

Automatisk måling af ionkanalstrømme i levende celler

Rafael Taboryski og Simon Pedersen, Sophion Bioscience A/S

Sophion Bioscience A/S

Sophion Bioscience A/S blev grundlagt i juli 2000, og er udsprunget af et udviklingsprojekt hos Neurosearch A/S. Sophions mission er at udvikle og sælge avanceret udstyr til automatiske målinger af ionkanalstrømme, samt at udøve support til vores kunder i brugen af udstyret og udvikling af applikationer (anvendelser). Sophions kunder er primært farmaceutiske virksomheder. Sophion Bioscience har med succes udviklet produktet QPatch™ (se figur 1) med den tilhørende QPlate™.



Figur 1. Billede af QPatch™ screening station til automatisk patch clamping.

Ionkanaler

Ionkanaler er nogle få Ångstrøm store porer dannet af proteiner, der forbinder indersiden og ydersiden af celler. Ionkanalernes evne til selektivt at transmittre ioner kan aktiveres ved ydre påvirkninger, som temperatur, elektrisk spænding, mekanisk stræk, samt ved kemiske påvirkninger. F.eks. aktiverer stoffet capsaicin, som findes i chilifrugter, ionkanaler på tungenes nerveceller [1]. Capsaicin får disse ionkanaler til at åbne, og elektriske strømme løber igennem cellemembranen. Dette medfører, at der transmitteres et aktionspotential til hjernens smertecenter. Det er denne mekanisme, der ligger bag den smertefuldt brændende fornemmelse som vi føler når vi indtager stærk mad. De samme ionkanaler aktiveres også af varme, hvorfor man i angelsaksiske lande siger at chili er 'hot'. Tilsvarende virker smertestillende stoffer ved at blokere de ionkanaler som indgår i transmissionen af nerveimpulser til hjernens smertecenter. Ionkanalerne er med andre ord grundelementerne i kroppens netværk af nervebaner.

Forståelsen af ionkanalernes funktion – også kaldet elektro-fysiologi – spiller en meget vigtig rolle for

de farmaceutiske virksomheders udvikling af ny medicin. Efter kortlæggelsen af det menneskelige genom, har man identificeret funktionen af en lang række ionkanaler, og mange af ionkanalerne kan relateres til bestemte sygdomme eller kropsfunktioner – f.eks. cystisk fibrose og Parkinsons syge. Et stof, der er i stand til at blokere eller åbne en bestemt type af disse ionkanaler er interessant og har potentiale som lægemiddel.

Elektrostatik for celler

Cellens elektrokemiske ligevægtstilstand bestemmes primært af forholdet mellem ionkoncentrationen af Na^+ , K^+ , Ca^{2+} og Cl^- inde i cellen og udenom cellen. For at opretholde en gradient i koncentrationen af bestemte ioner hen over cellemembranen kræves en elektrostatisk potentialforskell. Denne potentialforskell for ioner med koncentration c_x^{out} udenfor cellen og koncentrationen c_x^{in} inde i cellen kan beregnes med Nernsts ligning [2].

$$E_x = \frac{k_B T}{ze} \ln \left(\frac{c_x^{\text{out}}}{c_x^{\text{in}}} \right), \quad (1)$$

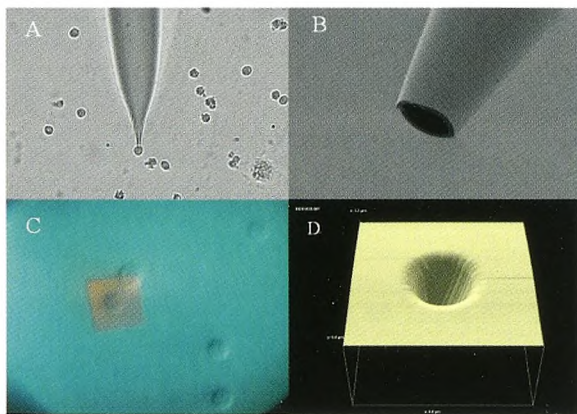
hvor k_B er Boltzmanns konstant, T er den absolutte temperatur, z er den pågældende ions valens og e er elementarladningen. Koncentrationer angives bekvemt i enheden molær ($M = \text{mol/L}$). Faktoren $k_B T/e$ giver 27 mV ved 37°C og dette er altså den relevante spændingsskala i elektro-fysiologi.

Lad os som eksempel beregne ligevægtspotentialet E_K for Kalium ved typiske koncentrationer. En typisk intracellulær koncentration vil være 155 mM og en typisk extracellulær koncentration er 4 mM. Det indre af cellen indeholder altså en højere koncentration af Kalium. Ved disse koncentrationer fås $E_K = -98 \text{ mV}$. Dvs. at for at trække K^+ -ioner ud af en celle er det nødvendigt at påtrykke en spænding større end -98 mV . Hvis spændingsforskellen mellem inder- og ydersiden er nøjagtig -98 mV balancerer Kaliumkoncentrationsgradienten og spændingsforskellen nøjagtigt hinanden og der løber netto ingen strøm.

Patch clamping – Teknikken

En vigtig metode til at teste potentielle lægemidler er den såkaldte patch-clamp teknik, hvor man er i stand til at måle ionstrømmen gennem cellemembranen direkte på en enkelt celle. Patch clamping blev udviklet af Bert Sakmann og Erwin Neher i 1970'erne, og de fik nobelprisen i medicin og fysiologi i 1991 for denne opdagelse [3]. Metoden går i korthed ud

på, at en glas-mikropipette (se figur 2A og 2B) med en lysning (åbning) på ca. én mikrometer presses mod en celle. Pipetten indeholder ledende intracellulær væske. Ved kontakt med cellemembranen danner pipettens rand spontant en forsegling til cellemembranen. Forseglingen har en elektrisk modstand af størrelsesordenen gigaohm. Denne høje isolationsmodstand kaldes i fagsprog for et 'gigaseal'. Ved at tilslutte en elektrode, som befinder sig inde i pipetten, og en referenceelektrode i saltvandsopløsningen udenom cellen, til en meget følsom strømforstærker, kan man måle ionstrømmen gennem cellen som respons til den påtrykte spændingsforskel mellem de to elektroder.



Figur 2. A: Patch clamping med pipette set i optisk mikroskop. Pipetten har netop fået kontakt med en celle. B: SEM (Scanning Electron Micrograph) af glaspipette til patch clamping. C: HEK-293 celle, der er landet på et patch clamp hul på et SiO substrat. Den kvadratiske struktur er en tynd Silicium membran som hullet går igennem. D: AFM (Atomic Force Micrograph) billede af et patch clamp hul på et plant SiO substrat. Billedet er optaget på DFM (Dansk Institut for Fundamental Metrologi i Lyngby).

For at opnå et bedre signal-støj forhold, er det ønskværdigt at rive hul på den del af cellemembranen der befinder sig inden for pipettens åbning. Herved opnås elektrisk adgang til cellens indre gennem en ren ohmsk forbindelse. Når der er kommet hul på cellemembranen, tales der i elektrofysiologi om, at cellen er i en 'whole cell' konfiguration, fordi man i denne konfiguration måler på alle ionkanaler i cellen (hele cellen). I konventionel elektrofysiologi etableres whole cell konfigurationen ved at elektrofysiologen suger hul på cellen gennem en slange, der er forbundet til pipetten og elektroden. Slangen er for enden forsynet med et mundstykke, og suget foretages med munden. Som det måske fremgår, er hele denne proces meget tidskrævende og kræver øvelse.

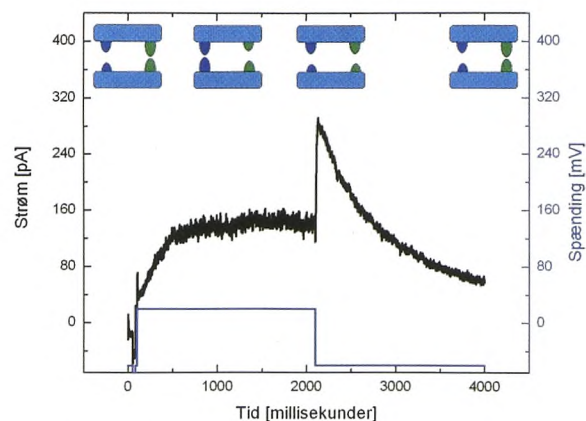
Cellerne

Man kan 'patche' på celler udtaget direkte af væv fra dyr eller mennesker. De fleste forsøg udføres dog på dyrkede celler, der er blevet klonede og genmodificerede til at udtrykke en bestemt ionkanal. Sådanne celler kan tages op af fryseren, dyrkes og høstes og være klar til brug i løbet af få dage. Cellerne er dog

levende organismer, og man skal være meget påpasselig ved omgangen med dem. Virus, svampe og bakterier kan inficere cellekulturen, så man må starte forfra med optøning af nye celler.

Miljøpåvirkninger kan få cellerne til at mutere hvorved de kan miste udtrykket af den ønskede ionkanal. Meget almindelige cellelinier brugt af den farmaceutiske industri er HEK-293 celler (Human Embryonic Kidney, 293 refererer til et eksperimentnummer) [4], og CHO (Chinese Hamster Ovary) celler. HEK-293 er en cellelinie der oprindeligt blev udtaget fra én af nyrerne på et menneskefoster, mens CHO er en cellelinie, der oprindeligt blev udtaget fra æggestokkene på en kinesisk hamster. Cellelinier som disse er særligt velegnede til patch clamping og kan ved en særlig teknik udstyres med en overrepræsentation af en bestemt ionkanal.

Én af de vigtigste ionkanaler for de farmaceutiske virksomheder er den såkaldte hERG kanal [5]. hERG (human Ether- a-gogo Related Gene) er navngivet således, da bananfluer, der manglede ERG-genet rystede (dansede go-go), når de skulle bedøves med æter. hERG kanalen er en Kalium ionkanal der bl.a. indgår i styringen af hjerterytmen. Det er bl.a. signaler fra hERG kanalen der registreres på et elektrokardiogram. Forstyrrelser af hERG kanalen kan medføre hjerterytm, med pludselig død til følge. Enhver påvirkning af hERG kanalen er således en særdeles uønsket bivirkning af et medikament, og hERG kanalen er derfor én af de vigtigste ionkanaler i den såkaldte 'safety pharmacology', hvor man checker potentielle lægemidler for uønskede bivirkninger.



Figur 3. Figuren viser en typisk safety screen protokol og tilhørende strømspor fra hERG ionkanaler. Den blå kurve viser spændingen som påtrykkes imellem den indre og ydre side af cellen. Den sorte kurve viser den resulterende strøm. Øverst på figuren vises skematisk, hvorledes strømsporet kan forstås som en følge af to separate lukkemekanismer (porte) som sidder i den samme ionkanal. Den blå (grønne) port reagerer ved at åbne (lukke) ved lave spændinger og lukke (åbne) ved høje spændinger. Den spidse top i strømsporet, som ses lige efter at spændingen falder, skyldes, at den blå port reagerer meget hurtigere end den grønne port. Dette giver anledning til en situation hvor begge porte er åbne samtidigt.

På figur 3 er vist et ionkanal-strømspor og tilhørende spænding fra en typisk hERG safety screen protokol. Målingen er udført på en QPatchTM. Det kan være katastrofalt for en farmaceutisk virksomhed at opdage bivirkninger for sent i udviklingen af et medikament, og det kan selvsagt medføre fatale følger for patienterne, hvis medicinen når at komme på markedet. Elektrofysiologi er derfor en uhyre vigtig disciplin for den farmaceutiske industri, men 'time to market' faktoren gør, at den meget omstændelige konventionelle pipetmetode, kun anvendes sent i forløbet, hvor de fleste stoffer allerede er diskvalificerede ved hjælp af andre metoder. Der var således fra den farmaceutiske industri efterspørgsel efter en billigere fuldautomatisk industriel metode, hvor mange forsøg kunne afvikles parallelt.

Udviklingen af chippen til patch clamping

Udviklingen af et fuldautomatisk patch clamp udstyr har krævet en koordineret indsats fra mange faggrupper, elektrofysiologer, cellebiologer, softwareudviklere, elektronikudviklere, mekaniske designere, robotprogrammører, mikroteknologer og fysikere. Udstyret består af en robot, som håndterer chips og stofbakker og pipetterer væsker. Derudover indeholder udstyret en multikanalforstærkerenhed med tilhørende dataopsamling, en trykreguleringsenhed, og endelig en chip, som pt. indeholder 16 parallelle måleenheder til patch clamping. Udstyret styres af en omfattende mængde software. I resten af artiklen beskrives primært udviklingen og funktionaliteten af chippen, da dette har mest relevans for et fysisk tidsskrift.

Som en god og billig erstatning for glaspipetten valgte vi at lave patch clamp hullet på en oxidbelagt Si-chip. Efter mange års udvikling af Silicium mikroelektronik, findes der et enormt antal standardprocesser til formning af Silicium [6]. Der findes en stor industri til fremstilling af mikroelektronik, hvor der også indgår bevægelige dele. Disse devices kaldes MEMS (Micro Electro Mechanical Systems). Et eksempel er accelerometre, der bl.a. bruges som sensorer til udløsning af airbags i biler. Vores chip har ingen bevægelige dele, men procesbiblioteket er det samme som bruges indenfor MEMS sektoren.

Denne fagre nye verden hvor også biologiske og kemiske forsøg foregår på en chip i stedet for i traditionelle glas og kolber kaldes også μ TAS (micro Total Analysis Systems), og hvis biologiske forsøg er involveret kaldes de tilhørende chips ofte for bioCHIPS eller bioMEMS. Under alle omstændigheder er der typisk tale om mikrosystemer hvor væsker indgår. For os gjaldt det om at finde den procesfølge som gjorde det muligt at opnå gigaseals på en chip.

Silicium processering foregår i et rent rum med enorm luftudskiftning, således at antallet af støvpartikler er minimalt. Man taler gerne om et klasse 100 renrum, hvor der højst må være 100 partikler større end 0,5 μ m per kubikfod luft. Operatørerne bærer

specielle renrumsdragter der skal forhindre afgivelsen af støvpartikler. Ved processerne kan man i princippet enten ætse (fjerne) materiale, eller påføre materiale på bestemte områder på en 'wafer'. En wafer er en tynd skive silicium énkystal med diameter på 4" – 8" (altså ca. 10 cm til 20 cm). Skivens tykkelse er typisk 0,5 mm. Ved hjælp af fotolitografi defineres de områder hvor ætsning eller påføring af materiale ønskes. Fotolitografi foregår ved at man lægger en tynd lysfølsom film over waferen og eksponerer filmen med UV-lys gennem en maske, som skygger for områder, der ikke ønskes belyst. Når filmen efterfølgende fremkaldes, blotlægges overfladen i veldefinerede områder som dermed er tilgængelige for ætsning eller pålægning af materiale.

Arbejdet med at udvikle et plant (fladt) substrat til patch clamping blev for alvor startet i foråret 2001, hvor vi begyndte at fremstille Silicium chips på MIC (Institut for Mikro- og Nanoteknologi på Danmarks Tekniske Universitet, DTU). Vi brugte en plastikholder, hvor 10 × 10 mm² chips med et patch clamp hul i midten kunne monteres. Plastikholderen blev placeret under et mikroskop i en opstilling der lignede en konventionel patch clamp opstilling. Cellerne blev suget på hullet med det sædvanlige mundsug, når operatøren i mikroskopet kunne se at en celle sedimenterede i nærheden af hullet (se figur 2C). Plastikholderen var ydermere forsynet med sølvelektroder. Elektroderne var forbundet til en kommerciel patch clamp forstærker, hvor data kunne måles og opsamles på en PC. Problemet var, hvordan hullet præcist skulle udformes for at opnå gigaohm-modstande. Der blev eksperimenteret med utallige geometrier og overfladebelægninger før de første rigtige målinger blev opnået i efteråret 2002.

I den mest hektiske fase, hvor firmaets overlevelse stod på spil, blev der arbejdet i toholdsskift. Wafere med huller blev fremstillet på MIC formiddag og eftermiddag af Sophions mikroteknologi folk. Disse blev sendt ud til Sophion i Ballerup med taxa, hvor de blev testet af biologerne med celler om aftenen. Næste morgen udveksledes erfaringer, og nye geometrier blev planlagt og fremstillet. Til sidst fandt vi frem til den optimale kombination af geometri, overflade og proces som gav en passende høj og reproducerbar succesrate for opnåelse af gigaseals (se figur 2D). En yderst vigtig milepæl for Sophion var nået, vi havde 'proof of concept' på, at gigaseal med celler kunne opnås på et plant substrat fremstillet med en industriel teknologi der muliggjorde massiv parallelisering af patch clamp forsøg. En erstatning for glaspipetten var fundet. Investorerne var tilfredse. Vi havde benyttet avanceret nanoteknologi til at etablere et interface mellem den mindste bestanddel af den menneskelige organisme (en celle) og et elektrisk målesystem.

Automatisk positionering af celler

Næste trin var at gøre patch clamp eksperimentet automatisk. Dette krævede, at cellerne kunne landes på

patch clamp hullet uden at operatøren igangsatte suget ved at følge med i mikroskopet og at mundsugget blev erstattet af en pumpe.

En af komplikationerne ved automatiseringen af cellepositioneringen var, at patch clamp hullet skulle være rent, før gigaseal med cellen kunne opnås. Hvis man bare startede suget, og ventede til der kom en celle på hullet, var der en stor risiko for at der forinden kom et stykke snavs (iturevet cellemembran f.eks.) på hullet, hvorved opnåelse af gigaseal blev umuligt. Vi valgte at cellerne skulle føres hen over hullet gennem en væskekanal. Udfordringen var nu at tilpasse strømningshastigheden i kanalen og kanaldimensionerne, så suget kunne times rigtigt. Når cellerne var over hullet, blev væskestrømmen i kanalen stoppet, cellerne fik lov til at sedimentere et stykke ned mod bunden af kanalen hvor hullet var, og så blev suget aktiveret. Denne metode er meget reproducerbar; med den rette timing kommer der næsten altid en celle på hullet. I de indledende forsøg observeredes cellernes bevægelse i mikroskop. Væskebevægelsen i kanalen blev styret med en elektrisk kanylepumpe der oven i købet muliggjorde at cellerne kunne 'køres' frem og tilbage indtil de lå lige over hullet. Senere blev kanylepumpen udskiftet med en gastrykpumpe.

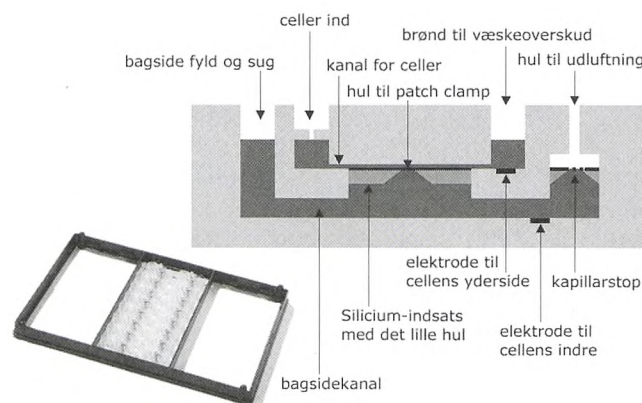
Den næste tekniske milepæl var nu nået. Vi havde fundet en pålidelig metode hvorved celler automatisk kunne landes på patch clamp hullet.

Priming, hvordan fylder man en chip med vand?

En af de store tekniske udfordringer indenfor μ TAS er forbindelsen til omverdenen. F.eks. er det ret nemt at designe et system med mikroskopiske væskekanaler, men det kan være svært at få fyldt disse kanaler med væske. Hvis man pipetterer en dråbe vand på en μ L (1 mikroliter = 1 mm^3) ned i en lille brønd med hul i bunden forbundet til en væskekanal, vil vandet fra dråben ikke nødvendigvis løbe ned igennem hullet, ligesom en liter vand der – påvirket af tyngdekraften – løber ud gennem afløbet i en håndvask.

Små væskemængder som disse vil typisk klæbe til pipetten eller til siden af brønden. Dette skyldes, at når væskemængden bliver tilstrækkelig lille, vil forholdet mellem overfladeareal og rumfang øges og de molekulære bindinger mellem vandmolekylerne (de såkaldte van der Waals kræfter) på dråbens overflade, og mellem vandmolekylerne og brøndens væg, vil begynde at dominere over tyngdekraften. De molekulære kræfter søger at holde sammen på vanddråben. Dette fænomen er kendt som overfladespænding. Når insekter kan gå på vand, skyldes det at de ikke er tunge nok til at deres ben bryder overfladespændingen. Overfladespænding måles i Newton per meter [N/m]. For vand er overfladespændingen γ_L til luft ca. 73 mN/m ved 20° C. Ved stigende temperatur eller tilsætning af sæbe og afspændingsmidler mindskes overfladespændingen for vand, hvorfor det er en fordel at vaske hænder i

varmt vand og sæbe. Ved mindre overfladespænding har vandet lettere ved at trænge ind og vætte (væde) de små afkroge på huden og opløse urenheder. For at få en fornemmelse af, hvornår overfladespændingen dominerer over tyngdekraften, kan man beregne kapillarlængden, $l_c = \sqrt{\gamma_L/g\rho}$, hvor ρ er massefylden af vand og g er tyngdeaccelerationen. For vand bliver kapillarlængden ca. 2 mm. Dvs. for dimensioner mindre end en millimeter holder vand op med at opføre sig som en flydende væske og begynder at opføre sig mere som klistrede dråber.



Figur 4. Nederst: Billede af QPlateTM. QPlateTM er en chip til 16 parallelle patch clamp målinger på levende celler. Bemærk de tomme huller i rammen der skal gøre plads til to ekstra indsatses så i alt 48 forsøg kan afvikles i parallel i den næste version af udstyret. Øverst: Skematisk principdiagram af kanalstrukturen i en QPlateTM.

På figur 4 er vist et principdiagram for den endelige chip. Det var især bagsidekanalen, som har kontakt til det indre af cellen, der var vanskelig at fylde med væske. I princippet er det nemt nok, man skal bare presse væsken ind gennem indløbshullet og vente til al luften er kommet ud gennem det lille patch clamp hul. Problemet er dog, at dette tager meget lang tid. Luftstrømmen gennem en kanal som er 1-10 μ m lang og har en diameter på 1-2 μ m er nogle pL per sekund per hPa trykforskel. Med et tryk på 300 hPa vil det derfor tage ca. 20 minutter at presse en mikroliter luft igennem kanalen. Løsningen måtte blive, at luften der blev fortrængt af vandet skulle ud et andet sted med en mindre strømningsmodstand.

Den elegante løsning på problemet blev indførelsen af et kapillarstop. Kapillarstoppet blev monteret for enden af bagsidekanalen. Kapillarstoppet var indrettet således, at det havde en samlet strømningsmodstand, der var lille nok til at luften kunne komme ud af kanalen hurtigt, men samtidigt havde den egenskab, at væskefronten på grund af kapillarkræfterne blev fanget ved kapillarstoppet. Kapillarstoppet består af en masse små huller. Når en væske skal presses igennem et lille hul kræves et kritisk tryk for at vætte overfladen på den anden side af hullet. Det kritiske tryk er givet ved $p_c = f(\theta)\gamma_L/d$, hvor d er hullets diameter og $f(\theta)$ er en geometrisk dimensionsløs forfaktor af størrelsesorden én, der kun afhænger af hullets specifikke geometri og

af kontaktvinklen mellem væsken og hullets overflademateriale.

For den før nævnte værdi af vands overfladespænding fås at p_c med $d = 1\mu\text{m}$ bliver af størrelsesordenen 700 hPa, altså et ganske betragteligt tryk. Det smarte ved denne løsning er, at hvert af hullerne kan holde et tryk af størrelsesordenen p_c , mens strømningshastigheden er proportional med antallet af huller. Med mange små huller i kapillarstoppet opnås en hurtig udtømmning af luft og et højt holdetryk, p_c , for væsken. Der gælder ydermere samme betragtning for en negativ trykforskel. Når væskefronten således er nået hen til kapillarstoppet, skal man også overskride et kritisk sugetryk for at trække den tilbage igen. Dette er absolut nødvendigt, idet der skal bruges et sug for at suge hul på cellerne ved overgangen til whole cell konfigurationen. Den endelige udgave af QPlate™, som er varebetegnelsen for vores chip, indeholder kapillarstop, både i frontsidekanalen og bagsidekanalen, og kan fyldes med væske med en passende optimeret sekvens af gastryk på for- og bagside.

Produktmodningen

Alle ingredienser var nu på plads. Vi havde 'proof of concept' på alle nødvendige teknologier, for at fremstille en chip til patch clamping. Tilbage stod at finde en industriel plast indpakning, og at overføre Silicium processerne fra MIC til en rigtig Silicium fabrik. Det stod klart, at indpakningen skulle fremstilles af sprøjtestøbte plastkomponenter. De enkelte celleprototyper vi hidtil havde arbejdet med var fremstillet ved sædvanlig maskinbearbejdning, som i det lange løb er meget dyrere end sprøjtestøbning. Vi gik i gang med at identificere passende partnere til disse processer og arbejdede i parallel med flere virksomheder. Vi havde f.eks. kontakt med en svensk, en hollandsk og en tysk virksomhed til fremstilling af chips, og med en dansk og en tysk virksomhed til fremstilling af plastkomponenterne og samlingen af alle stumperne. Vi endte med at gå videre med de to tyske virksomheder.

Den lille tyske virksomhed thinXXS microsystems GmbH, kom med en utrolig elegant løsning til samlingen. Udfordringen var her, at samlingen skulle være vandtæt og have en høj elektrisk isolationsmodstand. Plastdelene skulle indeholde væskekanaler og pipetteringsbrønde, således at væske kunne pipetteres ned på chippen oppefra. Interface til trykkontrol skulle også ske fra oversiden. Væskekanalerne skulle desuden skabe forbindelse til elektroder på et keramisk printkort i bunden af chippen. Med thinXXS' løsning af plastindpakningen kunne alt dette lade sig gøre uden brug af lim. Der skulle dog flere iterationer af sprøjtestøbning til før det hele virkede. Det tog sin tid, da der skulle laves en ny støbeform hver gang noget skulle ændres.

Den endelige QPlate™ indeholder pt. 16 stk. $3 \times 5\text{ mm}^2$ chips. Disse chips består af et stykke Silicium og et stykke glas som er 'bondet' sammen. Silicium er dækket med SiO og indeholder patch clamp hul og

kapillarstop. I glasdelen er forside strømningskanalen defineret. De keramiske printkort med elektroderne bliver leveret af en lille men effektiv dansk virksomhed. Vi har et fantastisk godt samarbejde med disse underleverandører, og selvom vi betaler for deres produkter, har deres indsats bestemt ikke været uden risiko. Underleverandørerne har hele vejen igennem troet på forretningsmodellen i automatisk patch clamping. QPlate™ er nu et kommercielt produkt og udgør sammen med QPatch™ et system til automatisk patch clamp forsøg.

Tak til

alle vores kolleger og samarbejdspartnere, både nuværende og tidligere, der gennem udviklingsforløbet har bidraget til denne artikel. Specielt til Niels J. Willumsen, for diskussionerne vedrørende hERG kanalen.

Litteratur

- [1] G. D. Smith et al., "TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein", *Nature* bind **418**, 186-190 (11 July 2002)
- [2] Bertil Hille, *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed., ISBN 0-87893-321-2, Sinauer Associates, s.15-17.
- [3] nobelprize.org/medicine/laureates/1991/press.html
- [4] HEK-293 F.L. Graham, J. Smiley, W.C. Russell, R. Nairn, "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5", *J. Gen. Virol.*, bind **36(1)**, 59-74 (July 1977).
- [5] M.C. Sanguinetti, C. Jiang, M.E. Curran and M.T. Keating, "A Mechanistic Link between an Inherited and an Acquired Cardiac Arrhythmia: hERG Encodes the IKr Potassium Channel", *Cell* bind **81**, 299-307 (1995).
- [6] Marc J. Madou, *Fundamentals of Microfabrication*, 2nd ed., ISBN 0-8493-0826-7.



Rafael Taboryski, 42 år, Director, consumables technology, ph.d. i fysik og erhvervsforsker fra KU og Ferroperm A/S. Ansat i Sophion Bioscience siden maj 2001, projektleder for udviklingen af QPlate™. Tidligere ansættelser ved DFM, Institut for Fysik på DTU og Cavendish Laboratoriet ved Cambridge universitet.



Simon Pedersen, 35 år, Research scientist, ph.d. i fysik fra Niels Bohr Institutet. Ansat i Sophion Bioscience siden august 2002. Han er primært beskæftiget indenfor det tværdisciplinære område imellem fysik og elektrofysiologi i forbindelse med udvikling af QPlate™ og QPatch™. Tidligere ansættelse ved EMP på Chalmers University of Technology.