

Investigations on planar lipid bilayers in nano-pores to study the function of membrane proteins

Doctoral Thesis

Author(s):

Studer, André Olivier

Publication date:

2009

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005901902>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

**Investigations on planar lipid bilayers in nano-pores to study
the function of membrane proteins**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH
For the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

Presented by
ANDRÉ OLIVIER STUDER
Dipl. Natw. ETH Zürich
born 02.03.1978
citizen of
Winterthur ZH, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Fritz K. Winkler, examiner
Prof. Dr. Kaspar Locher, co-examiner
Prof. Dr. Janos Vörös, co-examiner
Dr. Louis X. Tiefenauer, co-examiner

Summary

Planar lipid bilayers were recognized as model systems for cellular membranes almost 50 years ago. They offer the basic properties such as membrane thickness and lateral lipid mobility; additionally they provide a natural environment for isolated membrane proteins. The possibility to tightly control the composition of the artificial membrane and the free access to both sides of the bilayer makes them ideally suited to investigate the function of isolated membrane proteins. A significant disadvantage is their poor stability that varies with the used lipid and the formation technique. Based on the assumption that an increased ratio of the circumference to bilayer area has a stabilizing effect, small pores were arranged in arrays. A major part of my thesis was to investigate whether lipid bilayers formed in arrays of small pores are more stable than in larger pores and thus improve the conditions to investigate the function of membrane proteins.

Our arrays are based on a thin silicon nitride membrane. I report about the stabilizing effect on membranes by reducing the pore diameter from 800 nm to 200 nm that was observed for all lipids tested. In the case of the natural lipid soy PC, bilayers were stable for at least two days in the smaller pores, which corresponds to an improvement by a factor of about 30 compared to the larger pores. The precise determination of the number of bilayer spanned pores in the array was affected by the electrical noise introduced by the silicon-based device. But the successful ion channel recording from the pore forming toxin α -hemolysin assembled from seven monomers, proved the presence of a lipid bilayer in chip pores. The very large total pore area allowed the incorporation of a large number of toxin molecules which enabled us to measure directly the amount of sodium ions diffusing through the protein pores using ion selective electrodes. This demonstrated that the setup is also suitable to investigate membrane protein transporters, operating at lower rates than ion channels and requiring higher numbers of protein molecules to make solute transport measurable.

Different methods to form protein containing lipid bilayers were explored and adapted. The fusion of proteoliposomes with a preformed bilayer using the nystatin-ergosterol method resulted in the successful incorporation of a voltage gated sodium channel. We found that this method was limited to larger chip pores and fusion events were not observed with bilayers smaller than $30 \mu\text{m}^2$. In using this method, a compromise has to be accepted between the chance of liposome fusion in larger pores and sufficient bilayer

stability in smaller pores. Furthermore the incorporation of protein molecules to high densities cannot be achieved. This would be possible if lipid bilayers on a nanopore chip could be directly formed from proteoliposomes, but this method was not successfully implemented so far. However, investigations on protein channels and pores are perfectly possible and the exceptional stability of the lipid bilayers spanning small pores improves the measurement possibilities. The duration of an experiment is no longer highly limited by the lifetime of the lipid bilayer and the possible exchange of the buffer solutions allows using a prepared nanopore array chip for multiple measurements.

Zusammenfassung

Planare Lipiddoppelschichten wurden bereits vor fast 50 Jahren als Modellsystem für die Zellmembran beschrieben. Sie besitzen die selben Grundeigenschaften, zu denen beispielsweise die Membrandicke und die laterale Mobilität der Lipidmoleküle gehören; zusätzlich bieten sie eine natürliche Umgebung für aufgereinigte Membranproteine. Die Möglichkeit, die Zusammensetzung dieser künstlichen Membran exakt zu definieren, sowie der uneingeschränkte Zugang zu beiden Seiten der Doppelschicht, macht sie zu einem idealen Kandidaten um die Funktionen von aufgereinigten Membranproteinen zu untersuchen. Der grosse Nachteil ist ihre geringe Stabilität, die sowohl vom benutzten Lipid sowie der angewandten Herstellungstechnik abhängt. Basierend auf der Annahme, dass sich ein grösseres Verhältnis zwischen Umfang zu Fläche stabilisierend auf die Doppelschicht auswirkt, wurden kleine Poren in Reihen angeordnet. Ein wesentlicher Teil meiner Doktorarbeit bestand in der Ermittlung ob planare Lipiddoppelschichten, welche in regulär angeordneten, kleinen Poren gebildet werden, stabiler sind und somit die Untersuchung von isolierten Membranproteinen vereinfachen.

Unsere regulär angeordneten Reihen von Nanoporen wurden in einer dünnen Membran aus Siliziumnitrid angefertigt. Durch eine Reduktion des Porendurchmessers von 800 nm auf 200 nm konnten unterschiedliche Lipidmembranen stabilisiert werden. Im Falle des natürlich vorkommenden Lipidgemisches Soja PC waren die Doppelschichten in den kleinen 200 nm Poren mindestens 2 Tage stabil, dies entspricht einer 30 fachen Verlängerung verglichen mit den 800 nm Poren. Die genaue Bestimmung der Anzahl an Lipiddoppelschichten wurde aufgrund der spezifischen Chipeigenschaften beeinträchtigt. Aber durch die Porenbildung des Toxins α -hemolysin in zahlreichen Chiporen konnte das Vorhandensein ebensovieler Doppelschichten bewiesen werden. Die grosse Gesamtfläche ermöglichte den Einbau von vielen Toxin Molekülen, wodurch die erleichterte Diffusion von Natriumionen mit ionenselektiven Elektroden gemessen werden konnte. Der Chip bietet somit die Möglichkeit, Membranprotein Transporter zu untersuchen, welche langsamer als Ionenkanäle arbeiten und in einer grösseren Anzahl in der Lipiddoppelschicht vorhanden sein müssen damit der Stofftransport detektierbar wird.

Verschiedene Methoden um Lipidmembranen mit Proteinen herzustellen wurden geprüft und modifiziert. Die Verschmelzung von Protein-enthaltenden Liposomen mit vorgeformten Doppelschichten wurde mit der Nystatin-Ergosterol Methode realisiert.

Diese Methode war aber auf Lipidmembranen beschränkt welche grösser als $30 \mu\text{m}^2$ waren. Somit muss ein Kompromiss eingegangen werden zwischen erfolgreicher Fusion in grossen Poren und Stabilität in kleineren Poren. Ausserdem eignet sich diese Methode nicht zum Einfügen von einer grossen Anzahl von Proteinmolekülen. Dies wäre möglich falls die Doppelschicht direkt von Protein-enthaltenden Liposomen gebildet werden könnte, bis jetzt konnte diese Methode aber nicht realisiert werden. Andererseits ist die Untersuchung von einzelnen Ionen-Kanälen sehr gut möglich und die aussergewöhnlich hohe Stabilität der Lipidmembranen vereinfacht die Untersuchung von isolierten Membranproteinen. Die Dauer einer Messung wird nicht mehr so stark von der Lebensdauer der Lipiddoppelschicht eingeschränkt und ein Austauschen der wässrigen Lösungen ermöglicht das mehrmalige Verwenden der gleichen künstlichen Zellmembran.