

Die kleinsten Beziehungskisten der Welt

„Ein peinlich einfaches Prinzip“ nennt Dr. Ulrich Rant die Idee, mit der er und seine Mitarbeiter Biomoleküle detektieren und analysieren. Diese Idee dann aber in die Tat umzusetzen, dazu braucht man ein gutes Stück Genialität und noch viel mehr Harthäckigkeit. So gelang es den Forschern schließlich, erstaunliche Instrumente zu entwickeln

Links

www.dynamic-biosensors.com
www.wsi.tum.de

Leichte elastische Stäbe schwingen schneller als schwere – das ist nicht gerade eine neue Erkenntnis. Dass man aber ein solches Prinzip vom Großen aufs ganz Kleine übertragen und für einen neuartigen Biochip nutzen kann, auf diese Idee muss man erst einmal kommen. Dr. Ulrich Rant und sein Team am Zentralinstitut für Halbleiterphysik und Nanowissenschaften (Walter Schottky Institut) der TU München haben sie konsequent weiterverfolgt und stehen nun kurz davor, ein derartiges System auf den Markt zu bringen. „Ich nenne das Grundprinzip immer ‚Ball auf einem Stecker!‘“, sagt der geborene Österreicher Rant und benutzt seine Dialektfärbung dazu, die Einfachheit der Vorrichtung zu betonen. „Wir nehmen ein Stückchen genetisches Material – also DNA – als elektrisch geladenen Stab, befestigen es auf einer Unterlage und sorgen dann mit einer Wechselspannung dafür, dass dieser Stab wackelt. Wenn man nun an seinem oberen Ende

etwas anbringt, beeinflusst das seine Bewegung. Und das können wir messen.“

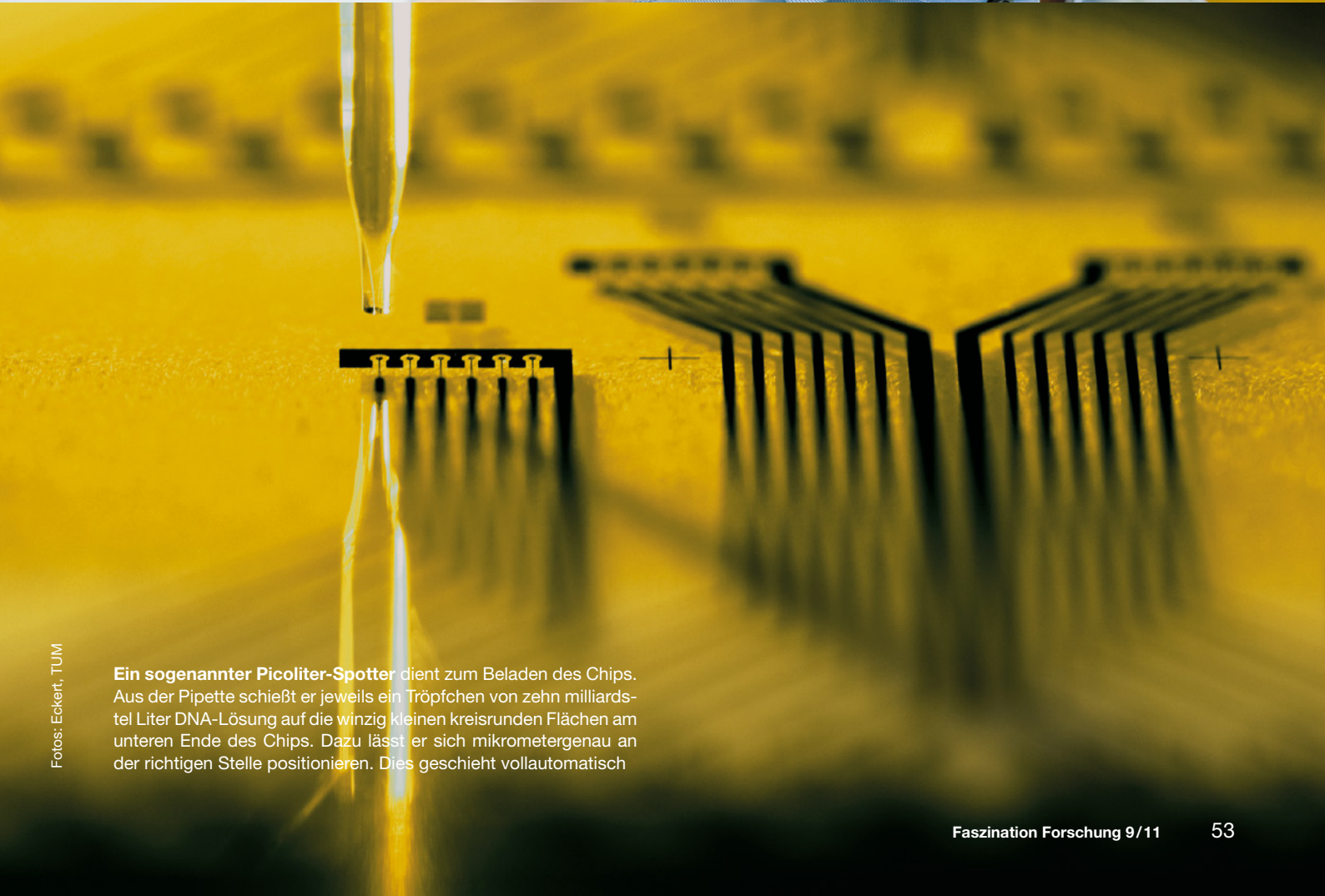
Das Ziel des Projekts am Lehrstuhl von Prof. Gerhard Abstreiter war zunächst, bestimmte Eiweißstoffe – sogenannte Proteine – oder pharmazeutische Wirkstoffe nachzuweisen. Wenn es gelingt, diese Moleküle an der Spitze der DNA-Stäbe zu befestigen, werden sie die Schwingung des Stabes schwerfälliger und damit langsamer machen. Tritt also dieser Effekt auf, stellt er einen Nachweismechanismus für die entsprechenden Substanzen dar. Und das, ohne dass man vorher die fraglichen Moleküle mit einem „Label“ versehen müsste, wie das meist für andere Nachweisverfahren nötig ist.

Wie befestigt man DNA auf einem Chip?

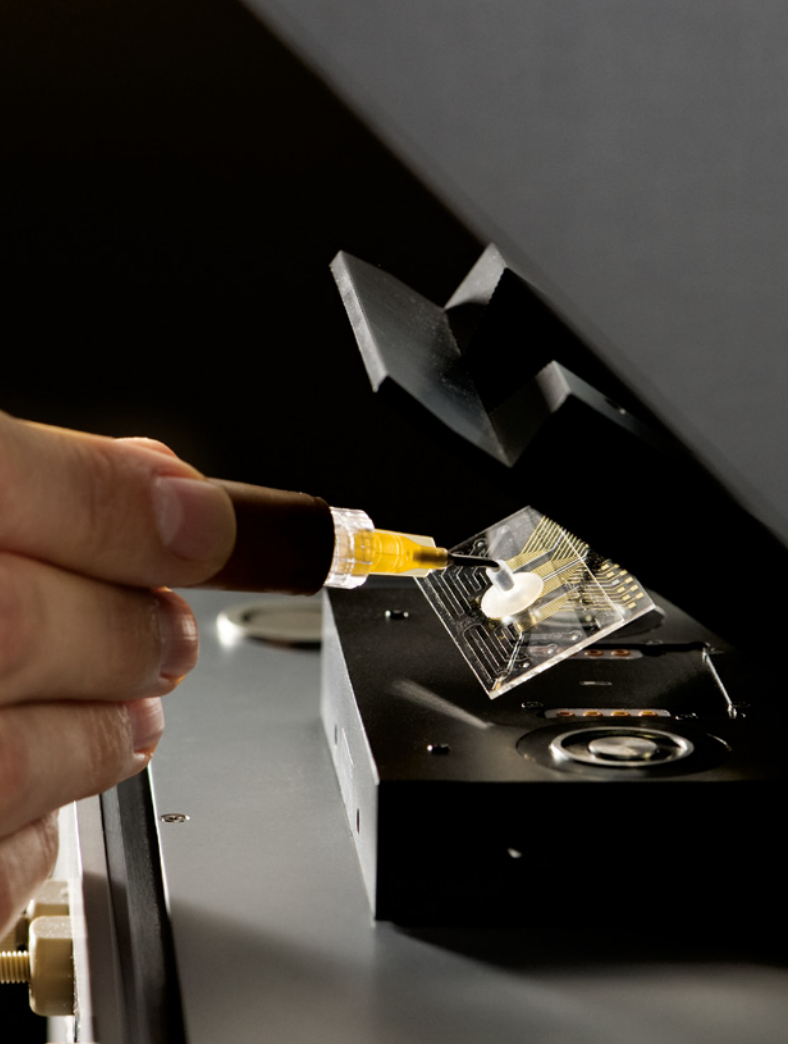
Das Ganze klingt simpel, ist aber in der Praxis mit einer Unzahl von Problemen verbunden. Zwar kann man die DNA-Schnipsel ganz nach Wunsch in der richtigen



In der Petrischale, die Ulrich Rant hier prüft, befindet sich ein Biochip (orange-farben). Die Flusskanäle erkennt man als helle Linien. Auf dem Deckel der Schale wurde die Belegung der Mikroelektroden mit DNA notiert



Ein sogenannter Picoliter-Spotter dient zum Beladen des Chips. Aus der Pipette schießt er jeweils ein Tröpfchen von zehn milliardenstel Liter DNA-Lösung auf die winzig kleinen kreisrunden Flächen am unteren Ende des Chips. Dazu lässt er sich mikrometergenau an der richtigen Stelle positionieren. Dies geschieht vollautomatisch



Mithilfe eines Saugers legt Ulrich Rant einen Biochip in den Prototyp des Auslesegeräts ein. Sobald die schwarze Klappe geschlossen wird, stellt das Gerät automatisch den elektrischen und den Flüssigkeitskontakt her, die Messung kann beginnen

Länge und Zusammensetzung bei einschlägigen Firmen kaufen, aber um sie auf einem Chip zu befestigen, muss man die Unterlage mit Gold beschichten und die DNA so verändern, dass sie darauf haften bleibt. Danach bringt man andere, kurze Moleküle auf der Oberfläche an, die sich wie ein Teppich zwischen der DNA ausbreiten. Sie tragen dazu bei, dass die DNA-Schnipsel nicht der Länge nach am Gold kleben bleiben, was sie sonst gerne tun.

Damit ist es aber noch nicht getan, denn wenn die Stäbchen zu eng stehen, können sie im elektrischen Wechselfeld nicht umfallen, sie behindern sich gegenseitig. „Wir mussten eine Methode finden, wie wir die DNA weit genug voneinander entfernt anbringen können“, sagt Ulrich Rant. „Da ein Schnipsel etwa 20 Nanometer lang ist, sollte er von seinen Nachbarn rund doppelt so weit entfernt stehen, damit alle umfallen können.“ Nach vielen Versuchen gelang es mit sanften Stromstößen,

die DNA-Stäbchen so auszudünnen, dass sie nicht mehr wie ein dichtes Fell auf dem Chip standen, sondern eher wie eine lichte Behaarung. Heute ist dieses Verfahren automatisiert; ein Gerät setzt die Stromstöße und testet, ob die Abstände groß genug sind. Am Ende verbleiben noch rund 10.000 DNA-Moleküle auf dem Chip.

Die DNA ist in wässriger Lösung stark negativ geladen, denn an ihrem Rückgrat sitzen an jedem Basenpaar zwei elektrisch geladene Elementarladungen. „Wir haben also geladene Stäbchen, die wir elektrisch beeinflussen können“, erklärt Rant. „Wenn wir eine Spannung anlegen, können wir die DNA schalten.“ Schalten bedeutet in diesem Fall, dass die Schnipsel aufrecht stehen, wenn die Goldoberfläche negativ geladen ist, und sich hinlegen, wenn sie positiv wird. Wie kann man dies nun von außen feststellen? Immerhin sind die beteiligten Komponenten in diesem Spiel so winzig, dass man sie

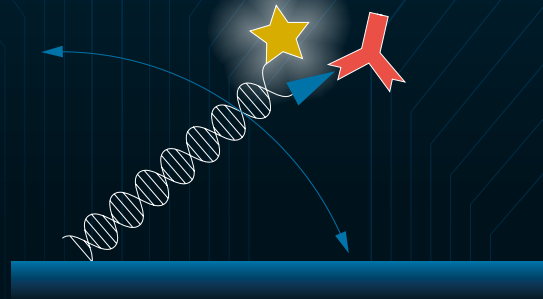


Fotos: Eckert, TUM

Matthias Firnkes analysiert das Stromrauschen, das durch Ionen, die durch eine Nanopore fließen, entsteht. Um störende Einflüsse auf den nur wenige Piko-Ampere starken Strom zu unterdrücken, hängt der Chip schwingungsgedämpft in einer Metallbox (Faraday-Käfig)

nicht einmal mehr unter den besten Mikroskopen klar erkennen kann. Rant und seine Mitarbeiter entschieden sich für ein raffiniertes optisches Verfahren. Schon früher war bekannt, dass bestimmte fluoreszierende Farbstoffe ihre Leuchtenergie über Resonanzeffekte an andere Moleküle abgeben können, ohne dass sich ihre chemische Struktur verändert. Dieser Hell-Dunkel-Effekt lässt sich auch beobachten, wenn sie ganz nahe an Metalloberflächen herankommen. Man nutzt dies in der Biophysik zur Messung sehr kleiner Abstände. Rant hatte die Idee, dass er das Phänomen dazu benutzen könnte, die Schwingungen der DNA-Stäbchen sichtbar zu machen. Er befestigt solche Farbstoffmoleküle an der Spitze der DNA und bestrahlt sie mit grünem Laserlicht, daraufhin beginnen sie gelb zu fluoreszieren. Nun verändert sich die Lichtintensität der Fluoreszenz mit der Bewegung der DNA: Stehen die Stäbchen gerade, ist die Lichtintensität am höchsten, sobald die Stäb-

chen sich neigen und damit der Goldoberfläche näher kommen, geht die Lichtintensität zurück. Liegen die DNA-Moleküle ganz flach, ist das Leuchten weg. Unter dem Mikroskop lässt sich das schwache Licht von den 10.000 Leuchtstoff-Molekülen beobachten, verstärken und messen. So weiß man nun, wie sich die winzigen Sonden verhalten. Rant erfand für diese elektrisch schaltbaren DNA-Oberflächen den griffigen Namen switchSENSE und meldete das Prinzip zum Patent an. Parallel zum Farbstoff kann man nun die unterschiedlichsten Dinge am oberen Ende der DNA-Schnipsel befestigen, beispielsweise Rezeptoren für bestimmte Proteine, Antikörper oder Pharmazeutika. Übergießt man nun den Biochip mit einer Flüssigkeit, in der diese Stoffe schwimmen, docken die entsprechenden Moleküle an die Rezeptoren an und machen das DNA-Stäbchen schwerer bzw. größer. Die Folge lässt sich sofort erkennen: Die Schwingungen im elektrischen Feld ►



Das Grundprinzip: Am Ende eines DNA-Stücks befindet sich ein Leuchtstoff-Molekül. Es leuchtet heller, je weiter es von der Chipoberfläche entfernt ist. In einem elektrischen Wechselfeld schwingt die DNA. Hängt an ihrem Ende ein großes Molekül (rechts), wird sie abgebremst

werden langsamer, und damit auch das Flackern des Hell-Dunkel-Rhythmus.

Beziehungskisten auf Nanoebene

Inzwischen sind die Analysemethoden sogar so ausgefeilt, dass die Wissenschaftler Aussagen über die Natur der angedockten Moleküle machen können: Wie schwer sind beispielsweise Proteine, welche Gestalt und Größe haben sie? „Daran habe ich am meisten Feuer gefangen“, schwärmt Ulrich Rant. „Wenn wir eine negative Spannung anlegen, dann treibt das die DNA hoch, dabei muss man das Protein durch die Lösung schwenken. Dazu ist ein gewisser Widerstand zu überwinden, so als ob man etwas durch Honig hindurchzieht. Das verlangsamt die DNA-Bewegung. Das Tolle ist, dass man so nicht nur feststellt, da hängt etwas dran. Sondern wir können aus dem Maß, wie stark die Bewegung verlangsamt wird, Rückschlüsse auf die

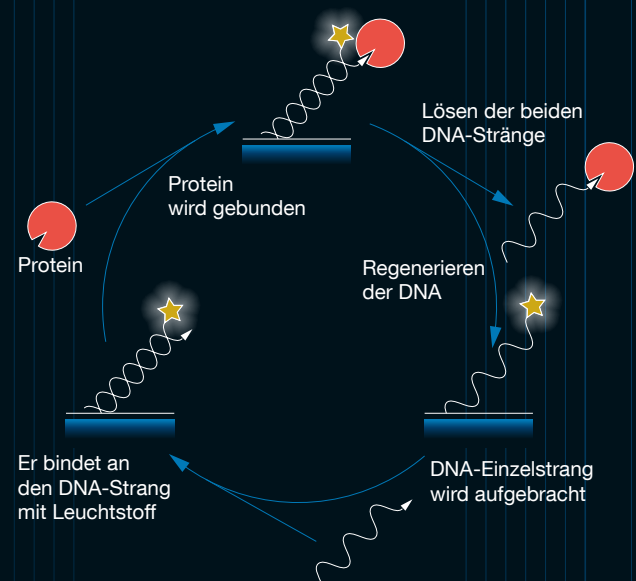
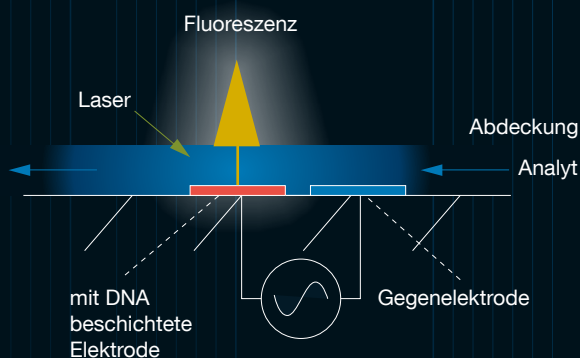
Beschaffenheit des Knubbers ziehen, der oben dranhängt. Das ist völlig neu und sehr spannend, denn bisher konnten Biosensoren nur eine Ja-nein-Aussage treffen. Wir hingegen untersuchen auch die Dynamik der Moleküle.“ In äußerst plastischer Weise schildert der 36-jährige Physiker, worum es dabei geht: „Wechselwirkungen zwischen Molekülen ähneln in vielerlei Weise romantischen Beziehungen. Die folgenden Fragen könnten in einem Klatschmagazin gestellt werden, ebenso aber auch während der Entwicklung eines neuen Wirkstoffes oder beim Erforschen der Signalwege in Zellen: Wie und wann treffen sich Partner? Wie lange bleiben sie zusammen? Wie beeinflusst das Aussehen der Partner ihre Anziehungskraft? Ist einer der Partner polygam und vielleicht schon in Beziehungen mit anderen verwickelt? In welcher Weise beeinträchtigt die neue Partnerschaft andere Bindungspartner?“ Normale Biosensoren liefern typischerweise Informationen

wie Bindungsraten oder Anziehungskräfte, aber das ist oft nicht genug, wenn man das Verhalten komplexer Biomoleküle verstehen will, wo die Form die Funktion definiert. switchSENSE soll diese Lücke schließen. Inzwischen nähert sich das Verfahren der Praxisreife. Unterstützt vom japanischen Unternehmen Fujitsu Laboratories Ltd., haben die Forscher ein ausgefeiltes Chip-Design entwickelt, mit dem man bis zu 24 verschiedene Substanzen gleichzeitig detektieren kann. Die immer wiederkehrenden Prozeduren wie Beladen oder Reinigen sowie die Auswertung der Ergebnisse erledigt ein Prototyp-Gerät vollautomatisch. Im Rahmen der Initiative des Bundesministeriums für Bildung und Forschung GO-Bio wollen Rant und sein Team die switchSENSE-Technologie bis zur Marktreife weiterentwickeln und für den Einsatz in der Antikörperforschung optimieren. Die Spin-off-Firma Dynamic Biosensors nutzt dazu ein breites Patentportfolio. Wichtige Anwendungsbereiche für die Methode finden sich in der medizinischen Diagnostik und der Arzneimittelentwicklung in der Pharmaindustrie. Später könnte das einfache und schnelle Analysegerät auch in Arztpraxen stehen und dort Infektionskrankheiten erkennen. Vor zehn Jahren kam Ulrich Rant aus Graz nach München zu Prof. Gerhard Abstreiter, um dort seine Doktorarbeit in Festkörperphysik zu machen. Geschult durch

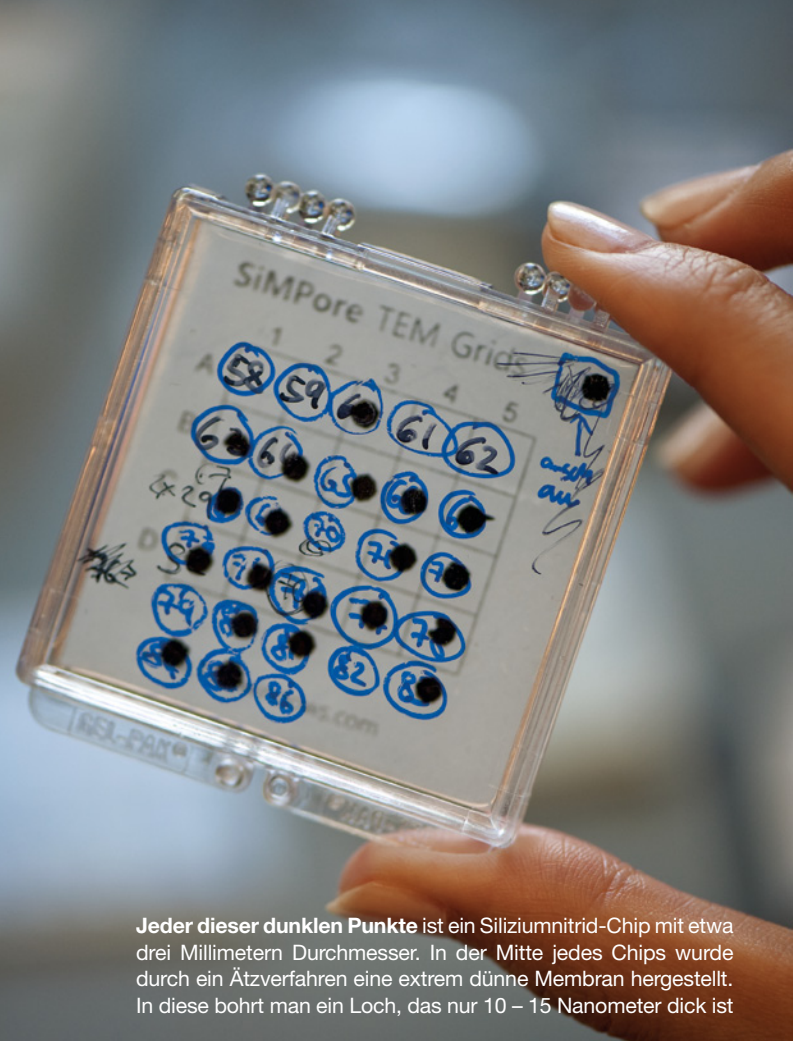
physikalische Vorstellungen, denkt er meist bildlich. „Biologen sind hingegen daran gewöhnt, dass ihre Systeme sehr komplex sind“, weiß er. „Ich als Physiker habe aber gern einen einfachen Baukasten.“ Da passt es, dass er und sein Team seit zwei Jahren neben den schaltbaren DNA-Chips noch an einem weiteren Projekt arbeiten, das ebenfalls recht einfach wirkt: an Nanoporen.

Wie man Poren intelligent machen kann

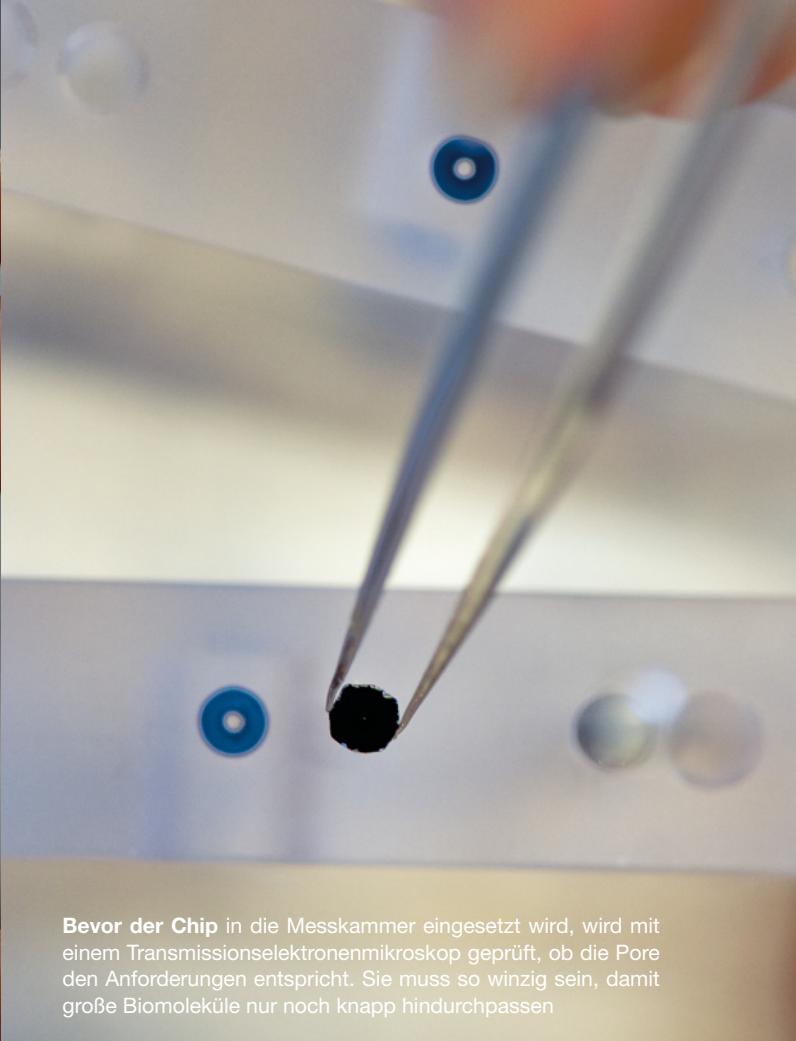
Wieder klingt alles fast primitiv: „Man benutzt ein Loch, um die Eigenschaften von den Objekten, die durch das Loch gehen, zu ermitteln“, erklärt Rant. „Das nennt man resistive pulse sensing.“ Das Prinzip wird bereits in der Medizin angewandt, um Blutkörperchen zu zählen: Eine Membran mit einem winzigen Loch trennt zwei Kammern, die mit Salzlösung gefüllt sind. Die Pore ist so klein, dass nur ein einzelnes Blutkörperchen hindurchpasst. Nun legt man zwischen den beiden Kammern eine elektrische Spannung an und misst den Strom, der aus den Ionen der Salzlösung besteht. Diese müssen durch die Pore fließen. Jedes Mal, wenn sich nun ein Blutkörperchen durch die Pore zwingt, steigt der elektrische Widerstand während dieser Zeit an, die Stromstärke fällt plötzlich ab. Über die Anzahl der Strompulse kann man die Blutkörperchen zählen. ▷



Wegen der Schwingung der DNA verändert sich das Leuchten im selben Rhythmus wie die elektrische Wechselspannung. In der Praxis erzeugt man das Leuchten durch einen fluoreszierenden Farbstoff, der mit einem grünen Laser angestrahlt wird (links). Der Kreislauf rechts zeigt, wie man den Chip mit einem Protein belädt und wieder reinigt



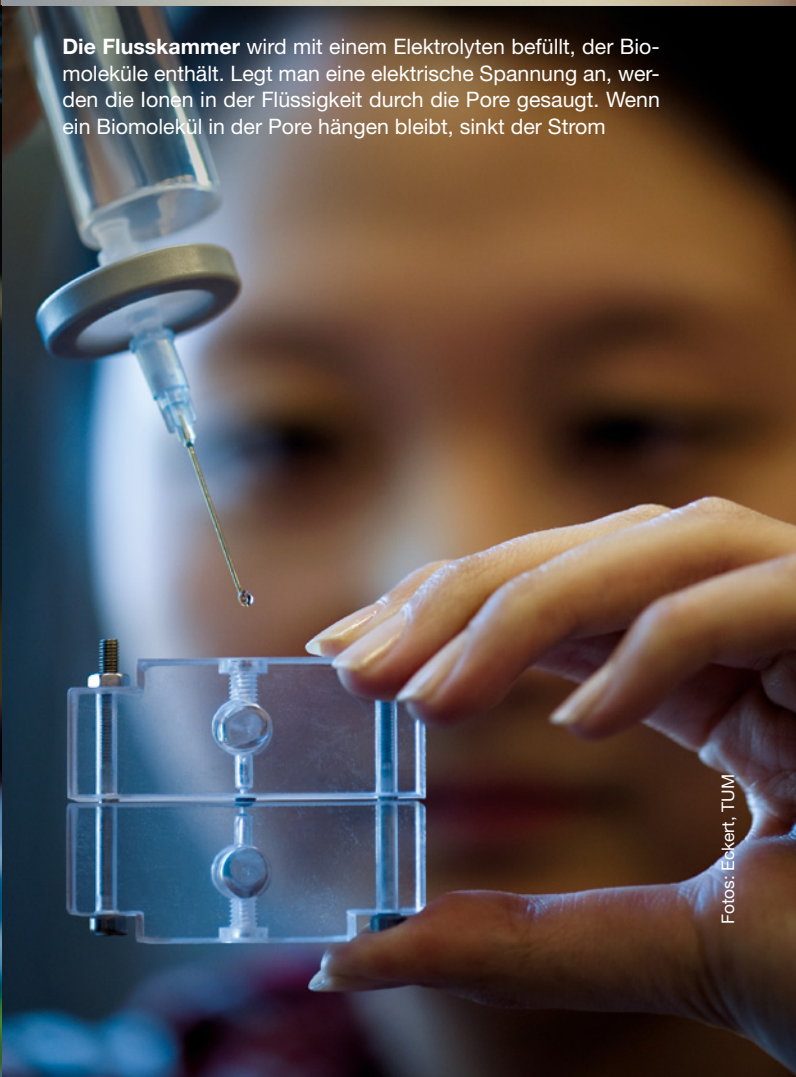
Jeder dieser dunklen Punkte ist ein Siliziumnitrid-Chip mit etwa drei Millimetern Durchmesser. In der Mitte jedes Chips wurde durch ein Ätzverfahren eine extrem dünne Membran hergestellt. In diese bohrt man ein Loch, das nur 10 – 15 Nanometer dick ist



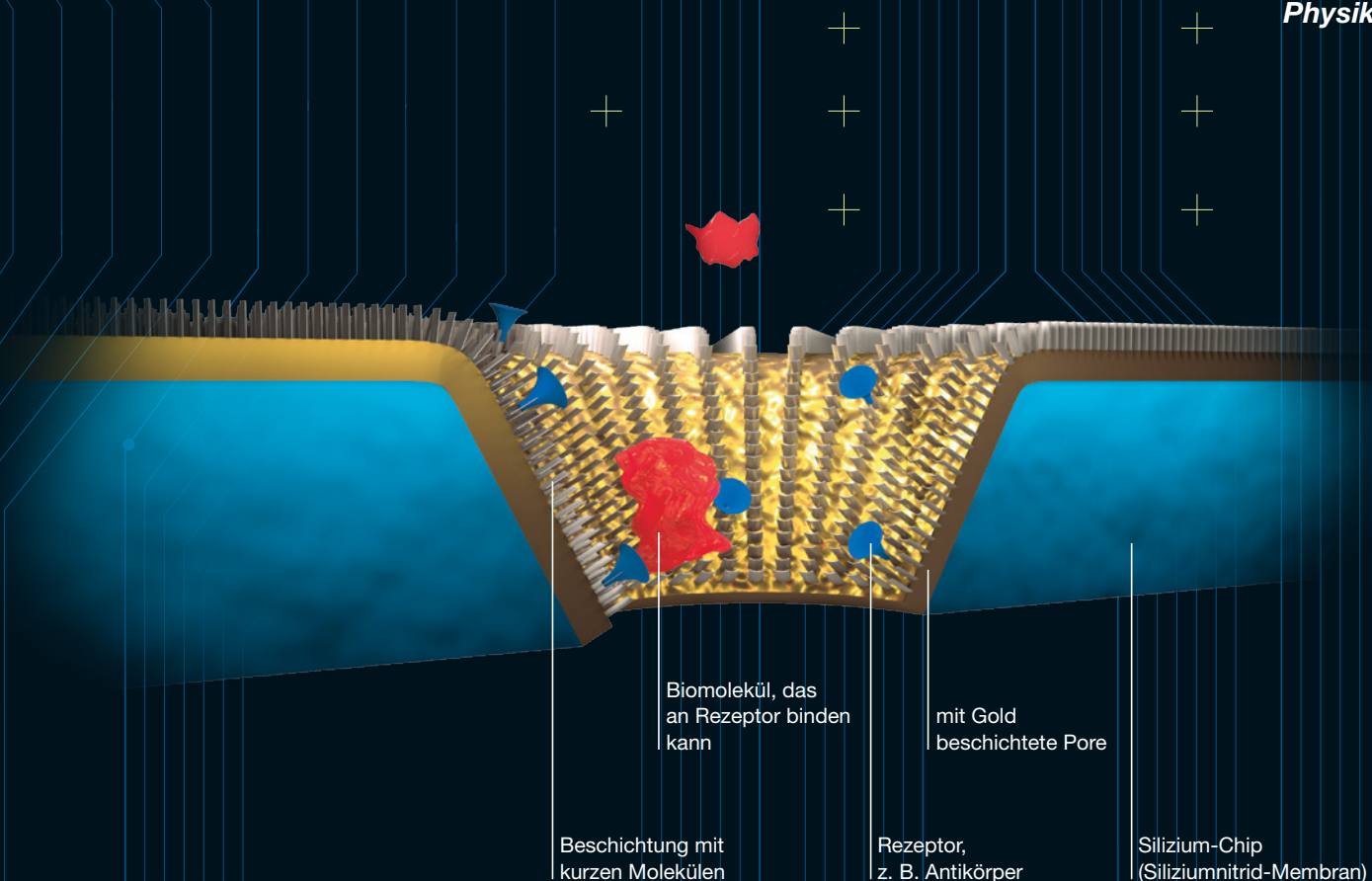
Bevor der Chip in die Messkammer eingesetzt wird, wird mit einem Transmissionselektronenmikroskop geprüft, ob die Pore den Anforderungen entspricht. Sie muss so winzig sein, damit große Biomoleküle nur noch knapp hindurchpassen



Hier legt die Doktorandin Ruoshan Wei einen Chip in eine sogenannte Flusskammer ein. Die Pore muss dabei über der Öffnung für die Flüssigkeit zu liegen kommen. Anschließend wird die Kammer mithilfe der beiden Schrauben fest verschlossen



Die Flusskammer wird mit einem Elektrolyten befüllt, der Biomoleküle enthält. Legt man eine elektrische Spannung an, werden die Ionen in der Flüssigkeit durch die Pore gesaugt. Wenn ein Biomolekül in der Pore hängen bleibt, sinkt der Strom



Nur wenige Nanometer Durchmesser hat diese Pore. Sie ist mit kurzen Molekülen beschichtet, auf denen ein Rezeptor sitzt (blau). Er kann Moleküle (rot) einfangen und festhalten, die vorbeischwimmen. Der elektrische Ionenstrom, der durch die Pore fließt, wird dadurch abgeschwächt

Die Löcher, die Ulrich Rant und seine Mitarbeiter in hauchdünne Siliziumnitrid-Membranen ätzen, sind jedoch noch viel kleiner, sie haben einen Durchmesser von nur wenigen Nanometern. Dies gibt den Forschern die Möglichkeit, auch einzelne Moleküle zu zählen und sie sogar zu analysieren. „Bisher hat man solche Poren als passive Löcher benutzt“, sagt Rant, „damit konnte man die Größe und Ladung der durchschwimmenden Objekte abschätzen, aber kaum deren Struktur. Wir machen nun etwas Neues: Wir befestigen in der Pore eine biochemische Bindungsstelle. Wenn nun ein passendes Molekül durchschwimmt, kann es andocken, und wir können messen, wie lange es dort bleibt.“ Zu diesem Zweck muss man das Innere der Pore mit Gold beschichten, darauf kommen kurze Moleküle, die sich an das Gold anheften, und in diese Schicht bringen die Forscher dann die gewünschten Rezeptoren. Damit haben die TUM Wissenschaftler also eine Methode entwickelt, mit der sie messen können, wie stark

sich ein Biomolekül an etwas anderes bindet oder wie stark man daran ziehen muss, um es von dort wieder zu lösen. „Das ist praktisch eine Kraftmessung an einem einzelnen Molekül“, freut sich Ulrich Rant. „Und trotzdem ist der Messaufbau erstaunlich billig. Man braucht Flusskammern aus Plastik, man muss die Pore machen können, und man braucht noch einen Stromverstärker. Abgesehen von der Porenherstellung kostet ein Set-up für Einzelmolekül-Messungen vielleicht 15.000 Euro, das ist wenig im Vergleich zu anderen Experimenten.“ Ulrich Rant hat schon etliche Pläne, was er mit seinen Nanoporen alles machen kann, und hofft, dass sie bald als Standardinstrument Eingang in die Forschung finden, etwa bei der Suche nach pharmazeutischen Wirkstoffen oder zur Untersuchung von einzelnen Zellen. Eines ist jedenfalls schon heute klar: Die Poren können viele bisher unbekannte Beziehungskisten zwischen Biomolekülen aufklären.

Brigitte Röthlein