

Ein rekombinanter Serotonin-Rezeptor auf einem Transistor als Prototyp für zellbasierte Biosensoren**

Ingmar Peitz, Moritz Voelker und Peter Fromherz*

Eines der Ziele der Biotechnologie ist es, die hohe Spezifität biochemischer Rezeptoren mit der universellen Mikroelektronik zu kombinieren, um selektive Sonden für Diagnostik, Wirkstoffsuche und Toxindetektion zu entwickeln.^[1] Zahlreiche Rezeptoren sind direkt oder über G-Proteine an Ionenkanäle in der Zellmembran gekoppelt. Üblicherweise wird der Ionenstrom nach Aktivierung mit klassischer oder mit planarer Patch-Clamp-Technik gemessen, wodurch die Zellen aber beschädigt werden.^[2-6] Wir möchten zeigen, dass nichtinvasive Rezeptor-Zell-Transistor(RCT)-Sensoren eine Alternative zu diesem Vorgehen bieten.^[7] Dabei wird der Ionenstrom eines rekombinanten Rezeptors über einen Zell-Transistor-Kontakt direkt an ein mikroelektronisches Bauelement gekoppelt (Abbildung 1a). Sobald Ionenkanäle durch einen Agonisten geöffnet werden, fließt ein Ionenstrom entlang des engen Spalts zwischen Zelle und Transistor in die Zelle. Dadurch wird eine extrazelluläre Spannung V_J auf dem Transistor erzeugt, die den elektronischen Source-Drain-Strom moduliert.^[8,9]

In unseren Experimenten verwendeten wir den ionotropen Serotonin-Rezeptor 5-HT3A, der in HEK293-Zellen überexprimiert wird. Serotonin-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle im peripheren und zentralen Nervensystem.^[10,11] Spezifische Blocker werden klinisch eingesetzt, um chemotherapieinduzierte Übelkeit zu unterdrücken und Reizdarmbeschwerden zu behandeln.^[12] Verschiedene 5-HT3-Untereinheiten können coexprimiert werden und bilden Heteropentamere.^[13] Die A-Untereinheit ist in der Lage, allein einen homopentameren 5-HT3A-Rezeptor mit einem kationenselektiven Kanal und mit Serotonin-Bindungsstellen in der extrazellulären Domäne aufzubauen.^[12-14]

Zur physikalisch-chemischen Charakterisierung der Rezeptor-Transistor-Kopplung in der vorliegende Studie führten wir zwei Randbedingungen ein (Abbildung 1a): Wir hielten die Agonistenkonzentration c_A mit einer Θ -Kapillare und die intrazelluläre Spannung V_M mit einer Patch-Pipette (in Ganzzell-Konfiguration) konstant. Um den ligandengesteuerten Kanal zu testen, muss ein ziemlich geringer Mem-

branstrom detektiert werden, ohne dass über wiederholte Signale gemittelt werden kann. Dieses Problem lösten wir mit einem Elektrolyt-Oxid-Halbleiter-Transistor (electrolyte-oxide semiconductor transistor, EOS-Transistor) in einem „Buried-channel“-Aufbau mit geringem Rauschen.^[15]

Ein Siliciumchip mit HEK293-Zellen auf einem linearen Array von EOS-Transistoren ist in Abbildung 1 b dargestellt. Die Zellen wurden für 24 Stunden auf Fibronektin kultiviert. Nach Applikation eines extrazellulären Messpuffers wurde eine Zelle, die das Gate eines Transistors bedeckt, mit einer Patch-Pipette kontaktiert. Der Transistor wird mit Spannungsimpulsen an einer Ag/AgCl-Elektrode im Bad kalibriert. Wir hielten die intrazelluläre Spannung bei -120 mV und applizierten das Serotonin (100 μ M in Messpuffer) mit

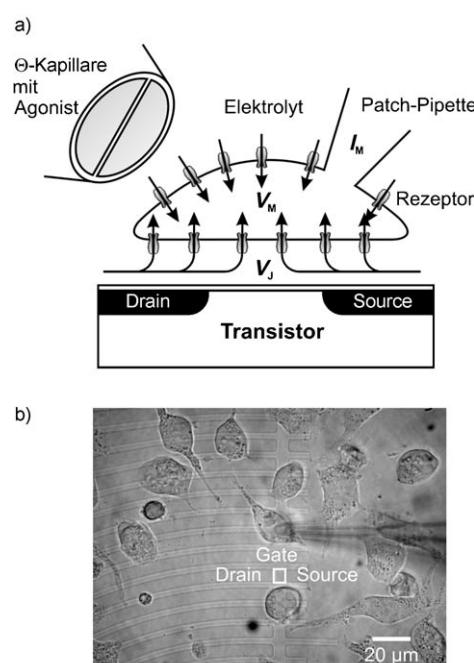


Abbildung 1. RCT-Biosensor mit ligandengesteuertem Ionenkanal.

a) Schematischer Querschnitt (nicht maßstabsgetreu). Eine Zelle mit etwa 20 μ m Durchmesser ist vom offenen Gate eines Feldeffekttransistors durch einen nur 50 nm breiten Spalt mit extrazellulärem Elektrolyten getrennt. Ein Agonist wird mit einer Θ -Kapillare appliziert. Der Ionenstrom durch offene Kanäle in der adhärierten Membran verursacht im Zell-Transistor-Kontaktbereich eine extrazelluläre Spannung V_J , die den Source-Drain-Strom moduliert. Eine Patch-Pipette hält die intrazelluläre Spannung V_M konstant und misst den Ionenstrom I_M durch die gesamte Zellmembran. b) HEK293-Zellen mit dem Serotonin-Rezeptor 5-HT3A auf einem linearen Array von Transistoren mit geringem Rauschen. Für einen Transistor sind die Zuleitungen von Source und Drain angedeutet, und der Gate-Bereich ist mit einem weißen Rahmen markiert. Eine Zelle ist mit einer Patch-Pipette kontaktiert.

[*] Dr. I. Peitz, Dr. M. Voelker, Prof. Dr. P. Fromherz
Abteilung Membran- und Neurophysik
Max-Planck-Institut für Biochemie
82152 Martinsried/München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-8578-2822
E-Mail: fromherz@biochem.mpg.de

[**] Das Projekt wurde durch das IST-Programm der Europäischen Union (NaChip-Projekt) gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

einem Flüssigkeitsaustauschsystem. Abbildung 2a und 2b zeigen für zwei Zellen transiente Signale von 10 nA für den Ganzzellstrom, die eine Öffnung und Desensitivierung von etwa 80000 5-HT3A-Rezeptoren bei einer Einzelkanalaktivität von 1 pS anzeigen.^[16,17] Gleichzeitig beobachteten wir transiente Signale der Transistorspannung um 1 mV. Die Signalformen sind für Transistorspannung und Ganzzellstrom ähnlich. Wenn wir die Serotonininkonzentration von 100 auf 5 μ M (Abbildung 2a) oder die Hyperpolarisation der Zelle von -120 auf -100 und -80 mV (Abbildung 2b) verringerten, wurden sowohl Pipettenstrom als auch Transistorspannung kleiner. Mit einer serotoninfreien Lösung beobachteten wir keine Signale.

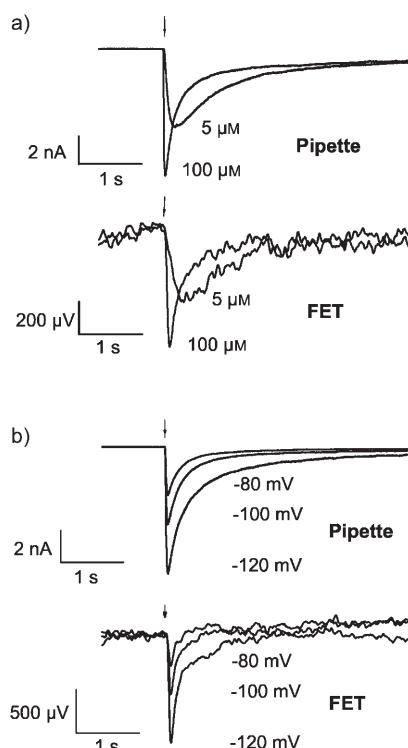


Abbildung 2. Ganzzellstrom (Pipette) und Transistorspannung (FET) nach Applikation von Serotonin (Pfeile) bei konstanter intrazellulärer Spannung ohne Signalmittelung. a) Intrazelluläre Spannung $V_M = -120$ mV. Applikation von zwei unterschiedlichen Serotonin-Konzentrationen. b) Applikation einer Serotonin-Konzentration von 100 μ M bei drei unterschiedlichen intrazellulären Spannungen.

Durch Messungen bei unterschiedlichen Serotonininkonzentrationen erhielten wir Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Pipettenstrom und Transistorspannung. Allerdings mussten wir dabei wegen der begrenzten Lebensdauer der Ganzzellkontakte Daten von verschiedenen Zellen kombinieren. Für jede Zelle maßen wir die maximale Antwort bei einer bestimmten Konzentration und normierten sie auf die maximale Antwort bei 100 μ M Serotonin, wenn alle Kanäle offen sind. Die normierten Amplituden von Transistorspannung und Pipettenstrom sind in Abbildung 3a gegeneinander und in Abbildung 3b gegen die Serotonininkonzentration aufgetragen. Die Signale sind perfekt proportional zueinander. Die

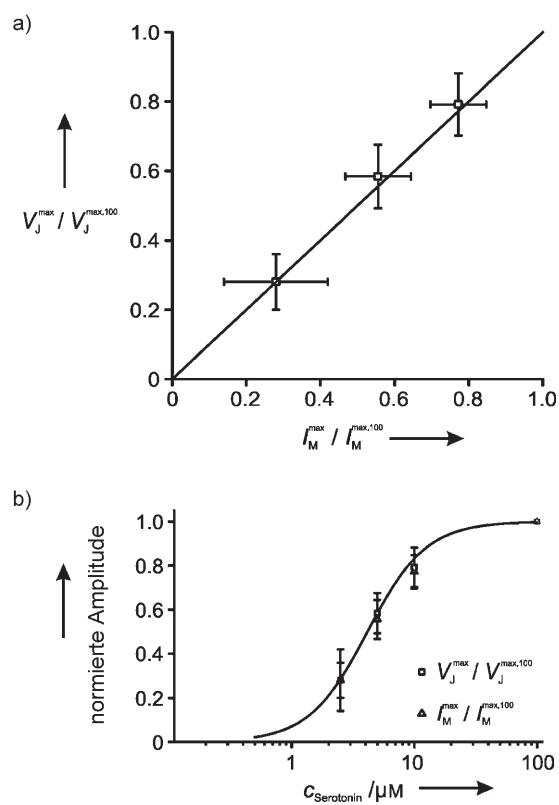


Abbildung 3. Dosis-Wirkungs-Beziehung. a) Amplitude des Transistorsignals V_J gegen Amplitude des Membranstroms I_M bei drei Serotonin-Konzentrationen, normiert auf die Amplitude bei einer Konzentration von 100 μ M (fünf Messungen bei jeder Konzentration). b) Normierte Amplitude des Transistorsignals und normierte Amplitude des Ganzzellstroms gegen die Serotonin-Konzentration. Die durchgezogene Linie ist eine Isotherme mit einer Konzentration von 4.2 μ M für die halbmaximale Kanalaktivierung bei einem Hill-Koeffizienten von 1.8, die in einem separaten Patch-Clamp-Experiment bestimmt wurde.

Dosis-Wirkungs-Beziehung stimmt mit einer Isotherme überein, die aus separaten Patch-Clamp-Messungen ermittelt wurde, und mit einer Konzentration von 4.2 μ M für die halbmaximale Kanalaktivierung sowie mit einem Hill-Koeffizienten von 1.8. Diese Parameter liegen nahe den publizierten Werten von 3.4 μ M bzw. 1.8.^[17]

Die Experimente zeigen, dass ein EOS-Transistor die Aktivierung von 5-HT3A-Rezeptoren detektieren und den Ionenstrom von aktivierte Kanälen analog zu einer Patch-Pipette messen kann. Zwei besondere Aspekte der Methode müssen allerdings in Betracht gezogen werden: 1) Das Transistorignal wird durch den Ionenstrom über die adhäsirende Membran erzeugt, wohingegen das Pipettensignal vom Ionenstrom durch die gesamte Zellmembran herrührt. 2) Das Spannungssignal des Transistors enthält einen Skalierungsfaktor für den Strom, der durch den elektrischen Widerstand des Zell-Transistor-Kontaktes bestimmt wird. Im Folgenden betrachten wir das zeitliche Erscheinen und die Korrelation von Transistorignal und Pipettensignal genauer.

Abbildung 4a zeigt den Verlauf der Transistorspannung $V_J(t)$ und des Pipettenstroms $I_M(t)$ im selben Diagramm. Das Transistorignal erscheint in diesem Experiment deutlich verzögert (um etwa 70 ms). Dieser Effekt ist noch besser in

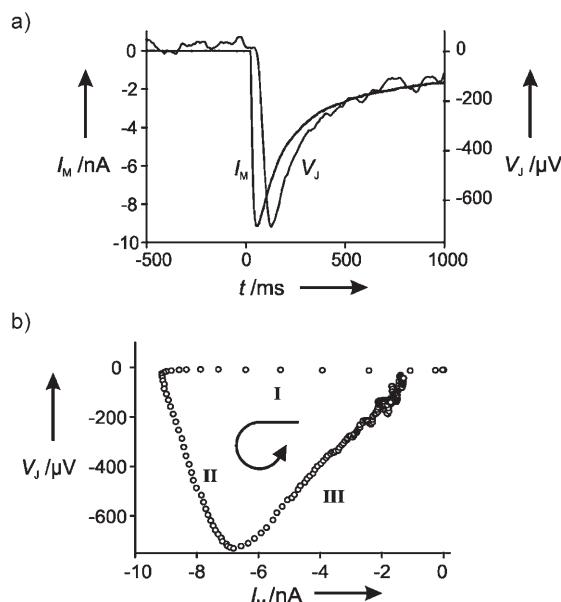


Abbildung 4. Verzögerung zwischen Transistorsignal und Ganzzellstrom. a) Transistorsignal $V_j(t)$ und Pipettensignal $I_M(t)$ gegen die Zeit bei einer intrazellulären Spannung von -120 mV und einer Serotonin-Konzentration von 100 µM. b) Transistorsignal $V_j(t)$ gegen Pipettensignal $I_M(t)$ mit drei Phasen: I) steigender Ganzzellstrom ohne Transistorsignal, II) steigendes Transistorsignal und fallender Ganzzellstrom, III) Abfall von Ganzzellstrom und Transistorsignal. Der Verlauf der Messung ist mit einem Pfeil markiert (Gesamtzeit 5 s, Intervalle 2.5 ms).

Abbildung 4b zu erkennen, in der $V_j(t)$ gegen $I_M(t)$ aufgetragen ist. Der Durchschnitt der Verzögerung in 16 Experimenten beträgt 40 ms. Wir können drei Phasen unterscheiden: I) Das Pipettensignal steigt an ohne ein Transistorsignal. II) Das Pipettensignal fällt ab bei gleichzeitig ansteigendem Transistorsignal. III) Pipettensignal und Transistorsignal fallen ab. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Rezeptoren in der adhärierten Membran, verglichen mit den Rezeptoren in der freien Membran, mit einer Verzögerung aktiviert werden.

Im Bereich der Zelladhäsion kann die Serotonin-Konzentration erst nach Diffusion in den Spalt zwischen Zelle und Transistor ansteigen. Für eine Abschätzung betrachten wir einen kreisförmigen Zell-Transistor-Kontakt mit einem Radius a_j und einem engen extrazellulären Spalt von etwa 50 nm.^[18] Nach einem Konzentrationsprung im Bad wird das Konzentrationsprofil im Kontaktbereich durch eine unendliche Reihe von Exponentialfunktionen beschrieben.^[19] Die Zeitkonstante der langsamsten Komponente – welche die zentrale Region der Adhäsion dominiert – beträgt dabei $a_j^2/5.783 D_A$ mit dem Diffusionskoeffizienten D_A und der ersten Nullstelle $\sqrt{5.783}$ der Bessel-Funktion J_0 . Für einen Radius von 10–15 µm und einen Diffusionskoeffizienten von 10^{-5} cm²s⁻¹ erhalten wir eine Zeitkonstante von 20–40 ms, die im Bereich der beobachteten Verzögerungen liegt. Der verbleibende Unterschied kann durch einen verringerten Diffusionskoeffizienten im engen Extrazellulärraum verursacht werden.^[20]

Zwei Aspekte der verzögerten Aktivierung von Rezeptoren im Zell-Transistor-Kontakt sind in Bezug auf RCT-

Biosensoren wichtig: 1) Die Verzögerung beeinträchtigt die Dosis-Wirkungs-Beziehung nicht, wie Abbildung 3 zeigt. 2) Die Verzögerung führt zu einem Unterschied der Ionenleitfähigkeit in der adhärierten und der freien Membran, was eine Voraussetzung für Transistormessungen ohne Patch-Pipette ist, um die Kompensation von ionischen und kapazitiven Strömen zu vermeiden.^[7,8] Eine strukturelle Polarität mit einer Anreicherung oder Verarmung von Ionenkanälen wird also nicht benötigt.

Der Ionenstrom I_{JM} durch die adhärierte Membran wird durch den Widerstand des Zell-Transistor-Kontaktes in eine extrazelluläre Spannung $V_j = (r_j/\eta_j)I_{JM}$ übersetzt, wobei r_j den Schichtwiderstand des Extrazellulärraums zwischen Zelle und Transistor bezeichnet und η_j die Position des Transistors berücksichtigt.^[9] Wir nehmen an, dass die Ströme durch die adhärierte und die gesamte Membran proportional sind zu den Membranflächen, ausgedrückt durch die Beziehung $I_{JM}/I_M = A_{JM}/A_M$. Wir erhalten so Gleichung (1), in der der effektive Widerstand R_j^* den gesamten Membranstrom I_M – gemessen mit der Pipette – in die extrazelluläre Spannung V_j – gemessen mit dem Transistor – übersetzt.

$$V_j = R_j^* I_M \quad \text{mit} \quad R_j^* = \frac{R_j A_{JM}}{\eta_j A_M} \quad (1)$$

In unserer Messmethode wird die geometrische Anordnung des Zell-Transistor-Kontaktes nicht kontrolliert. Als Folge variiert der effektive Widerstand, und somit das Transistorsignal, über einen weiten Bereich. Um dies zu überprüfen, bestimmten wir R_j^* über eine Transistormessung bei Zellstimulation durch Wechselspannung und über eine Messung der Membrankapazität.^[9] In Abbildung 5 ist das Transistorsignal der Rezeptoraktivierung als V_j^{\max}/I_M^{\max} – skaliert mit dem gesamten Membranstrom – gegen den effektiven Widerstand R_j^* für 16 Zell-Transistor-Kontakte aufgetragen,

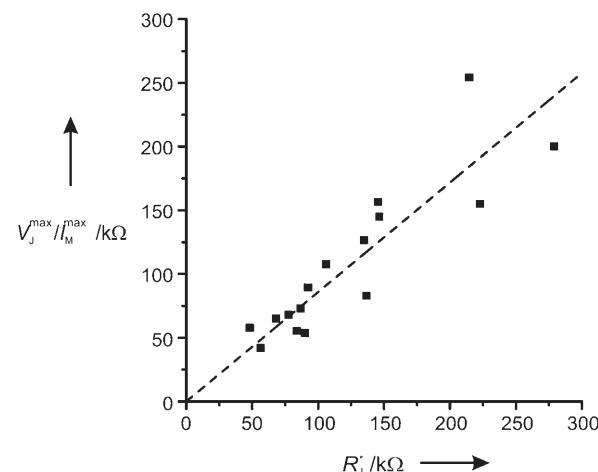


Abbildung 5. Der Quotient V_j^{\max}/I_M^{\max} der Amplituden von Transistorspannung und Pipettenstrom bei 100 µM Serotonin gegen den effektiven Widerstand R_j^* des Zell-Transistor-Kontaktes. Die gestrichelte Linie, die durch lineare Regression ermittelt ist, hat eine Steigung von 0.86 ($r^2 = 0.78$). Die Korrelation zeigt, dass die Variabilität der Transistormessungen durch eine Variabilität der Zell-Transistor-Kopplung dominiert wird, die durch unterschiedliche Positionen des Gates bei der Adhäsion verursacht wird.

mit einer weiten Variabilität von 50–250 kΩ. Lineare Regression führt zu einer Steigung von 0.86 ($r^2=0.78$) in guter Übereinstimmung mit Gleichung (1). Die Variabilität der Transistormessungen wird also durch den effektiven Widerstand R_j^* dominiert, im Besonderen aus dem Parameter η_j , der die Position von Transistor und Zelle beschreibt.^[9] Ein kleiner Beitrag röhrt von der Variabilität der Kanalexpression her, wie sie im Membranstrom beobachtet wird.

Wir haben das grundlegende Problem eines RCT-Biosensors durch die Kopplung eines ligandengesteuerten Ionenkanals an einen Feldeffekttransistor auf der Ebene einzelner Zellen gelöst. Bei konstanter intrazellulärer Spannung („Voltage-Clamp“) ist die extrazelluläre Spannung auf dem Transistor proportional zum Ganzzell-Ionenstrom der aktivierte Rezeptoren. Für RCT-Biosensoren verbleiben allerdings noch zwei wichtige Probleme: 1) Die Anwendung einer Patch-Pipette muss vermieden werden. Ohne „Voltage-Clamp“ führt der Rezeptorstrom jedoch zu einem schnellen Verschwinden der Triebkraft. Als Folge kann kein Transistorignal mehr beobachtet werden. Hier könnte ein überexprimierter „Delayed-Rectifier“-K⁺-Kanal zu einer effizienten Repolarisierung führen. 2) Die Variabilität der Transistor-Signale muss für eine unstrukturierte, zufällige Zellkultur überwunden werden. Am aussichtsreichsten scheint eine statistische Auswertung vieler Zellen auf einem großen Array dicht gepackter Transistoren, wie es durch CMOS-Technologie hergestellt werden kann.^[21]

Eingegangen am 16. Februar 2007,
veränderte Fassung am 13. April 2007
Online veröffentlicht am 19. Juni 2007

Stichwörter: Biosensoren · Serotonin-Rezeptoren · Transistoren

-
- [1] F. W. Scheller, U. Wollenberger, A. Warsinke, F. Lisdat, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 35.
 - [2] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth, *Pfluegers Arch.* **1981**, *391*, 85.
 - [3] C. Schmidt, M. Mayer, H. Vogel, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3267; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3137.
 - [4] K. G. Klemic, J. F. Klemic, M. A. Reed, F. J. Sigworth, *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 597.
 - [5] N. Fertig, R. H. Blick, J. C. Behrends, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 3056.
 - [6] A. Stett, C. Burkhardt, U. Weber, P. van Stiphout, T. Knott, *Recept. Channels* **2003**, *9*, 59.
 - [7] P. Fromherz in *Electrochemical Microsystems Technologies* (Hrsg.: J. W. Schultze, T. Osaka, M. Datta), Taylor and Francis, London, **2002**, S. 541.
 - [8] P. Fromherz, *Eur. Biophys. J.* **1999**, *28*, 254.
 - [9] M. Schmidtner, P. Fromherz, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 83.
 - [10] L. Farber, U. Haus, M. Spath, S. Drechsler, *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* **2004**, *33*, 2.
 - [11] A. J. Thompson, S. C. Lummis, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 3615.
 - [12] B. J. Jones, T. P. Blackburn, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2002**, *71*, 555.
 - [13] P. A. Davies, M. Pistis, M. C. Hanna, J. A. Peters, J. J. Lambert, T. G. Hales, E. F. Kirkness, *Nature* **1999**, *397*, 359.
 - [14] M. Voelker, P. Fromherz, *Small* **2005**, *1*, 206.
 - [15] F. G. Boess, R. Beroukhim, I. L. Martin, *J. Neurochem.* **1995**, *64*, 1401.
 - [16] D. D. Mott, K. Erreger, T. G. Banke, S. F. Traynelis, *J. Physiol.* **2001**, *535*, 427.
 - [17] A. M. Brown, A. G. Hope, J. J. Lambert, J. A. Peters, *J. Physiol.* **1998**, *507*, 653.
 - [18] R. Gleixner, P. Fromherz, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 2600.
 - [19] J. Crank, *The Mathematics of Diffusion*, 2. Aufl., Oxford University Press, Oxford, **1975**.
 - [20] T. A. Nielsen, D. A. DiGregorio, R. A. Silver, *Neuron* **2004**, *42*, 757.
 - [21] A. Lambacher, M. Jenkner, M. Merz, B. Eversmann, R. A. Kaul, F. Hofmann, R. Thewes, P. Fromherz, *Appl. Phys. A* **2004**, *79*, 1607.