbildung 3.1: *Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer Patch Clamp Pipette.*

Abschlüsse zwischen Zellmembran und Pipettenspitze zu erreichen. Typische Werte des elektrischen Widerstands solcher sogenannter Seals liegen im  $G\Omega$ -Bereich [Ham 81]. Das Annähern der Pipettenspitze an die Zellmembran und die richtige Dosierung von Unterdruck zum richtigen Zeitpunkt ist durchaus nicht trivial, sondern erfordert ein gewisses Geschick und Erfahrung. Während der Sealbildung wird ein Test-Spannungspuls von einigen mV und einer Dauer von einigen ms angelegt, der für die jeweils vorliegende Situation eine charakteristische Stromantwort induziert. Aufgrund der Stromantworten lässt sich kontrollieren, in welchem Stadium der Sealbildung sich die Zelle befindet. In Abb. 3.2 sind die typischen Stromantworten auf einen Test-Spannungspuls während der Sealbildung gezeigt.

Die Sealeigenschaften verschiedener Zelltypen können sehr unterschiedlich sein; bei manchen Präparaten gelingt einem geübten Elektrophysiologen in neun von zehn Fällen ein  $G\Omega$ -Seal, bei anderen Zellen ist das Verhältnis genau umgekehrt. Elementar wichtig ist neben der Verwendung frisch gezogener (sehr sauberer) Pipetten und hochreiner, am besten steril gefilterten

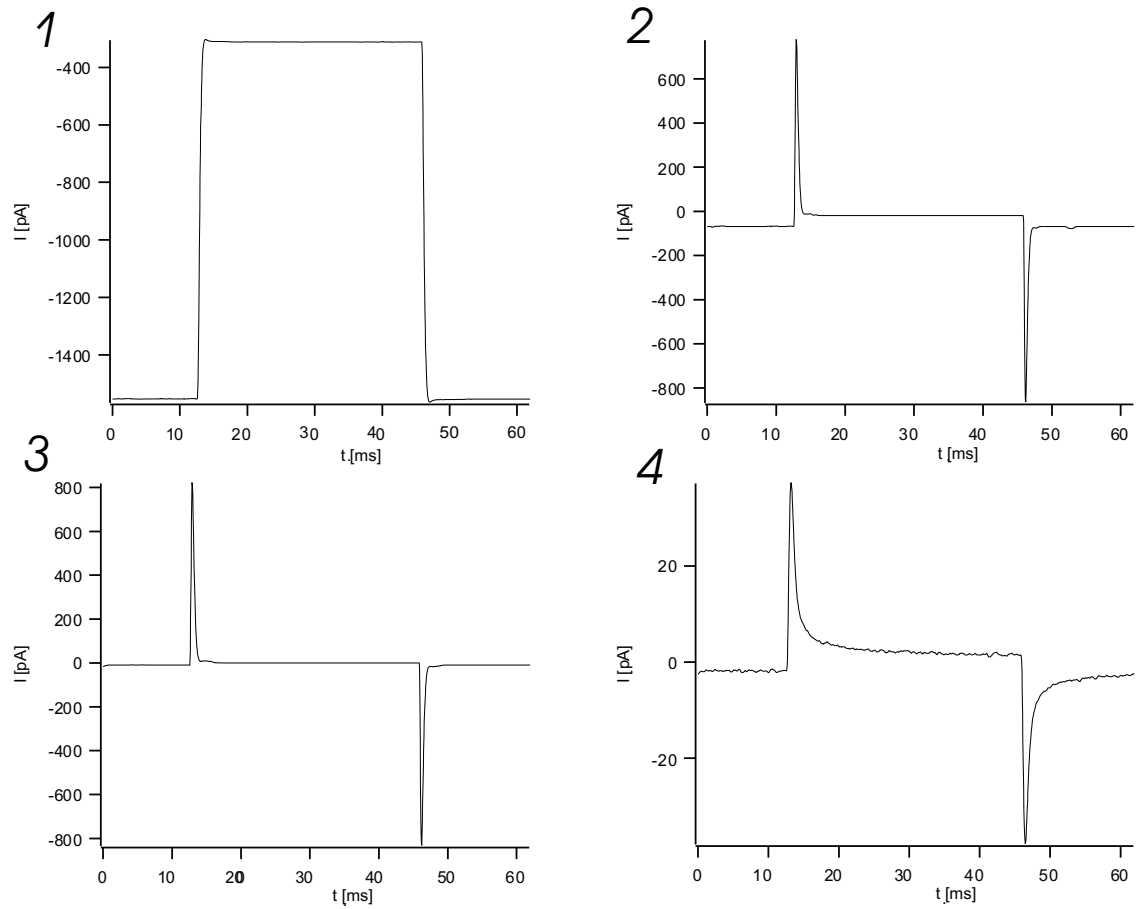


Abbildung 3.2: Stromsignale auf dem Oszilloskop für die verschiedenen Stadien der Sealbildung: 1. Stromantwort ohne Zelle auf den angelegten Spannungspuls (50 mV, 30 ms), 2. Zelle befindet sich auf der Öffnung, Beginn der Sealbildung, 3. Giga-Seal, 4. Höherer Verstärkungsfaktor und Kompensation der kapazitiven Ströme der Messsonde, des Halters und des Membranflecks, man ist nun im Cell-Attached-Mode.

Lösungen eine völlig stabile Halterung der Pipette, die auch bei Anlegen von Unterdruck keinerlei Bewegung zulässt. Ist ein G $\Omega$ -Seal etabliert, so können sehr kleine Ströme über die Zellmembran gemessen werden, typische Stromwerte liegen je nach Meßkonfiguration zwischen sub-pA und einigen nA. Man verwendet dafür eine Spannungsklemme (daher Patch Clamp) [Hod 45, Col 68], d.h. man prägt der Zelle ein definiertes Haltepotential auf. Öffnen sich nun Ionenkanäle in der Membran, fließen Ströme, das Haltepotential verändert sich und über einen Rückkopplungskreislauf im Vorverstärker wird in die Pipette ein entsprechender Strom eingespeist, der das Haltepotential wieder auf den definierten Wert bringt. Dieser Kompensationsstrom ist gleichzeitig das Messsignal, welches im Vorverstärker amplifiziert und in den Hauptverstärker weitergeleitet wird. Vom Hauptverstärker wird das Messsignal weiter konditioniert, d.h. verstärkt, gefiltert etc. und dann in ein entsprechendes Datenakquisitionssystem weitergeleitet. In Abb. 3.3 ist ein Patch Clamp Aufbau dargestellt und die Messanordnung schematisiert. Exzellente Darstellungen der Patch Clamp Technik und ihrer Anwendungen finden sich in [Lev 92, She 93, Num 96, Sak 95b]. Die Verstärkertechnik beim Patch Clamp ist stark optimiert, um die sehr kleinen Messsignale bei Raumtemperatur aus dem Hintergrundrauschen detektieren zu können. Das Prinzip der Spannungsklemme wird durch einen Operationsverstärker implementiert, in dessen Eingänge das gewünschte Haltepotential und das tatsächliche Membranpotential eingespeist werden. Die Differenz der beiden wird verstärkt und über einen Rückführwiderstand, bzw. einen Rückführkondensator wird durch die Spannungsdifferenz ein Strom in die Pipette eingespeist, bis die Differenz gegen Null geht. Dadurch gleichen sich Soll- und Istpotential an, die Spannung wird geklemmt. In Abb. 3.4 ist ein einfacher Schaltplan für einen Patch Clamp Vorverstärker gezeigt. Einen guten Überblick über die Verstärkertechnik beim Patch Clamp findet sich in [Sig 95], hinsichtlich rauscharmer Messtechnik in [Lev 98]. In dieser Arbeit wurde vornehmlich mit einem kommerziellen Patch Clamp Verstärker (Axopatch 200B, Axon Instruments, Foster City (Ca), USA) gearbeitet. Dieser Verstärker verfügt sowohl über einen resistiven als auch einen kapazitiven Rückkopplungs-Modus.

### 3.2.2 Integration des Patch Clamp Chip im Setup

Für die Arbeiten mit mikrostrukturierten Glaschips als Patch Clamp Sonden wird der Setup im Wesentlichen übernommen, es wird lediglich die Pipette gegen den Chip ausgetauscht. Verschiedene Halterungen wurden entwickelt,



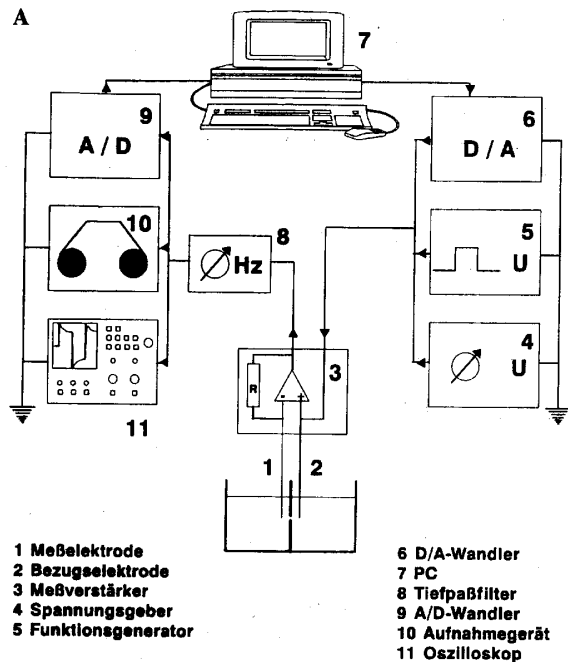


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau aller relevanten Komponenten eines typischen Patch Clamp Aufbaus [Han 97].

um den Patch Clamp Chip in den bestehenden Aufbau einzusetzen und mit dem Vorverstärker zu verbinden. Beim Design der Halterung sind verschiedene Parameter zu berücksichtigen, die im folgenden beschrieben werden. Es wird hier nur die aktuellste Halterungslösung vorgestellt, die allen Anforderungen gerecht wird.

Der Patch Clamp Chip ist auf Ober- und Unterseite von Elektrolytlösung umgeben. Beim Arbeiten mit Zellen befindet sich auf der Oberseite Extrazellulärlösung, auf der Unterseite Intrazellulärlösung, für Experimente an künstlichen Lipidmembranen wurden symmetrische Lösungen verwendet. Um den Chip auf beiden Seiten mit Lösung befüllen zu können, müssen Ober- und Unterseite gut erreichbar sein. Weiterhin ist es außerordentlich wichtig, die Lösungsvolumina auf beiden Seiten des Chips bis auf die Apertur elektrisch absolut voneinander zu isolieren. Nur so ist gewährleistet,

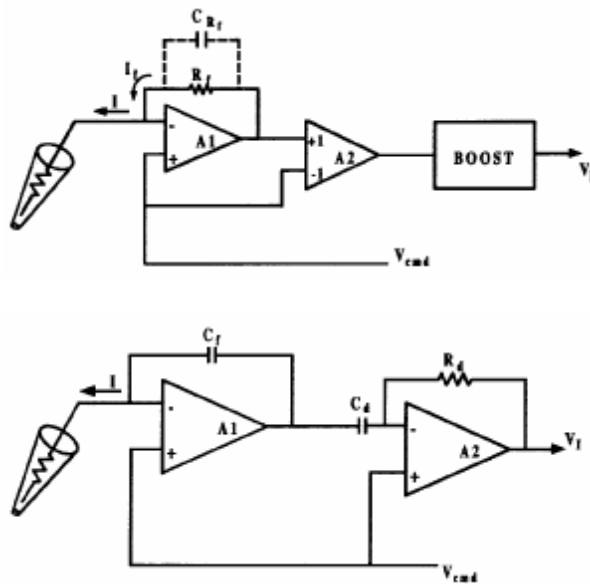


Abbildung 3.4: Zwei mögliche Schaltungen für einen Patch Clamp Vorverstärker. Oben: Resistiver Vorverstärker bei dem der Operationsverstärker A1 als Strom-Spannung-Wandler agiert. Unten: Kapazitiver Vorverstärker.

dass beim Experiment nur der Strom durch die Apertur im Chip bzw. die integrierte Membran darin gemessen wird und nicht ein Leckstrom etwa außen um den Chip herum die exakte Messung verhindert.

Ein fertig prozessierter Chip wird mit einem Epoxydharz-basierten Zweikomponentenkleber (UHU Endfest 300) oder einem Silikonelastomer (PDMS, Sylgard, Dow Corning) auf einen speziell dafür entwickelten Halterungskopf aufgeklebt. Dadurch werden die Lösungskompartimente elektrisch voneinander getrennt und nur noch durch die Apertur miteinander verbunden. Der Halterungskopf ist aus Polycarbonat gefertigt, da dieses Material relativ gut zu bearbeiten ist und dielektrisch optimale Eigenschaften aufweist. Im Halterungskopf ist eine Bohrung von 1,5 mm Durchmesser (Abb. 3.5) auf die der Chip so aufgebracht wird, dass die vorstrukturierte Unterseite im Bereich der Bohrung des Halters ist. Auf diese Weise ist der vorstrukturierte Bereich mit der Apertur leicht zu erreichen und mit

Lösung zu befüllen. Im Halterungskopf ist ein Innengewinde, mit dem der Halterungskopf samt Chip auf den Halter aufgeschraubt werden kann. Die gesamte Halterung wird weiterhin in den Eingang des Vorverstärkers eingeschraubt, der gleichzeitig die Halterung auf Position hält. Im Inneren des Halters verläuft ein Ag/AgCl-Draht, der auf der einen Seite mit dem Eingang des Vorverstärkers verbunden ist und auf der anderen Seite so positioniert ist, dass er von unten in die Elektrolytlösung im vorstrukturierten Bereich des Chips ragt. Dadurch wird ein elektrischer Kontakt des Chips, bzw der umgebenden Lösung und dem Vorverstärker realisiert. Des Weiteren ist in der Halterung ein Metallröhrchen eingelassen, auf das ein Schlauch aufgesetzt wird um Unter- bzw. Überdruck applizieren zu können. Um die Halterung komplett mechanisch (Druckapplikation) und elektrisch (Strommessung) abzudichten, sind sowohl zwischen Halterungskopf und Halter sowie zwischen Halter und Vorverstärker Dichtungsringe eingebracht, die beim Anschrauben ausreichend gequetscht werden.

Generell ist die gesamte Halterungseinheit sehr kompakt gehalten, um weitere Streukapazitäten zu minimieren. Die Halterung erlaubt einen schnellen Wechsel der mit Chip versehenen Aufsätze, so dass in rascher Folge Chipwechsel stattfinden können. Es wurden verschiedene Adapter gefertigt, die auf verschiedene Modelle von Vorverstärkern passen, so dass mit Verstärkern verschiedener Hersteller Versuche gemacht werden konnten. In Abb. 3.5 ist ein Bild der Halterung für Patch Clamp Chips zu sehen [Mey 00]. Die eingebaute Halterung bringt den Chip in horizontaler Lage in den Setup, so dass der Kegel, der schließlich die Apertur bildet, nach oben zeigt. Auf diese Weise kann man den Chip, bzw. die Apertur durch ein Wasserimmersions-Aufficht-Mikroskop beobachten und z.B. das Ausdünnen einer Lipidmembran oder das Ansaugen einer Zelle untersuchen. Für die Experimente an Lipidmembranen wurden zusätzlich besondere Badkammern gebaut, in denen der Chip zwei Badkompartimente voneinander trennt. Bei dieser Anordnung ist der Chip senkrecht eingebaut, was bei manchen Experimenten hilfreich sein kann.

### **3.3 Experimente mit artifiziellen Lipidmembranen**

Im folgenden wird zunächst auf die Eigenschaften und Herstellungsweisen von künstlichen Lipidmembranen eingegangen. Es werden dann verschiedene Experimente mit sehr kleinen Lipidmembranen in mikrostrukturierten

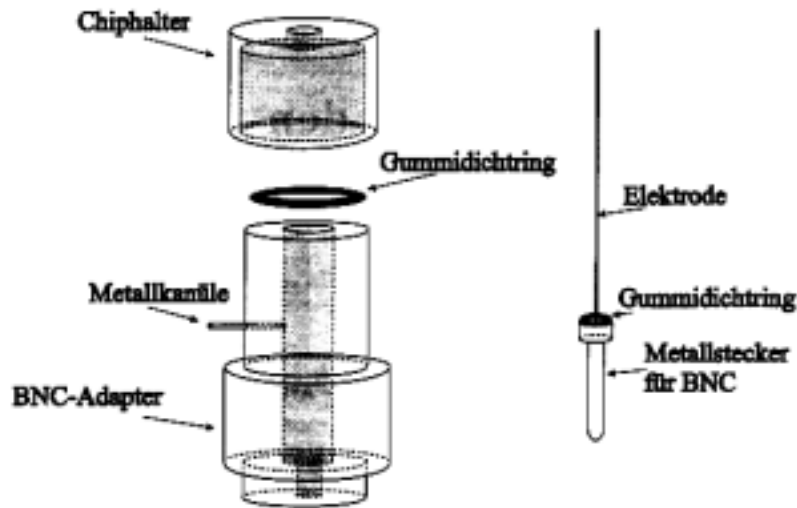


Abbildung 3.5: Die Patch Clamp Chips werden auf Halterungsköpfe aus Polycarbonat aufgeklebt, welche auf eine Halterung aufgeschraubt werden. Die Halterung wird am Vorverstärker montiert und eine Elektrode kontaktiert die Elektrolytlösung an der Unterseite des Chips. An der Halterung ist eine Metallkanüle angebracht über die Über- und Unterdruck appliziert werden kann.

Aperturen in Glaschips vorgestellt, sowie die Vor- und Nachteile der Mikrochips diskutiert.

### 3.3.1 Biophysik von Lipidmembranen

Biologische Membranen sind komplex in Struktur und Funktion. Ihre quantitativ wichtigsten Bestandteile sind Phospholipide und Proteine. Natürliche Phospholipide enthalten Glycerin, das in den Positionen 1 und 2 mit Fettsäuren verestert ist. Die Grundstruktur der meisten Membranlipide ist daher Phosphatidsäure (PA). Bei nahezu allen Membranphospholipiden ist deren Phosphatgruppe aber noch mit einem weiteren Alkohol verestert (siehe Abb. 3.6). Beispiele dafür sind Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerin (PG), und Phosphatidylserin (PS). Bei pH-Werten um 7 sind die Phospholipide je nach Struktur des po-

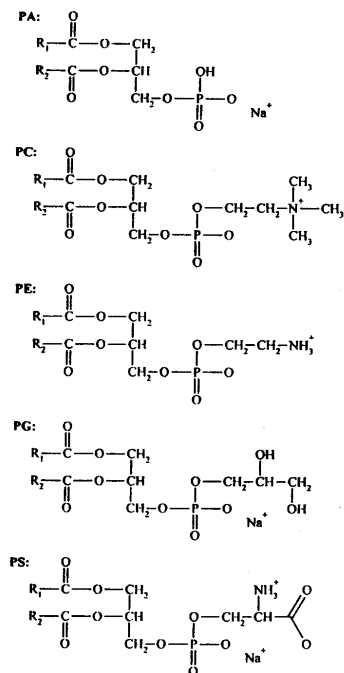


Abbildung 3.6: Strukturformeln von PA, PC, PE PG und PS.

laren Bereichs neutral und zwitterionisch, wie z.B. PC und PE, oder weisen eine negative Oberflächenladung auf, wie z.B. PA, PG und PS [Eib 84]. In wässrigen Lösungen bilden Phospholipide bei Erreichen einer bestimmten Konzentration, der kritischen Mizellkonzentration (CMC), spontan höhermolekulare Aggregate (Abb. 3.7). Deren Form ist sowohl von der chemischen Struktur der Phospholipide als auch von physikalischen Parametern wie Oberflächenladung, Temperatur und Ionenmilieu abhängig. Überwiegt die Grenzflächenbeanspruchung des polaren Bereiches der Phospholipide gegenüber dem apolaren, so werden Mizellen gebildet. Überwiegt jedoch der apolare Bereich, so entstehen invertierte Mizellen, die in Anlehnung an ihre Struktur auch als 'hexagonal' bezeichnet werden. Ist das Grenzflächenverhältnis des apolaren und polaren Bereiches etwa 1, entstehen ausgedehnte, lamellare Schichten, die auch Kugeln mit wässrigem Innenvolumen, sogenannte Vesikel oder Liposomen, bilden können. Charakteristische Beispiele hierfür sind die PC's. Für die Funktionstüchtigkeit von Trans-

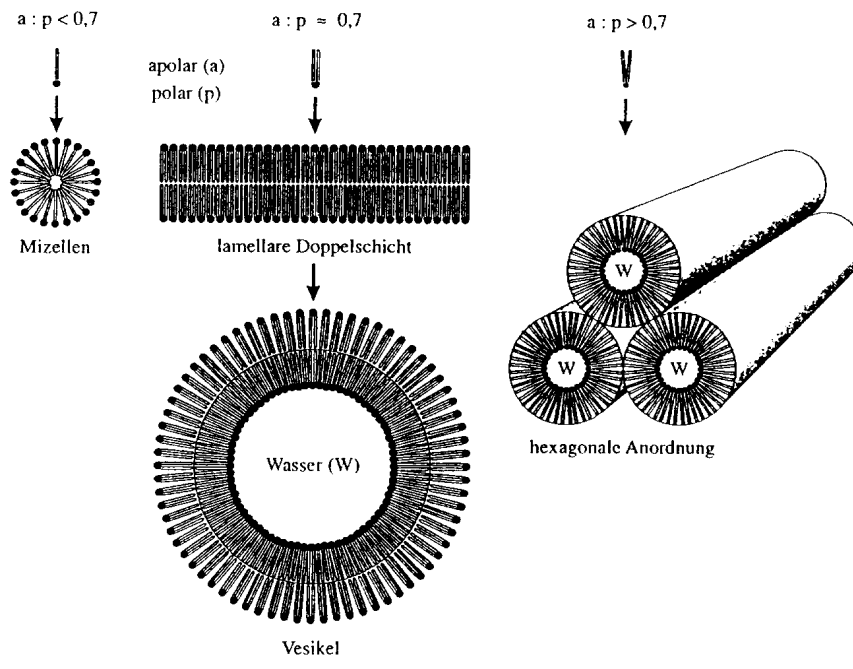


Abbildung 3.7: *Aggregate von Phospholipiden in Wasser.*

membranproteinen ist es essentiell, daß sie in Lipidschichten integriert sind, die beidseitig von wässrigem Medium begrenzt sind, also Vesikel oder planare Membranen. Die meisten Phospho- und Glykolipide bilden in wässriger Lösung spontan lamellare Schichten, also Membranen aus. Planare Lipiddoppelschichten lassen sich entweder freistehend (black lipid membrane, BLM) oder trägerfixiert (supported planar membrane, SPM) präparieren. Erstere werden als schwarze Membranen bezeichnet, da sie aufgrund ihres Durchmessers von ca. 3-5 nm Licht nicht reflektieren und daher im Mikroskop schwarz erscheinen.

Es gibt eine Vielzahl von Untersuchungen zu Proteinen in SPM's [Hey 95, McC 86, Spi 93, Fri 92, Sac 96], jedoch ist die Rekonstitution von intrinsischen Membranproteinen in ihrer aktiven Form durch das Trägersubstrat gestört. Die Ursache sind vor allem Wechselwirkungen mit dem Substrat [Bey 96] und die fehlende Wasserschicht für die extramembranären Teile der Proteine [Lan 94]. Ein vielversprechender Ansatz ist in diesem Zusam-

menhang die Verwendung von Abstandshaltern zwischen Lipiddoppelschicht und Substrat [Wag 00]; die sogenannten 'cushioned supported bilayers' sind auf beiden Seiten von Lösung umgeben und kommen daher der nativen Umgebung von Membranproteinen näher als herkömmliche SPM's.

### 3.3.2 Präparation von freitragenden Lipidmembranen

Bei der Herstellung von BLM's kann man zwei Haupttechniken unterscheiden, die 'painting'-Methode oder Streichtechnik [Mül 62] und die Langmuir-Blodgett (LB)-Technik [Mon 72]. In beiden Fällen wird eine Öffnung in einem Substrat eingesetzt, um über diese Öffnung eine Lipiddoppelschicht zu spannen. Es können nun Kanalproteine oder sonstige Porenbildner in die Membran eingebracht werden [Nel 80, Sch 80, Tan 83, Mil 87] und mit entsprechender Elektronik Ströme durch die Ionenkanäle gemessen werden (siehe Abb. 3.8). Üblicherweise werden die notwendigen Löcher mit mechanischen Methoden in dünnen Teflonfolien hergestellt. Die Durchmesser der Löcher sind meist etwa 200-500  $\mu\text{m}$  gross, bzw. bei Anwendung besonderer Technik bis hinab zu 80  $\mu\text{m}$  [Won 90] klein. Die resultierenden Bilayer weisen eine entsprechend hohe Kapazität auf. Um dieses Problem zu lösen, wurden Bilayer auf Glaspipettenspitzen mit etwa 5-10  $\mu\text{m}$  Durchmesser aufgespannt [Coro 83], was die Kapazität der Membranen schon deutlich reduziert hat. In dieser Arbeit wurden nun mikrostrukturierte Glaschips für die Herstellung von Lipidmembranen verwendet, wobei der Durchmesser der eingesetzten Aperturen auf unter 2  $\mu\text{m}$  reduziert werden konnte [Fer 01a, Fer 01b]. Zur Erzeugung der Lipidmembranen wurde ausschließlich die 'painting'-Methode eingesetzt.

Zunächst wird eine Lipidmischung aus Diphytanolphosphoditylechin (Di-PhPC) und n-Dekan (1mg/ml) angesetzt, die über mehrere Wochen bei -20  $^{\circ}\text{C}$  gelagert werden kann. Mit Hilfe eines mit Teflon beschichteten Silberdrahts werden etwa 0,5-1,5  $\mu\text{l}$  dieser Lipidmischung auf die Apertur aufgebracht. Der Chip ist zu diesem Zeitpunkt bereits beidseitig von Elektrolytlösung umgeben. Die Lipiddoppelschicht formt sich nicht spontan an der Apertur im Chip, da die thermodynamische günstigere Form der massive Tropfen ist. Daher wird der Lipidtropfen mit dem Teflon-'Pinsel' verteilt, bis die Lipidschicht in einen energetisch günstigen metastabilen Gleichgewichtszustand übergeht. Der entscheidende Faktor für die BLM ist die Grenzfläche zwischen dem Lipidreservoir, das die BLM ringförmig umgibt, und der wässrigen Pufferlösung. Der durch das Spreizen der Lipidlösung über der Apertur gebildete Lipidfilm ist zu Beginn noch mehrer Mikrometer

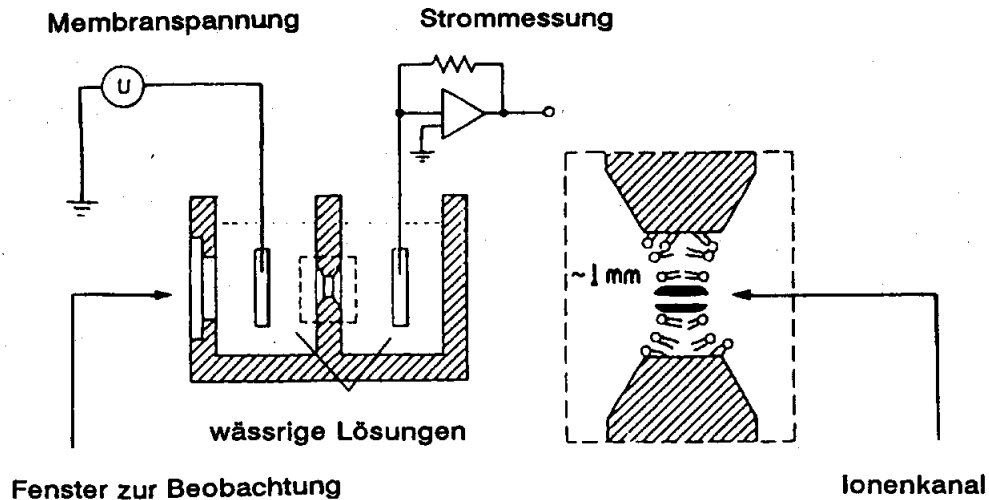


Abbildung 3.8: Aufbau einer konventionellen Messkammer für künstliche Lipidmembranen [Han 97].

dick. Durch verschiedene Kräfte geht er aber spontan in die Lipiddoppelschicht über. Im Anfangsstadium ist die entscheidende treibende Kraft der Plateau-Gibbs-Grenzflächensog, der von der Krümmung der Lipidmembran herrührt. Infolgedessen kommt es zunächst zu einem Fluss von Lipid aus dem flachen Film in die Randregion des ringförmigen Lipidreservoirs und damit zur Verjüngung des Lipidfilms. Hat der Lipidfilm eine Dicke von einigen 10 nm erreicht, wird eine zweite Kraft entscheidend. Die London-van-der-Waals-Anziehung zwischen den wässrigen Phasen, die durch den dünnen Lipidfilm getrennt sind, bewirkt die Verringerung der Filmdicke bis zur Doppelschicht (Abb. 3.9). Die Lipiddoppelschicht wäre jedoch nicht stabil, wenn der London-van-der-Waals-Anziehung nicht eine oder mehrere Kräfte entgegen wirkten. Die erste Gegenkraft ist die sterische Abstoßungskraft, die sich dadurch erhöht, daß Lösungsmittel bei der Abnahme der Membrandicke aus dem Lipidfilm ins Lipidreservoir gedrückt wird. Die zweite Gegenkraft entsteht durch die zunehmende Viskosität des noch im Lipidfilm befindlichen Lösungsmittels mit abnehmender Dicke der Lipidschicht. So erreicht die BLM letztlich ein lokales Gleichgewicht, bei dem das chemische Potential des Lösungsmittels und des Lipids in der BLM und im



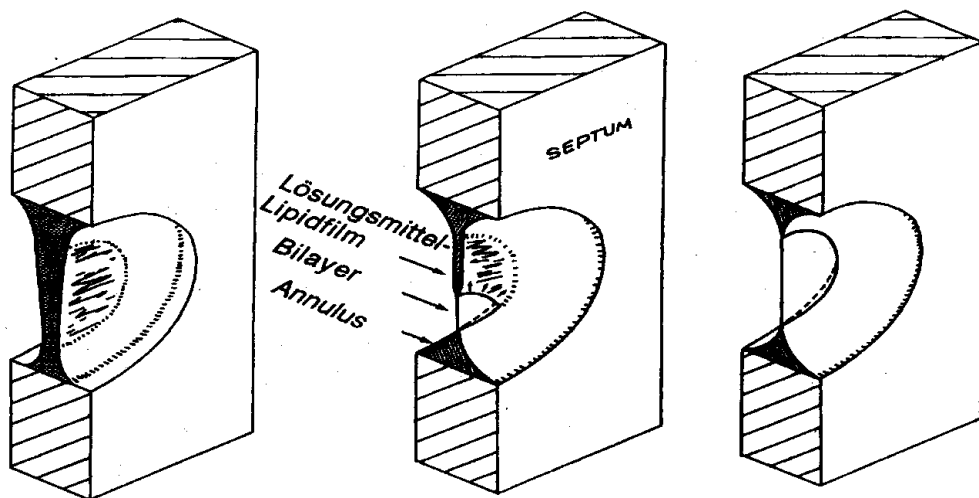


Abbildung 3.9: Phasen bei der Ausbildung einer BLM mit der Streichtechnik [Whi 72].

ringförmigen Lipidreservoir gleich sind.

Zusätzlich zur van-der-Waals-Anziehung führt das Anlegen eines elektrischen Feldes über die Lipidschicht zu einer Verringerung der Filmdicke und zu einer Vergrößerung der Fläche der Doppellipidschicht. Die dafür verantwortliche Kraft ist die Elektrostriktion. Diese führt zu einem erhöhten Druck in der Membran im Vergleich zum Lipidreservoir. Da kurzkettenige Alkane (das Lösungsmittel) und die Doppellipidschicht eine nicht-ideale Mischung bilden, führt das wiederum zu einer Abnahme der Konzentration der Alkane in der BLM. Je stärker das Mischungsverhalten der Alkane mit der Doppelschicht vom idealen Mischungsverhalten abweicht, umso stärker ist auch der Effekt eines äusseren elektrischen Feldes. Daher wird auch die Dicke von Lipidschichten, die mit n-Hexadekan gebildet werden, deutlich weniger durch ein elektrisches Feld beeinflusst, als dies bei Lipidschichten, die mit n-Dekan gebildet wurden der Fall ist. Die Anwendung der Elektrostriktion ist besonders bei den in dieser Arbeit verwendeten, extrem kleinen Membranen hilfreich, da diese generell weniger zum Ausdünnen neigen als Membranen mit sehr großem Durchmesser.

Allgemein wichtig sind beim Arbeiten mit künstlichen Lipidmembranen

die Phasenübergangstemperaturen des verwendeten Lipids. Für BLM-Experimente sollte das Lipid bei Raumtemperatur, bzw. der während des Experimentes herrschenden Temperatur in der fluiden Phase sein, da sonst die Ausbildung einer (fluiden) Bilayer wie in einer Zellmembran schlecht möglich ist. Entsprechende Phasenübergänge des Lipids der Bilayer haben auch eine Auswirkung auf den Ionentransport von Poren in der Membran [Boh 80].

### 3.3.3 Gramacidin

Gramacidine sind eine Gruppe von Peptid-Antibiotika aus der Kulturflüssigkeit von *Bacillus brevis*. Nach ihrer Struktur werden vier Arten von Gramacidinen unterschieden, die Gramacidine A, B und C sowie das Gramacidin S. Bei den drei erstgenannten handelt es sich um offenkettige Pentadecapeptide mit einer Ethanolamin-Gruppe am C-terminalen und einer N-Formyl-Gruppe am N-terminalen Ende. Die Gramacidine A, B und C unterscheiden sich lediglich durch verschiedene Aminosäuren in den Positionen 1 und 11 (Abb. 3.10). Ihre Gewinnung erfolgt über chromatographische Fraktionierung von Gramacidin D. Als Gramacidin D wird das natürliche Gemisch aus den Gramacidinen A, B und C bezeichnet. Gramacidin A ist mit etwa 80% der Hauptbestandteil des Gramacidin D [Woo 92]. Das Gramacidin S ist im Unterschied zu den Gramacidinen A, B und C ein Cyclopeptid, das aus zwei identischen Pentapeptiden aufgebaut ist. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Gramacidin A gearbeitet. Gramacidin A ist die klassische

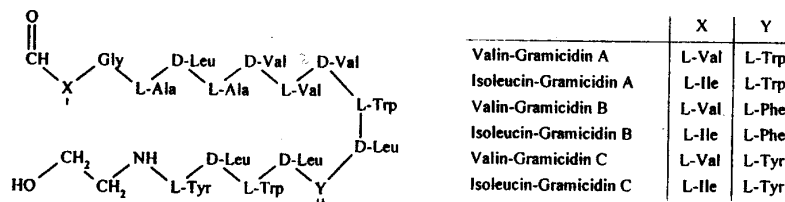


Abbildung 3.10: Struktur von Gramacidin A, B und C.

Modellpore in der Biophysik von Lipidmembranen [Hil 92]. Aufgrund der Einfachheit ihrer Struktur und ihrer klar definierten Funktionsweise sind Gramacidin A Kanäle ein gut zugängliches System für das Verständnis der

molekularen Basis des Ionentransports durch biologische Membranen. Die Literatur zum Ionentransport durch Gramicidin in Lipidmembranen ist intensiv; eingehende Untersuchungen begannen bereits in den siebziger Jahren [Hla 72, Neh 78a, Urb 80, And 83, Ell 83, Sig 87, Woo 92]. Auch heute ist die Forschung am Gramicidin ein sehr aktives Feld [Gou 98], wobei es oft als indirektes Hilfsmittel für weiterführende Experimente verwendet wird [Lun 99], in der Biosensorik seine Anwendung findet [Nik 98, And 99] oder mit neuen, physikalischen Techniken untersucht wird, auch um diese zu evaluieren [Bus 93, Abd 96]. Zudem wird Gramicidin in diversen Untersuchungen auch chemisch modifiziert, um z.B. Struktur-Funktionsbeziehungen zu analysieren [Koe 96].

### Eigenschaften des Gramicidin A

Gramicidin A ist ein Tonnen-förmiges Molekül mit einer Länge von etwa 1,5 nm und einem inneren Porendurchmesser von rund 0,4 nm [Bus 93, Bam 77]. Die Summenformel von Gramicidin A ist  $C_{99}H_{139}N_{19}O_{18}$ , die sich daraus ergebende molare Masse beträgt 1883,30 g/mol.

Um Gramicidin in eine Lipidmembran zu integrieren, wird entweder direkt eine Lipidmischung mit Gramicidin angesetzt, oder Gramicidin wird aus methanolischer Stammlösung in die Elektrolytlösung zugegeben und setzt sich dann aufgrund seiner lipophilen Struktur in die Membran ein. Die Länge eines Gramicidinmoleküls entspricht etwa der Dicke einer Lipidmonolage, so dass es sich in die Lipidmonoschichten einer Membran einfügt. Dadurch wird zunächst kein Leitwert erzeugt; erst wenn zwei Gramicidinmonomere in der Membran zusammentreffen, können sie ein Dimer mit Leitwert erzeugen. Das Dimer durchspannt dabei die ganze Membran und bildet auf diese Weise eine wassergefüllte Pore, die den Ionenfluss ermöglicht. Die Situation ist in Abb. 3.11 skizziert. Das Gramicidin A Dimer ist kationenselektiv, die Permeabilität der Ionen entspricht dabei der Reihenfolge  $H^+ \gg NH_4^+ > Cs^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$  [Hil 92]. Nahezu undurchlässig sind Gramicidin A Kanäle für Anionen und zweiwertige Kationen [Mye 72, Urb 78].  $Ca^{2+}$  und  $Ba^{2+}$  sowie in geringerem Maße auch  $Mg^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  sind in der Lage, den Ionenkanal zu blockieren [Bam 77]. Die Blockierung erfolgt dabei durch die Verstopfung des Gramicidin A Kanals infolge einer Bindung dieser Ionen in der Nähe des Kanaleingangs [Urr 82]. Bis zu Potentialen von etwa 150 mV verhält sich der Leitwert der Gramicidin A Kanäle ohmsch, nimmt also linear mit steigender Spannung zu. Bei höheren Potentialdifferenzen ergibt sich ein Maximalstrom. Der größte elek-

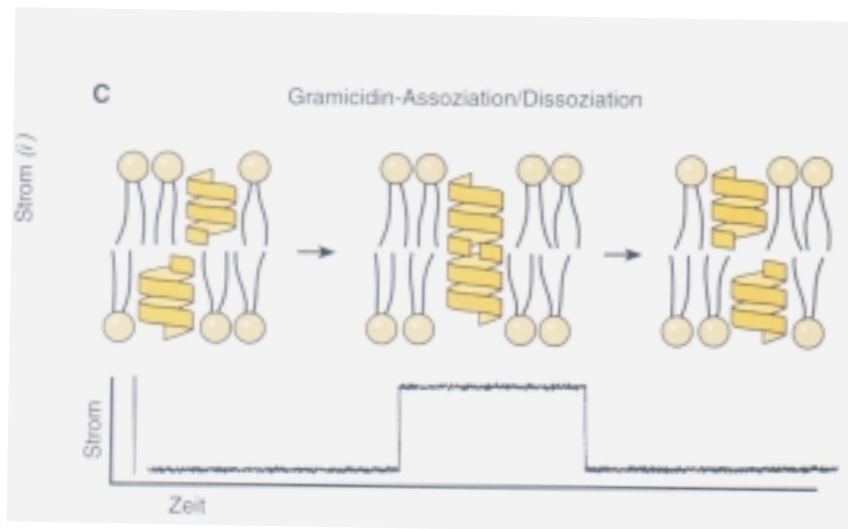


Abbildung 3.11: *Gramicidinmonomere diffundieren in einer Lipidmembran. Zwei Monomere können einen metastabilen Komplex bilden, der einen Leitwert aufweist und je nach Umgebungsbedingungen nach einigen hundert ms bis Sekunden wieder dissoziiert.*

trische Leitwert eines einzelnen Gramicidin A Kanals, von der bislang in der Literatur berichtet wurde, beträgt 107 pS für einwertige Kationen [Neh 78a] und ca. 1800 pS für Protonen [Eis 80].

Die Bildung von Gramicidindimeren ist nicht spannungsabhängig, die frei diffundierenden Monomere treffen sich stochastisch und bilden eine metastabile Struktur. Je nach Temperatur, Dicke der Lipidmembran, also Länge der Kohlenstoffketten der Phospholipide und z.B. angelegter Spannung ist ein Gramicidindimer für einige hundert Millisekunden bis zu mehrere Sekunden stabil [Pro 95]. Die Erhöhung der Kohlenstoff-Kettenlänge der Lipide von C<sub>16</sub> auf C<sub>24</sub>, was einer Vergrößerung der Membrandicke von 2,8 auf 6,9 nm entspricht, bewirkt eine Verringerung der mittleren Öffnungsdauer der Gramicidin A Kanäle um mehr als zwei Größenordnungen [Bam 77]. Der Leitwert der Gramicidin A Kanäle ist über einen weiten Bereich nahezu unabhängig von der Dicke d der sie umgebenden Lipidmembran [Hla 72]. Selbst Änderungen der Membrandicke von d = 2,2 nm bis d = 4,8 nm haben so gut wie keine Auswirkungen [Bam 77].

Die verschiedenen Gramacidinderivate weisen aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur unter anderem ungleiche Leitwerte auf. Dimere eines bestimmten Gramacidinderivats haben immer die gleiche Leitfähigkeit, jedoch kommt Gramacidin nur in Mischungen verschiedener Derivate vor. Diese werden daher in Hochdruck-Säulenchromatographie (HPLC) aufgereinigt; jedoch ist das vollständige Isolieren eines bestimmten Derivats sehr aufwendig, so dass oft Restspuren in den aufgereinigten Substanzen verbleiben. Elektrophysiologisch äussert sich dies durch das Auftreten verschiedener Leitwertsstufen bei gleichbleibenden Bedingungen, die aus Verschmutzungen mit anderen Gramacidinderivaten resultieren.

### **Struktur des Gramacidin A Dimers**

Die Assoziation der Gramacidin A Monomere zu  $\beta$ -helicalen Dimeren erfolgt über sechs intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen der N-Formyl-Termini [Dur 90]. Gleichzeitig besteht eine Stabilisierung der Gramacidin A Kanäle durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen in der Kanal/Lösungsmittel-Grenzfläche und den Peptid-CO- sowie den NH-Gruppen am C-Terminus. Eine weitere Stabilisierung erfahren die transmembranären Kanäle durch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wassermolekülen und den polaren Phospholipidgruppen an der Membran/Lösungsmittel-Grenzfläche einerseits und den Indol-NH-Gruppierungen des Gramacidins andererseits [Pro 95]. Die Struktur der Gramacidin A Monomere wird in sich durch zehn intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert [Pro 95, Koe 97].

Neuere Untersuchungen unter Verwendung der Fluoreszenzspektroskopie [Muk 94], der NMR-Spektroskopie [Hu 95, Hin 88], der IR-Spektroskopie [Van 94] und der Patch Clamp Technik [Ben 93] brachten den Beweis, dass durch die Tryptophan-Reste in den Positionen 9, 11, 13 und 15 des Gramacidin A die Kationenselektivität des Kanals bestimmt wird. Der Dipol des Tryptophans liegt dabei in der Ebene mit den Kopfgruppen des Phospholipids und reduziert so das Oberflächenpotential der Membran. Infolgedessen wird der Eintritt von Ionen in die Doppelschicht erst möglich.

### **Messungen an Gramacidin mit mikrostrukturierten Glaschips**

In dieser Arbeit wurden Leitwertmessungen an Gramacidin A vorgenommen. In Abb. 3.12 sind Strommessungen von Gramacidin A in einer DPhPC-Membran aufgespannt auf Glaschip in einer Apertur von 2  $\mu\text{m}$  Durchmesser

abgebildet.

Aufgrund der geringen Kapazität der sehr kleinen Lipidmembranen in

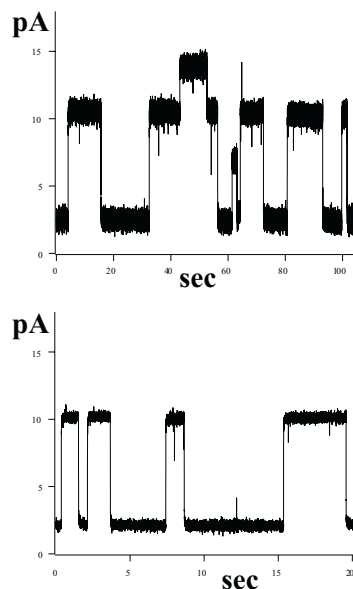


Abbildung 3.12: *Ionischer Stromfluss durch Gramicidin A Poren in DPhPC. Die Messungen wurden in 3 M CsCl bei 200 mV Potential durchgeführt (Filterfrequenz: oben 3 kHz, unten 1 kHz). Die geringe Kapazität der Membran ermöglicht eine sehr rauscharme Messung, so dass hier bis zu 3 kHz Bandbreite verwendet werden kann.*

den Aperturen ist das Hintergrundrauschen in den Messungen sehr gering. Der rms-Rauschpegel in einer Bandbreite von dc bis 1 kHz liegt bei diesen Mikrolipidschichten bei 300 fA. In Abb. 3.13 sind Strommessungen an Gramicidin in KCl-Lösung gezeigt. Es wurde ein Histogramm des Leitwerts der Membran gemacht, bei dem deutlich zwei unterschiedliche Leitwertsniveaus erkannt werden. Das in dieser Arbeit verwendete Gramicidin A ist lediglich einfach mittels HPLC aufgereinigt; es liegen daher verschiedene Gramicidinderivate mit unterschiedlichen Leitwerten vor.

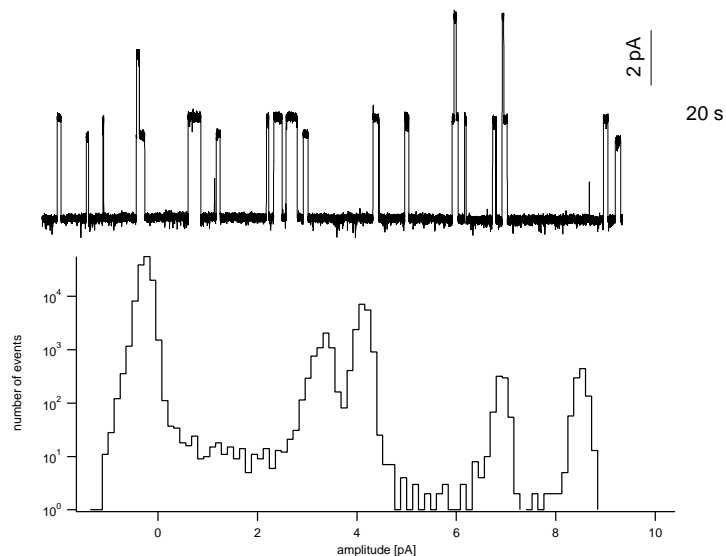


Abbildung 3.13: *Oben: Strommessungen an Gramicidin A in 1M KCl-Lösung. Das anliegende Potential war 100 mV und die Messung wurde bei 100 Hz gefiltert. Unten: Histogramm der Ströme der obigen Messung. In der Bilayer liegen zwei verschiedene Gramicidinderivate mit leicht unterschiedlichen Leitwerten von etwa 3.6 pA und 4.1 pA vor.*

### 3.3.4 Alamethicin

Alamethicin ist wie Gramicidin ein Peptid und hat ein Molekulargewicht von 1964.35 g/mol. Alamethicin ist ein stabförmiges Molekül mit helikaler Struktur. In Abb. 3.14 ist eine modellhafte Strukturformel abgebildet. Neben Gramicidin ist Alamethicin ein außerordentlich gut untersuchter Porenbildner [Woo 92], verschiedene Alamethicinderivate [Mak 95, Bor 00] in den verschiedensten Umgebungen sind mit einer Vielzahl von Methoden untersucht worden [Bak 01]. Alamethicin ist auch Gegenstand von Untersuchungen in dieser Arbeit, um Vergleiche zu den zahlreichen Arbeiten in der Literatur zu diesem Molekül anstellen zu können und so die Eigenschaften des Chips weiter zu charakterisieren.

Die Alamethicinmoleküle haben eine Länge von etwas mehr als 3 nm und

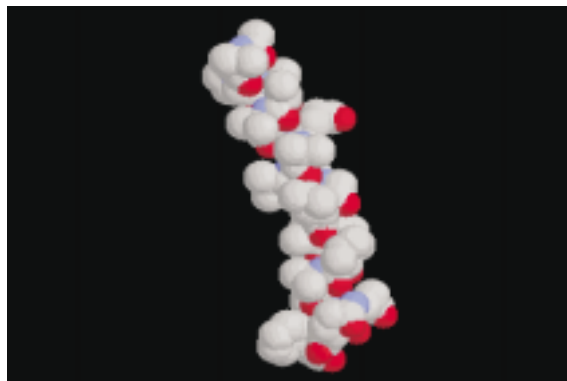


Abbildung 3.14: *Strukturmodell von Alamethicin.*

sind aufgrund der ausgeglichenen Polarisierungs- und Ladungsverteilung lipophil. Üblicherweise wird Alamethicin in einer alkoholischen Stammlösung aufbewahrt, in dieser Arbeit wurde Methanollösung verwendet. Für die Experimente wird ein geringes Volumen der Stammlösung, je nach Aufbau wenige  $\mu\text{l}$ , in die Elektrolytlösung gegeben, welche die Lipidmembran umgibt. Die Zugabe erfolgt nur auf der Seite der Membran, die später auf negatives Potential geklemmt wird. Aufgrund der Lipophilie des Alamethicins integriert sich dieses in die Lipidmembran, wo es sich zunächst in paralleler Ausrichtung in eine Monolage einbaut. Durch Anlegen einer Spannung über die Membran richtet sich das Alamethicinmolekül aufgrund seines Dipolmoments aus, so dass es nun die Bilayer durchspannt (Abb. 3.15).

In diesem Zustand ist das Alamethicin jedoch noch nicht leitfähig, da es keine Pore in der Membran bildet. Erst wenn sich mehrere, die Membran durchspannende Alamethicinmoleküle zusammenfinden, kann sich ein metastabiler Komplex bilden, welcher tatsächlich eine Pore in der Membran formen kann. Die Entstehung von Alamethicinporen setzt also einerseits die Ausrichtung der einzelnen Dipole im Feld, und andererseits die Aggregation von mindestens 3 Elementen voraus. Kommt ein viertes Alamethicin zu dem Komplex hinzu, steigt der Leitwert weiter an. Es können sich nun mehrere, bis zu acht, neun oder mehr Alamethicinmoleküle verbinden, was man anhand der Stufen im Leitwert ablesen kann. Die Zunahme des Leitwerts steigt bei Hinzukommen eines weiteren Alamethicins zu einem Komplex allerdings nicht um einen konstanten Betrag an, sondern deutlich überproportional.



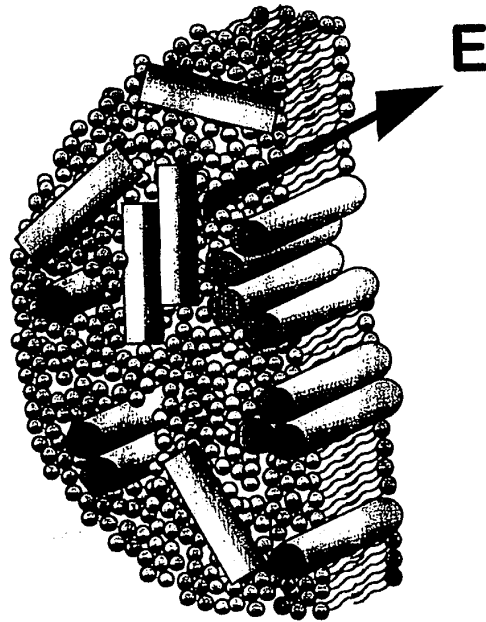


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung von Alamethicinmolekülen in einer Lipidmembran [Bez 97]. Die Alamethicinmoleküle richten sich entsprechend eines extern angelegten elektrischen Feldes  $E$  transmembran aus.

Geometrisch ist dies sehr intuitiv zu verstehen, da die effektive Vergrößerung der Pore bei Hinzukommen z.B. des vierten oder fünften Alamethicins zu einem Komplex höher ist als beim dritten, siehe Abb. 3.16

Die Alamethicinkomplexe sind nur metastabil und haben eine vergleichsweise schnelle Dynamik. Das Hinzufügen oder Abwandern einzelner Alamethicinmoleküle zu einem Komplex verläuft extrem schnell, sicherlich im sub-Mikrosekundenbereich, da die Leitwertsänderungen bei allen Experimenten bis zu 50 kHz nur durch die Filterfrequenz in der Dynamik begrenzt waren. Die einzelnen Leitwertsstufen sind für wenige Millisekunden stabil, die Dynamik der Konformationszustände verläuft also hier auf einer deutlich schnelleren Zeitskala als beim Gramicidin. In Abb. 3.17 sind Strommessungen durch Alamethicinporen abgebildet.

Alamethicinporen sind nicht selektiv, sämtliche Ionen können die vergleichsweise grossen Poren passieren. Aufgrund ihrer Grösse haben die Poren auch

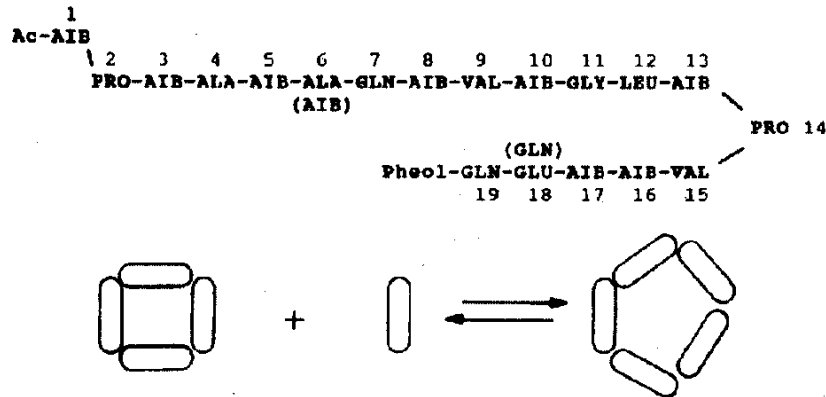


Abbildung 3.16: Molekularstruktur von Alamethicin und vereinfachte Darstellung der porenbildenden Alamethicinkomplexe mit steigender Molekülanzahl und entsprechend höherem Leitwert [Han 97].

sehr hohe Leitwerte von bis zu einigen hundert pS. Die relativ großen Ströme geben ein ausgesprochen gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis, was das Arbeiten mit Alamethicin bei sehr hohen Bandbreiten zulässt. Aufgrund der hohen Leitwerte, vor allem aber auch der geringen Kapazität der Mikromembranen konnten Experimente an Alamethicin mit den Mikrochips bei bis zu 50 kHz durchgeführt werden. Dabei sind die einzelnen Leitwertsstufen der Alamethicinkomplexe noch gut aufgelöst. In Abb. 3.18 ist ein Histogramm der Leitwerte einer Alamethicin enthaltenden Membran gezeigt, worin die verschiedenen Leitwertniveaus deutlich zu erkennen sind.

In weiterführenden Experimenten wird nun das gute Signal-zu-Rausch-Verhältnis der kleinen Membranen in den Mikrochips genutzt, um anhand der Informationsübertragung durch Alamethicin Kanäle [Bez 97, Sob 02] das Phänomen der stochastischen Resonanz [Wie 95, Bez 00] zu untersuchen.

### 3.4 Experimente an Zellen

Der zweite experimentelle Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der elektrophysiologischen Untersuchung von Zellen. Zellen sind durch ihre Membranen nach außen abgegrenzt und halten durch verschiedene Mechanismen wie z.B.

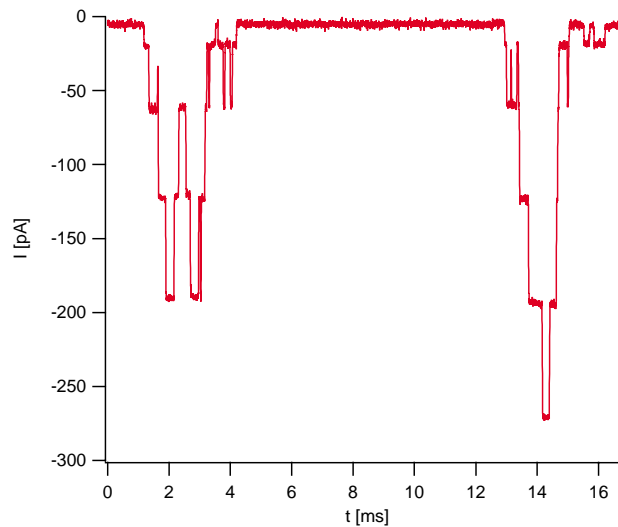


Abbildung 3.17: *Ströme mit den für Alamethicinporen charakteristischen Leitwertsstufen gemessen in 1 M NaCl bei 100 mV.*

Ionenpumpen einen ionischen Konzentrationsgradienten zwischen Zellinnerem und -äußeren aufrecht. In fast allen Zellen ist die Kaliumkonzentration in der Zelle gegenüber außerhalb erhöht und die Calcium- sowie die Natriumkonzentration verringert. Daraus resultiert für verschiedene Zelltypen ein Ruhepotential von -40 bis -110 mV. In den Zellmembranen existieren bis zu mehrere tausend Ionenkanäle, die auch verschiedenen Kanaltypen angehören können. Die verschiedenen Kanaltypen reagieren sehr spezifisch auf äußere Einflüsse wie Membranpotential, Präsenz von Liganden oder auch mechanische Reize. Die für einen Zelltyp charakteristische Ionenkanalkomposition ermöglicht sehr komplexe, äusserst spezifische Reaktionen der Zelle auf ihre Umwelt.

Es ist biophysikalisch sowie pharmakologisch von großem Interesse, die Wechselwirkung von Ionenkanälen mit ihrer Umwelt, sowie das komplexe Zusammenspiel verschiedener Kanaltypen einer Zelle z.B. bei der Erregung eines Aktionspotentials zu untersuchen, verstehen und gegebenenfalls manipulieren zu können. Um kontrollierte Bedingungen für entsprechende Untersuchungen zu etablieren, ist die oben beschriebene Methode der Spannungsklemme, bei der das Membranpotential auf einen Sollwert geklemmt

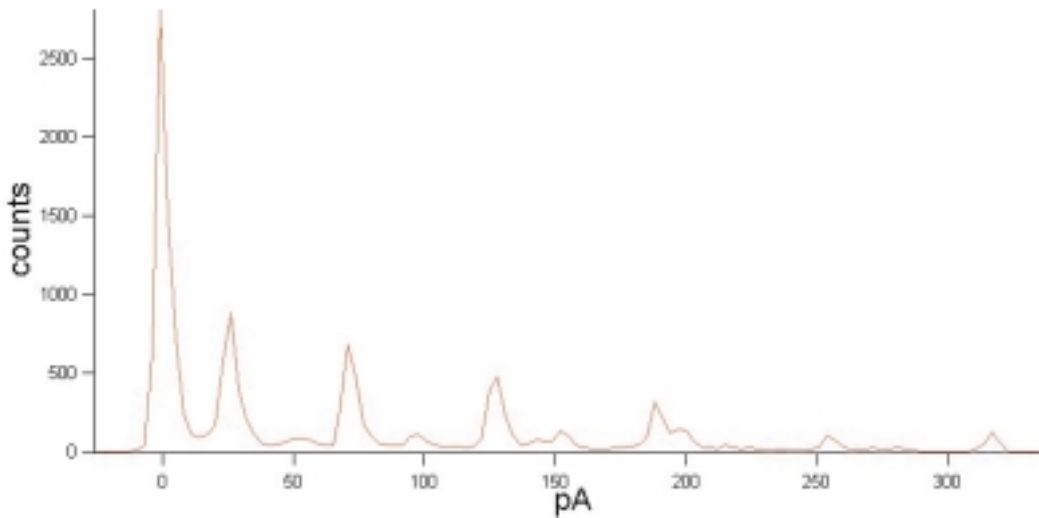


Abbildung 3.18: Leitwertshistogramm von Strömen durch Alamethicinporen gemessen in 1 M NaCl bei 100 mV. Deutlich zu erkennen sind die Peaks der verschiedenen Leitwertsstufen.

wird, und die daraus resultierende Patch Clamp Technik außerordentlich hilfreich. Bei Ganzzelleableitungen, bei denen also die Zellmembran an der Apertur aufgebrochen wird, ist es insbesondere auch möglich, das Intrazellulärmedium zu kontrollieren, da die Lösung in der Pipette, bzw. dem Chip durch Diffusion ins Zellinnere gelangt und umgekehrt [Pus 88].

### Zellpräparation

Um den für die Patch Clamp Methode notwendigen elektrisch dichten Kontakt zwischen Zellmembran und Messelektrode herzustellen, wird üblicherweise eine Glaspipette auf adhärente, d.h. auf einem Substrat aufgewachsene Zellen aufgesetzt. Zu diesem Zweck werden Zellen meist in Petrischälchen oder auf Deckgläsern kultiviert, bis sie mehr oder weniger flächendeckend das Substrat bewachsen haben.

Beim Arbeiten mit mikrostrukturierten Patch Clamp Chips ist die Vorgehensweise anders; hier werden Zellen aus einer Suspension auf den Chip gebracht und daraufhin in die Apertur im Chip eingesaugt. Zur Herstellung

einer Zellsuspension werden Zellen ebenfalls wie oben beschrieben in Zellkulturgefäßen angezüchtet, um dann direkt vor dem Experiment vom Substrat abgelöst und vereinzelt zu werden. Je nach Zelltyp kann das Ablösen der aufgewachsenen Zellen rein mechanisch durch leichtes Abschaben oder Absaugen mit einer Mikropipette stattfinden oder aber durch enzymatische Prozesse induziert werden. Für letzteres wird oft das Verdauungsenzym Trypsin verwendet. Beim Trypsinieren von adhären Zellen werden die Extrazellulär-Matrix und ähnliche, die Zelladhäsion unterstützende Strukturen verdaut, wobei auch zusammengewachsene Zellkomplexe vereinzelt werden. Ein weiteres Isolieren der Zellen kann mechanisch durch kräftiges Einsaugen und Ausblasen der Zelllösung durch eine vergleichsweise enge Pipettenspitze erreicht werden. Für das Arbeiten mit den Patch Clamp Chips ist es wichtig, dass die Zellen in der Suspension gut isoliert sind, da zusammenhängende Zellkomplexe schlecht durch die Apertur angesaugt werden und so die Ausbildung eines Seals sehr schwierig ist.

Desweiteren ist es von außerordentlicher Bedeutung, eine extrem reine Zellsuspension zu verwenden, da sämtliche Verunreinigungen in der Suspension ebenfalls in die Apertur gesaugt werden können und dort einen Seal mit einer Zelle verhindern. Insbesondere Membranreste, die relativ leicht sind und daher schnell angesaugt werden, stellen eine Gefahr dar, denn jede Verunreinigung der Apertur bringt die Sealwahrscheinlichkeit nahe Null. Die Zellsuspension wird daher zur Aufreinigung zentrifugiert, so dass die Zellen von kleineren Partikeln und Verunreinigungen getrennt werden. Die abzentrifugierten Zellen werden in zuvor steril gefilterter Lösung resuspendiert. Dieser Prozess kann mehrfach wiederholt werden, um höchste Reinheit der Zellsuspension zu gewährleisten. Beim finalen Resuspendieren der Zellen muss darauf geachtet werden, eine auf das Experiment angepasste Zellkonzentration in der Suspension zu erreichen. Für ein Experiment mit einem Patch Clamp Chip werden mehrere hundert bis einige tausend Zellen auf den Chip gegeben und die der Apertur am nächsten, bzw. zu ihr am günstigsten gelegene angesaugt. Eine Zelldichte, bei der etwa 10% der Chipoberfläche mit Zellen bedeckt wird, scheint nach bisherigen, allerdings nicht systematischen Versuchen gut geeignet, um schnell und direkt eine Zelle ansaugen zu können. In Tabelle 3.4 sind die Prozessparameter für die Herstellung einer entsprechenden Zellsuspension angegeben.

Zellsuspension	
Zellen vereinzeln	Trypsinieren oder mechanisch lösen
Triturieren	Zelllösung mehrfach durch angeschmolzene Pasteurpipette saugen und ausblasen
Zentrifugieren	Zelllösung bis zu drei mal für etwa 3 Minuten bei 1000 U/min zentrifugieren
Zellkonzentration	abzentrifugiertes Zellpellet in Messlösung resuspendieren, Zellmenge einer konfluenten Petrischälchens auf 500-1000 $\mu$ l Lösung

### 3.4.1 Ganzzelleableitungen

In den hier vorgestellten Experimenten wurden verschiedene Zelltypen verwendet, insbesondere auch, um die Einflüsse verschiedener Zelltypen und deren Eigenschaften auf die Eignung für die Arbeit mit Patch Clamp Chips hin zu untersuchen. Von der Pipetten-basierten Patch Clamp Technik ist bekannt, dass Experimente an manchen Zelltypen besonders gut, an anderen nur mit geringer Erfolgsrate funktionieren. Ähnliches ist auch bei mikrostrukturierten Chips zu erwarten; jedoch sind die relevanten Parameter zum Teil andere als für die Arbeit mit Pipetten.

Um die kollektive Reaktion aller Ionenkanäle einer Zelle auf einen äußeren Einfluss hin zu untersuchen, wird die sogenannte Ganzzelleableitung, bzw. whole cell Ableitung verwendet. Hierzu wird nach dem Erstellen eines Seals der Zellmembran mit der Pipette, bzw. dem Chip die Membran perforiert, um so das gesamte Zellinnere auf ein vorgegebenes Potential zu klemmen. Auf diese Weise kann der gesamte Strom, gleichgültig wo über die Membran er fließt, gemessen werden. Die Perforation der Zellmembran erfolgt durch eine Applikation eines kurzen Unterdruckpulses, dem die Membranstruktur mechanisch nicht standhalten kann. Eine Perforation kann auch durch Elektroperforation erreicht werden, wobei ein Spannungspuls größer als etwa 250 mV die Membran elektroporiert. Maßgeblich ist bei beiden Methoden darauf zu achten, dass der Sealwiderstand durch das Aufbrechen der Membran nicht zu stark verringert wird. Die Erfahrungen mit den Patch Clamp Chips zeigen, dass die Applikation eines Saugpulses den Sealwiderstand weniger stört als ein Spannungspuls, und folglich die schonendere Methode darstellt.

Das Aufbrechen der Membran lässt sich elektrisch sehr einfach verfolgen, da beim Anlegen von Spannungspulsen zum Messen des Sealwiderstands nach der Perforation der Zelle eine deutliche Kapazität im Stromverlauf zu erken-

nen ist. Dies ist die Kapazität der gesamten Zellmembran, die im whole cell Modus die Apertur überspannt und bei jedem Spannungspuls entsprechend aufgeladen wird. Die Kapazität der Zellmembran ist je nach Größe der Zelle zwischen wenigen bis zu einigen zehn pF. Das Abklingen des kapazitiven Stroms verläuft bei einer ideal runden Zelle ohne Fortsätze monoexponentiell.

Ein weiterer Vorteil der Ganzzelleableitung liegt in der Option, die Lösung

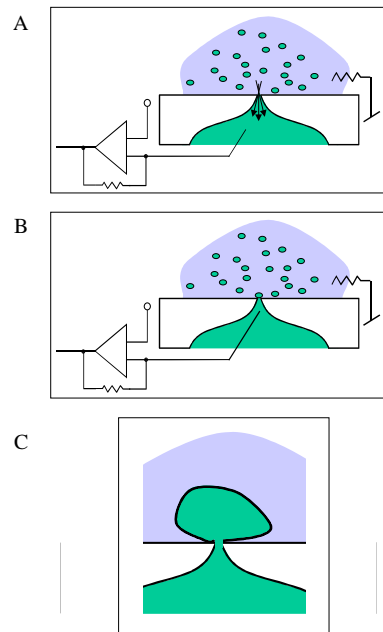


Abbildung 3.19: Seitlicher Schnitt durch die Chipebene. Zellsuspension wird auf der Chipoberseite in die Extrazellulärlösung gegeben (A). Auf der Chipunterseite befindet sich Intrazellulärlösung. Durch das Anlegen von Unterdruck an der Unterseite des Chips wird eine Zelle auf die Apertur gesaugt (B), wo sich ein Seal ausbilden kann. Durch einen weiteren, kurzen Unterdruckpuls kann die Zellmembran aufgebrochen werden, um in den whole cell Modus zu gelangen (C).

im Zellinneren zu kontrollieren. Die intrazelluläre Flüssigkeit wird durch die

Perforation dialysiert, so dass sich nach relativ kurzer Zeit ein Gleichgewicht zwischen der Konzentration diffundierender Substanzen im Inneren der Zelle und in der Pipette, bzw. Chipunterseite einstellt. Je nach verwendeter Intrazellulärlösung können so die Parameter der Ionen- und Substanzkonzentrationen im Zellinneren dem Experiment angepasst werden. Dies ist sehr hilfreich, um z.B. bestimmte Ionenspezies zu depletieren und dadurch Ströme dieser Ionenart zu eliminieren. Auf diese Weise können verschiedene Ionenströme für entsprechende Experimente voneinander isoliert werden. Auch können so bestimmte Liganden in gewünschter Konzentration ins Zellinnere gebracht werden, um ihre pharmakologische Wirkung zu untersuchen.

Da bei der Ganzzelleableitung alle Ionenströme, die die Zellmembran passieren, gemessen werden, kann mit dieser Methode die Reaktion der gesamten Zelle auf z.B. applizierte Substanzen evaluiert werden. Um Ionenkanalaktivität modulierende Substanzen (sogenannte ion channel active drugs, ICADs) zu untersuchen, ist die kollektive Reaktion aller Ionenkanäle der Zelle von hoher Bedeutung. Die Ganzzelleableitung stellt daher also insbesondere bei der Wirkstoffsuche (Drug Screening) hinsichtlich ICADs, also dem Testen von potentiellen Medikamenten, eine außerordentlich wichtige Methode dar.

### 3.4.2 N1E-115 Neuroblastomzellen

N1E-115 ist eine Zelllinie von Neuroblastomklonen, die 1972 etabliert wurde [Ama 72]. Zelllinien sind Tumorzellen, die sich unkontrolliert vermehren, da eine genetische Veränderung bei diesen Zellen den Zellzyklus in der Art stört, dass diese sich beliebig oft teilen können. Die Zellklone sind dabei vollständig identisch, was diese Zelllinien sehr attraktiv für wissenschaftliche Untersuchungen macht, da zu jedem Zeitpunkt und an jedem Ort die gleichen zellbiologischen Bedingungen vorliegen. Die Zelllinien vermehren sich ständig und müssen in regelmässigen Abständen geteilt und neu ausgesät werden. Sie werden, wie alle Säugetierzellen, in Brutschränken, bei 37 Grad Celsius, 5% Kohlendioxidgehalt etc. gezüchtet. Man kann entsprechende Zellen auch bei minus 80 Grad Celsius einfrieren, wo sie sich über Jahre halten und anschliessend wieder verwendet werden können. Das macht das Arbeiten mit Zelllinien sehr angenehm; zudem werden dabei auch keine Versuchstiere benötigt.

N1E-115 Zellen wurden für diese Arbeit ausgesucht, da sie über eine Vielzahl verschiedener Ionenkanaltypen verfügen. Sie exprimieren nativ  $\text{Na}^+$ ,



$K^+$  und  $Ca^{2+}$  Kanäle [Moo 78, Moo 79], so dass eine Vielzahl interessanter Experimente an diesen Zellen durchgeführt werden kann. Die Zellen werden in Petrischälchen gezüchtet und können durch leichtes Absaugen in Zellsuspension gebracht werden. Die Kultivierungsparameter für N1E-115 Zellen sind in Tabelle 3.4.2 dargestellt.

<b>N1E-115 Zellen</b>	
Medium	Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM, Gibco) mit 10% fötalem Kälberserum (Gibco), bei 37 C und 5% $CO_2$ -Gehalt in Luft
Suspendieren	Zellen mechanisch von der Petrischale lösen
Intrazellulärlsg. (mM)	CsCl (110), $CaCl_2$ (1), HEPES (10), BAPTA (3.45), $MgCl$ (5), pH=7.28
Extrazellulärlsg. (mM)	NaCl (125), KCl (1), $MgCl_2$ (1), $CaCl_2$ (12), HEPES 20, glucose (10), pH = 7.35

Die Zellen haben einen Durchmesser von 30-50  $\mu m$ , sind also vergleichsweise groß, was auch ein Gesichtspunkt bei der Auswahl dieses Zelltyps war. Die Zellen zeichnen sich desweiteren durch starke Tendenz zur Adhärenz aus, d.h. die Zelloberfläche ist recht 'klebrig'. Werden N1E-115 Zellen als Suspension auf einen Chip gegeben und sinken auf die Chipoberfläche, so adhären sie dort mehr oder weniger sofort. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass diese Eigenschaft sehr positiv ist, da sie eine sealbildende oder zumindest den Seal unterstützende Funktion hat. Ein damit verbundener Nachteil ist jedoch, dass einmal auf der Oberfläche zum Liegen gekommene Zellen nicht mehr vom Unterdruck an der Apertur angesaugt werden können, da die damit verbundene Kraft nicht ausreicht, um die Zellen von der Oberfläche abzulösen. Bei diesem Zelltyp muss also der Unterdruck bereits angelegt werden, solange die Zellen noch in der Suspension auf dem Chip schweben. Nur so kann eine Zelle angesaugt werden und dann auf der Apertur einen Seal ausbilden. Da die Zellen aufgrund ihrer Größe recht schwer sind, muss zum Ansaugen ein sehr starker Unterdruck, etwa 800 mbar, angelegt werden. Die dadurch über die Apertur erzeugte Anziehungskraft ist nicht so stark, dass weit entfernte Zellen ohne weiteres angezogen werden. Es muss also eine hohe Zelldichte verwendet werden, damit ausreichend viele Zellen in der Nähe der Apertur herunter sinken. Die Erfolgsrate beim Erreichen eines Seals und damit einer whole cell Konfiguration liegt bei diesem Zelltyp etwa bei 30%. In Abb. 3.19 ist die Situation noch einmal

schematisch dargestellt.

Zum Anlegen eines Druckprotokolls wurde eine semiautomatische Einrichtung aufgebaut. Mittels Aquarienpumpen werden zwei Glaskolben auf Über- bzw. Unterdruck gehalten. Die Glaskolben sind über ein Schlauchsystem und zwei 3-Wegeventile mit der Chiphalterung verbunden. Die 3-Wegeventile lassen sich elektrisch ansteuern, so dass durch Umlegen entsprechender Schalter an einer Kontrolleinheit zwischen Überdruck, Unterdruck und atmosphärischem Druck geschaltet werden kann. Ist ein Chip auf der Unterseite mit Intrazellulärlösung befüllt und abgedichtet in der Halterung eingebaut, so wird zunächst ein Überdruck von etwa 250 mbar auf die Apertur gegeben. Dies führt dazu, dass die steril gefilterte und völlig kontaminationsfreie Lösung von unten durch die Apertur gepresst wird. Nun wird Extrazellulärlösung auf den Chip gegeben und mit Zellsuspension angereichert. Während des Sinkprozesses der Zellen, der einige zehn Sekunden dauert, strömt weiterhin Lösung aus der Apertur und verhindert die Kontamination der Öffnung. Sind die Zellen weit genug herabgesunken wird direkt von Überdruck auf Unterdruck (einige hundert mbar) gewechselt und Zellen, die in der Nähe der Apertur sind, werden innerhalb weniger Sekunden auf die Öffnung gesaugt. Bei der Etablierung dieses Protokolls wurde das Geschehen durch ein aufrechtes Mikroskop beobachtet, so dass die Parameter wie Sinkzeit, notwendige Zelldichte, Druckstärke etc. optimiert werden konnten. Es ist nun auch ohne optische Beobachtung sehr gut möglich, auf diese Weise Zellen zu positionieren und zu kontaktieren. Insbesondere da durch das Anlegen von Test-Spannungspulsen die Situation der Apertur und gegebenenfalls der Zelle kontrolliert wird. In Abb. 3.20 ist ein licht-mikroskopisches Bild von einer durch Unterdruckapplikation auf der Apertur eines Patch Clamp Chips positionierten N1E-115 Zelle gezeigt. Nach Ausbildung eines Seals kann die Zellmembran an der Apertur durch einen Unterdruckpuls aufgebrochen werden, so dass ein Zugang zum Zellinneren realisiert wird. Es liegt nun die Ganzzell-, bzw. Whole-Cell-Konfiguration vor und entsprechende Ableitungen öffnen gemacht werden. In Abb. 3.20 sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme gemessen worden [Fer 02].

In Abb. 3.21 sind Strommessungen von  $\text{Na}^+$ -Strömen an N1E-115 Zellen in der whole cell Konfiguration gezeigt.  $\text{Na}^+$ -Kanäle inaktivieren innerhalb weniger Millisekunden und liefern gleichzeitig für eine Ganzzell-Messung einen relativ großen Stromfluss. Daher gelten  $\text{Na}^+$ -Kanäle als Herausforderung beim Patch Clamp. Die mit dem Patch Clamp Chip gemessenen  $\text{Na}^+$ -Ströme zeigen also die gute Qualität der Ableitungen, da in hoher Zeitaufösung (5 kHz) das schnelle Schaltverhalten der Kanäle gemessen wer-

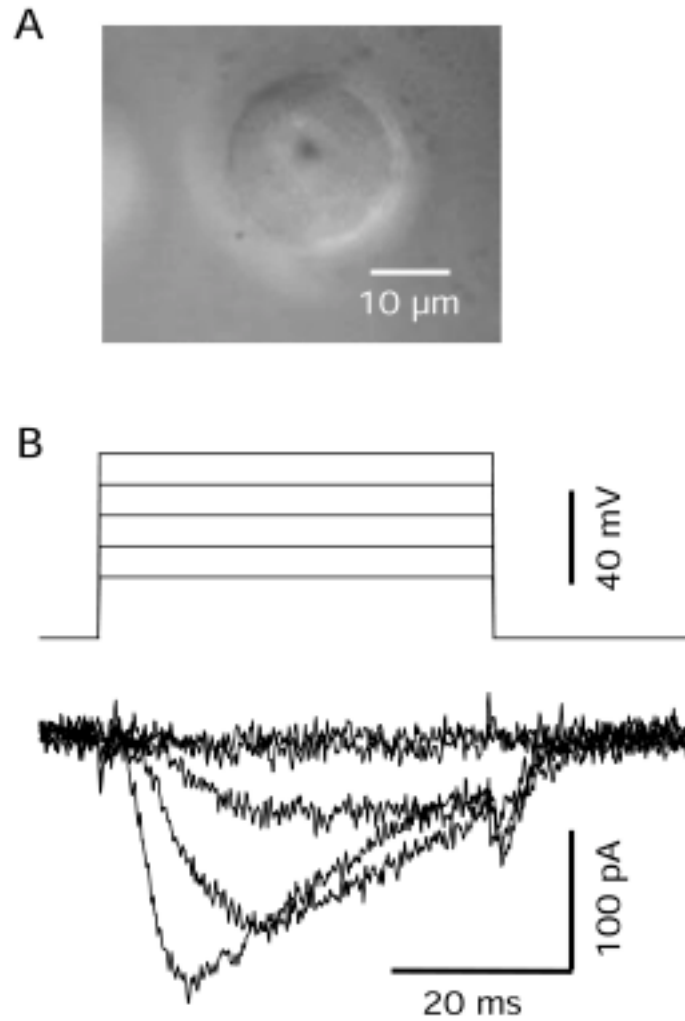


Abbildung 3.20: Ganzzelleableitung einer Neuroblastomzelle aufgenommen mit einem Patch Clamp Chip. A: Lichtmikroskopische Aufnahme einer N1E-115 Zelle, die durch Ansaugen auf der Apertur in der Glaschipoberfläche positioniert wurde. Die Apertur ist unterhalb der Zelle zu Erkennen. B:  $Ca^{2+}$ -Ströme wurden durch die Applikation von depolarisierenden Spannungspulsen angeregt, ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV.

den kann Abb. 3.21.

Die Datenaufnahme bei den vorgestellten Ganzzellaufnahmen erfolgt unter Kapazitäts- und Leckstromkorrektur. Dafür wird ein sogenanntes P/n Protokoll verwendet, bei dem vor der Applikation eines Spannungspulses eine Anzahl  $n$  kleiner Vorpulse appliziert wird, um die Kapazität und den Leckstrom der Messanordnung zu bestimmen. Die Vorpulse sind sehr klein (einige mV) und werden ausgehend vom Haltepotential (meist -70 mV) angelegt. Es werden dabei keine spannungsabhängigen Ionenkanäle aktiviert, so dass tatsächlich nur die passiven elektrischen Eigenschaften des Systems bestimmt werden. Ausgehend von den mit Vorpulsen gemessenen Werten der Kapazität und des Leckstroms wird auf den im folgenden angelegten Spannungspuls extrapoliert und eine entsprechende Korrektur bei der Strommessung vorgenommen. Auf diese Weise entfällt eine aufwendige Aufbereitung der gemessenen Daten nach dem Experiment. Bei den vorgestellten Ganzzellaufnahmen wurde ein Spannungsprotokoll verwendet, welches durch 8 kleine Vor-Pulse die elektrischen Parameter, d.h. Sealwiderstand und Kapazität der Anordnung, bestimmt. Die auf diese Weise aufbereiteten Daten sind übersichtlicher als reine Rohdaten und lassen sich leichter interpretieren. Um jedoch die elektrischen Parameter direkt zu bestimmen, muss auf eine solche Pre-Konditionierung verzichtet werden und ein einfaches Messpulsprotokoll verwendet werden. Die Ströme ohne Pre-Konditionierung sind in Abb. 3.22 dargestellt.

Um die volle Funktionstüchtigkeit der Patch Clamp Chips weiter zu verifizieren, wurden auch pharmakologische Untersuchungen durchgeführt. In Abb. 3.23 sind die Ergebnisse von Experimenten mit dem Natriumkanalblocker Tetratodoxin (TTX) gezeigt, der auf  $\text{Na}^+$ -Kanäle in N1E-115 Zellen angewendet wurde. Nach der Applikation von  $1 \mu\text{M}$  TTX sind die  $\text{Na}^+$ -Kanäle blockiert, die entsprechenden Ströme bleiben aus. Die Experimente zeigen die volle Tauglichkeit der Patch Clamp Chips und demonstrieren die Qualität der Ableitungen von ganzen Zellen.

### 3.4.3 CHO Zellen

Um die Eignung der Patch Clamp Chips weiter zu testen, wurden Experimenten an verschiedenen Zelltypen durchgeführt. Es ist unter anderem von Interesse, die Sealeigenschaften unterschiedlicher Zelltypen zu vergleichen. Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen stellen ein ausgezeichnetes Expressionssystem dar, d.h. man kann diese Zellen gut mit DNA bestimmter Proteine transfizieren, so dass diese Proteine von der Zelle hergestellt werden.

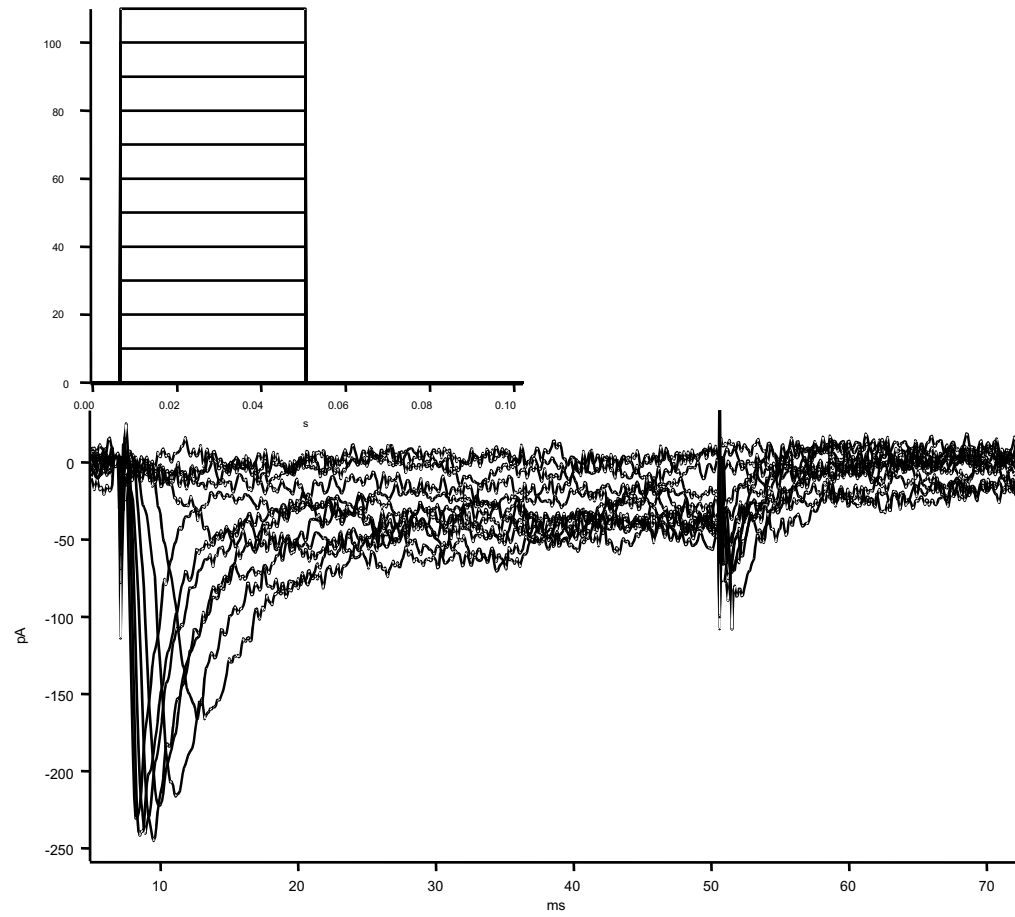


Abbildung 3.21:  $\text{Na}^+$ -Ströme einer N1E-115 Zelle mit dem Patch Clamp Chip gemessen. Nach dem schnellen Inaktivieren der  $\text{Na}^+$ -Ströme sind noch deutlich kleinere  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme zu sehen.

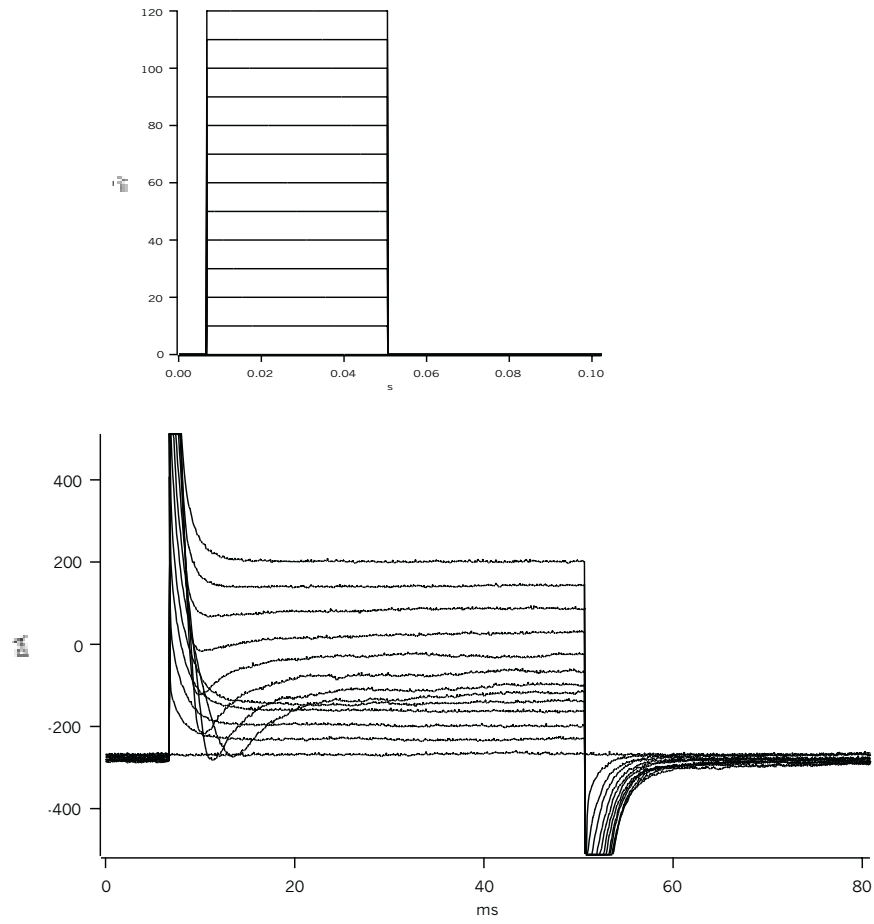


Abbildung 3.22: Rohdaten der identischen Ganzzelleleitung wie in Abb. 3.21, es fehlen die Korrektur für Leckstrom und kapazitive Ströme.

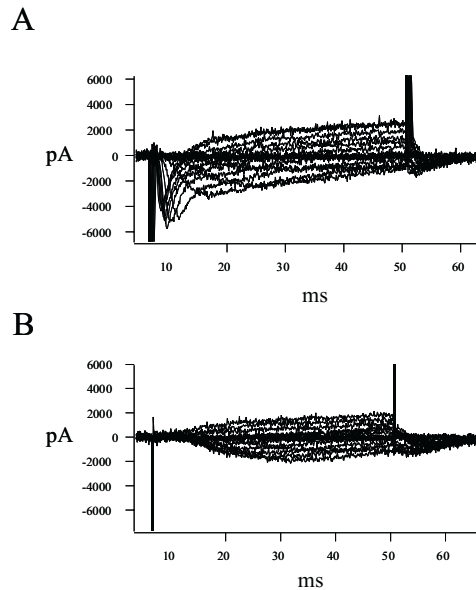


Abbildung 3.23: Ganzzellableitungen einer N1E-115 Zelle mit dem Patch Clamp Chip. A: Die Einwärtsströme der  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und der Auswärtsstrom der  $\text{K}^+$ -Kanäle in der whole cell Konfiguration. B: Die gleiche Zelle mit dem gleichen Pulsprotokoll nach der Applikation von  $1 \mu\text{M}$  TTX gemessen. Die  $\text{Na}^+$ -Ströme sind durch das TTX blockiert, sonst bleibt das Messergebnis gleich.

Da die CHO-Zellen intrinsisch nur wenige Ionenkanäle besitzen, sind sie hervorragend geeignet, um einen bestimmten Kanaltyp zu exprimieren, so dass dieser isoliert untersucht werden kann. Bei vielen anderen Säugetierzell-Expressionssystemen stören die intrinsischen Ionenkanäle, da diese bei Patch Clamp Messungen an den exprimierten Ionenkanälen ungewollte Ströme liefern können. Die CHO-Zellen werden daher oft in der Pharmakaentwicklung eingesetzt, wo die Wechselwirkung verschiedener Substanzen mit einem bestimmten Ionenkanal untersucht werden soll (Drug Screening). Ähnliche Expressionssysteme stellen Human Embryonic Kidney (HEK)-Zellen dar. Aus den dargelegten Gründen sind CHO-Zellen ein sehr wichtiger Zelltyp und wurden daher ebenfalls mit den Patch Clamp Chips untersucht. CHO-Zellen haben einen Durchmesser von etwa 7-10 Mikrometer und sind

damit deutlich kleiner als die N1E-115 Zellen. Die Zellkulturparameter sind in Tabelle 3.4.3 zusammengefasst. Die Zellen wachsen recht fest an den entsprechenden Kulturschälchen an, ein einfaches Absaugen reicht nicht, um sie abzulösen. Um eine Zellsuspension herzustellen, wird daher das Verdauungsenzym Trypsin verwendet.

<b>CHO Zellen</b>	
Medium	Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM, Gibco) mit 10% fötalem Kälberserum (Gibco), bei 37 C und 5% CO <sub>2</sub> -Gehalt in Luft
Suspendieren	Zellen durch Trypsinieren von der Petrischale lösen
Intrazellulärlsg. (mM)	K-Aspartate (135), EGTA (10), HEPES (10), CaCl <sub>2</sub> (8.5), MgCl <sub>2</sub> (2.1), pH=7.2, freie Ca <sup>2+</sup> -Konzentration ist 1 μM
Extrazellulärlsg. (mM)	Na-Aspartate (160), KAsp (4.5), HEPES (5), CaCl <sub>2</sub> (1), MgCl <sub>2</sub> (1), pH=7.4

Die in dieser Arbeit verwendeten CHO-Zellen sind stabil mit BK-Kanälen transfiziert [Zho 98], also mit spannungsabhängigen Kalium-Kanälen mit recht hohem Leitwert. Die Zellen wurden wie bereits beschrieben in Suspension auf die Patch Clamp Chips pipettiert und durch Anlegen eines Unterdruckes an der Apertur im Chip auf diese positioniert. Im Gegensatz zu den N1E-115 Zellen neigen die CHO-Zellen weniger stark zur instantanen Adhäsion auf der Substratoberfläche. Daher lassen sich auch bereits aus der Suspension abgesunkene, auf der Chipoberfläche liegende Zellen in die Apertur saugen. Die Sealeigenschaften der CHO-Zellen sind etwas besser als die der N1E-115 Zellen, die Sealwahrscheinlichkeit liegt bei etwa 50 Prozent. In Abb. 3.24 sind Messungen an CHO-Zellen dargestellt. Hier wurde ein Spannungspulsprotokoll appliziert, welches die spannungsabhängigen Kalium-Kanäle aktiviert. Diese inaktivieren nicht, so dass sich bei längerer Dauer eines Spannungspulses ein entsprechender Maximalstrom einstellt.

In der folgenden Abb. 3.25 sind länger anhaltende Spannungspulse appliziert worden, um das Einstellen des Maximalstroms bei gegebener Spannung zu messen.

Auch mit den CHO Zellen wurden pharmakologische Versuche durchgeführt. Es wurden Experimente mit dem Kaliumkanalblocker Charybdotoxin (ChTX) gemacht [Han 97], welcher der extrazellulären Lösung zugegeben wurde, um die Wechselwirkung der Substanz mit den BK-Kanälen zu



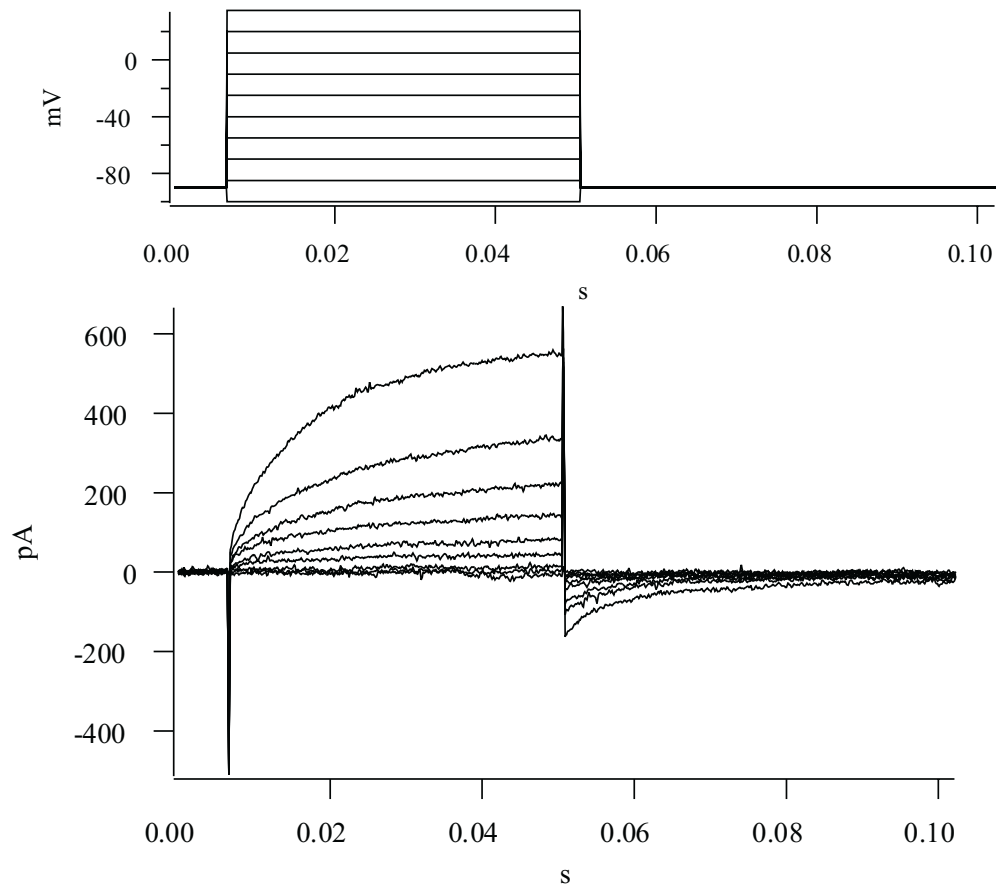


Abbildung 3.24: Spannungsabhängige Kalium-Kanäle in CHO-Zellen in der Ganzzellkonfiguration mit Patch Clamp Chip abgeleitet. Das Membranpotential wird sukzessive stärker depolarisiert, um die Kanäle zu aktivieren. Am Ende des Pulses ist ein sogenannter tail-current zu sehen, der aufgrund des Potentialsprunges unter das Umkehrpotential des Kaliums bei Pulsende entsteht.

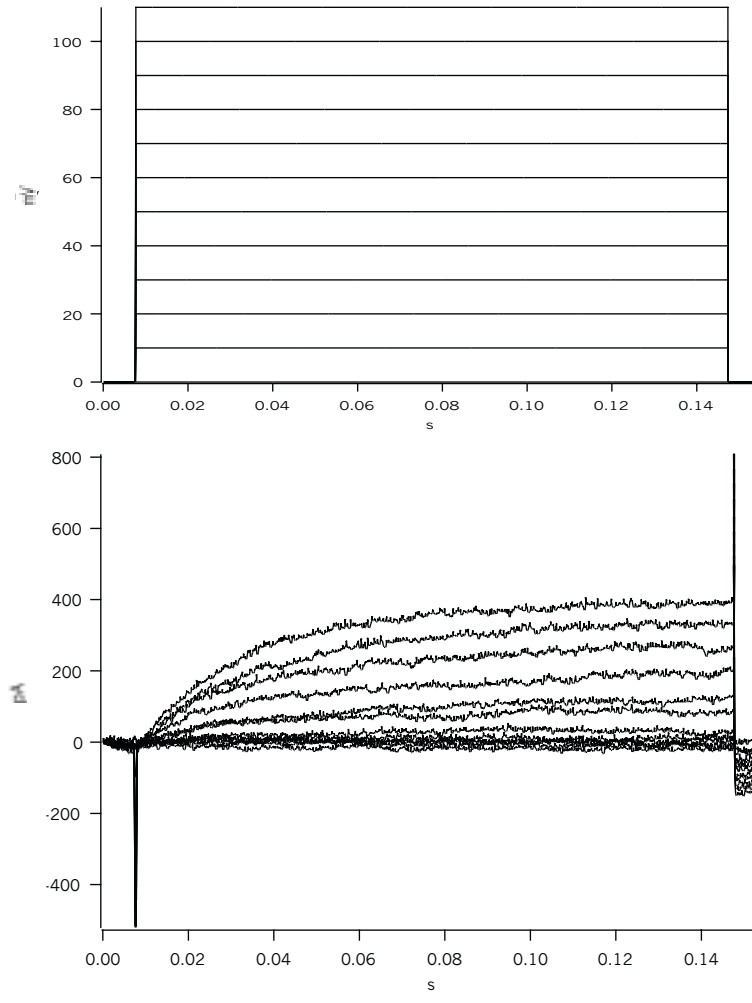


Abbildung 3.25: Ganzzelleableitungen an CHO-Zellen mit relativ langen Pulsen (140 ms) zur Stromäquibrierung.

testen. In Abb. 3.26 sind Ganzzelleableitungen vor und nach der Applikation von 100 nM ChTX an derselben Zelle, mit dem gleichen Pulsprotokoll und einem zeitlichen Abstand von wenigen Sekunden dargestellt. Erwartungsgemäß werden die Kanäle durch das Pharmakon blockiert und die entsprechenden Ionenströme bleiben aus [Fer 02].

Um einen Vergleich der Messungen mit den Patch Clamp Chips und Messungen mit der konventionellen Pipette zu ermöglichen, wurden Experimente an CHO Zellen der gleichen Generation (aus der gleichen Petrischale identisch präpariert) sowohl mit Pipette als auch mit Chip durchgeführt. In Abb. 3.27 sind Messungen in der whole cell Konfiguration gezeigt, die mit klassisch und chip-basierter Patch Clamp Technik gemacht wurden.

### 3.5 Kombinierte elektrische und optische Experimente an Einzelkanälen

Ultrasensitive optische Mikroskopie und Spektroskopie ermöglichen die Detektion und Charakterisierung von einzelnen fluoreszenzmarkierten Molekülen in biologischen Systemen mit einer Auflösung in x-y-Richtung von unter 50 nm [Bet 93, Dun 94, Fun 95, Sas 95, Sch 96, Ha 96, Van 97, Jia 99, Wei 99, Sch 00a]. Entwicklungen insbesondere bei der Untersuchung von fluoreszenzmarkierten Lipidmolekülen führen zu Zeitaufösungen bei der Einzelmoleküldetektion im Bereich von Millisekunden [Sch 96, Sch 97, Son 99].

Bei der Untersuchung von Ionenkanälen sind die molekularen Mechanismen, die für das sogenannte Gating, also das Öffnen und Schließen des Kanals, verantwortlich sind, von besonderem Interesse [San 00, Beza 00]. Die Herstellung größerer Mengen eines Kanalproteins ist aufwendig, und da Untersuchungen in natürlicher Zellmembranumgebung vorgenommen werden müssen, sind kernspinresonanz- und röntgenstrahlbasierte Strukturanalysen schwer durchführbar [Kab 97, Wat 95, Tsu 00]. Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie kombiniert mit site-spezifischer Fluoreszenzmarkierung und simultaner, elektrischer Detektion von Ionenströmen bietet die Möglichkeit, Struktur-Funktionsanalysen in nativer Proteinumgebung durchzuführen [Sch 00b, Ish 00]. Die Möglichkeit, durch kombinierte elektrische und fluoreszenz-optische Detektion Informationen über die strukturelle Dynamik während der Schaltvorgänge in Ionenkanälen zu erhalten, wurde bereits an Ensembles von Ionenkanälen demonstriert [Cha 99, Man 96, Gla 99, Hor 00]. Optische Messungen an Einzelmolekülen

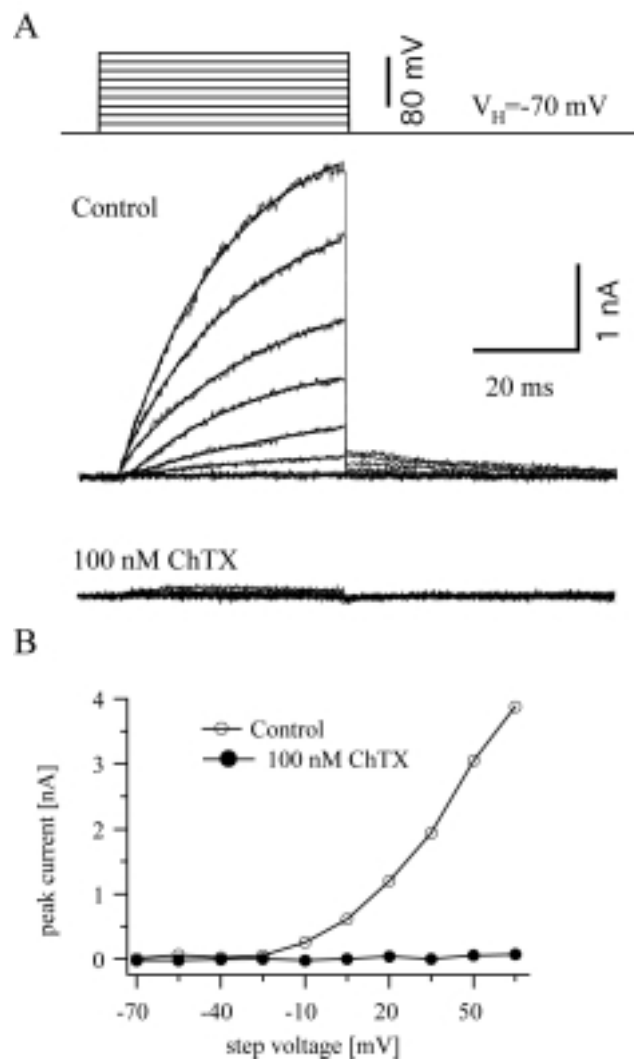


Abbildung 3.26: *Pharmakologische Charakterisierung von Kalium-Kanälen mittels Patch Clamp Chips. A: Ganzzellableitungen an CHO-Zelle mit über-exprimierten BK-Kanälen vor und nach der Applikation von 100 nM ChTX. B: Strom-Spannungsbeziehung aus dem Experiment in A.*

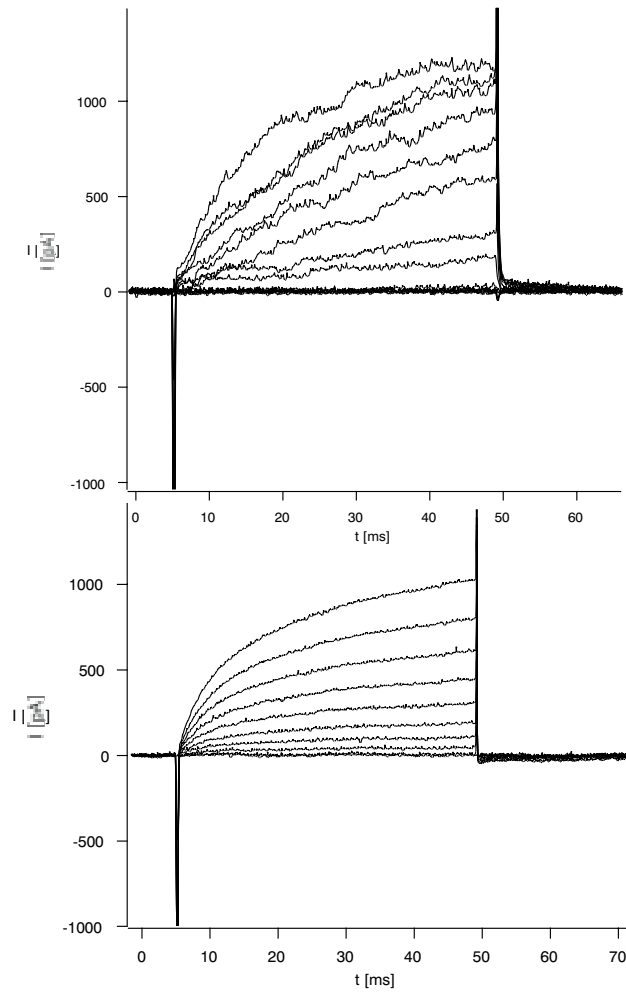


Abbildung 3.27: *Elektrophysiologische Charakterisierung von Kalium-Kanälen in CHO Zellen mittels pipetten- und chip-basierter Patch Clamp Technik. Oben: Ganzzelleableitung mit konventioneller Patch Clamp Pipette. Unten: Das gleiche Experiment mit dem Patch Clamp Chip durchgeführt. Die Messungen sind qualitativ identisch.*

bieten das Potential einer detaillierteren Strukturanalyse. Zum Beispiel können Subzustände beim Gating oder im Leitwert eines Ionenkanals, die bei Ensemble-Experimenten untergehen, aufgelöst werden [Man 00]. Das Potential der Kombination von optischen und elektrischen Experimenten für die Gewinnung von Information über Struktur und Dynamik von Ionenkanälen ist seit einiger Zeit wahrgenommen [Mac 95], und verschiedene Untersuchungen, welche die Machbarkeit solcher Experimente zeigen, sind bereits durchgeführt worden [Ide 99, Sch 00a, Son 00]. Insbesondere Einzel-Molekül Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) ist eine geeignete Methode, um direkte Strukturuntersuchungen beim Gating durchzuführen. Ähnliche Experimente zur Untersuchung von Konformationsänderungen im Nanometerbereich sind bereits mithilfe des Einzel-Molekül Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers durchgeführt worden [Ha 96, Ish 99, Yin 00, Jia 99, Den 99].

### 3.5.1 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer

Fortentwicklungen in der Einzelmoleküldetektion und Einzelmolekülspektroskopie bei Raumtemperatur durch Laser-induzierte Fluoreszenz eröffnen einen experimentellen Zugang zur Untersuchung einzelner Moleküle unter physiologischen Bedingungen. Eine besondere Bedeutung hat in diesem Zusammenhang der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) [För 48]. Dieses Phänomen ermöglicht äußerst präzise Abstandmessungen im Bereich von 2 bis 8 nm, basierend auf dem abstands-abhängigen Energieübertrag zwischen einem Donorfluorophor und einem Acceptorfluorophor. Diese Technik kann sogar dynamische Strukturänderungen und Orientierungen zwischen den beiden Fluorophoren bei intra- und intermolekularen Systemen messen (Abb. 3.28). Die Quanteneffizienz (Q) des Donors ist definiert als das Verhältnis von der Anzahl emittierter Photonen zur Anzahl absorbierter Photonen, ein Parameter, der sehr stark von der unmittelbaren Umgebung des Fluorophors abhängt. Die FRET-Effizienz (E) kann aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten des Donors in Gegenwart des Acceptors ( $Q_{da}$ ) und ohne diesen ( $Q_d$ ) erhalten werden [Van 94]:

$$E = 1 - Q_{da}/Q_d, \quad (3.11)$$

Der Zusammenhang zwischen der Transfereffizienz und dem Abstand zwischen den beiden Fluorophoren (R) wird durch folgende Gleichung beschrieben

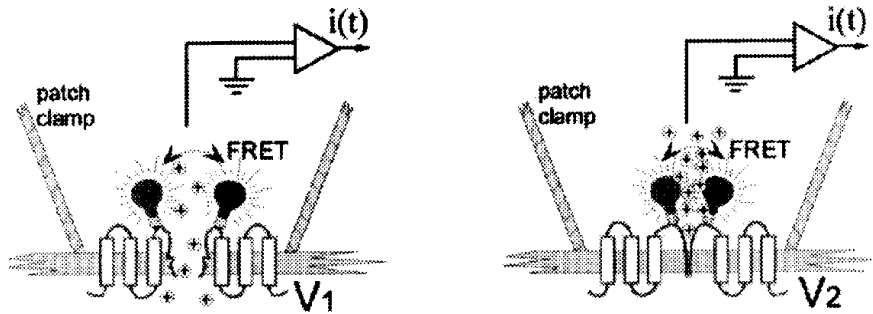


Abbildung 3.28: Mögliche Konfiguration für simultane Patch Clamp und Einzelmolekül-FRET Messung an einem Ionenkanal. Ein fluoreszenzmarkiertes Ionenkanalprotein im Membranfleck (Patch) einer Patch Pipette.

ben:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6), \quad (3.12)$$

wobei  $R_0$  die sogenannte Försterdistanz ist, d.h. die Distanz zwischen Donor und Acceptor bei der der Energietransfer im Mittel 50% beträgt. Aus der Abhängigkeit der Transfereffizienz von der 6. Potenz des Abstandes der Fluorophore ergibt sich die hohe Empfindlichkeit von FRET-Abstandsmessungen.  $R_0$  kann wie folgt berechnet werden:

$$R_0 = (9000(\ln 10)K^2Q_dJ/128\pi^5n^4N_{av})^{1/6} = 9.7810^3(Q_dK^2n^{-4}J)^{1/6} \text{ Angström}, \quad (3.13)$$

mit  $Q_d$  = Quanteneffizienz des Donors,  $n$  = Brechungsindex des Mediums (etwa 1.33-1.6 für Proteine),  $N_{av}$  = Avogadrozahl,  $K^2$  = Orientierungsfaktor und  $J$  = Überlappungsintegral. Das Überlappungsintegral  $J$  repräsentiert den Überlapp zwischen dem Fluoreszenzemissionsspektrum des Donors und

des Absorptionsspektrum des Acceptors und wird beschrieben durch:

$$J = \int f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \quad (3.14)$$

mit  $\lambda$  = Wellenlänge des Lichts,  $\epsilon_A(\lambda)$  = der molare Auslöschungskoeffizient des Acceptors bei der entsprechenden Wellenlänge und  $f_D(\lambda)$  = das Fluoreszenzspektrum des Donors normalisiert auf die Wellenlängenskala.

Der Orientierungsfaktor ist definiert als:

$$K^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D \cos\theta_A)^2, \quad (3.15)$$

mit  $\theta_T$  = Winkel zwischen Donor Emissionsübergangsmoment und Acceptor Absorptionsübergangsmoment, und  $\theta_D$  und  $\theta_A$  = die Winkel zwischen Donor-Acceptor Verbindungslinie und Donor-Emissions- und Acceptor-Absorptionsmomenten.

FRET kann an Ensembles von Fluorophoren untersucht werden, jedoch ist seit kurzem auch möglich, FRET an einzelnen Molekülen zu messen [Ha 96]. Das sogenannte single-pair FRET (spFRET) wurde eingesetzt, um Liganden-Rezeptor Kollokalisierungen zu untersuchen [Sch 98], Enzym-Substrat Wechselwirkungen während der Katalyse zu studieren [Ha 96] und um Konformationszustände einzelner, in Lösung diffundierender Moleküle zu messen [Den 99].

spFRET ist eine ausgesprochen attraktive Methode, um Konformationsdynamiken in Molekülen zu untersuchen. Wie oben bereits erwähnt, wäre es sehr reizvoll, einen Ionenkanal mit einem FRET-Paar zu markieren und so seine Konformationsänderungen beim Öffnen und Schließen zu überwachen. Die Herausforderungen für entsprechende Konstrukte liegen in der Konjugationschemie und der Wahl spektral geeigneter FRET-Paare.

### 3.5.2 Fluoreszenzmarkierte Gramacidine

Um das Potential von optischen Einzel-Molekülexperimenten zur Struktur-Funktionsanalyse von komplexen Membranproteinen voll ausschöpfen zu können, ist es hilfreich, ein ausreichend charakterisiertes Modellsystem



zur Kalibrierung des Experimentes zu haben. Schwankungen der FRET-Effizienz kann aus verschiedenen Gründen auftreten, z.B. Übergänge in nicht-emittierende Zustände (blinking) [Ha 99] oder Fluorophordynamik (cis-trans Isomerisierung) [Wid 00]. Schwierigkeiten bei der Zuordnung verschiedener Photozustände kann zu Fehlern bei der Interpretation von FRET-Experimenten führen [Cre 00].

Der bereits eingehend beschriebene Ionenkanal, der durch Gramicidin geformt wird, erfüllt in hervorragender Weise die Voraussetzungen für ein einfaches Modellsystem. Tatsächlich wurden bereits vor 25 Jahren simultane Fluoreszenz- und Leitwertmessungen an Gramicidin (Ensembles) von Veatch und Stryer durchgeführt [Vea 75]. Diese klassischen Arbeiten haben maßgeblich zum Verständnis des Dimerisierungsprozesses von Gramicidin beigetragen.

Wenn die Dimerisierung von Gramicidin optisch auf Einzel-Molekül Niveau detektiert werden könnte, so würde man erwarten, dass das optische Signal mit einem erhöhten Leitwert der das Gramicidin enthaltene Membran ko-inzidiert. Mit fluoreszenzmarkierten Gramicidinderivaten sollte es möglich sein, die Dimerisierung optisch durch einen FRET-Prozess zu detektieren. Dazu müssten zwei verschiedene Gramicidinderivate mit zwei entsprechenden Fluorophoren markiert werden, die ein FRET-Paar bilden. Das mit dem Donor markierte Gramicidin wird auf die eine Seite der Membran zugegeben, das mit dem Acceptor markierte auf die andere. Nachdem sich das Gramicidin in die Membran inkorporiert hat, diffundiert es in den jeweiligen Lipidmonoschichten, und der Abstand von Acceptor-Donor-Paaren ist deutlich grösser als 10 nm, d.h. die FRET-Effizienz verschwindend gering. Bildet sich nun ein leitfähiges Dimer, gibt es zum einen den charakteristischen Ionenstrom, der elektrisch gemessen werden kann. Gleichzeitig sinkt bei der Dimerisierung der Abstand von Acceptor und Donor auf unter 5 nm, so dass ein sehr effektiver FRET stattfinden kann. In Abb. 3.29 ist der Prozess schematisch dargestellt. Dissoziiert das Dimer, verschwindet der Leitwert, und da der Abstand des FRET-Paares wieder ansteigt, sinkt die FRET-Effizienz drastisch. Kombinierte Patch Clamp und FRET-Messungen sollten also eine Korrelation von ionischem Leitwert und FRET-Signal zeigen. Fluoreszenzmarkierte Gramicidine stellen daher ein ausgezeichnetes Modellsystem für simultane optische und elektrische Einzelmoleküldetektion dar.

Eine Schwierigkeit bei der Korrelation der optischen und elektrischen Signale ergibt sich aus der Verteilung von Donor- bzw. Acceptor-markierten Gramicidinen in der Membran. Es ist wünschenswert zu verhindern, dass sich Di-

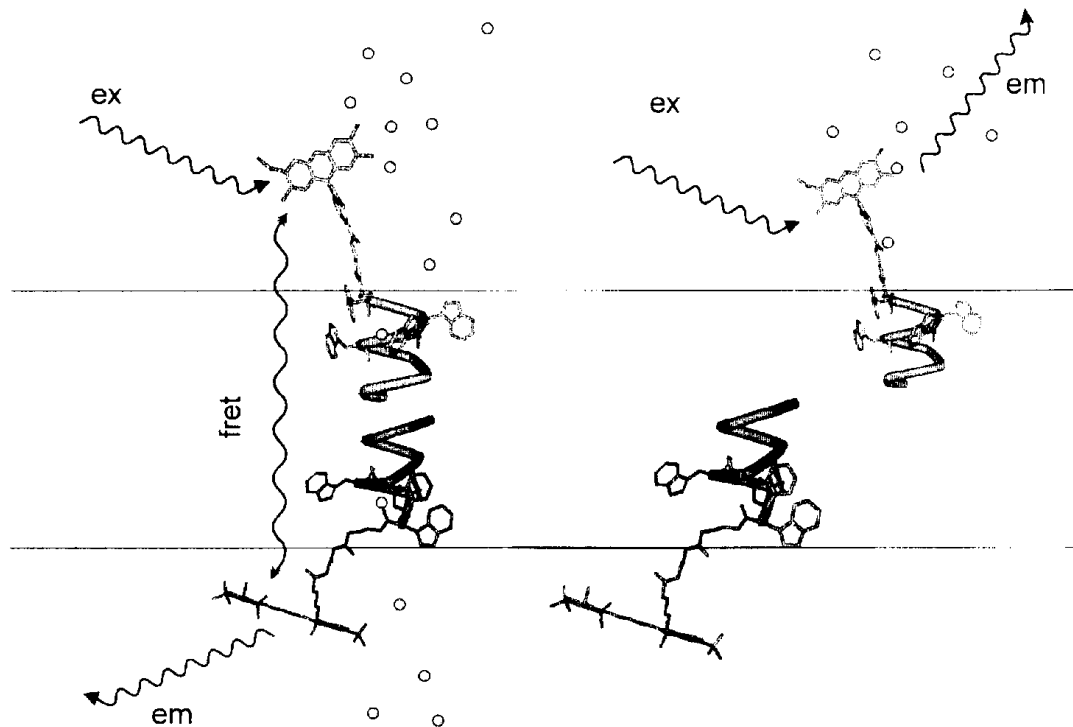


Abbildung 3.29: Das Diagramm [Lou 01] zeigt die Dimerisierung von fluoreszenzmarkierten Gramicidinderivaten in einer Lipidmembran. Das Dimer bildet eine wässrige Pore, die Ionenfluss (kleine Kreise) ermöglicht. Der Abstand des FRET-Paares eines Dimers beträgt etwa 5 nm, so dass eine recht hohe FRET-Effizienz zu erwarten ist.

mere aus Gramicidinen mit gleichem Fluorophor (also z.B. ein Donor-Donor-Dimer) bilden, die dann zwar einen Leitwert haben, aber kein FRET-Signal zeigen, da dies die Interpretation der Daten hinsichtlich der Korrelation deutlich erschwert. Es ist experimentell aufwendig, die verschiedenen markierten Gramicidine exklusiv auf jeweils einer Membranseite zu konzentrieren. Die Übergangsrate der Gramicidine von einer Membranseite auf die andere (flip-flop) ist zwar sehr gering [O'Co 90], jedoch reißt die Membran häufiger, so dass Gramicidine frei diffundieren können. Um dieses Problem zu lösen, wurden verschiedene Gramicidinderivate mit unterschiedlichen Leitwerten verwendet, derart, dass das Gramicidin kleineren Leitwerts mit dem Acceptor und das andere mit dem Donor markiert wurde. Es gibt entsprechend Dimere mit drei unterschiedlichen Leitwerten: ein Homo-Dimer mit niedrigem, ein Homo-Dimer mit hohem und ein Hetero-Dimer mit mittlerem Leitwert. Auf diese Weise lässt sich aus dem elektrischen Leitwert eines Dimers seine Zusammensetzung ablesen, und man weiß, ob ein FRET-Signal zu erwarten ist (Hetero-Dimer) oder nicht (Homo-Dimer). In Abb. 3.30 sind die verschiedenen Leitwerte der unterschiedlichen Gramicidin-Dimere analysiert. Als FRET-Paar wurden die Fluorophore Cy5 und Cy3 verwendet, welche jeweils an das C-Terminal der Gramicidinderivate angebracht wurden. Diese Markierungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Woolley an der Universität in Toronto durchgeführt [Lou 01].

Um die Fluoreszenzeigenschaften der markierten Gramicidine zu untersuchen wurden zunächst Experimente an kleinen Lipidvesikeln durchgeführt. Lipidvesikel mit etwa 100 nm Durchmesser wurden hergestellt und mit Gramicidin dotiert. Im Fall A wurde eine Vesikellösung die ausschliesslich mit Donor-Gramicidin dotiert war mit einer zweiten Vesikellösung die nur mit Acceptor-Gramicidin dotiert war im Verhältnis 1:1 gemischt. Im Fall B wurden Donor- und Acceptor-Gramicidin in gleicher Konzentration direkt im Verhältnis 1:1 in eine Vesikellösung gemischt. Das Resultat sind zwei Vesikellösungen mit gleicher Lipid-, Donor- und Acceptor-Konzentration, aber unterschiedlicher Verteilung der Donoren und Acceptoren. In Fall A sind in den Vesikelmembranen dementsprechend Donor-Monomere, Donor-Dimere, Acceptor-Monomere und Acceptor-Dimere vorhanden. In der vorgemischten Lösung (Fall B) sind weiterhin noch Donor-Acceptor-Dimere, also FRET-Paare, anwesend. Aufgrund der geringgehaltenen Konzentration der Vesikel in der Lösung war der durchschnittliche Abstand zwischen Vesikeln etwa 300 nm. Das ist deutlich über dem Försterabstand von etwa 5 nm, so dass FRET nur im Fall B möglich sein sollte, wo sich Donor- und Acceptor-Gramicidin im gleichen Vesikel befinden.

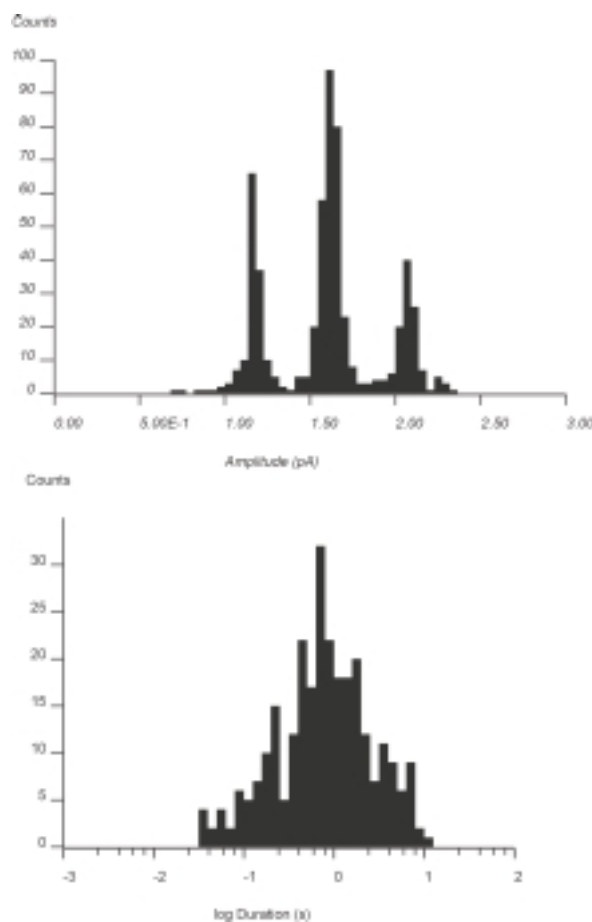


Abbildung 3.30: Oben: Histogramm der bei 100 mV gemessenen Leitwerte der fluoreszenzmarkierten Gramicidine. In der Lipidmembran sind Donor- und Acceptor-markierte Gramicidinderivate im Verhältnis 1:1 gemischt. Der mittlere Leitwertspike entsteht durch Hetero-(Cy3Cy5)-Dimere, der linke durch (Cy5Cy5)-Homo-Dimere und der rechte durch (Cy3Cy3)-Homo-Dimere. Die Wahrscheinlichkeit der Bildung eines Hetero-Dimers ist gegenüber den Homo-Dimeren um den Faktor 2 erhöht, was mit der Höhe des Leitwertpeaks korrespondiert. Die Leitwertniveaus der verschiedenen Dimere sind deutlich zu unterscheiden. Unten: Histogramm der Lebensdauern der Gramicidinkanäle. Die Daten wurden im Labor von Prof. Woolley an der Universität Toronto aufgenommen und ausgewertet.

In Abb. 3.31 sind Fluoreszenzspektren von Cy3/Cy5-markierten Gramicidinen in Lipidvesikeln gezeigt. Die gestrichelte Linie repräsentiert die gemessene Fluoreszenzintensität für den Fall A, bei dem nur Homo-Dimere, also kein FRET, möglich sind. Die durchgezogene Linie entspricht der gemessenen Fluoreszenzintensität im Fall B, wo ebenfalls Hetero-Dimere gebildet werden und FRET stattfinden kann. Ein signifikantes Quenching der Donorfluoreszenz ist für den Fall B im Vergleich zu Fall A zu sehen, was auf den nur im Fall B möglichen FRET zurück zu führen ist.

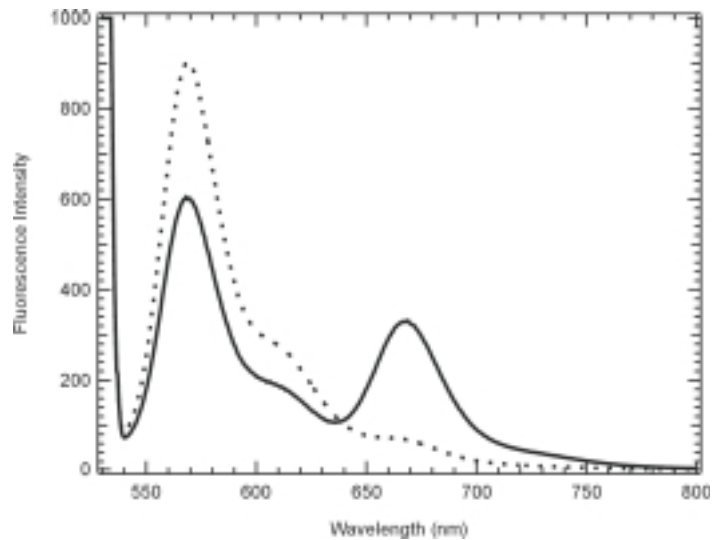


Abbildung 3.31: *Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer zwischen Cy3-Gramicidin und Cy5-Gramicidin. Die gestrichelte Linie entspricht der Fluoreszenz Intensität von Cy3-gA und Cy5-gA in seperaten Lipidvesikeln, die durchgezogene Linie dem Fall von Cy3-gA und Cy5-gA in denselben Vesikeln. Nur im letzteren Fall ist FRET möglich, was im deutlichen Quenching der Donorfluoreszenz gegenüber dem ersten Fall resultiert. Die Fluoreszenz wurde bei 520 nm angeregt, die Scangeschwindigkeit betrug 100nm/min. Die Daten wurden im Labor von Prof. Woolley an der Universität Toronto aufgenommen und ausgewertet.*

### 3.5.3 Optischer Aufbau

Die optischen Untersuchungen an Einzelmolekülen wurden in Kooperation mit G. Schütz am Lehrstuhl für Biophysik der Kepler Universität in Linz durchgeführt. Für die Experimente wurde ein invertiertes Mikroskop (Zeiss, Axiovert 135-TV) mit einem 60-fach vergrößernden Objektiv (Neofluar, numerische Apertur 1,3, Zeiss) verwendet. Zur Anregung des Fluoreszenzdonors wurde die 514 nm Wellenlänge eines Argonlasers (Innova 306, Coherent) in den Strahlengang des Mikroskops eingekoppelt. Zur getrennten Messung der Fluoreszenz des Donors und des Acceptors wurde das Lichtsignal mittels eines dichroitischen Spiegels so geteilt, dass die entsprechenden Wellenlängenbereiche (größer, bzw. kleiner als 550 nm) in unterschiedliche Wege abgelenkt wurden. Die beiden Fluoreszenzsignale wurden dann von einer Stickstoff-gekühlten CCD-Kamera (AT200, Photometrix) mit einem TH512B Chip (512x512 Pixel, 27  $\mu\text{m}^2$  pixel size, Tektronix) detektiert. Für die Datenaufnahme wurde die CCD-Kamera als Zwischspeicher genutzt, derart, dass 12 Bilder mit je 40x40 Pixeln sukzessiv, entsprechend verschoben, auf den Chip abgebildet wurden. Die höchste Zeitauflösung, die in dieser frameshift Methode erreicht wird, liegt bei 6,6 Millisekunden. Das Verfahren bietet die Möglichkeit, einen relativ grossen Bereich (z.B. die gesamte Lipidmembran) mit ausreichender Zeitauflösung zu untersuchen. In Abb. 3.32 ist die Anordnung schematisch dargestellt. Der Aufbau ist weitgehend optimiert und erreicht routinemässig Einzelmolekülaufösung. Eine Softwaresteuerung verschiebt die Abbildung der Fluoreszenzsignale automatisch auf dem Chip und lässt eine vorläufige Datenanalyse in Echtzeit zu.

### 3.5.4 Korrelation optischer und elektrischer Aktivität

Für die kombinierten optischen und elektrischen Messungen wurde eine kleine Zelle für die Lipidmembran und Elektrolytlösung angefertigt, die in das Mikroskop eingesetzt werden kann. Hierzu wurde eine perforierte Teflonfolie auf einem mit Agarose-Gel beschichteten Deckplättchen fixiert. Die Teflonfolie war von Elektrolytlösung umgeben und durch Ag/AgCl-Elektroden mit einem Patch Clamp Verstärker verbunden. Die Perforation der Teflonfolie wurde durch eine scharfe, glühend heisse Metallspitze mechanisch eingebracht.

Die Lipidmembran wurde aus DiPhPC durch painting hergestellt, wobei dem Lipid in gewünschter Menge die beiden fluoreszenzmarkierten Gramicidinderivate beigemischt waren. Das Erstellen und Ausdünnen der Mem-

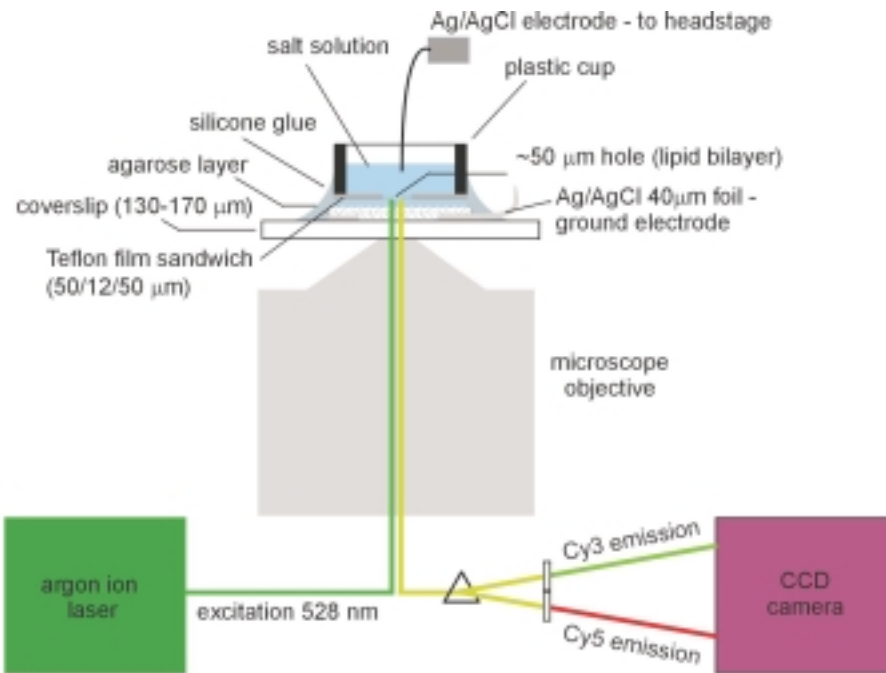


Abbildung 3.32: Skizze des optischen Messaufbaus zur Analyse von einzelnen fluoreszenzmarkierten Gramicidinen.

bran wurde elektrisch mit Hilfe des Patch Clamp Verstärkers überwacht. Nach Ausbildung der Bilayer wurde gegebenenfalls die Gramicidinkonzentration auf das gewünschte Maß erhöht, woraufhin die gesamte Zelle mit der Bilayer in das Mikroskop transferiert wurde. Nach entsprechendem Einstellen des zu messenden Bereiches, in unserem Fall immer die gesamte Bilayerfläche, wurden simultan zu den Patch Clamp Messungen Zeitserien der Fluoreszenzsignale der Donoren und Acceptoren aufgenommen. Die Einzelmolekülfluoreszenz der Gramicidinderivate war deutlich nachweisbar, ebenso die FRET-basierte Fluoreszenz, wobei letztere signifikant weniger häufig auftrat als die Donor-Fluoreszenz, da natürlich nur mit einer Wellenlänge im Donorabsorptionspektrum angeregt wurde.

In den Experimenten wurden Bilayer mit Durchmesser von etwa  $10 \mu\text{m}$  untersucht, in Abb. 3.33 sind Aufnahmen einer solchen Bilayer mit der CCD-Kamera abgebildet. Die Sequenz der drei Bilder ist im Abstand von 100 ms

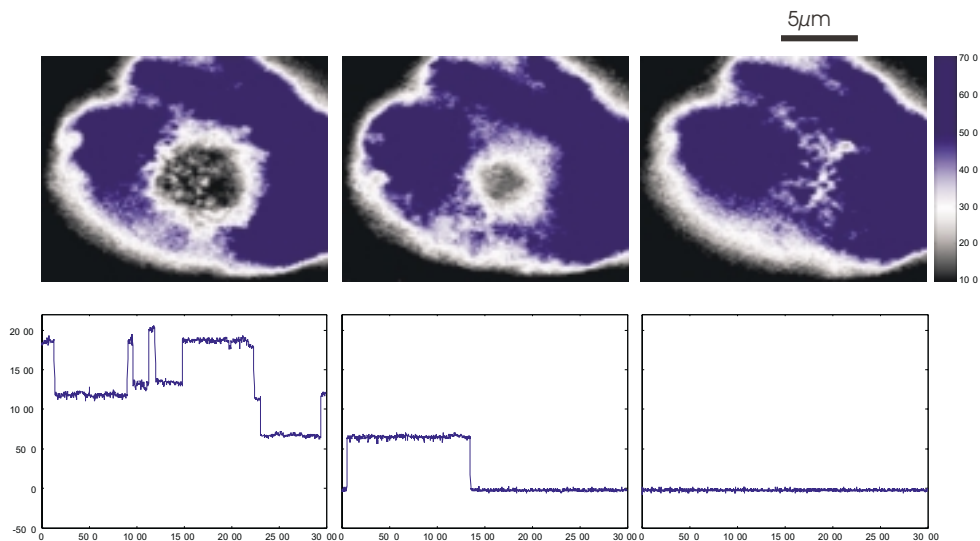


Abbildung 3.33: Im oberen Teil der Abbildung sind CCD-Kamera Aufnahmen der Bilayer zu sehen, im unteren Teil sind der simultan gemessene Stromfluss über die Bilayer dargestellt. Das Schliessen der Bilayer korrespondiert mit dem Verschwinden der Kanalaktivität.

aufgenommen und im unteren Teil der Abbildung ist der simultan gemessene Stromfluss über die Bilayer dargestellt. Deutlich zu erkennen ist der die Bilayer umgebende Lipid/Dekan-Torus. Im Verlauf der Sequenz schließt sich der Torus, und die Doppellipidschicht der Membran wird durch eine multilamellare bis ungeordnete Lipid/Dekan-Phase ersetzt. Dieses Phänomen des Auflösens der Bilayer zugunsten einer dickeren Lipidschicht wurde besonders bei sehr kleinen Bilayern wiederholt beobachtet. Der korrespondierende Stromfluss zeigt während der Gegenwart der Bilayer Kanalaktivität, welche beim Schliessen der Doppellipidschicht natürlich verschwindet, da sich keine leitfähigen Gramacidindimere in der dicken Lipidschicht bilden können. Die optische Detektion der Bildung und des Auflösens einer Bilipidschicht wird also durch die elektrische Messung der Kanalaktivität bestätigt.

Ein weiteres, oft beobachtetes Phänomen ist das spontane Aufreißen der Lipidmembran. Insbesondere bei anliegenden Potentialdifferenzen von deutlich über 100 mV oder bei starker mechanischer Erschütterung wird die Membran stark beansprucht, wodurch die Wahrscheinlichkeit des Aufreis-



sens erhöht wird. In Abb. 3.34 ist eine Sequenz von Aufnahmen mit der CCD-Kamera und den simultanen Strommessungen über die Bilayer dargestellt. In der zehnten Aufnahme der Sequenz ist deutlich zu sehen, dass die Bilayer gerissen ist, was durch den drastischen Anstieg des Leitwerts bestätigt wird.

In Abb. 3.35 ist wiederum eine Sequenz von Aufnahmen der CCD-Kamera

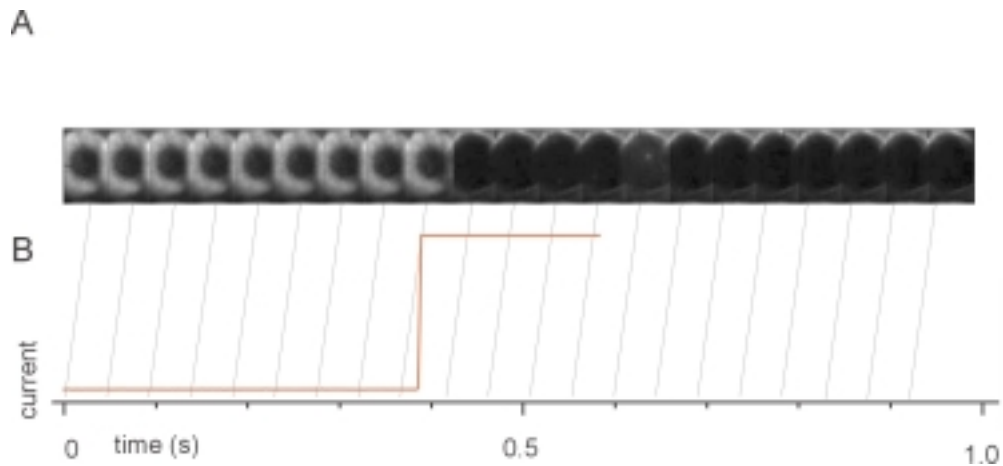


Abbildung 3.34: Eine Sequenz von Aufnahmen mit der CCD-Kamera und der simultan aufgezeichnete Stromverlauf. Deutlich zu sehen ist das Aufreißen, bzw. Verschwinden der Lipidmembran ab der zehnten Aufnahme, was durch den sofortigen Anstieg des Leitwerts bestätigt wird. Die Grösse der CCD-Kamerabilder entspricht etwa 20 x 35 Mikrometern.

mit den simultanen Strommessungen über die Bilayer zu sehen. Die Leitwertsstufen der einzelnen Gramicidin-Dimere sind gut aufgelöst und lassen sich zum Teil mit sp-FRET Ereignissen korrelieren (siehe Pfeile).

Die genauere Evaluation der Korrelation ist möglich, da wie bereits beschrieben die Leitwerte der verschiedenen möglichen Dimere (Donor-Homo-Dimer, Acceptor-Homo-Dimer und Donor-Acceptor-Hetero-Dimer) unterschiedlich und damit unterscheidbar sind. Beim Anstieg des Stromflusses um den Betrag des Hetero-Dimer Leitwerts ist nach sp-FRET Ereignissen zu suchen. Es liegen eine Vielzahl solcher Daten vor, die gegenwärtig ausgewertet werden.

In weiteren Experimenten wurde die Molekularbewegung einzelner

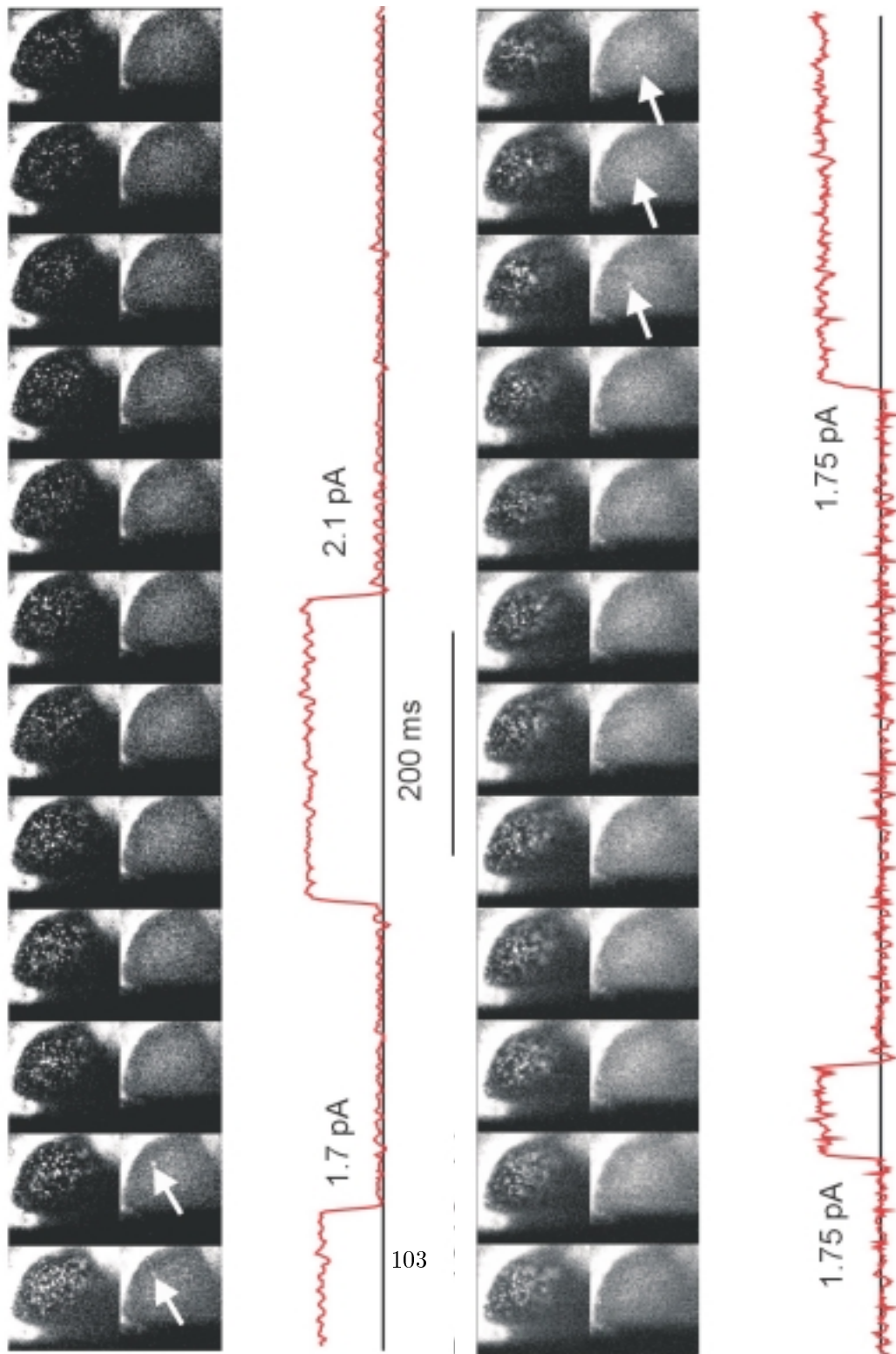


Abbildung 3.35: Stromfluss durch Gramicidinkanäle und simultaner Einzel Molekül Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer zwischen den einzelnen fluoreszenzmarkierten Gramicidinen im Fall eines Hetero-Dimers.

Gramicidin-Monomere und -Dimere untersucht. Es wurden Trajektorien der fluoreszierenden Monomere (Cy3-Kanal) und Hetero-Dimere (Cy5-Kanal) aufgenommen, aus denen sich die Beweglichkeit der Moleküle berechnen lässt. Die Unterscheidung von Monomeren und Dimeren war auf einfache Weise möglich, da die Fluoreszenz von Cy5 (dem Acceptor im FRET-Paar) nur dann auftritt, wenn tatsächlich FRET statt findet, was nur bei einem Hetero-Dimer möglich ist.

Die laterale Diffusion eines Brownschen Teilchens charakterisiert durch ei-

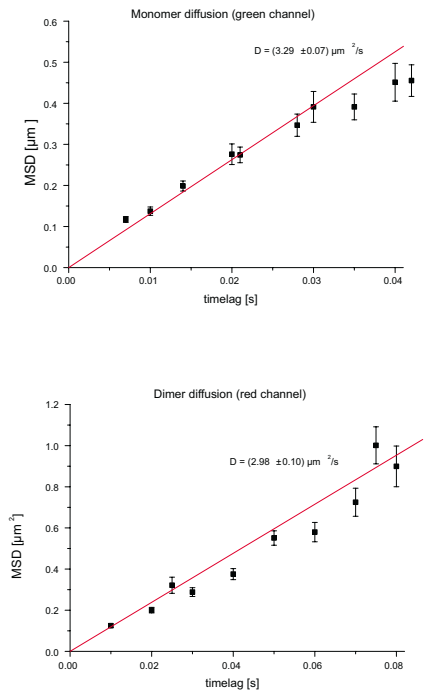


Abbildung 3.36: *Bestimmung der Diffusionskonstante von Gramicidin-Monomeren und -Dimeren in freitragender Lipidmembran. Aus der Auftragung der mittleren Abstände der Molekülposition zu verschiedenen Zeitpunkten lässt sich die Diffusionskonstante extrapolieren.*

ne Diffusionskonstante  $D$ , lässt sich durch die Verteilung von Abständen  $r$  zwischen zwei Beobachtungen innerhalb einer Zeitspanne  $t$  beschreiben:

$$p(r^2, t)dr^2 = (1/r_0^2(t)) \cdot e^{(-r^2/r_0^2(t))} \cdot dr^2, \quad (3.16)$$

wobei  $r_0^2(t) = 4Dt$  ist. Die Integration von Gleichung 3.16 ergibt die Verteilungsfunktion der quadratischen Abstände  $r^2$ :

$$P(r^2, t) = \int_0^{r^2} p(r_1^2, t)dr_1^2 = 1 - e^{(r^2/r_0^2(t))}, \quad (3.17)$$

$P(r^2, t)$  ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Brownsche Teilchen während der Zeit  $t$  in einem Kreis mit Radius  $r$  bleibt. Die Auswertung der gemessenen Trajektorien für Monomere und Dimere mittels der obigen Gleichungen führte zur Bestimmung der Diffusionskonstanten zu  $D_{Monomer} = (3.29 + -0.07)\mu m^2/s$  für Gramacidin-Monomere und  $D_{Dimer} = (2.98 + -0.10)\mu m^2/s$  für die Hetero-Dimere. Die Beweglichkeit der grösseren, die Membran durchspannenden Dimere ist erwartungsgemäss geringer als die der Monomere, jedoch nur um einen kleinen Betrag. In Abb. 3.36 sind die Auswertungen der Daten zur Beweglichkeit der einzelnen Moleküle dargestellt. Aufgetragen sind jeweils die quadrierten, mittleren Abstände der Teilchenposition gemessen nach verschiedenen Zeitintervallen.

# Kapitel 4

## Diskussion

Mit den in dieser Arbeit entwickelten, planaren Patch Clamp Sonden sind verschiedene elektrophysiologische und biophysikalische Experimente durchgeführt worden. Im folgenden werden die Ergebnisse ausführlich diskutiert, Vor- und Nachteile dargestellt und mögliche Entwicklungen aufgezeigt.

### 4.1 Patch Clamp Chips

Ausgehend von verschiedenen Substraten wurden mit unterschiedlichen Strukturierungstechniken Patch Clamp Chips hergestellt, die in ihren Eigenschaften und der resultierenden Eignung für die Anwendung stark variierten. Ausgehend von Siliziumproben wurde zunächst auf kristallines Quarz gewechselt, dann Glas und schliesslich auch amorphes Quarz prozessiert. Insbesondere Borosilikatglas hat sich als vorteilhaft erwiesen, so dass verschiedene Strukturierungsmethoden für dieses Material entwickelt wurden. In Abb. 4.1 sind die wesentlichen Meilensteine bei der Evaluation von Substraten und Prozessierungstechniken dargestellt. Silizium als Ausgangsmaterial bietet den Vorteil, dass die Prozessierungstechniken sehr weit entwickelt und weitgehend zugänglich sind, insbesondere ist die Prozessierung vollständig parallelisierbar. Als Nachteil müssen die Halbleitereigenschaften, besonders die freie Ladungsträgerdichte genannt werden, welche die elektrische Kapazität der Messsonde erhöht. Die Kapazität führt zu parasitären Strömen in der Messung, welche auch durch gute elektrische Isolierung der Probe nicht vollständig vermieden werden können. Ein weiterer Nachteil ist die geringe mechanische Stabilität der freitragenden Siliziumnitridmembran, in welche die Apertur eingebracht ist. Diese ist äußerst empfindlich, so dass

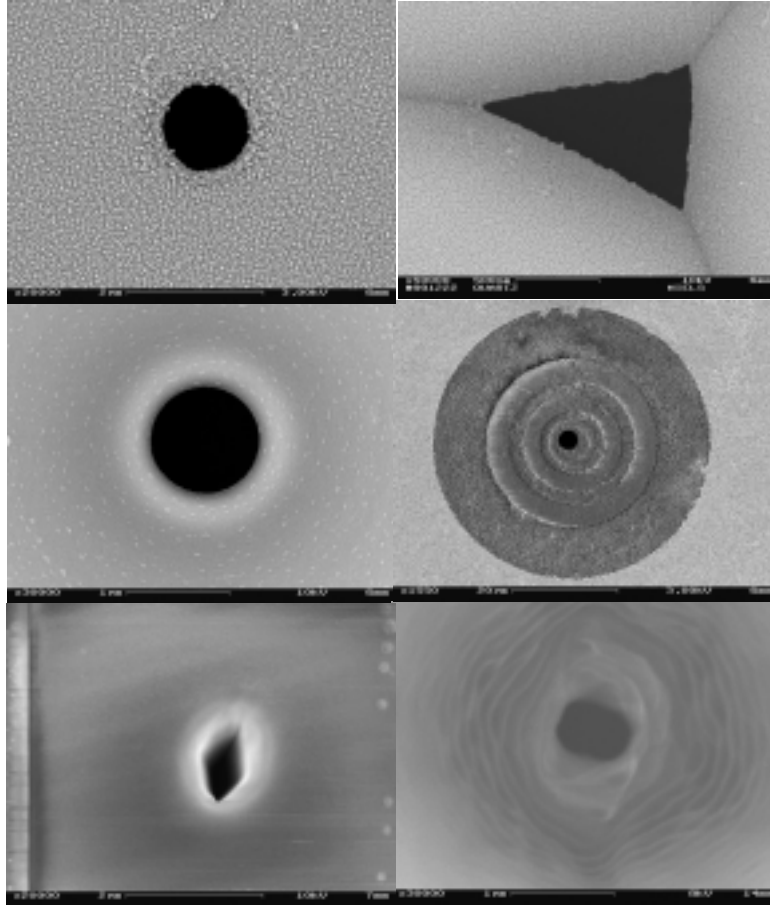


Abbildung 4.1: *Verschiedene Entwicklungsstufen der Patch Clamp Chips (von links oben nach rechts unten): Siliziumsubstrat, kristallines Quarz, Borosilikatglas mit Ionenspritzung, dito mit zusätzlicher Oberflächenstrukturierung mittels Reaktivem Ionenätzen, Glas mit Focused Ion Beam strukturiert, Glas perforiert mit Laserablation.*

z.B. Reinigungsprozesse im Ultraschallbad sofort zur Zerstörung der Probe führen.

Der Hauptnachteil der Siliziumstruktur liegt jedoch in ihrer Geometrie. Aufgrund der geringen Dicke der freitragenden Struktur von nur etwa 0.2-1 Mikrometer hat die integrierte Öffnung fast keine Seitenwände, sondern ist im wesentlichen ein sehr flacher Zylinder mit wenigen 100 nm Höhe. Diese Geometrie bietet einer angesaugten Zellmembran nur eine äußerst geringe Anlagerungsfläche. Für die Ausbildung eines elektrisch sehr dichten Abschlusses zwischen Zellmembran und Probe ist aber gerade diese Anlagerungsfläche von herausragender Bedeutung. Versuche, mit auf den Aperturen positionierten Zellen einen Seal zu erreichen, sind mit den Si-Proben durchweg gescheitert. Es wurde lediglich eine geringe Widerstandserhöhung bei der Strommessung über den Si-Chip von etwa 0.1-1 M $\Omega$  ohne Zelle auf etwa 2-10 M $\Omega$  mit Zelle registriert. Diese Sealwiderstände sind um mindestens einen Faktor 10-50 zu gering, um sinnvolle Messungen zu machen und um einen Faktor 100-1000 geringer als übliche Widerstände mit Patch Pipetten. Neben anderen potentiellen Ursachen für schlechte Sealbildung (z.B. Oberflächenchemie oder Zellkontaktierungsmethode) ist die ungeeignete Geometrie der Siliziumproben mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Hauptfaktor für die unzureichende Zellmembranadhäsion an der Apertur.

Um die dielektrischen Eigenschaften der Patch Clamp Chips zu verbessern, wurde auf Quarz als Ausgangssubstrat gewechselt. Quarz hat die für diesen Aspekt idealen Eigenschaften und stellt im Vergleich zum Silizium die maximal erreichbare Verbesserung dar. Bei der Prozessierung von kristallinem Quarz stellten sich einige Herausforderungen (siehe Kapitel Präparation), welche nur durch eine optimierte Prozesskontrolle zu überwinden sind. Die anisotrop geätzten Löcher im kristallinen Quarz konnten schliesslich auch mit Durchmessern im Sub-Mikrometerbereich hergestellt werden. Sie sind jedoch aufgrund der Kristallstruktur des Quarzes (z-cut) dreieckig. Diese Geometrie ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nachteilig bei der Sealausbildung, da sich eine Zellmembran nur schlecht in die Ecken der Öffnung anlagert. Intuitiv ist das verständlich: die starke Krümmung der Membran, die notwendig ist, um eine elektrisch dichte Anlagerung in einem spitzen Winkel zu ermöglichen, ist nicht die energetisch günstigste. Die Zellmembran ist durch das Cytoskelett eher rigide und auf einer solch kleinen Skala nur begrenzt flexibel. Es bleiben dementsprechend grosse Leckströme über die Ecken der Apertur, so dass bei Experimenten an Zellen mit den kristallinen Quarzchips auch nur Sealwiderstände von einigen 10 M $\Omega$  erreicht wurden, ausgehend von 0.5-3 M $\Omega$  Widerstand der Apertur ohne Membran.

Bei Versuchen mit künstlichen Lipidmembranen in den dreieckigen Löchern kam es in wenigen Fällen zur Ausbildung einer Bilipidschicht. Dies war vor allem nur bei relativ grossen Aperturen mit Durchmessern von einigen 100  $\mu\text{m}$  der Fall. Bei kleineren Öffnungen scheint sich die dreieckige Geometrie nachteilig auf das Ausdünnen des Lipides auszuwirken. Der Hauptgrund ist der Lipidtorus um den ausgedünnten Bereich, der maßgeblich wichtig für die Stabilität der Bilayer ist, und sich besser in eine runde Geometrie als in eckige fügt. Die mechanische Stabilität auch der in grösseren Aperturen erzeugten Bilipidschichten ist im Vergleich zu Lipidmembranen in runden Öffnungen deutlich verringert.

Um die offensichtlichen Vorteile einer Apertur mit höherer Symmetrie zu erreichen, wurden amorphe Glassubstrate nasschemisch mit Hilfe des Ionenstrahlens strukturiert. Mit diesem Verfahren wurden absolut kreisrunde Löcher mit Durchmessern von unter einem Mikrometer hergestellt, die in vielerlei Hinsicht optimale Eigenschaften für Patch Clamp Messungen haben. Mit diesen Glaschips wurden eine Vielzahl von Experimenten an Lipidmembranen durchgeführt und unter anderem Strommessungen an Gramicidin und Alamethicin vorgenommen. Das Ausdünnen der Lipidschicht in den runden Aperturen gelingt recht gut, wobei das Ausdünnen bei grösseren Durchmessern (grösser etwa 50  $\mu\text{m}$ ) einfacher ist als bei sehr kleinen Öffnungen. Bei Aperturdurchmessern von wenigen Mikrometern ist der Übergang von der aufgetragenen Multilayer zur Lipiddoppelschicht in der Öffnung energetisch nicht so zwingend wie bei grösseren Bilayern. In diesem Fall muss der Übergang mechanisch katalysiert werden, also durch Verstreichen des Lipids das weitere Ausdünnen favorisiert werden, bzw. auch durch Anlegen einer Spannung eine Elektrostriktion erzeugt werden, welche die energetische Situation einer Bilipidschicht weiter verbessert.

Aufgrund der geringen Durchmesser der Aperturen und damit auch der Bilipidschichten können sehr rauscharme Experimente an Bilayern durchgeführt werden. Entgegen den ursprünglichen Erwartungen stellte sich jedoch allein aufgrund der runden Öffnungen keine deutliche Verbesserung der Sealeigenschaften mit Zellen ein. Die verschiedenen Entwicklungsschritte bei der Optimierung der Patch Clamp Chips für Experimente an Zellen werden im Abschnitt 4.3 ausführlich behandelt.

Es wurden wie bereits beschrieben auch Glassubstrate mit der Focused Ion Beam Technik perforiert, da aber der Zugang zu dieser recht aufwendigen Technik nur sehr begrenzt war, konnten keine abschließenden Untersuchungen an Zellen mit diesen Chips durchgeführt werden. Die in dieser Arbeit erreichten Ergebnisse mit der FIB-Technik deuten jedoch darauf hin, dass



unter Inkaufnahme des hohen technischen und zeitlichen Aufwandes bei der Prozessierung auch mit dieser Technik gute Ergebnisse erzielt werden können.

## 4.2 Lipidmembranen in mikrostrukturierten Aperturen

Im Vergleich zur klassischen Methode black lipid membranes in perforierten Teflonfolien zu erzeugen, können mit den in dieser Arbeit entwickelten, planaren Chipsonden deutlich kleinere Aperturen definiert werden. Die dementsprechend geringere Fläche der Bilipidschichten führt zu einer um bis zu 1000-fach geringeren Kapazität der Bilayer, wodurch äußerst rauscharme Messungen möglich werden. Entsprechend klein sind auch die kapazitiven Artefakte beim Anlegen von Spannungspulsen an die Lipidmembran. Dies ist zum Beispiel in einem weiterführenden Experiment zur Untersuchung der stochastischen Resonanz an Ionenkanälen von besonderer Bedeutung, bei dem der Haltespannung an der Bilayer ein sinusförmiges Spannungssignal überlagert wird. Der Sinus soll von spannungsabhängigen Kanälen detektiert werden, wobei das Auslesen lediglich aus der Stromantwort der Kanäle in der Membran geschieht. Ist die Kapazität der Membran nun recht groß, so ist der aus der sinusförmigen Spannung resultierende kapazitive Strom nicht vernachlässigbar und muss bei der Datenanalyse aus dem Stromsignal entfernt werden. Es ist natürlich deutlich günstiger mit Membranen so geringer Kapazität zu arbeiten, dass die auftretenden, kapazitiven Ströme vernachlässigbar klein sind. Ein weiterer Vorteil der kleinen Bilipidschichten ist ihre mechanische Stabilität. Messungen können über Stunden vorgenommen werden, auch wenn vergleichsweise hohe Spannungen (200 mV) an der Membran anliegen. Auch Erschütterungen der Probe führen nicht zur instantanen Zerstörung der Bilayer, wie es bei großflächigen BLMs oft der Fall ist. Allerdings sind die kleinen Membranen akustisch recht sensitiv, insbesondere im Frequenzbereich einiger Kilohertz, so dass bei unzureichender Schallisolierung die menschliche Sprache außerordentlich gut im Stromsignal der Bilayer repräsentiert wird (Mikrophonie).

Das Ausdünnen des Lipids zu einer Bilayer wird mit abnehmendem Durchmesser der Aperturen im Chip schwieriger. Bei Öffnungen von einigen 100  $\mu\text{m}$  findet das Ausdünnen spontan statt, bei Durchmessern unter 50  $\mu\text{m}$  muss mechanisch durch Ausstreichen nachgeholfen werden. Bei sehr kleinen Aperturen ist es oft hilfreich, dem Lipid/Dekan-Gemisch einige Prozent

Butanol beizumischen, da dies das Ausdünnen unterstützt. Neben der reinen Grösse der Öffnung ist auch die Dicke der Schicht, in der die Apertur integriert ist, von Bedeutung. Je dünner die Dicke dieser Schicht, desto leichter bildet sich eine Bilipidschicht aus. Gute Erfahrungen wurden mit Schichtdicken von unter  $10\ \mu\text{m}$  gemacht, das Ausdünnen ist dabei reproduzierbar und die mechanische Stabilität der Glasschicht ist noch hoch genug, um einen Reinigungsprozess im Ultraschallbad vorzunehmen.

### 4.3 Sealausbildung bei Experimenten an Zellen

Eine notwendige Voraussetzung für Patch Clamp Messungen an Zellen ist ein guter Seal, d.h. ein elektrisch und mechanisch dichter Abschluss zwischen Messsonde und Zellmembran. Mit Pipetten lassen sich je nach Zelltyp mehr oder weniger reproduzierbar Seals mit Zellen erstellen. Es besteht ein enormer Erfahrungsschatz an Tricks, Kniffen und Optimierungen für spezifische Anwendungen, der sich in den letzten Jahrzehnten angesammelt hat. Die allgemeinsten und wichtigsten Regeln sind die folgenden:

- Pipetten werden nur einmal verwendet: benutzte Pipetten sind mit Zellmaterial kontaminiert und werden keinen Seal mehr ausbilden.
- Pipetten werden möglichst frisch gezogen, d.h. sauber verwendet. Wenn sie gelagert werden müssen (und sei es nur für einige Stunden) so bewahrt man sie in einer luftdichten Box o.ä. auf, um Kontamination mit Staub und Partikeln aus der Umgebungsluft zu vermeiden.
- Der Öffnungsdurchmesser der Pipetten muss dem Experiment und Zelltyp angepasst sein: für ein Einzelkanalexperiment an einem sehr kleinen Neuron wird man Pipetten mit Spitzendurchmessern unter einem Mikrometer benutzen, für Ganzzelleableitungen an einer grossen N1E-115 Zelle kann der Spitzendurchmesser auch bis zu  $2\ \mu\text{m}$  betragen. Mit Spitzen grösser als  $2\ \mu\text{m}$  lassen sich allerdings nur sehr selten gute Seals erreichen.
- Speziell für Einzelkanalableitungen empfiehlt es sich, die gezogenen Pipettenspitze zu feuerpolieren, d.h. sie kurzzeitig anzuschmelzen, um erstens den Spitzendurchmesser zu verringern und zweitens eine sehr glatte Oberfläche der Spitze zu erhalten.

- Beim Eintauchen der Pipette in die Badlösung und während der Positionierungsphase der Pipette an der Zelle ist ein Überdruck an das Pipetteninnere anzulegen, um durch die entsprechend aus der Pipettenspitze ausströmende Lösung (die natürlich gefiltert und äußerst sauber ist) eine Kontamination der Spitze mit Zellmaterial aus der Badlösung zu vermeiden.
- Die richtige Positionierung der Pipette relativ zur Zelle ist für die Erfolgchancen der Sealbildung von besonderer Bedeutung. Wird der Abstand falsch gewählt und etwa zu früh gesaugt, kann die Sealrate gegen Null gehen. Ein guter Abstand lässt sich finden, indem man die Eindellung der Zellmembran durch die aus der Pipettenspitze ausströmende Lösung beobachtet. Wenn durch den Lösungsstrom auf der Membran im Phasenkontrastbild eine Art Halbmond erzeugt wird, ist der Abstand geeignet um mit der Sealbildung zu beginnen.
- Zur Sealbildung wird zunächst der Überdruck von der Pipette genommen, wodurch sich die eingedellte Membran relaxiert und mit der Pipettenspitze in Berührung kommt. Der Widerstand steigt auf einige  $100\text{ M}\Omega$  und durch Klemmen der Zellmembran auf ein negatives Potential, etwa  $-70\text{ mV}$ , wird die Sealbildung unterstützt. Nun gibt man dem Seal einige Zeit, um sich voll auszubilden, was durch Anlegen eines leichten Unterdrucks unterstützt wird. Dadurch können Sealwiderstände auf einige  $\text{G}\Omega$  ansteigen.

Nun kann man je nach geplantem Experiment in die verschiedenen Konfigurationen der Patch Clamp Technik übergehen, also z.B. durch Applizieren eines kurzen Unterdruckpulses die Zellmembran aufbrechen, um eine Ganzzellableitung zu machen oder etwa durch Zurückziehen der Pipette einen Membranfleck, also einen Patch, aus der Zelle heraus reißen, um ein Einzelkanalexperiment durchzuführen. All die oben genannten Punkte sind für sich genommen Ausschluß-Kriterien, die also bei Nichtbeachtung die Sealwahrscheinlichkeit deutlich herabsetzen.

#### **4.3.1 Zelladhäsion an Festkörpern oder das Ziel ist der Seal**

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war es, die Bedingungen zu schaffen, um vergleichbare Sealeigenschaften auch an den mikrostrukturierten Chips zu ermöglichen. Eine Vielzahl von Parametern sind allerdings deutlich gegenüber der Pipette verändert. Die Mechanismen der Sealbildung sind allerdings nicht im Detail verstanden [Mil 90, Ruk 91, Sok 91, Ops 94] und

der Erfolg beim Patchen mit Pipetten beruht weitgehend auf empirischen Erfahrungswerten. Es mussten demzufolge intensive Untersuchungen und Versuchsreihen durchgeführt werden, um auch mit Patch Clamp Chips elektrophysiologische Messbedingungen zu schaffen.

Auch mit den Glaschips wurden, ausgehend von Chipwiderständen zwischen 0.5-3 M $\Omega$ , bei Zellkontaktierung lediglich Sealwiderstände von 10-50 M $\Omega$  gemessen. In einer Vielzahl von Experimenten mit verschiedenen Chips diesen Typs und auch verschiedenen Zelltypen wurden keine befriedigenden Sealwiderstände erreicht. Damit wurde deutlich, dass nicht allein die Form der Öffnung, sondern die Geometrie der gesamten Perforation für die Sealausbildung relevant ist.

Eine Vermutung war, dass für eine gute Zellkontaktierung eine lokale Angriffsfläche der Messsonde notwendig ist, analog zum Rand der Pipette, welcher lokal in die Zellmembran eingedrückt ist. Daher wurden auf der Chipoberfläche um die Apertur konzentrische Erhöhungen definiert, die dem Pipettenrand nachempfunden waren (siehe Abb. 4.1). Diese lokalen Erhöhungen um den Rand der Apertur herum wurden mittels Lithographie und Trockenätzverfahren hergestellt, die Höhe der Wallstrukturen relativ zur Chipoberfläche betrug zwischen 200 und 1200 nm. Der Erfolg dieser Oberflächenstrukturierung war jedoch gering, die Zelladhäsion auf den künstlichen Pipettenrändern war nur minimal, wenn überhaupt verbessert im Vergleich zu unstrukturierten, planaren Oberflächen. Die Hydraulik beim Ansaugen einer Zelle sollte bei den oberflächenstrukturierten Chips geeigneter sein, die Zelle eng zu kontaktieren, da sich nicht wie beim planaren Chip ein dünner Fluidfilm zwischen Zellmembran und Chipoberfläche ausbilden kann. Um die Frage nach einer Verbesserung der Zelladhäsion durch Oberflächenstrukturierung abschließend zu klären, sollten zum einen höhere Ränder mit 2-5  $\mu\text{m}$  Höhe getestet werden. Dies war aufgrund der Prozessierung, die in dieser Arbeit verwendet wurde, nicht ohne weiteres möglich. Zum anderen bietet die Randstruktur um die Apertur eventuell dann einen Vorteil, wenn eine Zelle gezielt über der Apertur positioniert werden kann, bevor sie in diese angesaugt wird. In den durchgeführten Experimenten wurde die Zelle zumeist aus der Suspension direkt angesaugt, so dass der Sog sowohl zum Positionieren der Zelle als auch zum Einsaugen, bzw. Sealen verwendet wurde. Eine Trennung dieser beiden Prozesse erscheint sinnvoll, um das Unterdruckprotokoll spezifisch dem gewünschten Ziel (Positionieren, bzw. Einsaugen) anpassen zu können. In diesem Fall könnte die Oberflächenstrukturierung eine subtile Sealhilfe darstellen, die beim vergleichweisen groben Einsaugen einer Zelle aus der Suspension nicht

wirklich zum Tragen kommt.

Ein weiterer Unterschied zu Patch Pipetten, war der Öffnungswinkel der Aperturen. Bei Patch Pipetten liegt der Öffnungswinkel zwischen 10-20 Grad, bei den geätzten Ionenspuren in Glas bei etwa 70 Grad. Es kann daher der Zellmembran beim Einsaugen schwer fallen, sich auf einen relativ stumpfen Winkel zu öffnen und eng anzulagern, wohingegen dies bei einem um 50 Grad steileren Winkel durchaus möglich ist. Es wurden daher verschiedene Versuche unternommen, den Öffnungswinkel der Aperturen in den Chips dem der Pipetten anzupassen. Zum einen wurde amorphes Quarz mittels der Ionenspurätztechnik strukturiert, was aufgrund der im Vergleich zu Glas geringeren Ätzrate des Quarzes zu einem spitzeren Winkel von etwa 30 Grad der aufgeätzten Ionenspur führt. Zum anderen wurden amorphe Glaschips durch Laserablation perforiert, was ebenfalls den Öffnungswinkel verkleinert, auch wenn dieser nicht ohne weiteres auszumessen ist, da der Verlauf der Seitenwände der Perforation bei dieser Prozesstechnik nicht linear ist. In beiden Fällen wurden bei Experimenten mit Zellen deutlich höhere Sealwiderstände erzielt, die bis in den unteren  $G\Omega$ -Bereich gingen. Routinemässig lassen sich insbesondere mit den laserstrukturierten Glaschips Sealwiderstände von einigen 100  $M\Omega$  erreichen, womit sich elektrophysiologische Messungen gut durchführen liessen. Die Laserperforationen haben Durchmesser von bis hinab zu 0.5 Mikrometer und die Widerstände entsprechender Chips in Medium ohne Zellen liegen zwischen 1-8  $M\Omega$ .

### 4.3.2 Automatisierte Sealbildung

Ein weiterer Aspekt bei der chip-basierten Patch Clamp Technik war die Automatisierung der Zellpositionierung, der Sealbildung und des Aufbrechens der Zellmembran, um in die Whole-Cell-Konfiguration überzugehen. In ersten Versuchen wurde zunächst mit Hilfe einer Saugpipette eine Zelle aufgenommen und über der Apertur im Chip positioniert. Nach der Positionierung der Zelle wurde der Überdruck vom Chip genommen, der Widerstand über den Chip gemessen und gegebenenfalls die Zelle weiter angenähert, um dann durch Anlegen von Unterdruck am Chip die Sealbildung zu unterstützen. Mit dieser Methode wurden keine besonders guten Ergebnisse erzielt. Die Ursachen dafür liegen vermutlich in der durch die Saugpipette an der Zelle verursachten Störungen, welche die Zelle bereits vor dem Sealen beanspruchen oder schädigen können. Weiterhin stört die Pipette falls die Zelle erfolgreich am Chip eingesaugt wurde. Wird sie danach entfernt, kann auch das zu ungewünschten Irritationen der Zellmembran

führen. Ein weiterer, sehr entscheidender Nachteil dieser Methode ist der hohe technische Aufwand der Zellmanipulation, es wird wie bei der klassischen Patch Clamp Technik ein Mikroskop und Mikromanipulator, sowie ein geübter Operator benötigt. Dies kann zwar im Falle einer einzelnen Apertur geleistet werden, ist aber nicht skalierbar. Damit ist das Verfahren beim Arbeiten mit Aperturarrays nicht anwendbar.

In weiteren Versuchen wurde eine wesentlich einfachere und elegantere Methode entwickelt, die Zellen zur Apertur zu bringen und einen Seal auszubilden. Durch ein entsprechend angelegtes Druckprotokoll können diese Aufgaben erfüllt, sowie auch die Whole-Cell-Konfiguration erreicht werden. Um eine Zelle aus der Suspension auf dem Chip auf die Apertur eines Chips zu bringen, wird ein Unterdruck von einigen hundert Millibar angelegt. Ist eine Zelle angesaugt, wird zunächst der Unterdruck vollständig vom Chip genommen, d.h. auf atmosphärischen Druck relaxiert. Die Zelle wird nun auf  $-70$  mV geklemmt, was die Sealbildung unterstützt, und es wird dann ein leichter Unterdruck appliziert. Nach Ausbildung des Seals kann die Zellmembran durch einen Unterdruckpuls aufgebrochen werden, so dass nun Ganzzelleableitungen durchgeführt werden können. Diese Methode vereinfacht das Prozedere ungemein, es wird kein Mikroskop und Mikromanipulator benötigt, die Handhabung ist denkbar einfach, und die störende Saugpipette entfällt.

Um die Erfolgsrate dieses Vorgehens zu optimieren, ist ein gut abgestimmtes Druckprotokoll von hoher Bedeutung. Um durch den Unterdruck über die Apertur eine ausreichende Kraft zum Ansaugen einer Zelle zu erreichen, ist ein recht starker Unterdruck notwendig. Das ist insbesondere bei großen Zellen wie zum Beispiel den N1E-115 Zellen der Fall. Wird die Zelle nun auf den Chip gesaugt, muss sehr schnell der Unterdruck auf atmosphärischen Druck relaxiert werden, da sonst der starke Unterdruck die Zellmembran instantan aufbricht, und sich kein guter Seal entwickeln kann. Desweiteren muss die Zeitspanne zwischen Anlegen des Unterdrucks und dem Auftreffen der Zelle auf der Apertur möglichst kurz gehalten werden, da in dieser Zeit natürlich auch Verunreinigungen aus der Lösung, z.B. Membranreste, angesaugt werden können, welche die Apertur kontaminieren und einen Seal damit unmöglich machen. Es muss daher eine sehr saubere, mehrfach zentrifugierte und resuspendierte Zellsuspension verwendet werden, um Kontamination zu vermeiden. Die Anzahl der Zellen in der Suspension, bzw. die Zelldichte ist ebenfalls wichtig, da bei zu geringer Zelldichte die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle in die Nähe der Apertur und damit in die Reichweite der Saugkraft kommt, gering ist, wodurch sich die Zeitspanne des Ansaugens

gens deutlich verlängert. Zu viele Zellen können allerdings auch unerwünscht sein, zumindest wenn sich mehrere Lagen von Zellen auf der Chipoberfläche absetzen.

Das Anlegen des Unterdrucks zur Sealunterstützung ist ebenfalls an den jeweiligen Zelltyp und die Grösse der Apertur anzupassen, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Mit der entsprechenden Erfahrung lassen sich diese Parameter jedoch so wählen, dass das Verfahren zu reproduzierbaren Ergebnissen führt. Eine Verbesserung der Sealergebnisse lässt sich eventuell auch durch konsequente Trennung der Zellpositionierung und der Sealausbildung erreichen. In den vorgestellten Verfahren wurde zum Positionieren der Zelle auf der Apertur, sowie zur Sealausbildung Unterdruck eingesetzt. Für die beiden Prozesse sind aber sehr unterschiedliche Druckniveaus notwendig und eine klare Trennung der Prozesse ist im bisherigen Verfahren nicht einfach. Wünschenswert wäre es, eine Zelle durch einen ersten, vom Unterdruck unabhängigen Prozess zu positionieren und erst im zweiten Schritt Unterdruck zur Unterstützung der Sealbildung anzuwenden. Zellen lassen sich durch verschiedene Verfahren manipulieren, z.B. durch Laserverfahren [Guc 01] oder elektrische Felder [Mül 99], wodurch eine Trennung in zwei Prozesse möglich wäre. Ein Ansaugverfahren wäre ebenfalls möglich, wenn das Ansaugen für die Zellpositionierung vom Ansaugen zur Sealausbildung vollständig entkoppelt ist, also z.B. durch Verwendung von separaten Ansaugkanälen.

#### **4.4 Optimierte Messbedingungen beim Patch Clamp Chip**

Die in dieser Arbeit entwickelten Patch Clamp Chips haben gegenüber den konventionellen Patch Pipetten messtechnische, sowie grundsätzliche Vorteile. Um rauscharme Messungen zu ermöglichen, ist die Minimierung der Streukapazität der Messsonde von grosser Bedeutung. Aufgrund seiner Geometrie weist der Patch Clamp Chip eine gegenüber der Pipette um den Faktor 3-5 verringerte Kapazität auf. Weiterhin ist der Serienwiderstand des Chips kleiner als der einer Pipette gleichen Öffnungsdurchmessers, da der lange, spitz zu laufende Schaft der Pipette entfällt. Auch der Zugangswiderstand [Arm 92] ist beim Chip verhältnismässig gering, so dass eine nahezu unverfälschte Spannungsklemme möglich ist.

Durch die partielle Automatisierung des Patch Clamp Experimentes mit dem Chip, ist der notwendige, technische Aufwand gegenüber der klassi-

schen Methode deutlich reduziert. Da die Zellen durch Ansaugverfahren auf der Apertur positioniert werden, wird kein Mikromanipulator und Mikroskop benötigt. Der technisch aufwendige und handwerklich anspruchsvolle Prozess der Pipettenmanipulation entfällt vollständig.

Um Relativbewegungen zwischen Pipette und Zelle zu vermeiden, da diese den fragilen Seal beeinträchtigen, wird das klassische Patch Clamp Setup auf einem schwingungsisolierenden Tisch gelagert. Da beim chip-basierten Patch Clamp Verfahren Zelle und Chip eine Einheit bilden, entfallen Relativbewegungen und eine aufwendige Schwingungsdämpfung wird überflüssig. Neben diesen für die Meßtechnik relevanten Verbesserungen ist die planare Geometrie und planare Prozessierung eine der Hauptstärken des Patch Clamp Chips. Durch den Einsatz von planaren Prozessierungstechniken ist das Herstellungsverfahren der Chips parallelisierbar, so dass mehrere Patch Clamp Aperturen z.B. in einer Matrixanordnung auf einem einzelnen Chip integriert werden können. Daraus ergeben sich vor allem anwendungsorientierte Vorteile. Die planare Geometrie des Chips selber vereinfacht die Anwendung von Rastersondenverfahren wie AFM oder SNOM in Kombination mit der Patch Clamp Messung. Entsprechende Experimente wurden bisher an invertierten Pipetten durchgeführt, was einen hohen technischen Aufwand darstellt.

Das Arbeiten mit mikrostrukturierten Patch Clamp Chips bietet ebenfalls den Vorteil, dass weitere Komponenten auf dem Chip integriert werden können. Unter anderem ist eine schnelle Perfusion an den untersuchten Zellen von Interesse [Her 87], um Substanzen auf die Zelle applizieren und wieder auswaschen zu können. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde das jeweils durch Anwendung von Mikropipetten auf der Oberseite des Chips ausgeführt. In Weiterentwicklungen ist jedoch on-chip, bzw. im Chip integrierte Mikrofluidik z.B. mittels Soft Lithography [Xia 98, Ung 00] möglich, wodurch eine ausserordentlich schnelle Perfusion mit minimalem Substanzverbrauch realisiert werden kann.

Interessant ist auch die Integration von aktiven Elementen mit dem Chip, z.B. ein in Hybridtechnik gefertigter Strom/Spannungswandler und Verstärker zur Vorverstärkung des Messsignals direkt am Ort der Messung. In Erweiterungen des hier vorgestellten Chip-Konzeptes bietet die Integration von planaren Elektroden auf dem Chip vielversprechende Möglichkeiten zur Mikrowellenspektroskopie [Gre 98, Mao 98, Hef 99]. Diese Messtechnik ist insbesondere für festkörperunterstützte (supported) Lipidmembranen geeignet, die z.B. durch Vesikelfusion hergestellt werden können [Kel 00]. In die Lipidmembranen können Membranproteine einge-



bracht werden [Nau 95, Puu 95, Ott 97, Kah 01, Wag 00], welche durch die Mikrowellen spektroskopiert oder auch manipuliert werden. Die Kombination eines solchen Ansatzes mit der chip-basierten Patch Clamp Technik ermöglicht einen neuen, experimentellen Zugang zur Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehungen von Ionenkanalproteinen.

## Kapitel 5

# Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Patch Clamp Verfahrens basierend auf planarer Chiptechnologie. Zu diesem Zweck mussten feine Öffnungen mit Durchmessern bis in den Submikrometerbereich in planare Substrate eingebracht werden. Es wurden Patch Clamp Chips aus verschiedenen Substraten und mit verschiedenen Strukturierungsverfahren hergestellt. Die Eignung der unterschiedlichen Ausgangsmaterialien wurde evaluiert sowie die Prozessierung optimiert. Als Ausgangssubstrat der Wahl hat sich Borosilikatglas, bzw. amorphes Quarz erwiesen. Eine Kombination aus nasschemischer Vorstrukturierung und Laserablation, bzw. Strukturierung mit aufgeätzten Ionenspuren hat die besten Ergebnisse geliefert.

Mit den Patch Clamp Chips wurden zunächst Experimente an künstlichen Lipidmembranen durchgeführt. In Einzelkanaluntersuchungen an Gramicidin und Alamethicin wurde die gute Eignung der Patch Clamp Chips für BLM-Experimente deutlich. Die in der Apertur der mikrostrukturierten Chips erzeugten Lipidmembranen sind sehr stabil und die Messungen zeichnen sich durch ein im Vergleich zu Standard-Bilayerexperimenten außerordentlich geringes Hintergrundrauschen aus. Im Vergleich zu Messungen an Bilayers in herkömmlichen Teflonfolien konnte der Rauschlevel deutlich reduziert werden, was maßgeblich an der geringen Grösse der Bilayer in der mikrostrukturierten Apertur sowie an der Geometrie des Patch Clamp Chips allgemein liegt.

In weiteren Experimenten wurden kombinierte Messungen elektrischer und optischer Aktivität fluoreszenzmarkierter Ionenkanäle in künstlichen Lipidmembranen durchgeführt. Dabei wurden zwei Gramacidinderivate verwendet, die mit jeweils einem Fluoreszenzfarbstoff (Cy3 und Cy5) markiert waren, wobei die beiden Fluorophore ein FRET-Paar bilden. Gegenstand der Untersuchung war der simultane Nachweis des Ionenkanalschaltens mit elektrischer Methode (ionischer Stromfluss durch den geöffneten Kanal) und optischer Methode (Anstieg der FRET-Effizienz durch Dimerisierung). Die Arbeit wurde in Kooperation mit Prof. Woolley, Universität Toronto, und Dr. Schütz, Universität Linz, durchgeführt. Eine Korrelation der optischen und elektrischen Messung konnte nachgewiesen werden.

Der Schwerpunkt der Arbeit waren elektrophysiologische Untersuchungen an biologischen Zellen mittels der Patch Clamp Chips. Es mussten zunächst die Sealeigenschaften von Zellen auf den planaren Chips optimiert werden. Von herausragender Bedeutung ist dabei die Grösse und Geometrie der Apertur in den Chips. Die besten Ergebnisse wurden mit Glaschips erzielt, dabei konnten routinemässig Sealwiderstände von einigen hundert  $M\Omega$  und in einzelnen Fällen wenige  $G\Omega$  erreicht werden. Das lokale Aufbrechen der Zellmembran zur Erstellung der Whole-Cell-Konfiguration war sehr reproduzierbar durch Applikation eines Unterdruckpulses möglich. Für die Patch Clamp Chips wurde eine miniaturisierte Halterung aus Polycarbonat entwickelt, welche die Möglichkeit der Über-/Unterdruckapplikation enthält. Es wurden Ganzzelleableitungen an verschiedenen Zelltypen (N1E-115, CHO, C6) und mit unterschiedlichen Umgebungsbedingungen (verschiedene Elektrolyte, Applikation von Pharmaka) durchgeführt. Die Erfolgsrate bei der Ausbildung des Seals lag je nach Zelltyp zwischen 10-50%. Das Positionieren und Erstellen des Seals, bzw. der Whole-Cell-Konfiguration wurde weitgehend automatisiert, so dass im Versuchsaufbau auf Mikroskop, Mikromanipulator und aufwendige Schwingungsisolierung verzichtet werden kann.

## 5.2 Ausblick

In der Post-Genom Ära gewinnt die Proteomik zunehmend an Bedeutung. Um der Proteomik zum Erfolg zu verhelfen, werden ähnlich wie bei der Genomik automatisierte, hochdurchsatzkompatible Schlüsseltechnologien benötigt. Die in dieser Arbeit entwickelten Patch Clamp Chips stellen einen wichtigen ersten Schritt bei der Entwicklung einer Proteinanalysewerkbank dar. Die Untersuchung von Ionenkanalproteinfunktionen in ihrer

nativen Umgebung ist eine wissenschaftliche wie wirtschaftliche Herausforderung. Die Kombination von (fluoreszenz)-optischen Methoden mit der Patch Clamp Technik bietet ein hohes Potential für detaillierte Struktur-Funktionsanalysen an Ionenkanälen. Entsprechende Experimente lassen sich an einzelnen Molekülen durchführen, da beide Techniken simultan eine hochaufgelöste Detektion erlauben, wie in den Experimenten an fluoreszenzmarkierten Gramicidinen gezeigt wurde.

In weiterführenden Arbeiten wird die chip-basierte Patch Clamp Technologie nun vollständig automatisiert, weiter optimiert und vor allem parallelisiert. Es werden mehrere Aperturen in den Chip eingebracht, z.B. in Form eines regelmäßigen Arrays, an denen bei entsprechender elektronischer Kontaktierung simultan Patch Clamp Messungen durchgeführt werden können. Mit einem solchen mikrostrukturierten Patch Clamp Array kann die Anzahl der möglichen Experimente pro Tag drastisch erhöht werden. Dies ist insbesondere in der Pharmakaentwicklung, im sogenannten Drug Screening von Bedeutung. Hier wird die Patch Clamp Technik, der Goldstandard in der Validierung ionenkanalaktiver Substanzen, routinemässig eingesetzt. Allerdings geschieht dies erst spät im Sekundär oder Tertiär Screening, wenn die Anzahl der zu testenden Substanzen bereits von einigen 10-100.000 durch Hochdurchsatz-Screeningverfahren auf etwa 20-100 reduziert wurde. Untersuchungen mit der klassischen Patch Clamp Technik sind zu zeitaufwendig und teuer, um eine höhere Anzahl von Substanzen zu testen. Die meist fluoreszenz-basierten Hochdurchsatz-Primär-Screeningverfahren liefern allerdings nur indirekte, oft wenig informative Ergebnisse und sind zudem relativ fehleranfällig, speziell bei der falsch-negativ Diagnose. Das Interesse der Pharmaindustrie an einer automatisierten, hochdurchsatzfähigen Patch Clamp Technologie ist dementsprechend intensiv.

Die vorgestellte chip-basierte Technologie ist nicht auf Ionenkanalproteine beschränkt, sondern kann auch in der Untersuchung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) oder anderen Mechanismen der Elektrophysiologie der Zelle eingesetzt werden. Insbesondere lässt die planare Geometrie des Chips die Anwendung von Rastersondenverfahren und anderen oberflächenorientierten Methoden zu. Dadurch werden verschiedene, interessante Experimente möglich, die Patch Clamp Messungen mit anderen physikalischen Methoden kombinieren.

# Literaturverzeichnis

- [Abd 96] N. Abdul-Manan, and J.F. Hinton, Conformational States of Gramicidin A along the Pathway to the Formation of Channels in Model Membranes Determined by 2D NMR and Circular Dichroism Spectroscopy, *Biochem.* **33**, 6773 (1996).
- [Advalytix] [www.advalytix.com](http://www.advalytix.com).
- [Ake 99] M. Akesson, D. Branton, J.J. Kasianowicz, E. Brandin, and D.W. Deamer, Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments with single RNA molecules, *Biophys. J.* **77**, 3227-3233 (1999).
- [Ama 72] T. Amano, E. Richelson, and M. Nirenberg, Neurotransmitter Synthesis by Neuroblastoma Clones, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 258-263 (1972).
- [And 83] O.S. Andersen, Ion movement through gramicidin A channels, *Biophys. J.* **41**, 119-165 (1983).
- [And 96] Andersen, and Feldberg, *J. Phys. Chem.* **100**, 4622-4629 (1996).
- [And 99] O.S. Andersen, C. Nielsen, A.M. Maer, J.A. Lundbaek, M. Goulian, and R.E. Koeppe, Ion Channels as Tools to Monitor Lipid Bilayer-Membrane Protein Interactions: Gramicidin Channels as Molecular Force Transducers, *Methods Enzymol.* **294**, 208-224 (1999).
- [Arm 92] C.M. Armstrong, and W.F. Gilly, Access Resistance and Space Clamp Problems Associated with Whole-Cell Patch Clamping, *Meth. Enzymol.* **207**, 100 (1992).

- [Bak 01] M. Bak, R.P. Bywater, M. Hohwy, J.K. Thomson, K. Adelhorst, H.J. Jakobsen, O.W. Sorensen, and N.C. Nielsen, Conformation of Alamethicin in Oriented Phospholipid Bilayers Determined by  $^{15}\text{N}$  Solid-State Nuclear Magnetic Resonance, *Biophys. J.* **81**, 1684-1698 (2001).
- [Bam 77] E. Bamberg, and P. Läuger, Blocking of the Gramicidin A Channel by Divalent Cations, *J. Membr. Biol.* **35**, 351 (1977).
- [Ben 93] D. Benamar, P. Daumas, Y. Trudelle, B. Calas, R. Bennes, and F. Heitz, Influence of the nature of the aromatic side-chain on the conductance of the linear gramicidin: study of a series of 9, 11, 13, 15-Tyr(O-protected) derivatives, *Eur. Biophys. J.* **22**, 145 (1993).
- [Ben 95] K. Benndorf, Low-Noise Recording, in *Single Channel Recording (Second Edition)*, Herausgeber: B. Sakmann and E. Neher, Plenum Verlag (1995).
- [Bet 93] E. Betzig, and R.J. Chichester, Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy, *Science* **262**, 1422-1425 (1993).
- [Bey 96] D. Beyer, G. Elender, W. Knoll, M. Kühner, S. Maus, H Ringsdorf, and E. Sackmann, Influence of Anchor Lipids on the Homogeneity and Mobility of Lipid Bilayers on Thin Polymer Films, *Angew. Chem. Int. Ed.* **35**, 1682 (1996).
- [Bez 94] S.M. Bezrukov, I. Vodyanoy, and A. Parsegian, Counting polymers moving through a single ion channel, *Nature* **370**, 279-281 (1994).
- [Bez 97] S.M. Bezrukov, and I. Vodyanoy, Signal Transduction Across Alamethicin Ion Channels in the Presence of Noise, *Biophys. J.* **73**, 2456-2464 (1997).
- [Bez 00] S.M. Bezrukov, and M. Winterhalter, Examining Noise Sources at the Single-Molecule Level:  $1/f$  Noise of an Open Maltoporin Channel, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 202-205 (2000).
- [Beza 00] F. Bezanilla, The voltage sensor in voltage-dependent ion channels, *Physiol. Rev.* **80**, 555-592 (2000).

- [Bin 86] G. Binnig, C.F. Quate, and C. Gerber, Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930-933 (1986).
- [Bla 98] G. Blankenstein and U.D. Larsen, Modular concept of a laboratory on a chip for chemical and biochemical analysis, *Biosensors and Bioelectronics* **13**, 427 (1998).
- [Boh 80] G. Boheim, W. Hanke, and H. Eibl, Lipid phase transition in planar bilayer membrane and its effect on carrier- and pore-mediated ion transport, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **77**, 3403 (1980).
- [Bor 00] V. Borisenko, M.S.P. Sansom, and G.A. Woolley, Protonation of Lysine Residues Inverts Cation/Anion Selectivity in a Model Channel, *Biophys. J.* **78**, 1335-1348 (2000).
- [Bru 65] L.J. Bruner, The electrical conductance of semipermeable membranes, *Biophys. J.* **5**, 867-886 (1965).
- [Bus 93] D. Busath, The Use of Physical Methods in Determining Gramicidin Channel Structure and Function, *Ann. Rev. Physiol.* **55**, 473 (1993).
- [Cha 99] A. Cha, G.E. Snyder, P.R. Selvin, and F. Bezanilla, Atomic scale movement of voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy, *Nature* **402**, 809-812 (1999).
- [Col 68] K.S. Cole, *Membranes, Ions and Impulses*, University of California Press, Berkeley (1968).
- [Con 70] F. Conti and I. Tasaki, *Science* **169**, 1322 (1970).
- [Cor 83] D.P. Corey and F.C. Stevens, Science and Technology of Patch-Recording Electrodes, in *Single Channel Recording*, Herausgeber: B. Sakmann and E. Neher, Plenum Verlag Verlag (1983).
- [Cor 97] B.A. Cornell, V. Braach-Maksvytis, L. King, P. Osman, B. Rague, L. Wiczorek and R. Pace, A biosensor that uses ion-channel switches, *Nature* **387**, 580-583 (1997).
- [Coro 83] R. Coronado, and R. Latorre, Phospholipid bilayers made from monolayers on patch-clamp pipettes, *Biophys. J.* **43**, 231-236 (1983).

- [Cou 98] K. Coupland, P.R. Herman, and B. Gu, Laser cleaning of ablation debris from CO<sub>2</sub>-laser-etched vias in polyimide, *Appl. Surf. Sci.* **127-129**, 731-737 (1998).
- [Cre 00] T.M. Creemers, A.J. Lock, V. Subramaniam, T. Jovin, and S. Volker, Photophysics and optical switching in green fluorescent protein mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2974-2978 (2000).
- [Dan 90] J.S. Danel, F. Michel, and G. Delapierre, Micromachining of quartz and its application to an acceleration sensor, *Sensors and Actuators* **21-23**, 971-977 (1990).
- [Den 98] J. Denyer, J. Worley, B. Cox, G. Allenby, and M. Banks, HTS approaches to voltage-gated ion channel drug discovery, *Drug Discovery Today* **3**, 323-332 (1998).
- [Den 99] A.A. Deniz, M. Dahan, J.R. Grunwell, T. Ha, A.E. Faulhaber, D.S. Chemla, S. Weiss, and P.G. Schultz, Single-pair fluorescence resonant energy transfer on freely diffusing molecules: observation of Forster distance dependence and subpopulations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3670-3675 (1999).
- [Doy 98] D.A. Doyle, J.M. Cabral, R.A. Pfuetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, and R. MacKinnon, The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity, *Science* **280**, 69-77 (1998).
- [Dun 94] R.C. Dunn, G.R. Holtom, L. Mets, X.S. Xie, Near-field fluorescence imaging and fluorescence lifetime measurement of light harvesting complexes in intact photosynthetic membranes, *J. Phys. chem.* **98**, 3094-3098 (1994).
- [Dur 90] J.T. Durkin, R. E. Koeppe, O.S. Andersen, Energetics of Gramicidin Hybrid Channel Formation as a Test for Structural Equivalence: Side-Chain Substitutions in the Native Sequence, *J. Mol. Biol.* **211**, 221 (1990).
- [Eib 84] H. Eibl, Phospholipide als funktionelle Bausteine biologischer Membranen, *Angew. Chem.* **96**, 247 (1984).
- [Eis 98a] R. Eisenberg, Ionic Channels in Biological Membranes: Natural Nanotubes, *Acc. Chem. Res.* **31**, 117-123 (1998).



- [Eis 98b] R. Eisenberg, Ionic channels in biological membranes - electrostatic analysis of a natural nanotube, *Contemp. Physics* **39**, 447-466 (1998).
- [Eis 80] G. Eisenman, B. Enos, J. Hagglund, J. Sandblom, Gramicidin as an example of a single-filing ionic channel, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **339**, 8 (1980).
- [Ell 83] I.R. Elliott, D. Needham, J.P. Dilger, and D.A. Haydon, The Effect of Bilayer Thickness and Tension on Gramicidin Single-Channel Lifetime, 95-103 (1983).
- [Fer 99] N. Fertig, Nanostrukturierte Messsonde für einzelne Ionenkanäle in Zellmembranen, Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1999).
- [Fer 00a] N. Fertig, A. Tilke, R.H. Blick, J.C. Behrends, G. ten Bruggencate, and J.P. Kotthaus, Stable integration of isolated cell membrane patches in nanomachined aperture, *Appl. Phys. Lett.* **77**, 1218-1220 (2000).
- [Fer 00b] N.Fertig, Ch. Meyer, A. Tilke, R.H. Blick, and J.C. Behrends, Nanostructured suspended aperture for patch clamp recording and scanning probe applications on native cell membranes, *Biophys. J.* **266a**, (2000).
- [Fer 01a] N. Fertig, Ch. Meyer, R.H. Blick, Ch. Trautmann, and J.C. Behrends, Microstructured glass chip for ion channel electrophysiology, *Phy. Rev. E (Rap. Com)* **64**, (2001).
- [Fer 01b] N. Fertig, Ch. Meyer, R.H. Blick, and J.C. Behrends, A microstructured chip electrode for low noise single channel recording, *Biophys. J.* **337a**, (2001).
- [Fer 02] N.Fertig, R.H. Blick, and J.C. Behrends, Whole cell patch clamp recording performed on a planar glass chip, *Biophys. J.*, in press (2002).
- [Fle 65] R.L. Fleischer, P.B. Price, and R.M. Walker, *J. Appl. Phys.* **36**, 3645 (1965).

- [Fie 99] M. Fiebig, M. Kauf, J. Fair, H. Endert, M. Rahe, and D. Basting, New aspects of micromachining and microlithography using 157 nm excimer laser radiation, *Appl. Phys. A* **69**, 305 (1999).
- [För 48] T. Förster, Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Ann. Phys.* **6**, 55-75 (1948).
- [Fri 92] U.P. Fringeli, In Situ Infrared Attenuated Total Reflection (IR ATR) Spectroscopy: A Complementary Analytical Tool for Drug Design and Drug Delivery, *Chimia* **46**, 200 (1992).
- [Fun 95] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, and Y. Yanagida, Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution, *Nature* **374**, 555-559 (1995).
- [Gim 99] J.K. Gimzewski, and C. Joachim, Nanoscale Science of Single Molecules Using Local Probes, *Science* **283**, 1683-1688 (1999).
- [Gla 99] K.S. Glauner, L.M. Mannuzzu, C.S. Gandhi, and E.Y. Isacoff, Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel, *Nature* **402**, 813-816 (1999).
- [Gon 99] J.E. Gonzalez, K. Oades, Y. Leychkis, A. Hrootunian, and P.A. Negulescu, Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets, *Drug Discovery Today* **4**, 431-439 (1999).
- [Gou 98] M. Goulian, O.N. Mesquita, D.K. Fygeson, C. Nielsen, O.S. Andersen and A. Libchaber, Gramicidin Channel Kinetics under Tension, *Biophys. J.* **74**, 328-337 (1998).
- [Gre 98] M.H. Greenhall, J. Yarwood, R. Brown, and R.M. Swart, Spectroscopic Studies of Model Biological Membranes in Vesicles and Langmuir-Blodgett Films, *Langmuir* **14**, 2619-2626 (1998).
- [Gu 99] L. Gu, O. Braha, S. Conlan, S. Cheley, and H. Bayley, Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter, *Nature* **398**, 686-690 (1999).
- [Guc 01] J. Guck, R. Ananthakrishnan, H. Mahmood, T.J. Moon, and C.C. Cunningham, The Optical Stretcher: A Novel Laser Tool to Micromanipulate Cells, *Biophys. J.* **81**, 767-784 (2001).

- [Ha 96] T. Ha, T. Enderle, D.F. Ogletree, D.S. Chemla, P.R. Selvin, and S. Weiss, Probing the interaction between two single molecules: fluorescent resonant energy transfer between a single donor and a single acceptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6264-6268 (1996).
- [Ha 99] T. Ha, J. Ting, A.Y. Liang, A.A. Deniz, D.S. Chemla, S. Weiss, and P.G. Schultz, Single-pair fluorescence resonant energy transfer on freely diffusing molecules: observation of Förster distance dependents and subpopulations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3670-3675 (1999).
- [Ham 81] O.P., Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F.J. Sigworth, Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Arch.* **391**, 85-100 (1981).
- [Han 97] W. Hanke und R. Hanke, *Methoden der Membranphysiologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg* (1997).
- [Han 97] M. Hanner, W.A. Schmalhofer, P. Munujos, H.G. Knaust, G.J. Kaczorwski, and M.L. Garcia, The  $\beta$  subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel contributes to the high-affinity receptor for charybdotoxin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94**, 2853-2858 (1997).
- [Hed 93] C. Hedlung, Anisotropic etching of z-cut quartz, *J. Micromech. Microeng.* **3**, 65-73 (1993).
- [Hef 99] J. Hefti, A. Pan, and A. Kumar, Sensitive detection method of dielectric dispersions in aqueous-based, surface-bound macromolecular structures using microwave spectroscopy, *Appl. Phys. Lett.* **75**, 1802-1804 (1999).
- [Her 87] S. Hering, D.J. Beech, and T.B. Boltom, A simple method for fast extracellular solution exchange for the study of whole-cell or single channel currents using the patch clamp technique, *Pflügers Arch.* **411**, 137 (1987).
- [Her 93] P.R. Herman, B. Chen, and D.J. Moore, Vacuum ultraviolet laser ablation of Teflon (PTFE), *MRS Proc.* **285**, 163 (1993).

- [Hey 95] S. Heyse, H. Vogel, M. Sanger, and H. Sigrist, Covalent attachment of functionalized lipid bilayers to planar waveguides for measuring protein binding to biomimetic membranes, *Protein Science* **4**, 2532 (1995).
- [Hil 92] B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Sinauer Verlag (1992).
- [Hod 45] A.L. Hodgkin, and A.F. Huxley, Resting and action potential in single nerve fibres, *J. Physiol.* **104**, 176-187 (1945).
- [Hod 55] A.L. Hodgkin, and Keynes, *J. Physiol.* **128**, 61-88 (1955).
- [Hin 88] J. F. Hinton, J. Q. Fernandez, D.C. Shungu, W.L. Whaley, R.E. Koeppe, and F.S. Millet, Tl-205 Nuclear Magnetic Resonance Determination of the Thermodynamic Parameters for the Binding of Monovalent Cations to Gramicidin A and C, *Biophys. J.* **54**, 527 (1988).
- [Hor 00] R. Horn, A new twist in the saga of charge movement in voltage dependent ion channels, *Neuron* **25**, 511-514 (2000).
- [Hir 01] T. Hirogaki, E. Aoyama, H. Inoue, K. Ogawa, S. Maeda, and T. Katayama, Laser drilling of blind via holes in aramid and glass/epoxy composites for multi-layer printed wiring boards, *Composites A* **32**, 963-968 (2001).
- [Hla 72] S.B. Hladky, and D.A. Haydon, Ion Transfer across Lipid Membranes in the Presence of Gramicidin A, *Biochim. Biophys. Acta* **274**, 294-312 (1972).
- [Hor 95] J.K. Horber, J. Mosbacher and W. Haberle, Force Microscopy on Membrane Patches: A Perspective, in *Single Channel Recording (Second Edition)*, Herausgeber: B. Sakmann and E. Neher, Plenum Verlag (1995).
- [Hu 95] W. Hu, and T.A. Cross, Tryptophan Hydrogen Bonding and Electric Dipole Moments: Functional Roles in the Gramicidin Channel and Implications for Membrane Proteins, *Biochemistry* **34**, 14147 (1995).

- [Ide 99] T. Ide, and T. Yanagida, An artificial lipid bilayer formed on an agarose-coated glass for simultaneous electrical and optical measurement of single ion channels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 595-599 (1999).
- [Ish 99] Y. Ishii, T. Yoshida, T. Funatsu, T. Wazawa, and T. Yanagida, Fluorescence resonance energy transfer between single fluorophores attached to a coil-coiled protein in aqueous solution, *Chem. Phys.* **247**, 163-13 (1999).
- [Ish 00] Y. Ishii, and T. Yanagida, Single molecule detection in life sciences, *Single Mol. bf1*, 5-16 (2000).
- [Jia 99] Y.W. Jia, D.S. Talaga, W.L. Lau, H.S.M. Lu, W.F. DeGrado, and R.M. Hochstrasser, Folding dynamics of single GCN4 peptides by fluorescence resonant energy transfer confocal microscopy, *Chem. Phys.* **247**, 69-83 (1999).
- [Kab 97] H.R. Kaback, and J. Wu, From membrane to molecule to the third amino acid to the left with a membrane transport protein, *Q. Rev. Biophys.* **30**, 333-364 (1997).
- [Kah 01] N. Kahya, E.I. Pecheur, W.P. de Boeij, D.A. Wiersma, and D. Hoekstra, Reconstitution of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles via Peptide- Induced Fusion, *Biophys. J.* **81**, 1464-1474 (2001).
- [Kas 96] J.J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, and D.W. Deamer, Characterization of individual polynucleotides molecules using a membrane channel, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**, 13770-13773 (1996).
- [Kel 00] C.A. Keller, K. Glasmästar, V.P. Zhdanov, and B. Kasemo, Formation of Supported Membranes from Vesicles, *Phys. Rev. Lett.* **84**, 5443-5446 (2000).
- [Kie 91] H. Kiefer, B. Klee, E. John, Y.D. Stierhof, and F. Jähnig, Biosensors based on membrane transport proteins, *Biosens. Bioelectron.* **6**, 233 (1991).
- [Koe 96] R.E. Koeppe, and O.S. Andersen, Engineering the gramicidin channel, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **25**, 231 (1996).

- [Koe 97] U. Koert, Synthetische Ionenkanäle, *Chemie in unserer Zeit* **31**, 20 (1997).
- [Kor 00] Y.E. Korchev, J. Gorelik, M.J. Lab, E.V. Sviderskaya, C.L. Johnston, C.R. Coombes, I. Vodyanoy, and C.R.W. Edwards, Cell Volume Measurement Using Scanning Ion Conductance Microscopy, *Biophys. J.* **78**, 451-457 (2000).
- [Lan 94] H. Lang, and C. Duschl, A New Class of Thiolipids for the Attachment of Lipid Bilayers on Gold Surfaces, *Langmuir* **10**, 197 (1994).
- [Läu 73] P. Läuger, Ion transport through pores: a rate theory analysis, *Biochim. Biophys. Acta* **311**, 423-441 (1973).
- [Läu 85] P. Läuger, Ionic Channels with conformational Substates, *Biophys. J.* **47**, 581-593 (1985).
- [Lab 98] M. Lapczynska, and M. Stuke, Rapid prototype fabrication of smooth microreactor channel systems in PMMA by VUV laser ablation at 157 nm for applications in genome analysis and biotechnology, *Mat. Res. Symp. Proc.* **526**, 143 (1998).
- [Lei 01] F.H. Lei, G.Y. Shang, M. Troyon, M. Spajer, H. Morrijani, J.F. Angiboust, and M. Manfait, Nanospectrofluorometry inside living cell by scanning near-field optical microscopy, *Appl. Phys. Lett.* **79**, 2489-2491 (2001).
- [Lev 92] R.A. Levis, and J.L. Rae, Constructing a Patch Clamp Setup, *Methods Enzymol.* **207**, 14-66 (1992).
- [Lev 93] R.A. Levis, and J.L. Rae, The use of quartz pipettes for low noise single channel recording, *Biophys. J.* **65**, 1666-1677 (1993).
- [Lev 98] R.A. Levis, and J.L. Rae, Low-noise patch-clamp techniques, *Methods Enzymol.* **293**, 218-266 (1998).
- [Lew 99] A. Lewis, A. Radko, N.B. Ami, D. Palanker, and K. Lieberman, Near-field scanning optical microscopy in cell biology, *Trends Cell Biol.* **9**, 70-72 (1999).
- [Li 01] J. Li, D. Stein, C. McMullan, D. Branton, M.J. Aziz, and J.A. Golovchenko, Ion-beam sculpting at nanometre length scales, *Nature* **412**, 166-169 (2001).

- [Lou 01] T. Lougheed, V. Borisenko, C.E. Hand, and G.A. Woolley, Fluorescent Gramicidin Derivates for Single Molecule Fluorescence and Ion Channel Measurements, *Bioconjugate Chem.* **12**, 594-602 (2001).
- [Lub 99] D.K. Lubensky, and D.R. Nelson, Driven Polymer Translocation Through a Narrow Pore, *Biophys. J.* **77**, 1824-1838 (1999).
- [Lun 99] J.A. Lundbaek, and O.S. Andersen, Spring Constants for Channel-Induced Lipid Bilayer Deformations Using Gramicidin Channels, *Biophys. J.* **76**, 889-895 (1999).
- [Mac 95] A.G. Macdonald, and P.C. Wraight, Combined Spectroscopic and Electrical Recording Techniques in Membrane Research: Prospects and Single Channel Studies, *Prog. Biophys. molec. Biol.* **63**, 1-29 (1995).
- [Mak 95] D.D. Mak, and W.W. Webb, Two Classes of Alamethicin Transmembrane Channels: Molecular Models from Single-Channel Properties, *Biophys. J.* **69**, 2323-2336 (1995).
- [Man 96] L.M. Mannuzzu, M.M. Moronne, and E.Y. Isacoff, Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating, *Science* **271**, 213-217 (1996).
- [Man 00] L.M. Mannuzzu, and E.Y. Isacoff, Independence and cooperativity in rearrangements of a potassium channel voltage sensor revealed by single subunit fluorescence, *J. Gen. Physiol.* **115**, 257-268 (2000).
- [Mao 98] R. Maoz, H. Cohen, and J. Sagiv, Specific Nonthermal Chemical Structural Transformation Induced by Microwaves in a Single Amphiphilic Bilayer Self-Assembled on Silicon, *Langmuir* **14**, 5988-5993 (1998).
- [McC 86] H. M. McConnell, T.H. Watts, R.M. Weis, and A.A. Brian, supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system, *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 864 (1986).
- [McC 94] K. McCormack, W.J. Joiner, and S.H. Heinemann, *Neuron* **12**, 301 (1994).

- [Mey 00] C. Meyer, Nano-Patch-Clamp Sonden aus Quarz, Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (2000).
- [Mil 87] C. Miller, Ion Channel Reconstitution, Plenum Press, New York (1987).
- [Mil 90] R.L. Milton, and J.H. Caldwell, How do patch clamp seals form?, *Pflügers Arch.* **416**, 758-765 (1990).
- [Mir 99] T.A. Mirzabekov, A.Y. Silberstein, and B.L. Kagan, Use of Planar Lipid Bilayer Membranes for Rapid Screening of Membrane Active Compounds, *Methods Enzymol.* **294**, 661-674 (1999).
- [Mon 72] M. Montal, A. Darszon, and H. Schindler, Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 3561-3566 (1972).
- [Moo 78] W.H. Moolenaar, and I. Spector, Ionic currents in cultured mouse neuroblastoma cells under voltage clamp conditions, *J. Physiol.* **278**, 265-286 (1978).
- [Moo 79] W.H. Moolenaar, and I. Spector, The calcium current and the activation of a slow potassium conductance in voltage-clamped mouse neuroblastoma cells, *J. Physiol.* **292**, 307-323 (1979).
- [Mül 62] P. Müller, D. Rudin, H.T. Dien, and W.C. Westcott, Reconstitution of excitable membrane structure in vitro, *Circulation* **26**, 1167-1171 (1962).
- [Mül 99] T. Müller, G. Gradl, S. Howitz, S.G. Shirley, T. Schnelle, and G. Fuhr, A 3D-micro electrode for handling and caging single cells and particles, *Biosens. Bioelectronics* **14**, 121-147 (1999).
- [Muk 94] S. Mukherjee, and A. Chattopadhyay, Restricted Tryptophan Environments at the Peptide Lipid Interface of Gramicidin Channels, *Biochemistry* **33**, 5089 (1994).
- [Mye 72] V.B. Myers, and D.A. Haydon, Ion Transfer Across Lipid Membranes in the Presence of Gramicidin A, *Biochim. Biophys. Acta* **274**, 313 (1972).



- [Nau 95] R. Naumann, A. Jonzyk, R. Kopp, J. van Esch, H. Ringsdorf, W. Knoll, and P. Gräber, Incorporation of Membrane Proteins in Solid-Supported Lipid Layers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **34**, 2056 (1995).
- [Neh 76] E. Neher, and B. Sakmann, Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres, *Nature* **260**, 799-802 (1976).
- [Neh 78a] E. Neher, J. Sandblom, and G. Eisenman, Ionic Selectivity, Saturation, and Block in Gramicidin A Channels, *J. Membrane Biol.* **40**, 97-116 (1978).
- [Neh 78b] E. Neher, B. Sakmann, and J.H. Steinbach, The Extracellular Patch Clamp: A Method for Resolving Currents through Individual Open Channels in Biological Membranes, *Pflügers Arch.* **375**, 219 (1978).
- [Neh 92a] E. Neher, and B. Sakmann, The Patch Clamp Technique, *Sci. Am.*, **226**, 28 (1992).
- [Neh 92b] E. Neher, Ion Channels for Communication Between in Within Cells, *Science* **256**, 498 (1992).
- [Nik 98] D.P. Nikolelis, C.G. Siontorou, U.J. Krull, and P.L. Katrivanos, Ammonium ion Minisensors from Self-Assembled Bilayer Lipid Membranes Using Gramicidin as an Ionophore, *Anal. Chem.* **68**, 1735 (1998).
- [Nel 80] N. Nelson, R. Anholt, J. Lindstrom, and M. Montal, Reconstitution of purified acetylcholine receptors with functional ion channels in planar lipid bilayers, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **77**, 3057 (1980).
- [Num 96] M. Numberger, and A. Draguhn, *Patch-Clamp-Technik*, Spektrum Verlag, Heidelberg (1996).
- [O'Co 90] A.M. O'Connell, R.E. Koeppe, and O.S. Andersen, Kinetics of gramicidin channel formation in lipid bilayers: transmembrane monomer association, *Science* **250**, 1256-1259 (1990).

- [Ops 94] L.R. Opsahl, and W.W. Webb, Lipid-Glass Adhesion in Giga-sealed Patch-clamped Membranes, *Biophysical Journal*, **66**, 75 (1994).
- [Ott 93] D. Ottenbacher, F. Jähnig, and W. Göpel, A prototype biosensor based on transport proteins: electrical transducers applied to lactose permease, *Sens. Act. B* **13-14**, 173 (1993).
- [Ott 96] A. Ottova-Leitmannova, V. Tvarozek, T. Hianik, T.A. Zhou, W. Ziegler, and H.T. Tien, Self-assembled and Supported BLMs as an Adaptive Material for Biotechnology, *SPIE Proc.* **27**, 1 (1996).
- [Ott 97] A. Ottova, V. Tvarozek, J. Racek, J. Sabo, W. Ziegler, H. Hianik, and H.T. Tien, Self-assembled BLMs: biomembrane models and biosensor applications, *Supramol. Sci.* **4**, 101 (1997).
- [Par 99] W.J. Parak, J. Domke, M. George, A. Kardinal, M. Radmacher, H.E. Gaub, A.D.G. de Roos, A.P.R. Theuvenet, G. Wiegand, E. Sackmann, and J.C. Behrends, Electrically Excitable Normal Rat Kidney Fibroblasts: A New Model System for Cell-Semiconductor Hybrids, *Biophys. J.* **76**, 1659-1667 (1999).
- [Par 69] A. Parsegian, Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: solutions to four relevant electrostatic problems, *Nature* **221**, 844-846 (1969).
- [Pro 95] L.L. Providence, O.S. Andersen, D.V. Greathouse, R.E. Koeppe, and R. Bittmann, Gramicidin Channel Function Does not Depend on Phospholipid Chirality, *Biochemistry* **34**, 16404 (1995).
- [Pus 88] M. Pusch, and E. Neher, Rates of diffusional exchange between small cells and measuring patch pipette, *Pflügers Arch.* **411**, 204 (1988).
- [Puu 95] G. Puu, I. Gustafson, E. Artursson, and P.A. Ohlsson, Retained activities of some membrane proteins in stable lipid bilayers on a solid support, *Biosens. Bioelectron.* **10**, 463 (1995).
- [Rad 92] M. Radmacher, R.W. Tillmann, M. Fritz, and H.E. Gaub, From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope, *Science* **257**, 1900-1905 (1992).

- [Rae 92a] J.L. Rae, and R.A. Levis, Glass Technology for Patch Clamp Electrodes, *Methods in Enzymol.* **207**, 66-92 (1992).
- [Rae 92b] J.L. Rae, and R.A. Levis, A method for exceptionally low noise single channel recordings, *Pflügers Arch.* **420**, 618-620 (1992).
- [Ran 98] P. Rangsten, Etch rates of crystallographic planes in z-cut quartz- experiments and theory, *J. Micromech. Microeng.* **8**, 1-14 (1998).
- [Row 95] C. Rowan, Excimer laser drill precise holes with higher yield, *Laser Focus World* **8**, 81 (1995)
- [Ruk 91] A. Ruknudin, M.J. Song, and F. Sachs, The Ultrastructure of Patch-Clamped Membranes: A Study Using High Voltage Electron Microscopy, *The Journal of Cell Biology* **112**, 125 (1991).
- [Sac 96] E. Sackmann, Supported Membranes: scientific and practical applications, *Science* **271**, 43-48 (1996).
- [Sak 95a] B. Sakmann, and E. Neher, Geometric Parameters of Pipettes and Membrane Patches, in *Single Channel Recording (Second Edition)*, Herausgeber: B. Sakmann and E. Neher, Plenum Verlag (1995).
- [Sak 95b] B. Sakmann, and E. Neher, *Single Channel Recording*, Plenum Press, New York (1995).
- [San 98] M.S.P. Sansom, Models and simulation of ion channels and related membrane proteins, *Struct. Biol.* **8**, 237 (1998).
- [San 00] M.S.P. Sansom, Potassium Channels: watching a voltage-sensor tilt and twist, *Curr. Biol.* **10**, 206-209 (2000).
- [Sas 95] I. Sase, H. Miyata, J.E.T. Corrie, J.S. Craik, and K. Kinosita, Real time imaging of single fluorophores on moving actin with an epifluorescence microscope, *Biophys. J.* **69**, 323-328 (1995).
- [Sch 80] H. Schindler, and U. Quast, Functional acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata* in planar membranes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **77**, 3052 (1980).

- [Sch 96] T. Schmidt, G.J. Schütz, W. Baumgartner, H.J. Gruber, and H. Schindler, Imaging of single molecule diffusion, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**, 2926-2929 (1996).
- [Sch 97] G.J. Schütz, H. Schindler, and Th. Schmidt, Single molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion, *Biophys. J.* **73**, 1073-1080 (1997).
- [Sch 98] G.J. Schütz, W. Trabesinger, and T. Schmidt, Direct observation of ligand colocalization of individual receptor molecules, *Biophys. J.* **74**, 2223-2226 (1998).
- [Schm 98] H. Schmidt, J. Ihlemann, B. Wolff-Rottke, K. Luther, and J. Troe, Ultraviolet laser ablation of polymers: spot size, pulse duration and plume attenuation effects explained, *J. Appl. Phys.* **83**, 5458 (1998).
- [Schm 00] C. Schmidt, M. Mayer, and J. Vogel, A Chip-Based Biosensor for the Functional Analysis of Single Ion Channels, *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 3137-3140 (2000).
- [Sch 00a] G.J. Schütz, V.Ph. Pastushenko, H.J. Gruber, H.G. Knaus, B. Pragl, and H. Schindler, 3D Imaging of Individual Ion Channels in Live Cells at 40 nm Resolution, *Single Mol.* **1**, 25-31 (2000).
- [Sch 00b] G.J. Schütz, M. Sonnleitner, P. Hinterdorfer, and H. Schindler, Single Molecule Microscopy of Biomembranes (review), *Mol. Membr. Biol.* **17**, 17-29 (2000).
- [Sei 56] F. Seitz, and J.S. Koehler, *Solid State Phys.* **2**, 305 (1956).
- [She 93] R. Sherman-Gold, *The Axon Guide for Electrophysiology and Biophysics Laboratory Techniques*, Axon Instruments Inc. (1993).
- [Sig 87] F. Sigworth, D.W. Urry, and K.U. Prasad, Open channel noise III, *Biophys. J.* **52**, 1055-1064 (1987).
- [Sig 95] F.J. Sigworth, *Electronic Design of the Patch Clamp*, in 'Single Channel Recording', Plenum Press, New York (1995).
- [Sne 69] I.M. Snell, Some electrical Properties of fine-tipped pipette microelectrodes, in *Glass Microelectrodes*, Herausgeber M. Lavallee, O.F. Schanne and M.C. Herbert, John Wiley & Sons (1969).

- [Sob 02] C. Sobotta, Stochastische Resonanz in Ionenkanälen, Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (2002).
- [Sok 91] M. Sokabe, F. Sachs, and Z. Jing, Quantitative video microscopy of patch clamped membranes stress, strain, capacitance and stretch channel activation, *Biophys. J.* **59**, 722-728 (1991).
- [Son 96] L. Song, Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore, *Science* **274**, 1859-1865 (1996).
- [Son 99] M. Sonnleitner, G.J. Schütz, and Th. Schmidt, Free Brownian Motion of Individual Lipid Molecules in Biomembranes, *Biophys. J.* **77**, 2638-2642 (1999).
- [Son 00] A. Sonnleitner, L. Mannuzzu, D. Chemla, S. Weiss, and E. Isa-coff, Single molecule imaging and fluorescent correlation spectroscopy as tools for the study of S4 movement in single Shaker K<sup>+</sup> channels, *Biophys. J.* **78**, 2775Pos.
- [Spi 93] J. Spinke, M Liley, H.J. Guder, L. Angermair, and W. Knoll, Molecular Recognition at Self-Assembled Monolayers: The Construction of Multicomponent Multilayers, *Langmuir* **9**, 1821 (1993).
- [Spo 90] R. Spohr, Ion tracks and microtechnology, Vieweg, Braunschweig (1990).
- [Spo 96] K. Hjort, G. Thornell, and J.A. Schweitz, Quartz micromachining by lithographic control of ion track etching, *Appl. Phys. Lett.* **69**, 3435-3436 (1996).
- [Stü 89] W. Stühmer, F. Conti, H. Suzuki, X. Wang, M. Noda, N. Yahagi, H. Kubo, and S. Numa, Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel, *Nature* **339**, 597-603 (1989).
- [Tan 83] D.W. Tank, R.L. Huganir, P. Greengard, and W.W. Webb, Patch-recorded single-channel currents of the purified and reconstituted Torpedo acetylcholine receptor, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **80**, 5129 (1983).
- [Tie 90] H.T. Tien, Self-Assembled Lipid Bilayers for Biosensors and Molecular Electronic Devices, *Adv. Mat.* **2**, 316 (1990).

- [Tra 94] J.K. Trautmann, J.J. Macklin, L.E. Brus, and E. Betzig, *Nature* **369**, 40 (1994).
- [Tra 99] C. Trautmann, Modifications induced by swift heavy ions, *Bull. Mater. Sci.* **22**, 679-686 (1999).
- [Tou 90] M. Toulemonde, Damage induced by high electronic stopping power in SiO<sub>2</sub> quartz, *Nuc. Inst. and Meth. In Phys. Res. B* **46**, 64-68 (1990).
- [Tou 98] M. Toulemonde, and F. Studer, Nanometric amorphization of oxide material under dense electronic excitation: swift heavy ion irradiation, *Key Eng. Mat.* **155-156**, 267-300 (1998).
- [Tsu 00] T. Tsuihara, and H. Aoyama, Membrane protein assemblies-towards atomic resolution analysis, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 208-212 (2000).
- [Ung 00] M.A. Unger, H.P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, and S.R. Quake, Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography, *Science* **288**, 113-116 (2000).
- [Unw 93] N. Unwin, Nicotinic Acetylcholine Receptor at 9 Å Resolution, *J. Mol. Biol.* **229**, 1101 (1993).
- [Unw 95] P.N.T. Unwin, Acetylcholine receptor channel imaged in the open state, *Nature* **373**, 37 (1995).
- [Urb 78] B.W. Urban, S.B. Hladky, and D.A. Haydon, The kinetics of ion movements in the gramicidin channel, *Fed. Proc.* **37**, 2628 (1978).
- [Urb 80] B.W. Urban, S.B. Hladky, and D.A. Haydon, Ion Movements in Gramicidin Pores: An Example of Single-File Transport, *Biochim. Biophys. Acta* **602**, 331-354 (1980).
- [Urr 82] D. W. Urry, T.L. Trapane, J.T. Walker, and K.U. Prasad, On the relative Lipid Membrane Permeability of Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>, *J. Biol. Chem.* **257**, 6659 (1982).
- [Van 94] B.W. Van Der Meer, G. Coker, and S.Y. Chen, *Resonance Energy Transfer Theory and Data*, VCH, New York (1994).

- [Van 97] N.F. van Hulst, M.F. Garcia-Parajo, M.H.P. Moers, J.A. Veerman, and A.G.T. Ruiter, Near-field fluorescence imaging of generic material: towards the molecular limit, *J. Struct. Biol.* **119**, 222-231 (1997).
- [Van 94] N. Van Mau, B. Bonnet, A. Benanyad, and F. Heitz, The conformation of linear gramicidin is sequence dependent. A monolayer and infrared study, *Eur. Biophys. J.* **22**, 447 (1994).
- [Vea 75] W.R. Veatch, R. Mathies, M. Eisenberg, and L. Stryer, Simultaneous fluorescence and conductance studies of planar lipid membranes containing a highly active and fluorescent analogue of gramicidin A, *J. Mol. Biol.* **99**, 75-92 (1975).
- [Von 83] J.K. Vondeling, Fluoride-based etchants for quartz, *J. Mat. Sci.* **18**, 304-314 (1983).
- [Wag 00] M.L. Wagner, and L.K. Tamm, Tethered polymer-supported planar lipid bilayers for reconstitution of integral membrane proteins: silane-polyethylenglycol-lipid as a cushion and covalent linker, *Biophys. J.* **79**, 1400-1414 (2000).
- [Wat 95] A. Watts, A.S. Ulrich, and D.A. Middleton, Membrane protein structure: the contribution and potential of novel solid-state NMR approaches, *Mol. Membr. Biol.* **12**, 233-246 (1995).
- [Wei 96] R. Weis, B. Müller, and P. Fromherz, Neuron adhesion on a silicon chip probed by an array of field-effect transistors, *Phys. Rev. Lett.*, **76**, 327 (1997).
- [Wei 99] S. Weiss, Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules, *Science* **283**, 1676-1683 (1999).
- [Whi 72] S.H. White, The physical nature of planar bilayer membranes, *Biophys. J.* **12**, 432 (1972).
- [Wid 00] J. Widengren, and P. Schwille, Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy, *J. Phys. Chem. A* **104**, 6416-6428 (2000).

- [Wie 95] K. Wiesenfeld, and F. Moss, Stochastic resonance and the benefits of noise: from ice ages to crayfish and SQUIDS, *Nature* **373**, 33-36 (1995).
- [Won 90] W. Wonderlin, A. Finkel, and R. French, Optimizing planar lipid bilayer single-channel recording for high resolution with rapid voltage steps, *Biophys. J.* **58**, 289-297 (1990).
- [Woo 92] G.A. Woolley, and B.A. Wallace, Model ion channels: gramicidin and alamethicin, *J. Membr. Biol.* **129(2)**, 109-136 (1992).
- [Xia 98] Y.N. Xia, and G.M. Whitesides, Soft Lithography, *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 550-569 (1998).
- [Xu 01] J. Xu, X. Wang, B. Ensign, M. Li, L. Wu, A. Guia, and J. Xu, Ion-channel assay technologies: quo vadis?, *Drug Discovery Today* **6**, 1278-1287 (2001).
- [Yin 00] L.M. Ying, M.I. Wallace, S. Balasubramanian, and D. Klenerman, Ratiometric analysis of single-molecule fluorescence resonant energy transfer using logical combinations of threshold criteria: A study of 12-mer DNA, *J. Phys. Chem.* **104**, 5171-5178 (2000).
- [Zha 01] P.C. Zhang, A.M. Keleshian, and F. Sachs, Voltage-induced membrane movement, *Nature* **413**, 428-432 (2001).
- [Zho 98] X.B. Zhou, J. Schlossmann, F. Hofmann, P. Ruth, and M. Korth, Regulation of stably expressed and native BK channels from human myometrium by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase, *Pflügers Arch.* **436**, 725-734 (1998).
- [Zie 85] J.F. Ziegler, J.P. Biersac, and U Littmark, *The Stopping and Ranges of Ions in Solids*, Pergamon Press, New York (1985).



## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren hinsichtlich meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. J. P. Kotthaus, der durch zahlreiche Diskussionen und sein Interesse wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.
- Prof. G. Ten Bruggencate für die Möglichkeit Experimente an seinem Lehrstuhl durchzuführen.
- Robert Blick und Jan Behrends für die exzellente Betreuung, die stete Bereitschaft zur Unterstützung und die ausgesprochen gute Zusammenarbeit auch ausserhalb des universitären Rahmens.
- Armin Kriele, Klaus Wehrhahn, Stefan Manus und Franz Rucker für die kompetente fachliche und technische Unterstützung.
- Monika Kämpfe für ihre ständige Hilfsbereitschaft und das immer wiederkehrende Umformatieren einer Vielzahl von Posterdateien.
- Der Materialforschungsgruppe der Gesellschaft für Schwerionenforschung in Darmstadt, insbesondere Christina Trautmann, für die hervorragende Kooperation hinsichtlich der Bestrahlung von Proben mit schweren Ionen.
- Prof. E. Sackmann (TU München) und Prof. R. Benz (Universität Würzburg) und deren Lehrstuhlmitgliedern für die freundliche Einführung in das Arbeiten mit Lipiden.
- Prof. A. Woolley (University of Toronto) und Dr. Gerd Schütz (Universität Linz) für die fantastische Zusammenarbeit bei den kombinierten optisch-elektrischen Einzelmolekülmessungen.
- allen Mitgliedern des Lehrstuhls für die gute Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima.
- Meinen Eltern für die andauernde moralische und allgemeine Un-

terstützung während dieser Arbeit.

- Katja für die wunderbare Zeit in München.

Ich versichere, daß ich diese Arbeit selbständig angefertigt und keine weiteren Hilfsmittel, außer den von mir angegebenen, verwendet habe.

München, den 6. April 2002,

.....

Niels Fertig

## Lebenslauf

von

Niels Fertig

Geburtstag/-ort: 22.12.1972 in Hamburg

1979 - 1982 Grundschule in Tangstedt (Hamburg)

1982 - 1985 Grundschule und Orientierungsstufe in Seesen

1985 - 1992 Gymnasium in Seesen; Abiturnote: 1,2

07.92 - 09.93 Zivildienst im Universitätsklinikum Göttingen

10.93 - 08.95 Studium der Physik an der Georg-August-Universität in Göttingen

09.95 - 10.96 Studium an der University of California in San Diego

11.96 - 06.99 Studium der Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München

03.97 - 03.02 Stipendiat der Studienstiftung des dt. Volkes

06.98 - 06.99 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Halbleiterphysik

09.99 - 07.02 Promotion am Center for NanoScience, München