

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Patch-clamping mit Mikroöffnungen in Polyimide-Folien

Alfred Stett^{*,§}, Volker Bucher^{*}, Claus Burkhardt^{*}, Thomas Müller[#], Wilfried Nisch^{*}

^{*,§} NMI Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen

Markwiesenstr. 55, 72770 Reutlingen, Tel. +49 7121 51530 70, Fax +49 7121 51530 16;

Email: stett@nmi.de www.nmi.de

[#]BAYER AG, Leverkusen, Germany

Registriernummer der Online-Anmeldung: 173

Poster

Die Patchclamp-Technik ist die aussagekräftigste Methode zur Untersuchung der Funktion und Regulation von Ionenkanälen [1]. Sie basiert auf der Bildung eines engen Kontaktes zwischen der Spitze einer Glasspipette und der Membran einer Zelle, an die die Pipette herangeführt wird. Aus dem engen Kontakt resultiert ein elektrischer Widerstand im Gigaohm-Bereich zwischen der Elektrolytlösung im Innern der Pipette und der die Zelle und Pipette umgebenden Elektrolytlösung. Trotz der weitverbreiteten Verwendung dieser Methode ist die wahre Natur dieses Kontaktes und der resultierenden hochohmigen „Seal“-Bildung noch immer nicht im Detail verstanden. Zudem ist die Patchclamp-Methode zweitaufwendig und erfordert erfahrene Anwender sowie gutausgerüstete Setups. Im Moment ist noch keine Vorrichtung beschrieben, die diesen „Cell-by-cell“-Assay vollautomatisch durchführt. Dies ist jedoch die Voraussetzung für Automatisierung, Miniaturisierung und Parallelisierung, um mit dieser Methode Hochdurchsatz-Untersuchungen von pharmazeutischen Substanzen durchführen zu können.

Mehrere Gruppen berichten über einen Ansatz, der die Glasspipette durch eine mikromechanisch gefertigte Siliziumstruktur ersetzen soll [2, 3]. Sie verwenden ein dünnes Diaphragma, in das ein mikroskopisch kleines Loch (Durchmesser im Nano- und Mikrometer-Bereich) eingebracht ist. Darauf werden Lipidvesikel aufgebracht, die per Adhäsion die Umgebung der Mikroöffnung hochohmig abdichten. Mit dieser Methode lassen sich Einzelkanalströme messen [3].

In einem ähnlichen Ansatz untersuchten wir, ob mit einem Mikroloch in einer Polyimidfolie Patchclamp-Messungen an natürlichen Zellen durchführbar sind. Mit einem fokussierten Ionenstrahl brachten wir in Folien mit einer Dicke von 6 μm singuläre Öffnungen mit einem Durchmesser zwischen 1 und 2 μm ein. Darauf wurden dissoziierte Purkinjezellen aus Schafherzen positioniert und mit Unterdruck angesaugt, um den Sealwiderstand zu erhöhen.

Strom/Spannungsmessungen zwischen den Elektrolytlösungen beiderseits der Folie ergaben mit 2- μm -Öffnungen einen mittleren Sealwiderstand von 25 M Ω (n = 55). Mit diesen Loose-Patch-Kontakten konnten wir Membranströme und Aktionspotentiale ableiten (n=18). In wenigen Fällen gelangen Gigaseals (n=4), einmal konnten intrazelluläre Ableitungen durchgeführt werden. Dies ist das erste mal, daß über „Whole-Cell“-Patchclamp-Ableitungen an natürlichen Zellen ohne Verwendung einer Glaspipette berichtet wird.

Der überraschend kleine Sealwiderstand ist in guter Übereinstimmung mit theoretischen Betrachtungen über die elektrische Natur des durch Adhäsion vermittelten Kontaktes zwischen Zellmembranen und planaren Substraten. Ein analytisches Modell sagt Widerstände bis zu 200 M Ω voraus, in Abhängigkeit von der Dicke der Elektrolytschicht im Kontaktspace.

Wir kommen zu der Schlußfolgerung, daß dieser einfache Ansatz der Einzelzelleableitung für automatisierte Loose-Patch-Ableitungen an suspendierten Zellen geeignet ist. Aufgrund der kleinen sich einstellenden Sealwiderstände wird sich diese Methode jedoch nur schwer für intrazelluläre Ableitungen mit hohem Durchsatz umsetzen lassen.

Literatur

- [1] Hamil, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., und Sigworth, F.J. (1981). *Pflügers Archiv*, **406**
- [2] Fertig, N., Meyer, C., Tilke, A., Blick, R., und Behrends, J. (2000) *European Biophysics Journal*, **29**, 4-5 (Abstract)
- [3] Schmidt, C., Mayer, M., und Vogel, H. (2000) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**