

Untersuchungen zur Zell-Transistor Kopplung mittels der Voltage-Clamp Technik

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich
Chemie und Pharmazie der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Michael Krause
geboren in Kaiserslautern

Mainz 2000

Tag der mündlichen Prüfung:

06.07.2000

Die vorliegende Arbeit wurde unter Betreuung von
Herrn Prof. Dr. W. Knoll und
Herrn Dr. A. Offenhäuser
in der Zeit von

November 1997 bis April 2000 am

Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz und am

Institute for Physical and Chemical Research (RIKEN),
Wako (Tokio, Japan)

angefertigt.

Gewidmet meinen Eltern
Brigitte und Wolfgang Krause

Inhalt

Formelzeichen

Abkürzungen

1	Einleitung.....	1
2	Grundlagen der bioelektronischen Kopplung.....	5
2.1	Sensoren.....	5
2.1.1	Feldeffekttransistoren (FET).....	5
2.1.2	Extended-Gate-Electrode (EGE).....	10
2.2	Elektrisch erregbare Zellen.....	11
2.2.1	Grundstruktur einer Zelle.....	11
2.2.2	Ruhepotential.....	12
2.2.3	Hodgkin-Huxley Theorie.....	13
2.3	Zell-Sensor-Kopplung.....	18
2.3.1	Punkt-Kontakt-Modell.....	19
2.3.2	Kopplungstypen.....	20
2.3.2.1	Geringe Ionenkanalleitfähigkeit.....	21
2.3.2.2	Hohe Ionenkanalleitfähigkeit.....	23
3	Sensoren.....	25
3.1	Extended-Gate-Electrode Array (EGEs).....	25
3.1.1	Layout EGE.....	25
3.1.2	Aufbau der EGE.....	29
3.1.3	Charakterisierung des EGE Arrays.....	32
3.2	Feldeffekttransistoren (FETs).....	34
3.2.1	Layout FET.....	35

3.2.2	Prozessbeschreibung.....	35
3.2.2.1	p-Kanal Feldeffekttransistoren.....	36
3.2.2.2	n-Kanal Feldeffekttransistoren.....	38
3.2.3	Gategrößen.....	41
3.2.4	Aufbau der FET Arrays	43
3.2.5	Charakterisierung der FET Arrays.....	44
3.2.5.1	p-Kanal FET.....	45
3.2.5.2	n-Kanal FET.....	47
4	Experimenteller Aufbau	53
4.1	Messaufbau.....	53
4.2	Messelektronik.....	56
4.2.1	EGE Messplatz	57
4.2.2	Rauschverhalten der EGE.....	60
4.2.3	FET Messplatz.....	63
4.2.4	Rauschverhalten der FET	64
4.3	Versuchsdurchführung.....	66
4.3.1	Patch-Clamp Methode	66
4.3.2	Kopplungsmessung Transistor-Zelle.....	70
5	Zell-Transistor-Kopplung.....	75
5.1	Neuroblastoma Zell-Linie SH-SY5Y	77
5.1.1	Zellkultur	77
5.1.2	Elektrophysiologische Charakterisierung der SH-SY5Y Zellen	78
5.1.3	Entwicklung der SH-SY5Y Zellen auf den Sensoren.....	81
5.1.4	Signaleinkopplungen von SH-SY5Y in FET und EGE.....	82
5.1.4.1	Zellen ohne aktive Ionenkanäle.....	83
5.1.4.2	Zellen mit aktiven Ionenkanälen.....	90
5.2	Humane Endothelzellen - Linie EA.hy - 926	106
5.2.1	Zellkultur	107
5.2.2	Entwicklung der EA.hy-926 Zellen auf den FET und EGE	107
5.2.3	Signaleinkopplung von EA.hy-926 in FET und EGE.....	108
5.3	Hippocampale Neuronen	113
5.3.1	Zellpräparation.....	113
5.3.2	Elektrophysiologische Charakterisierung der Neuronen	114

5.3.3	Morphologische Entwicklung hippocampaler Neurone auf den FET und EGE	117
5.3.4	Signaleinkopplung in den FET und EGE.....	119
5.3.4.1	Zellen ohne aktive Ionenkanäle	119
5.3.4.2	Zellen mit aktiven Ionenkanälen	123
5.4	Kardiomyozyten	132
5.4.1	Präparation der Kardiomyozyten.....	132
5.4.2	Elektrophysiologische Charakterisierung der Kardiomyozyten.....	134
5.4.3	Entwicklung der Kardiomyozyten auf den Sensoren	136
5.4.4	Kopplungsexperimente mit konfluenten Zellen.....	137
5.4.4.1	Korrelation zwischen Membranpotential V_M und extrazellulären Signal V_J	137
5.4.4.2	Kopplung mit Topographieelektroden.....	138
5.4.4.3	Multisite Kopplung.....	139
5.4.4.4	Signaltypen des extrazellulären Aktionspotentials.....	140
5.4.4.5	Hohe K^+ -Ionenleitfähigkeit im Kontaktbereich.....	143
5.4.4.6	Vergleich der Signale gemessenen mit FET und EGE	145
5.4.5	Einzelzell-Experimente	147
5.4.5.1	Zellen ohne aktive Ionenkanäle	147
5.4.5.2	Zellen mit aktiven Ionenkanälen	149
6	Zusammenfassung.....	161
7	Anhang.....	165
7.1	Fabrikationsprozesse	165
7.1.1	p-Kanal Feldeffekttransistoren.....	165
7.1.2	n-Kanal Feldeffekttransistoren.....	170
7.1.3	Extended-Gate-Electrode (EGE).....	173
7.2	Patch Clamp Ausstattung	176
7.3	Geräteverzeichnis	177
7.4	FET und EGE Aufbau	178
7.5	Chemikalien und Rezepturen	179
	Literatur.....	183

Formelzeichen

A_M	Membranfläche
A_{FM}	Freie Membranfläche
A_{JM}	Membranfläche im Kontaktbereich
A_{Gate}	Gatefläche
A_{El}	Elektrodenfläche
b	Geometrische Kanalbreite
C_M	Membrankapazität
c_M	spezifische Membrankapazität
C_{Streu}	Streukapazität
d_i	Dicke der Oxidschicht
e	Elementarladung eines Elektrons
E	Elektrisches Feld
E_i	Nernst-Potential
E_{Na}	Umkehrpotential Na^+
E_K	Umkehrpotential K^+
E_{Ca}	Umkehrpotential Ca^{2+}
E_{St}	elektrisches Steuerfeld
g_J	spezifische Abdichtleitfähigkeit
g_m	Gatesteilheit
g_{JM}^L	spezifische Leckleitfähigkeit (Leckstrom)
g^{Na}	spezifische Membranleitfähigkeit für Na^+
g^K	spezifische Membranleitfähigkeit für K^+
g^{Ca}	spezifische Membranleitfähigkeit für Ca^{2+}
i_M	Ionenstromdichte
I	Elektrischer Strom
I_H	Haltestrom
I_i	Ionenstrom
I_{DS}	Drain-Source-Strom

Formelzeichen

I_M	Membranstrom
I_P	Patch-Strom
I_{Puls}	Strompuls
I_{DS}^{max}	Strom im Abschnürbereich
k	Boltzmannkonstante
k_p	Transistorkonstante für p-Halbleiter
L'	Geometrische Kanallänge
L	Effektive Kanallänge
n	Ladungsträgerdichte
R_J	Abdichtwiderstand des Kontaktbereichs
R_M	Membranwiderstand
R_{Patch}	Öffnungswiderstand der Patch-Elektroden
R_S	Zuleitungswiderstand
$R_{Zuleitung}$	Drain-Zuleitungswiderstand
R_{\square}	Quadratwiderstand
t	Zeit
T	Absolute Temperatur
V_{DS}	Drain-Source-Spannung
V_{DSP}	Abschnürspannung
V_{GS}	Gate-Source-Spannung
V_M^H	Haltepotential
V_M^{Puls}	Membranpotential nach der Depolarisierung
V_{St}	Spannungspuls
V_{TH}	Schwellspannung
V_J	Gate-Potential
V_M	Membranpotential
V_{RP}	Ruhepotential der Zelle
X^L	Skalierungsfaktor für die spezifische Leckleitfähigkeit
X^i	Skalierungsfaktor für die spezifische Ionenleitfähigkeit Na^+ , K^+ und Ca^{2+}
X_i	Ionenkonzentration
σ	Oberflächenladung
ϵ_i	Dielektrizitätskonstante×Dielektrizitätszahl
$\mu_{n,p}$	Elektronen- und Defektelektronen-Leitfähigkeit

Abkürzungen

AP	Aktionspotential
A/D-Wandler	Analog/Digital-Wandler
CC-Modus	<i>Current-Clamp</i> Modus
D/A-Wandler	Digital-Analog-Wandler
DIC	Differential-Interferenzkontrast
DIV	Tage in Kultur
EGE	Extended Gate Electrode (Metallmikroelektroden)
EOSFET	Elektrolyt-Oxid-Semiconductor FET
FET	Feldeffekttransistor
JFET	JunctionFET (Sperrstrom-FET)
IGFET	Insulated-Gate-FET
VC-Modus	<i>Voltage-Clamp</i> Modus

1 Einleitung

Die Verarbeitung von Reizen biologischer Organismen ist in ihrer Gesamtheit sehr komplex. Dabei spielt die Entstehung, Weiterleitung und die Reaktion auf elektrische Signale eine besondere Rolle. So sind die Signalwandlung optischer Reize durch Rezeptoren, die elektrische Signalfortpflanzung über das Nervensystem oder die Kontraktion von Muskelzellen auf elektrische Stimulation nur einige Beispiele wie Lebensformen in ihrer Umwelt agieren und reagieren. Um dieses biologische Signalverarbeitungssystem besser Verstehen zu können, erfordert es sich auf der Zellebene zu bewegen und mit Signalgrößen im mV-Bereich zu experimentieren.

Eine invasive Technik zur Untersuchung elektrischer Eigenschaften ist die Membran der Zelle mit einer Glaselektrode zu durchstoßen. Durch diese Technik konnten Aktionspotentiale aufgenommen werden, die durch [Hodgkin, 52] mit dem Vorhandensein spannungsabhängiger Ionenkanäle beschrieben wurden. Eine Methode, die durch [Neher, 76], [Hamill, 81] eingeführt wurde, ist die Patch-Clamp Technik. Dabei wird die Glaselektrode an die Zellmembran angesetzt und die Membran geöffnet. Diese sog. *Whole-Cell* Konfiguration ermöglicht die Untersuchung dieser spannungsabhängigen Ionenkanäle.

Die Nachteile der mit den Glaselektroden durchgeführten Untersuchungen liegen in der Zerstörung der Zelle. Um diesen Nachteil zu umgehen, wurden mit Hilfe der Dünnschichttechnologie Metallelektroden entwickelt. Die Einführung von Metallmikroelektroden Arrays von [Gross, 77], [Pickard, 79] und [Gross, 95], erlaubt dann eine extrazelluläre Signaldetektion. Die Elektroden können durch verschiedene Dünnschichtmethoden, Materialien sowie Strukturierungen hergestellt werden. Die Materialien Gold, ITO, TiN sowie Goldelektroden mit Platinoberfläche besitzen für die Messungen mit diesen Arrays die notwendige Biokompatibilität und die für das Messprinzip erforderlichen niedrigen Impedanzen [Hämmerle, 94], [Nisch, 94]. Der Ansatz mit den Metall-

mikroelektroden erlaubt so auch, die Zellen für längere Zeit auf diesen Sensoren in Kultur zu halten. Die Vorteile der Metallmikroelektroden Arrays liegt zum einen in ihrer einfachen Herstellung und zum anderen in der Tatsache das Messungen an mehreren Orten gleichzeitig durchgeführt werden können. Typische Zellsysteme die mit diesen Metallmikroelektroden untersucht werden können sind die Kardiomyozyten, Herzmuskelzellen von Säugetieren die selbstständig Aktionspotential ausbilden und auch aufgrund der mechanischen Kontraktion optisch sichtbar sind [Israel, 84].

Ein anderer Ansatz für die extrazelluläre Signalkopplung liegt in der Einführung der Feldeffekttransistoren als Halbleiterbausteine. Die erste Messung an Muskelfasern gelang [Bergveld, 70], [Bergveld, 76] mit einem ionensensitiven FET, der damit den Weg für weitere Entwicklungen auf diesem Gebiet bereitete.

Die Weiterentwicklung von [Fromherz, 91] und [Offenhäusser, 95] bei denen aus der Elektronik bekannten Feldeffekttransistoren als Metall-Oxid-FET (MOSFET) durch einen modifizierten Prozessablauf ein extrazellulärer Sensor hergestellt wird. Der Herstellungsprozess führt dann auf einen Elektrolyt-Oxid-FET (EOSFET) wobei die Zelle dann auf dem biokompatiblen Silizium-Oxid aufliegt und das Gatepotential beeinflusst.

Die Anwendungsgebiete für die extrazelluläre Signalerfassung sind zum einen der Einsatz solcher Meßsysteme im Bereich der Pharmakologie. Hier lassen sich durch die genaue Zuordnung der extrazellulären Signale zu der Reaktion der Zellen auf Medikamente die Zahl der aufwendigen invasiven Messprogramme deutlich reduzieren. Zum anderen kann der gezielte Einsatz solcher Sensorsysteme im Bereich der Wiederherstellung der Sehfunktion in Zukunft möglich werden, oder die Weitergabe von Stimulationssignalen an das Muskelgewebe, wie es heutzutage schon bei den Herzschrittmachern durchgeführt wird. Zukünftige Aufgaben zielen darauf ab zweidimensionale neuronale Netzwerke auf solchen Signalwandlern aufzubauen um auch in Gebiete des Denkens, der Sprache und des Lernens vorzustoßen. Die Anwendungen solcher extrazellulärer Sensorsysteme erfordert es noch sensitivere EOSFETs herzustellen die ein gutes signal-to-noise Verhalten aufweisen, sowie neue Messmethoden zu entwickeln. Auch das Wissen der Entstehung und Ausbreitung von extrazellulären Signalen sowie deren Zuordnung zu äußeren Stimulationen ist wichtig um diese Sensorsysteme erfolgreich in der Praxis einzusetzen.

Aufbauend auf diesem thematischen Hintergrund sollen in der vorliegenden Arbeit die folgenden Aufgaben erfüllt werden:

- Die Entwicklung der Sensoren umfasst die Weiterentwicklung der p-Kanal Feldeffekttransistoren sowie die Neueinführung von n-Kanal Feldeffekttransistoren, in der Ausführung als EOSFET.
- Die Entwicklung von Metallmikroelektroden (Extended-Gate-Elektrode: EGE) mit verschiedenen Elektrodendimensionen und Topographien.
- Aufbau der EGE Arrays zu einem Sensor.
- Anfertigung eines Messplatzes und der zugehörigen neuartigen Messelektronik für den Einsatz der EGE Arrays als extrazellulärer Sensor.
- Als Zelllinie sollen humane Neuroblastoma Zell-Linie SHSY-5Y und die Endothelium Linie EA.hy-926 in die Kopplungsmessung eingeführt werden.
- Als Primärzellen dienen die hippocampalen Neuronen und Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) von Ratten.
- Alle Kopplungsmessungen sollen im *Voltage-Clamp* Modus durchgeführt werden und anhand einer passenden Kopplungstheorie erklärt werden.
- Kopplungsexperimente im *Current-Clamp* Modus sollen durch die Ergebnisse der *Voltage-Clamp* Messungen erklärt werden.

Die Arbeit ist wie folgt aufgebaut:

- Im Kapitel *Grundlagen der bioelektronischen Kopplung* werden die Grundlagen der Feldeffekttransistoren als Sensorsystem, der Aufbau der Zellen im Hinblick auf die Funktionsweise spannungsabhängiger Ionenkanäle und deren Beitrag an den gemessenen Aktionspotentialen erklärt. Des Weiteren wird die Theorie der Zell-Transistor Kopplung beschrieben.

- Im Kapitel *Sensoren* wird der Herstellungsprozess, die Strukturierung und der Aufbau der EGE und FET Arrays beschrieben. Zusätzlich werden die elektrischen Eigenschaften der p- und n-Kanal FETs und der EGEs untersucht.
- Im Kapitel *Experimenteller Aufbau* wird der Messaufbau und dessen Komponenten beschrieben, die zur Aufzeichnung der extrazellulären Signale erforderlich sind, sowie das Messprinzip und die nötige Messelektronik.
- Im Kapitel *Zell-Transistor-Kopplung* werden die Kopplungsexperimente mit den verwendeten Zellsystemen, die mit Hilfe der Patch-Clamp Technik durchgeführt werden, dargestellt.
- Das Kapitel *Zusammenfassung* stellt alle Ergebnisse der Arbeit zusammen und gibt einen Ausblick auf zukünftige Folgearbeiten.
- Das Kapitel *Anhang* enthält die ausführliche Prozessbeschreibung für die Herstellung der p- und n-Kanal Feldeffekttransistoren und der Extended-Gate-Electrode Arrays, sowie ein Geräteverzeichnis und eine Auflistung der verwendeten Chemikalien.

2 Grundlagen der bioelektronischen Kopplung

Die Verbindung von lebenden elektrisch aktiven Zellsystemen und elektronischen Halbleiterbausteinen zur extrazellulären Signalableitung erfordert die Kenntnisse über den Aufbau und die Funktionsweise einer Zelle sowie der Funktion des Feldeffekttransistors (FET) und der Extended-Gate-Electrode (EGE) als extrazelluläres Sensorsystem. In den folgenden Abschnitten werden die Funktionsweise der p- und n-Kanal Feldeffekttransistoren sowie der EGE als Signalwandler erläutert. Danach werden die Elemente einer Zellmembran beschrieben, im besonderen die spannungsgesteuerten Ionenkanäle, die für die Entstehung von Aktionspotentialen verantwortlich sind. Zum Abschluss dieses Kapitels werden die Kopplungsmodelle diskutiert, die Größe und zeitlichen Verlauf des extrazellulären Signals, welches mit den Sensoren detektiert wird, beschreiben.

2.1 Sensoren

2.1.1 Feldeffekttransistoren (FET)

Zur Messung der von den Zellen produzierten Potentialänderungen außerhalb der Membran sind Sensoren notwendig, die geringe Potentialveränderungen detektieren können. Ein Halbleiterbauelement, welches Potentialänderungen zur Strommodulation benutzt ist der Feldeffekttransistor.

Die hier vorgestellten und in der Arbeit verwendeten Halbleiter-Transistoren haben drei Anschlüsse Source, Drain und Gate. Der Ladungsträgerstrom I_{DS} der zwischen Source und Drain fließt wird durch ein senkrechtes elektrische Feld E_{St} zwischen dem Source- und Gateanschluß gesteuert, mit der Gate-Source Spannung V_{GS} , [Müller, 87], [Löcherer, 92], [Tholl, 76] und [Tholl, 78]. Dabei ist $\sigma(E_{St})$ die oberflächennahe Ladung und μ_n die Beweglichkeit der Elektronen.

$$I_{DS} \propto \sigma(E_{St}) V_{DS} \propto q n \mu_n(E) V_{DS} \propto V_{GS} V_{DS} \mu_n \quad (2.1)$$

Die Ladungsträgerdichte n wird vom senkrechten elektrischen Feld E_{St} vergrößert oder verkleinert und der durch die Spannung V_{DS} erzeugte Strom erfährt eine Änderung.

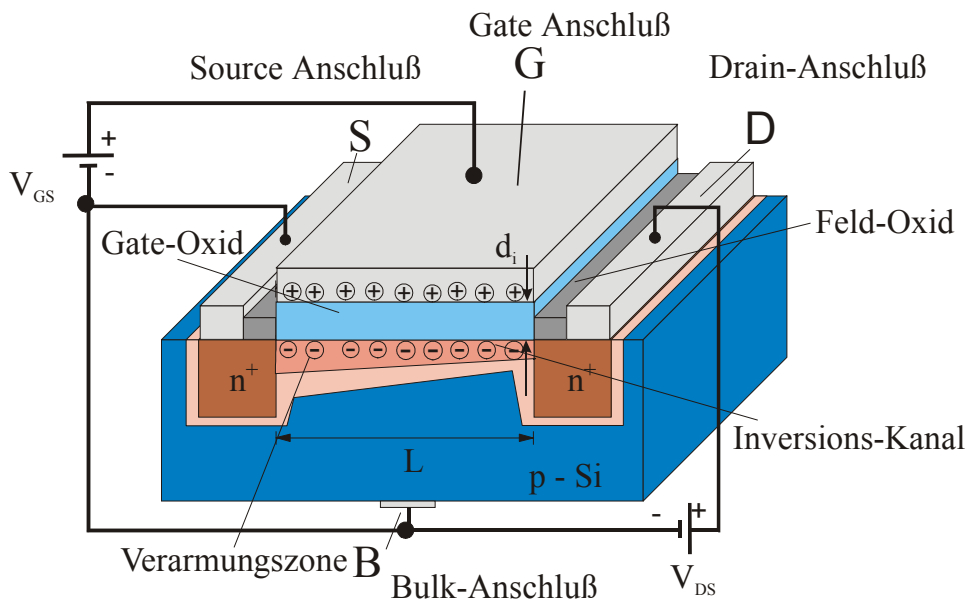


Bild 2.1: Querschnitt durch einen n-Kanal Anreicherungs-Metall-Oxid-FET (MOSFET). Zwischen den beiden n-dotierten Source und Drain Bereichen wird bei positiver Gatespannung V_{GS} ein Inversionskanal erzeugt. Die Source-Drain Spannung führt dann zu einem Strom durch diesen Inversionskanal.

Bei den Feldeffekttransistoren mit Metall-Oxid-Halbleiter Konstruktion wird zwischen zwei Steuerungsarten unterschieden. Bei der Verarmungsteuerung liegen auch ohne äußerem Steuerfeld im Kanal Ladungsträger vor, wenn im Kanal die gleiche Dotierung wie in den Drain-Source Gebieten vorliegt. Bei diesem selbstleitenden FET erfolgt die Steuerung durch das elektrische Feld mit der Reduzierung der Ladungsträger im Kanal. Im Gegensatz dazu müssen bei der Anreicherungsteuerung im Kanal erst Ladungsträger

durch das elektrische Steuerfeld erzeugt werden. Die Steuerung erfolgt somit durch die Erzeugung von Ladungsträgern im Inversionskanal. Die in dieser Arbeit hergestellten FETs sind p- und n- Kanal Anreicherungstypen sowie n- Kanal Verarmungstypen.

Die Verdeutlichung der genauen Funktionsweise eines FETs wird anhand eines n-Kanal Anreicherungstypen (Bild 2.1) verdeutlicht. Zur Herleitung der Kennliniengleichung wird die sog. „Gradualnäherung“ eingesetzt, [Müller, 87].

Bei diesem FET-Typ liegt beim Anlegen von $V_{GS} = 0$ V keine leitende Trägerschicht im Kanalbereich vor und es fließt beim Anlegen von V_{DS} kein Drain-Source Strom. Durch die Erhöhung der zwischen Source und Gate angelegten Spannung V_{GS} erzeugen die positiven Ladungen an der Oberfläche des Oxids durch Influenz negative Ladungen an der Grenzfläche Oxid/p-Substrat (Kanal). Zur Berechnung von I_{DS} werden die durch den Potentialabfall $V(x)$ am Ort x erzeugten negativen Ladungsträger entlang des Kanals der Länge L integriert. Der beobachtete Strom wird in der folgenden Gleichung beschrieben.

$$I_{DS} = k_n \frac{b}{L} \left(V_{GS} - V_{Th} - \frac{V_{DS}}{2} \right) V_{DS} = \beta_n \left(V_{GS} - V_{Th} - \frac{V_{DS}}{2} \right) V_{DS} \quad (2.2)$$

mit der Transistorkonstanten für p- und n-dotiertes Substrat.

$$k_n = \mu_n \frac{\epsilon_i}{d_i} \quad \text{und} \quad \beta_n = k_n \frac{b}{L} \quad (2.3)$$

$$k_p = \mu_p \frac{\epsilon_i}{d_i} \quad \text{und} \quad \beta_p = k_p \frac{b}{L} \quad (2.4)$$

Die Stromkennlinien mit $I_{DS} = I_{DS}(V_{DS})|_{V_{GS}=\text{const}}$ nennt man Ausgangskennlinien des MOSFET. Die für die Charakterisierung wichtigere Transferkennlinie wird durch $I_{DS} = I_{DS}(V_{GS})|_{V_{DS}=\text{const}}$ beschrieben.

Im Anlaufbereich zwischen $V_{DS} < V_{GS} - V_{Th}$, mit der Schwellspannung V_{Th} , arbeitet der FET als spannungsgesteuerter Widerstand. Dies ändert sich wenn $V_{DS} = V_{GS} - V_{Th} = V_{DSP}$ wird und der Kanal im Bereich des Drain abgeschnürt wird. Der maximale Strom I_{DS}^{\max} erreicht im Abschnürpunkt einen konstanten Wert.

$$I_{DS}^{\max} = k_n \frac{b}{2L} (V_{GS} - V_{Th})^2 \quad (2.5)$$

Bei Spannungen $V_{DS} > V_{DSP}$ bleibt der Strom konstant auf seinem maximalen Wert. Experimentell beobachtet man ab dem Abschnürpunkt V_{DSP} ein leichtes Ansteigen des Stroms $I_{DS} = I_{DS}(V_{DS})$. Zur Verdeutlichung des Verlaufs werden die Ausgangskennlinien für einen n- und p-Kanal Anreicherungs-FET (Bild 2.2) und (Bild 2.3) für verschiedene V_{GS} -Spannungen simuliert.

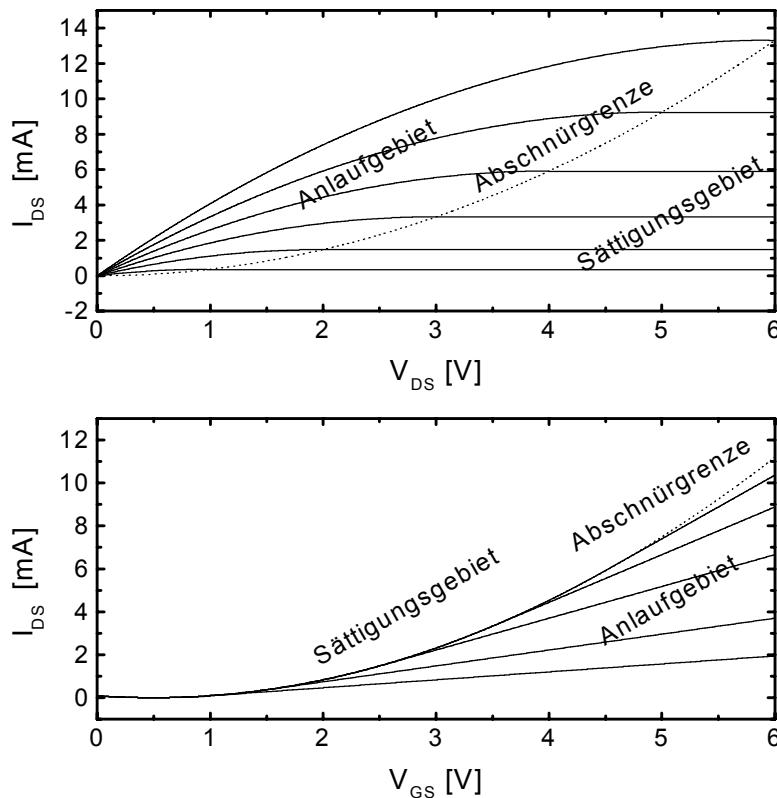


Bild 2.2: n-Kanal Anreicherungstyp: Simulation (Gradual Näherung) Ausgangskennlinien (oben), Transferkennlinien (unten). Simulation der Kennlinien mit einer Elektronenbeweglichkeit von $\mu_n = 670 \text{ cm}^2/\text{Vs}$ [Müller, 87], einem d_i von 10 nm, einer Gatebreite von 16 μm und einer Gatelänge von 5 μm .

Die Simulation der Transferkennlinien für beide FET Typen (Bild 2.2) und (Bild 2.3) erfolgt mit Gleichung (2.2) durch konstante Werte für V_{DS} .

Besondere Bedeutung kommt dem Klein-Signalverhalten des FETs zu. Der Einsatz der Feldeffekttransistoren als Zellsensoren erfordert es, dass kleine Potentialveränderungen

am Gate zu einer möglichst großen Änderung des Stromes I_{DS} führen. Diese für den FET charakteristische Größe wird Steilheit g_m bezeichnet.

$$g_m = \frac{dI_{DS}}{dV_{GS}} \quad (2.6)$$

Aus den Transferkennlinien wird die Steilheit bestimmt. Im Anlaufgebiet $V_{DS} < V_{GS} - V_{Th}$ ergibt sich für g_m

$$g_m = k_n \frac{b}{L} V_{DS} \quad (2.7)$$

In diesem aktiven Bereich ist die Steilheit unabhängig von der Gate-Source Spannung V_{GS} . Somit kann der FET im Punkt mit der größten Steilheit (Arbeitspunkt), am empfindlichsten Potentialänderungen, die am Gate entstehen, in eine hohe Änderung des Source-Drain Stromes transformieren.

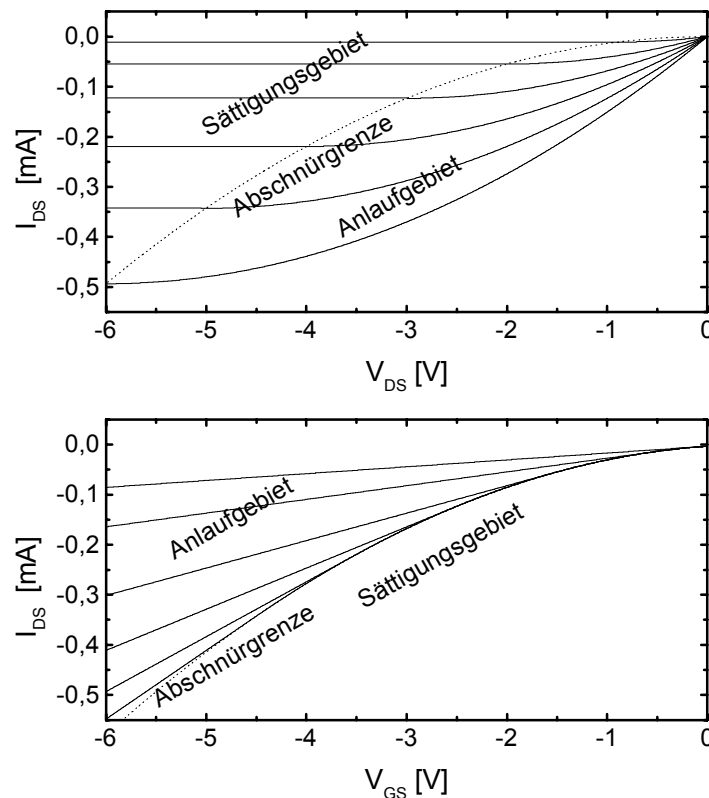


Bild 2.3: p-Kanal Anreicherungstyp: Simulation (Gradual Näherung) Ausgangskennlinien (oben), Transferkennlinien (unten). Simulation der Kennlinien mit einer Elektronenbeweglichkeit von $\mu_p = 220 \text{ cm}^2/\text{Vs}$ [Müller, 87], einem d_i von 10 nm, einer Gatebreite von 16 μm und einer Gatelänge von 5 μm .

Die in Rahmen dieser Arbeit hergestellten und eingesetzten FETs in der Ausführung als Elektrolyt-Oxid-FET (EOSFET) unterscheiden sich zu den MOSFETs durch ihre Ansteuerung des Gates. Das Gate des EOSFET wird über den Elektrolyten angesteuert, der wiederum über eine Ag/AgCl-Elektrode potentialmäßig definiert ist [Bergveld, 76].

Die oben beschriebenen FET Typen werden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Ein kommerziell erhältlicher FET Typ der in Verbindung mit den produzierten EGEs in dieser Arbeit eingesetzt wird ist der Sperrschicht-FET oder auch Junction-FET (JFET), [Tholl, 78]. Der Unterschied zu den MOSFETs liegt in der Steuerung des Source-Drain Stroms. Beim n-JFET besteht der Source-Drain Bereich sowie der Kanal aus dem gleichen n-dotierten Halbleitermaterial. Das Gate im JFET bildet im Gegensatz zum MOSFET eine p-dotierte Insel. Durch das Anlegen zwischen Source und Drain fließt ein Strom unter dieser Insel vom Source zum Drain Gebiet. Zur Steuerung wird nun die Sperrschichtkapazität des in Sperrichtung gepolten Gate-pn Übergangs ausgenutzt.

2.1.2 Extended-Gate-Electrode (EGE)

Der Aufbau üblicher planarer Dünnschichtelektroden besteht aus der Elektrode, die im Bereich von $\varnothing = 10\text{-}100\mu\text{m}$ liegen kann, einer Kontaktfläche für die Verbindung mit der Messelektronik und der Leiterbahn zwischen den beiden Flächen. Das Substrat für diese Elektroden kann aus Glas oder Silizium sowie aus flexiblen Polyamid bestehen. Die Elektroden- und Kontaktflächen sowie die Leiterbahnen können aus verschiedenen Metallen bestehen. In dieser Arbeit wird Gold oder Titan eingesetzt. Die Abschirmung wird durch eine Isolationsschicht erreicht. Die späteren Mess- und Kontaktflächen werden durch Öffnungen in dieser Isolationsschicht gebildet. Die Form der Elektroden kann planar sein oder aus Spitzen oder Plateaus bestehen. Die im Rahmen dieser Arbeit produzierten Elektroden werden mit den Gates der JFETs kontaktiert und bilden somit als Extended-Gate-Electrodes (EGEs) eine neue Messmethode in der extrazellulären Signaldetektion.

2.2 Elektrisch erregbare Zellen

2.2.1 Grundstruktur einer Zelle

Ein wesentlicher Bestandteil jeder Zelle ist die Zellmembran, die das Zellinnere (Zytoplasma) gegenüber dem extrazellulären Raum trennt. Die Zellmembran besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht, die als undurchdringbar für wasserlösliche Ionen gilt. Der Austausch der Ionen und Moleküle erfolgt über integrale Transmembranproteine wie Pumpen, Carrier und Ionenkanäle, die in dieser Lipid-Doppelschicht eingebunden sind und sich vom intrazellulären bis zum extrazellulären Raum erstrecken. Proteine wie die Na⁺/K⁺-Pumpe transportieren durch Umwandlung von ATP diese Ionen über die Zellmembran. Carrier befördern Ionen und Moleküle durch eine Konformationsänderung durch die Lipidschicht. Der wichtigste Baustein für die elektrische Signalentstehung und Weitergabe ist der Ionenkanal. Es unterscheiden sich spannungsgesteuerte, Liganden gesteuerte und mechanisch gesteuerte Ionenkanäle. Von diesen Ionenkanälen gilt den spannungsgesteuerten Ionenkanälen für Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ in dieser Arbeit besondere Aufmerksamkeit, weil sie zur Entstehung von Aktionspotentialen den größten Beitrag leisten, und dabei Ströme bis zu mehreren nA über die Zellmembran fließen können. In Bild 2.4 ist ein solcher spannungsabhängiger Ionenkanal dargestellt, wie er in die Zellmembran eingebaut ist. Das Öffnen und Schließen dieser Ionenkanäle ist von der Spannung über der Membran abhängig. Die Entstehung von Aktionspotentialen, wie sie in neuronalen Zellen und Herzmuskelzellen zu finden sind, ist auf den unterschiedlichen zeitlichen Fluss verschiedener Ionen über die Zellmembran zurückzuführen.

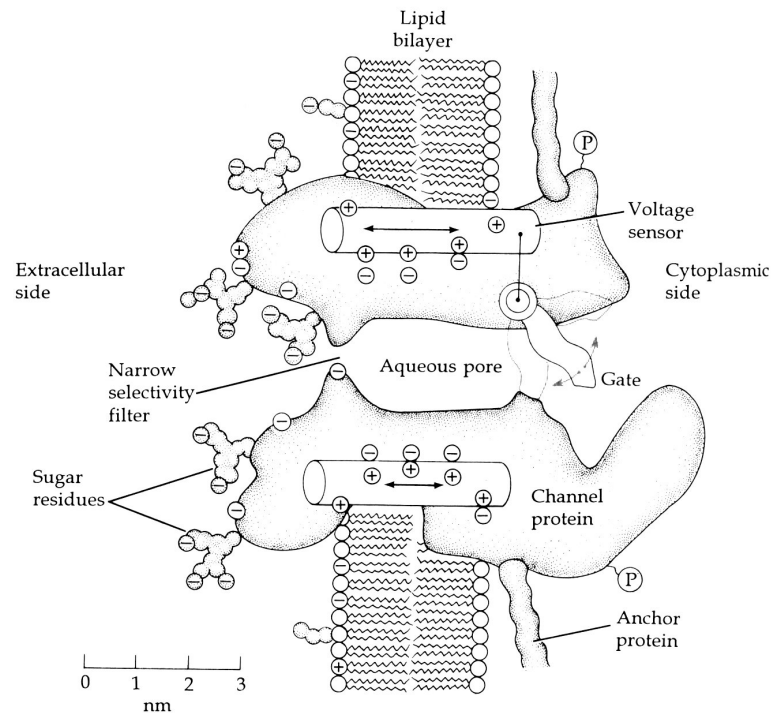


Bild 2.4: Skizze eines spannungsabhängigen Ionenkanals in der Zellmembran [Hille, 92]

2.2.2 Ruhepotential

Als Ruhepotential V_{RP} bezeichnet man in der Elektrophysiologie die Membranspannung zwischen dem Zellinneren und dem Extrazellulärraum. Es entsteht aufgrund der unterschiedlichen Konzentration von Ionen zu beiden Seiten der Membran. Das Gleichgewichtspotential das sich aufgrund einer einzelnen Ionenart i einstellt wird durch die Nernst-Gleichung beschrieben. Das sog. Nernst-Potential E_i ist abhängig von den Konzentrationen $c_i^{ausse,innen}$ zu beiden Seiten der Zelle, der Wertigkeit der Ionenart z und der Temperatur T .

$$E_i = E_{innen} - E_{ausse} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_i^{ausse}}{c_i^{innen}} \quad (2.8)$$

Das Ruhepotential einer realen Zelle ist kein Gleichgewichtspotential mehr, sondern muss durch ein Fließgleichgewicht beschrieben werden. Bezieht man alle Ionenarten mit in die Rechnung ein, kann das Ruhepotential mit Hilfe der Goldman-Gleichung be-

stimmt werden. Durch die unterschiedlichen Permeabilitäten beeinflussen sie die Lage des Ruhepotentials.

$$V_M = \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum_{k=1,n} z_k P_k [X_k]_{\text{außen}}^{Kation} + \sum_{l=1,m} z_l P_l [X_l]_{\text{außen}}^{Anion}}{\sum_{k=1,n} z_k P_k [X_k]_{\text{innen}}^{Kation} + \sum_{l=1,m} z_l P_l [X_l]_{\text{innen}}^{Anion}} \quad (2.9)$$

Dabei liegt das Ruhepotential eines Neurons nahe dem K^+ Gleichgewichtspotential und es fließt im stationären Fall kein Membranstrom. Die Ruhepotentiale liegen für elektrische aktive Zelle im Bereich -30 bis -70 mV.

2.2.3 Hodgkin-Huxley Theorie

Elektrisch aktive Zellen können Aktionspotentiale ausbilden. Bei einem Aktionspotential kommt es zu einer Verschiebung des Membranpotentials V_M . Dabei nähert sich V_M ausgehend vom negativen Ruhepotential V_{RP} einem maximalen positiven Wert an, der charakteristisch für jeden Zelltyp ist. Danach bewegt sich das Membranpotential wieder auf den Wert des Ruhepotentials zurück. In Bild 2.5 ist ein solches Aktionspotential eines hippocampalen Neurons dargestellt.

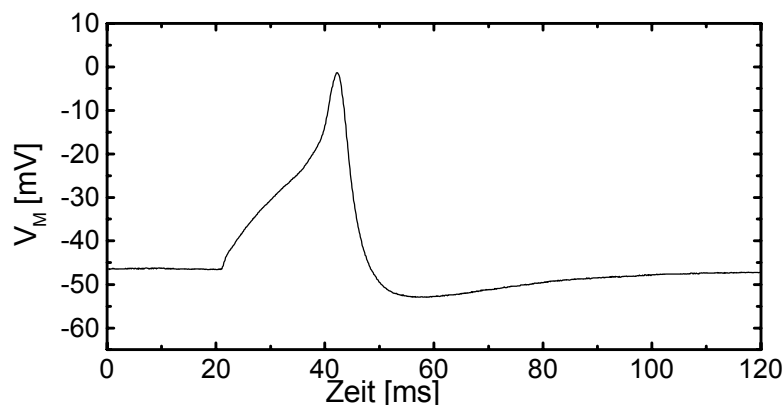


Bild 2.5: Aktionspotential eines hippocampalen Neurons.

Verschiebt sich das Membranpotential V_M vom seinem Ruhepotential V_{RP} ausgehend in Richtung positiverer Potentiale, so kommt es ab einer bestimmten Spannung zu einem schnellen, in die Zelle gerichteten, Na^+ -Strom auf Grund der Öffnung der Na^+ -Kanäle. Diese Na^+ -Kanäle schließen sich kurze Zeit später. Überlagert wird dieser Na^+ -Strom

durch ein langsames Öffnen von K^+ -Kanälen und es kommt zu einem auswärtsgerichteten Ionenstrom der das Membranpotential in Richtung des vorherigen Ruhepotentials V_{RP} verschiebt.

Die Hodgkin-Huxley Theorie [Hodgkin, 52] beschreibt dieses Verhalten der Ionenkanäle durch ein Ersatzschaltbild der Zellmembran wie es in Bild 2.6 gezeigt ist. Die spezifischen Leitfähigkeiten g^{Na} und g^K für die Na^+ - und K^+ -Ionen hängen von der beobachteten Ionenstromdichte i_M , dem aktuellen Membranpotential V_M und dem Nernstpotential E_i der jeweiligen Ionenart i ab. Die Kapazität der Zellmembran wird durch die spezifische Kapazität c_M berücksichtigt.

$$g^i = \frac{i_M}{V_M - E_i} \quad (2.10)$$

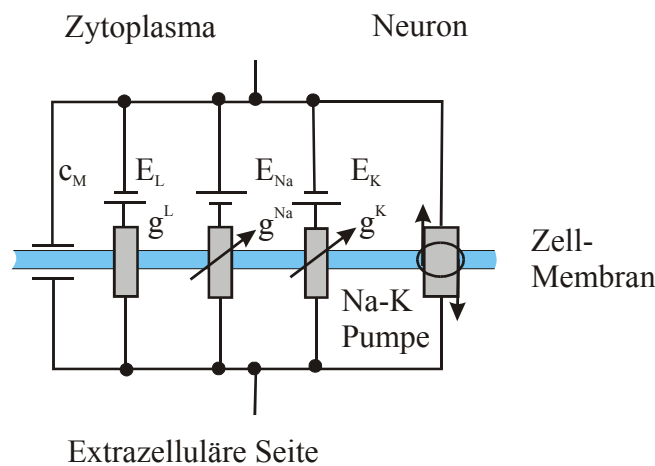


Bild 2.6: Ersatzschaltbild zur Beschreibung der elektrischen Eigenschaften einer neuronalen Zelle nach [Hodgkin, 52], mit den Nernst Potentialen E_i der Ionen, den spezifischen Ionenleitfähigkeiten g^i der spannungsabhängigen Ionenkanäle und der spezifischen Membrankapazität c_M . Ströme aller anderen Ionen werden als Leckstrom zu einer spannungsunabhängigen Leitfähigkeit g^L zusammengefasst. Der Konzentrationsgradienten wird durch die Na^+ - K^+ -Ionenpumpe entscheidend beeinflusst.

Alle anderen Ströme über die Membran werden zum Leckstrom zusammengefasst und durch den spannungsunabhängigen Widerstand mit der spezifischen Leitfähigkeit g^L und dem zugehörigen Nernstpotential E_L symbolisiert. Somit ergibt sich die Ionenstromdichte, die über die Zellmembran fließt, als Summe aller Elemente des Ersatzschaltbildes.

$$i_M = c_M \frac{dV_M}{dt} + g_{Na}(t)(V_M - E_{Na}) + g_K(t)(V_M - E_K) + g_L(t)(V_M - E_L) \quad (2.11)$$

Da aber die Ionenleitfähigkeiten einer realen Zelle zeitlich nicht konstant sind, beschreiben die Gleichungen im Hodgkin-Huxley Modell, experimentelle gefundene Werte von Leitfähigkeiten von K^+ und Na^+ .

Die zeitliche Veränderung der g_i -Werte wird durch drei unterschiedliche, dimensionslose Parameter n , m und h beschrieben, die Werte zwischen 0 und 1 annehmen können und experimentell aus Versuchen an Tintenfischaxonen ermittelt wurden. Diese Parameter beschreiben die Leitfähigkeiten der Na^+ und K^+ -Ionenkanäle. Die Kanäle in dieser Theorie haben geschlossene und offene Zustände, die sich durch die Gesamtleitfähigkeit bei einem bestimmten Membranpotential berechnen lassen. Ein K^+ -Kanal liegt bei dieser Theorie in einem offenen Zustand vor, wenn 4 molekulare Einheiten des Kanals, den Ionenkanal öffnen. Somit ergibt sich die Wahrscheinlichkeit von n^4 für einen offenen K^+ -Kanal. Das Öffnen und Schließen kann als Konformationsänderung über eine Ratengleichung beschrieben werden. Die dimensionslosen Parametern n , m und h hängen über die Parameter α , β und von der Differenz $V = V_M - V_{RP}$ ab.

Somit ergibt sich für die aktuelle Membranleitfähigkeit der K^+ -Kanäle

$$g_K(t) = \bar{g}_K n^4(t) \quad (2.12)$$

mit

$$\frac{dn(t)}{dt} = \alpha_n(1-n) - \beta_n n \quad (2.13)$$

Die aus experimentellen Daten bestimmten spannungsabhängigen Ratenkonstanten sind im folgenden dargestellt.

$$\alpha_n = \frac{0.01(V+10)}{(\exp((V+10)/10)-1)} \quad (2.14)$$

$$\beta_n = 0.125 \exp(V/80) \quad (2.15)$$

Für die Na^+ -Leitfähigkeit gilt die Wahrscheinlichkeit von m^3h . Der Na^+ -Kanal geht dann in einen leitenden Zustand über wenn 3 molekulare Einheiten die richtige Konformation besitzen. Eine vierte Einheit kann bei Depolarisation öffnen aber dann auch

wieder in den geschlossenen Zustand überwechseln. Die aktuelle spezifische Leitfähigkeit für Na^+ durch eine Zellmembran wird in der folgenden Gleichung beschrieben:

$$g_{\text{Na}}(t) = \bar{g}_{\text{Na}} m^3(t) h(t) \quad (2.16)$$

Dabei gilt für den offenen Zustand des Na^+ -Kanals:

$$\frac{dm(t)}{dt} = \alpha_m (1 - m) - \beta_m m \quad (2.17)$$

$$\alpha_m = \frac{0.1 (V + 25)}{\exp((V + 25)/10) - 1} \quad (2.18)$$

$$\beta_m = 4 \exp(V/18) \quad (2.19)$$

Für den geschlossenen Zustand gilt:

$$\frac{dh(t)}{dt} = \alpha_h (1 - h) - \beta_h h \quad (2.20)$$

$$\alpha_h = 0.07 \exp(V/20) \quad (2.21)$$

$$\beta_h = \frac{1}{\exp((V + 30)/10) + 1} \quad (2.22)$$

Diese Gleichungen beschreiben die zeitliche und spannungsabhängige Änderung der spezifischen Leitfähigkeit g^i der einzelnen Ionenarten über die Zelle. Im Bild 2.7 ist der Verlauf für die spezifische Leitfähigkeit einer Zelle nach einem Stimulationspuls auf das Membranpotential $V_M = 9 \text{ mV}$ dargestellt.

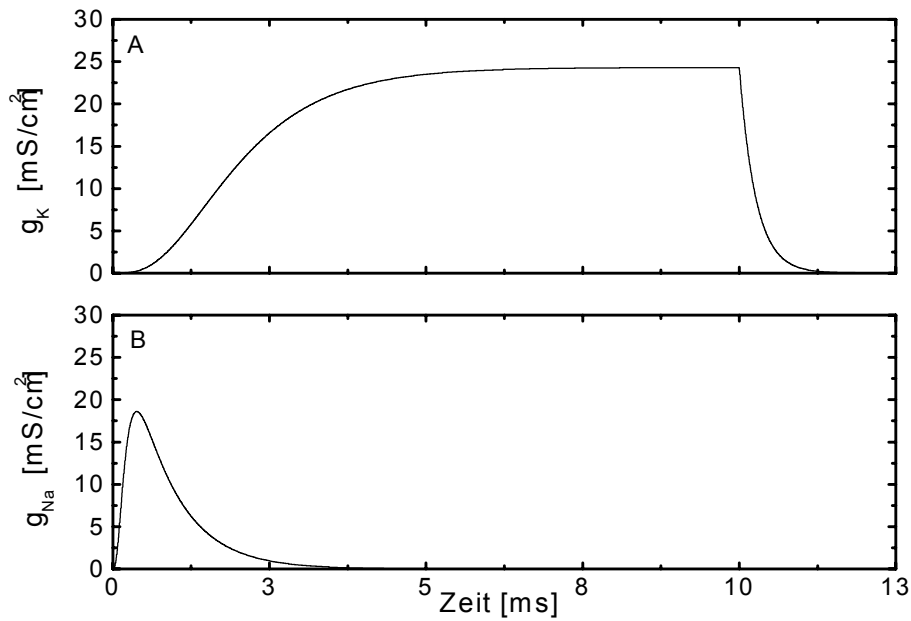


Bild 2.7: Die spezifische Leitfähigkeit von K^+ und Na^+ . Das Membranpotential der Zelle liegt bei $V_M = 9$ mV. Berechnet nach dem Hodgkin-Huxley Modell.

Der charakteristische Verlauf für Na^+ und K^+ -Ionenstromdichten wird dann durch die folgende Gleichung beschrieben.

$$i_M = c_M \frac{dV_M}{dt} + \bar{g}_K n^4 (V_M - E_K) + \bar{g}_{Na} m^3 h (V_M - E_{Na}) + \bar{g}_L (V_M - E_L) \quad (2.23)$$

Die Aktionspotentiale der in dieser Arbeit ebenfalls untersuchten Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) zeigen einen gegenüber dem Aktionspotentialen von Neuronen verschiedenen Verlauf, der maßgeblich durch den Ca^{2+} -Ionenstrom beeinflusst wird (Bild 2.8).

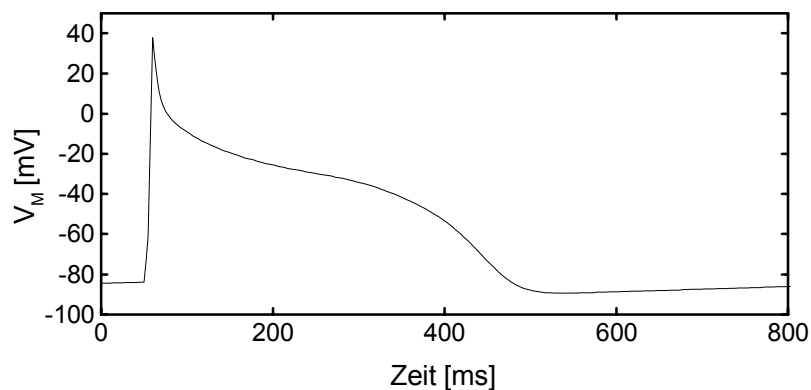


Bild 2.8: Aktionspotential einer Herzmuskelzelle (Purkinje fibre)

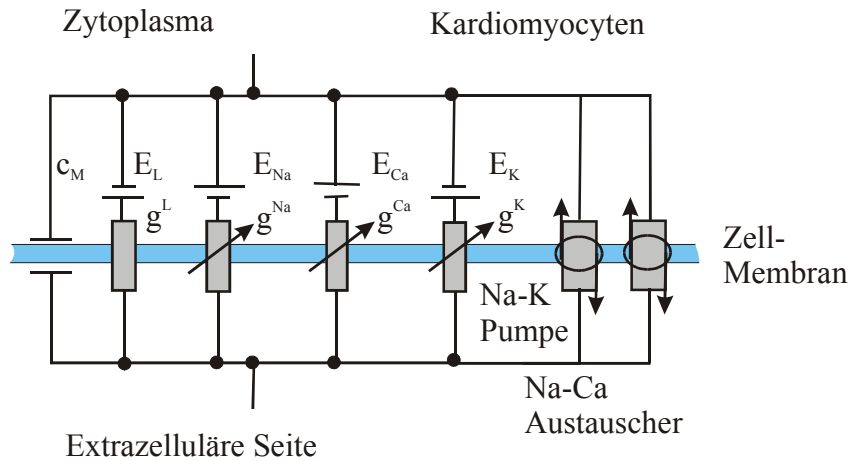


Bild 2.9: Ersatzschaltbild zur Beschreibung der elektrischen Eigenschaften einer Herzmuskelzelle.

Im Ersatzschaltbild kommt der spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanal hinzu (Bild 2.9), der durch die spezifische Leitfähigkeit g_{Ca} und dem Nernstpotential E_{Ca} dargestellt wird. Die spezifische Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen wird durch [Shrier, 86] mit der folgenden Gleichung beschrieben. Dabei werden $d(t)f(t)f'(t)$ ebenfalls durch Ratengleichungen beschrieben, deren Parameter wiederum von dem Membranpotential abhängen.

$$i_{\text{Ca}} = \bar{g}_{\text{Ca}} d(t)f(t)f'(t)(V_M - E_{\text{Ca}}) \quad (2.24)$$

Der Ca^{2+} -Ionenstrom ist bei den Kardiomyozyten für den Plateaubereich im Aktionspotential verantwortlich. Dabei ist dieser einwärtsgerichtete Ca^{2+} -Ionenstrom betragsmäßig gleich dem auswärtsgerichteten K^+ -Ionenstrom, der für die Repolarisation verantwortlich ist. Der Ca^{2+} -Ionenstrom verzögert somit für mehrere ms diese Repolarisation der Zelle und es kommt zu diesem charakteristischen Verlauf des Membranpotentials.

2.3 Zell-Sensor-Kopplung

Im Folgenden wird ein einfaches Modell präsentiert, das es erlaubt, die mit potentialsensitiven Sensoren gemessenen extrazellulären Signale von elektrisch aktiven Zellen zu erklären.

2.3.1 Punkt-Kontakt-Modell

Beim Punkt-Kontaktmodell geht man davon aus, dass alle Ströme durch einen gemeinsamen Punkt fließen. Die wichtige zentrale Messgröße ist $V_J(t)$, die Potentialänderung im Bereich zwischen der Zellmembran und dem Gate des Zellsensors.

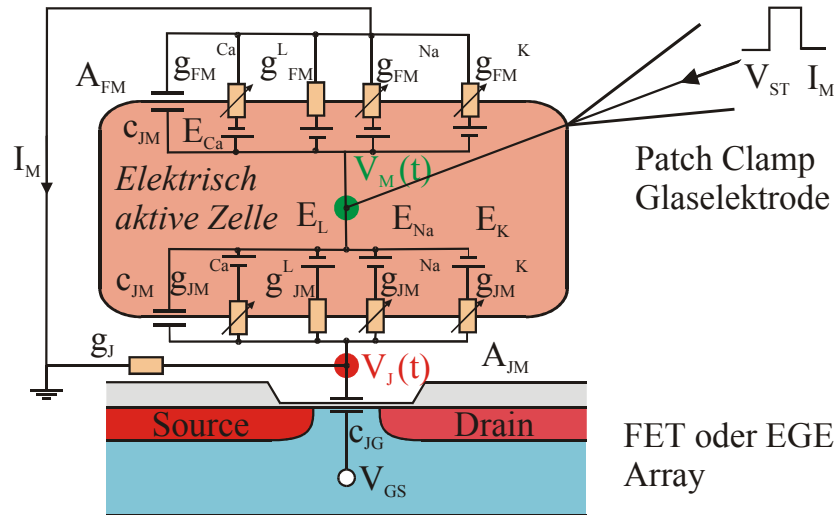


Bild 2.10: Punkt-Kontakt-Modell zur Beschreibung der extrazellulären Kopplung zwischen einer elektrisch aktiven Zelle und den FET und EGE, [Weis, 97], [Schätzthauer, 98].

Die Anwendung des Kirchhoffschen Gesetzes ermöglicht die Berechnung von $V_J(t)$ im Kontaktbereich der Zelle.

Die Stromdichte, die über die Zellmembran in den Gatebereich einströmt, muss demnach über den Abdichtwiderstand und der Kapazität des Gates, als Verschiebestromdichte, wieder abfließen.

$$c_{JG} \frac{dV_J}{dt} + g_J V_J = c_M \frac{d(V_M - V_J)}{dt} + \sum_i g_{JM}^i (V_M - V_J - E_i). \quad (2.25)$$

Dabei bedeuten:

$$c_{JG} \frac{dV_J}{dt} \quad \text{Verschiebestromdichte über das Gate,}$$

$$g_J V_J \quad \text{Stromdichte über den Abdichtwiderstand,}$$

$$c_M \frac{d(V_M - V_J)}{dt} \quad \text{kapazitive Membranstromdichte,}$$

$\sum_i g_{JM} (V_M - V_J - E_i)$ Ionen- und Leckstromdichte durch die Membran im Gatebereich A_{JM} .

Die Gleichungen lassen sich durch folgende Annahmen vereinfachen:

(1) Der kapazitive Strom über das Gate beeinflusst das extrazelluläre Signal nicht.

$$(c_{JG} + c_M) \frac{dV_J}{dt} \ll g_J V_J \quad (2.26)$$

(2) Ist die Membranleitfähigkeit im Gatebereich deutlich kleiner als die Leitfähigkeit des Abdichtwiderstandes, so ergibt sich dadurch keine Beeinflussung des extrazellulären Signals $V_J(t)$. Bei der Annahme $V_J \ll V_M$ kann davon ausgegangen werden, dass es im Bereich der Auflagefläche der Zelle und dem aktiven Bereich des Feldefekttransistors zu keiner Veränderung der Ionenkonzentration des Elektrolyten kommt, somit ergäbe sich dann auch keine Verschiebung des Umkehrpotentials für jede Ionenart der Zelle.

$$\sum g_{JM}^i \ll g_J, \text{ und } V_M - V_J \approx V_M \quad (2.27)$$

(3) Die Membranfläche im Gatebereich ist bezogen auf die freie Membran deutlich kleiner.

$$\frac{A_{JM}}{A_{FM}} \ll 1 \quad (2.28)$$

Aufgrund dieser Annahmen vereinfacht sich die Gleichung (2.25) zur Berechnung von $V(t)$ zu:

$$g_J V_J = c_M \frac{dV_M}{dt} + g_{JM}^L V_M + \sum_i g_{JM}^i (V_M - E_i) \quad (2.29)$$

2.3.2 Kopplungstypen

Ist der zeitliche Verlauf des Membranpotentials $V_M(t)$ bekannt, so ist es möglich, das extrazelluläre Signal $V_J(t)$ im Kontaktbereich zwischen Zelle und aktivem Sensorfeld zu beschreiben.

Bild 2.11 zeigt Aktionspotentiale eines hippocampalen Neurons und einer Herzmuskel Zelle. Der zeitliche Verlauf $V_M(t)$ für das Neuron ist experimentell bestimmt. Für die Herzmuskelzelle ist sie nach [DiFrancesco, 85], [Earm, 90] aufbauend auf dem Hodgkin-Huxley-Model simuliert.

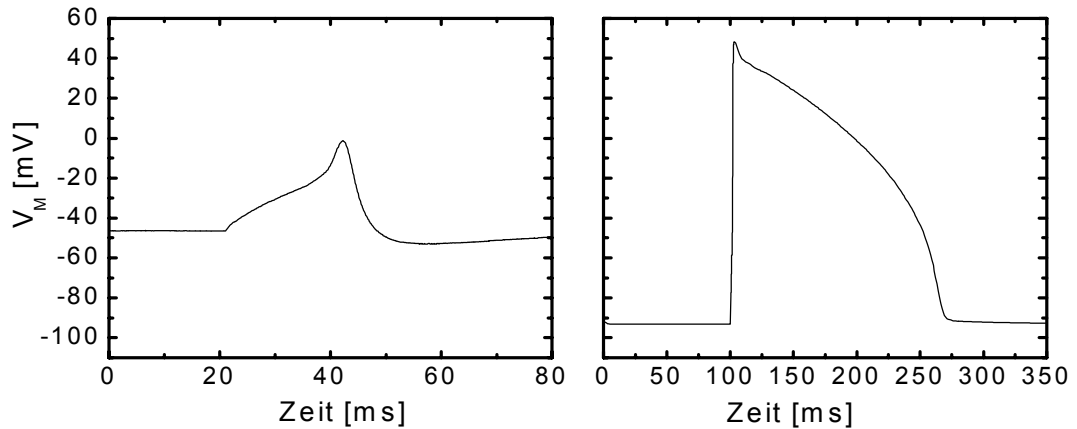


Bild 2.11: Aktionspotentiale eines hippocampalen Neuron (gemessen) und einer Herzmuskelzelle (simuliert), nach [DiFrancesco, 85], [Earm, 90].

Im folgenden werden die Einflüsse der spezifischen Abdichtleitfähigkeit g_J , der spezifischen Membranleitfähigkeit g_{JM}^L und den spezifischen Ionenleitfähigkeiten $\sum_i g_{JM}^i$ auf die extrazellulären APs betrachtet.

2.3.2.1 Geringe Ionenkanalleitfähigkeit

A-Typ:

Der erste Schritt bei der Simulation ist die Vernachlässigung der Ionenleitfähigkeit $\sum_i g_{JM}^i$ im Gatebereich. Somit erhält man die folgende Gleichung

$$V_J = \frac{c_M}{g_J} \frac{dV_M}{dt} \quad (2.30)$$

Die damit verbleibenden Parameter zur Beschreibung der Kopplung sind die Membrankapazität und die spezifische Abdichtleitfähigkeit.

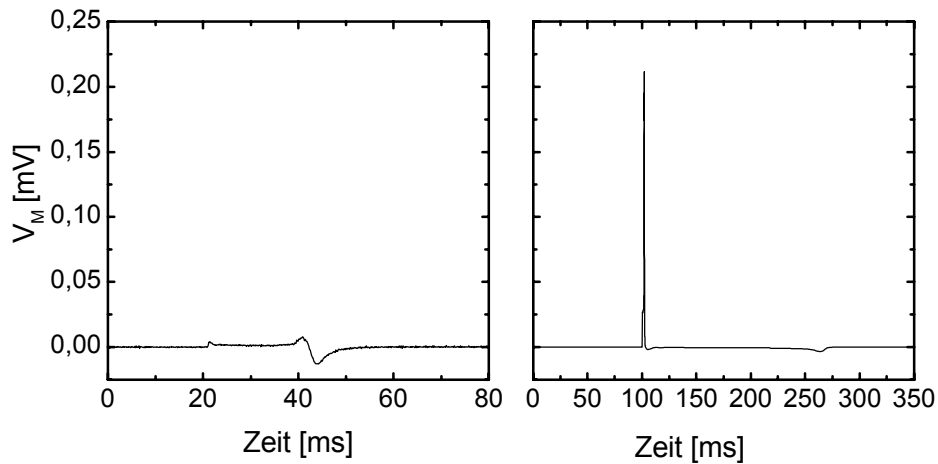


Bild 2.12: A-Typ Kopplung des Aktionspotentials

Bei dieser Kopplung wird das extrazelluläre Signal deutlich von der differenzierenden Eigenschaft von c_{JM} / g_J bestimmt (Bild 2.12) und wird daher auch als kapazitive Kopplung bezeichnet. In der Literatur wird die kapazitive auch als A-Typ Kopplung bezeichnet [Fromherz, 91],[Fromherz, 93], [Jenker, 97] und [Sprössler, 99]

B-Typ:

$$V_J = \frac{c_M}{g_J} \frac{dV_M}{dt} + \frac{g_{JM}^L}{g_J} V_M \quad (2.31)$$

Dieser Kopplungstyp wird durch eine deutliche Zunahme des Membranleitwertes g_{JM}^L im Gatebereich bestimmt. Dabei ist der Leckstrom durch die Membran deutlich größer als die kapazitiven Ströme und die Kombination aus g_{JM}^L / g_J wirkt somit als Spannungsteiler für das Membranpotential im Gatebereich (Bild 2.13). Vergrößert sich der Abdichtwiderstand bzw. fällt der Membranwiderstand, so erhöht sich der Einfluss des Membranpotentials auf das extrazelluläre Signal. Deshalb wird dieser Kopplungstyp auch als ohmsche Kopplung bezeichnet

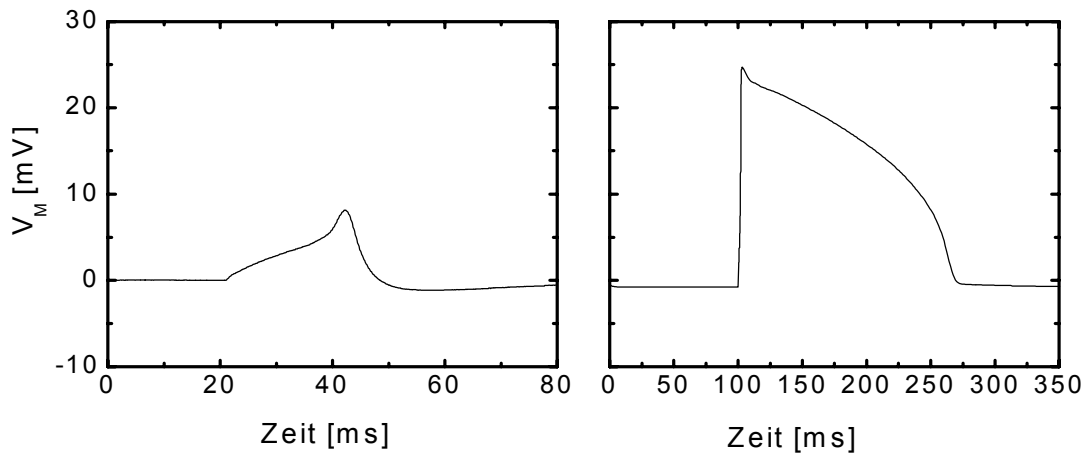


Bild 2.13: B-Typ Kopplung des Aktionspotentials

In der Literatur wird die ohmsche Kopplung auch als B-Typ Kopplung bezeichnet [Fromherz, 91],[Fromherz, 93], [Jenker, 97] und [Sprössler, 99].

2.3.2.2 Hohe Ionenkanalleitfähigkeit

C- und D-Typ:

Negative Änderungen im extrazellulären Signal können mit den kapazitiven und ohmschen Kopplungen nicht komplett erklärt werden. Für diese negativen Auslenkungen für V_J werden die spannungsabhängigen Ionenkanäle verantwortlich gemacht, siehe Gl. (2.29).

$$g_J V_J = c_M \frac{dV_M}{dt} + g_{JM}^L V_M + \sum_{i=Na^+, K^+, Ca^{2+}} g_{JM}^i (V_M - E_i) \quad (2.32)$$

Die skalierten spezifischen Na^+ - und K^+ -Leitfähigkeiten, [Schätzthauer, 98], [Fromherz, 99], sowie Ca^{2+} -Leitfähigkeiten [Sprössler, 99], können dann auch negative Verläufe darstellen.

Für das Aktionspotential einer Herzmuskelzelle ist dies in Bild 2.14 dargestellt. Zusätzlich ist im Kopplungsmodell der Einfluss von Ca^+ -Ionenströmen hinzu gekommen.

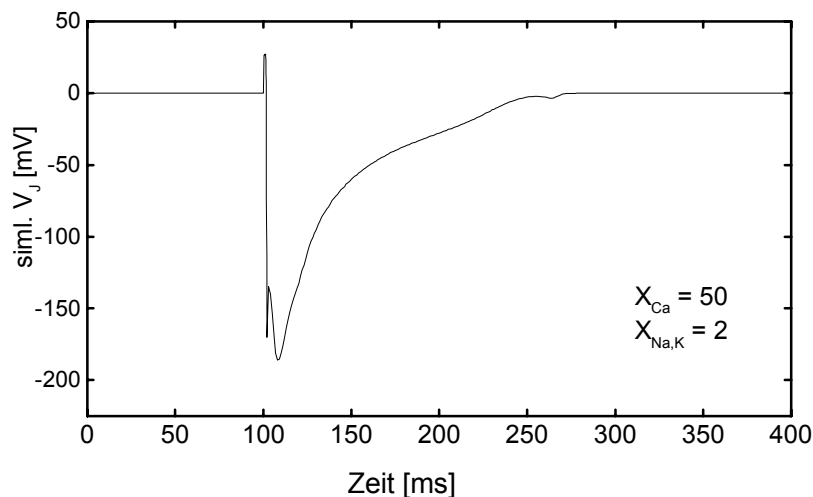


Bild 2.14: Simuliertes extrazelluläres Signal eines Aktionspotentials von einer Herzmuskelzelle mit der Skalierung X_i der spezifischen Leitfähigkeiten im Kontaktbereich [Sprössler, 99].

Die hier vorgestellten extrazellulären Aktionspotentiale erfordern zur theoretischen Simulation [Sprössler, 99], [Fromherz, 99] des Signalverlaufs, dass die Membranelemente der Zelle wie spezifische Membrankapazität, Membranleitfähigkeit und auch die über die Zellmembran und den Abdichtwiderstand abfließenden Ionenströme bekannt sind. Daher werden oft spezifische Ionenleitfähigkeiten von Modellzellen verwendet, obwohl man das Aktionspotential messen kann. Der Nachteil dieser Messung im sog. *Current-Clamp* Modus liegt darin, dass während des APs die spezifische Ionenleitfähigkeit der einzelnen Ionenart i nicht bestimmbar ist und somit auch die direkten Zusammenhänge mit dem extrazellulären Signal nicht herstellbar ist.

Deshalb wird in dieser Arbeit der *Voltage-Clamp* Modus eingesetzt um die Zelle definiert auf ein Membranpotential zu depolarisieren. Dabei kann gleichzeitig der Membranstrom I_M und das resultierende extrazelluläre Signal V_j detektiert werden. Der Vorteil der *Voltage-Clamp* Technik liegt darin, dass durch die definierte Depolarisation der Zelle auf ein bestimmtes Membranpotential V_M z.B. nur eine Ionenart i im Membranstrom I^i beobachtet werden kann. Dadurch ist es möglich den Einfluss nur einer Ionenart i auf das extrazelluläre Antwortsignal V_j zu untersuchen. Diese Untersuchung liefert dann auch die wichtige Aussage über die Skalierung des Ionenstroms I^i der zu dem entsprechenden Verlauf des extrazellulären Signal V_j geführt hat.

3 Sensoren

Im diesem Kapitel werden die hergestellten Sensoren für die Kopplungsexperimente beschrieben. Dabei werden die beiden FET und EGE Arrays hinsichtlich des Layouts und des Aufbaus für die Experimente beschrieben. Die verschiedenen n- und p-Kanal FET Arrays werden anhand ihrer experimentell bestimmten Kennlinien charakterisiert. Auf den Fabrikationsprozess der einzelnen Sensoren soll hier nur kurz eingegangen werden. Eine ausführliche Darstellung der einzelnen Prozessschritte befindet sich im Kapitel Anhang.

3.1. Extended-Gate-Electrode Array (EGEs)

In den Entwurf der EGEs muss die Größe der Zellen, die Verwendbarkeit des Arrays für den Aufbau von neuronalen Netzwerken sowie der Abstand der Elektroden mit einfließen. Des weiteren soll die Elektrodenbeschaffenheit hinsichtlich Material der Elektroden, Abstand Elektrode-Zelle und Form der Elektrode variiert werden, um dadurch eine bessere Ankopplung an die Zelle zu erreichen.

3.1.1 Layout EGE

Das Layout der EGEs ist in Bild 3.1 dargestellt. Das Array besteht aus 64 Elektroden, die in einer 8x8 Matrix angeordnet sind. Die Größe eines einzelnen Gateelektroden-Chips beträgt $11 \times 11 \text{ mm}^2$. Auf den in der Produktion verwendeten 5“-Glaswafer (Borofloat 33, Schott DESAG AG) befinden sich 66 einzelne Chips, wobei jeweils die Hälfte der Chips einen Elektrodenabstand von $100 \text{ }\mu\text{m}$ bzw. $200 \text{ }\mu\text{m}$ besitzt. Die einzelnen Gateelektroden sind durch Leiterbahnen mit den Kontaktbereichen verbunden.

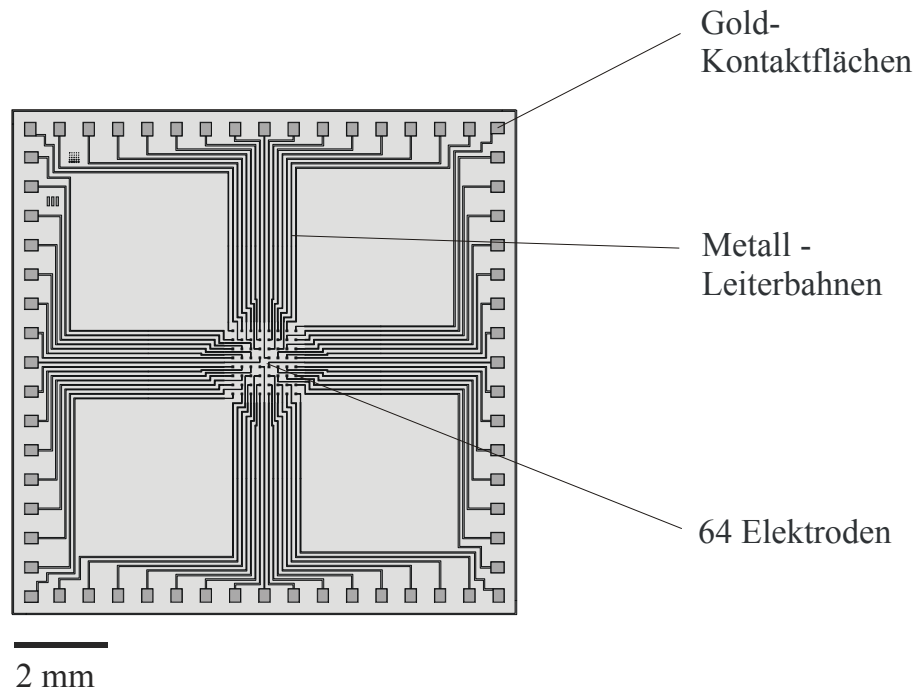


Bild 3.1: Layout des Gateelektroden Chip als EGE Array.

Der Herstellungsprozess besteht aus drei wesentlichen Schritten. Das sind zum einen das Aufdampfen des Elektrodenmaterials, wie Gold oder Titan, das Aufbringen der Isolationsschicht und das Ätzen der Elektroden bzw. der Kontaktflächen.

Die Leiterbahnen, die Elektrodenflächen sowie die Kontaktflächen werden mit Hilfe eines *Lift-Off* Prozesses auf den Glaswafer definiert, [Sze, 85] und [Beneking, 91]. Bei den Goldelektroden, die aus 300 nm aufgedampften Gold bestehen, sorgt eine zuvor ausgedampfte 30 nm dicke Titanschicht für eine bessere Haftung sowohl der Gold- als auch der Isolationsschicht auf dem Glaswafer. Die Titanelektroden weisen keine Schichtfolge auf, sondern bestehen aus 300 nm dicken gesputtertem Titan. Zum Schutz der Leiterbahnen vor elektrischem Übersprechen von Signalen während des Messbetriebs und zur Isolation gegenüber dem Elektrolyten wird eine Schicht aus jeweils 500 nm SiO_2 und Si_3N_4 und einer Oberflächenschicht von 100 nm SiO_2 aufgebracht. Die Elektroden selbst sowie die Kontaktbereiche werden durch Ätzen des Isolationsmaterials bis auf die Metallschicht definiert. Die Kontaktflächen der Titanelektroden besitzen zur besseren Kontaktierung ebenfalls eine Goldschicht.

Die Elektroden haben Durchmesser von $\varnothing = 6, 8, 10, 20$ und $30 \mu\text{m}$. Die Elektroden, die hier in der Arbeit verwendet werden, sind in Bild 3.2 als Goldelektroden dargestellt.

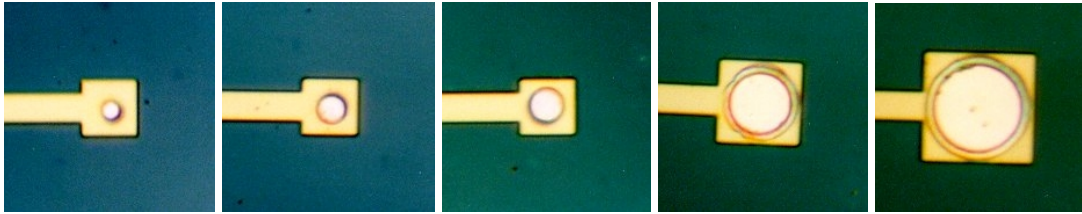


Bild 3.2: Durchmesser der verwendeten Goldelektroden: $\varnothing = 6, 8, 10, 20$ und $30 \mu\text{m}$.

Im Bild 3.3 a) ist ein 8×8 Elektroden Array, mit einem Elektrodenabstand von $100 \mu\text{m}$ und in b) ein Rasterelektronenmikroskop Bild einer einzelnen Elektrode mit einem Durchmesser von $\varnothing = 6 \mu\text{m}$ dargestellt.

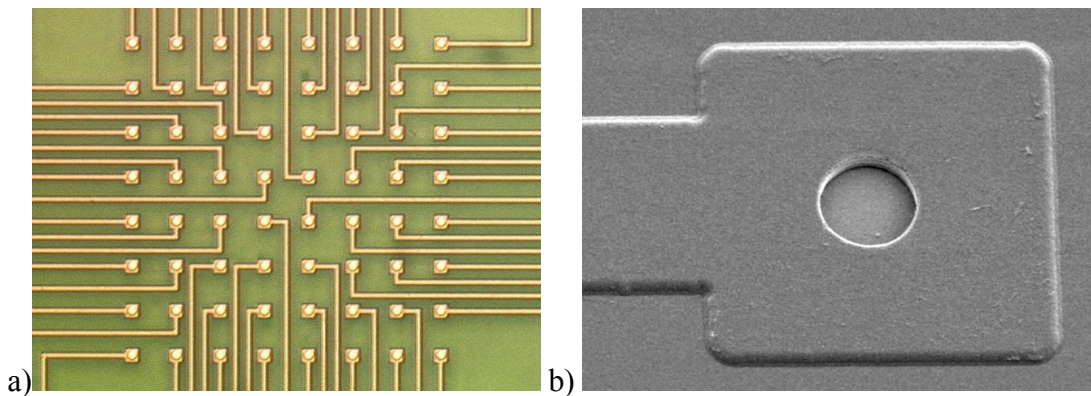


Bild 3.3: Extended-Gate-Elektroden Array: a) 8×8 Elektroden Array, mit einem Elektrodenabstand von $100 \mu\text{m}$ b) REM Bild einer einzelnen Elektrode, mit einem Durchmesser von $\varnothing = 6 \mu\text{m}$ (Bild IMM).

Anstatt der kleinen Gateelektroden befinden sich auf einigen EGE Arrays in den vier Eckbereichen jeweils 3 Stimulationselektroden. Für die $100 \mu\text{m}$ Arrays haben diese 12 Elektroden einen Durchmesser von $\varnothing = 50 \mu\text{m}$, bei den $200 \mu\text{m}$ Arrays einen Durchmesser von $\varnothing = 100 \mu\text{m}$ (Bild 3.4).

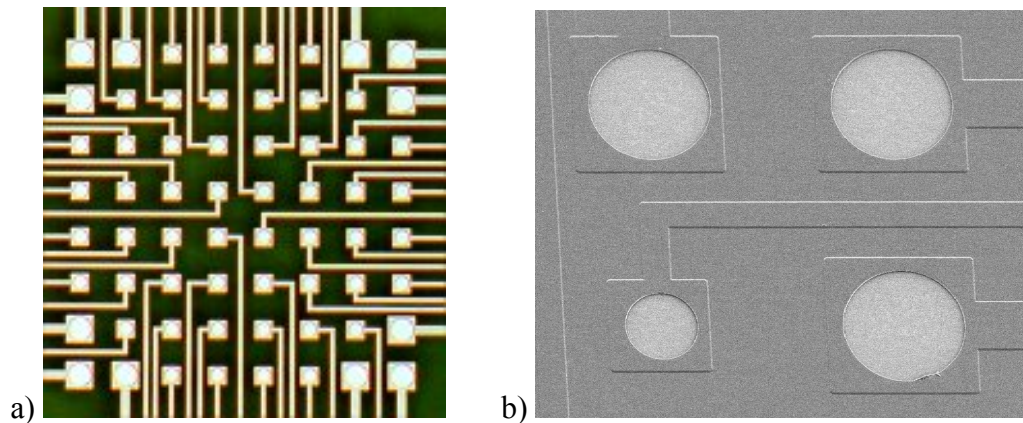


Bild 3.4: a) 12 Eckelektroden haben Durchmesser von $\varnothing = 50 \mu\text{m}$ bzw. $100 \mu\text{m}$, bei Elektrodenabständen von $100 \mu\text{m}$ bzw. $200 \mu\text{m}$ Abstand b) REM Ausschnittsvergrößerung der drei Eckelektroden (Bild IMM).

Zur Durchführung von Stimulationsexperimenten mit Einzelzellen halbiert sich die Anzahl der zur Verfügung stehenden Gesamtelektroden. Dazu dient eine Elektrode als Stimulations- und die andere als Aufnahmeelektrode, wobei jeweils zwei Elektroden bis auf $5 \mu\text{m}$ zusammengeführt werden. In Bild 3.5 sind solche Elektrodenkombinationen dargestellt.

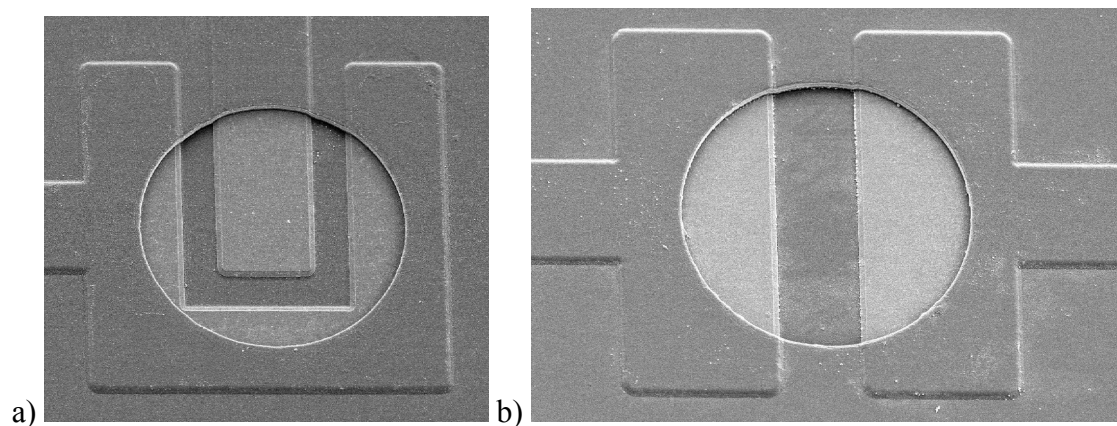


Bild 3.5: Verschiedenen Elektrodenkombinationen für die gleichzeitige Stimulation und Aufnahme in a) und b), (Bilder IMM).

Für zukünftige Experimente mit dünnen Gehirnschnitten bzw. zur Verbesserung des Zellkontaktes werden Elektroden gebraucht, die mit ihrer aktiven Fläche bis an bzw. sogar über die Isolationsschicht hinaus in Richtung der Zellen gebracht werden.

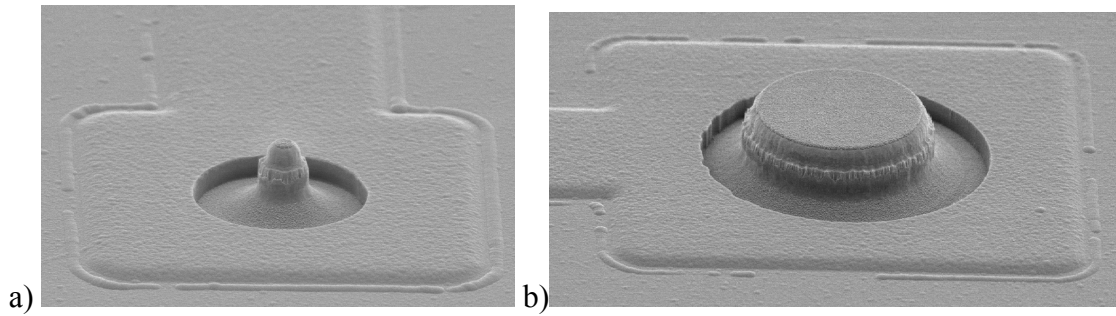


Bild 3.6: Elektrodenform für Gehirnschnitte und zur Verbesserung des Zellkontaktes werden spitze a) und plateauartige b) Elektroden hergestellt.

Dazu wird in einem zusätzlichen Prozessschritt die Höhe der Elektrode durch einen Unterbau aus Si_3N_4 definiert. Es können durch Variation dieses zusätzlichen Schritts spitze oder plateauartige Elektroden hergestellt werden (Bild 3.6).

3.1.2 Aufbau der EGE

Die produzierten und gesägten $11 \times 11 \text{ mm}^2$ großen Gateelektroden Chips werden mit Ethanol und Aceton im Ultraschallbad gereinigt, um den Schutzlack von den Elektrodenflächen und im Besonderen von den Kontaktflächen zu entfernen. Die Chips werden dann auf $48 \times 48 \text{ mm}^2$ große Platinen geklebt. Diese Platinen haben eine $9 \times 9 \text{ mm}^2$ große Öffnung in der Mitte sowie mit Gold aufgalvanisierte Leiterbahnen als Klebeflächen für die Chipkontakte. Außerdem besitzen sie Bohrungen zum Einlöten der Steckerreihen und einer Buchse für die Badelektrode (Bild 3.7 a).

Die Chips werden mit Hilfe der Polymer Flip-Chip-Technologie [Lau, 95] auf die Platine aufgeklebt. Hierzu wird im ersten Schritt der Zweikomponenten Epoxy Kleber (EPO-TEK H20E-PFC, Epoxy Technology IN., USA) auf die $300 \times 300 \mu\text{m}^2$ großen Klebeflächen der Platine aufgetragen. Dazu wird ein Siebdrucker (ESSEMTEC SP-002, ESSEMTEC AG, Schweiz) eingesetzt, (Bild 3.7 b)).

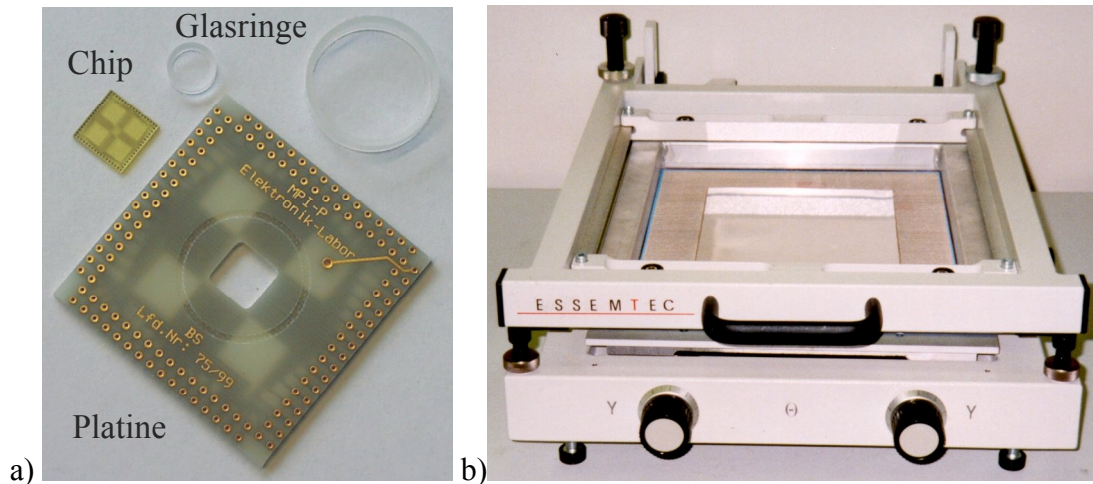


Bild 3.7: a) Einzelteile für das EGE Array: Platine mit Gold galvanisierten Leiterbahnen und Buchse, Mikroelektroden Chip und Glasringe zum Aufbau der Kulturkammer b) Siebdrucker (ESSEMTEC SP-002, ESSEMTEC AG, Schweiz).

Dieser Drucker besitzt eine Stahlfolie, in der die 64 mit einem Laser geschnittenen quadratischen Öffnungen in der Größe der Klebeflächen enthalten sind. Die Folie mit den 64 Löchern und die 64 vergoldeten Klebeflächen der Platine werden zueinander justiert. Dann wird der Kleber mit einem Rakel durch die Löcher in der Folie gestrichen. Im zweiten Schritt werden die Chips mit ihren Kontaktflächen mit Hilfe einer Positionierungseinrichtung (FINEPLACER-145 "PICO", FINTECH electronic, Deutschland, Bild 3.8 a) deckungsgleich auf die 64 Klebestellen abgelegt. Dabei wird die Platine in eine Halterung eingelegt die in der x-, y- Richtung verschiebbar ist und eine Rotation um die z- Achse zulässt. Zu dieser Einheit gehört eine Spannungsversorgung der Lampen für die Ausleuchtung während der Platzierung sowie eine Vakuumanlage zum Ansaugen des Gateelektrodenchips. Die Ausrichtung erfolgt über den integrierten Strahlteiler. Durch das Mikroskop können die Kontakte des Chips und die der Platine mit Hilfe der Verschiebeeinheit zur Deckung gebracht werden. Mit dem Positionierarm, der den angesaugten Chip hält, werden die Kontakte auf den Kleber gedrückt, ohne dabei den Kleber soweit zusammenzudrücken, dass sich die einzelnen Klebepunkte berühren, (Bild 3.8 b).

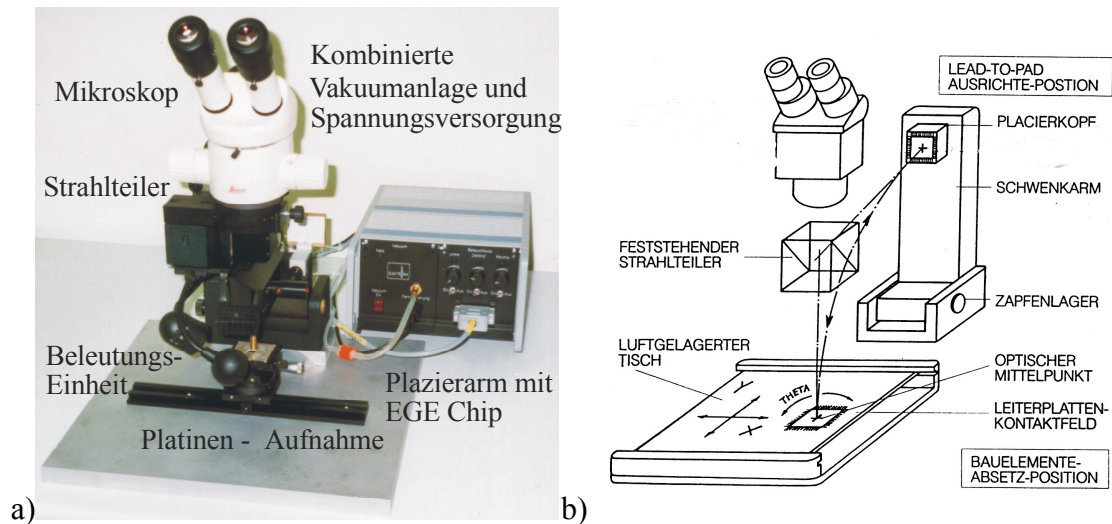


Bild 3.8: a) Positionierungseinrichtung (FINEPLACER-145 "PICO", FINTECH electronic, Deutschland) mit dem Mikroskop, dem integrierten Strahlteiler und der Spannungsversorgung mit Vakuumanlage; b) Skizze für die Platzierung der EGE Chips auf der Platine.

Der Kleber wird im Ofen bei 150 °C für 30 min. ausgehärtet. Die gegenseitige Isolierung der Kontaktstellen auf der Platine wird mit einem zweikomponentigen Füllmaterial (Underfill U300, Epoxy Technology IN., USA) durchgeführt. Der hochviskose Underfill umschließt die Kontaktstellen und wird anschließend ebenfalls bei 150 °C für 15 min. ausgehärtet. Der Zellkulturraum wird durch zwei Glasringe gebildet. Dazu wird der erste Glasring mit einem Innendurchmesser von 7 mm und einer Wandstärke von 1 mm durch die 9x9 mm² große Öffnungen der Platine auf die Oberseite des EGE Chips und ein zweiter mit einem Innendurchmesser von 22 mm, in eine gefräste glasringgroße Vertiefung auf der Platine mit dem Silikonkleber (SYLGARD 96-083, DOW CORNING, Deutschland) aufgeklebt. Der zwischen den beiden Glasringen verbleibende Bereich auf der Oberseite der Platine wird ebenfalls mit dem Silikonkleber aufgefüllt und etwaige Luftblasen im Kleber mit Hilfe eines Exikators und einer Vakuumpumpe entfernt. Die Füllmasse wird bei 150 °C für 45 min. ausgehärtet. Für die externe Kontaktierung im Sockel des Vorverstärkers werden vier Steckerreihen und für die Aufnahme der Ag/AgCl Badelektrode eine Buchse in die Platine eingelötet. Der fertige EGE Array ist in Bild 3.9 dargestellt.

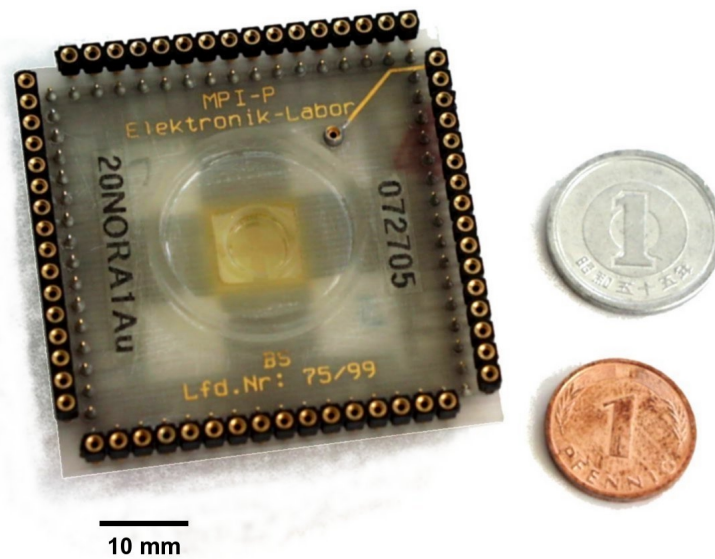


Bild 3.9: EGE mit dem in der Mitte der Platine platzierten Glaselektroden Chip, den zwei Glasringen die den Zellkulturraum bilden, den vier Steckerreihen mit den 64 Anschlüssen und der Buchse zur Aufnahme der Ag/AgCl Badelektrode [Krause, 2000 a].

3.1.3 Charakterisierung des EGE Arrays

Die Charakterisierung der EGE Arrays erfolgt durch die experimentelle Bestimmung der spezifischen Elektrodenkapazität c_{EI} sowie dem Rauschverhalten der Elektronik mit dem eingebauten Array.

Die Materialeigenschaften, wie Widerstand und Gatekapazität, der Goldelektroden werden durch eine Impedanzmessung mit einem EGE Array bestimmt. Dazu wird ein EGE Array mit einem Elektrodendurchmessern von 100 μm verwendet. Die Impedanzmessung wird an zwei Elektroden durchführt, die im EGE Array gegenüberliegen. Dabei wird der frequenzabhängige Real- und Imaginärteil der Impedanz aufgezeichnet.

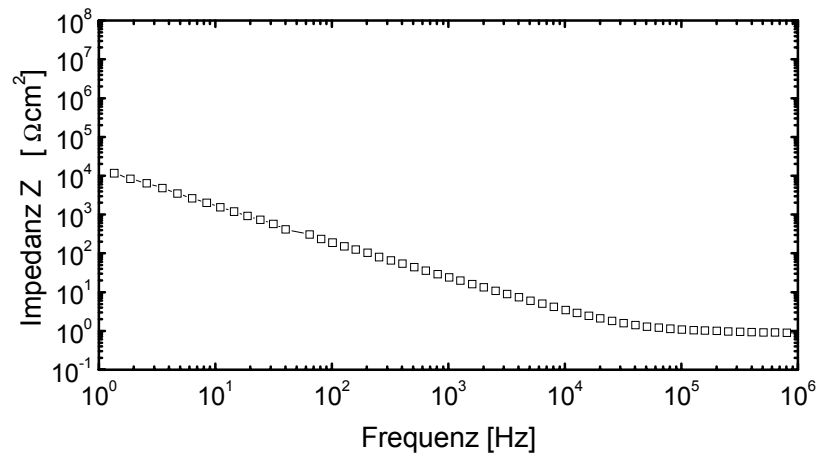


Bild 3.10: Betrag der Impedanz der Goldelektroden des EGE Arrays.

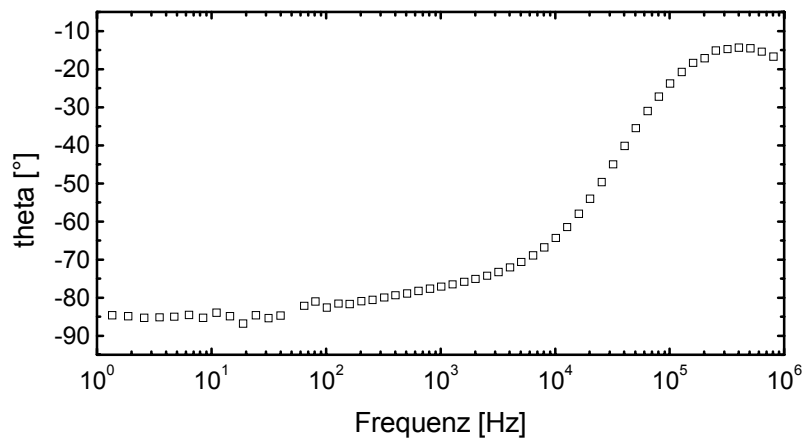


Bild 3.11: Abhängigkeit des Winkels Θ von der Frequenz.

In Bild 3.10 und Bild 3.11 ist das Ergebnis der Messung im Frequenzbereich zwischen 10^6 und 1 [Hz] dargestellt. Die Impedanz bezieht sich hier auf die Gesamtfläche aus beiden Elektroden und beträgt bei den vermessenen Elektroden, bei einer Frequenz von 1 Hz, $1.4 \times 10^4 \Omega\text{cm}^2$.

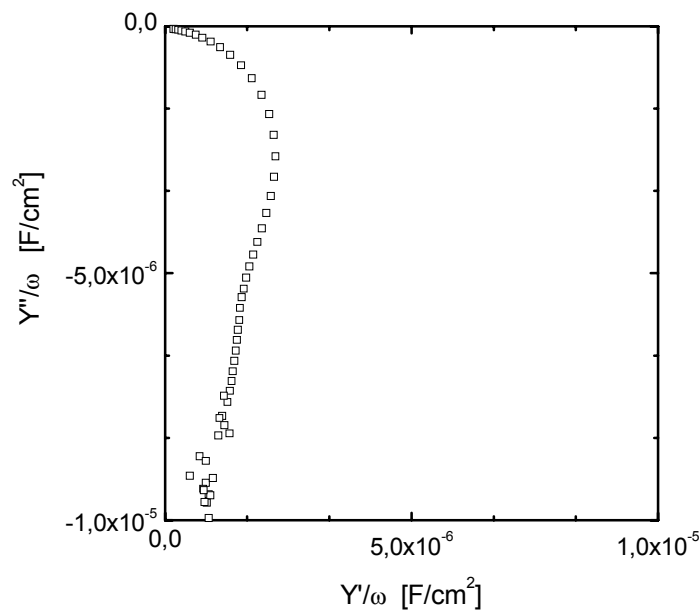


Bild 3.12: Spezifische Elektrodenkapazität c_{EI} der Goldelektroden des EGE Arrays.

Die spezifische Kapazität der Goldelektroden kann einfach aus dem sog. Kapazitätsplot bestimmt werden. Hierzu trägt man den frequenznormierten Imaginärteil der Admittanz (Y''/ω) über den Realteil (Y'/ω) auf. Es ergibt sich somit im Schnittpunkt aus der Fortsetzung des Verlaufs als Halbkreis (Bild 3.12) mit der y-Achse die spezifische Elektrodenkapazität zu $c_{EI} = 5 \times 10^{-6} \text{ F/cm}^2$.

3.2. Feldeffekttransistoren (FETs)

Der Feldeffekttransistor in der Ausführung mit isoliertem Gate (IGFET: insulated gate field-effect transistor) findet Anwendung in der extrazellulären Signalkopplung und kann auch als chemisch sensitiver Sensor für die pH- Bestimmung eingesetzt werden [Sprössler, 97].

Die hier eingesetzte neue Generation von p-Kanal Anreicherungs-FETs bzw. n-Kanal Anreicherungs- und Verarmungs-FETs soll im Hinblick auf das Kleinsignalverhalten charakterisiert werden.

3.2.1 Layout FET

Das Layout der FETs ist im Bild 3.13 dargestellt. Das Array besteht aus 16 FETs, die in einer 4x4 Matrix angeordnet sind. Die Größe eines einzelnen FET Chips beträgt $5 \times 5 \text{ mm}^2$. Auf den in der Produktion verwendeten 5“-Siliziumwafern befinden sich jeweils 360 einzelne Chips, wobei die Hälfte einen Gate-Abstand von $100 \mu\text{m}$ bzw. $200 \mu\text{m}$ besitzt.

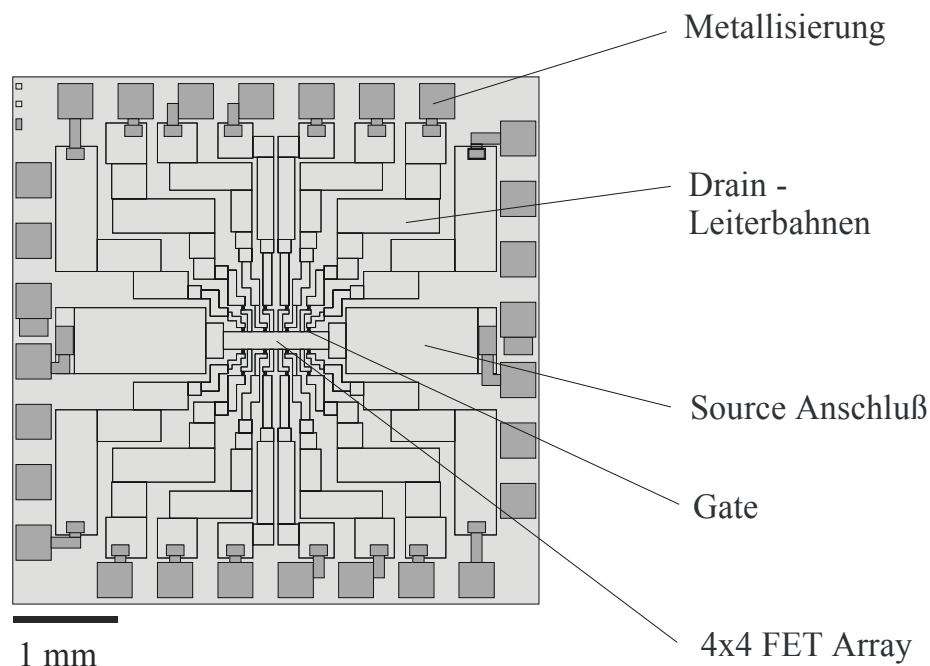


Bild 3.13: Layout des FET Chips.

3.2.2 Prozessbeschreibung

Die Herstellung der p-Kanal Feldeffekttransistoren ist im Gegensatz zu den n-Kanal FET einfacher zu realisieren. Da bei der Oxidation des Gates positive Ladungsträger in das Oxid eingebaut werden, führt dies zu einer Erhöhung der Anzahl negativer Ladungen im Grenzbereich zwischen Oxid und dem n-dotierten Silizium und somit zu einer Selbstanreicherung. Durch die Implantationen mit Bor werden zwei hochdotierte p^+ -Bereiche geschaffen, die mit dem Gateoxid abgedeckt den Anreicherungstyp und damit die einfachste Form der Feldeffekttransistoren bildet. Da das n-dotierte Silizium nur wenig positive Ladungsträger hat, ist ein Stromfluss ohne das Anlegen eines negativen

Potentials am Gate nicht möglich. Erst ein genügend großes negatives Gate-Potential erzeugt den positiven Ladungsträgerüberschuss und die damit verbundene Inversion im Kanalbereich. Durch die Drain-Source Spannung kommt es dann zum Ladungsträgertransport durch den Kanal.

Im Gegensatz dazu muss die Anreicherung negativer Ladungsträger, bei der Herstellung der n-Kanal FETs, in der Grenzschicht zwischen Oxid und Substrat durch positive Ladung kompensiert werden. Dazu wird zwischen den Source und Drain Bereichen aller 16 FETs, mit Ausnahme der Gates, Bor implantiert. Durch diese Feldimplantation verhindert man zusätzlich ein Übersprechen von Signalen zwischen den Zuleitungen.

3.2.2.1 p-Kanal Feldeffekttransistoren

Die Schritte zur Produktion der FET unterteilen sich in die Implantation der Source und Drain Gebiete, die Isolation der Leiterbahnen sowie die Fertigung des Gateoxids und der Bereiche für die elektrische Kontaktierung.

Zur Herstellung der p-Kanal FETs wird n-dotiertes Silizium als Basismaterial mit einem spezifischen Widerstand von 5-10 Ωcm verwendet. In den zwei folgenden Implantationsschritten werden die Source und Drain Gebiete definiert. Im ersten Schritt wird eine tiefe Implantation durchgeführt. Dabei wird Bor mit einer Energie von 120 keV und einer Dosis von $8 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ implantiert.

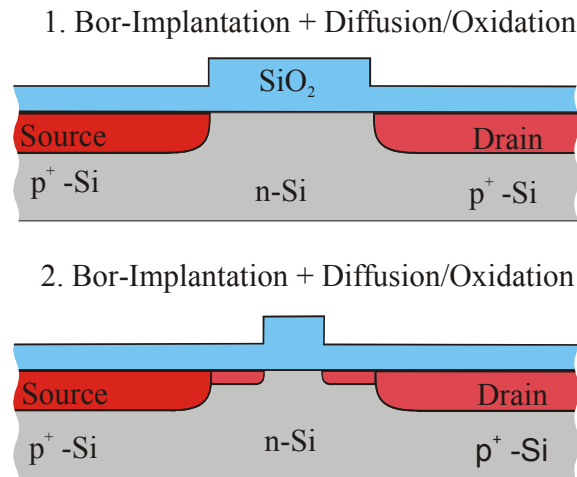


Bild 3.14: 1. und 2. Bor-Implantationen für die Source und Drain Gebiete des p-Kanal Feldeffekttransistors. Im Querschnitt sind die unterschiedlichen Tiefen der Implantation schematisch dargestellt.

Im anschließenden Diffusionsprozess bei 1000 °C wird das Implantationsprofil in die Tiefe eingestellt, um eine Reduzierung der Zuleitungswiderstände zu erreichen. Ein Querschnitt durch den Chip nach dem 1. kombinierten Implantation + Diffusion/Oxidationsschritt ist schematisch dargestellt, (Bild 3.14, oben). Die zweite Implantation bei 80 keV und einer Dosis von $5 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ erfolgt in die vorherigen Gebiete der ersten Implantation und zusätzlich erfolgt die Definition des Gates in Länge und Breite, (Bild 3.14, unten). Ein veränderter Diffusionsprozess sorgt für eine geringere Tiefe im Vergleich zum ersten Schritt. Somit erhält man eine Art Stufe im Diffusionsprofil, ausgehend vom Gate, sowohl in Richtung Drain als auch in Richtung Source.

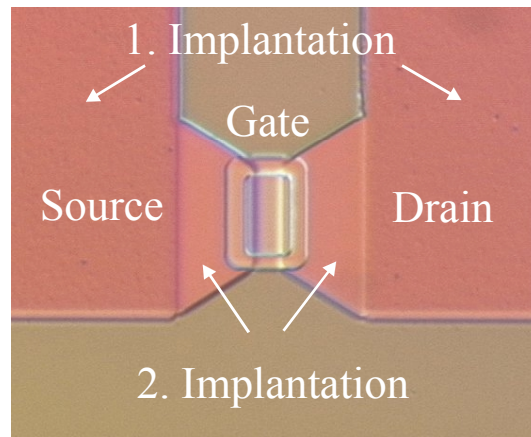


Bild 3.15: Aufsicht des Gates eines p- Kanal FET mit einer Größe von $A_{Gate} = 4 \times 16 \mu\text{m}^2$. Die unterschiedlichen Implantationsgebiete von Source und Drain können optisch unterschieden werden, (Auflichtmikroskop, DIC).

In Bild 3.15 ist eine Aufsicht des Gates eines p-Kanal FETs mit einer Größe von $A_{Gate} = 4 \times 16 \mu\text{m}^2$ dargestellt. Die ersten und zweiten Implantationsgebiete können deutlich aufgrund der Oberflächenrauigkeiten unterschieden werden, da die erste Implantation größere Strahlungsschäden in der Oberfläche des Siliziums erzeugt als die zweite Implantation mit 80 keV.

In drei nachfolgenden Schritten wird die Isolation der Leiterbahnen hergestellt bestehend aus einer jeweils 500 nm dicken SiO_2 -, einer 150 nm dicken Si_3N_4 -Schicht, gefolgt von einem 100 nm dicken Oberflächenoxid. In mehreren Ätzschritten wird die Isolation über dem Gatebereich entfernt und es folgt die Herstellung des Gateoxids mit Hilfe eines trockenen Oxidationsschritts. Den Abschluss des Herstellungsprozesses bildet die Kontaktflächenherstellung. Dabei wird Aluminium mit geringem Siliziumanteil auf die zuvor freigeätzten Kontakte aufgedampft. Im Anschluss daran wird der Wafer getempert, um eine Verringerung der Übergangswiderstände zu erhalten.

3.2.2.2 n-Kanal Feldeffekttransistoren

Der Fabrikationsprozess für die n-Kanal Feldeffekttransistoren unterscheidet sich im Ausgangsmaterial und den zwei Implantationsschritten, dargestellt in Bild 3.16.

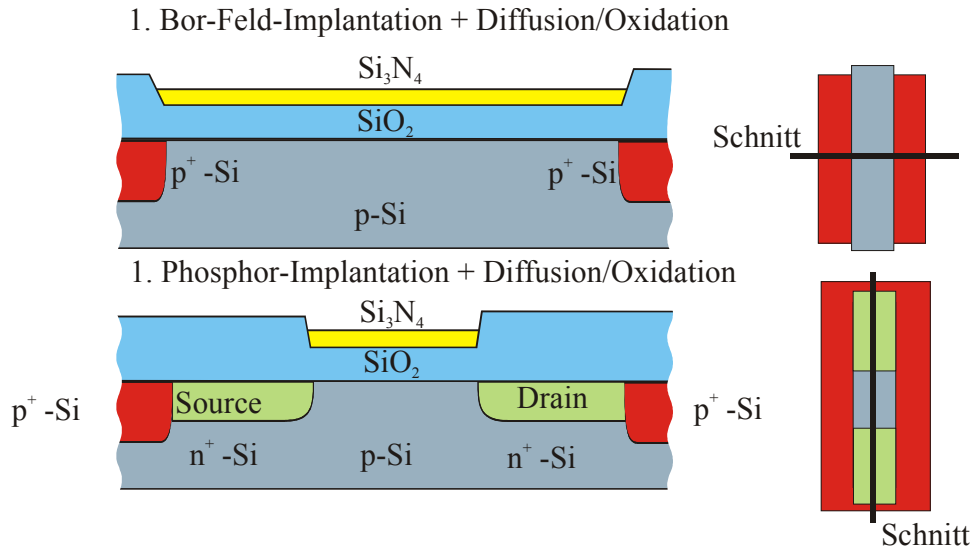


Bild 3.16: 1. Bor-Feld-Implantation und 1. Phosphor-Implantation für die Source und Drain Gebiete des n-Kanal Feldeffekttransistors.

Zur Herstellung der n-Kanal FET wird p-dotiertes Silizium mit einem spezifischen Widerstand von 8.5-11 Ωcm verwendet. Bei der Herstellung von n-Kanal Verarmungs- und Anreicherungstypen besteht die Gefahr der Selbstinversion zwischen den dotierten Bereichen, was zu unerwünschten Effekten führen würde. Deshalb wird zu Anfang eine Schutzschicht aus Oxid und Nitrid auf dem Wafer abgeschieden. In dem Bereich, in dem später keine Leiterbahnen verlaufen, wird eine Feldimplantation mit einem zusätzlichen Diffusions/Oxidationsschritt durchgeführt (Bild 3.16, oben). Dabei wird Bor mit einer Energie von 100 keV und einer Dosis von $5 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ implantiert. Durch die anschließende lokale Oxidation wird keine zusätzliche Oxidschicht über den Leiterbahnen aufgebracht, (LOCOS-Prozess) [Beneking, 91]. Der nächste wichtige Schritt ist die Implantation von Phosphor mit 50 keV und einer Dosis von $8 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$, für die Source und Draingebiete. Der anschließende Diffusions/Oxidationsschritt führt zu der endgültigen Form des n-FETs, (Bild 3.16, unten). Die Prozessschritte für die Isolation, das Gateoxid und die Kontaktierung entsprechen den Schritten zur Herstellung der p-Kanal Feldeffekttransistoren.

Die endgültige Struktur der Feldeffekttransistoren mit den verschiedenen Implantationen und Isolationsschichten ist in Bild 3.17 als schematischer Querschnitt durch das Drain-Source Gebiet und den Kontaktbereich für die beiden p- und n-Kanal FET gezeigt.

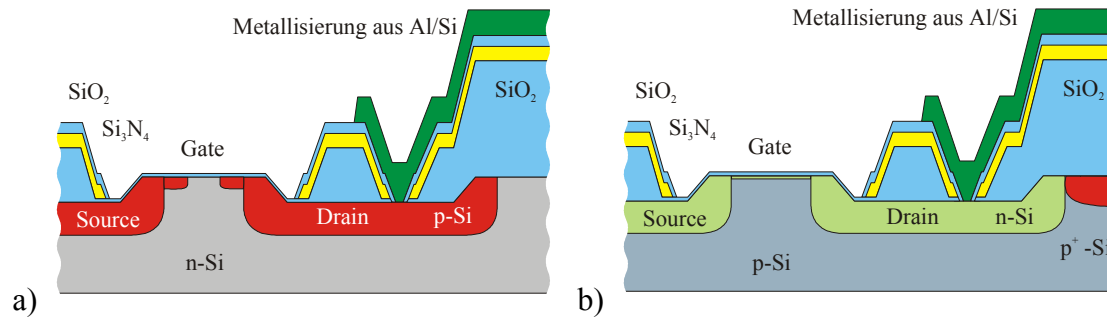


Bild 3.17: Querschnitt durch das Drain-Source Gebiet und den Kontaktbereich der beiden Feldeffekttransistoren Typen. a) p-Kanal FET ; b) n-Kanal FET.

In Bild 3.18 ist eine Übersicht des 4x4 FET Arrays dargestellt, mit den Leiterbahnen zu den Source und Drain Anschlüssen sowie den Gates selbst. In Bild 3.18 a) ist das FET Array mit einem Abstand von 100 μm und in b) ein Array mit 200 μm Abstand dargestellt.

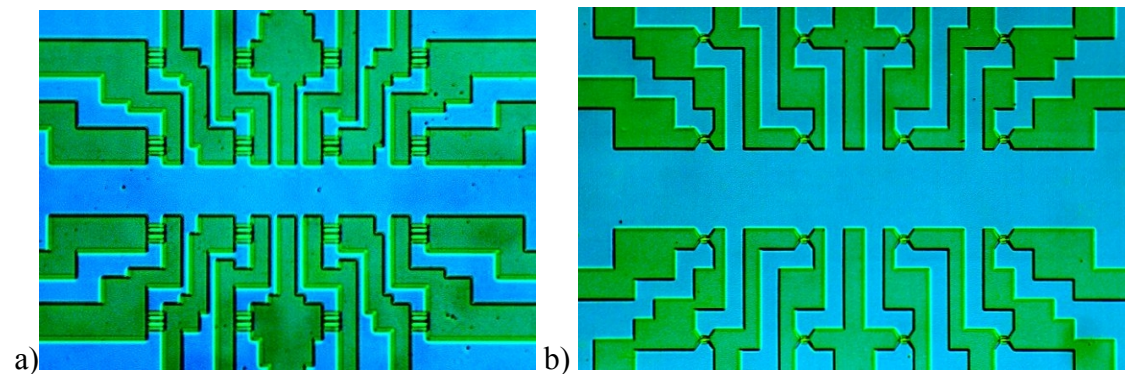


Bild 3.18: Aufsicht auf die endgültige Struktur des 4x4 FET Arrays nach Beendigung des Herstellungsprozesse. a) Gateabstand 100 μm , b) Gateabstand 200 μm .

Gateabstände kleiner als 100 μm können nicht mehr in einer Matrixanordnung realisiert werden. Der Abstand zwischen den Leiterbahnen muss mindestens 20 μm betragen, um eine Kontaktierung während des Herstellungsprozesses und ein Übersprechen von Signalen während des Messbetriebes in andere Kanäle sicher zu verhindern. Bei dem 100 μm Array ist die Länge der Leiterbahnen zu den außenliegenden Kontaktflächen größer als bei dem 200 μm Array und somit ist auch der Zuleitungswiderstand größer. Nach der Methode von *van der Pauw* wird der Quadratwiderstand R_{\square} für die n- und p-Kanal FET bestimmt [Beneking, 91], [Sze, 85]. Der erste Implantationsschritt für den p-Kanal FET liefert einen Quadratwiderstand von $R_{\square} = 18.1 \Omega_{\square}$ und die zweite Implantation einen von 36.6 Ω_{\square} . Damit bestimmt sich der Zuleitungswiderstand für die Drainbereiche zu

$R_{Zuleitung} = 252 \Omega$. Zum Vergleich ergibt sich durch die Implantation für den n-Kanal FET ein Quadratwiderstand $R_{\square} = 10.9 \Omega_{\square}$, der zu einem Drainwiderstand von $R_{Zuleitung} = 153 \Omega$ führt. Der Widerstand zwischen zwei benachbarten Drainzuleitungen liegt im $M\Omega$ Bereich wodurch eine Signalbeeinflussung vernachlässigt werden kann.

3.2.3 Gategrößen

Eine wichtige Größe bei der Verwendung der Feldeffekttransistoren als Signalwandler für die Kopplungsmessung ist das Design des Gates. Die Abmessungen des Gates müssen in der Größenordnung der Abmessung der zu untersuchenden Zelle liegen damit die Zelle das Gate komplett abdecken kann und somit eine gute Signaleinkopplung in den FET gewährleistet werden kann. Zum Anderen nimmt die Gestaltung des Gates Einfluss auf die Transferkennlinien bzw. der daraus resultierenden Steilheit g_m im betrachteten Arbeitspunkt, da die Abmessung des Gates (Breite b , Länge L) den Bereich bestimmt in dem der Drain-Source Strom I_{DS} durch Potentialänderungen am Gate gesteuert wird.

Die Länge des Kanals L , als der Drain-Source Abstand, wird durch den Fabrikationsprozess bestimmt. Die geometrische Länge L' in der Maske reduziert sich auf dem Wafer durch Unterätzung des Oxids und durch die laterale Diffusion der Bor bzw. Phosphor Ionen im Silizium. Nach [Beneking, 91] kann die Unterätzung des Oxid bei der Definition des Drain-Source Abstand nach dem 2. Lithographieschritt auf jeder Seite bis zu $1 \mu\text{m}$ betragen. Im anschließenden Prozessschritt wird das Profil der implantierten Ionen im Diffusionsprozess in die Tiefe des Siliziums eingestellt. Dabei kommt es als Nebeneffekt auch zu einer lateralen Eindiffusion der Ionen in das Gategebiet. Man kann diese Eindiffusionslänge zu beiden Seiten mit $0.5 \mu\text{m}$ abschätzen. Damit reduziert sich die Länge L' des Kanals im Maskenmaß um insgesamt $3 \mu\text{m}$ auf dem Wafer. Die Definition der Breite b des Kanals entspricht dem Maskenmaß, da es bei dem Ätzprozess für das Si_3N_4 zu keiner Unterätzung kommt. Auf allen hergestellten Wafern sind die in Tabelle 3.1 dargestellten Gatekombinationen aus Länge L und Breite b , realisiert.

Tabelle 3.1: Kombinationen der Gatebreite b und der Gatelänge L die auf den Wafern realisiert wurden (×). In den Klammern ist das jeweilige Maskenmaß L' angegeben.

	$b = 4 \mu\text{m}$	$b = 8 \mu\text{m}$	$b = 16 \mu\text{m}$
$L = 2 (5) \mu\text{m}$	×	×	×
$L = 2 \times 2 (2 \times 5) \mu\text{m}$	—	—	×
$L = 3 (6) \mu\text{m}$	—	×	×
$L = 4 (7) \mu\text{m}$	—	×	×

In Tabelle 3.1 steht in der Klammer das Maskenmaß für die Gatelänge. In allen Angaben zur Gatelänge in dieser Arbeit wird die effektive Länge L verwendet.

Bild 3.19 a zeigt die Abmessung eines p-Kanal Gates mit einer Breite von $b = 8 \mu\text{m}$ und einer Länge von $L = 3 \mu\text{m}$. Bild 3.19 b zeigt die REM Aufnahme eine n-Kanal Gates mit der gleichen Abmessung. Deutlich sind hier die Oxidstufen der Isolation zu erkennen die den Gatebereich definieren, sowie die Kanallänge L .

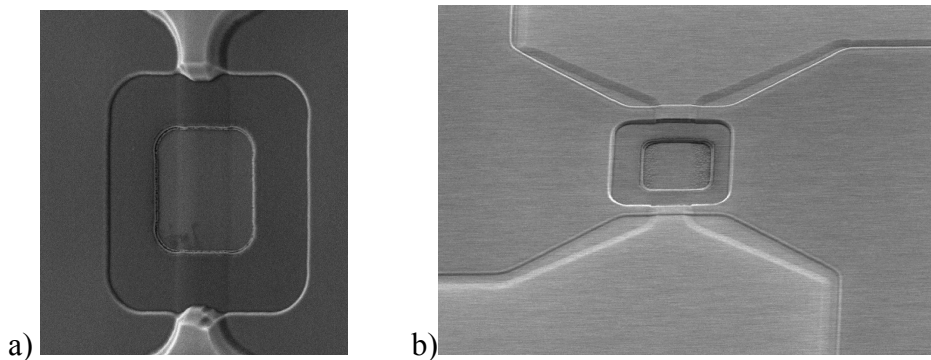


Bild 3.19: a) REM Bild des Gatebereichs eines p-Kanal FET Arrays b) REM Bild des Gatebereichs von einem n-Kanal FET Array; deutlich zu sehen die Stufen im Schutzoxid (LOCOS-Prozess), (Bilder IMM).

Zusätzlich zu diesen einzelnen Gates wird eine weitere Struktur in den Messungen verwendet, diese ist im Bild 3.20 a dargestellt. Dabei wird in Richtung der Kanallänge L ein zusätzlicher Streifen in den Kanal implantiert. Diese Konfiguration bildet somit ein Doppelgate, (Bild 3.20 b).

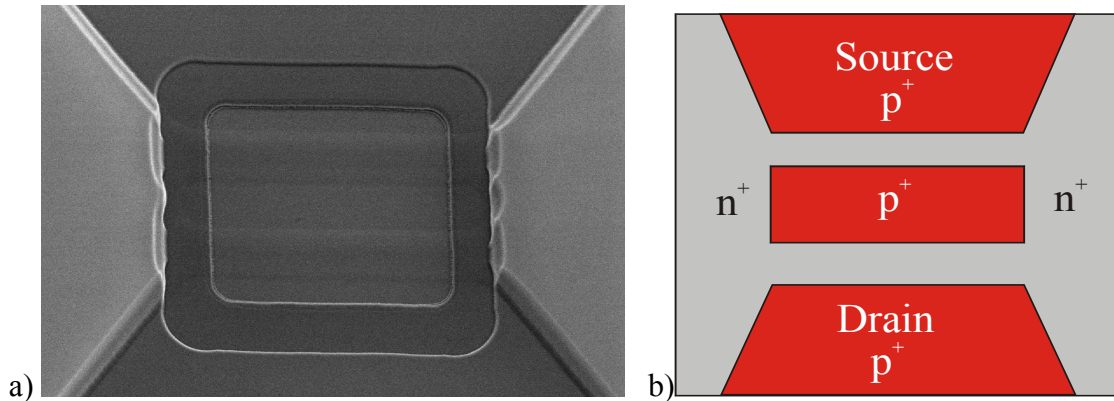


Bild 3.20: p-Kanal Doppelgate mit einer zusätzlichen 2. Implantation im Kanalbereich. a) REM Bild (IMM), b) zusätzliche Borimplantationen im Kanalbereich (schematisch).

Das Doppelgate wird als p-Kanal FET und als n-Kanal FET hergestellt. Die mit den oben beschriebenen Prozessparametern hergestellten FET Chips werden wie anschließend beschrieben für die Experimente aufgebaut.

3.2.4 Aufbau der FET Arrays

Der Aufbau der FET Arrays folgt den Schritten wie sie in [Sprössler, 97] beschrieben sind. Die $5 \times 5 \text{ mm}^2$ großen FET Chips werden mit Ethanol und Aceton im Ultraschallbad gereinigt, um auch hier den Schutzlack von den Gates und im besonderen von den Metallkontaktflächen zu entfernen. Die gereinigten Chips werden dann mit Zweikomponenten-Leitkleber (EPO-TEK H20E-175, Epoxy Technology IN., USA) in ein 28 DIL Keramik Gehäuse eingeklebt und bei 150°C für 30 min. ausgehärtet. Der nächste Schritt umfasst die Kontaktierung der Drain-Zuleitungen der 16 FETs sowie der gemeinsamen Source-Leitung und dem Bulk-Anschluß. Die Kontakte zwischen den 28 DIL Keramik Gehäuse und den FET Kontakten werden mit einem Ultraschall-Bonder (Westbond, USA) hergestellt. Der verwendete Aluminium-Draht (Al/1%Si) besitzt eine Stärke von 25 bzw. 50 μm , dabei zeigt der 50 μm dicke Draht die besseren Haftungseigenschaften auf der Kontaktfläche. Der Bereich für die Zellkultur wird durch den äußeren Glasring, mit einem Innendurchmesser von 16 mm und einer Höhe von 3 mm bzw. einem Silikontrichter, der auf den FET Chip geklebt wird, gebildet.

Der hier neu eingeführte Trichter ist so konzipiert, dass die untere Öffnung, also die freie aktive Fläche für die Aufnahme der Zellen, mit einem Durchmesser von 3 mm möglichst groß ist und die Unterseite des Trichters über den Aluminiumdrähten liegt. Dieser Trichter wird mit Hilfe der Abformtechnik aus Silikon (SYLGARD 182, DOW CORNING, Deutschland) hergestellt. Dazu wird die Kontur der Trichterunterseite in eine Edelstahlplatte gefräst. Die Öffnung des Trichters bestimmt ein Edelstahlstempel.

Der Trichter wird dann mit dem Silikonkleber (SYLGARD 96-083, DOW CORNING, Deutschland) aufgeklebt und der Raum zwischen dem äußeren Glasring und dem Trichter ebenfalls mit dem Kleber ausgefüllt und etwaige Luftblasen im Kleber mittels Unterdruck entfernt. Die Füllmasse wird dann wie bei den EGE Array bei 150°C für 45 min. ausgehärtet. Der fertige FET Chip ist im Bild 3.21 dargestellt.

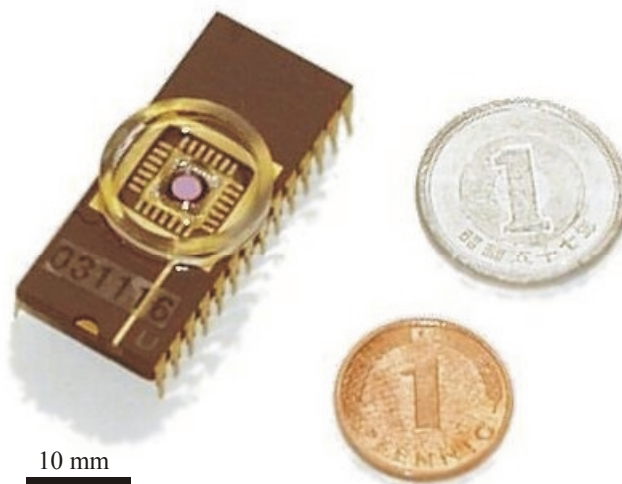


Bild 3.21: FET mit dem 5x5 mm² großen Chip im DIL Keramik Gehäuse, sowie dem Silikon-Trichter und dem Glasring zur Herstellung des Zellkulturraums.

3.2.5 Charakterisierung der FET Arrays

Die Charakterisierung der FET Arrays erfolgt durch die experimentelle Bestimmung der Kennlinien, wie den Ausgangskennlinien $I_{DS}(V_{DS})$ bei konst. V_{GS} , den Transferkennlinien $I_{DS}(V_{GS})$ bei konst. V_{DS} und den sich daraus bestimmenden Steilheiten g_m .

Die Kennlinien werden mit Hilfe der in Kapitel 4 näher dargestellten Messelektronik und der dazugehörigen Steuersoftware aufgezeichnet. Dabei werden die variablen bzw. die jeweils konstant gehaltenen Potentiale definiert an die jeweiligen Source, Drain und Gateanschlüsse angelegt. Der Messbereich für den Drain-Source Strom I_{DS} ist gerätebedingt auf den Bereich zwischen -1mA und $+1\text{mA}$ begrenzt.

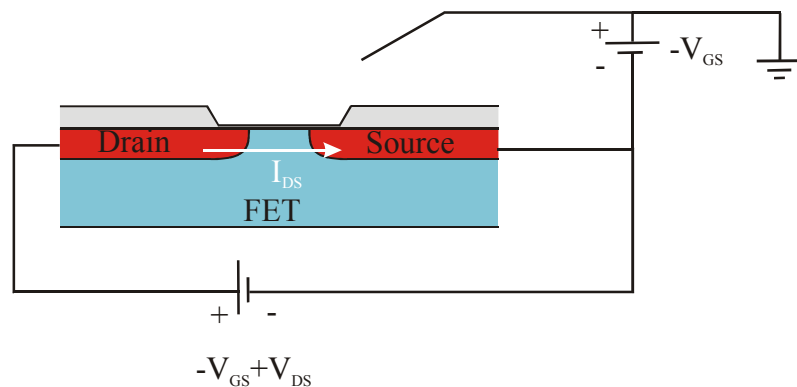


Bild 3.22: Beschaltung der Anschlüsse zur Durchführung der Charakterisierung der hergestellten Feldeffekttransistoren.

In Bild 3.22 ist die Beschaltung der FETs dargestellt wie sie zur Aufnahme der Kennlinien verwendet wird und welche Spannungen an die Anschlüsse angelegt werden.

Im folgenden werden jeweils ein p-Kanal FET, mit einer Gateabmessung von $L = 3\ \mu\text{m}$ und $b = 16\ \mu\text{m}$, und ein n-Kanal, mit einer Gateabmessung von $L = 2 \times 2\ \mu\text{m}$ und $b = 16\ \mu\text{m}$, stellvertretend für die in den Zell-Transistor Kopplungsexperimenten eingesetzten p- und n-Kanal FET charakterisiert.

3.2.5.1 p-Kanal FET

Die Ausgangskennlinien des p-Kanal Feldeffekttransistors mit der Gategröße von $3 \times 16\ \mu\text{m}$ und einer Gateoxiddicke von $d_i = 12\ \text{nm}$ sind im Bild 3.23 dargestellt. Die Ausgangskennlinien zeigt die erwartete Abhängigkeit des Drain-Source Stroms I_{DS} von der Gate-Source Spannung V_{GS} . Der Messbereich für die Drain-Source Spannung V_{DS} liegt zwischen 0 und $-3\ \text{V}$. Die Kennlinien entstehen durch die Variation von V_{GS} mit konstanten Werten zwischen $0 \dots -2.4\ \text{V}$. Bei $V_{GS} = 0\ \text{V}$ wird keine Ladungs-Inversion im Kanal des FETs erzeugt und es kann deshalb kein Drain-Source Strom gemessen werden. Erst eine betragsmäßige Erhöhung von V_{GS} führt dann zum Einsetzen der Inversion

und zu einer Anreicherung von positiven Ladungsträgern im Kanalbereich. Dadurch ist es dann möglich, einen Drain-Source Strom zu messen.

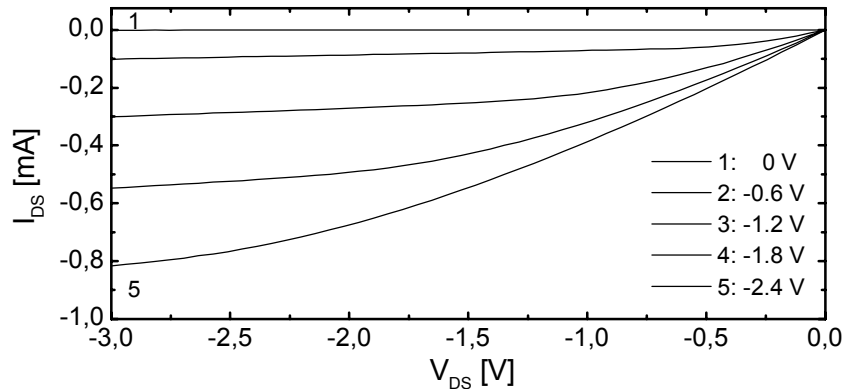


Bild 3.23: Ausgangskennlinien eines p-Kanal Feldeffekttransistors mit einer Gateabmessung von $L = 3 \mu\text{m}$ und $b = 16 \mu\text{m}$. Konstante V_{GS} -Werte zwischen $0 \dots -2,4 \text{ V}$. Die Dicke des Gateoxids liegt bei $d_i = 12 \text{ nm}$.

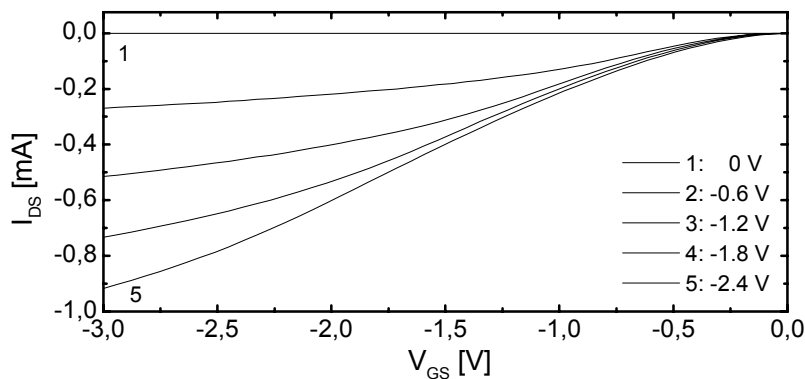


Bild 3.24: Transferkennlinien eines p-Kanal Feldeffekttransistors mit einer Gateabmessung von $L = 3 \mu\text{m}$ und $b = 16 \mu\text{m}$. Konstante V_{DS} -Werte zwischen $0 \dots -2,4 \text{ V}$.

Die Transferkennlinien in Bild 3.24 und deren Ableitungen in Bild 3.25 sind bei der Charakterisierung der FET von besonderer Bedeutung. Der Einsatzpunkt für die Ausbildung der Inversion und damit zur Beobachtung eines Drain-Source Stroms liegt bei dem hier verwendeten p-Kanal bei der Schwellspannung von $V_{TH} = -0,1 \text{ V}$. Deutlich zu sehen ist, dass alle Kennlinien bei $V_{TH} = -0,1 \text{ V}$ starten und der beobachtete Strom I_{DS} in Abhängigkeit von der Gate-Source Spannung V_{GS} ansteigt. Denn bei der kontinuierlichen Vergrößerung von V_{GS} erhöht sich auch die Anzahl der durch Inversion im Kanal er-

zeugten positiven Ladungsträger. Aus den Transferkennlinien des p-Kanal FETs in Bild 3.24, die die Abhängigkeit des Drain-Source Stroms I_{DS} vom Source-Gate Spannung V_{GS} beschreiben, kann die Steilheit g_m für diesen Anreicherungstyp berechnet werden.

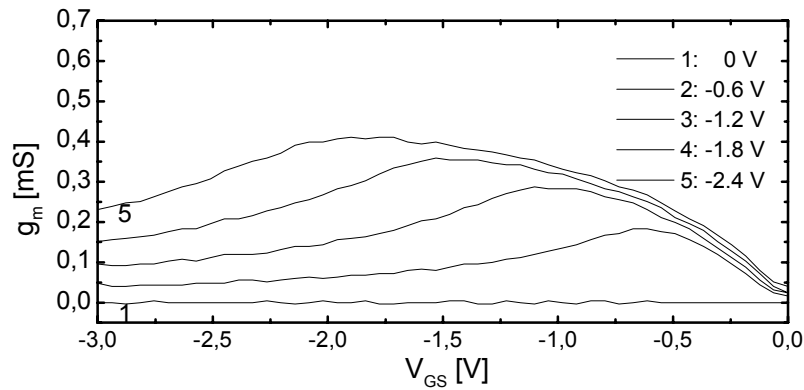


Bild 3.25: Steilheit g_m bestimmt aus den Transferkennlinien des p-Kanal Feldeffekttransistors.

Bild 3.25 zeigt die aus den Transferkennlinien berechneten Steilheiten. Während des Messbetriebs wird die Gate-Source Spannung so gewählt, dass sich eine kleine Änderung in einer möglichst großen Änderung im Drain-Source Strom bemerkbar macht. Diese feste Einstellung während des Messbetriebs wird Arbeitspunkt des FETs genannt. Aus den Verläufen in Bild 3.25 würde man den Arbeitspunkt bei $V_{GS} = -1.75$ V und $V_{DS} = -2.4$ V beim Messbetrieb einstellen, aufgrund seiner maximalen Steilheit von $g_m = 0.4$ mS.

3.2.5.2 n-Kanal FET

Die Kennlinien der n-Kanal FET liegen im 1. Quadranten. Die Gate-Source Spannung hat positive Werte, damit es zur Ausbildung eines Inversionskanals kommt. In diesem Fall besteht der Inversionsstrom I_{DS} aus negativen Ladungsträgern.

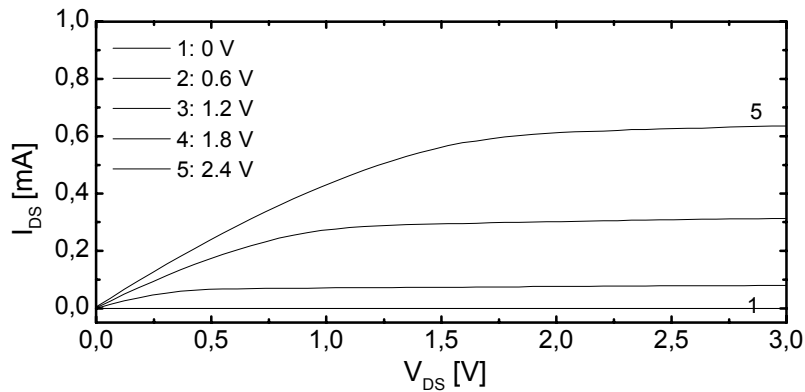


Bild 3.26: Ausgangskennlinien eines n-Kanal Feldeffekttransistors mit einer Gateabmessung von $L = 2 \times 2 \mu\text{m}$ und $b = 16 \mu\text{m}$. Konstante V_{GS} -Werte zwischen $0 \dots 2.4 \text{V}$. Die Dicke des Gateoxids liegt bei $d_i = 12 \text{nm}$.

Die Ausgangskennlinien des n-Kanal Feldeffekttransistors mit der Abmessung von $L = 2 \times 2 \mu\text{m}$ und $b = 16 \mu\text{m}$ mit einem Gateoxid von 12nm sind im Bild 3.26 dargestellt. Der hier verwendete n-Kanal zeigt erst ab V_{GS} -Werten größer Null einen nennenswerten Anstieg des Drain-Source Stroms. Deshalb liegt hier ein n-Kanal FET mit Anreicherungssteuerung vor.

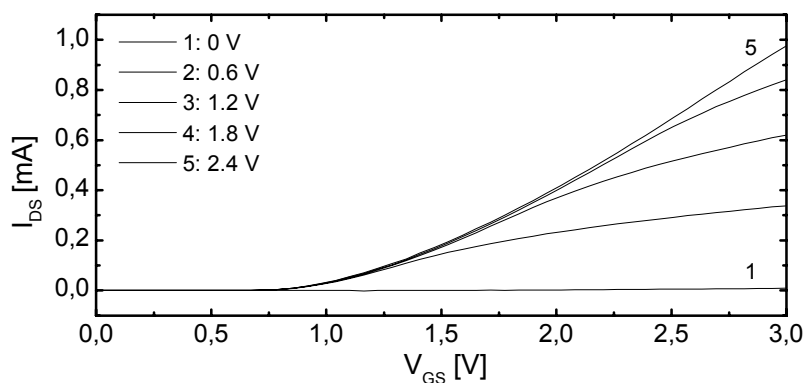


Bild 3.27: Transferkennlinien eines n-Kanal Feldeffekttransistors mit einer Gateabmessung von $L = 2 \times 2 \mu\text{m}$ und $b = 16 \mu\text{m}$. Konstante V_{DS} -Werte zwischen $0 \dots 2.4 \text{V}$.

Die Transferkennlinien in Bild 3.27 zeigen die Abhängigkeit des Drain-Source Stroms von der Steuerspannung am Gate des n-Kanal FETs. Deutlich zu erkennen ist der Einsatzpunkt des Drain-Source Stroms I_{DS} bei der Schwellenspannung von $V_{TH} = 0.8 \text{V}$.

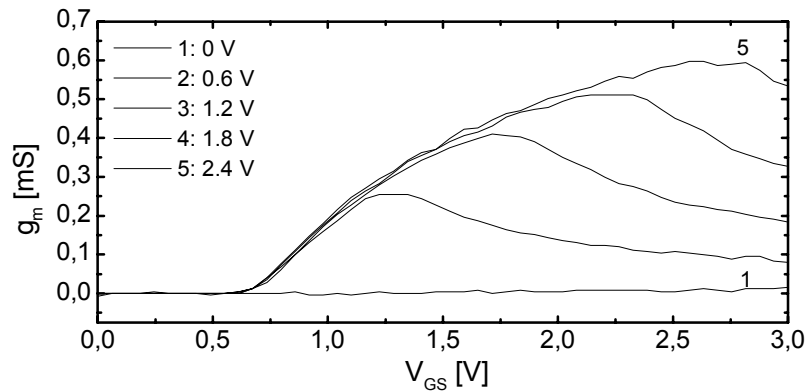


Bild 3.28: Steilheit g_m bestimmt aus den Transferkennlinien des n-Kanal Feldeffekttransistors.

Die Steilheit des n-Kanals liegt im Arbeitspunkt von $V_{GS} = 2.7 \text{ V}$ und $V_{DS} = 2.4 \text{ V}$ bei einem Wert von $g_m = 0.6 \text{ mS}$.

Geht man von einem idealen FET aus, wird die Steilheit g_m entscheidend von der Dicke des Gateoxids, der Breite b und der Länge L des Kanals sowie der Beweglichkeit der beiden Majoritätsträger beeinflusst.

Im Anlaufgebiet der Transferkennlinien, eines idealen FET, hängt die Steilheit von den konstruktiven Parametern, der Beweglichkeit sowie von der Drain-Source Spannung ab. Die Steilheit ist in diesem Bereich unabhängig vom Drain-Source Strom.

$$g_m = \mu_{n/p} \frac{\epsilon_i}{d_i} \frac{b}{L} V_{DS} \quad (3.1)$$

Wohingegen die Steilheit im Sättigungsbereich durchaus vom Drain-Source Strom anhängig ist.

$$g_m = \frac{\sqrt{2 \mu_{n,p} \epsilon_i I_{SD}}}{L d_i} \quad (3.2)$$

Da bei den Kopplungsmessungen die Arbeitspunkte der p- und n-Kanal FETs im Anlaufgebiet liegen werden im folgenden die Auswirkungen der konstruktiven Parameter auf die Steilheit diskutiert.

Die Auswertung aller Gatekombinationen in Bezug auf die Steilheit zeigt, dass wie erwartet Breiten mit $b = 16 \text{ }\mu\text{m}$ und effektiven Längen von $L = 2$ und $3 \text{ }\mu\text{m}$ die größten

Werte für die Steilheit liefern. Zusätzlich wirkt sich auch die Dicke des Gateoxid aus. Durch die Verkleinerung der Gateoxidschicht vergrößert sich die Steilheit. Aufgrund dieser Tatsache wurden bei der Herstellung 3 Oxiddicken, $d_i = 8, 10$ und 12 nm, mit dem neu eingeführten Oxidationsschritt in trockener Atmosphäre realisiert (siehe Anhang). Diese Betrachtung für FETs mit einem Gateabstand von $200 \mu\text{m}$ gilt auch für die $100 \mu\text{m}$ Abstände. Die Werte für die Steilheiten liegen zum Teil nur geringfügig unter denen mit dem $200 \mu\text{m}$ Abständen. Der Grund für die geringere Steilheit ist der erhöhte Wert für den Bahnwiderstand. Zusammenfassend ergeben sich für die p-Kanal Feldefekttransistoren Steilheitswerte von 0.4 - 0.6 mS. Der Bereich für die n-Kanal Anreicherungstypen liegt hier bei 0.5 - 1.2 mS.

Ein weiterer Aspekt bei der Beschreibung der Steilheit ist die Abhängigkeit der Steilheit g_m vom Drain-Source Strom. Nach [Müller, 87] ist die Steilheit im Bereich schwacher Inversion proportional dem Drain-Source Strom und wächst im Bereich starker Inversion nur noch mit $\sqrt{I_{SD}}$.

Die Verwendung von n-Kanal FETs für die Kopplungsmessung zeigen Vorteile in den Steilheiten als auch Nachteile in der Langzeitstabilität. Die p-Kanal weisen geringere Steilheiten auf, zeigen aber bzgl. der Stabilität gegenüber dem Elektrolyten länger Standzeiten.

Die Abweichung von dem idealen Verlauf bei den Ausgangs- und Transferkennlinien kann man auf mehrere physikalische Effekte zurückführen, [Müller, 87].

Die hier benutzen Gleichungen beschreiben einen idealen FET, bei dem die Beweglichkeit der Ladungsträger als konstant angenommen wird. Beim Übergang zu einem realen FET müssen die Änderungen im Beweglichkeitsverhalten berücksichtigt werden. Auf die Ladungsträger des Drain-Source Stroms wirkt zum einen das Längsfeld in Richtung des Stroms und zum anderen zusätzlich ein Querfeld. Dieses Querfeld ist für die Beschleunigung der Ladungsträger in Richtung Substrat-Oxid Grenzfläche verantwortlich, wodurch eine zusätzliche Streuung an dieser Grenzschicht die Beweglichkeit beeinflusst. Diese feldabhängige Beweglichkeit ist verantwortlich, dass die Steilheit im Anlaufbereich ein mehr oder weniger ausgeprägtes Maximum ausbildet. Dieses Verhalten ist in Bild 3.25 und Bild 3.28 zu erkennen. Die Transferkennlinien für den p- und n-Kanal zeigen diese veränderte Beweglichkeit im Anlaufbereich deutlich. In Bild 3.24

und Bild 3.27 bewirkt die Abnahme der Beweglichkeit, im Bereich starker Inversion, eine Reduzierung des Drain-Source Stroms I_{DS} .

Aus den geometrischen Gategrößen und der Oxiddicke kann die Defekt-Elektronenbeweglichkeit nach Gl. (3.1) bestimmt werden. Sie liegt bei den p-Kanal-FETs mit $\mu_p = 108 \text{ cm}^2/\text{Vs}$ um den Faktor zwei unter dem Wert, wie sie üblicherweise bestimmt wird [Müller, 87] ($\mu_p = 220 \text{ cm}^2/\text{Vs}$). Die Elektronenbeweglichkeit von $\mu_n = 217 \text{ cm}^2/\text{Vs}$ liegt um den Faktor drei unter dem üblichen Wert [Müller, 87] ($\mu_n = 670 \text{ cm}^2/\text{Vs}$). Mögliche Ursachen für die Abweichungen von den üblichen Werten können durch einen Fehler in der Abschätzung b/L , den Einfluss des Zuleitungswiderstandes und durch Streuprozesse bedingt sein.

4 Experimenteller Aufbau

Die Untersuchung der Kopplungseigenschaften von Zellen mit Sensoren erfordern es, Potentialänderungen im μV -Bereich zu messen. Dazu gibt dieses Kapitel eine Beschreibung der einzelnen Elemente des Gesamtaufbaus sowie deren Funktionsweise. Weiterhin werden die für die Einzelzell-Untersuchungen notwendige Patch-Clamp Technik erklärt, sowie die Schritte bei den Zell-Sensor Kopplungen erläutert. Des weiteren wird das Messprinzip zur Detektion der extrazellulären Signale und die dafür notwendige Messelektronik beschrieben.

4.1 Messaufbau

Der gesamte Messaufbau unterteilt sich in mehrere funktionell unterschiedliche Einheiten, die in Bild 4.1 als Blockschaltbild dargestellt sind. Zur Aufzeichnung der extrazellulären Signale wird ein EGE-Vorverstärker, der in dieser Arbeit realisiert wird [Krause, 2000a] und ein FET-Vorverstärker mit einer nachgeschalteten Hauptverstärkereinheit eingesetzt. Der Vorverstärker dient zum einen der Aufnahme der EGE und FET Arrays und zum anderen enthält er die erste Stufe zur Signalverstärkung. Der Hauptverstärker enthält die Spannungsversorgung aller Operationsverstärker sowie der p- und n-Kanal Feldeffekttransistoren. Der Hauptverstärkereinschub dient auch zur Unterbringung der zweiten und letzten Stufe der Signalverstärkung. Die Spannungsversorgung des Hauptverstärkers zur Charakterisierung der FET Arrays erfolgt über die Netzspannung. Bei der Durchführung der Kopplungsexperimente wird eine Batterie eingesetzt, um die extrazelluläre Messeinheit galvanisch vom Netz zu trennen.

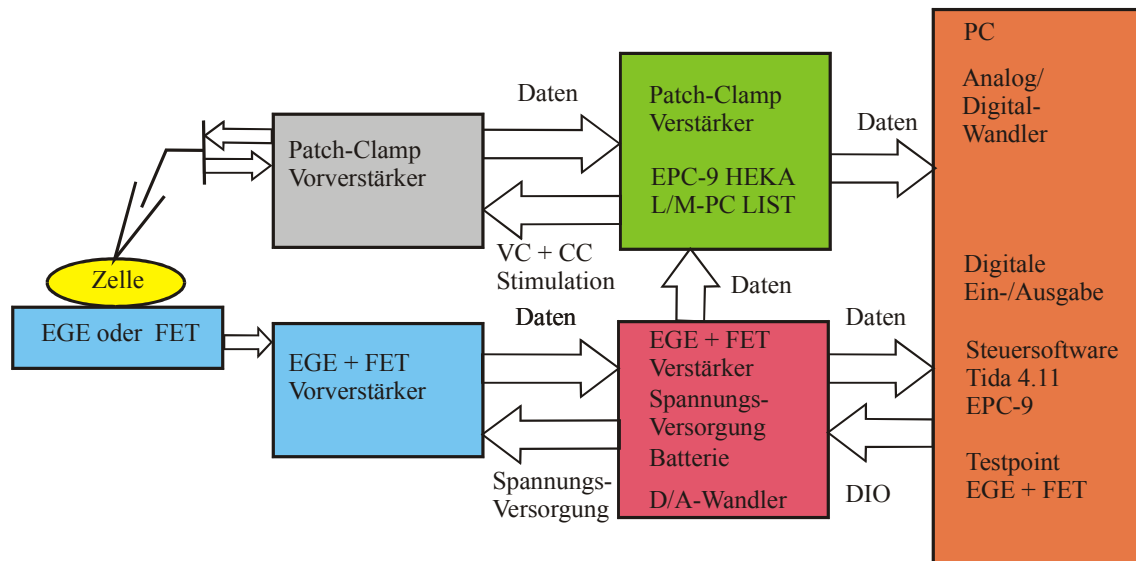


Bild 4.1: Blockschaltbild des experimentellen Aufbaus zur Untersuchung der extrazellulären Signalkopplung durch FET und EGE mit Hilfe der Patch-Clamp Technik.

Zur Untersuchung der elektrischen Zelleigenschaften mit Hilfe der Patch-Clamp Technik stehen zwei kommerziell erhältliche Patch-Clamp Verstärker zu Verfügung, (List-Medical, L/M-PC) und (HEKA, EPC-9). Die Verschiebung der Glaselektrode im μm Bereich wird mit einer Manipulatoreinheit von Luigs&Neuman erreicht. Diese Einheit besteht aus 3 Schrittmotoren die in x-, y- und z-Richtung beweglich sind und können über eine Tastatur angesteuert werden. Die dafür notwendige Spannungsversorgung ist, wie der Hauptverstärker und der Patch-Clamp Verstärker, in einem Rack untergebracht. An dieser Einheit ist der Patch-Clamp Vorverstärker mit einer Halterung für die Glaselektrode befestigt.

Zur Beobachtung der Zellen auf den EGE und FET Oberflächen kann für die EGEs aufgrund der Verwendung von Glaswafern ein inverses oder auch ein Auflichtmikroskop eingesetzt werden. Dagegen ist für Experimente mit den FETs wegen des verwendeten Siliziums nur das Auflichtmikroskop einsetzbar. In dieser Arbeit wird daher zur Durchführung der Kopplungsexperimente ausschließlich ein Auflichtmikroskop von Zeiss eingesetzt.

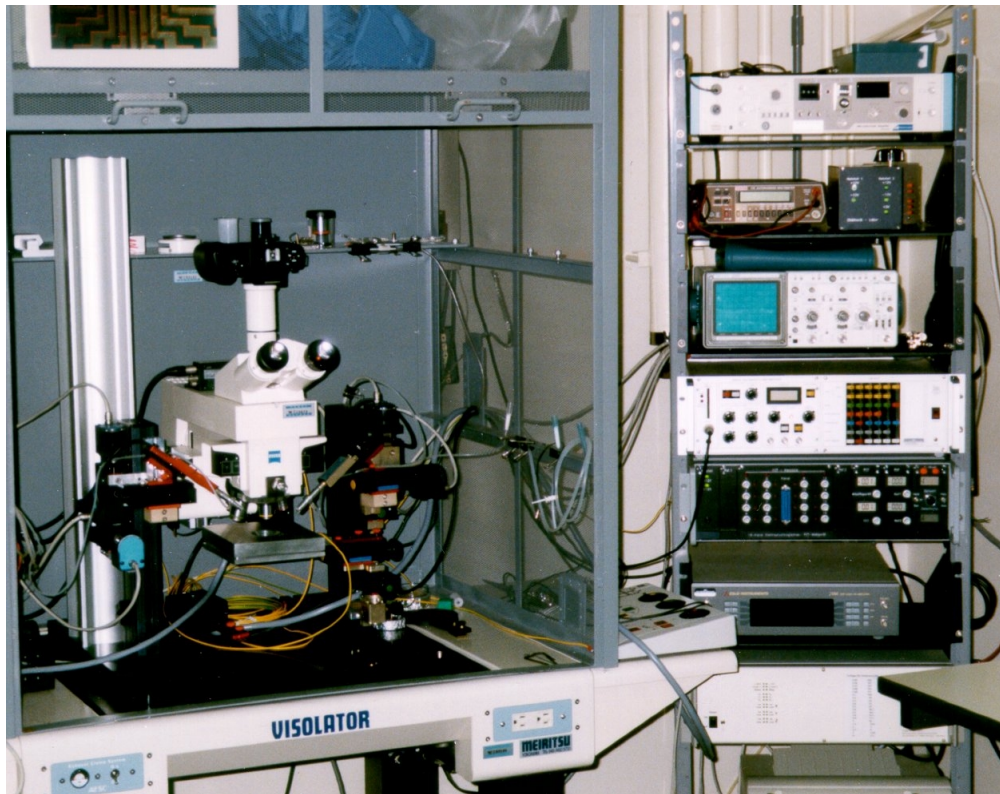


Bild 4.2: Der hier dargestellte Messaufbau steht am Institut für Physikalische und Chemische Forschung (RIKEN), Wako (Tokio, Japan) und entspricht dem Aufbau am MPI in Mainz. Rechts und links vom EGE Vorverstärker stehen die Manipulatoreinheiten mit den Patch-Clamp Vorverstärkern. Darüber ist das Auflichtmikroskop mit einer Spiegelreflexkamera an eine Aluminiumsäule montiert. Im Rack rechts von dem Faradaykäfig stehen der Patch-Clamp Verstärker, die Verstärkerelektronik, das Oszilloskop und die Manipulatorsteuerung. Nicht im Bild zu sehen ist der Messcomputer.

Um Erschütterungen während des Messens zu vermeiden, erfolgt die Verschiebung des Auflichtmikroskops in z-Richtung ebenfalls über die Manipulatoreinheit. An das Auflichtmikroskop ist über einen Aufsatz eine Spiegelreflex-Kamera montiert, die zur Dokumentation benutzt werden kann. Die eingesetzten Zeiss-Objektive haben 5x, 10x und 20x Vergrößerungen. Bei den Patch-Clamp Experimenten wird das 10x Objektiv eingesetzt. Beim Befüllen der Badkammern der EGEs und FETs bildet sich stets ein Meniskus an der Flüssigkeitsoberfläche, wodurch die Beobachtung entscheidend gestört ist. Eine Verbesserung dieser Situation bringt die Auflage von Deckgläsern über der Badkammern, um so einen definierten Übergang des Lichtes zu ermöglichen. Eine weitere Verbesserung konnte durch die Verwendung eines Immersionsobjektivs erzielt werden. Das hierbei verwendete Olympus-Objektiv hat eine 20x Vergrößerung. Dabei

wird das Objektiv in die extrazelluläre Badlösung eingetaucht, nachdem die Glaselektrode für den Patch-Clamp Versuch in das Medium der Badkammer der EGEs oder FETs eingetaucht ist. Dies ermöglicht eine verbesserte Beobachtung der Zelle, insbesondere bei der Annäherung der Glaselektroden spitze an die Zelle.

Die verwendeten Zellsysteme werden in einem Inkubator bei 5% CO₂ Anteil und einer Temperatur von 37 °C für mehrere Tage in Kultur gehalten. Kulturbegleitende Maßnahmen wie der Austausch von Kulturmedium erfolgt in einer Sterilbank von Heraeus.

Zur Aufnahme von Messdaten und zur Kontrolle der Messung stehen Steuerprogramme zur Verfügung, die durch [Sprössler, 97] mit TestPoint (Keithley, Deutschland) und ADBasic (Jäger Messtechnik, Deutschland) erstellt worden sind. Diese Programme dienen dazu die Messkanäle, welche den Gates der FETs bzw. EGEs entsprechen, auszuwählen, die Spannungseinstellungen für den Arbeitspunkt zwischen Drain-Source V_{DS} und Gate-Source Spannung V_{GS} herzustellen. Zusätzlich wird durch das Programm die Kompensation des DC Anteils des Stromsignals vor der Messung durchgeführt. Die Messsoftware dient zusätzlich zur Aufnahme der Messdaten auch zur Verarbeitung von Signalen von externen Geräten wie Patch-Clamp Verstärkern bzw. Lock-in Verstärkern.

Ein zweiter Ansatz zur Aufnahme von extrazellulären und elektrophysiologischen Messdaten ist die Kombination der von TestPoint kontrollierten Spannungseinstellungen, für den Betrieb der EGE und FET, und die Kontrolle der kompletten Datenaquisition durch die Steuersoftware des Patch-Clamp Verstärkers EPC 9 (Tida 4.11 Software, HEKA Deutschland). Diese Software ermöglicht die Durchführung der Kompensation des Nullpotentials der Glaselektrode, der parasitären Kapazitäten und des Serienwiderstands bei den Patch-Clamp Messungen sowie das Erstellen von Einzelprogrammen bzw. der Mittelung der gemessenen Daten.

4.2 Messelektronik

Für die Kopplungsmessungen im Kontaktbereich zwischen Zelle und Sensorfeld stehen ein Vorverstärker für die Aufnahme der Elektroden-Arrays und ein Vorverstärker für die

Feldeffekttransistoren Arrays zur Verfügung. Im folgenden werden die für die Signalverarbeitung elektrischen Komponenten sowie der Aufbau der Verstärker beschrieben.

4.2.1 EGE Messplatz

Das aus Aluminium gefräste Gehäuse des EGE Vorverstärkers, welches aus einer Grundplatte und zwei Deckelteilen besteht, ist für den Einsatz mit einem inversen Mikroskop (Transmission mit Standard Phasenkontrast) bzw. mit einem Auflichtmikroskop (Reflexion und DIC) konzipiert worden. Deshalb besitzt das Gehäuse eine Öffnung in der Grundplatte und eine runde Öffnung im Deckel. Die Grundplatte dient als Aufnahme für die Platine. Auf der Platine befindet sich der Nullkraftsockel (PENTIUM Socket 7, MOLEX Deutschland), der in der Mitte ebenfalls eine rechteckige Öffnung besitzt. Dieser Sockel ermöglicht einen schnellen Austausch des EGE Arrays. Des weiteren befinden sich die Anschlüsse für die Datenleitungen, einem 64 Sub D Stecker, für die Spannungsversorgung der Operationsverstärker und die Spannungsversorgung der FETs auf der Platine. In Bild 4.3 ist die Grundplatte mit der bestückten Platine dargestellt. Hauptbestandteile der elektronischen Verschaltung auf der Platine sind die kommerziellen Junction Feldeffekttransistoren (JFET BF510, Philips Semiconductor, Niederlande) und die Operationsverstärker (OP97, Analog Devices GmbH, Deutschland). Diese JFETs zeigen in dem Frequenzbereich (DC bis 10 kHz), in dem die Kopplungsmessungen durchgeführt werden, ein gutes Signal zu Rauschverhältnis. Die Elektroden des EGE Arrays sind nach dem Einsetzen in den Nullkraftsockel direkt mit den Gates der 16 JFET verbunden. Die Ag/AgCl Badelektrode des EGE Arrays dient als Bezugspunkt beim Anlegen der Gate-Source Spannung und ist, ebenfalls über den Sockel, mit der Masse der Versorgungsleitungen auf der Platine verbunden, Bild 4.4.

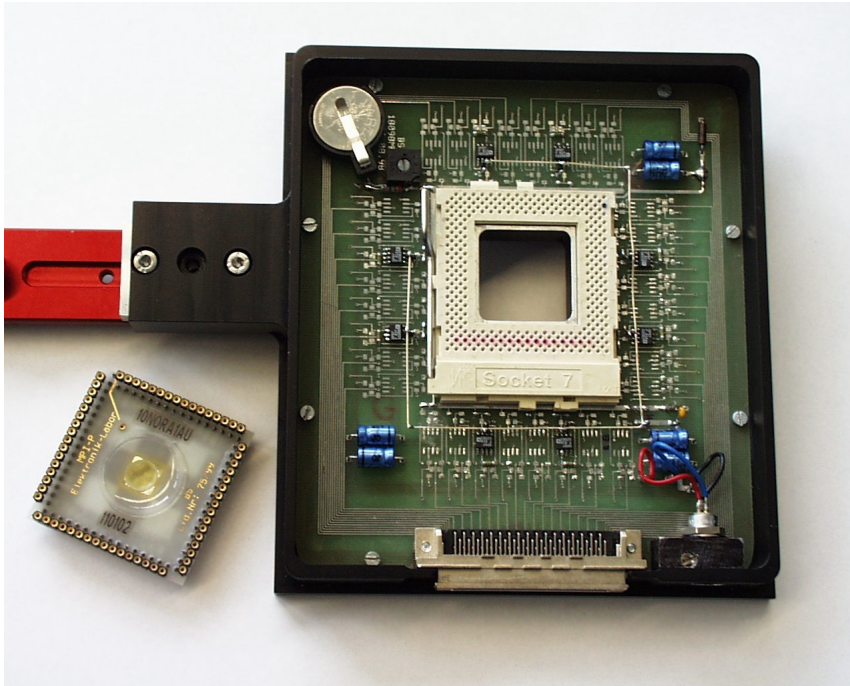


Bild 4.3: Gehäusegrundplatte mit der Platine, dem Nullkraftsockel sowie den Anschlüssen für die Datenleitungen und Spannungsversorgungen.



Bild 4.4: EGE Vorverstärker mit eingesetztem EGE Array und Ag/AgCl Badelektrode, sowie die zwei Abdeckungen, [Krause, 2000 a].

Der Arbeitspunkt des JFET wird intern konstant über eine 3V Batterie und einem Potentiometer direkt auf der Platine eingestellt. Dabei wird nur das Sourcepotential verändert, um somit eine gleiche Spannungsdifferenz zwischen Drain-Source V_{DS} und Gate-

Source Spannung V_{DS} herzustellen. Die zweite Möglichkeit, einen Arbeitspunkt zu wählen, ist die Spannungen V_{DS} und V_{GS} extern variabel einzustellen. Dadurch können auch die Ausgangs- und Transferkennlinien des BF510 aufgenommen werden, Bild 4.5.

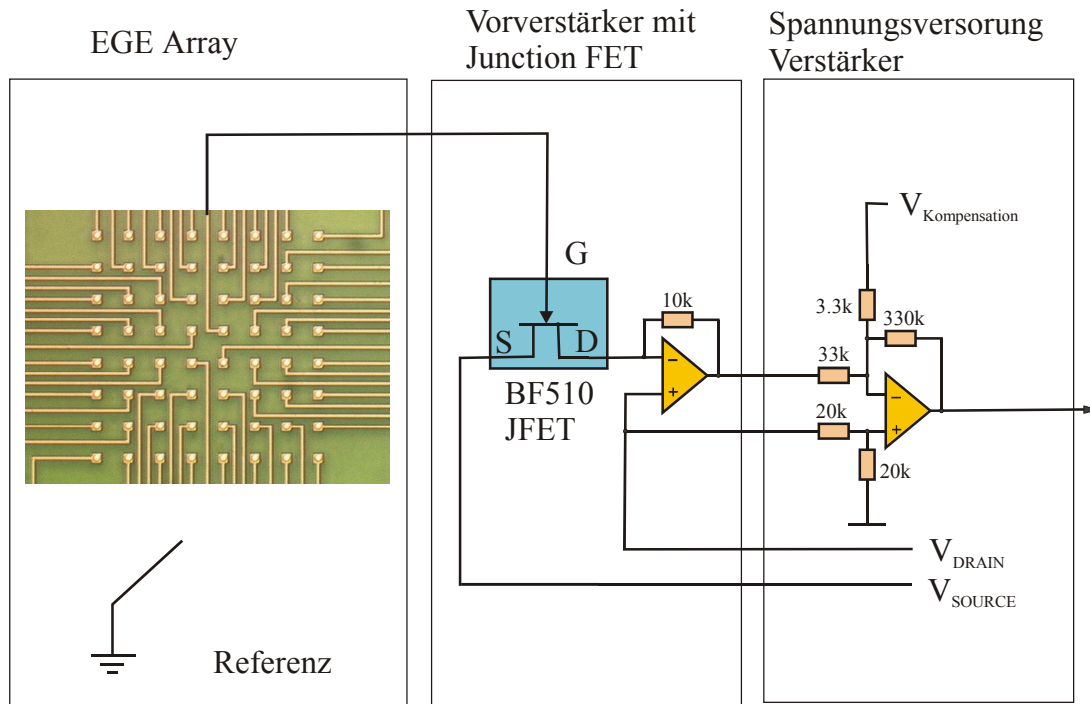


Bild 4.5: Blockschaltbild für den EGE Messplatz, mit den EGE-Arrays und der Ag/AgCl-Referenzelektrode, der Vorverstärkereinheit mit dem JunctionFET sowie der Verstärkereinheit mit der Spannungsversorgung.

Die Sourceleitungen der JFETs sind mit den negativen Eingängen der Operationsverstärker verbunden. Diese dienen als Strom-Spannungskonverter mit einer Wandlung von $V = 10k\Omega I$. Die mit den Operationsverstärkern in Spannungssignale gewandelten Stromsignale werden dann über ein Kabel in die Verstärkereinheit weitergegeben.

Im gewählten Arbeitspunkt ist dem eingekoppelten Signal I_{Signal} ein großer Arbeitsstrom überlagert. Der nach dem ersten Operationsverstärker vorliegende gemittelte, dem großen Arbeitsstrom entsprechende, Spannungswert wird kompensiert. Dazu wird ein 16 bit D/A Wandler (DAC707JP, Burr-Brown, USA) eingesetzt. Das kompensierte Signal wird anschließend mit einem Operationsverstärker (OP-07, Analog Devices, USA) um den Faktor 100 nachverstärkt.

Die Source- und Drain-Potentiale zum Betrieb des JFET werden über einem in dem Hauptverstärkereinheit eingebauten D/A Wandler eingestellt.

4.2.2 Rauschverhalten der EGE

Für die spätere Kopplungsmessung ist das Rauschverhalten der EGE mit der nachgeschalteten Verstärkerelektronik wichtig. Um die einzelnen Beiträge zum Gesamtrauschen zu bestimmen, wird der Eingang des Operationsverstärkers nacheinander jeweils mit einem 10 k Ω Widerstand, dann mit dem JFET BF510 mit geerdetem Eingang und dann mit der Kombination aus JFET BF510 und Goldelektrode verbunden. Anschließend werden die Gate-Source und Source-Drain Spannungen angelegt und der Drain-Source Strom I_{DS} für 5s bei einer Auflösung von 10 kHz gemessen. Die Stromänderungen werden dann auf ein Gate-Potential V_J umgerechnet.

In Bild 4.6 sind die aus den Source-Drain Änderungen mit entsprechenden g_m berechneten zeitlichen Verläufe für V_J dargestellt. Bild 4.6 A zeigt den Verlauf bei dem der Eingang des Operationsverstärkers mit einem Widerstand von $R = 10 \text{ k}\Omega$ verbunden ist. Über den Widerstand wird eine Spannung von $V = 0.4 \text{ V}$ angelegt. Die resultierende Stromänderung von $I_{DS} = 1.9 \text{ nA}$ entspricht einer peak-to-peak Amplitude von $V_J = 14 \text{ }\mu\text{V}$. Bild 4.6 B zeigt den Verlauf, bei dem der Drain-Anschluß des JFET BF510 mit dem Eingang des Operationsverstärkers verbunden wird. Der Gate-Anschluss wird dabei auf Masse gelegt. Dann werden die Gate-Source Spannung auf $V_{GS} = 0.05 \text{ V}$ und die Drain-Source Spannung auf $V_{DS} = 1 \text{ V}$ gesetzt. Der JFET besitzt in diesem Arbeitspunkt eine Steilheit von $g_m = 2.88 \text{ mS}$. Die Stromänderung von $I_{DS} = 100 \text{ nA}$ entspricht hier einem peak-to-peak Verhältnis von $V_J = 35 \text{ }\mu\text{V}$. In Bild 4.6 C ist der zeitliche Verlauf dargestellt, wie er in einem Kopplungsexperiment mit den EGEs während des Messbetriebs vorkommt. Dabei wird das Gate des JFET nicht wie in Bild 4.6 B geerdet sondern mit einer Goldelektrode eines EGE Arrays verbunden. Somit entspricht dieser Fall der kompletten Messkonfiguration, wie sie zur Aufzeichnung extrazellulärer Signale bei der Kopplung verwendet wird. Die Steilheit von $g_m = 2.58 \text{ mS}$ wird durch ein $V_{GS} = 0 \text{ V}$ und ein $V_{DS} = 1.2 \text{ V}$ erreicht. Die Stromänderung von $I_{DS} = 258 \text{ nA}$ ergibt mit der Steilheit im Arbeitspunkt eine peak-to-peak Änderung von $V_J = 100 \text{ }\mu\text{V}$. Aus diesen Messungen resultiert, dass das Rauschen des Signals I_{DS} bzw. V_J der Messelektronik deutlich geringer ist, als die für die Kopplungsexperimente eingesetzte Kombination aus Goldelektrode, JFET und Nachverstärkung. Somit beeinflusst das Rauschverhalten der nachgeschalteten Messelektronik das eingekoppelte extrazelluläre Signal nur unwesentlich.

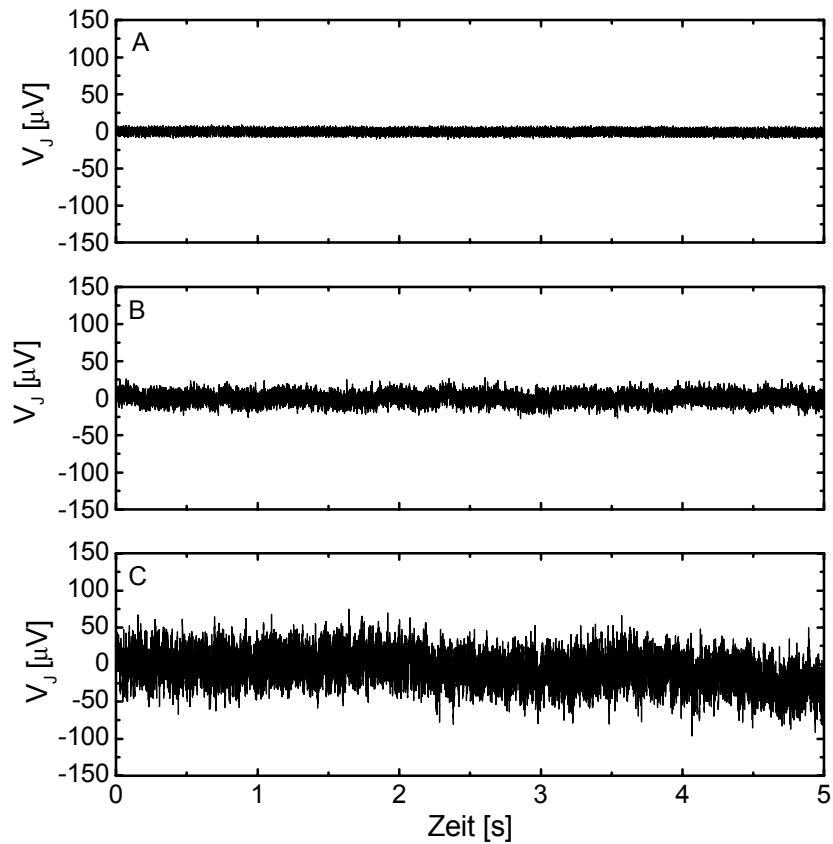


Bild 4.6: Zeitlicher Spannungsverlauf des aus I_{DS} berechneten V_J . A) Verstärkereingang mit einem $10\text{k}\Omega$ Widerstand gegen Masse; B) Gate des JFET gegen Masse; C) Goldelektroden des EGE Arrays mit dem Gate des JFET verbunden. Die Messzeit beträgt 5s und die Auflösung 10 kHz. V_J in B) und C) berechnet mit der Steilheit g_m im Arbeitspunkt.

Ein weiterer Punkt, der für die Kopplungsexperimente eine entscheidende Rolle spielt, ist die Frequenzverteilung der gemessenen Signale in Bild 4.6. Dazu werden zwei Rauschverläufe der Vorverstärkereinheit mit und ohne eingesteckten EGE Array aufgenommen, so wie es in Bild 4.6 B und C durchgeführt wurde. Für die Berechnung der Rauschspektren in Bild 4.7 werden die zeitlichen Verläufe in Bild 4.6 B und C verwendet.

Das Rauschen von Feldeffekttransistoren setzt sich, je nach Ausführungsform aus mehreren Rauscheffekten zusammen [Müller, 90]. Ein Effekt ist, sowohl bei den JFETs als auch bei den hier eingesetzten EOSFETs, das thermische Rauschen im Kanal. Wobei dieser Rauscheffekt sich durch die statistische Bewegung der Ladungsträger, abhängig

von Temperatur und Steilheit im Arbeitspunkt, auszeichnet, aber unabhängig von der Frequenz ist. Da es sich bei den in dieser Arbeit eingesetzten FET um ladungsgesteuerte Halbleiterelemente handelt, beeinflussen Ladungsschwankungen in der Raumladungszone, und zusätzlich bei den n- und p-Kanal IGFET in der Grenzschicht zwischen Halbleiter und Oxid und im Isolator durch Generation-Rekombinations Rauschen direkt den Source-Drain Strom bzw. die durch die Steilheit berechnete Potentialänderung V_J . Dieser Effekt ist frequenzabhängig, und äußert sich in einer $1/f$ -Abhängigkeit, im Bereich von einem Hz bis in den kHz Bereich. Die Rauschverläufe der JFET und der hergestellten FET werden nach der folgenden Weise verglichen.

Aus den Rohdaten, wie sie in Bild 4.6 B und C zu sehen sind, wird eine Autokorrelationsfunktion berechnet, anschließend das Fourierspektrum gebildet und in einem Rauschspektrum in Bild 4.7 dargestellt. Die Rauschspektren dienen zum einen dem Auffinden etwaiger Streufrequenzen aus dem Netz oder anderer parasitärer Einstrahlungen, zum anderen kann aus der Steigung der Spektren auf den Mechanismus des hier vorliegenden Rauschens geschlossen werden.

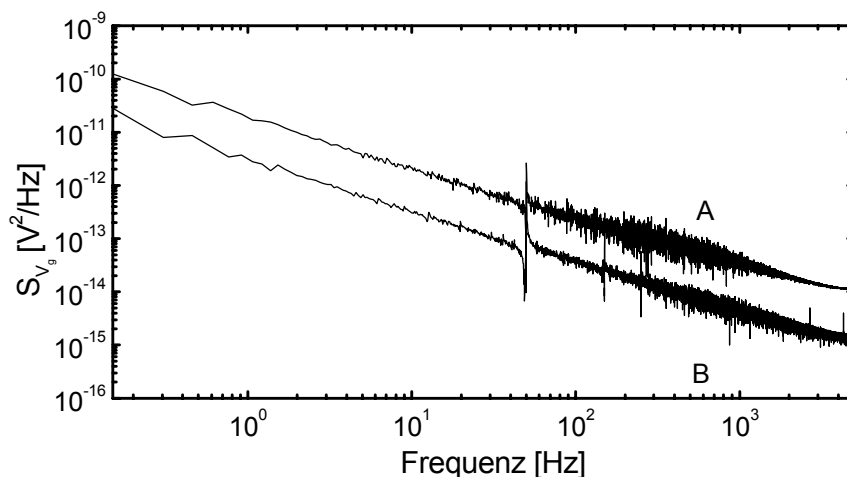


Bild 4.7: Spektrale Rauschdichte: Der obere Verlauf A) zeigt das Rauschspektrum mit eingestecktem EGE Array. Der untere Graph B) zeigt das Verhalten ohne EGE Array wobei hier die Gates der JFETs mit der Masse verbunden sind. Die Messzeit beträgt 5s, die Auflösung 10kHz . [Müller, 90]

Das Spektrum zeigt zum einen eine $1/f$ -Abhängigkeit und weist somit auf das Generation-Rekombinations Rauschen hin, zum anderen zeigt das Spektrum in Bild 4.7 B eine deutlich geringere spektrale Rauschdichte auf, als die mit den Goldelektroden verbun-

denen Gates der JFETs. Die Spektren zeigen auch deutlich, dass es außer den 50 Hz zu keinen signifikanten Einstreuungen von Frequenzen bis in den kHz Bereich aus dem Umfeld der Messapparatur kommt.

4.2.3 FET Messplatz

Der FET Messplatz in Bild 4.8 wurde durch [Sprössler, 97], [Sprössler, 98] entwickelt. Der ebenfalls wie das EGE Vorverstärkergehäuse aus Aluminium hergestellte FET Vorverstärker enthält einen Nullkraftsockel bzw. die Hauptplatine mit den Operationsverstärkern, die während dieser Arbeit durch Operationsverstärker in SMD Hybridbauweise ausgetauscht worden sind.

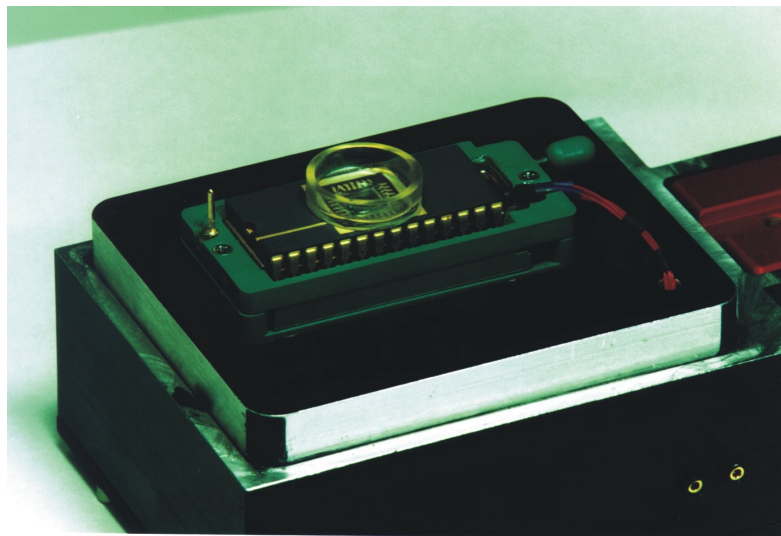


Bild 4.8: FET Messplatz wurde durch [Sprössler, 98] entwickelt. Mit dem Nullkraftsockel werden die FET Arrays elektrisch kontaktiert.

Die Kompensation und die Nachverstärkung erfolgt wie bereits zuvor beschrieben. Der Unterschied zum EGE Messplatz liegt hier in der Verwendung der in dieser Arbeit hergestellten Feldeffekttransistoren als einziger Signalwandler. Die p- und n-Kanal FET Arrays ersetzen hier die Kombination aus Goldelektroden und den kommerziellen JFETs. In Bild 4.9 ist das Messprinzip zur extrazellulären Signaleinkopplung mit den FET dargestellt.

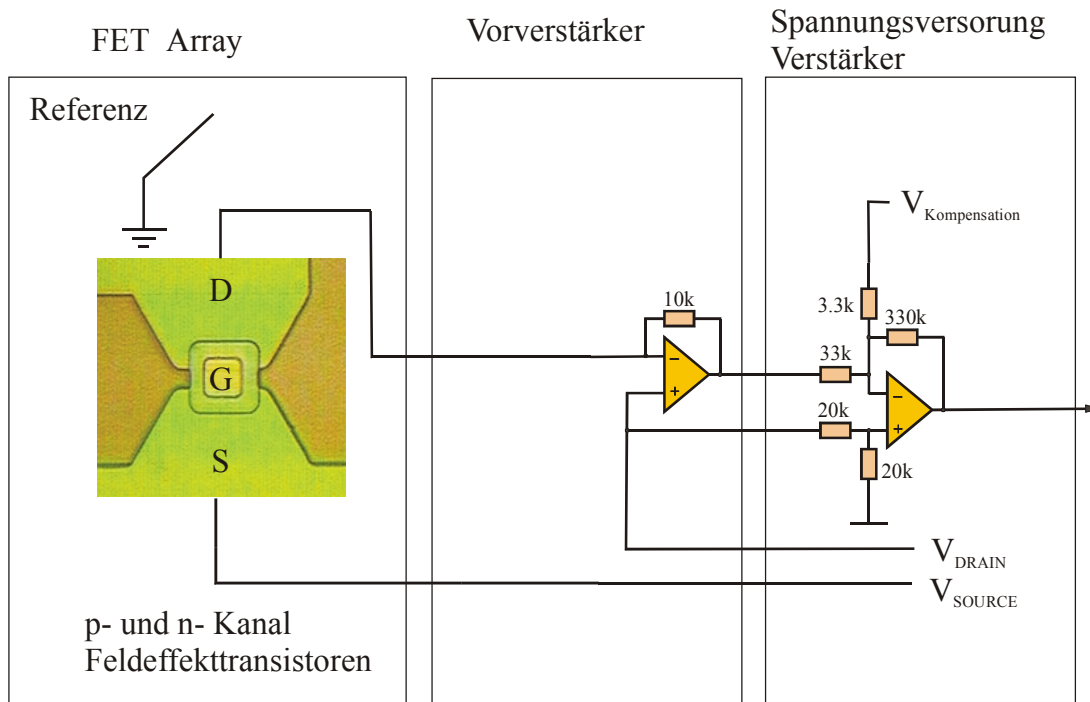


Bild 4.9: Blockschaltbild für den FET Messplatz, mit den FET Arrays und der Ag/AgCl-Referenzelektrode, der Vorverstärkereinheit sowie der Verstärkereinheit mit der Spannungsversorgung.

Für beide EGE und FET Messplätze gilt die Strom-Spannungswandlung von $1\text{nA} = 1\text{mV}$. Zudem können die aufgezeichneten Messsignale mit der gleichen Auswertesoftware bearbeitet werden.

4.2.4 Rauschverhalten der FET

Wie schon bei den EGE soll auch hier die zeitliche Veränderung von V_J der verschiedenen p- und n-Kanal FET untersucht werden. In Bild 4.10 sind die Rauschspektren zweier p-Kanal und einem n-Kanal FET dargestellt. Für die Aufnahme der Spektren werden die Badkammer der aufgebauten FET mit extrazellulärer Badlösung gefüllt. Über die Ag/AgCl-Elektrode kann das Badmedium auf Massepotential gelegt werden. Danach werden die zeitlichen Stromänderungen nach der gleichen Prozedur wie bei den EGE Rauschspektren mit 5s Messzeit und einer Auflösung von 10kHz aufgenommen. Bild 4.10 A stammt von einem p-Kanal FET mit einer Gategröße von $A_{Gate} = 3 \times 16 \mu\text{m}^2$. Im Arbeitspunkt erreicht der FET mit $V_{GS} = -1.8\text{ V}$ und $V_{DS} = -2.5\text{ V}$ eine Steilheit von $g_m = 0.5\text{ mS}$. Die dabei realisierte peak-to-peak Stromänderung von $I_{DS} = 175\text{ nA}$ ergibt mit

der Steilheit im der Rauschspannung ein $V_J = 350 \mu\text{V}$. Der FET mit dem Doppelgate, $A_{\text{Gate}} = 2 \times 2 \times 16 \mu\text{m}^2$, in Bild 4.10 B hat ein g_m von 0.45 mS , bei $V_{\text{GS}} = -2.2 \text{ V}$ und $V_{\text{DS}} = -3 \text{ V}$. Die Rauschamplitude weicht nicht sehr von der in Bild 4.10 A ab und beträgt $V_J = 300 \mu\text{V}$ bei gemessenen $I_{\text{DS}} = 135 \text{ nA}$. Eine deutliche Verbesserung im Rauschverhalten zeigt der n-Kanal FET in Bild 4.10 C. Die Gategröße beträgt $A_{\text{Gate}} = 3 \times 16 \mu\text{m}^2$. Die Steilheit mit $g_m = 0.88 \text{ mS}$ wird erreicht mit $V_{\text{GS}} = V_{\text{DS}} = 3 \text{ V}$. Mit einer Stromänderung von $I_{\text{DS}} = 140 \text{ nA}$ ergibt sich die Amplitude zu $V_J = 160 \mu\text{V}$.

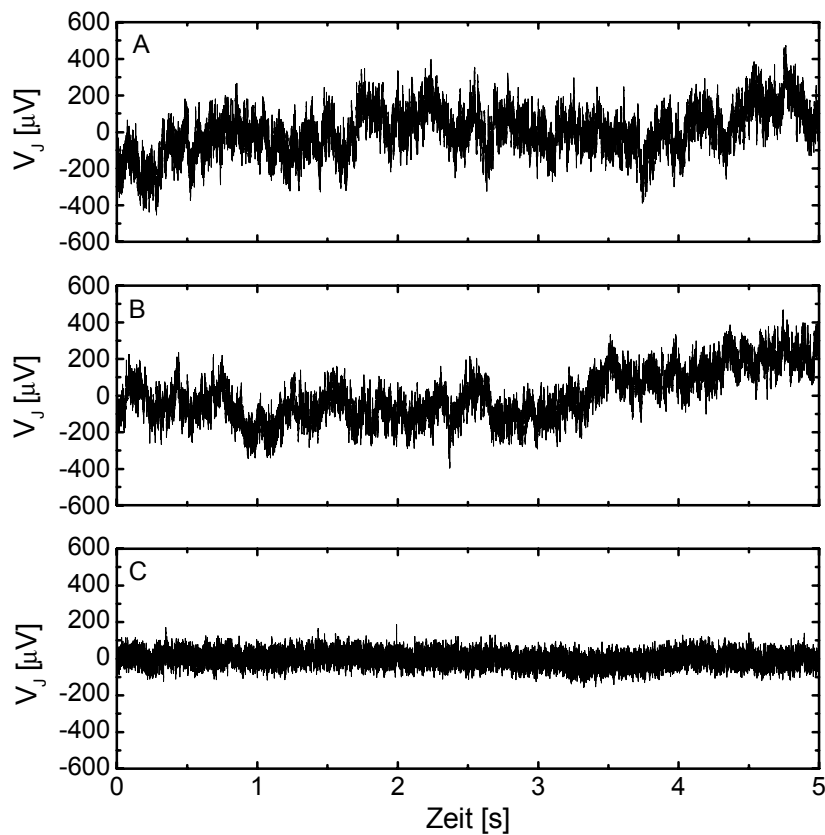


Bild 4.10: Zeitlicher Spannungsverlauf des aus I_{DS} berechneten V_J , von n- und p-Kanal FETs. A) p-Kanal FET mit einem $g_m = 0.5 \text{ mS}$; B) Doppelgate p-Kanal FET mit einem $g_m = 0.45 \text{ mS}$; C) n-Kanal FET mit einem $g_m = 0.88 \text{ mS}$. Die Messzeit beträgt 5s und die Auflösung 10 kHz.

Aus den Rauschdaten von Bild 4.10 A und C werden mit der gleichen Berechnung wie bei den EGEs die Rauschspektren in Bild 4.11 A und C berechnet.

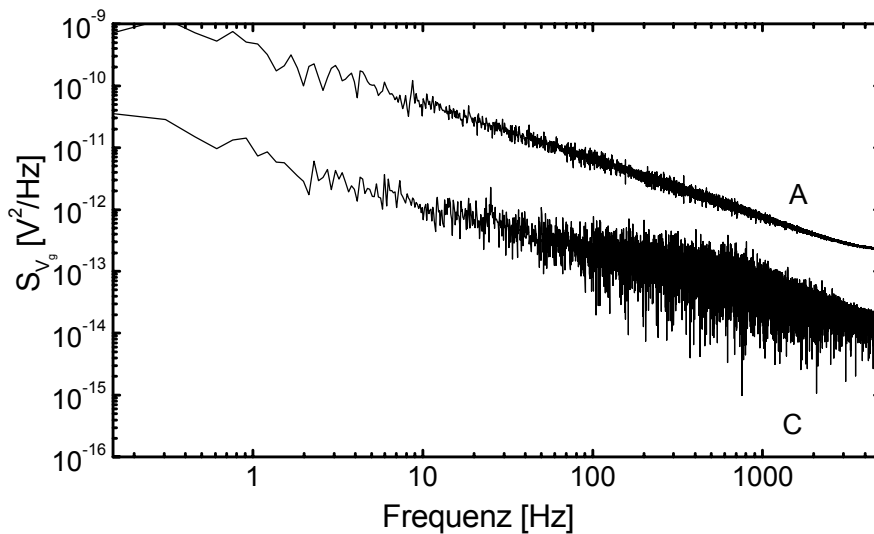


Bild 4.11: Die spektrale Rauschdichte der verwendeten p- und n-Kanal FETs aus Bild 4.10 A und C. Die Messzeit beträgt 5s, Auflösung 10kHz.

Das Rauschspektrum des n- Kanal FET in Bild 4.11 C) liegt deutlich unter dem des p-Kanal FET, wie es sich auch schon aus dem Rauschverlauf in Bild 4.10 erwarten lässt. Auch hier kann eine $1/f$ -Abhängigkeit festgestellt werden und es werden hier keine Einstreuungen festgestellt.

4.3 Versuchsdurchführung

Die Untersuchung zur Kopplung von lebenden elektrisch aktiven Zellen mit den Transistoren bedingt einen komplexen Versuchsablauf: Aufbau der FET und EGE Arrays, die Oberflächenmodifikation, die Zellpräparation und den Besatz der Arrays bis hin zur eigentlichen Kopplungsmessung zwischen Zelle und Halbleiter mit Hilfe der Patch-Clamp Technik. In den folgenden Abschnitten werden die Patch-Clamp Methode und der Ablauf der Kopplungsmessung genauer beschrieben.

4.3.1 Patch-Clamp Methode

Im Bereich der Elektrophysiologie ist die Patch-Clamp Methode nach [Hamill, 81], [Sakmann, 95] und [Neher, 76] die erste Wahl zur Untersuchung von lebenden Zellen.

Die in dieser Arbeit benutzte *Whole-Cell* Konfiguration der Patch-Clamp Technik erlaubt die elektrischen Eigenschaften, wie die Auslösung von Aktionspotentialen sowie die Ionenleitfähigkeit der ganzen Zelle zu untersuchen

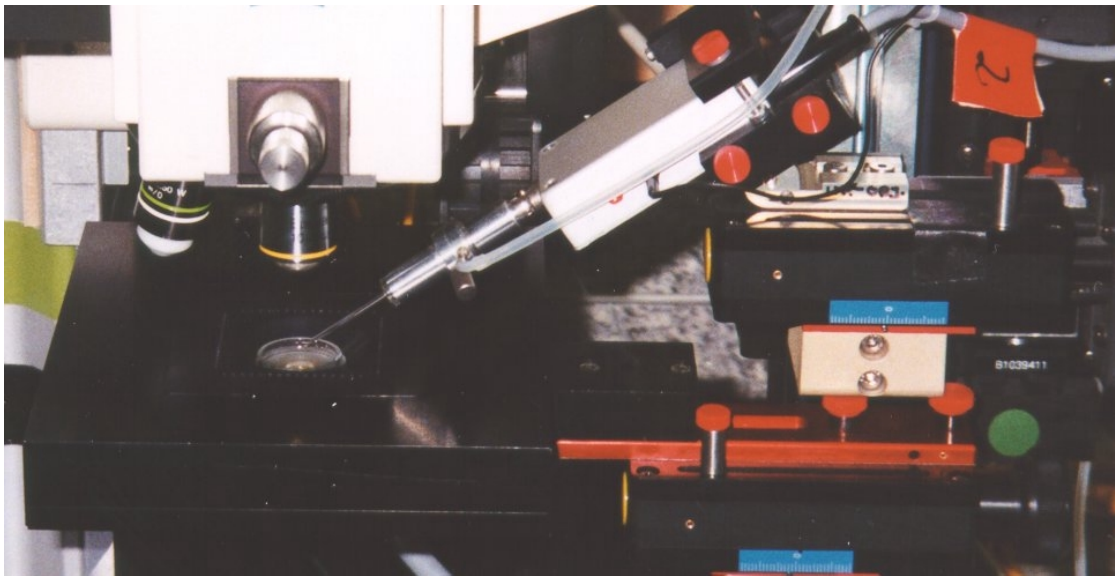


Bild 4.12: Verwendete Patch-Clamp Anordnung zur Untersuchung der elektrischen Eigenschaften. Die Patch-Clamp Glaselektrode ist mit der intrazellulären Messlösung gefüllt und steckt in einer Halterung des Patch-Clamp Vorverstärker. Die Spitze der Elektrode befindet sich ebenso in der extrazellulären Messlösung wie auch die Ag/AgCl- Referenzelektrode. Durch den Schlauch an der Halterung für die Glaselektrode, kann der benötigte Unterdruck zum Öffnen der Zellmembran kontrolliert werden. Über dem EGE Array ist das 10x Objektiv und links davon das 20x Immersionsobjektiv zu erkennen.

In der *Whole-Cell* Konfiguration unterscheidet man die *Voltage-Clamp* Methode, die zur Untersuchung der spannungsgesteuerter Ionenströme über die Zellmembran dient und die *Current-Clamp* Methode, bei der die Depolarisierung von Zellen und die Untersuchung der Aktionspotentiale im Vordergrund steht. Im Bild 4.12 ist die Versuchsanordnung für diese Patch-Clamp Experimente dargestellt.

Zu Beginn jeder Patch-Clamp Messung werden die Glaselektroden mit dem Pipettenpuller (P-97, Sutter Instruments Company, USA) gezogen. Dazu wird die Borosilikatglaskapillare mit Filament (Hilgenberg, Deutschland), mit einer Wandstärke von $s = 0.315 \text{ mm}$, einem Innendurchmesser von $D_I = 0.87 \text{ mm}$ und einer Länge von $l = 100 \text{ mm}$ in den Puller eingesetzt. Mit Hilfe des Pullers lassen sich unterschiedliche Öffnungsgrößen bzw. Spitzen herstellen. Die in dieser Arbeit verwendeten Patch-Clamp

Elektroden haben eine Öffnung von 1-3 μm . Die hergestellte Glaselektrode wird mit Hilfe einer dünnen Plastikkanüle und einer Spritze mit der intrazellulären Lösung zur Hälfte befüllt. Danach wird sie in die Halterung des Patch-Clamp Verstärkers eingesteckt, wobei in das Innere der Glaskapillare eine Ag/AgCl-Elektrode ragt, die für den elektrischen Kontakt zur Lösung dient. Danach wird durch einen Schlauch ein geringer Überdruck auf die intrazelluläre Lösung in der Glaselektrode erzeugt, die dann in das Kulturbad des FET oder EGE Array mit Hilfe der Manipulatoreinheit eingetaucht wird. Durch den Überdruck wird verhindert, dass kleine Partikel im Kulturmedium die Öffnung verstopfen. Über die Glaselektrode wird durch das Steuerprogramm des Patch-Clamp Verstärkers ein rechteckförmiger Spannungsimpuls V_{St} an die Elektrode angelegt, (Bild 4.14 A). Durch den resultierende Strom I_P und die Höhe des Spannungsimpulses lässt sich der Öffnungswiderstand an der Spitze der Glaselektrode berechnen; üblicherweise liegt er im Bereich von $R_{Patch} = 4\text{-}11 \text{ M}\Omega$ in der extrazellulären Badlösung.

Unter Beobachtung durch das Auflichtmikroskop wird die Elektrode mit der Manipulatoreinheit in x, y und z-Richtung verschoben und so über die Zelle gebracht. Nähert sich die Glaselektrode der Zellmembran an, so nimmt der durch den Spannungspuls erzeugte Strom ab. Zur Unterstützung der Abdichtung von Zelle und Glaselektrode wird der angelegte Überdruck gelöst und es bildet sich der sog. *Giga-Seal*, eine extrem hochohmige Verbindung aus. Dabei erhöht sich der Widerstand bis in den $\text{G}\Omega$ -Bereich und es entstehen im Stromsignal zusätzlich parasitäre Effekte durch Streukapazitäten C_{Streu} , (Bild 4.13, Bild 4.14 B). Durch eine Kompensationsschaltung werden diese vor dem Öffnen der Zellmembran ausgeglichen. Durch leichtes Saugen an dem Schlauch kann die Zellmembran geöffnet werden. Dies äußert sich durch kapazitive Ströme, die im Bereich der Spannungsflanken (Bild 4.14 C) entstehen. Zum Öffnen der Zellmembran wird in dieser Arbeit zusätzlich eine zweite Methode angewandt. Die Technik des *Perforated-Patch*, ([Korn, 91]), benutzt einen Porenbildner, (Amphotericin B [Rae, 91]) der das Öffnen der Zellmembran durch Saugen überflüssig macht. Dieser lichtempfindliche Porenbildner wird zur intrazellulären Lösung gegeben und inkorporiert beim *Giga-Seal* in die Zellmembran und bildet dort Poren. Dass die Membran geöffnet ist, äußert sich ebenfalls im Stromsignal im Anwachsen der kapazitiven Stromanteile. Durch den zweiten Kompensationsschritt werden die kapazitiven Stromanteile und auch der Serienwiderstand abgeglichen. Als Resultat der Kompensation erhält man die Membran-

kapazität C_M , den Membranwiderstand R_M und den Zugangswiderstand R_S , (Bild 4.13 und Bild 4.14 C). Nachdem die Membran geöffnet ist, kann man nun die elektrischen Eigenschaften der Zelle untersuchen. Das Ruhepotential V_{RP} der hier untersuchten Zellen liegt gewöhnlich zwischen -60 und -10mV.

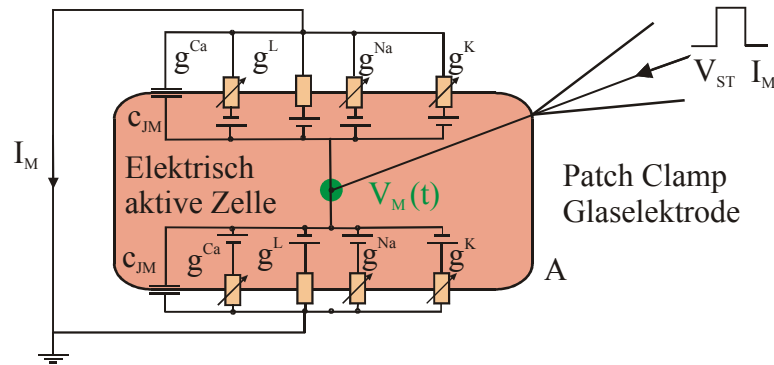


Bild 4.13: Widerstände und Kapazitäten bei der *Whole-Cell* Konfiguration.

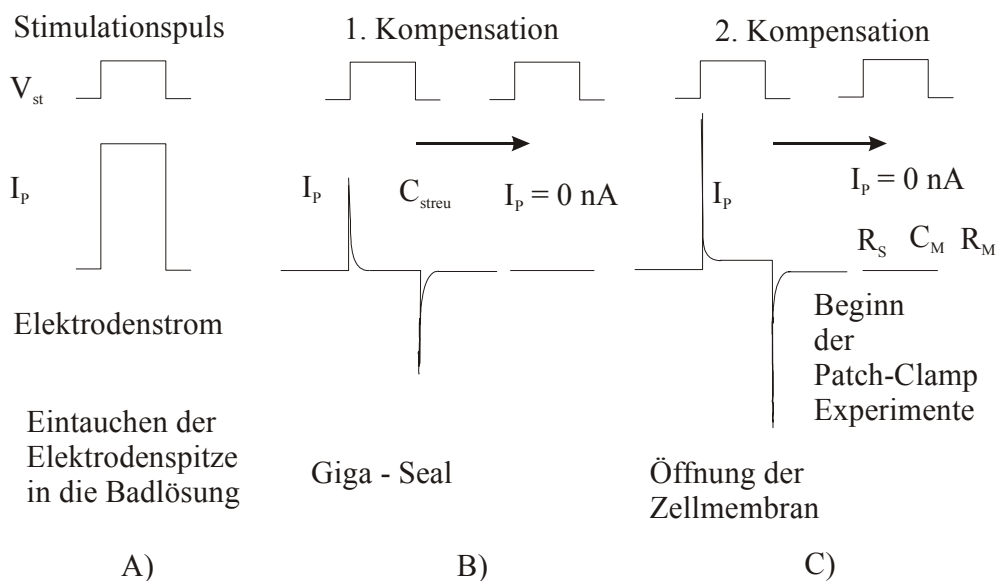


Bild 4.14: Kompensationsschritte vor den *Voltage-Clamp* Experimenten zur Bestimmung der Kapazitäten und der Widerstände vor und nach der Öffnung der Zellmembran.

Im *Voltage-Clamp* Modus kann das für die Messung benötigte Haltepotential frei gewählt werden. Enthält die Zellmembran spannungsabhängige Ionenkanäle kann durch ein sog. Stimulationsprotokoll, in dem die Spannungspulse in Amplitude und Zeit definiert werden, der Ionenstrom I_M bei einem definierten Membranpotential V_M aufgezeichnet werden. Dabei handelt es sich immer um eine Überlagerung von Ionenströmen

die in die Zelle oder aus ihr heraus fließen und Werte im nA-Bereich erreichen. In der Elektrophysiologie haben Ionenströme die aus der Zelle herausfließen positives Vorzeichen und die in die Zelle hineinfließen negatives Vorzeichen, (Bild 4.15).

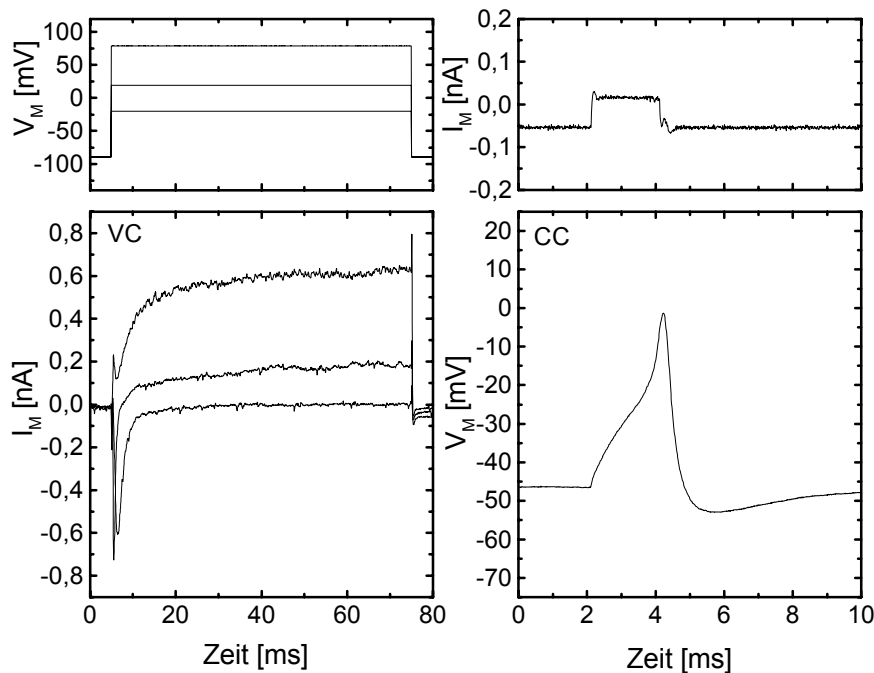


Bild 4.15: Die linke Seite zeigt ein *Voltage-Clamp* und die rechte Seite ein *Current-Clamp* Experiment mit neuronalen Zellen.

Im *Current-Clamp* Modus wird mittels Stromzufuhr in die Zelle das Membranpotential kontrolliert. Durch einen überlagerten Strompuls kann die Zelle soweit depolarisiert werden, dass es zu einem Aktionspotential kommt. Dabei wird durch den Ionenfluß das Membranpotential verändert, welches dann aufgezeichnet wird, (Bild 4.15).

4.3.2 Kopplungsmessung Transistor-Zelle

Vor der eigentlichen Messung werden die Arrays aus dem Inkubator entnommen und in die Sterilbank aufgenommen. Das Kulturmedium wird entfernt und durch extrazelluläre Badlösung ausgetauscht, die zuvor auf 37 °C erwärmt wird. Alle in dieser Arbeit benutzten FET und EGE Arrays sind mit einem Zahlencode versehen, der die jeweiligen Kennzeichnungen der Arrays über Kanalart, Gategröße bzw. Elektrodengröße und den Aufbau tag trägt. Die Kennzeichnung entscheidet bei den FETs über die Spannungen V_{GS}

und V_{DS} zur Einstellung des richtigen Arbeitspunktes. Das ausgewählte FET oder EGE Array wird in den jeweils vorbereiteten Vorverstärker eingesetzt und die Abdeckungen angebracht. Die als Ring geformte Ag/AgCl-Badelektrode wird in das Kulturbad des Arrays eingetaucht und setzt die extrazelluläre Badlösung auf das Massepotential. Danach erfolgt die oben beschriebene Vorbereitung auf den Patch-Clamp Versuch. Die Glaselektrode wird soweit auf die Sensoroberfläche abgesenkt, dass alle ansteuerbaren Gates oder Elektroden im Mikroskop sichtbar sind. Auf dem Sensorfeld, auf dem sich eine angewachsene Zelle befindet, wird der eigentliche Patch-Clamp Versuch durchgeführt. Ist die Zelle geöffnet, wird der dazugehörige Messkanal über das Steuerprogramm angewählt und die Spannungen V_{GS} und V_{DS} eingestellt.

Der optimale Arbeitspunkt der FET Arrays richtete sich nach dem größten Steilheitswert g_m . Dieser Arbeitspunkt liegt für den p-Kanal Anreicherungstyp im 3. Quadranten und für den n-Kanal Verarmungstyp bzw. des EGE Array im 1. Quadranten.

Der Drain-Source Strom besitzt in diesem Fall eine positive Steigung, d.h. eine Erhöhung der Spannung V_{GS} führt zu einer positiven Stromänderung, wenn sich die Spannung V_{GS} bzgl. des Massepunktes größer wird, Bild 4.16.

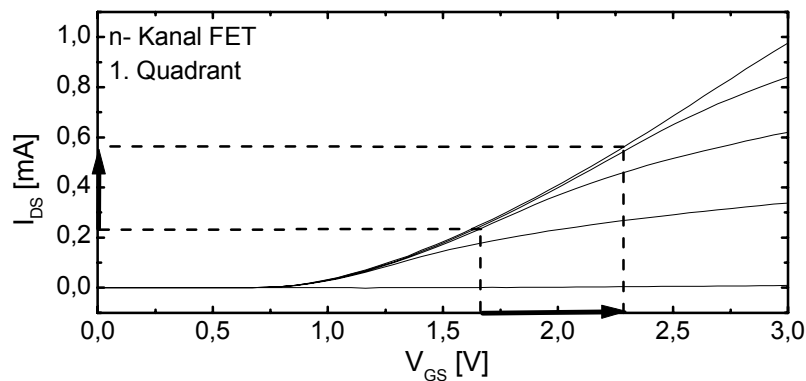


Bild 4.16: Änderungen im Stromverlauf bei Veränderung der Gate-Source Spannung (n-Kanal Feldeffekttransistoren).

Für die p-Anreicherungstypen, (im 3. Quadranten, Bild 4.17), liefert eine aus dem negativen Arbeitspunkt in positiver Richtung sich veränderndes Potential einen weniger negativen Drain-Source Strom.

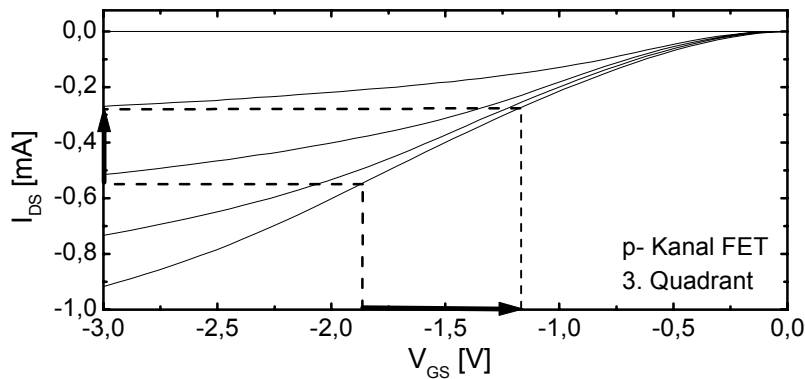


Bild 4.17: Änderungen im Stromverlauf bei Veränderung der Gate-Source Spannung (p-Kanal Feldeffekttransistoren).

Damit sind die Stromrichtungen für beide FET Arten bei unterschiedlicher Potentialänderung bestimmt. Sowohl für n- als auch p-Kanal FETs ist die Steilheit g_m im Arbeitspunkt positiv.

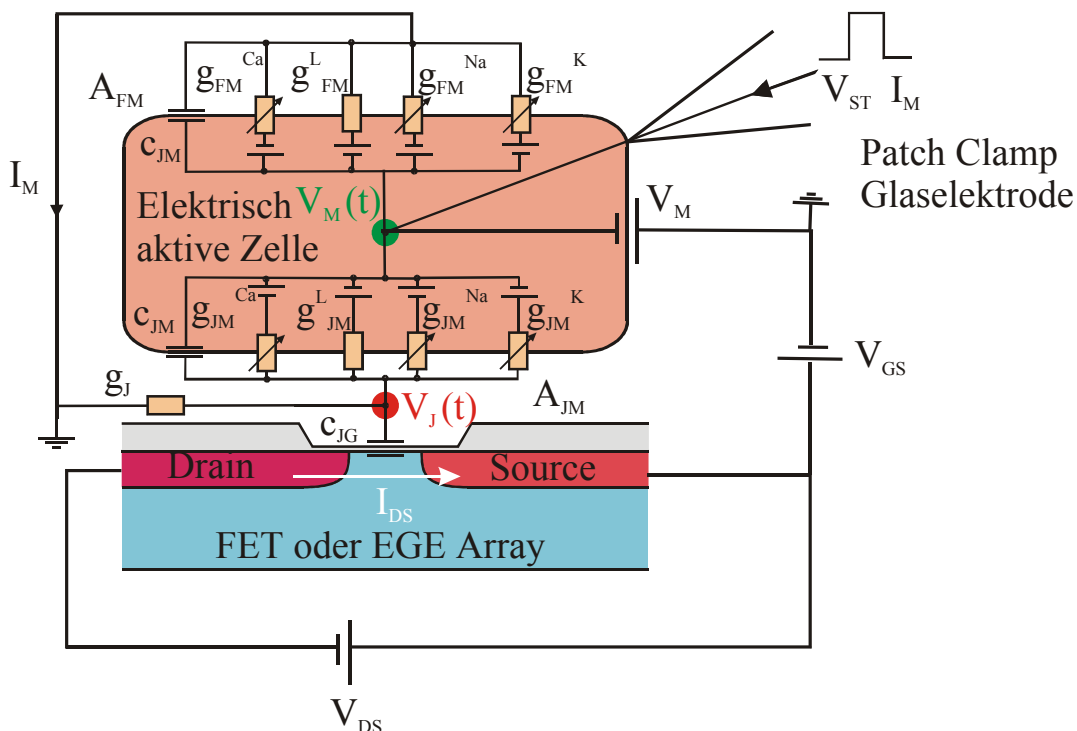


Bild 4.18: Spannungen für die Ansteuerung der FET und EGE Arrays, sowie die für die Kopplung wichtigen Kapazitäten und spezifischen Leitwerte.

Über den Abdichtwiderstand bzw. den spezifischen Abdichtleitwert fließt bei Anlegung der Arbeitspunktspannungen für FET oder EGE Array kein Strom, der Elektrolyt ist weiterhin ladungsneutral und das kompensierte Stromsignal zeigt keine Auslenkungen.

Danach werden die Kopplungsexperimente mit den oben beschriebenen *Voltage- und Current-Clamp* Methoden durchgeführt. Nachdem die Zelle geöffnet ist, wird durch einen äußeren Spannungspuls die Zelle depolarisiert. Das eingekoppelte extrazelluläre Signal V_J kann in Amplitude und zeitlichen Verlauf durch die eingestellte Steilheit g_m im Arbeitspunkt zurückgerechnet werden.

Die eingekoppelten extrazellulären Signale haben in ihrem zeitlichen Verlauf, während die Zelle depolarisiert wird, positive und negative Auslenkungen.

Dies gilt in allen Fällen, bei einer positiven Steilheit von g_m , unabhängig von der Wahl der verwendeten p-, n-Kanal FETs oder den EGEs.

5 Zell-Transistor-Kopplung

In diesem Kapitel wird beschrieben wie die FETs und EGEs mit lebenden Zellsystemen zusammengebracht und die Kopplungsexperimente durchgeführt werden.

Die verwendeten Zellsysteme lassen sich unterteilen in *Primärkulturen* und *Zell-Linien*. Die Primärkulturen, wie die hippocampalen Neuronen und Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen), stammen direkt von Säugetieren. Die hier verwendeten Primärkulturen werden aus embryonalen oder neonatalen Ratten präpariert. Der Vorteil dieser Art Zellgewinnung liegt darin, dass die entnommenen Zellen ausdifferenziert sind, d.h. die Zellen stehen am Ende ihrer Entwicklung und können daher ihre charakteristischen Aufgaben wie die Signalverarbeitung (Neuronen) oder die rhythmische Kontraktion (Herzmuskelzellen) auch in der Zellkultur bzw. auf den Sensorfeldern ausführen. Die hippocampalen Neuronen bilden schon nach einigen Stunden in Kultur Axone und Dendrite aus und bilden nach Tagen Netzwerke aus, wobei sich die Neurone meist über chemische Synapsen verbinden. Die Kardiomyozyten adhären auf der Oberfläche, verbinden sich über elektrische Synapsen und kontrahieren spontan. Somit stellen die primären Kulturen ein fast perfektes Abbild ihrer biologischen Funktion in den Säugetieren dar. Ein gewisser Nachteil liegt in der aufwändigeren Präparation der Zellen, hinsichtlich der Ausbeute der Zellen, der sterilen Entnahme und auch in der Trennung unterschiedlicher Zelltypen, wie Fibroblasten und Gliazellen, die bei den Kopplungsexperimenten nicht von Interesse sind und eher stören.

Im Gegensatz zu den Primärkulturen stammen die kontinuierlichen Zell-Linien aus natürlichem Tumorgewebe oder aus nachträglich induzierter abnormer Zellentwicklung. Die zwei Zell-Linien, die in der Arbeit auf ihre Kopplungseigenschaften untersucht werden, sind die humane neuronale Zell-Linie SH-SY5Y aus neuronalem Tumorgewebe des Nervensystems und die Endothelzell-Linie EA.hy-926 aus den Venen-Blutgefäß der humanen Nabelschnur. Diese Zellen haben den Vorteil der einfacheren Zellkultivierung,

dabei können die Zellen mehrere Male passagiert werden. Im Gegensatz zur Primärkultur sind Eigenschaften der Zellen aus Tumorgewebe nicht vollständig entwickelt. So bilden Zellen aus der neuronalen Linie SH-SY5Y keine Synapsen aus, sie besitzen aber dennoch spannungsabhängige Ionenkanäle, deren spezifische Leitfähigkeit ist aber im Vergleich zu den primären hippocampalen Neuronen reduziert.

Bei den folgenden Kopplungsexperimenten stehen die *Voltage-Clamp* Experimente im Vordergrund, bei der die Zelle auf ein Membranpotential eingestellt wird, kontrolliert Membranströme ausgelöst werden und das extrazelluläre Antwortsignal mit den Sensoren aufgezeichnet wird, um damit die Signalkopplung zu untersuchen. Dabei soll die Auswirkung geringer und hoher Ionenkanalleitfähigkeit auf den extrazellulären Signalverlauf aufgezeigt werden.

Zusätzlich werden auch *Current-Clamp* Experimente an Herzmuskelzellen durchgeführt, bei denen der zeitliche Verlauf des Membranpotentials und das resultierende extrazelluläre Signal aufgezeichnet wird.

Aufbauend auf den bestehenden Erkenntnissen aus der Arbeit von [Sprössler, 97] zur Detektion extrazellulärer Aktionspotentiale mit Kardiomyozyten und hippocampalen Neuronen, soll in dieser Arbeit die Abhängigkeit des extrazellulären Signals von der spezifischen Ionenkanalleitfähigkeit untersucht werden. Dabei soll in Abschnitt 5.1 die extrazelluläre Kopplung von Zellen aus der Neuroblastoma Zell-Linie SH-SY5Y mit den Sensoren untersucht werden. Der Vorteil bei der Verwendung dieser Zell-Linie liegt in der Anzahl der spannungsgesteuerten Ionenkanäle. Diese Linie weist im wesentlichen Na^+ - und K^+ -Kanäle auf, die bei unterschiedlichen Membranpotentialen öffnen. Dies erlaubt die definierte Untersuchung des Einflusses der Na^+ - und K^+ -Ionenströme auf das extrazelluläre Signal. Dabei soll die Skalierung der Ionenströme durch $X_{JM}^{\text{Na,K}}$ im Kontaktbereich im Vordergrund stehen. In Abschnitt 5.2 werden Experimente mit Zellen der Endothelzellen-Linie EA.hy-926 durchgeführt. Diese Zellen besitzen keine spannungsabhängigen Ionenkanäle zeigen aber für die extrazelluläre Kopplung eine interessante morphologische Eigenschaft auf. Diese Zellen können konfluente Zellmonolayer bilden. Dies ermöglicht die Untersuchung der Hypothese, dass Zellmonolayer zu einer geringeren spezifischen Abdichtleitfähigkeit g_j führen. Die hippocampalen Neurone in Abschnitt 5.3 besitzen komplexere Ionenstromverläufe aufgrund ihrer wesentlich größeren Anzahl spannungsgesteuerter Ionenkanäle. Bei diesen Zellen können zwei spannungs-

abhängige K^+ -Ionenkanäle (A-Typ und K-Typ) identifiziert werden. Der Einfluss der beiden K^+ -Ionenströme sowie zusätzlich des Na^+ -Ionenstroms auf das extrazelluläre Signal soll dann untersucht werden. In Abschnitt 5.4 werden Experimente mit den Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) beschrieben. Dieser Abschnitt unterteilt sich in die Themenbereiche : Experimente mit konfluenten Zell-Monolayern und Einzelzellexperimente. Die Experimente mit den Zell-Monolayern werden im *Current-Clamp* Modus durchgeführt. Ziel der Experimente ist, extrazelluläre Aktionspotentiale mit den neu eingeführten EGEs aufzunehmen und sie mit denen von FETs zu vergleichen, [Sprössler, 97]. Bei den sich daran anschließenden Einzelzellexperimenten liegt das Hauptaugenmerk auf den Na^+ und Ca^{2+} -Ionenströmen, wobei die Skalierung der einwärtsgerichteten Na^+ und Ca^{2+} -Ionenströme im Kontaktbereich von besonderer Bedeutung ist.

5.1 Neuroblastoma Zell-Linie SH-SY5Y

Die menschliche neuronale Line SH-SY5Y ist ein Subklon der im Dezember 1970 aus Tumorgewebe in Kultur genommenen ungeklonten Neuroblastoma Line SK-N-SH, [Biedler, 78]. Elektrophysiologische Experimente mit der Neuroblastoma-Line SH-SY5Y von [Toselli, 91], [Toselli, 96], [Ginsborg, 91] und [Tosetti, 98] zeigen das Vorhandensein von spannungsabhängigen Na^+ , K^+ und Ca^{2+} -Kanälen, sowie die Fähigkeit zur Auslösung von Aktionspotentialen, [Johansson, 94]. Bei den Kopplungsexperimenten liegt der Hauptaugenmerk auf die Untersuchung der relativ hohen Na^+ - und K^+ -Ströme auf das extrazelluläre Signal. Diese elektrophysiologischen Eigenschaften sowie die morphologische Ähnlichkeit zu den primären hippocampalen Neuronen macht diesen Zelltyp zu einem einfachen Modellsystem für die Untersuchung der Kopplung von Einzelzellen mit Feldeffekttransistoren und EGEs.

5.1.1 Zellkultur

Die Stammzellen SH-SY5Y werden in Zellkulturflaschen kultiviert. Das verwendete Kulturmedium DMEM/HAMS F12 (GibcoBRL) enthält zusätzlich 200 mM Glutamax (GibcoBRL), 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung (GibcoBRL) und 12.5 % Hitze inak-

tiviertes fötales Rinderserum (FCS, GibcoBRL). Dieses Kulturmedium wird aus der Kulturflasche abgesaugt. Die noch in der Flasche verbleibenden Zellen werden mit 0.02 % EDTA (GibcoBRL), gelöst in PBS-Puffer (Dulbeco, GibcoBRL), gespült. Danach werden die Zellen für 1-3 min., bei 37 °C in feuchter Atmosphäre und 5 % CO₂ Gehalt mit einer Lösung aus 0.25 % Trypsin Typ III (Sigma) und 0.025 % EDTA gelöst in PBS-Puffer, inkubiert. Die Trypsinierung der Zellen wird mit dem Kulturmedium gestoppt, wobei die Zellen für 5 min. bei 370 Umdrehungen/min zentrifugiert werden. Die dann vorhandene Zellsuspension wird gesammelt und nochmals mit Kulturmedium verdünnt.

Die aufgebauten FET- und EGE-Arrays werden nacheinander mit Leitungswasser und deionisiertem Wasser (Milli-Q) jeweils für eine Dauer von 10 min im Ultraschallbad gereinigt. Danach werden die Badkammern der FET- und EGE-Arrays mit einer 20 % -igen Schwefelsäure befüllt und bei 80 °C für 45 min. erhitzt. Dieser Vorgang dient der Beseitigung organischer Reste und der Aktivierung der Oxidoberfläche.

Die so gereinigten FETs und EGEs werden mit 70 % -Ethanol sterilisiert. Dabei werden die Arrays in Glasschalen gelegt und die Badkammern mit der Ethanol-Mischung aufgefüllt. Danach wird in die Glasschale Ethanol gegeben, bis die keramischen Chip-Carrier bis zur Oberkante bedeckt sind. Vor dem Aufsetzen der Zellen wird das Ethanol entfernt und die Badkammer drei mal mit PBS-Puffer Dulbeco (GibcoBRL) gespült.

Die Oberflächenmodifikation der FET- und EGE-Arrays erfolgt mit Fibronectin. Dazu werden auf die aktiven Oberflächen der Chips jeweils 20 µl einer wässrigen Fibronectin Lösung 5 µg/ml gegeben und für 60 min. bei 37 °C inkubiert. Die Fibronectin Lösung wird entfernt und die Arrays drei mal mit PBS-Puffer gespült. Anschließend wird die Zellsuspension auf die aktiven Flächen der FETs und EGEs gegeben.

5.1.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der SH-SY5Y Zellen

Die nachfolgende rein elektrophysiologische Charakterisierung der SH-SY5Y Zellen wird im *Voltage-Clamp* sowie im *Current-Clamp* Modus durchgeführt. Dabei werden Zellen, die nicht auf den aktiven Stellen wie (Gates bzw. Elektroden) liegen und so nicht für Kopplungsexperimente verwendet werden können, ausgewählt.

Die mit den SH-SY5Y Zellen besetzten FET und EGE werden ab dem 2. Tag in Kultur vermessen. In Bild 5.1 ist eine solche Messung dargestellt. Die vermessene Zelle (2 DIV) liegt auf einem Titan-EGE-Array mit SiO₂ Oberfläche und hat beim Öffnen der Zellmembran ein Ruhepotential von $V_{RP} = -36$ mV. Danach wird die Membranspannung der Zelle auf einen Bereich von -70 bis -90 mV geklemmt. Das Programm startet mit einem hyperpolarisierenden Spannungspuls nach -110 mV. Diese Pulse dienen dazu, die spannungsabhängigen Ionenkanäle in einen definierten geschlossenen Zustand zu bringen. Von diesem Potential ausgehend erhöhen sich die Pulse mit 10 mV Schritten. Bei jedem Spannungspuls wird der Membranstrom aufgezeichnet. Bei einem Membranpotential von $V_M = -30$ mV gehen die Na⁺-Kanäle in den geöffneten Zustand über und es kommt zu einem Einstrom von Na⁺-Ionen vom extrazellulären Bereich in das Innere der Zelle. Die spezifische Leitfähigkeit der Na⁺-Ionenkanäle erreicht einen maximalen Wert. Danach gehen die Kanäle in einen geschlossenen Zustand über, obwohl der Spannungspuls weiterhin auf $V_M = -30$ mV verbleibt. Bei höheren Spannungspulsen kommt es zusätzlich zur Öffnung von K⁺-Kanälen in der Membran und zu einem Ausstrom von K⁺-Ionen entlang des Konzentrationsgradienten aus der Zelle. Der Membranstrom ist deshalb von Na⁺- und K⁺-Ionenströmen über die Membran zusammengesetzt, die aber in unterschiedliche Richtungen weisen. Der Anteil der anderen Kanäle ist bei undifferenzierten Zellen gering und wird als Leckstrom I_L zusammengefasst und durch eine geeignete Kompensation von dem Patchprogramm aus dem Signal eliminiert.

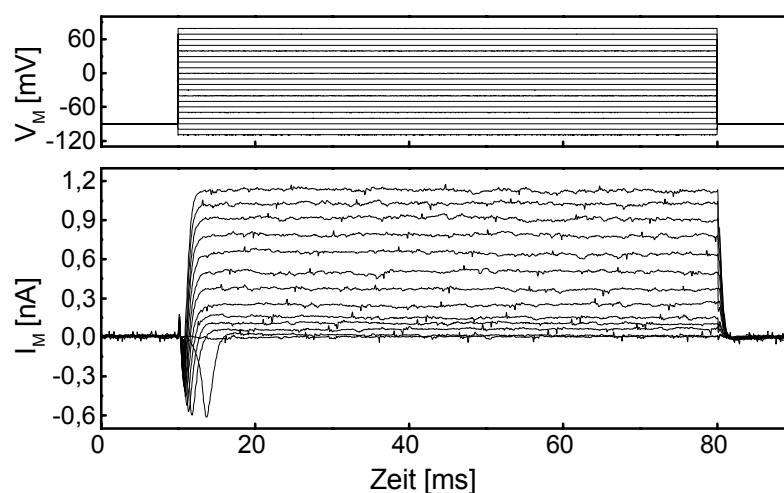


Bild 5.1: *Voltage-Clamp* Experiment mit einer SH-SY5Y Zelle (2 DIV, $V_{RP} = -36$ mV) zum Nachweis von spannungsabhängigen Na⁺- und K⁺-Kanälen.

Das Vorhandensein von Na^+ - und K^+ -Kanälen deutet darauf hin, dass im *Current-Clamp* Modus an der gleichen SH-SY5Y Zelle auch ein AP ausgelöst werden kann, was im folgenden gezeigt wird.

Dazu wird in der Steuersoftware in den *Current-Clamp* Modus umgeschaltet. Durch einen Haltestrom I_H wird das Membranpotential auf ein Potential von $V_M = -70$ mV festgelegt. Durch einen zusätzlichen Strompuls von $I_{Puls} = 0.15$ nA kann nun die Zelle depolarisiert werden und ein Aktionspotential ausgelöst werden. In Bild 5.2 ist der zeitliche Verlauf des Aktionspotentials dargestellt. Zu Beginn des Strompulses entspricht der Verlauf des Aktionspotentials einer Ladekurve der Membrankapazität bis das Membranpotential bei -30 bis -20 mV liegt und es zum Öffnen der Na^+ -Kanäle und mit einem kurzen Zeitversatz auch zum Öffnen der K^+ -Kanäle kommt.

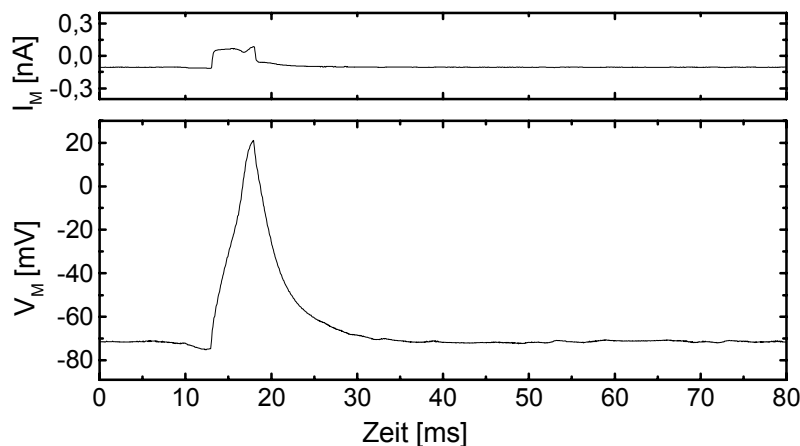


Bild 5.2: Aktionspotential einer Neuroblastoma-Zelle (2 DIV). Die Zelle wurde im CC-Modus des Patch-Clamp Verstärkers auf ein Membranpotential von $V_M = -70$ mV geklemmt. Durch einen Stromimpuls depolarisiert die Zelle und es kommt zu einem Aktionspotential.

Die im Verlauf der Arbeit mit den SH-SY5Y Zelle durchgeführten elektrophysiologischen Experimente zeigen, dass der Na^+ -Ionenstrom nur im Bereich bis etwa 1nA liegt und im Gegensatz zum K^+ -Strom deutlich reduziert ist. Dies ist ein typisches Merkmal dieser Neuroblastoma Zell-Linie [Toselli, 96].

5.1.2 Entwicklung der SH-SY5Y Zellen auf den Sensoren

Bei dem Ausplattieren der SH-SY5Y Zellen auf einen FET Sensor liegt die Anzahl im Bereich von 4.000 - 30.000 Zellen bzw. für einen EGE im Bereich bis 100.000 Zellen. Die unterschiedliche Fläche der Badkammer erfordert die Variation der Zellanzahl beim Ausplattieren der Zellen. Da die SH-SY5Y Zellen unter diesen Bedingungen keine geschlossene Zellschicht bilden, ermöglicht die Wahl einer geringeren Dichte in der Zellsuspension die spätere Durchführung von Einzelzell-Experimenten.

Bild 5.3 zeigt die auf einem n-Kanal Feldeffekttransistor Array kultivierten SH-SY5Y Zellen nach 3 DIV. Die Zellen zeigen eine pyramidale bis ovale Morphologie mit einem Durchmesser von 10 - 25 μ m. Sie weisen somit Ähnlichkeit zu den primären Neuronen auf. Einige Zellen bilden in der Kultur Neurite aus, die aber nicht mit anderen Zellen Synapsen bilden.

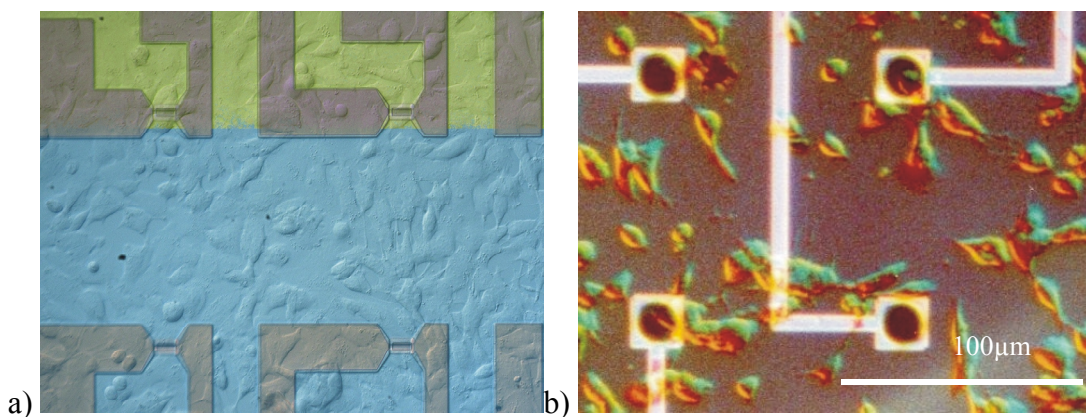


Bild 5.3: SH-SY5Y Zellen (3 DIV) auf einem, mit Fibronectin modifizierten, n-Kanal FET bzw. einem EGE Array. Die Zellen zeigen die morphologische Ähnlichkeit zu hippocampalen Neuronen.

Elektrophysiologische Experimente zeigen, dass mit der Patch-Glaselektrode eine gute Abdichtung der Membran erzielt werden kann. Dies ist ein Indiz dafür, dass sich die Membran der Zellen nach 2 DIV vom Trypsinierungsschritt während der Zellpräparation regeneriert hat. Das Ruhepotential der SH-SY5Y Zellen liegt im Bereich von -5 bis -40 mV. Die Kopplungsexperimente werden also ab 2 DIV bis hin zum 6 DIV durchgeführt.

5.1.3 Signaleinkopplungen von SH-SY5Y in FET und EGE

Nach der Vorbereitung auf die Patch-Clamp Messung wird die Sensoroberfläche nach Zellen abgesucht, die auf Gates oder Elektroden angewachsen sind. Die Verteilung der Zellen auf der Oberfläche ist durch das Aufplatieren rein zufällig. Auf den Gates oder Elektroden eines Sensors liegen im Durchschnitt 1-2 Zellen die für eine Kopplungsmessung in Betracht kommen. Der Idealfall für extrazelluläre Kopplungen ist in Bild 5.4 dargestellt. Die SH-SY5Y Zelle liegt mit ihrem Zellkörper auf einem Gate eines n-Kanal Feldeffekttransistors. Abweichend von diesem Idealfall werden aber auch Kopplungsmessungen durchgeführt, wenn der Zellkörper der zu vermessenden Zelle nicht vollständig die aktive Fläche des Sensors bedeckt.

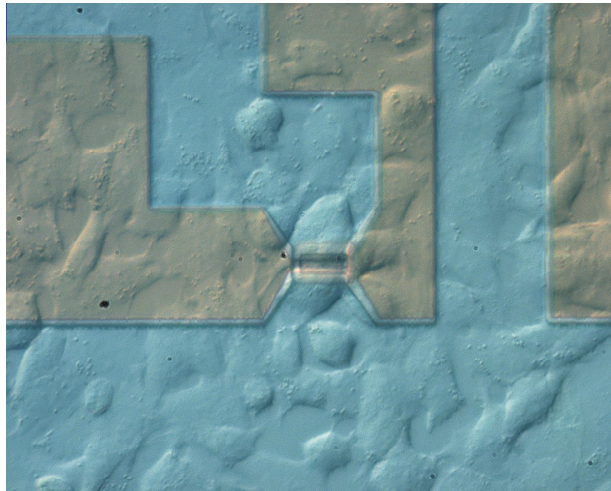


Bild 5.4: SH-SY5Y Zelle (3DIV) auf einem $3 \times 16 \mu\text{m}^2$ großen Gate eines n-Kanal Feldeffekttransistors.

Die Beschreibung der extrazellulären Kopplung mit SH-SY5Y Zellen wird mit den Elementen eines Ersatzschaltbilds erklärt. Bild 5.5 zeigt ein Ersatzschaltbild der *Whole-Cell* Konfiguration für die folgenden *Voltage-Clamp* Experimente (siehe auch Bild 2.10).

Das Membranpotential $V_M(t)$ der Zelle wird durch die Patchelektrode kontrolliert und der Membranstrom I_M , der sich aus den spezifischen Ionenleitfähigkeiten und dem kompensierten Leckstrom zusammensetzt, gemessen. Einfluss auf das eingekoppelte Signal nehmen die spezifischen Ionenleitfähigkeiten g_{JM}^{Na} , g_{JM}^K , die Membran- oder

Leckleitfähigkeit g_{JM}^L und die Abdichtleitfähigkeit g_J im Kontaktbereich A_{JM} sowie die spezifische Membrankapazität c_M .

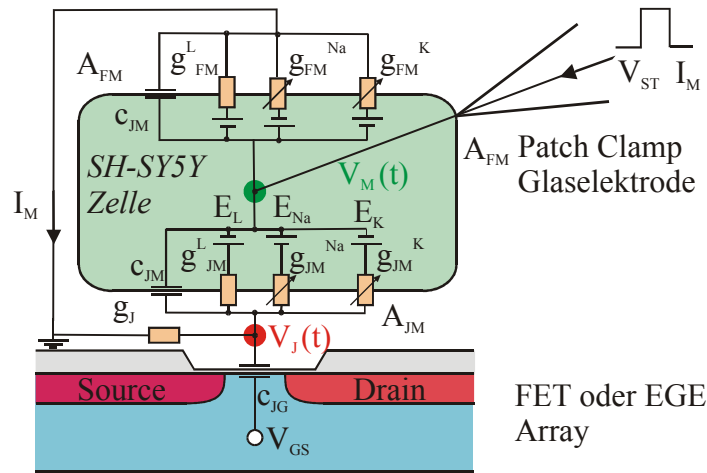


Bild 5.5: Ersatzschaltbild der *Whole-Cell* Konfiguration für die *Voltage-Clamp* Experimente mit SH-SY5Y-Zellen. Dargestellt sind die wesentlichen Membranelemente, die Einfluss auf den Verlauf des extrazellulären Signals im Kontaktbereich nehmen können.

Die beobachteten extrazellulären Signale werden in der Arbeit nach der Art ihrer Entstehung unterschieden. Bei geringer Ionenkanalleitfähigkeit wird das extrazelluläre Signal ausschließlich durch die spezifische Membrankapazität c_M und die Membranleitfähigkeit g_{JM}^L im Kontaktbereich definiert. Zusätzlich zu den eben beschriebenen Membranelementen beeinflussen bei normaler bis hoher Ionenkanalleitfähigkeit hauptsächlich die Na^+ , K^+ -Ionen, die in den Kontaktbereich einfließen, das beobachtete extrazelluläre Signal. Diese Unterteilung bei der Untersuchung der Kopplungseigenschaften wird bei allen Zellsystem in dieser Arbeit eingehalten.

5.1.3.1 Zellen ohne aktive Ionenkanäle

Zeigt die Zelle über dem Gate oder Elektrode keine Ionenkanalleitfähigkeit so wird das extrazelluläre Signal durch die Elemente c_M , g_J und g_{JM}^L beschrieben.

Tabelle 5.1 zeigt die Betriebsparameter des verwendeten Sensors, die elektrophysiologischen Eigenschaften der beim Kopplungsexperiment verwendeten Zelle sowie den Patch-Clamp Modus. Die Daten für den Sensor zeigen den Typ, seine Gate- oder Elektrodenfläche A_{Gate} sowie die durch V_{GS} und V_{DS} erhaltene maximale Steilheit g_m im

Arbeitspunkt. Die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zelle geben das Ruhepotential V_{RP} und die Tage in Kultur bis zum Kopplungsexperiment an. Der Membranwiderstand R_M gibt einen ersten Anhaltspunkt über Dichtigkeit der Zellmembran.

Tabelle 5.1: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.6 durchgeführte Kopplungsexperiment.

Sensor-Typ p-Kanal FET	A_{Gate} [μm^2]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
	3×16	-2	-3	0.44
Zell-Typ SH-SY5Y	V_{RP} [mV] -5	$R_M^{\text{exp.}}$ [$\text{G}\Omega$]	$C_M^{\text{exp.}}$ [pF]	A_M [cm^2]
	DIV 3	1	5.1	5.1×10^{-6}
Patchmode VC	V_M^H [mV]	V_M^{Puls} [mV]	Abtastrate	Mittelung
	-90	-10, 60, 140	20 kHz	30 Zyklen

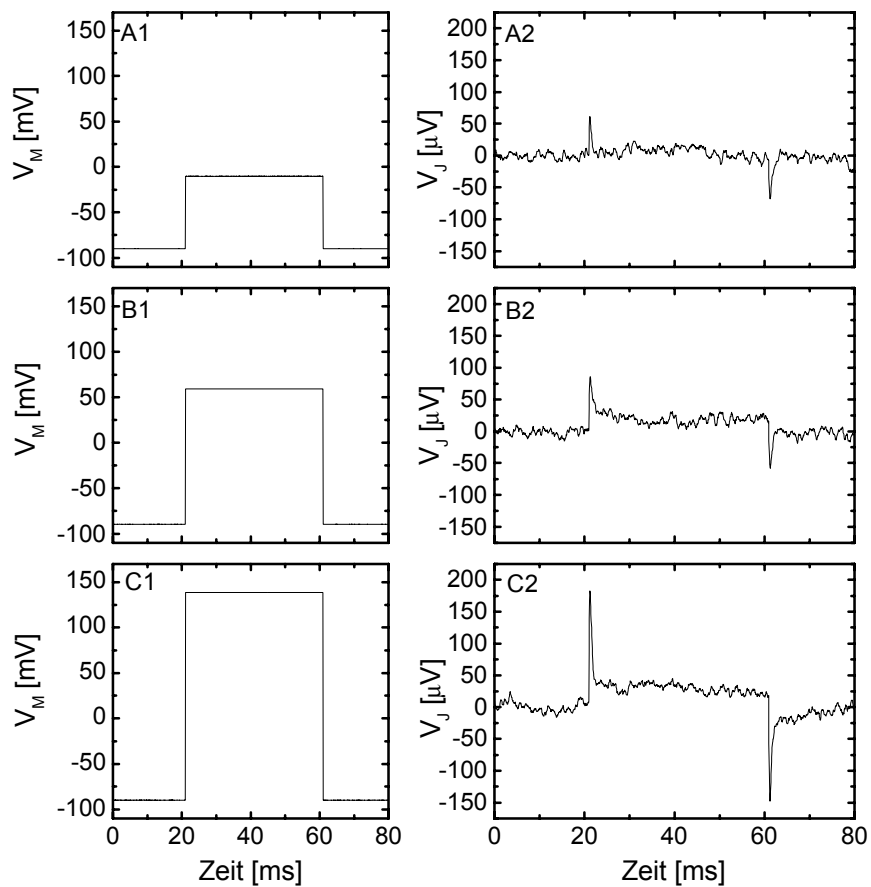
Die gesamte Zellmembranfläche A_M ergibt sich aus der Membrankapazität C_M , die experimentell über die Kompensation des Patch-Clamp Verstärkers bestimmt werden kann und der angenommenen spezifischen Membrankapazität von $c_{JM} = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für biologische Membranen [Cole, 68]. Der Patchmode unterscheidet *Voltage-* oder *Current-Clamp* Messungen. Das Haltepotential V_M^H , welches über die Steuersoftware eingestellt wird, gibt den Ausgangspunkt für den Stimulationspuls auf das Membranpotential V_M^{Puls} an. Die variable Abtastrate gibt die zeitliche Auflösung der Messpunkte an. Die Mittelung zeigt die Anzahl der Einzelmessungen, aus denen der endgültige Messverlauf entsteht.

Bild 5.6 zeigt die extrazellulären Signaleinkopplungen der SH-SY5Y Zelle die durch Stimulationspulse V_M^{Puls} erzeugt werden.

Diese Pulse führen im Kontaktbereich über dem Gate zu extrazellulären Signalen mit Amplituden von jeweils $V_J = 60, 80$ und $180 \mu\text{V}$. Bei dieser beobachteten kapazitiven Signalkopplung ist das extrazelluläre Signal V_J proportional zu der zeitlichen Ableitung des Pulses V_M^{Puls} . Unter der Voraussetzung, dass die Anstiegszeit des Stimulationspulses Δt für alle Spikes gleich ist, gilt: $V_J = \alpha \Delta V_M$. Tabelle 5.2 zeigt diese Proportionalität.

Tabelle 5.2: Proportionalität zwischen dem Stimulationspuls und dem detektierten extrazellulären Signal.

ΔV_M [mV]	V_J [μ V]	α
60	60	7.5×10^{-4}
150	80	5.3×10^{-4}
230	180	7.8×10^{-4}

Bild 5.6: Kapazitive Kopplung mit einer SH-SY5Y Zelle: Linke Seite Spannungspulse, V_M^{Puls} und Haltepotential V_M^H , Rechte Seite: kapazitives extrazelluläres Signal V_J .

Mithilfe der Gleichung für die extrazelluläre Kopplung kann das beobachtete extrazelluläre Signal V_J beschrieben werden. Die Ausgangsgleichung für die Beschreibung der extrazellulären Kopplung führt unter der Vernachlässigung der spezifischen Leck- und Ionenleitfähigkeiten über die Membran zu der vereinfachten Form:

$$V_J = \frac{c_{JM}}{g_J} \frac{dV_M}{dt}. \quad (5.1)$$

Diese Vereinfachung wird durch das Experiment bestätigt. Es wirkt sich allein die spezifische Membrankapazität c_M der Zelle und der Abdichtleitwert g_J auf die Signalform aus.

Aus den drei Kopplungen (Bild 5.6) kann durch Simulation der spezifische Abdichtleitwert zu $g_J = 14 \text{ S/cm}^2$ bestimmt werden. In Einzelmessungen haben die kapazitiven Spikes deutlich größere Werte als bei der Mittelung. Ein Faktor drei besseres g_J kann aus den Einzelmessungen als realistisch angenommen werden. Diese rein kapazitive Abhängigkeit von extrazellulärem Signal zu Stimulationspuls wird in der Literatur als kapazitive oder auch *A-Typ* Kopplung bezeichnet, [Fromherz, 93], [Jenker, 97], [Sprössler, 99].

Tabelle 5.3: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.7 durchgeführte Kopplungsexperiment.

Sensor-Typ	$A_{Gate} [\mu\text{m}^2]$	$V_{GS} [\text{V}]$	$V_{DS} [\text{V}]$	$g_m [\text{mS}]$
p-Kanal FET	4×16	-2	-3	0.48
Zell-Typ	$V_{RP} [\text{mV}]$ -30	$R_M^{\text{exp.}} [\text{G}\Omega]$	$C_M^{\text{exp.}} [\text{pF}]$	$A_M [\text{cm}^2]$
SH-SY5Y	DIV 4	0.768	5.6	5.6×10^{-6}
Patchmode	$V_M^H [\text{mV}]$	$V_M^{\text{Puls}} [\text{mV}]$	Abtastrate	Mittelung
VC	-90	100	20 kHz	50 Zyklen

Das nächste Experiment zeigt eine deutlichere Überlagerung von kapazitiver und ohmscher Kopplung. Tabelle 5.3 zeigt die für diese Kopplung experimentellen Daten. Die ohmsche Kopplung wird in der Literatur auch als *B-Typ* Kopplung bezeichnet, [Fromherz, 93], [Jenker, 97], [Sprössler, 99].

Bild 5.7 zeigt deutlich eine Überlagerung von kapazitiver und ohmscher Kopplung mit dem Stimulationspuls von $V_M = 190 \text{ mV}$ und dem extrazellulären Kopplungssignal V_J . Daraus ergibt sich für die *A-Typ* Kopplung ein $V_J = 100 \text{ }\mu\text{V}$ und für den *B-Typ* eine Signalthöhe von $V_J = 50 \text{ }\mu\text{V}$. Die elektrophysiologische Messung zeigt keine Na^+ - oder K^+ -Ionenströme über die Zellmembran. Daraus ergibt sich eine spezifische Leckleitfä-

higkeit von $g_{FM}^L = 2.32 \times 10^{-4} \text{ S/cm}^2$. Bei diesem *Voltage-Clamp* Experiment liegen die kapazitiven Ströme und die Ströme durch die Zellmembran im Kontaktbereich Zelle-Substrat in der gleichen Größenordnung. Es ergibt sich also ein kapazitiver Stromanteil der für die positiven und negativen Spikes verantwortlich ist und einen rein durch die spezifische Leckleitfähigkeit definierten Strom.

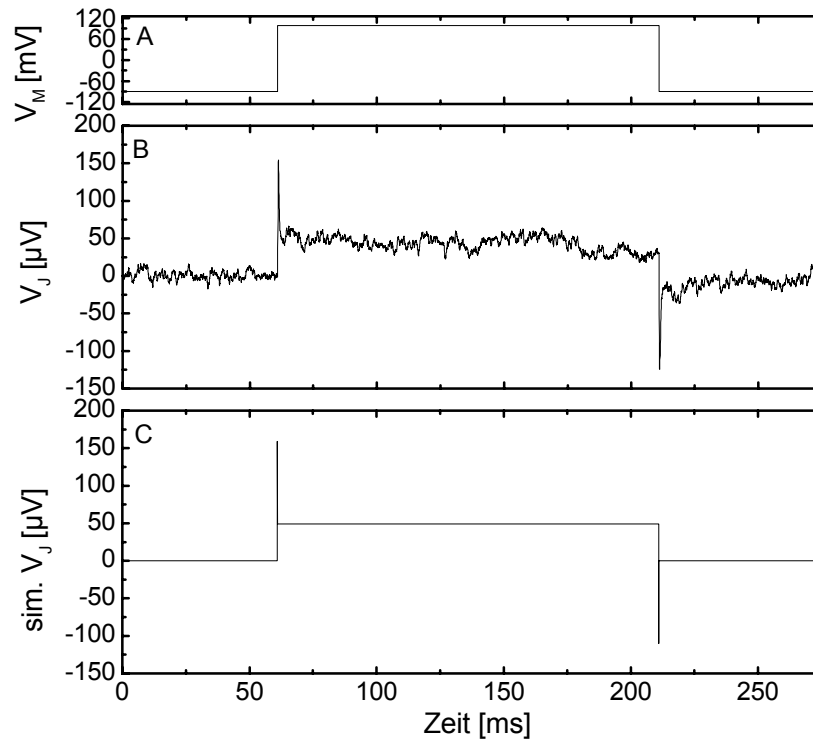


Bild 5.7: Deutliche Überlagerung von A- und B- Typ Kopplung einer SH-SY5Y Zelle (4 DIV, $V_{RP} = -30 \text{ mV}$).

Somit ergibt sich ein kombiniertes Signal V_J , welches der Ableitung des Membranpotentials V_M sowie dem Membranpotential V_M proportional ist. Die Gleichung (5.2) dient zur Simulation des beobachteten Signals.

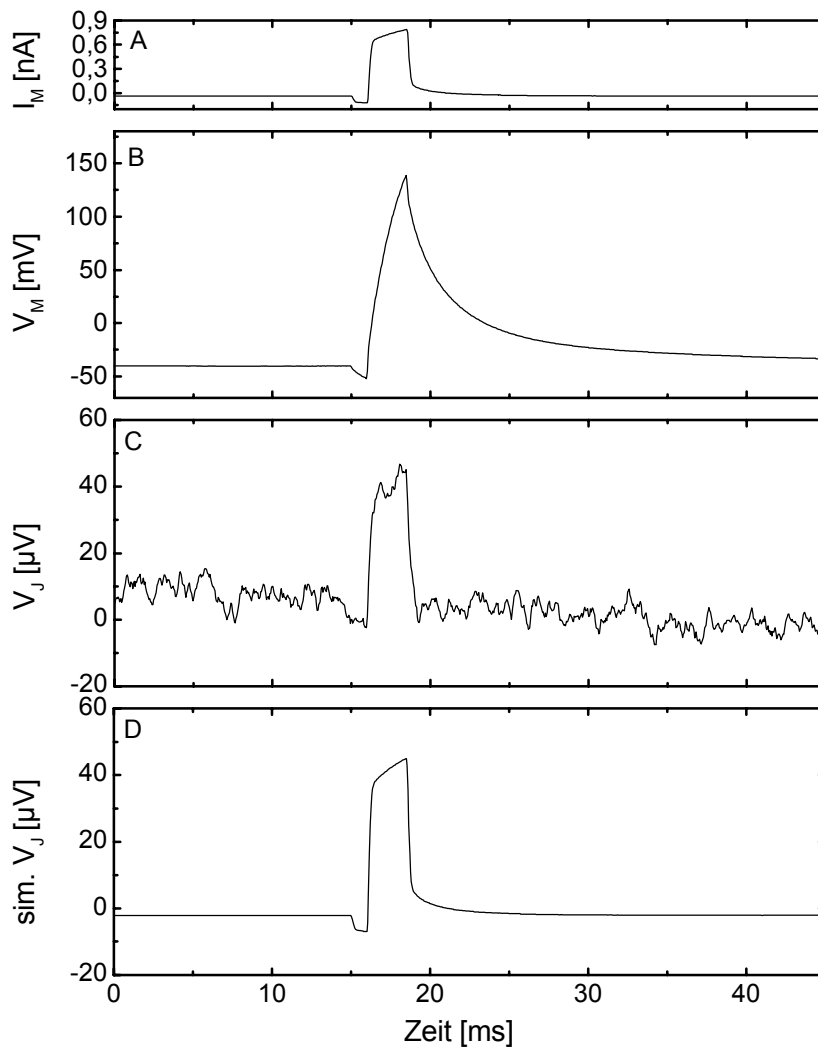
$$V_J = \frac{1}{g_J} \left(c_M \frac{dV_M}{dt} + X^L g_{FM}^L V_M \right) = \frac{1}{g_J} \left(c_M \frac{dV_M}{dt} + g_{JM}^L V_M \right) \quad (5.2)$$

Die Simulation des extrazellulären Signals (Bild 5.7 C) ergibt für die Abdichtleitfähigkeit $g_J = 10 \text{ S/cm}^2$ sowie einen Skalierungsfaktor von $X_{JM}^L = 11$.

Eine deutliche Kopplung erhält man auch dann, wenn man von der *Voltage-Clamp* Messung auf die *Current-Clamp* Messung übergeht.

Tabelle 5.4: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.8 durchgeführte Kopplungs-experiment.

Sensor-Typ n-Kanal FET	A_{Gate} [μm^2]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
	$2 \times 2 \times 16$	2	3	0.87
Zell-Typ SH-SY5Y	V_{RP} [mV] -30	$R_M^{\text{exp.}}$ [$\text{G}\Omega$]	$C_M^{\text{exp.}}$ [pF]	A_M [cm^2]
	DIV 4	4.22	6.7	6.7×10^{-6}
Patchmode CC	V_M^H [mV]	I_{Puls} [nA]	Abtastrate	Mittelung
	-36	0.9	20 kHz	50 Zyklen

Bild 5.8: *Current-Clamp* : ohmsche Kopplung einer SH-SY5Y Zelle (4 DIV, $V_{RP} = -30$ mV) durch einen Strompuls $I_M = 0.9$ nA.

Hierbei wird eine Zelle durch die kontinuierliche Stromzufuhr auf ein bestimmtes Membranpotential eingestellt. Durch einen zusätzlichen Strompuls kann dann der eingepreßte Strom als kapazitiver Stromanteil über die Membrankapazität oder über den Membranwiderstand abfließen. Bild 5.8 zeigt eine aus passiven Membranelementen erklärbare Kopplung im *Current-Clamp* Modus mit dem Stromstimulationspuls und der extrazellulären Kopplung V_J . Während der Depolarisierung der Zelle kann kein Na^+ - oder K^+ -Ionenstrom beobachtet werden. Bild 5.8 zeigt für die ohmsche Kopplung eine Signalthöhe von $V_J = 50 \mu\text{V}$. Das extrazelluläre Signal bildet den eingepreßten Strompuls I_{Puls} nach. Es kann hier deutlich die Abhängigkeit von V_J vom Leckstrom gezeigt werden, der als Ionenstrom aus der Zelle auswärts gerichtet ist. Die spezifische Abdichtleitfähigkeit g_J wird aus einem VC-Experiment bestimmt, welches unmittelbar vor dem CC Versuch durchgeführt wurde. Der Wert für g_J kann aus einer Simulation zu $g_J = 9 \text{ S/cm}^2$ abgeschätzt werden. Die Membranleitfähigkeit von muss dann zur Erzeugung des beobachteten Signals V_J im Kontaktbereich um den Faktor $X_{JM}^L = 3.7$ erhöht sein.

Tabelle 5.5: Ergebnisse der Experimente, wenn keine Ionenkanalleitfähigkeit beobachtet werden kann.

SH-SY5Y	g_J [S/cm^2]	X_{JM}^L
A-Typ	14	—
A-Typ+ B-Typ	10	11
<i>Current-Clamp</i>	9	3.7

Die Tabelle 5.5 zeigt die Ergebnisse aus den Kopplungsexperimenten wenn keine Ionenkanalleitfähigkeit beobachtet werden kann. Relativ gute Werte für die extrazelluläre Kopplungen liegen hier im Bereich um die $g_J = 10 \text{ S/cm}^2$. Die relativ großen g_J -Werte für die Kopplungen können auf eine nicht ganz durch den Zellkörper abgedeckte Sensorfläche zurückgeführt werden. Die Simulationen bestätigen die aus dem Punkt-Kontakt-Modell vorausgesagten extrazellulären Signalverläufe, wonach sich V_J aus kapazitiven und ohmschen Anteilen zusammensetzt.

5.1.3.2 Zellen mit aktiven Ionenkanälen

Der Beitrag von Ionenströmen wie Na^+ und K^+ im Kontaktbereich zwischen Zelle und Substrat zur Entstehung von extrazellulären Signalen kann ebenfalls mit der *Voltage-Clamp* Messungen an den SH-SY5Y untersucht werden. Dazu ist es notwendig, dass sich in der Zeit vom Aufplatieren der Zellen auf den oberflächenmodifizierten FET und EGE Arrays bis zum Zeitpunkt der elektrophysiologischen Experimente die verschiedenen spannungsabhängigen Ionenkanäle für Na^+ und K^+ in der Zellmembran wieder entwickelt haben und die Zelle auf einem aktiven Bereich wie Gate oder Elektrode des Arrays anwächst.

a) Geringe Ionenleitfähigkeit im Kontaktbereich

Dass rein kapazitive Kopplungen selbst dann beobachtet werden können, wenn aktive Ionenkanäle in der Zellmembran nachgewiesen werden, zeigt das nächste Experiment mit seinen Parametern in Tabelle 5.6.

Tabelle 5.6: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.9 durchgeführte Kopplungsexperiment.

Sensor-Typ n-Kanal FET	A_{Gate} [μm^2]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
	4×16	2	3	0.51
Zell-Typ SH-SY5Y	V_{RP} [mV] -28	$R_M^{\text{exp.}}$ [$\text{G}\Omega$]	$C_M^{\text{exp.}}$ [pF]	A_M [cm^2]
	DIV 4	2	4.6	4.6×10^{-6}
Patchmode <i>VC</i>	V_M^H [mV]	V_M^{Puls} [mV]	Abtastrate	Mittelung
	-90	-10	20 kHz	70 Zyklen

In Bild 5.9 zeigt die *Voltage-Clamp* Messung einen Membranstromverlauf I_M der zu Beginn in negative Richtung verläuft und durch einen Na^+ -Einstrom in die Zelle verursacht ist. Anschließend kann ein Anstieg in positive Richtung aufgrund des einsetzenden K^+ -Auswärtsstroms beobachtet werden. Trotz eines Ionenstroms über die Zellmembran beobachtet man einen reinen kapazitiven Signalverlauf für V_J mit einer Amplitude von $40 \mu\text{V}$. Dieses Verhalten der Signalkopplung kann durch die Ungleichverteilung der Ionenkanäle in der Membran erklärt werden. Somit ergibt sich dann ein extrazelluläres Signal, dass nur von den passiven Elementen der Zellmembran wie g_{FM}^L und

c_M sowie der spezifischen Abdichtleitfähigkeit g_J bestimmt wird. Das simulierte Signal in Bild 5.9 D kann mittels Gl. (5.1) mit $c_M = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und $g_J = 10 \text{ S}/\text{cm}^2$ berechnet werden.

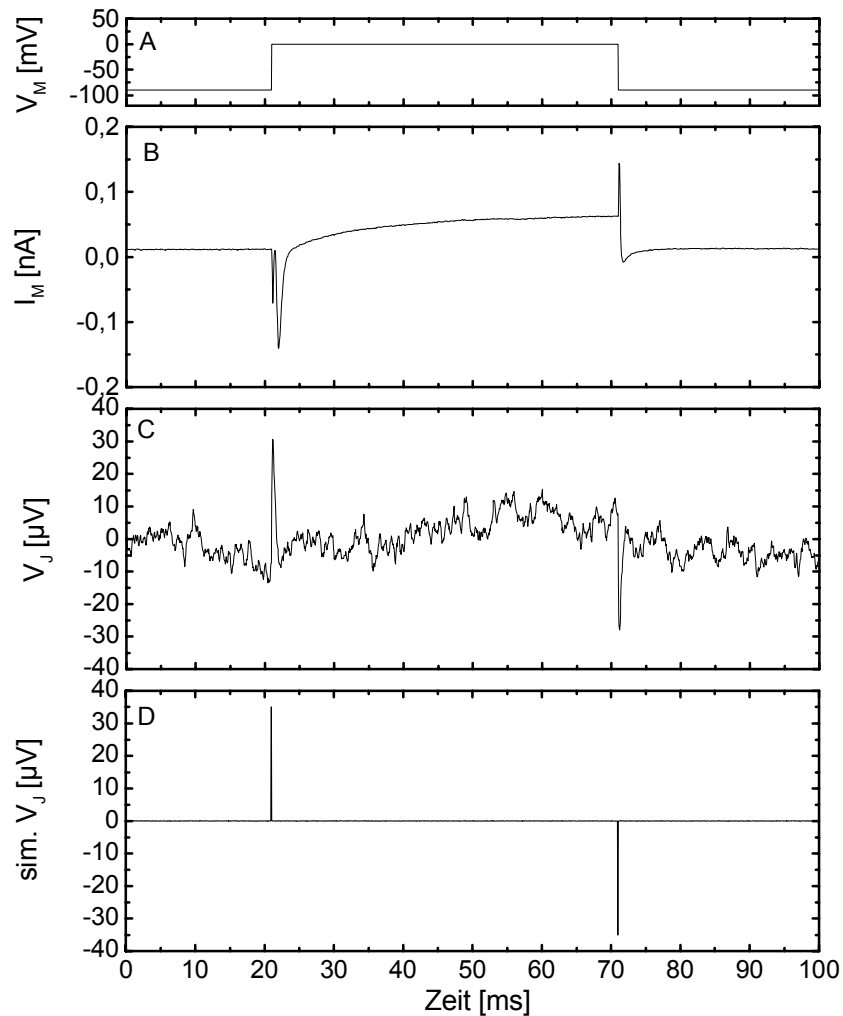


Bild 5.9: Kapazitive Kopplung mit einer SH-SY5Y Zelle. Keine Beeinflussung des extrazellulären Signals durch Na^+ - und K^+ -Ionenströme, trotz eines beobachtbaren Ionenstromes I_M .

Nachdem die kapazitive Kopplung mit den SH-SY5Y beschrieben wurde, zeigt das nächste Experiment den Einfluss von g_{JM}^L , der spezifischen Leckleitfähigkeit, auf das Aussehen der extrazellulären Signals.

Tabelle 5.7: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.10 durchgeführte Kopplungs-experiment.

Sensor-Typ	$\varnothing_{El.}$ [μm]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
Au EGE	20	0	0.34	1
Zell-Typ	V_{RP} [mV] -9	$R_M^{\text{exp.}}$ [$\text{G}\Omega$]	$C_M^{\text{exp.}}$ [pF]	A_M [cm^2]
SH-SY5Y	DIV 2	2	13	13×10^{-6}
Patchmode	V_M^H [mV]	V_M^{Puls} [mV]	Abtastrate	Mittelung
VC	-90	10	20 kHz	100 Zyklen

In Bild 5.10 ist die sog. ohmsche Kopplung dargestellt, wobei sich der einwärtsgerichtete Na^+ -Ionenstrom im Patch-Stromsignal I_M deutlich in der Amplitude vom K^+ -Ionenstrom unterscheidet.

Man erkennt keinen Einfluss des einwärtsgerichteten Na^+ -Ionenstroms im extrazellulären Signal, d.h. im Kontaktbereich muss die spezifische Membranleitfähigkeit g_{JM}^L deutlich größer sein als die Na^+ -Leitfähigkeit g_{JM}^{Na} . Es kann folglich eine Verarmung von Na^+ -Ionenkanälen im Kontaktbereich A_{JM} gegenüber der freien Membran A_{FM} angenommen werden. Die Simulation des extrazellulären Signals V_J liefert einen Wert von $g_J = 80 \text{ S/cm}^2$. Das beobachtete Signal V_J wird als Überlagerung aus kapazitivem und ohmschen Anteil beschrieben. Der kapazitive Anteil ist dabei sehr klein und wird auf $V_J = 3 \mu\text{V}$ abgeschätzt. Durch die Simulation des extrazellulären Signals kann der Skalierungsfaktor X_{JM}^L berechnet werden.

Aus der Simulation erhält man für die Skalierungsfaktor $X_{JM}^L = 3333$. Die Membranleitfähigkeit muss im Kontaktbereich über der Elektrode um diesen Faktor X_{JM}^L größer sein als die spezifische Membranleitfähigkeit von $g_{FM}^L = 6 \times 10^{-6} \text{ S/cm}^2$ der gesamten Zelle.

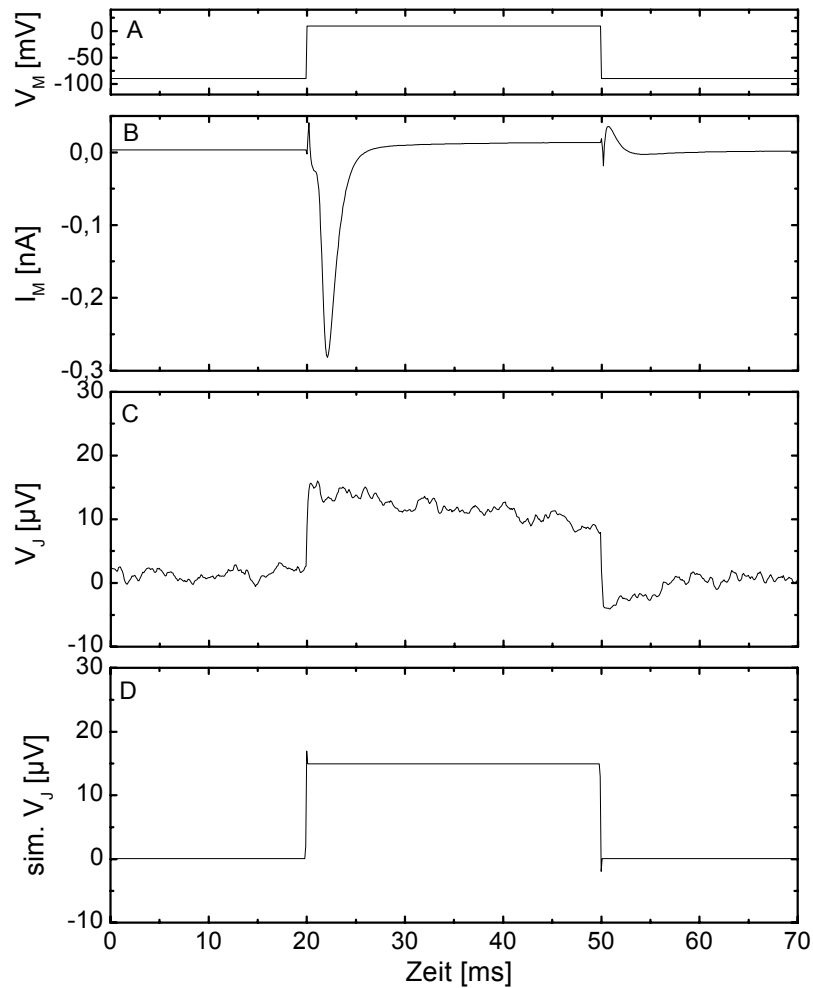


Bild 5.10: SH-SY5Y Zelle: Keine Beeinflussung der Kopplung, trotz eines beobachtbaren Na^+ -Membranstromes.

b) Hohe Ionenleitfähigkeit im Kontaktbereich

Die Frage nach der Verteilung der Ionenkanäle in der Zellmembran im Kontaktbereich ist die zentrale Frage bei der Untersuchung der extrazellulären Kopplung. Kommt es zu einer Erhöhung der spezifischen Leitfähigkeit einer bestimmten Ionenart i im Kontaktbereich A_{JM} oder ist diese reduziert gegenüber der freien Membran A_{FM} . Ebenfalls zu untersuchen ist die Proportionalität des Signals V_J zum Ionenstrom I_M bei einer Stimulationsfolge unterschiedlicher Membranpotentialsprünge.

Tabelle 5.8: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.13 durchgeführte Kopplungs-experiment.

Sensor-Typ	A_{Gate} [μm^2]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
n-Kanal FET	4×16	2	2	0.35
Zell-Typ	V_{RP} [mV] -32	$R_M^{\text{exp.}}$ [G Ω]	$C_M^{\text{exp.}}$ [pF]	A_M [cm^2]
SH-SY5Y	DIV 4	34	6.5	6.5×10^{-6}
Patchmode	V_M^H [mV]	V_M^{Puls} [mV]	Abtastrate	Mittelung
VC	-90	-10	20 kHz	135 Zyklen

Um den Einfluss des Na^+ -Ionenstroms auf den Verlauf des extrazellulären Signals V_J zu untersuchen, wird ein Membranpotential gewählt, bei dem fast ausschließlich Na^+ -Ströme über die Membran beobachtet werden. Dazu ist es notwendig, die Strom-Spannungsabhängigkeit der Zelle zu bestimmen. Bild 5.11 zeigt den beobachteten Ionenstrom in Abhängigkeit vom Membranpotential.

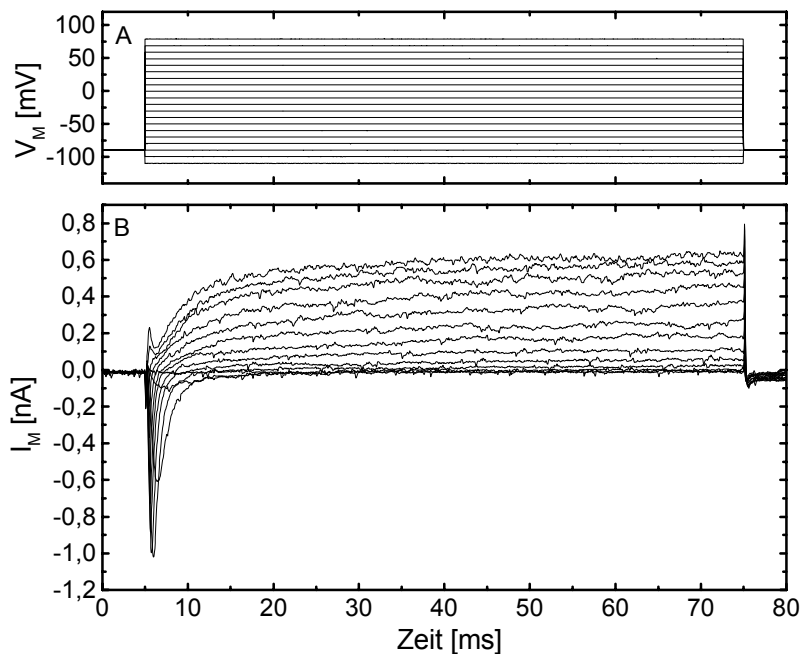


Bild 5.11: Spannungsgesteuerte Na^+ - und K^+ -Ionenströme einer SH-SY5Y Zelle (4DIV, $V_{RP} = -32$ mV).

Die Zelle zeigt ab einem Membranpotentialsprung auf $V_M = -30$ mV einen Einstrom von Na^+ -Ionen, der bei $V_M = -10$ mV einen maximalen Wert von $I^{\text{Na}} = 1$ nA aufweist.

Gleichzeitig kommt es zu einem K^+ -Strom in positiver Richtung, der proportional zu den größer werdenden Membranpotentialsprüngen ansteigt. Bei einem Potential von $V_M = 80$ mV ergibt sich schließlich der maximale K^+ -Strom von $I^K = 0.6$ nA, wohingegen es für Na^+ beim Überschreiten des Umkehrpotentials von $V_M = 55$ mV zu einer Umkehrung des Stroms, nämlich zu einem Ausstrom aus der Zelle kommt. Die gemessenen Ionenstromwerte werden gegenüber dem Membranpotential aufgetragen. Die charakteristische Abhängigkeit ist in Bild 5.12 dargestellt.

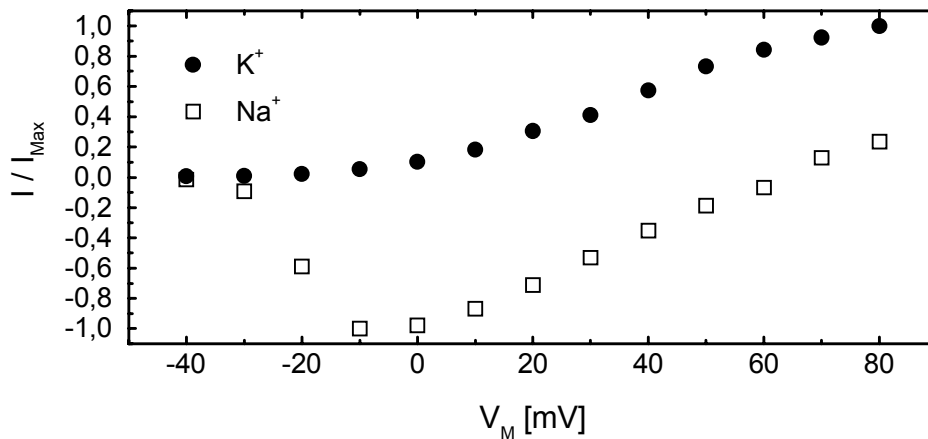


Bild 5.12: Normierte Na^+ und K^+ -Ionenströme über die Zellmembran der SH-SY5Y Zelle in Abhängigkeit des Membranpotentials V_M .

Der Verlauf für Na^+ und K^+ entspricht dem Hodgkin-Huxley Modell, wonach der Na^+ -Strom ein Maximum besitzt, und der K^+ -Strom kontinuierlich ansteigt. Aus dem experimentell bestimmten Ionenstrom I^i einer Ionenart i kann die durchschnittliche spezifische Leitfähigkeit g^i für das eingestellte Membranpotential bestimmt werden.

$$g_{FM}^i = \frac{I_M^i}{A_M} \frac{1}{(V_M - E_i)} = i_M^i \frac{1}{(V_M - E_i)} \quad (5.3)$$

Die gesamte Stromdichte i_M über die Membran ist die Summe aller Ionenstromdichten.

$$i_M = \sum_i i_M^i = \sum_i g_{FM}^i (V_M - E_i) \quad (5.4)$$

Die Na^+ -Leitfähigkeit g_{FM}^{Na} ergibt bei einem max. Na^+ -Ionenstrom von $I^{Na} = 1$ nA und einem Umkehrpotential von $E_{Na} = 55$ mV einen Wert von $g_{FM}^{Na} = 2.5$ mS/cm². Dieses

Ergebnis stimmt mit der von [Toselli, 96] bestimmten maximalen spezifischen Leitfähigkeit von Na^+ in undifferenzierten SH-SY5Y Zellen überein.

Um den größtmöglichen Na^+ -Ionenstrom zu erhalten, wird für das Kopplungsexperiment die Zelle auf ein Membranpotential von $V_M = -10$ mV depolarisiert, da bei diesem Potential der Na^+ -Strom sein Maximum aufweist und noch kein nennenswerter K^+ -Strom beobachtet wird. Der Na^+ -Strom sollte somit auch im Kontaktbereich dominierend sein. Bild 5.13 A zeigt den Spannungspuls auf $V_M = -10$ mV mit dem resultierenden einwärts gerichteten Na^+ -Strom (Bild 5.13 B) sowie das extrazelluläre Signal (Bild 5.13 C).

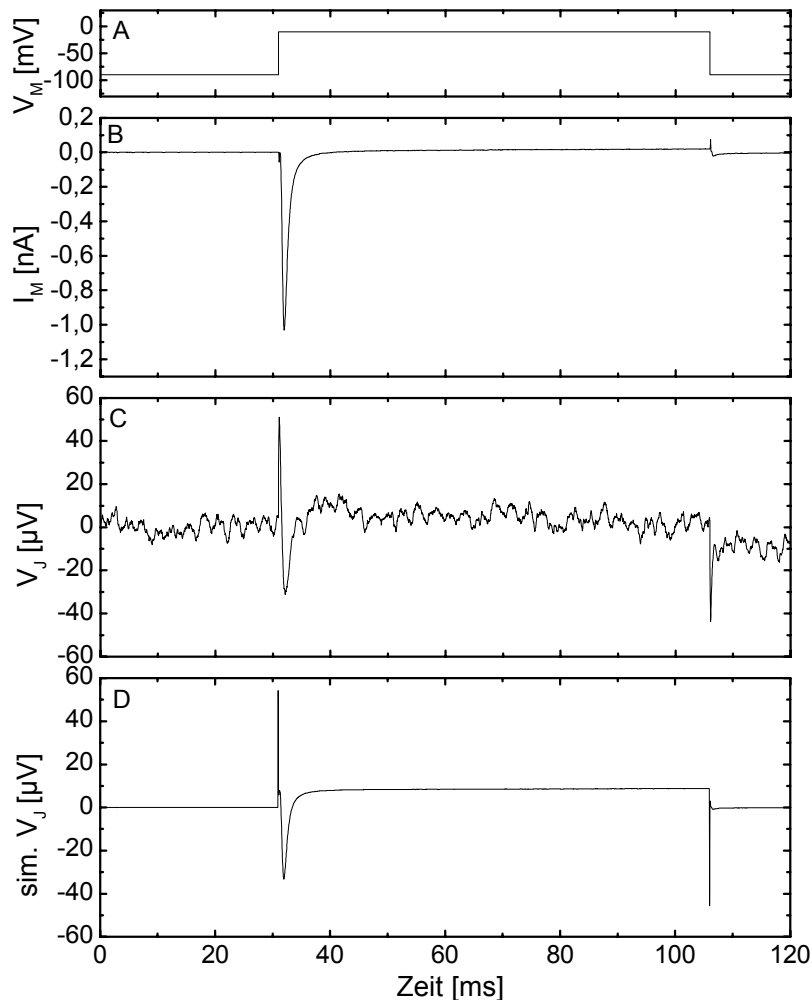


Bild 5.13: Einfluss der Na^+ -Ionen auf die Kopplung V_J einer SH-SY5Y Zelle (4 DIV, $V_{RP} = -32$ mV) mit einem n-Kanal FET.

Deutlich ist der kapazitive Signalanteil durch den Spannungspuls sowie das durch Einstromen der Na^+ -Ionen in die Zelle hervorgerufene extrazelluläre Signal zu erkennen. Der Verlauf von V_J bildet den Verlauf des Ionenstroms exakt nach. Die elektrophysiologisch negativen Strömen, wie Na^+ , die über den Abdichtwiderstand in die Zelle hineinfließen, führen zu einer negativen Potentialänderung am Gate, wodurch es zu einem negativen ΔI_{DS} kommt. Die durch den Na^+ -Ionenstrom erzeugte Kopplung zeigt eine Signalthöhe von $V_J = 30 \mu\text{V}$.

Zur Beschreibung des extrazellulären Signals werden die spezifischen Ionenleitfähigkeiten von Na^+ und K^+ sowie deren Skalierungsfaktor X_{JM}^i mit berücksichtigt. Damit ergibt sich folgende Abhängigkeit des extrazellulären Signals (vgl. Gl. 2.32):

$$g_J V_J = c_M \frac{dV_M}{dt} + X_{JM}^L g_{FM}^L V_M + \sum_{i=\text{Na}^+, \text{K}^+} X_{JM}^i g_{FM}^i (V_M - E_i) \quad (5.5)$$

Durch die gleichzeitige Messung von V_J , i_M und der spezifischen Abdichtleitfähigkeit g_J , die man aus der Simulation erhält, kann die Differenz zwischen der spezifischen Ionenleitfähigkeit in der gesamten Zelle und im Kontaktbereich berechnet werden.

$$V_J = \frac{1}{g_J} \left(c_M \frac{dV_M}{dt} + X_{JM}^L g_{FM}^L V_M + \sum_i X_{JM}^i i_M^i \right) \quad (5.6)$$

Durch den Vergleich der experimentell bestimmten Stromdichte i_M und der Simulation des tatsächlichen V_J kann eine Aussage über die Anreicherung oder die Verarmung bestimmter Ionenkanäle im Kontaktbereich getroffen werden. Durch die Simulation des extrazellulären Signals V_J in Bild 5.13 D können folgende Kopplungsparameter bestimmt werden. Der Wert von g_J wird auf 10 S/cm^2 bestimmt. Die Membranleitfähigkeit von $g_{FM}^L = 4.5 \times 10^{-6} \text{ S/cm}^2$ erhöht sich um den Faktor $X_{JM}^L = 200$ im Kontaktbereich. Die spezifische Leitfähigkeit von Na^+ vergrößert sich um den Faktor $X_{JM}^{\text{Na}} = 2.6$ auf $g_{JM}^{\text{Na}} = 6.44 \text{ mS/cm}^2$ im Kontaktbereich der Zelle mit dem Gate.

Die reine K^+ -Signalabhängigkeit kann ebenfalls durch die *Voltage-Clamp* Messung erfolgen. Dabei gilt die gleiche Vorgehensweise wie beim Na^+ -Einwärtstrom Kopplungsexperiment.

Tabelle 5.9: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.15, Bild 5.16 und Bild 5.17 durchgeführte Kopplungsexperiment.

Sensor-Typ	A_{Gate} [μm^2]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
n-Kanal FET	$2 \times 2 \times 16$	2	2	0.78
Zell-Typ	V_{RP} [mV]	$R_M^{\text{exp.}}$ [$\text{G}\Omega$]	$C_M^{\text{exp.}}$ [pF]	A_M [cm^2]
SH-SY5Y	DIV 3	67	8.2	8.2×10^{-6}
Patchmode	V_M^H [mV]	V_M^{Puls} [mV]	Abtastrate	Mittelung
VC	-90	80	20 kHz	115 Zyklen

Wiederum fließt bei dem Membranpotential von $V_M = -10$ mV der größte Na^+ -Strom mit $I^{\text{Na}} = 0.5$ nA, der aber deutlich geringer ausfällt als in Bild 5.11 B. Der K^+ -Strom bei $V_M = -80$ mV ist mit $I^K = 1.38$ nA um den Faktor 2.3 größer als in Bild 5.11 B.

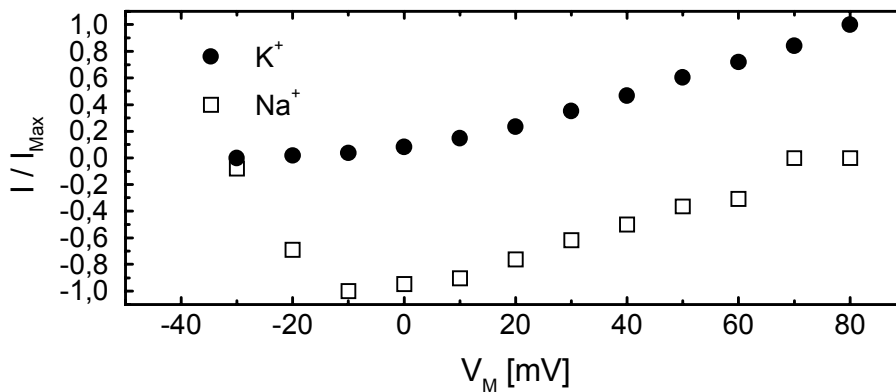


Bild 5.14: Normierte Na^+ und K^+ -Ionenströme über die Zellmembran der SH-SY5Y Zelle in Abhängigkeit des Membranpotentials V_M .

In Bild 5.14 sind die normierten Ionenströme gegenüber dem angelegten Membranpotential der SH-SY5Y Zelle aus dem Na^+ -Einwärtsstrom- und dem K^+ -Auswärtsstrom Experiment aufgetragen. Für die durchschnittliche spezifische Leitfähigkeit g_{FM}^K ergibt sich mit einem K^+ -Strom von $I^K = 1.4$ nA und einem Umkehrpotential von $E_K = -76$ mV ein Wert von $g_{FM}^K = 1.09$ mS/ cm^2 . Dies liegt im Bereich der von [Tosetti, 98] gezeigten Leitfähigkeiten von undifferenzierten SH-SY5Y.

Um einen hohen K^+ -Stromanteil zu erhalten wird die Zelle für das Kopplungsexperiment auf ein Potential von $V_M = 80$ mV depolarisiert (Bild 5.15 A). Der daraufhin aus-

gelöste K^+ -Strom beträgt $I^K = 1.2 \text{ nA}$ (Bild 5.15 B). Ein Na^+ -Strom ist bei diesem Membranpotential nicht zu beobachten. Das gemessene extrazelluläre Signal V_J (Bild 5.15 C) enthält auch hier wieder die kapazitiven Spikes, überlagert von dem Signal aufgrund des K^+ -Stroms.

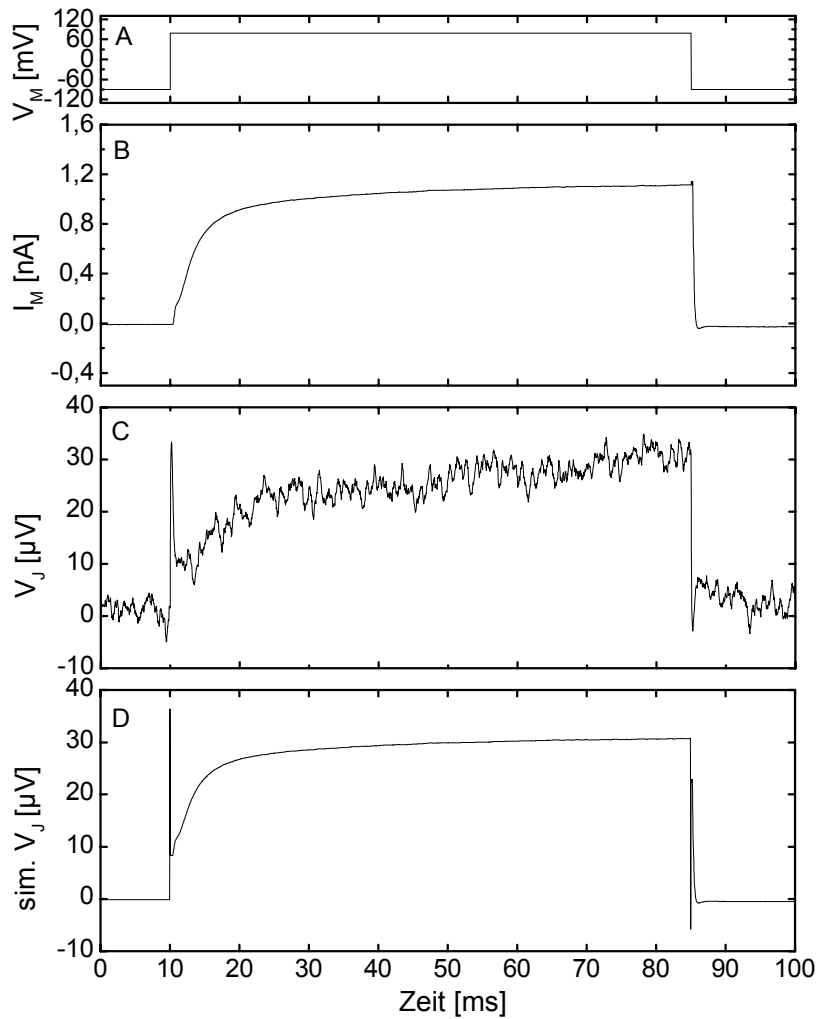


Bild 5.15: Einfluß von K^+ Ionen auf die Kopplung V_J einer SH-SY5Y Zelle (3 DIV, $V_{RP} = -55 \text{ mV}$. Der n-Kanal FET hat ein $g_m = 0.78 \text{ mS}$.

Positive (elektrophysiologische) Ströme die im Kontaktbereich über den Abdichtwiderstand fließen, führen zu einer Anhebung des Potentials über dem Gate. Diese Änderung erzeugt dann im Drain-Source Strom I_{DS} eine positive Auslenkung ($\Delta I_{DS} > 0$). Ausgehend von einem niedrigen Anfangswert von $10 \text{ } \mu\text{V}$, erreicht das Signal nach 70 ms den höchsten Wert von $30 \text{ } \mu\text{V}$. Damit ist auch hier die Proportionalität zwischen dem K^+ -Strom und dem detektierten Signal V_J gegeben. Die Simulation des extrazellulären

Signals V_J in Bild 5.15 D liefert wiederum die Kopplungsparameter. Die spezifische Abdichtleitfähigkeit wird auf $g_J = 30 \text{ S/cm}^2$ bestimmt. Die Leckleitfähigkeit von $g_{FM}^L = 1.8 \times 10^{-6} \text{ S/cm}^2$ erhöht sich um den Faktor $X_{JM}^L = 800$ im Kontaktbereich. Die spezifische Leitfähigkeit von K^+ vergrößert sich um den Faktor $X_{JM}^K = 4.9$ auf $g_{JM}^K = 5.3 \text{ mS/cm}^2$ im Kontaktbereich der Zelle mit dem Gate.

Der Nachweis, dass es sich bei der Kopplung tatsächlich um K^+ -Ionen handelt und nicht um eine durch einen ebenfalls positiven Leckstrom im Kontaktbereich erzeugte ohmsche Kopplung, kann durch die Blockierung der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle erbracht werden. Wird der spannungsabhängige K^+ -Strom unterdrückt darf der vorher beobachtbare extrazelluläre positive Verlauf von V_J nicht mehr messbar sein. Die in der SH-SY5Y Zelle ausgebildeten spannungsabhängigen K^+ -Kanäle können durch Zugabe von Tetraethylammonium (TEA) in das extrazelluläre Medium blockiert werden [Toselli, 96].

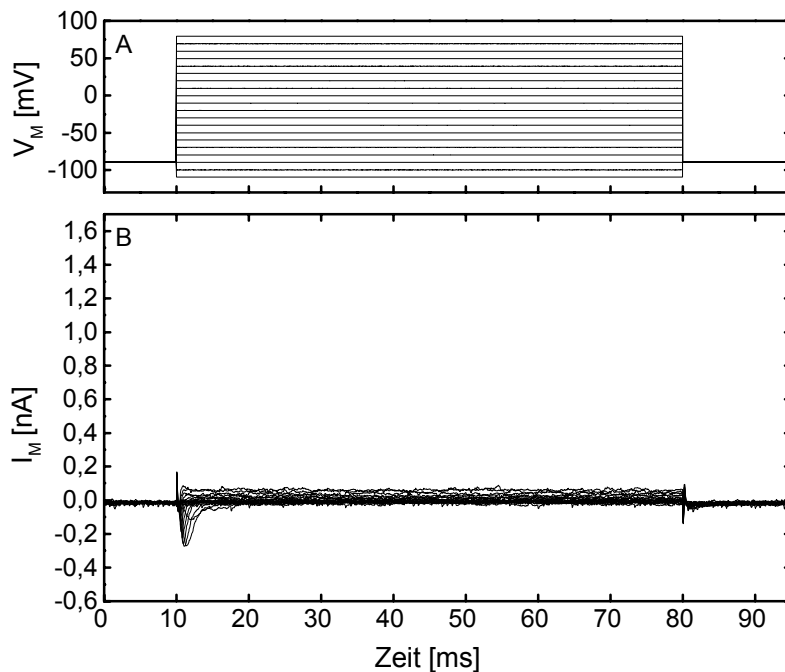


Bild 5.16: Blockierung der K^+ -Kanäle durch TEA der gleichen Zelle wie in Bild 5.14 und Bild 5.15.

Dieses Experiment wird weiterhin an der gleichen Zelle durchgeführt. Bild 5.16 zeigt den Einfluss von TEA auf den K^+ -Strom. Durch die Zugabe von TEA verschwindet der positive auswärtsgerichtete K^+ -Strom im *Voltage-Clamp* Signal. Bild 5.16 zeigt das der

Membranstrom gerade noch $I^M = 0.1$ nA aufweist. Der jetzt noch messbare positive Strom ist der nicht blockierbare auswärtsgerichtete Leckstrom I^L .

Nachdem der K^+ -Strom durch die Zugabe von TEA unterdrückt wurde muss sich diese Reduzierung auch auf das extrazelluläre Signal V_J auswirken. Bild 5.17 zeigt auf der linken Seite das Kopplungsexperiment aus Bild 5.15 und auf der rechten Seite die Auswirkung von TEA auf den Ionenstrom und das extrazelluläre Signal V_J .

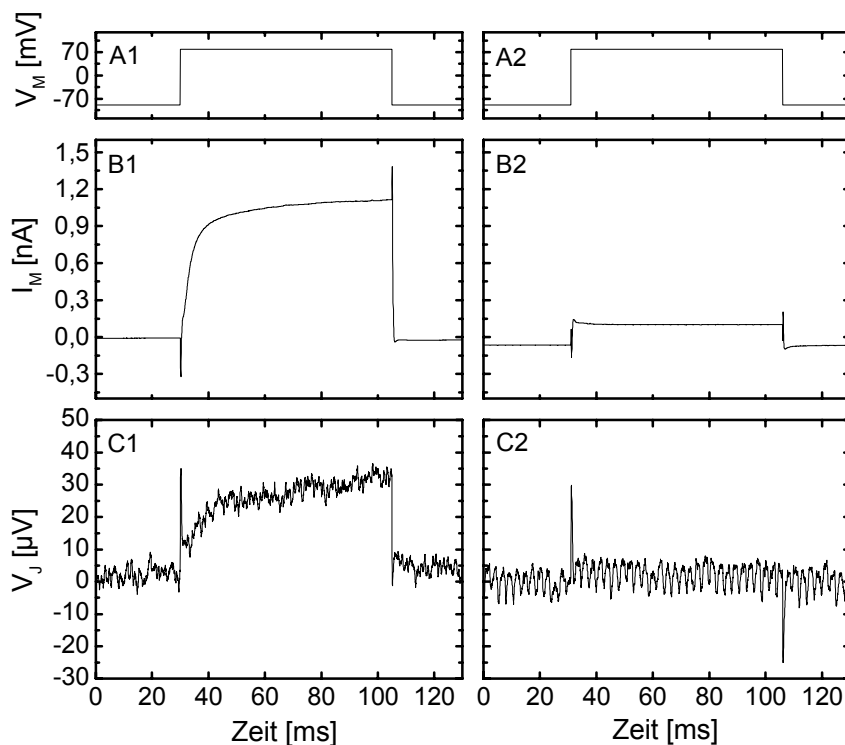


Bild 5.17: Blockierung der K^+ -Ionenkanäle der SH-SY5Y Zelle durch TEA. Unterdrückung des Einflusses des K^+ -Stroms auf das extrazelluläre Signal.

Bei beiden Experimenten wird ein Spannungspuls ausgehend vom Haltepotential von $V_M = -90$ mV auf ein Potential von $V_M = 80$ mV an die Zelle angelegt. Das aufgenommene Signal der TEA Messung unterscheidet sich deutlich von der ohne TEA. Das durch den K^+ -Ioneneinstrom hervorgerufene Signal auf der linken Seite ist auf der rechten Seite unterdrückt, wohingegen die kapazitiven Spikes in beiden Fällen noch vorhanden sind und die gleiche Größe haben. Dies zeigt, dass sich nach der Zugabe von TEA die Kopplungsstärke zwischen Zelle und FET nicht geändert hat.

Durch die Blockierung der K^+ -Ionenkanäle mit TEA ist der experimentelle Beweis erbracht, dass der beobachtete positive Verlauf des extrazellulären Signals V_J einzig durch den Einstrom von K^+ -Ionen in den Kontaktbereich erzeugt wird.

Im nächsten Experiment wird die Proportionalität des extrazellulären Signals V_J mit dem Gesamtstrom I_M aus Na^+ und K^+ im Kontaktbereich zwischen Gate und Zelle untersucht. Dies geschieht durch die Aufnahme einer Serie von Stimulationspulsen und deren Antwortsignalen. Dabei wird die Zelle auf unterschiedliche Membranpotentiale geklemmt und der jeweilige Gesamtstrom aus Na^+ und K^+ und das extrazelluläre Antwortsignal V_J gemessen.

Tabelle 5.10: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.18 durchgeführte Kopplungsexperiment.

Sensor-Typ n-Kanal FET	A_{Gate} [μm^2]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
	4×8	2	2	0.62
Zell-Typ SH-SY5Y	V_{RP} [mV] -33	$R_M^{exp.}$ [G Ω]	$C_M^{exp.}$ [pF]	A_M [cm^2]
	DIV 2	17	8.2	8.2×10^{-6}
Patchmode VC	V_M^H [mV]	V_M^{Puls} [mV]	Abtastrate	Mittelung
	-90	Folge	20 kHz	100 Zyklen

Die Stimulationsserie für eine SH-SY5Y Zelle (2 DIV) ist in Bild 5.18 dargestellt und zeigt die angelegten Spannungspulse ausgehend von einem Haltepotential von $V_M = -90$ mV sowie den Gesamtmembranstrom I_M und das extrazelluläre Signal.

Die in Bild 5.18 A angelegten Stimulationspulse von $V_M = -90$ mV auf $V_M = -30$ mV, -20 mV, 0 mV, 70 mV und 80 mV depolarisieren die SH-SY5Y Zelle, führen zum Öffnen der spannungsabhängigen Ionenkanäle und erzeugen die in Bild 5.18 B gemessenen Ionenströme I_M . Deutlich ist der Na^+ - und der sich anschließende K^+ -Strom zu erkennen. Die Na^+ -Ströme I^{Na} haben maximale Werte von 0.2, 0.4, 0.3 und 0.07 nA und die maximalen K^+ -Ströme verlaufen ansteigend von $I^K = 0.01, 0.06, 0.35$ und 0.47 nA.

Die Reaktion auf die über den Abdichtwiderstand fließenden Ströme ist in Bild 5.18 C dargestellt. Die Signalverläufe von 1 bis 5 enthalten alle die kapazitiven Spikes, die sich ebenfalls mit den Beträgen der Stimulationspulse erhöhen. In den Verläufen von 1, 2 und 3 kommt nach dem positiven Spike der durch den Na^+ -Strom erzeugte negative Verlauf im extrazellulären Signal.

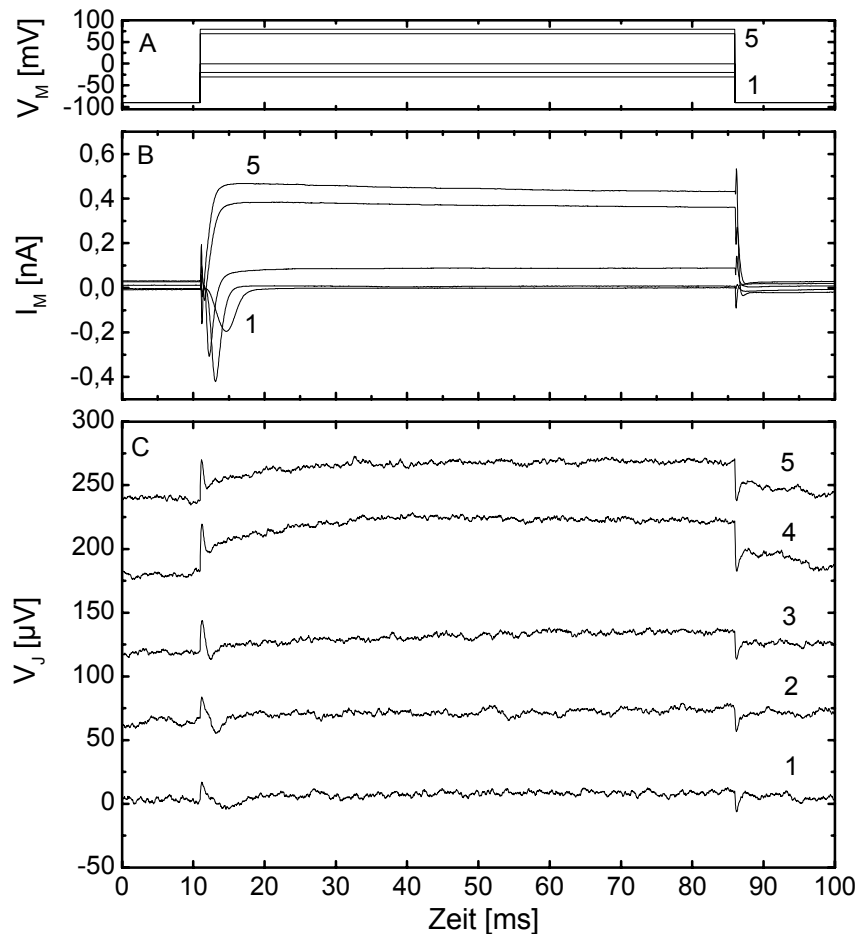


Bild 5.18: Extrazelluläre Nachbildung der Stimulationsfolge einer SH-SY5Y Zelle (2DIV , $V_{RP} = -33\text{mV}$) auf einem $4 \times 8 \mu\text{m}^2$ großen Gate eines n-Kanal FET Arrays, mit $g_m = 0.62 \text{ mS}$. Die Signale in C) sind entsprechend der Stimulationspulse und zur besseren Übersicht verschoben.

Die Signalamplitude reicht von $V_J = 5.5 \mu\text{V}$ in 1, $V_J = 9 \mu\text{V}$ in 2 und $V_J = 5.3 \mu\text{V}$ in 3. Ab $t = 20 \text{ ms}$ kann man dann für die Verläufe 1-5 den durch den K^+ -Strom erzeugten langsamen positiven extrazellulären Signalanstieg erkennen, der dann bei $t = 85 \text{ ms}$ durch den hyperpolarisierenden negativen Stimulationspuls beendet wird. Für V_J ergeben sich die maximalen Amplituden, im Plateaubereich, von 6, 8, 15, 45 und $30 \mu\text{V}$.

Die Auswertung der extrazellulären Nachbildung der Strom-Membranpotential Beziehung erfolgt in der gleichen Weise wie die vorherigen Kopplungsmessungen, für die Na^+ und K^+ -Signale.

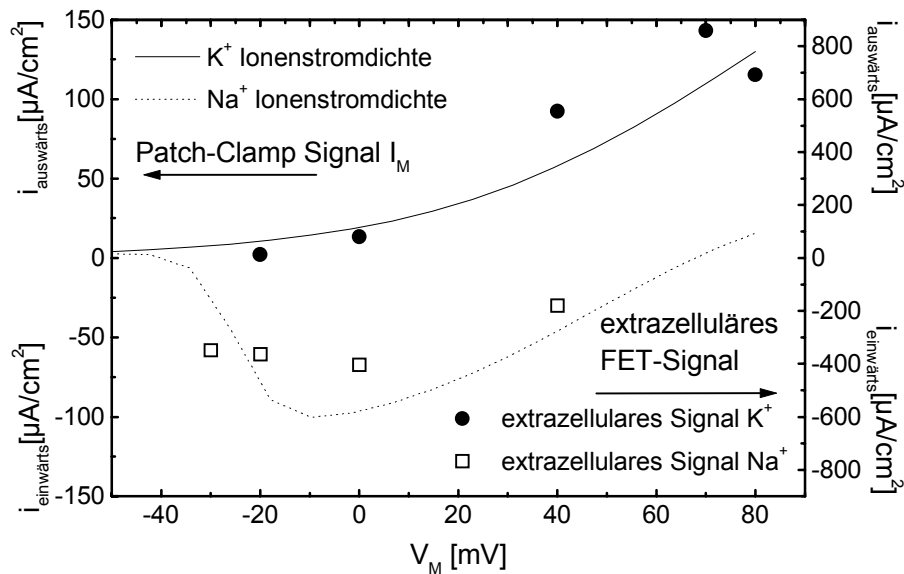


Bild 5.19: Gemittelte Ionen-Stromdichten (linke Seite) berechnet aus den Strömen der einwärts- und auswärtsgerichteten Ionen, aus den *Voltage-Clamp* Messungen in Bild 5.12 und Bild 5.14 sowie aus Bild 5.18 und die für die Erzeugung des extrazellulären Signals V_J notwendigen Ionenstromdichten im Kontaktbereich (rechte Seite), [Krause, 2000 b].

Für jedes extrazelluläre Signal in Bild 5.18 wird eine Simulation durchgeführt. Aus dieser Simulation ergibt sich dann der spezifische Abdichtleitwert für die Kopplung und die Skalierungsfaktoren für die spezifischen Ionenleitfähigkeiten.

Die linke Seite Bild 5.19 zeigt die gemittelten die K^+ - und Na^+ -Stromdichten aus den *Voltage-Clamp* Messungen. Diese sind aus den einwärts- und auswärtsgerichteten Ionenströmen aus den *Voltage-Clamp* Messungen in Bild 5.12 und Bild 5.14 sowie Bild 5.18 berechnet.

Die rechte Seite in Bild 5.19 zeigt die K^+ und Na^+ -Stromdichten die notwendig sind, um die im Bild 5.18 C gemessenen extrazellulären Signale 1-5 im Kontaktbereich zwischen Zelle und Gate darzustellen. Der Vergleich der Stromdichten zeigt, dass die Stromdichten im Kontaktbereich deutlich erhöht sind und in etwa gleichmäßig skalieren.

Tabelle 5.11: Ergebnisse aus den Experimenten mit hoher Ionenkanalleitfähigkeit im Kontaktbereich.

SH-SY5Y	g_J [S/cm ²]	X_{JM}^L	X_{JM}^{Na}	X_{JM}^K
Na ⁺	10	200	2.6	—
K ⁺	30	800	—	4.9

Zusammenfassend kann man folgende Aussagen zu den durchgeführten Experimenten machen:

Die extrazellulären Kopplungen mit den Zellen der Neuroblastoma Zell-Linie zeigen A- und B- Typ Kopplungen, wenn die Ionenkanäle der Zelle nicht entwickelt sind. Die bei diesen Kopplungen aus der Simulation bestimmten Werten für die spezifische Abdichtleitfähigkeit unterscheiden sich nicht von den Werten die bei geringer und hoher Ionenkanalleitfähigkeit bestimmt wurden. Experimente bei hoher Ionenkanalleitfähigkeit zeigen beim Na⁺ als auch bei dem K⁺ deutlich die erhöhte spezifische Leitfähigkeit im Kontaktbereich mit den Skalierungswerten von $X_{JM}^{Na}=2.6$ und $X_{JM}^K=4.9$. Der Nachweis, dass es sich bei den K⁺-Experiment wirklich um den Einstrom von K⁺-Ionen in den Kontaktbereich handelt kann durch die Blockierung der K⁺-Kanäle mit TEA bewiesen werden. Für Na⁺ ist der Beweis der Proportionalität zwischen Na⁺-Ionenstrom und dem extrazellulären Signal. Nur diese Ionenart ist in der Lage einen solche Spannungsabhängigkeit erzeugen.

5.2 Humane Endothelzellen - Linie EA.hy - 926

Die Idee bei der Verwendung dieser Endothelzellen-Linie liegt in der besseren Abdeckung der Sensorfelder durch den Zellkörper. Die Endothelzellen bilden einen konfluenten Zell-Layer aus Einzelzellen. Es soll deshalb im folgenden untersucht werden, ob die spezifische Abdichtleitfähigkeit g_j mit den Endothelzellen gegenüber den Neuroblastomazellen erniedrigt werden kann.

Die Endothelzellen des menschlichen Organismus haben die Aufgabe alle Blutgefäße auszukleiden. Damit gewährleisten sie den Aufbau und die Reparatur von Blutgefäßen in allen Körperregionen.

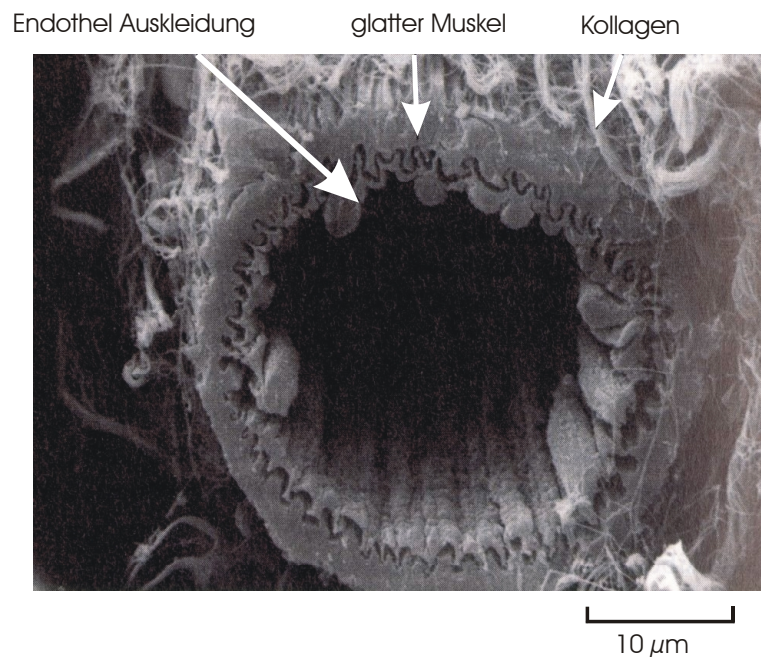


Bild 5.20: Die Endothelzellen in den Blutgefäßen des menschlichen Organismus, [Alberts, 95].

Blutgefäße, sowohl Arterien als auch Venen, besitzen eine starke Wand aus Bindegewebe und glatter Muskulatur. Die innere Wand dieser Gefäße besteht aus einer Lage Endothelzellen (Bild 5.20), die durch Basallamina von der Muskulatur getrennt ist.

Die Endothelzellen arbeiten als mechanische Signalübersetzer zwischen Blut und glatten Muskelzellen. Die Membran dieser Zellart hat dafür drucksensitive Ionenkanäle eingebaut. Die druckabhängigen Ionenkanäle (stretch-activated cation channel, SAC) öffnen dann, wenn sich die Membran durch äußere Einflüsse stark verformt, [Köhler, 98]. Diese Zellart unterscheidet sich somit von Nervenzellen, da sie durch äußere Stimulation keine Aktionspotentiale auslöst und keine spannungsabhängigen Ionenkanäle besitzt. Durch dieses Fehlen der spannungsgesteuerten Kanäle können mit der Voltage-Clamp Methode nur die kapazitiven und ohmschen Kopplungsanteile und damit die spezifische Abdichtleitfähigkeit mit den Endothelzellen untersucht werden

5.2.1 Zellkultur

Die Stammzellen EA.hy-926 werden in Zellkulturflaschen kultiviert. Das verwendete Kulturmedium M199 (Sigma) enthält zusätzlich 200 mM Glutamax (GibcoBRL), 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung (GibcoBRL) und 15 % Hitze inaktiviertes fötales Rinderserum (FCS, GibcoBRL). Die Zellkultur und die Oberflächenmodifikation erfolgt nach dem gleichen Protokoll wie bei den Experimenten mit den Neuroblastoma-Zellen SH-SY5Y (s. Kapitel 5.1.1). Die FET und EGE werden mit 4.000 bzw. 40.000 Zellen besetzt.

5.2.2 Entwicklung der EA.hy-926 Zellen auf den FET und EGE

Die ausgesäten Endothelzellen wachsen konfluent auf der mit Fibronectin beschichteten Siliziumdioxid-Oberfläche. Die ca. 20 - 40 μm im Durchmesser großen Zellen bilden einen Monolayer aus, wobei sich die Zellen nicht übereinander legen sondern sich nur an den Ränder gegenseitig berühren. Das Wachstum der Zelle wird inhibiert sobald sich die Endothelzellen mit der Zellmembran berühren. Bild 5.21 zeigt die Endothelzellen auf je einem FET und EGE. Deutlich sind die runden bzw. ovalen Zellkörper zu sehen, die sich dicht aneinander lagern. Die Zellen liegen sehr flach auf der Oberfläche auf. Dadurch erschweren sich die Patch-Clamp Experimente. Die Endothelzellen können bis zu 6 Tagen in Kultur gehalten werden. Das Ruhepotential dieser Zellen liegt zwischen 10 bis -50 mV.

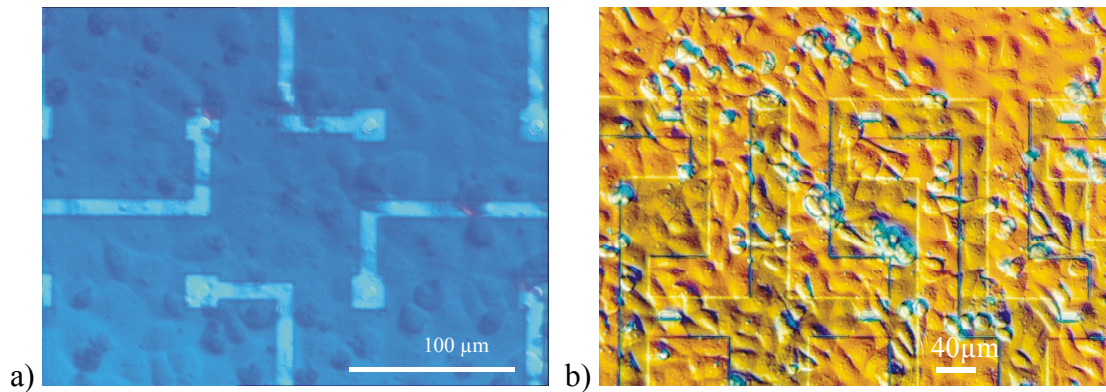


Bild 5.21: EA.hy-926 Zellen (2DIV) auf einem EGE und FET. Der Elektrodenabstand beträgt (a) 100 μm und der Gateabstand (b) 200 μm . Deutlich zu erkennen sind die konfluenten Zell-Monolayer auf beiden Sensoren, mit ihren ovalen bis runden Zellkörpern.

5.2.3 Signaleinkopplung von EA.hy-926 in FET und EGE

Die für die Kopplung zwischen den EA.hy-926 Zellen und den Arrays wichtigen Membranelemente des Ersatzschaltbildes sind in Bild 5.22 dargestellt.

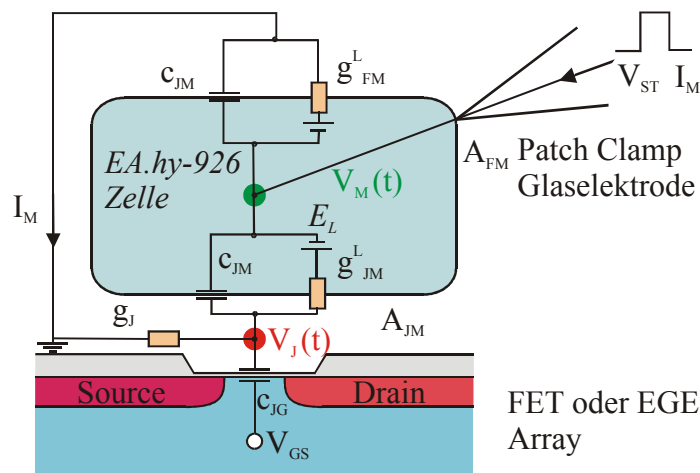
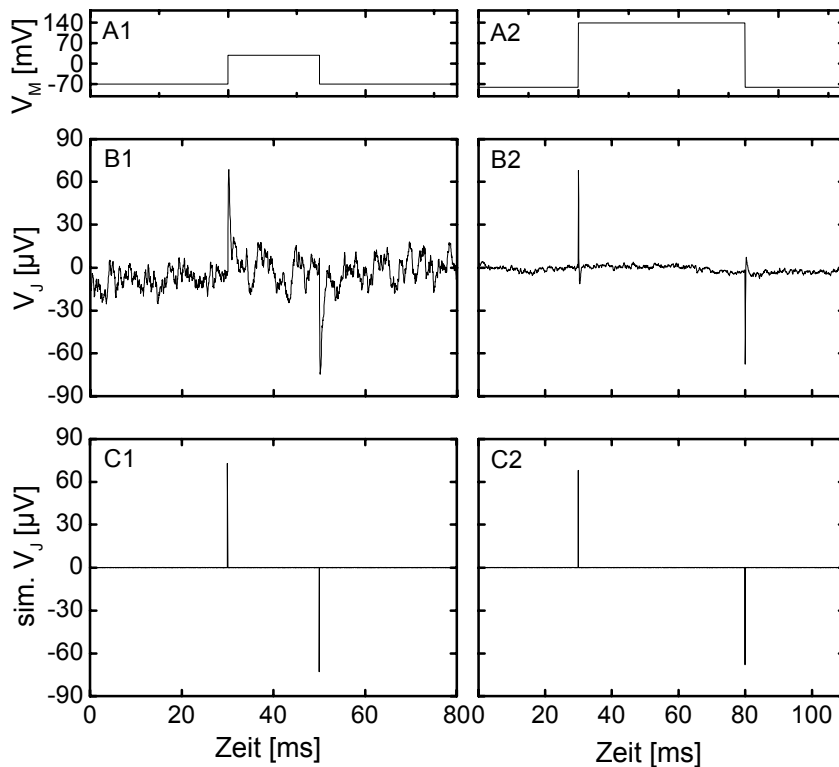


Bild 5.22: Das Ersatzschaltbild der Kopplung ist für die EA.hy-926 Zelle gegenüber der SH-SY5Y Zelle, auf c_{JM} , g_{JM}^L und g_J reduziert.

Im Bild 5.23 sind die rein kapazitiven Kopplung mit einem FET und einer EGE dargestellt. Die linke Seite zeigt das extrazelluläre Signal V_J mit einem n-Kanal FET. Die rechte Seite zeigt eine Aufnahme von einer Goldelektrode.

Tabelle 5.12: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.23 durchgeführte Kopplungsexperiment.

Sensor-Typ n-Kanal FET Au -EGE	A_{Gate} [μm^2]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
	2×16	2	3	0.89
	$\varnothing = 10$	0	0.34	1
Zell-Typ EA.hy-926	DIV V_{RP} [mV]	$R_M^{\text{exp.}}$ [G Ω]	$C_M^{\text{exp.}}$ [pF]	A_M [cm 2]
	2 -30	0.46	1.2	1.2×10^{-6}
	1 -30	1	2.3	2.3×10^{-6}
Patchmode VC	V_M^H [mV]	V_M^{Puls} [mV]	Abtastrate	Mittelung
	-70	30	30 kHz	20 Zyklen
	-80	140	20 kHz	50 Zyklen

Bild 5.23: Kapazitive Kopplung einer EA.hy-926 Zelle in einen FET (links) und eine EGE (rechts). A zeigt den jeweiligen Stimulationspuls V_M und B das extrazelluläre Signal V_J . C zeigt das simulierte Signal.

Die extrazelluläre kapazitive Signalhöhe beträgt bei der FET Kopplung $V_J = 73 \mu\text{V}$ und $V_J = 68 \mu\text{V}$ für die EGE Kopplung. Die Endothelzellen EA.hy-926 zeigen ebenfalls kapazitive Kopplungen wie die Neuroblastoma Zelle SH-SY5Y. Durch die Simulationen in Bild 5.23 C1 und C2 kann man die spezifischen Abdichtleitwerte für die beiden kapazitiven Kopplung abschätzen. Mit den Endothelzellen auf den FET und Goldelektrode erreicht man Werte von $g_J = 7 \text{ S/cm}^2$ und $g_J = 10 \text{ S/cm}^2$. Mit den Endothelzellen lassen sich somit die gleichen spezifischen Abdichtleitwerte erzielen wie mit den Neuroblastoma Zellen. Der Zell-Monolayer der Endothelzellen bewirkt offensichtlich keine deutliche Erhöhung des spezifischen Abdichtleitwertes g_J .

Eine zusätzlich interessante Fragestellung wurde mit den Endothelzellen durchgeführt, nämlich: Welchen Einfluss hat eine Veränderung des Stimulationspulses von einem rechteckigen Puls zu einer Stimulationsrampe auf das extrazelluläre Signal. Im folgenden wird diese Fragestellung an einer Endothelzelle experimentell untersucht.

Tabelle 5.13: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.24 und Bild 5.25 durchgeführte Kopplungsexperiment.

Sensor-Typ n-Kanal FET	$A_{Gate} [\mu\text{m}^2]$	$V_{GS} [\text{V}]$	$V_{DS} [\text{V}]$	$g_m [\text{mS}]$
	6×16	2	3	0.9
Zell-Typ EA.hy-926	$V_{RP} [\text{mV}]$ -48	$R_M^{\text{exp.}} [\text{G}\Omega]$	$C_M^{\text{exp.}} [\text{pF}]$	$A_M [\text{cm}^2]$
	DIV 2	2.5	10	10×10^{-5}
Patchmode VC	$V_M^H [\text{mV}]$	$dV/dt [\text{V/s}]$	Abtastrate	Mittelung
	-70	100	20 kHz	51 Zyklen

Ausgangspunkt ist in Bild 5.24 A1-C1 die rein kapazitive Kopplung einer Endothelzelle auf einem n-Kanal FET. Danach folgt eine Spannungsrampe (Bild 5.24 A2-C2) mit einer Steigung von $dV/dt = 100 \text{ V/s}$ von einem Haltepotential V_M^H . Die Membranleitfähigkeit ergibt sich damit zu $g_{FM}^L = 40 \mu\text{S/cm}^2$ und deutet auf eine dichte Membran im Kontaktbereich hin.

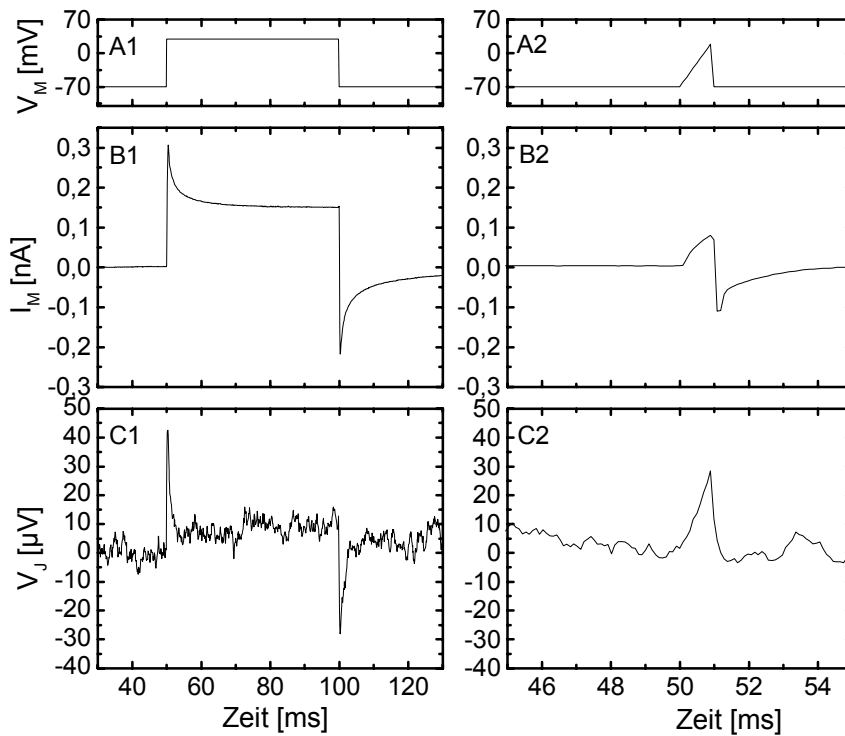


Bild 5.24: Kapazitive Kopplung einer EA.hy-926 Zelle (2 DIV, $V_{RP} = -48$ mV) erzeugt durch einen rechteckige Stimulationspuls und einer Stimulation mit einer Rampe.

Während der Fortsetzung des Experimentes wird die Zellmembran undicht und es erhöht sich die Membranleitfähigkeit auf $g_{JM}^L = 1.6$ mS/cm². Dies führt zu einer ohmsche Kopplung und somit zu einer Proportionalität zwischen Stimulationspuls und extrazellulärem Signal (Bild 5.25). Die Rampe in Bild 5.25 A3-C3 zeigt, dass die Signaleinkopplung selbst mit einer weit geringeren Steigung von $dV/dt = 1$ V/s durchführbar ist. Nach dem Rampenexperiment folgt in Bild 5.25 A4-C4 ein rechteckiger Stimulationspuls mit der bereits diskutierten extrazellulären Form.

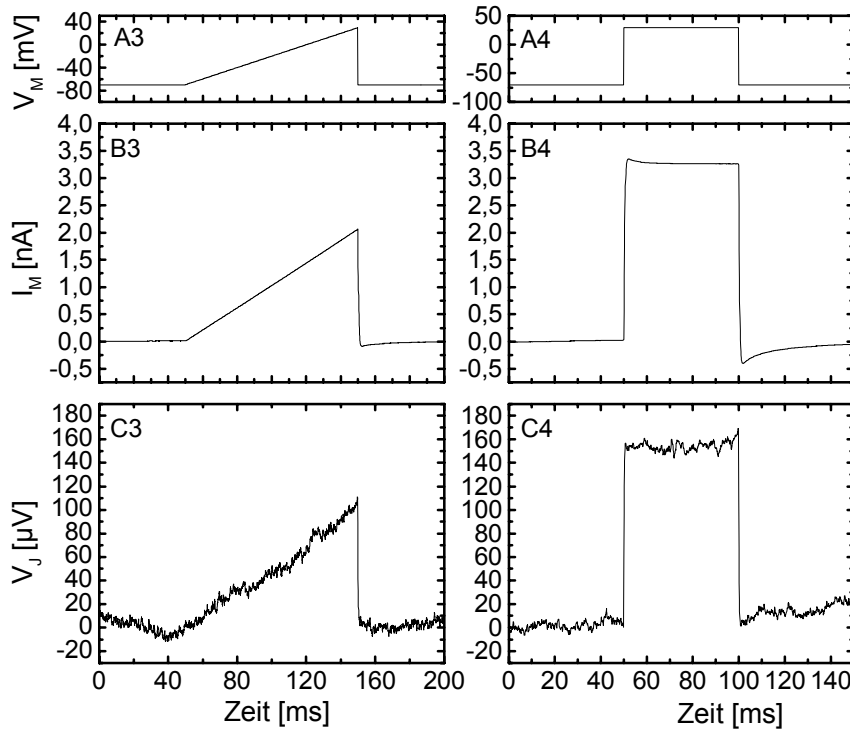


Bild 5.25: EA.hy-926: Fortsetzung des Experiments aus Bild 5.24.

Tabelle 5.14: Ergebnisse aus den Experimenten mit geringer Ionenkanalleitfähigkeit.

EA.hy-926	g_j [S/cm^2]
A-Typ	10, 7

Zusammenfassend zeigen die Endothelzellen EA.hy-926 die gleichen kapazitiven und ohmschen Kopplungseigenschaften wie die neuronale Zell-Linie SH-SY5Y. Die Stimulation der Zelle mit einer Rampe ist dann möglich wenn die Zelle im Kontaktbereich keine dichte Membran besitzt. Damit ist es auch möglich sehr langsame Depolarisationen von Zellen detektieren zu können. Eine deutliche Verbesserung der Kopplung durch eine Erniedrigung der spezifischen Abdichtleitfähigkeit kann durch den Zell-Monolayer aus EA.hy-926 Zellen nicht beobachtet werden.

5.3 Hippocampale Neuronen

Ein wesentlicher Vorteil der hippocampalen Neurone bei der Untersuchung der Kopplung liegt in der Höhe der beobachtbaren Ionenströme. Im Gegensatz zu den Neuroblastomazellen SH-SY5Y liegen die Ströme die über die spannungsgesteuerten Ionenkanäle fließen für Na^+ im Bereich von 1-2 nA und für K^+ bei 1-3 nA. Der K^+ -Ionenstrom kann bei den Neuronen über zwei spannungsgesteuerte Kanäle, dem A-Typ und K-Typ, fließen. Dadurch können sich verschiedene extrazelluläre Signalverläufe bei den Kopplungsexperimenten ergeben. Zudem ist das Ziel bei der Verwendung von hippocampalen Neuronen der Aufbau neuronaler Netze auf Sensorflächen, [Offenhäuser, 97b]. Dabei wird die Eigenschaft der hippocampalen Neuronen ausgenutzt Synapsen zu bilden. Um solche neuronale Netzwerke auf Halbleiterbauelemente zu etablieren und somit ein zweidimensionale Anordnung von Zellen des Hippocampus zu schaffen, ist es zum einen wichtig, diese Zellen an die Sensoroberfläche zu binden und zum anderen die Kopplung zwischen Sensorfeld und Neuron zu verstehen. Auf dem Weg, dieses Ziel zu erreichen, steht in der Arbeit die Untersuchung der Kopplungseigenschaften dieser Zellart.

5.3.1 Zellpräparation

Zur Präparation von hippocampalen Neurone werden Ratten (CD-Ratten) des Embryonaltages E18 verwendet. Die steril entnommenen Embryonengehirne werden in eiskalter, steriler HBSS-Lösung gewaschen und gesammelt. Mit Hilfe einer Stereolupe werde die Hippocampi der einzelnen Föten herausgelöst, gesammelt und für 8 min. in einer 0.25% - igen Trypsinlösung in HBSS bei 37°C in feuchter Atmosphäre und mit 5% CO_2 Gehalt inkubiert. Das Gewebe wird mit einer 5 ml-Messpipette in ein 15-ml Zentrifugenröhrchen mit 2 ml Kulturmedium (Neurobasalmedium mit 2 % B27 Supplement) überführt und durch 5-maliges Waschen mit jeweils 2 ml Medium bei einer Wartezeit von 5 min. pro Waschvorgang vom restlichen Trypsin befreit. Die gewaschenen Hippo-

campi werden dann mit einer Pasteurpipette mit verengter Spitze durch Aufsaugen und Ausblasen mechanisch dissoziiert. Nach 5 min werden 1.5 ml der überstehenden Zellsuspension in 1 ml Kulturmedium überführt und die Zellen gezählt. Man erhält auf diese Weise eine Zellausbeute von etwa 5×10^5 Zellen pro Hippocampus.

Die Oberflächenmodifikation der EGE und FET Arrays erfolgt durch Physisorption von Laminin an der SiO_2 Oberfläche. Die Ausgangslösung von 500 μl Laminin in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ wird mit 6 ml sterilem Phosphatpuffer (PBS, Dulbecco GibcoBRL) aufgefüllt. Von dieser Lösung werden 100 μl auf die FET und 200 μl auf die EGE Oberfläche gegeben. Die Sensoren werden dann 3 h bei 37 °C in feuchter Atmosphäre und bei 5 % CO_2 Gehalt inkubiert. Danach werden die Oberflächen 3 mal mit sterilem Phosphatpuffer (PBS, Dulbecco GibcoBRL) gespült. Die Zellsuspension wird dann auf die Sensoroberfläche gegeben. Zum Zeitpunkt des Besatzes beträgt die Zelldichte $100\text{-}150 \times 10^6$ Zellen/ cm^3 .

5.3.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der Neuronen

Die Membrankapazitäten der in den Experimenten untersuchten Hippocampalen Neuronen liegen im Bereich von $C_M = 5\text{-}11$ pF. Daraus ergibt sich mit der spezifischen Kapazität von $c_M = 1$ $\mu\text{F/cm}^2$ eine Zelloberfläche von $A_M = 500\text{-}1100$ μm^2 . Das Ruhepotential der Neurone variiert zwischen $V_{RP} = -60$ mV und -10 mV. In der Zellmembran der hippocampalen Neuronen sind ebenfalls wie bei den Neuroblastomazellen die spannungsabhängigen Na^+ , K^+ und Ca^{2+} Ionenkanäle enthalten, wobei die Experimente durch die Na^+ und K^+ -Ionenkanäle dominiert werden.

Durch zwei verschiedene Spannungspulsprotokolle können zwei Arten von K^+ -Kanälen im *Voltage-Clamp* Modus beobachten werden [Storm, 90]:

Der K^+ -Kanal, der bei der Depolarisation am schnellsten öffnet wird als A-Typ K^+ -Kanal bezeichnet [Klee, 97], [Ficker, 92], wohingegen der K-Typ K^+ -Kanal den bereits bei den SH-SY5Y Zellen beobachtbaren langsam öffnenden und schließenden Verlauf zeigt [Storm, 90].

Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Ionenstromverläufe sind in Bild 5.26 und in Bild 5.27 die K^+ -Ströme des gleichen Neurons bei (1 DIV, $V_{RP} = -35$ mV), für verschiedene Stimulationsprotokolle dargestellt.

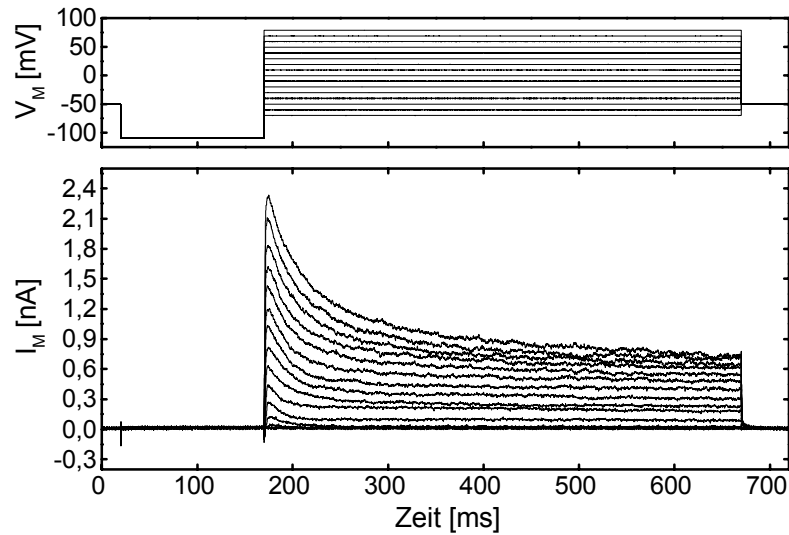


Bild 5.26: A-Typ und K-Typ K^+ -Strom überlagert: Das Stimulationsprotokoll zeigt einen für Neuronen charakteristischen schnell ansteigenden A-Typ K^+ -Strom direkt nach dem Depolarisierungspuls.

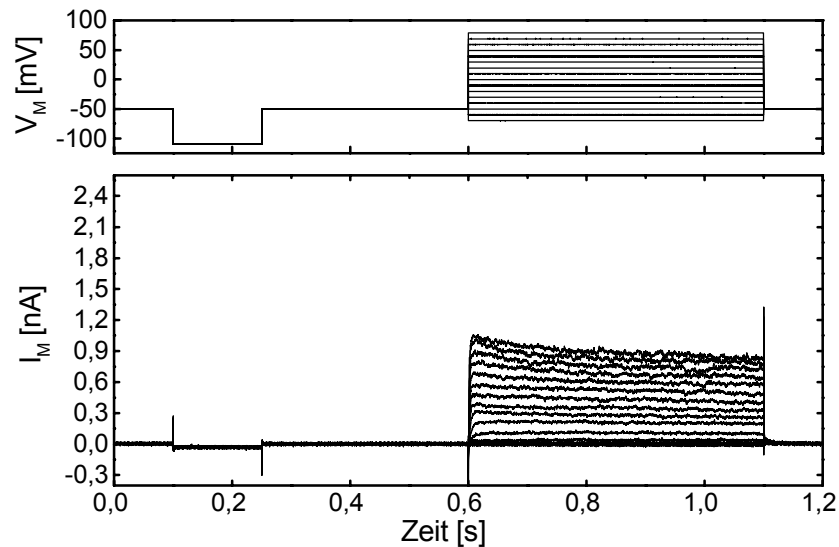


Bild 5.27: K-Typ K^+ -Strom: Das Stimulationsprotokoll zeigt den auch bei den Neuroblastomazellen beobachteten K-Typ K^+ -Strom. Durch eine Verweilzeit von $t = 350$ ms zwischen der Hyperpolarisation auf -110 mV und der Depolarisation bleibt der A-Typ K^+ -Kanal inaktiviert.

In der untersuchten Zelle kann kein Na^+ -Strom beobachtet werden, wohingegen sich aber gerade dadurch die zwei unterschiedlichen K^+ -Ströme besonders gut darstellen lassen. In beiden Fällen wird von einem Haltepotential von $V_M = -50$ mV die Zelle auf ein Membranpotential von $V_M = -110$ mV hyperpolarisiert. Danach folgen zur Beobachtung des A-Typ K^+ -Stroms die Depolarisierungspulse in 10 mV Schritten bis zu einem Membranpotential von $V_M = 80$ mV, wodurch Ströme bis zu 2 nA gemessen werden. Nur noch der K-Typ K^+ -Strom kann dann beobachtet werden, wenn der A-Typ Kanal durch einen 350 ms langen zusätzlichen Spannungspuls nach der Hyperpolarisation auf $V_M = -50$ mV deaktiviert wird. Der Betrag des Stroms liegt dann nur noch bei einem nA.

Durch die Entwicklung von Na^+ -Kanälen in den hippocampalen Neuronen kann im VC- und CC-Modus zum einen der Na^+ -Ionenfluß über die Zellmembran gemessen werden und zum anderen Aktionspotentiale ausgelöst werden (Bild 5.28, Bild 5.29).

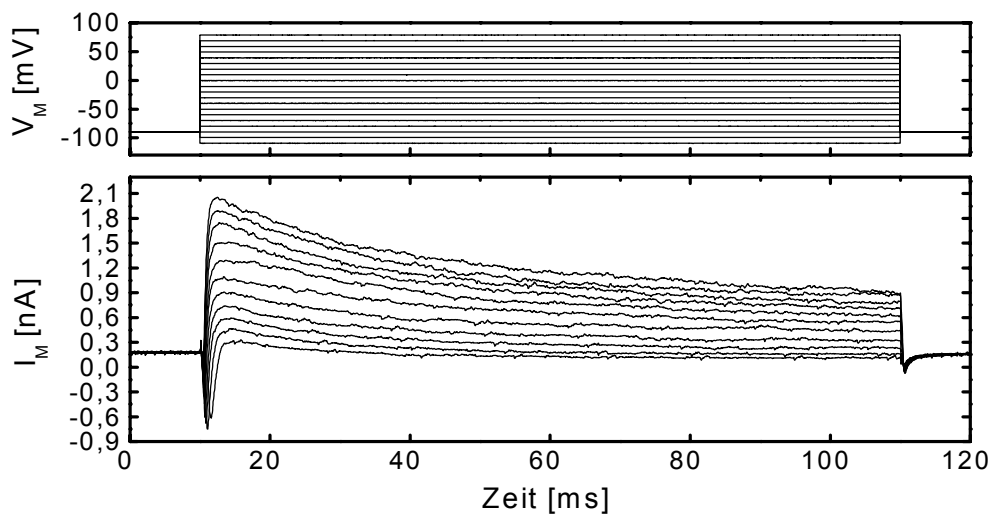


Bild 5.28: VC-Patch eines hippocampalen Neurons (1DIV, $V_{RP} = -30$ mV): Überlagerung der Ionenströme aus schnell öffnenden Na^+ -Kanälen und den A- und K-Typ K^+ -Strömen.

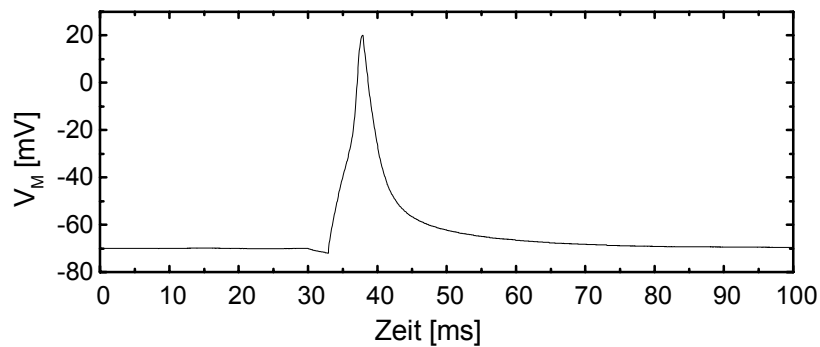


Bild 5.29: Aktionspotential des Neurons (1 DIV, $V_{RP} = -30$ mV). Das Aktionspotential wird durch einen depolarisierenden Stromimpuls von $I_{Puls} = 0.17$ nA ausgelöst.

5.3.3 Morphologische Entwicklung hippocampaler Neurone auf den FET und EGE

Auf den EGE und FET bilden die Neurone schon ab dem 1 DIV Neurite aus (Bild 5.30).

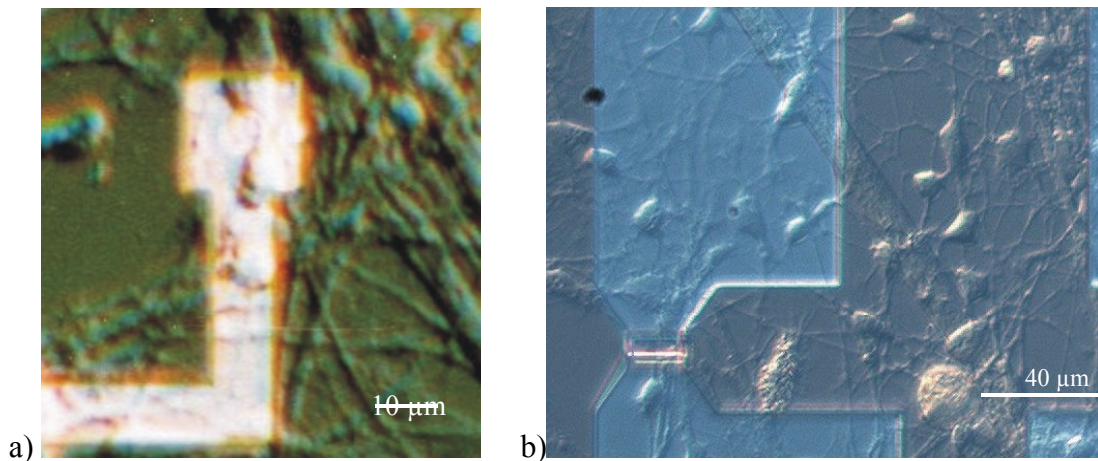


Bild 5.30: Hippocampale Neuronen auf EGE und FET (1 DIV).

Die Neurone haben einen pyramidalen Aufbau und einen durchschnittliche Größe von 10-15 μm . Zum Aufbau von Netzwerken auf den FET und EGE ist es erforderlich, dass die Neurone auf den modifizierten Oberflächen adhäreren und über längere Zeit in Kultur gehalten werden können. Spontane Aktionspotentiale können durch Botenstoffe sowie über die Synapsen, die sich während der Zeit in Kultur zwischen Dendriten und

Axonen mehrerer Neurone ausbilden, ausgelöst werden. Im Bild 5.31 sind solche spontane Aktionspotentiale eines Neurons (3 DIV, $V_{RP} = -50$ mV) innerhalb eines Netzwerks auf der Oberfläche eines p-Kanal FET Arrays dargestellt. Dabei erkennt man deutlich die Repolarisierung des Neurons nach jedem Aktionspotential. Bild 5.32 zeigt ein Netzwerk von Neuronen auf einem FET Array. Deutlich zu erkennen sind die Neurite zwischen den Neuronen.

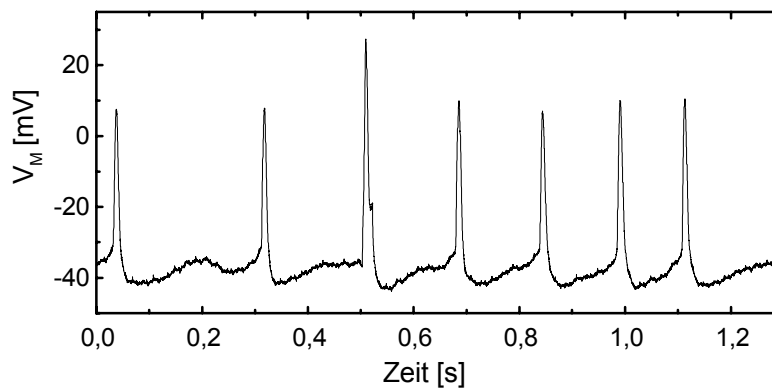


Bild 5.31: Patch-Signal: Spontane Aktionspotentiale eines hippocampalen Neurons (3 DIV, $V_{RP} = -50$ mV).

Dieses Ergebnis zeigt, daß es möglich ist, die Eigenschaften eines Neurons im natürlichen Gewebeverband, wie Ausbildung von Aktionspotentials, Neuritenwachstum und das Formen von Synapsen auch in Kultur auf den Sensorfeldern unverändert aufrecht zu erhalten.

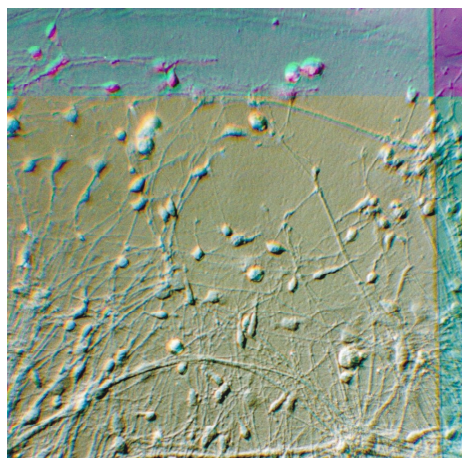


Bild 5.32: Netzwerke von Hippocampalen Neuronen auf einem FET Array.

In [Sprössler, 2000] ist die Möglichkeit zum gezielten Aufbau von Netzwerken auf den FET und EGE-Oberflächen beschrieben. Dabei wird die spätere Zellorientierung auf dem Sensor durch das Stempeln (microcontact-printing) von Adhäsionsmolekülen in definierten Strukturen möglich.

5.3.4 Signaleinkopplung in den FET und EGE

Das Interesse bei den Kopplungsexperimenten mit hippocampalen Neuronen liegt zum einen in der Unterscheidung der beiden Typen der K^+ -Kanäle im extrazellulären Signal, die durch verschiedene Stimulationsprotokolle aktiviert werden können. Zum anderen zusätzlich auch darin den Einfluss des Na^+ -Stroms auf V_J zu untersuchen. Die Kopplung von extrazellulären Signalen mit den Sensor-Arrays unterteilt sich in die Untersuchung von Kopplungen, bei dem nur die passiven Elemente der Zellmembran zum Entstehen des Signals beitragen, sowie in solche Kopplungen bei denen die Ionenströme im Kontaktbereich die Signale beeinflussen.

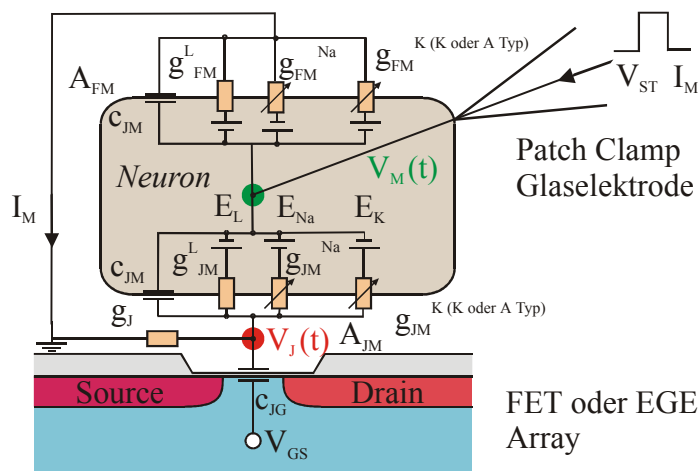


Bild 5.33: Ersatzschaltbild zur Kopplung von hippocampalen Neuronen auf FET und EGE Arrays. Zusätzlich wird hier die Untersuchung der K^+ -Kanälen A- und K- Typ im extrazellulären Signal wichtig.

5.3.4.1 Zellen ohne aktive Ionenkanäle

Die spannungsabhängigen Ionenkanäle hippocampaler Neurone können durch den Präparationsprozess in ihrer Entwicklung in der Zellkultur beeinträchtigt sein. Die Neu-

rone haben dann ein Ruhepotential von bis zu $V_{RP} = -50$ mV, doch können während des *Voltage-Clamp* Experiments keine spannungsabhängigen Ionenströme gemessen werden. An diesen Neuronen können dann, sofern sie auf einem Gate oder Elektrode eines FET oder EGE liegen, Untersuchung der rein kapazitiven bzw. ohmschen Kopplung durchgeführt werden.

Tabelle 5.15: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.34 durchgeführte Kopplungsexperiment.

Sensor-Typ	A_{Gate} [μm^2]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
n-Kanal FET	4×16	2.3	3	0.8
Au -EGE	$\varnothing = 8$	0.05	0.15	0.84
Zell-Typ	DIV	$R_M^{\text{exp.}}$ [$\text{G}\Omega$]	$C_M^{\text{exp.}}$ [pF]	A_M [cm^2]
hippocampale Neurone	V_{RP} [mV]			
	2 -60	0.76	4.9	4.9×10^{-6}
	1 -5	1.8	8.6	8.6×10^{-6}
Patchmode	V_M^H [mV]	V_M^{Puls} [mV]	Abtastrate	Mittelung
VC	-60	-10	33 kHz	100 Zyklen
	-90	60	33 kHz	135 Zyklen

Die Resultate rein kapazitiver Kopplung sind in Bild 5.34 dargestellt. Als Reaktion auf den Spannungspuls kann ein kapazitiver Signalanteil mit einer Amplitude von $V_J = 15$ μV detektiert werden. Der Stimulationspuls von insgesamt $V_M = 150$ mV erzeugt ein extrazelluläres Signal von ebenfalls $V_J = 15$ μV . In Bild 5.34 B1 und B2 lassen sich keine ohmschen Kopplungsanteile beobachten. Dies weist auf eine auch im Kontaktbereich dichte Zellmembran hin. Aus der Simulation in Bild 5.34 leitet sich ein Wert für die spezifische Abdichtleitfähigkeit von $g_J = 18$ S/cm^2 ab. Für die Kopplung des Neurons mit dem EGE fällt die Abdichtleitfähigkeit mit $g_J = 55$ S/cm^2 deutlich größer aus. Die spezifischen Membranleitfähigkeiten von $g_{FM}^L = 0.26$ mS/cm^2 für die FET Kopplung und $g_{FM}^L = 0.06$ mS/cm^2 für die EGE Kopplung beweisen die Dichtheit der Neurone im Kontaktbereich.

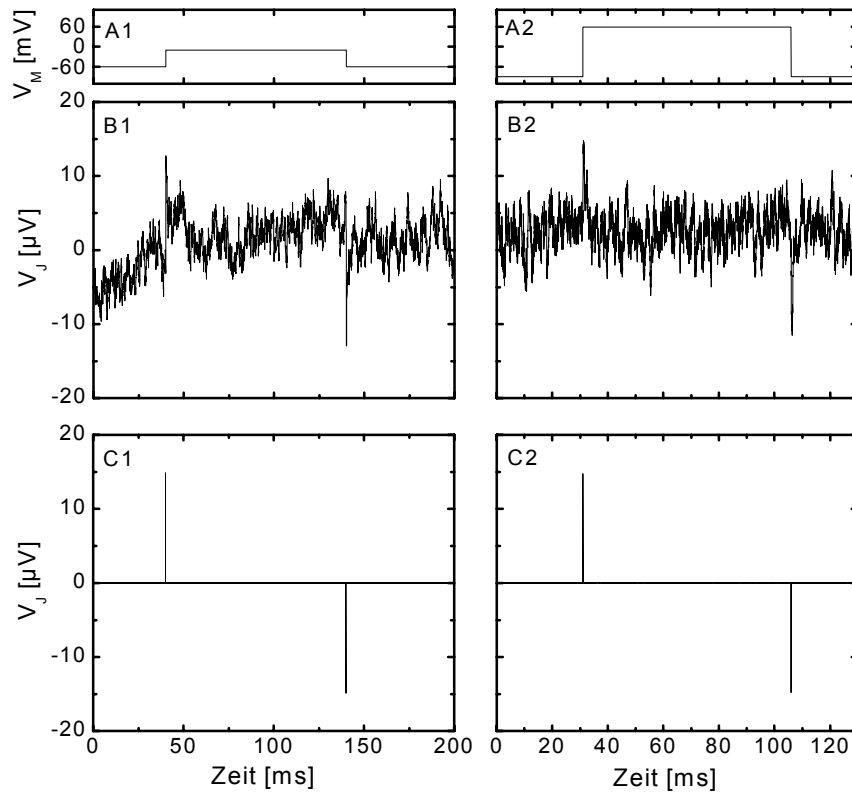


Bild 5.34: A-Typ Kopplung hippocampaler Neurone: in einen FET (links) und eine EGE (rechts). A zeigt den jeweiligen Stimulationspuls V_M und B das extrazelluläre Signal V_J . C zeigt das simulierte Signal.

Im Vergleich zum vorhergezeigten Experiment (Bild 5.34) zeigt Bild 5.35 zusätzliche ohmsche Anteile im extrazellulären Signal.

Tabelle 5.16: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.35 durchgeführte Kopplungs-experiment.

Sensor-Typ p-Kanal FET	A_{Gate} [μm^2]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
	3×16	-2.5	-3	0.55
Zell-Typ Neurone	DIV	$R_M^{\text{exp.}}$ [G Ω]	$C_M^{\text{exp.}}$ [pF]	A_M [cm^2]
	V_{RP} [mV]	1	32	3.2×10^{-5}
Patchmode VC	V_M^H [mV]	V_M^{Puls} [mV]	Abtastrate	Mittelung
	-90	10	33 kHz	150 Zyklen

Bei dem Sensortyp führt ein Stimulationsspuls ausgehend von $V_M = -90$ mV, von jeweils 100 mV zu einem kapazitiven und einem ohmschen Kopplungsanteil am Gesamtsignal V_J . Bild 5.35 B zeigt den beobachteten Membran-Leckstrom, wobei diesem Fall die Kompensation nicht vollständig ist. Das kapazitive Signal wird Bild 5.35 C zu $V_J = 68$ μ V bestimmt.

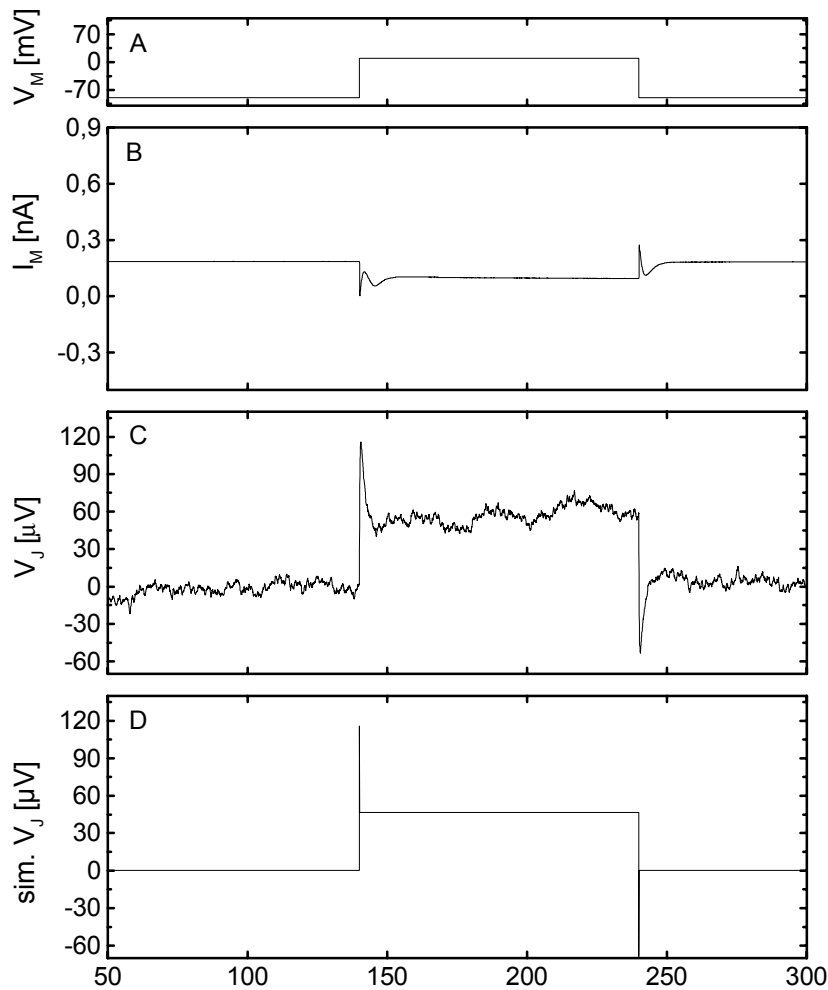


Bild 5.35: Ohmsche und Kapazitive Kopplung mit hippocampalen Neuronen und einen FET. A und B zeigen jeweils den Stimulationsspuls V_M und den Membranstrom I_M durch die Patchelektrode. C zeigt die entsprechenden eingekoppelten Signale V_J . Zur Bestimmung der Kopplungsparameter werden die Signale V_J entsprechend simuliert (D).

Aus der Simulation der kapazitiven Spikes für beide Kopplungen (D) zeigt sich, dass die spezifische Abdichtleitfähigkeit einen Wert von $g_J = 7.6$ S/cm² aufweist. Die spezi-

fische Membranleitfähigkeit von $g_{FM}^L = 0.03 \text{ mS/cm}^2$ ist für die für die FET-Neuron Kopplung um den Skalierungswert $X_{JM}^L = 114$ erhöht.

Tabelle 5.17: Ergebnisse aus *Voltage-Clamp* Experimenten mit geringer Ionenkanalleitfähigkeit.

Neurone	g_J [S/cm ²]	X_{JM}^L
A-Typ	18,55	—
A-Typ+ B-Typ	7.6	114

Die Ergebnisse für die spezifische Abdichtleitfähigkeit bei den Versuchen mit Neuronen ohne aktive Ionenkanäle im Kontaktbereich liegen in dem Bereich wie sie auch für die Neuroblastoma Linie ermittelt worden sind. Einen relativ guten Wert zeigt das Experiment mit einem deutlichen A- und B- Typ Anteil im Signal. Die lässt sich durch eine bessere Abdeckung des Gates mit der Zelle beschreiben.

5.3.4.2 Zellen mit aktiven Ionenkanälen

Die Untersuchung der Kopplung von hippocampalen Neuronen konzentriert sich dabei analog auf den Einfluss der hohen Na⁺ und K⁺-Leitfähigkeit, sowie auf die mögliche Unterscheidung der A- und K-Typ K⁺-Ionenkanäle.

Tabelle 5.18 Experimentelle Parameter für das in Bild 5.36 durchgeführte Kopplungsexperiment.

Sensor-Typ n-Kanal FET	A_{Gate} [μm ²]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
	4×16	2.3	3	0.8
Zell-Typ Neuron	V_{RP} [mV] -60	$R_M^{\text{exp.}}$ [GΩ]	$C_M^{\text{exp.}}$ [pF]	A_M [cm ²]
	DIV 2	0.63	6.6	6.6×10 ⁻⁶
Patchmode <i>VC</i>	V_M^H [mV]	V_M^{Puls} [mV]	Abtastrate	Mittelung
	-90	40, 100	33 kHz	100 Zyklen

An diesem Neuron wird das folgende Kopplungsexperiment durchgeführt und die Ergebnisse in Bild 5.36 abgebildet. Das Neuron wird vom Haltepotential $V_M = -90 \text{ mV}$ einmal auf $V_M = 40 \text{ mV}$ und $V_M = 100 \text{ mV}$ depolarisiert, Bild 5.36 A1 und A2. Als

Reaktion auf die Depolarisation öffnen die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle und die charakteristischen Verläufe für einen K-Typ K^+ -Kanal B1 und B2 können beobachtet werden. Der schnell ansteigende K^+ -Strom vom A-Typ K^+ -Kanal ist in diesem Fall nicht zu finden. Die maximalen K^+ -Ströme liegen bei $I^K = 0.25$ nA und 0.57 nA. Damit kann aus den beobachtbaren K^+ -Strömen I^K die durchschnittliche spezifische Leitfähigkeit g_{FM}^K für K^+ für die zwei unterschiedlichen Spannungspulse berechnet werden. Mit einem Umkehrpotential von $E_K = -80$ mV und der Membranfläche A_M ergeben sich in beiden Fällen jeweils die durchschnittliche Leitfähigkeit von $g_{FM}^K = 0.35$ mS/cm².

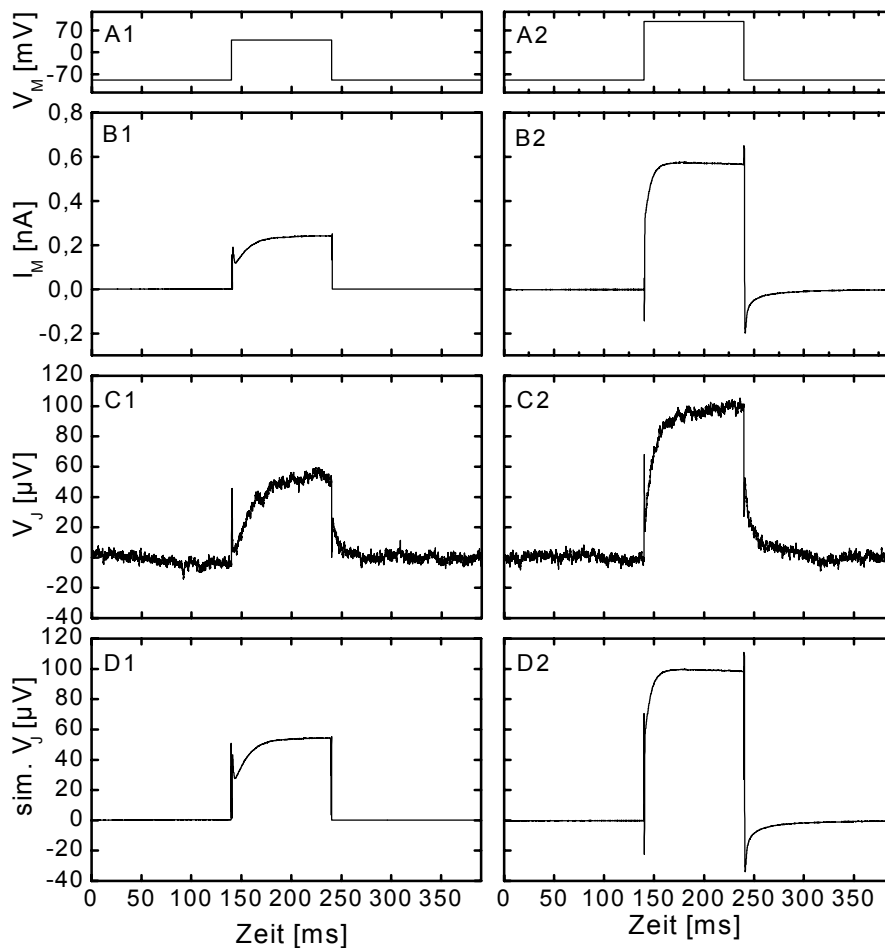


Bild 5.36: Extrazelluläre K^+ -Antwort eines hippocampalen Neurons (2 DIV, $V_{RP} = -60$ mV).

Der Verlauf der extrazellulären Signale in Bild 5.36 C1 und C2 bei konstantem Spannungspuls zeigt wie schon bei der Neuroblastoma Zelle SH-SY5Y den charakteristi-

schen langsamen, im Bereich von 0-5 μV startenden, Anstieg, der dann nach etwa 50 bis 100 ms einen maximalen Wert von $V_J = 54 \mu\text{V}$ und $V_J = 100 \mu\text{V}$ erreicht.

Aus der Simulation, der durch die Stimulationspulse erzeugten kapazitiven Spikes von $V_J = 50 \mu\text{V}$ und $V_J = 68 \mu\text{V}$ in Bild 5.36 C1 und C2, lassen sich die spezifischen Abdichtleitwerte zu $g_J = 14 \text{ S/cm}^2$ und zu $g_J = 15 \text{ S/cm}^2$ bestimmen. Die Simulation in Bild 5.36 D1 und D2 und die aus der Membranfläche und dem Membranwiderstand berechneten spezifischen Leckleitfähigkeit von $g_{FM}^L = 2.34 \times 10^{-4} \text{ S/cm}^2$ und $g_{FM}^L = 1.9 \times 10^{-4} \text{ S/cm}^2$ ergeben die Skalierungswerte jeweils zu $X_{JM}^L = 1$. Die niedrigen Werte für X_{JM}^L resultieren in den fehlenden ohmschen Anteilen im extrazellulären Signalverlaufs (Bild 5.36 C1+2).

Der Anstieg des Gatepotentials V_J kann somit allein durch den K^+ -Auswärtsstrom und den damit verbundenen Spannungsabfall über den Abdichtwiderstand erklärt werden. Durch die Simulation zeigt sich auch, dass die spezifische K^+ -Leitfähigkeit in der Zellmembran im Kontaktbereich stark erhöht sein muss. Der Skalierungsfaktor beträgt $X_{JM}^K = 17.5$, wodurch sich die Leitfähigkeit im Kontaktbereich auf $g_{JM}^K = 6.13 \text{ mS/cm}^2$ vergrößert.

Die folgenden Experimente an einen Neuron zeigen die Signaleinkopplung des Na^+ -Einwärtsstrom und den K^+ -Auswärtsstrom. An diesen Neuron wird anschließend ein Blockierungsexperiment durchgeführt, womit der K-Typ K^+ -Kanal mit TEA blockiert wird.

Das betrachtete Neuron (2 DIV, $V_{RP} = -55 \text{ mV}$) zeigt im VC Mode das spannungsabhängige Öffnen von Na^+ - und K^+ -Kanälen (Bild 5.37). Der maximale Na^+ -Strom von $I^{\text{Na}} = 0.8 \text{ nA}$ wird bei einem Membranpotential von $V_M = -10 \text{ mV}$ beobachtet. Die Höhe des K^+ -Stroms ist abhängig vom Membranpotential und liegt hier bei $I^K = 2 \text{ nA}$, für ein Potential von $V_M = 80 \text{ mV}$.

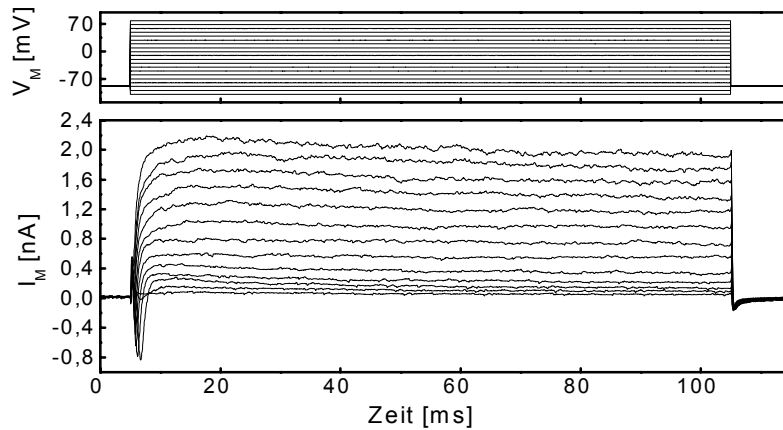


Bild 5.37: VC-Experiment: Hippocampales Neuron (2 DIV, $V_{RP} = -55$ mV).

Starke Anteile des A-Typ K^+ -Kanals sind in Bild 5.37 nicht zu erkennen. Nach dem schnellen Anstieg auf ein Maximum bis 2.2 nA, bei dem Spannungspuls auf $V_M = 80$ mV, fällt das Stromsignal langsam auf unter 2 nA bei Ende des Pulses. Dieser Verlauf des K^+ -Stroms stimmt mit Bild 5.28 tendenziell überein.

Tabelle 5.18: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.38 und Bild 5.39 durchgeführte Kopplungsexperiment.

Sensor-Typ p-Kanal FET	A_{Gate} [μm^2]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
	$2 \times 2 \times 16$	-2	-2	0.31
Zell-Typ Neuron	V_{RP} [mV] -55	$R_M^{\text{exp.}}$ [$\text{G}\Omega$]	$C_M^{\text{exp.}}$ [pF]	A_M [cm^2]
	DIV 2	1.6	7.8	7.8×10^{-6}
Patchmode VC	V_M^H [mV]	V_M^{Puls} [mV]	Abtastrate	Mittelung
	-90	-10	20 kHz	200 Zyklen

Die Beobachtung eines starken Na^+ -Stroms von $I^{\text{Na}} = 0.8$ nA wird zum Anlass genommen das erste Kopplungsexperiment mit einem Stimulationsspuls von $V_M = -90$ mV auf $V_M = -10$ mV durchzuführen. Der Puls (Bild 5.38 A) führt zum beobachteten Gesamtionenstrom I_M , der sich aus dem Na^+ - und K^+ -Strom zusammensetzt (Bild 5.38 B). Mit dem Na^+ -Strom von $I^{\text{Na}} = 0.8$ nA ergibt sich die spezifische Na^+ -Leitfähigkeit bei einem Membranpotential von $V_M = -10$ mV und einem Umkehrpotential von $E_{\text{Na}} = 60$ mV einen Wert von $g_{FM}^{\text{Na}} = 1.46$ mS/ cm^2 und mit $I^K = 0.24$ nA für die spezifische K^+ -

Leitfähigkeit ein Betrag von $g_{FM}^K = 0.44 \text{ mS/cm}^2$. Die spezifische Leckleitfähigkeit beträgt $g_{FM}^L = 8 \times 10^{-5} \text{ S/cm}^2$. Der durch den Stimulationspuls (Bild 5.38 A) ausgelöste und einwärtsgerichtete Na^+ -Strom erzeugt durch einen Spannungsabfall über den Abdichtwiderstand das in Bild 5.38 C gezeigte extrazelluläre Signal mit einer Amplitude von $V_J = 19 \mu\text{V}$ überlagert mit den kapazitiven Spikes des Stimulationspulses. Damit ist es nun möglich die Skalierungsfaktoren X_{JM}^L , X_{JM}^{Na} und X_{JM}^K aus der Simulation des extrazellulären Signals herzuleiten.

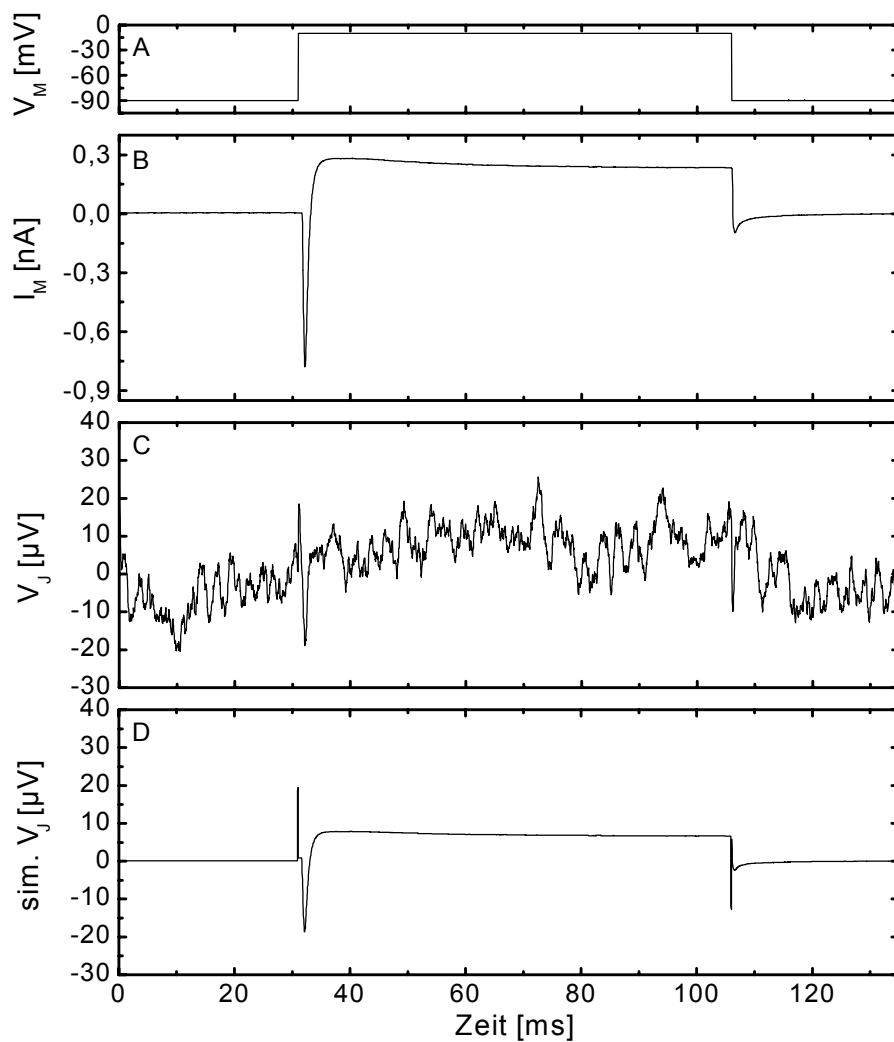


Bild 5.38: Extrazelluläres Na^+ -Signal des hippocampalen Neurons aus Bild 5.37.

Die Leckleitfähigkeit ist um den Faktor $X_{JM}^L = 2.8$ vergrößert, bei der Annahme von $V_J = 0.1 \mu\text{V}$ Signalhöhe für den ohmschen Anteil. Damit wird die Annahme unterstützt, dass der ohmsche Anteil nur einen sehr geringen Beitrag zum Verlauf von V_J hat. Aus

der Simulation in Bild 5.38 wird der spezifische Abdichtleitwert auf $g_J = 23 \text{ S/cm}^2$ bestimmt. Der Skalierungswert für X_{JM}^{Na} und X_{JM}^K wird durch die Simulation auf 4.6 festgesetzt. Damit erhöht sich die spezifische Leitfähigkeit für Na^+ auf $g_{JM}^{Na} = 6.7 \text{ mS/cm}^2$ und für K^+ auf $g_{JM}^K = 2 \text{ mS/cm}^2$ im Kontaktbereich der Zelle.

Um die elektrophysiologische Funktionsfähigkeit des hippocampalen Neurons auf dem Doppelgate nach dem Kopplungsexperiment nachzuweisen wird ein Aktionspotential im *Current-Clamp* Modus durch einem Strompuls von 0.1 nA ausgelöst worden. Nach dem *Current-Clamp* Experiment soll die Zelle nun mit einem Spannungspuls auf ein Membranpotential von $V_M = 80 \text{ mV}$ depolarisiert werden und das extrazelluläre Antwortsignal aufgezeichnet werden. Dann werden durch Zugabe von TEA zur extrazellulären Badlösung die K-Typ K^+ -Kanäle blockiert und durch den gleichen Stimulationsimpuls die Veränderungen in der Kopplung beobachtet.

Bild 5.39 B1 zeigt direkt bei der Depolarisation einen relativ geringen Anteil von A-Typ K^+ -Ionenstrom im Stromsignal. Der größere Anteil des gemessenen Membranstroms wird durch den K-Typ K^+ -Strom gebildet. Mit einem Umkehrpotential von $E_K = -80 \text{ mV}$ und dem K-Typ K^+ -Strom von $I^K = 1.69 \text{ nA}$ dem Membranpotential von $V_M = 80 \text{ mV}$ beträgt die Leitfähigkeiten von K^+ $g_{EM}^K = 1.35 \text{ mS/cm}^2$. Dabei wird der K-Typ K^+ -Strom zum Ende des Stimulationspulses gemessen um einen Beitrag von dem A-Typ K^+ -Ionenstrom zu vermeiden. Ein wichtiges Ergebnis ist, dass das extrazelluläre Signal V_J zu Beginn der Depolarisation einen entgegengesetzten zeitlichen Verlauf zum gemessenen Membranstrom zeigt (Bild 5.39 B1,C1). Daraus lässt sich schließen, dass der A-Typ K^+ -Ionenstrom keine Auswirkung auf das extrazelluläre Signal hat. So dass die beobachtete Verlauf von V_J nur auf den K-Typ K^+ -Ionenstrom zurückzuführen ist, der auch bei den Neuroblastomazellen für das extrazelluläre Signal verantwortlich ist.

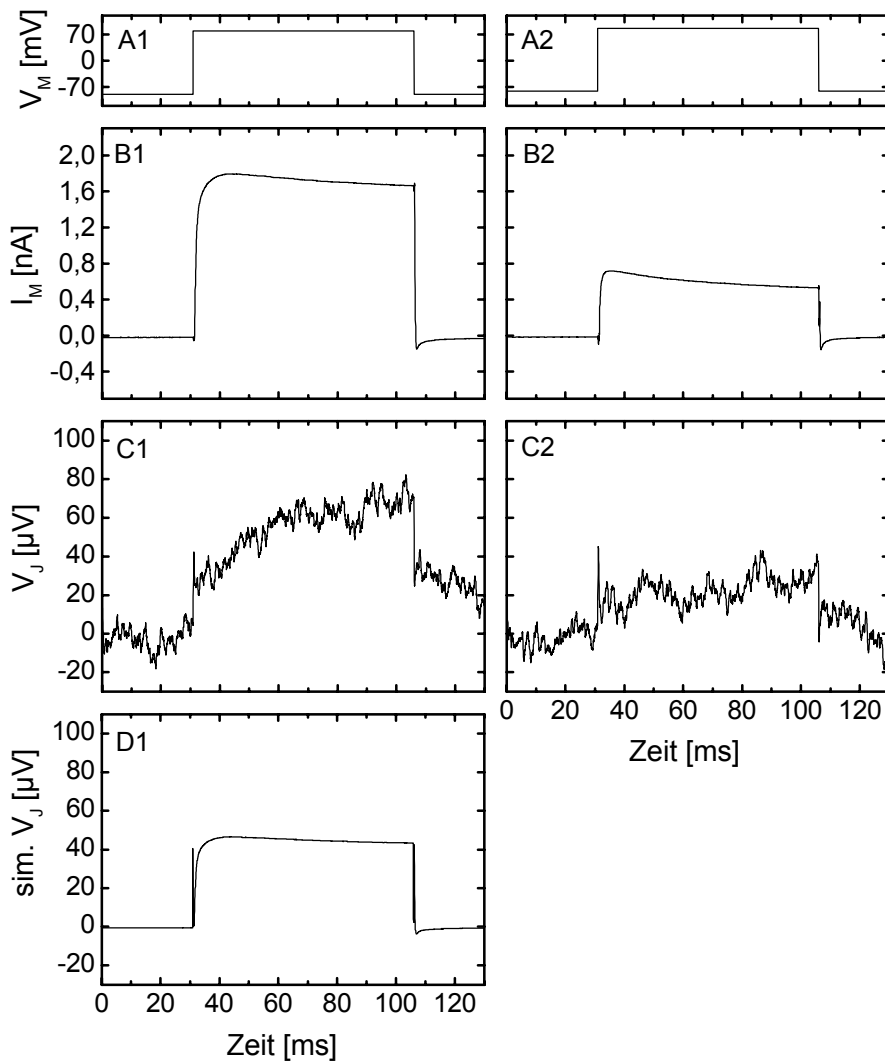


Bild 5.39: Blockierung der K-Typ K^+ -Kanäle durch TEA: linke Seite ohne TEA; rechte Seite nach Zugabe und Blockierung der K-Typ K^+ -Kanäle durch TEA.

Durch Zugabe von TEA (Bild 5.39 B2) geht der K-Typ K^+ -Strom auf 0.5 nA zurück. Nicht betroffen von der TEA Zugabe ist der Anteil des A-Typ K^+ -Strom zu Beginn der Depolarisation. Durch die Blockierung K-Typ K^+ -Kanäle wird der A-Typ K^+ -Strom noch etwas deutlicher beobachtet. Die Reaktion von V_j auf die Blockierung ist in (Bild 5.39 C2) dargestellt. Das Neuron ist immer noch in Kontakt mit dem Gate, dies zeigt sich durch die kapazitiven Anteile im extrazellulären Signal. Zum anderen ist deutlich der Rückgang des extrazellulären Signals erkennbar. Dies lässt sich durch den blockierten Einstrom des K-Typ K^+ -Stroms in den Kontaktbereich beschreiben.

Tabelle 5.19: Ergebnisse aus den Experimenten mit hoher Ionenkanalleitfähigkeit im Kontaktbereich.

Neurone	g_J [S/cm ²]	X_{JM}^L	X_{JM}^{Na}	X_{JM}^K
K ⁺	14, 15	1	—	17.5
Na ⁺ K ⁺	23	2.8	4.6	4.6

Die in der Tabelle 5.17 und Tabelle 5.19 dargestellten Werte für die spezifische Abdichtleitfähigkeit liegen in dem Bereich wie sie für die beiden zuvor untersuchten Zell-Linien ermittelt worden sind. Extrazelluläre Kopplungsexperimente von [Vassanelli, 99] an hippocampalen Neuronen zeigen Werte von $g_J = 1$ S/cm². Die verschiedenen Werte können durch eine andere Oberflächenmodifikation sowie durch eine andere Messmethode für g_J erklärt werden. In dieser Arbeit wird Laminin zur Anbindung der Neurone an die SiO₂ Oberfläche der Sensoren eingesetzt. Im Gegensatz dazu verwendet [Vassanelli, 99] Poly-L-Lysin zur Zelladhäsion verwendet. Die Prozesse zur Oberflächenmodifikation mit Zelladhesiven haben eine große Auswirkung auf das Verhalten der spezifischen Abdichtleitfähigkeit g_J . Daraus können sich selbst schon unterschiedliche Beträge für g_J ergeben. Auch die in [Vassanelli, 99] eingesetzte Bestimmungsmethode für g_J unterscheidet sich von der in der dieser Arbeit eingesetzten Methode. In [Vassanelli, 99] wird mit dem Zell-Transistor System eine Impedanzmessung durchgeführt, wobei das Membranpotential moduliert wird und das extrazelluläre Signal detektiert wird. Mittels der Übertragungsfunktion wird dann g_J bestimmt. In dieser Arbeit wird der kapazitive Signalanteil eines jeden Kopplungsexperiments zur Bestimmung von g_J ausgenutzt. Aus der Proportionalität zwischen V_J und dV_M/dt wird g_J berechnet. Aufgrund der Mittelung aller Einzelsignale wird, durch etwaige Streukapazitäten bzw. apparativ bedingte Abweichungen in der Aufzeichnung, bei den Experimenten ein zu großes g_J bestimmt. Die Bestimmung der spezifischen Ionenkanalleitfähigkeit wird von [Vassanelli, 99] nur mit K⁺-Ionenströmen untersucht. Dabei zeigt sich eine um den Faktor $X_{JM}^K = 12$ erhöhte spezifische K-Typ K⁺-Leitfähigkeit im Kontaktbereich. In dieser Arbeit ergibt sich für das Kopplungsexperiment bei dem nur K-Typ K⁺-Ströme beobachtet werden ein Skalierungswert von $X_{JM}^K = 17.5$ für die spezifischen Ionenleitfähigkeit im Kontaktbereich. Der Unterschied kann neben einem zu großen g_J auch durch die unterschiedliche Oberflächenbeschichtung beider Systeme hergerufen werden. Auch die hier beobachtete Na⁺-Abhängigkeit des extrazellulären Signals weist auf eine

Erhöhung der Na^+ -Ionenkanäle hin. Die spezifische Na^+ -Leitfähigkeit ist mit $X_{JM}^{\text{Na}} = 4.6$ ebenfalls erhöht. Ein wichtiges Ergebnis ist es auch, dass es spannungsgesteuerte Ionenkanäle gibt, wie in diesem Fall der A-Typ K^+ -Kanal, dessen Ionenstrom das extrazelluläre Signal im Kontaktbereich nicht beeinflusst. Dies führt zur Annahme, dass diese Kanalart sich nicht oder nur in sehr geringer Anzahl vertreten ist. Die Kopplungsexperimente zeigen aber auch deutlich das der beobachtete langsame positive Verlauf des extrazellulären Signals V_j unmittelbar durch den K^+ -Strom des TEA sensitiven K-Typ K^+ -Kanals verursacht wird. Damit zeigt der TEA sensitive K-Typ K^+ -Kanal bei den Neuronen das gleiche Verhalten wie der K^+ -Kanal bei der Neuroblastomazell-Line SH-SY5Y.

5.4 Kardiomyozyten

Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) besitzen sowohl morphologische als auch elektrophysiologische Eigenschaften, die sie für die Kopplungsexperimente mit den Sensoren interessant machen. Einzelne Zellen, die aus dem Herzgewebe von Ratten präpariert werden, haben durchschnittliche Größen von $40 \times 60 \mu\text{m}^2$. Diese Größe ist von Vorteil bei allen Kopplungsmessungen, weil sie durch ihre Größe die Gates oder Elektroden im Idealfall ganz abdecken können. Die spannungsgesteuerten Kanäle zeigen wie bei den hippocampalen Neuronen hohe Ionenströme. Diese Eigenschaften macht sie für die Einzelzellexperiment im *Voltage-Clamp* Modus zu einem interessanten Zellsystem. Eine besonders interessante Eigenschaft ist die Ausbildung von elektrischen Verbindungen, den gap-junctions. Über diese Verbindungen werden elektrische Stimulationen von Zelle zu Zelle ausgetauscht, die zur Ausbildung von Aktionspotentialen und der Kontraktion des Zellgewebes führen können. Diese Eigenschaft wird bei Kopplungsexperimenten im *Current-Clamp* Modus mit konfluenten Zellmonolagen ausgenutzt. Dabei verbinden sich die Kardiomyozyten zu einer Monolage elektrisch verbundener Zellen auf den Sensoroberflächen. Dabei kann auf eine zusätzlich externe Stimulation durch eine Patch-Clamp Elektrode verzichtet werden. Diese Stimulation wird von sog. Pacemaker-Zellen übernommen. Gleichzeitig kann sich durch diese elektrische Verbindung der Zellen untereinander die Abdichtung des Sensorfelds und auch die Amplitude des extrazellulären Signals erhöhen.

5.4.1 Präparation der Kardiomyozyten

Die Präparation der Kardiomyozyten erfolgt zum einen von neonatalen Ratten mit einem Alter von 1-3 Tagen sowie von embryonalen Ratten des Embryonaltages E18 der CD-Rattenart.

Embryonal Präparation

Die Herzen von 8-12 Embryonen werden steril entnommen und in Ca/Mg –freien HBSS (Hanks balanced salt solution, GibcoBRL) gesammelt. Nach dem das Blut durch mechanisches Pumpen des Herzens entfernt wurde, wird das Gewebe mit einem Skalpel zerkleinert und in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und 3 mal mit eiskaltem Ca/Mg –freien HBSS gewaschen. Der Puffer wird anschließend ersetzt durch 0.05 % Trypsin (Sigma), gelöst in Versene Puffer (GibcoBRL) und für 20 min bei 37 °C in feuchter Atmosphäre bei 5 % CO₂ Gehalt inkubiert. Danach wird der Überstand verworfen, und für die enzymatische Dissoziation DNase Typ II Lösung (10.000 Einheiten/ml, Sigma) zur Zellsuspension hinzugegeben. Nach 2 min wird zusätzlich 0.025 %-ige Trypsin/Versene Lösung hinzugefügt und für 20 min inkubiert. Der Überstand, in dem sich die vereinzelt Zellen befinden wird dann gesammelt und in HEPES Puffer Ham's F10 (GibcoBRL) gegeben, welcher 0.5 % einer Insulin-, Transferrin-, Selenit-Lösung (IST, GibcoBRL) und 25 % fötales Rinderserum (FCS, GibcoBRL) enthält. Die Zellsuspension wird für 5 min bei 1500 Umdrehungen/min zentrifugiert. Danach wird der Überstand verworfen und das abgesetzte, noch nicht dissoziierte Gewebe in eiskaltem Ham's F10 mit 0.5 %-igem ITS und 10 %-igem FCS resuspendiert. Die Schritte zur erneuten enzymatischen Dissoziation werden so oft wiederholt, bis alles Gewebe dissoziiert ist. Die endgültige Zellsuspension wird gesammelt und in Zell-Kulturflaschen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Da die Fibroblasten-Zellen schneller adhäreren als Kardiomyozyten erhält man nach dem Ausspülen eine Zellsuspension mit einer erhöhten Anzahl von Herzzellen, wobei die Fibroblasten vermehrt am Boden der Kulturflasche zurückbleiben. Anschließend wird die Zellkonzentration mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Konzentration eingestellt.

Neonatal Präparation

Unterschiede zur embryonalen Präparation liegen hauptsächlich in der Dissoziation des Herzmuskelgewebes. Das Gewebe von neonatalen Ratten ist aufgrund der fortgeschrittenen Entwicklung deutlich fester, als das Herzgewebe embryonaler Ratten. Hier wird 0.05 % -iger Versene Puffer verwendet und die Zell-Lösung für 4 min bei 37°C im Wasserbad gerührt. Die enzymatische Dissoziation entspricht der obigen und wird

insgesamt 4 mal durchgeführt. Die nächsten Schritte folgen denen der embryonalen Präparation.

Die gereinigten FETs und EGEs werden in 70 %-igem Ethanol aufbewahrt. Vor der Belegung des Sensors mit Zellen wird das Ethanol entfernt und die Kulturbereiche 3 mal mit sterilem Milli-Q Wasser gespült. Die Oberflächenmodifikation der FET und EGE Arrays erfolgt mit Fibronectin. Dazu werden auf die aktiven Oberflächen der Arrays jeweils 20 μl einer wässrigen Fibronectin Lösung 25 $\mu\text{g/ml}$ gegeben und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wird die überstehende Fibronectin Lösung entfernt und die Arrays 3 mal mit sterilem Wasser gespült. Die Arrays werden danach mit der Zellsuspension besetzt und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach werden die Kulturbereiche der EGE und FET mit vorgewärmtem Kulturmedium Ham's F10 mit 3 % igem FCS aufgefüllt.

5.4.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der Kardiomyozyten

Die Aktionspotentiale der Kardiomyozyten zeigen für den zeitlichen Verlauf des Membranpotentials V_M ein charakteristisches Aussehen. Zusätzlich zu den wichtigen Ionenkanälen wie Na^+ und K^+ , die für die Neuroblastoma und hippocampalen Neuronen zur Ausbildung der Aktionspotentiale erforderlich sind, spielt bei den Herzmuskelzellen der Ca^{2+} -Kanal eine entscheidende Rolle.

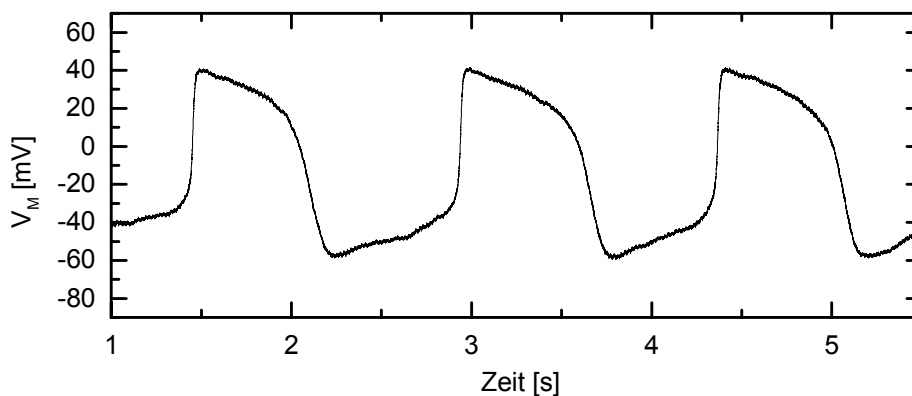


Bild 5.40: Herzmuskelzellen zeigen einen charakteristischen Verlauf der Aktionspotentiale ($V_{RP} = -50 \text{ mV}$, 1 DIV). Deutlich ist der Plateaubereich zu erkennen.

Bild 5.40 zeigt die Aktionspotentiale einer Herzmuskelzelle nach 1 DIV mit einem Ruhepotential von $V_{RP} = -50$ mV.

Nach [Brown, 97] wird die Auslösung eines Aktionspotentials durch einen schnellen Einstrom von Na^+ eingeleitet und ist vergleichbar mit den Na^+ -Strom bei der Depolarisation von hippocampalen Neuronen und Neuroblastomazellen. Zusätzlich kommt es dann bei einem positiveren Membranpotential zum Einstrom von Ca^{2+} . Dieser zeitlich verlangsamte Ca^{2+} -Einstrom wirkt sich teilweise auf die weitere Depolarisierung der Zelle aus. Hauptsächlich hat dieser Einstrom von Ca^{2+} die Aufgabe den zusätzlichen Ca^{2+} -Einstrom vom Sarcoplasmatischen Reticulum in das Zellinnere (Cytosol) einzuleiten, welcher dann zur Kontraktion der Herzmuskelzelle führt. Diesem Ca^{2+} -Einstrom steht ein Auswärtsstrom von K^+ gegenüber. Dieser Vorgang führt dann zur Ausbildung des Plateaubereichs im Aktionspotential. Nach dem der Ca^{2+} -Einstrom sich reduziert hat überwiegt die Repolarisation der Herzzelle durch den K^+ -Auswärtsstrom.

Das *Voltage-Clamp* Experiment (Bild 5.41) an der gleichen Zelle liefert für Na^+ und Ca^{2+} den erwarteten hohen Ionenstrom. Für den K^+ -Verlauf kann durch die unvollständige Kompensation keine Aussage getroffen werden.

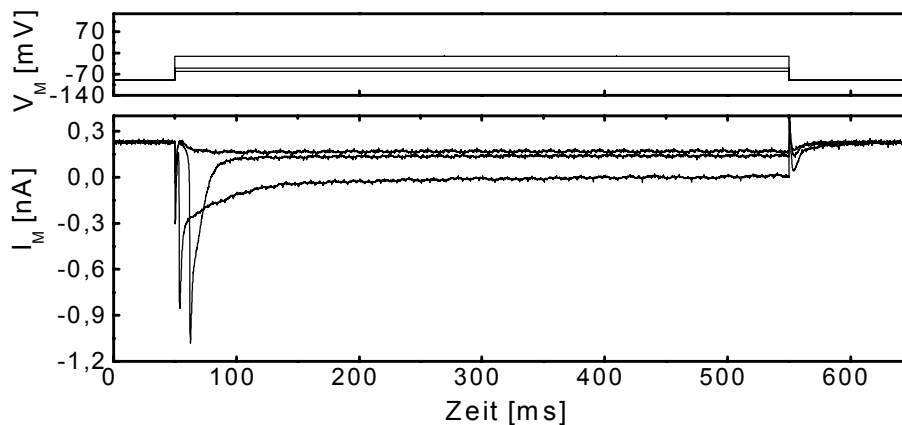


Bild 5.41: *Voltage-Clamp* Messung an der gleichen Herzzellen wie in Bild 5.40.

Die Unterscheidung der Na^+ und Ca^{2+} Ströme kann durch das angelegte Membranpotential V_M erfolgen. Schnelle Na^+ -Ströme erfolgen unmittelbar nach dem Stimulationspuls, wogegen der Ca^{2+} -Strom verspätet einsetzt.

5.4.3 Entwicklung der Kardiomyozyten auf den Sensoren

Für die Einzelzellexperimente muss eine genügend geringe Zelldichte gewählt werden, damit die Zellen keinen geschlossenen Zellrasen ausbilden können. Es zeigt sich, dass dafür eine Zelldichte von etwa 1.1×10^5 Zellen/cm² auf dem Sensor ideal ist. Im folgenden Experiment wurde ein 20µl Tropfen einer Zellsuspension mit 0.375×10^6 Zellen/ml auf die FET-Oberfläche gegeben. Damit beträgt die Dichte auf der Oberfläche 1.1×10^5 Zellen/cm² (Bild 5.42).

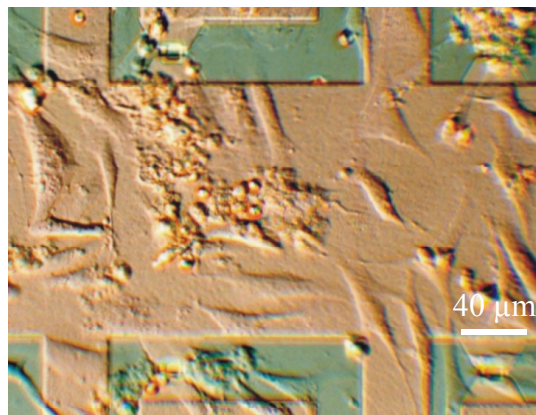


Bild 5.42: Kardiomyozyten liegen mit geringer Dichte für Einzelzellexperimente auf dem FET Array.

Durch die geringere Dichte liegen die Kardiomyozyten vereinzelt auf der Oberfläche. Stellenweise kommt es dennoch zur Ausbildung von elektrischen Verbindungen zwischen mehreren Zellen. Durch die Ausbildung von gap-junctions sind die Kardiomyozyten elektrisch miteinander verbunden und können sich gleichzeitig sichtbar kontrahieren. Durch die geringere Dichte reduziert sich auch die Wahrscheinlichkeit, dass eine Herzmuskelzelle auf einem Gate oder einer Elektrode zu liegen kommt. Eine Erhöhung der Zelldichte in der Suspension erhöht die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung eines Zellrasens. Deshalb ist die Zelldichte von 0.375×10^6 Zellen/ml eine optimale Dichte zur Durchführung des Einzelzellexperimente. Die Ausbildung eines ganzen Zellrasens findet man bei einer Dichte von 1.5×10^6 Zellen/ml in der Zellsuspension.

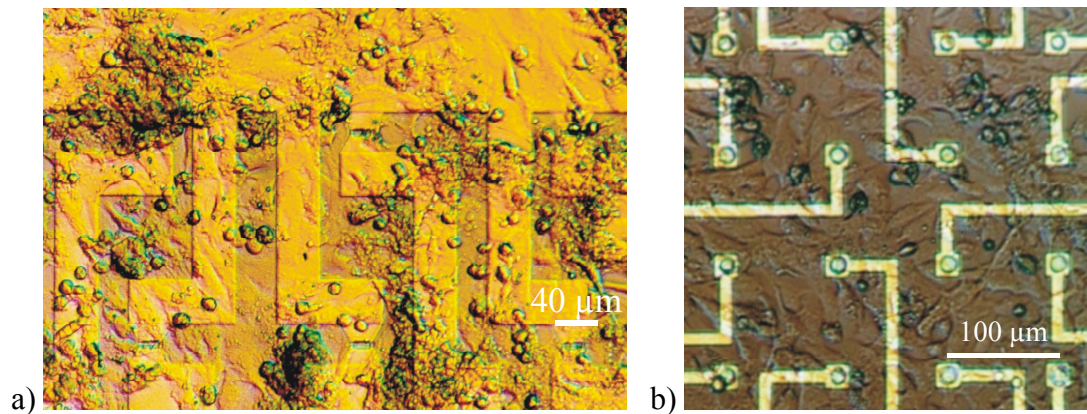


Bild 5.43: Kardiomyozyten bilden bei größer Dichte von 1.5×10^6 Zellen/ml einen Zellrasen aus. a) auf einer FET bzw. b) einer EGE Oberfläche.

Bild 5.43 zeigt in a) und b) die Ausbildung eines solchen Zellrasens auf den Oberflächen von FET und EGE Arrays.

5.4.4 Kopplungsexperimente mit konfluenten Zellen

Bei den Experimenten mit Kardiomyozyten die sich zu einem großflächigen Zellrasen zusammenschließen können, steht die Diskussion des extrazellulären APs gemessen mit den EGE Arrays im Vordergrund. Durch eine hohe Zelldichte von 1.5×10^6 Zellen/ml beim Aussetzen auf die Arrays erreicht man die Ausbildung von elektrischen Kontakten zwischen den Herzmuskelzellen.

5.4.4.1 Korrelation zwischen Membranpotential V_M und extrazellulären Signal V_J

Im *Current-Clamp* Modus wird die Membran der Herzmuskelzelle mit die Spitze einer Glaselektrode durchstoßen. Diese Glaselektrode unterscheidet sich von der Patch-Clamp Elektrode durch eine lange und schmale Spitze, die der Kontraktionsbewegung der Muskelzelle folgen kann ohne abzubrechen.

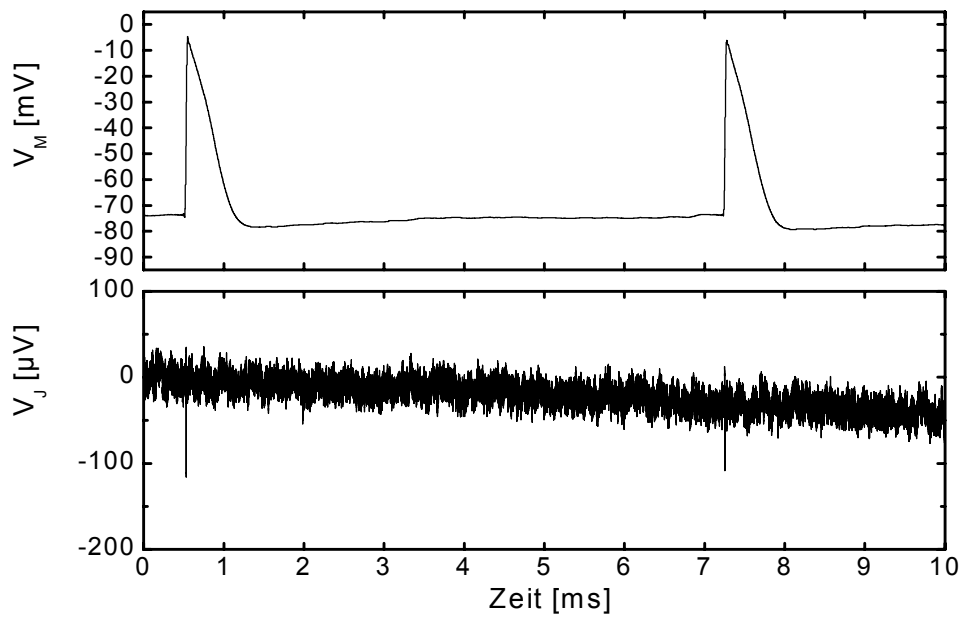


Bild 5.44: Membranpotential V_M und extrazelluläres Signal V_J einer embryonalen Kardiomyozyte (3 DIV).

Die Glaselektrode ist mit einer 3 M KCl Lösung gefüllt und hat einen Öffnungswiderstand von 60 bis 100 M Ω . Bild 5.44 zeigt eine solche Kopplungsmessung mit einer embryonalen Herzmuskel-Zelllayer (3DIV) und einer Goldelektrode ($\varnothing = 20 \mu\text{m}$). Der Verlauf des Aktionspotentials V_M ist deutlich korreliert mit dem Auftreten von extrazellulären Signalen V_J . Die Amplituden der Signale liegen hier bei etwa 150 μV .

5.4.4.2 Kopplung mit Topographieelektroden

In Bild 5.45 ist das extrazelluläre Signal von Herzmuskelzellen (Zellrasen, 5DIV) dargestellt, abgeleitet von einer Goldelektrode. Der Unterschied zu den anderen in dieser Arbeit verwendeten planaren Elektroden liegt hier in einer Erhöhung der Elektrodenfläche.

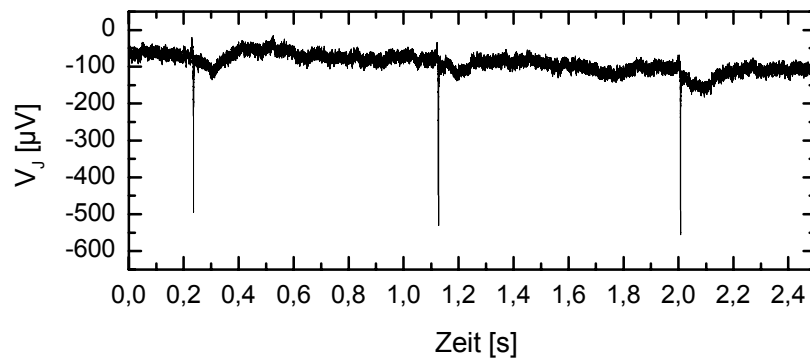


Bild 5.45: Extrazelluläres Signal von Herzzellen auf einem EGE Array mit erhöhter Elektrode mit 5 Tagen in Kultur.

Bei dem im Experiment verwendeten EGE hat die Elektrodenoberfläche die gleiche Höhe wie die Isolationsschicht. Die mit dieser Elektrode gemessenen extrazellulären Signale besitzen Amplituden im Bereich von 400 bis 500 μV . Diese Signalhöhen liegen deutlich über den durchschnittlichen Signalen, die mit planaren Elektroden aufgezeichnet werden können. Bei gleicher Zellpräparation und Oberflächenmodifikation von planaren und strukturierten EGEs, deuten diese höheren Signale bei Verwendung der Topographie-Elektroden auf eine verringerte Abdichtleitfähigkeit g_J hin.

5.4.4.3 Multisite Kopplung

Die Anordnung der Goldelektroden in einer 8x8 Matrix ermöglicht die Aufzeichnung von Aktionspotentialen mehrerer Zellen gleichzeitig. Die im Bild 5.46 a) dargestellten extrazellulären Signale stammen von Herzmuskelzellen, die auf Elektroden mit einem Durchmesser von $\varnothing = 20 \mu\text{m}$ für 3 Tage mit einer hohen Zelldichte (1.5×10^6 Zellen/ml) kultiviert worden sind.

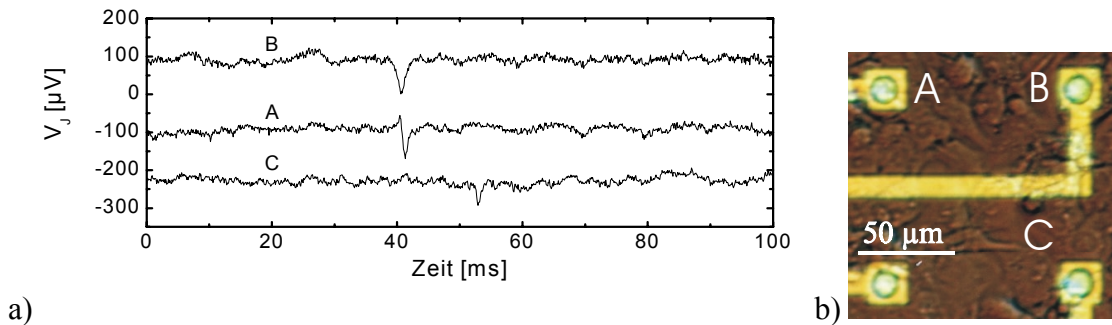


Bild 5.46: Signaleinkopplungen von Herzmuskelzellen auf verschiedenen Goldelektroden (a). Die Verläufe sind zur besseren Darstellung entlang der y-Achse verschoben. Die Elektroden A, B und C zeigen die Orte der Signaldetektion (b).

Das verwendete Elektroden Array hat einen Abstand von $100\mu\text{m}$ (Bild 5.46 b). Das erste Signal wird auf der Elektrode B detektiert nachfolgend auf A und bei C. Es ist mit den EGEs möglich auf mehreren Elektroden gleichzeitig extrazelluläre Signale zu detektieren

5.4.4.4 Signaltypen des extrazellulären Aktionspotentials

Bei den Kopplungsexperimenten mit den Herzmuskelzellen treten verschiedene zeitliche Verläufe der extrazellulär gemessenen Aktionspotentiale auf. Die mit den EGEs experimentell beobachtbaren Signaltypen sind in Bild 5.48 dargestellt.

Die zur Simulation der jeweiligen Kopplung notwendigen Größen wie der zeitliche Verlauf des Membranpotential V_M und die damit verknüpften spezifischen Ionenleitfähigkeiten von Na^+ , K^+ und Ca^{2+} kann durch die Simulationssoftware Oxsoft HEART vers. 4.8 berechnet werden in der verschiedene Herz-Modellzellen durch [DiFrancesco, 85] realisiert sind. Zur Simulation wird ein Model einer Ventrikel Herzzelle [Earm, 90] herangezogen. Dabei werden für die maximalen spezifischen Leitfähigkeiten folgende Werte angenommen: $g_M^{\text{Na}} = 18.75 \text{ mS/cm}^2$, $g_M^{\text{K}} = 7.5 \text{ mS/cm}^2$ und $g_M^{\text{Ca}} = 8 \text{ mS/cm}^2$. Im *Current-Clamp* Modus beträgt der Stromstimulationspuls $I^{\text{Puls}} = 6 \text{ nA}$ für 2ms. Die Membrankapazität für die Simulation beträgt $C_M = 200\text{pF}$. Die gewählten Größen ergeben das Aktionspotential V_M und die zeitlichen Verläufe für die Ionenströme wie im Bild 5.47 dargestellt.

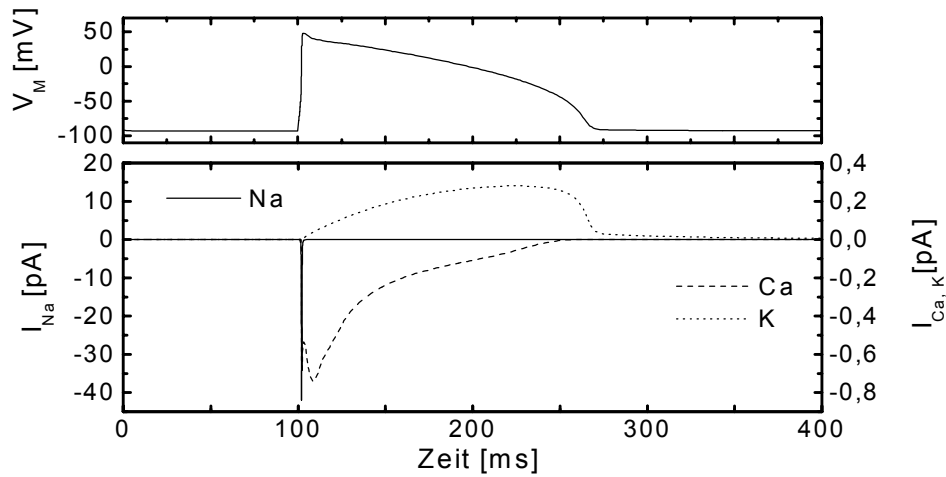


Bild 5.47: Aktionspotential einer Ventrikel Modellzelle und die dabei fließenden Ionenströme I^i , mit $i = \text{Na}^+$, K^+ und Ca^{2+} . Erstellt mit der Oxsoft HEART Simulationssoftware Vers. 4.8, [Earm, 90], [DiFrancesco, 85].

Tabelle 5.20: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.40 durchgeführte Kopplungsexperiment.

Sensor-Typ	\varnothing [μm]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
Au-EGE	20, 30	0	0.340	1
Zell-Typ	DIV		Abtastrate	Mittelung
Herzmuskel	3, 4		10 kHz	—

Im Bild 5.48 sind die beobachtbaren Signalverläufe dargestellt. Dabei kann man den extrazellulären Verlauf durch zwei Teilverläufe beschreiben. Der positive starke Anstieg (spike) am Anfang und einen langsameren Verlauf im Anschluss.

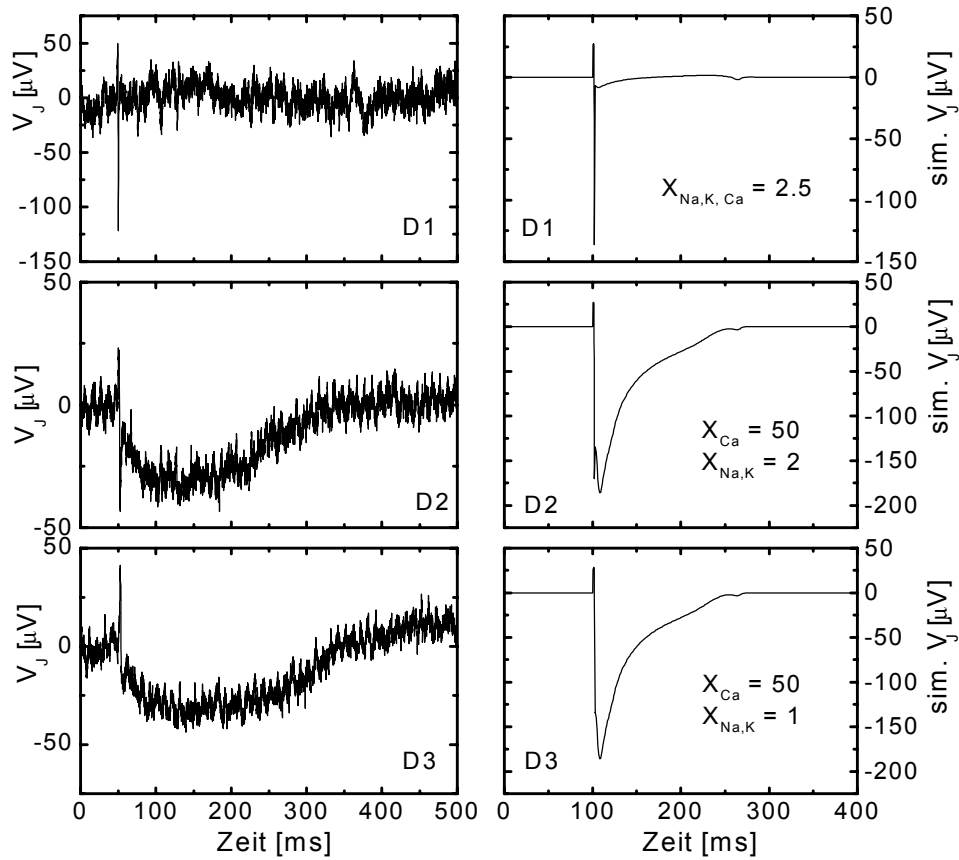


Bild 5.48: Charakteristische Signaltypen von Herzmuskelzelle aufgenommen mit EGEs (links), [Krause, 2000 a]. Simulation der Signale durch skalierte Ionenströme im Kontaktbereich (rechts).

Die Charakterisierung und Klassifizierung der extrazellulären APs mit den Bezeichnungen D1-D3 werden in [Sprössler, 99] mit p-Kanal FET durchgeführt. Die Signale mit den hier verwendeten EGEs lassen sich ebenfalls mit dem gleichen Modell simulieren. Zur Simulation der Kopplung wird $g_J = 1 \text{ S/cm}^2$ gewählt.

$$g_J V_J = c_M \frac{dV_M}{dt} + \sum_{i=Na^+, K^+, Ca^{2+}} X^i i^i \quad (5.7)$$

In Bild 5.48 sind die verwendeten Skalierungswerte der einzelnen Ionenströme angegeben. Der Typ D1 entsteht in der Simulation bei der Skalierung aller spezifischen Ionenleitwerte mit dem Faktor $X_{JM}^i = 2.5$. Der Typ D2 wird durch die Skalierung der Na^+ - und K^+ -Leitfähigkeiten mit dem Wert $X_{JM}^{Na,K} = 2$ und einer stark erhöhten Ca^{2+} -Leitfähigkeit mit $X_{JM}^{Ca} = 50$ erzeugt. Der Typ D3 entsteht durch Reduzierung der Na^+ - und K^+ -Leitfähigkeiten gegenüber dem D2-Typ mit dem Skalierungsfaktor $X_{JM}^{Na,K} = 1$

und der Erhöhung von X_{JM}^{Ca} . Die Typen D2 und D3 können durch die Simulation auf erhöhten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle aus dem Kontaktbereich erklärt werden. Die positiven Spitzen im Signalverlauf können durch den Na^+ -Stimulationsstrom über die gap-junctions benachbarter Herzmuskelzellen erklärt werden.

5.4.4.5 Hohe K^+ -Ionenleitfähigkeit im Kontaktbereich

Die zuvor beschriebenen charakteristischen extrazellulären Kopplungstypen lassen sich im negativen Bereich durch die Skalierung des Ca^{2+} -Ionenstroms darstellen. Das folgende Experiment beschreibt eine neue Signalform des extrazellulären Aktionspotentials.

Tabelle 5.21: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.49 durchgeführte Kopplungsexperiment.

Sensor-Typ	A_{Gate} [μm^2]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
n-Kanal FET	$2 \times 2 \times 16$	2.4	3	0.89
Zell-Typ	DIV		Abtastrate	Mittelung
Herzmuskel	5		40 kHz	—

Bild 5.49 zeigt extrazelluläre Aktionspotentiale von Herzmuskelzellen (5DIV) gemessen mit einem n-Kanal FET.

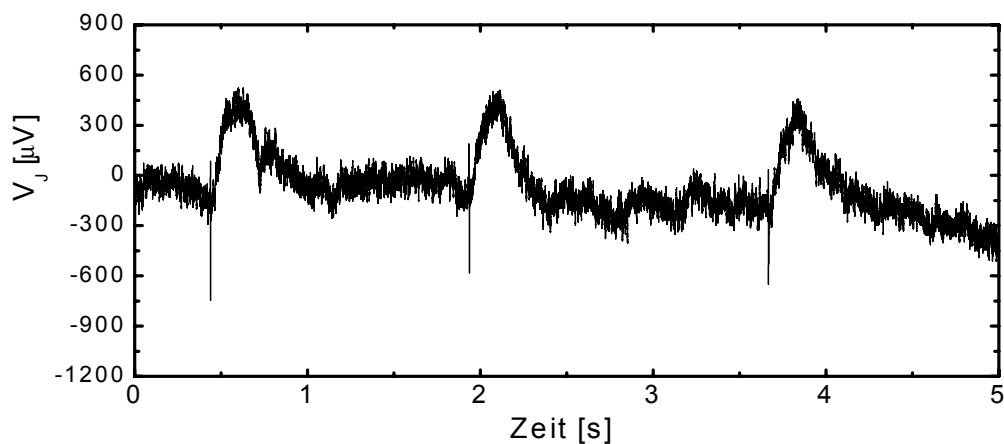


Bild 5.49: Extrazelluläres Signal einer Herzmuskelzelle (5DIV) aufgezeichnet mit einem Doppelgate eines n-Kanal FET Arrays.

Eine Darstellung eines einzelnen Signals als Ausschnitt von Bild 5.49 zeigt Bild 5.50 A). Das extrazelluläre Signal hat eine Gesamtamplitude von $V_J = 1.1$ mV. Das Signal zeigt deutlich den positiven Anstieg zu Beginn und fällt nach dem Erreichen eines Wertes von $300 \mu\text{V}$ sofort auf $500 \mu\text{V}$ ab. Dieser erste Bereich des Signals korreliert mit dem D1-Typ. Danach steigt das Signal aber über eine Zeit von $t = 400$ ms in den positiven Bereich, um dann wieder auf den Ausgangswert zurückzugehen. Der Maximalwert liegt bei $600 \mu\text{V}$.

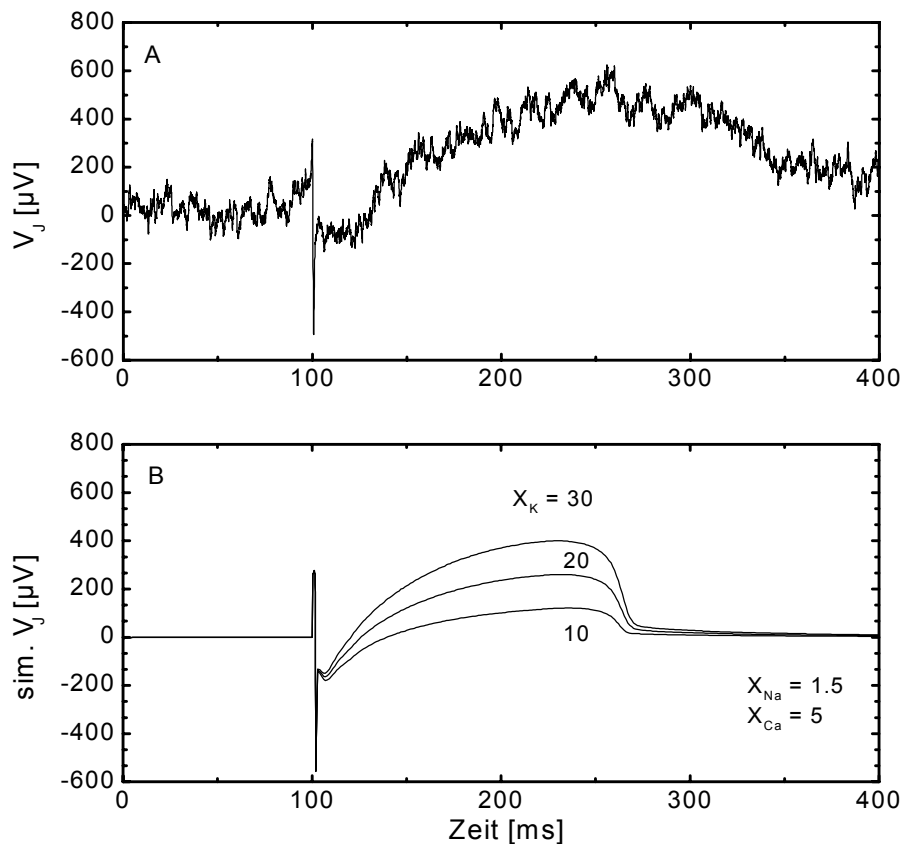


Bild 5.50: Einzelsignal des K^+ dominierten Kopplungstyps D4. Simulation der Signalf orm mit den berechneten Ionenströmen der Oxsoft Heart Simulationssoftware vers. 4.8.

Bild 5.50 B zeigt das simulierte Signal, wobei nur durch eine Skalierung der spezifischen Ionenleitfähigkeit des K^+ -Kanals die experimentellen Ergebnisse beschrieben werden können. Dabei wird ein niedriges g_J angenommen.

5.4.4.6 Vergleich der Signale gemessenen mit FET und EGE

Im Vergleich mit den extrazellulären Aktionspotentialen, die mit FETs gemessen wurden [Sprössler, 99], zeigen die mit den EGEs aufgezeichneten Signale nur geringe Unterschiede. Einer der wesentlichen Unterschiede zwischen den Detektoren besteht in der höheren Elektrodenkapazität gegenüber der Gatekapazität. Die nachfolgende Simulation soll zeigen, ab welcher spezifischen Elektrodenkapazität c_{EI} sich Änderungen im extrazellulären Signal zu erwarten sind (Bild 5.51).

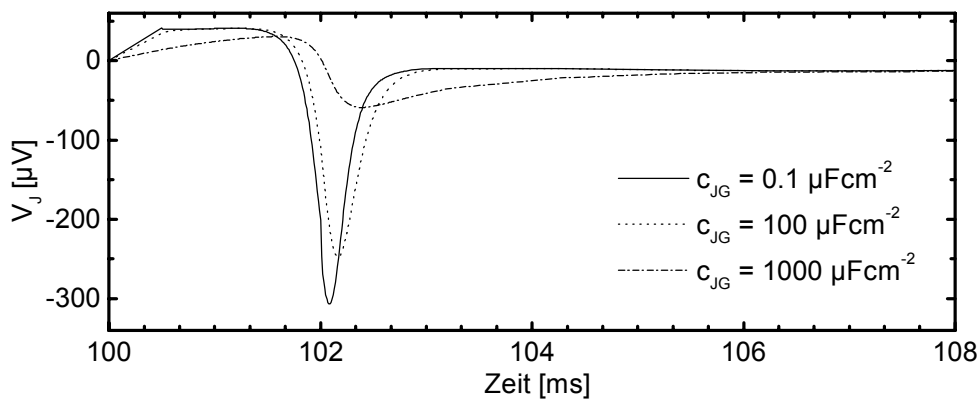


Bild 5.51: Simulation der Abhängigkeit des Spannungsverlaufs einer D1-Typ Koppelung bei Variation der spezifischen Elektrodenkapazität c_{JG} , (FET $\approx 0.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, EGE $\approx 10 \mu\text{F}/\text{cm}^2$), [Krause, 2000 a].

Bild 5.51 zeigt die Abhängigkeit des Spannungsverlaufs von $V_J(t)$ im Kontaktbereich in Bezug auf die Variation der spezifischen Elektrodenkapazität c_{JG} mit einem D1 Signalverlauf aus Bild 5.48. Die Skalierungsfaktoren für die Simulation für die Na^+ , K^+ und Ca^{2+} Ionenstromdichten, $X_{JM}^{\text{Na,K,Ca}} = 2$, $g_J = 1 \text{ S}/\text{cm}^2$ und ($c_M = 1.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$). Bild 5.51 zeigt drei Simulationen mit $c_{JG} = 0.1, 100$ und $1000 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Dabei zeigt sich deutlich eine Veränderung des Zeitverlaufs und der Amplitude bei Erhöhung der spezifischen Elektrodenkapazität c_{JG} . Dieses Ergebnis korreliert mit den typischen Werten von FET bzw. EGE Arrays (FET $\approx 0.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, EGE $\approx 10-100 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) und Metallelektroden Arrays mit zusätzlicher Oberflächenmodifikation ($\approx 1000 \mu\text{F}/\text{cm}^2$). Bei diesen großen Werten für die Gatekapazität handelt es sich typischerweise um TiN-Elektroden bzw. Goldelektroden die mit einer Platinoberfläche bedeckt sind [Nisch, 94]. Für eine optimale Signalübertragung muss die spezifische Gatekapazität im $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ Bereich

liegen. Die in der Arbeit verwendeten Elektroden liegen in einem Bereich zwischen 5-30 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ und zeigen deshalb auch keine Veränderungen im Signalverlauf.

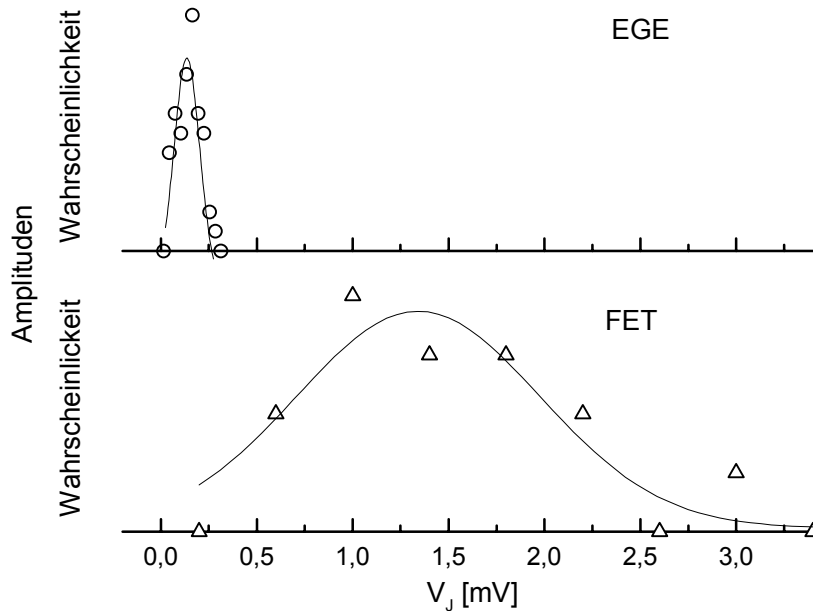


Bild 5.52: Wahrscheinlichkeiten für die Amplituden von extrazellulären Aktionspotentialen von Herzmuskelzellen gemessen mit EGEs und FETs, [Krause, 2000 a]. Daten für FETs aus [Sprössler, 97].

Ein Unterschied zwischen den EGE und FET bei Detektion von extrazellulären Aktionspotentialen liegt in der Amplitude der gemessenen Signale. Bild 5.52 zeigt die Amplitudenverteilung von extrazellulären Aktionspotentialen die mit FETs und EGEs gemessen wurden. Dabei zeigt sich, dass die Amplituden die mit den FETs gemessen werden wesentlich größer sind als die, die mit den EGEs aufgenommen wurden. Durch die größere Elektrodenkapazitäten der EGEs wird der zeitliche Verlauf jedoch nicht beeinflusst.

Die Simulation der extrazellulären Signale durch Skalierung der Na^+ , K^+ und Ca^{2+} spezifischen Ionenleitfähigkeiten, einer Modellzelle, im Kontaktbereich soll im nächsten Abschnitt anhand von Einzelzelleexperimenten im *Voltage-Clamp* Modus bestätigt werden.

5.4.5 Einzelzell-Experimente

Die folgenden Experimente an Herzmuskelzellen unterteilen sich wie bei den Messung an Neuroblastoma Zellen und Hippocampalen Neuronen in die Signaleinkopplung durch geringe und hohe Ionenkanalleitfähigkeit.

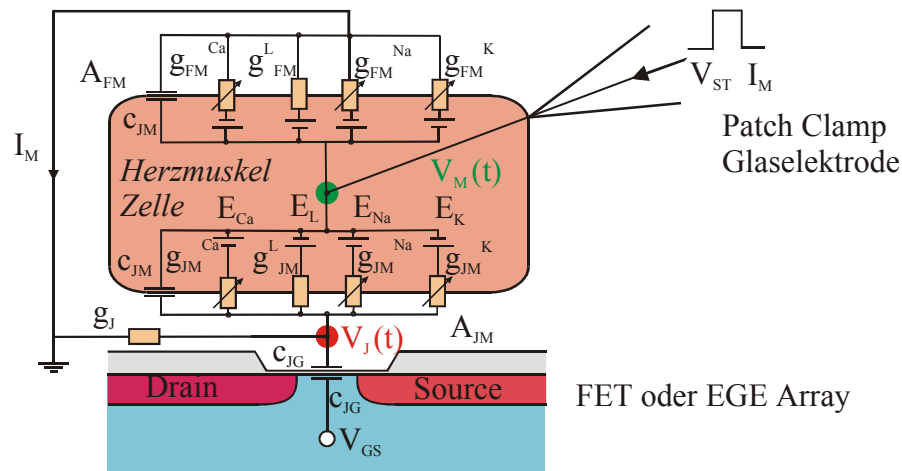


Bild 5.53: Ersatzschaltbild von Herzmuskelzellen. Der spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanal kommt zu den bereits bei den Neuroblastoma und den hippocampalen Neuronen diskutierten Na^+ - und K^+ -Kanälen hinzu.

5.4.5.1 Zellen ohne aktive Ionenkanäle

Die Diskussion zum Einfluss der geringen Ionenkanalleitfähigkeit erfolgt mit der gleichen Vorgehensweise wie bei den Zellsystemen zuvor. Dabei werden ebenfalls FET und EGE eingesetzt.

Tabelle 5.22: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.54 durchgeführte Kopplungsexperiment.

Sensor-Typ	A_{Gate} [μm^2]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
p-Kanal FET	2×16	-2	-2	0.39
Zell-Typ	V_{RP} [mV]	$R_M^{\text{exp.}}$ [$\text{G}\Omega$]	$C_M^{\text{exp.}}$ [pF]	A_M [cm^2]
Herzmuskel	DIV 2	1	27	2.7×10^{-5}
Patchmode	V_M^H [mV]	V_M^{Puls} [mV]	Abtastrate	Mittelung
VC	-90	-40, 10, 90	33 kHz	100 Zyklen

In Bild 5.54 zeigt ein Kopplungsexperiment zur Untersuchung der A-Typ Kopplung von Herzzellen mit einem FET Array. Die Zellen sind 1 Tag alten neonatalen Ratten entnommen und zu einer Zellesuspension mit der Dichte von 0.75×10^6 Zellen/ml aufbereitet.

Bei den Stimulationspulsen für A1 und B1 ergeben die extrazellulären Signale in A2 und B2 die erwarteten rein kapazitiven Signalanteilen. Der Stimulationsimpuls in C1 erzeugt auch die kapazitiven Spikes doch zeigt sich, dass die Zellmembran langsam undicht wird. Dies zeigt sich durch das Auftreten der ohmschen Anteile im Signal. Doch steht bei diesem Experiment die Proportionalität zwischen Ableitung des Stimulationspulses und der kapazitiven Spikes im Vordergrund. Unter der Voraussetzung das die Anstiegszeit des Stimulationspulses Δt für alle Spikes gleich ist, gilt: $V_J = \alpha \Delta V_M$. Tabelle 5.24 zeigt diese Proportionalität.

Tabelle 5.23: Proportionalität zwischen dem Stimulationspuls und dem detektierten extrazellulären Signal

ΔV_M [mV]	V_J [μV]	α
50	54	10^{-3}
100	99	10^{-3}
180	231	1.3×10^{-3}

Durch eine Simulation des kapazitiven Signals (nicht dargestellt) lässt sich die Abdichtleitfähigkeit zu $g_J = 5 \text{ S/cm}^2$ bestimmen. Dieser gute Werte kann auf die vollständige Abdeckung des Gates mit dem Zellkörper zurückzuführen.

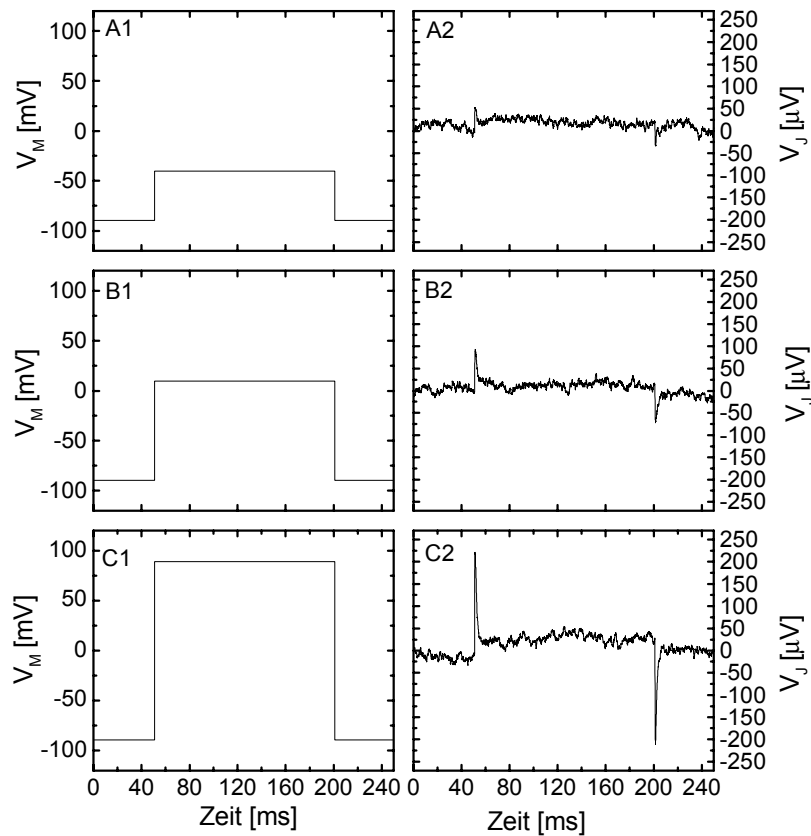


Bild 5.54: Kapazitive Kopplung mit einer Herzmuskelzelle Zelle: Linke Seite Spannungspulse, V_M^{Puls} und Haltepotential V_M^H , Rechte Seite: kapazitives extrazelluläres Signal V_J .

5.4.5.2 Zellen mit aktiven Ionenkanälen

Die Experimente zur aktiven Signaleinkopplung mit den Herzmuskelzellen mit Hilfe der *Voltage-Clamp* Technik soll zum einen die bei den vorherigen Experimenten mit den Herzzellschichten gemachten Ergebnisse, im *Current-Clamp* Methode, bestätigen und auch die Simulationen für die D1-D4 Kopplungen, zur Skalierung der Ionenströme im Kontaktbereich, nachzeichnen.

Zur Untersuchung der Na^+ Kopplungsfähigkeit werden in diesem Experiment neonatale Herzmuskelzellen (Tag 1) mit einer Anzahl von 0.75×10^{-6} Zellen/ml in der Zellsuspension auf den p-Kanal FET aufgesetzt. Trotz der relativ hohen Dichte in der Zellsuspension bilden sich nicht nur zusammenhängende Zellgebiete sondern auch Einzelzellen, die

dann hier vermessen werden können. Bild 5.55 zeigt extrazelluläre Signaleinkopplungen, die hauptsächlich durch Na^+ -Ionenströme in den Kontaktbereich beeinflusst sind.

Tabelle 5.24: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.55 durchgeführte Kopplungsexperiment.

Sensor-Typ	A_{Gate} [μm^2]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
p-Kanal FET	2×16	-2	-3	0.31
Zell-Typ	V_{RP} [mV] -50	$R_M^{\text{exp.}}$ [$\text{G}\Omega$]	$C_M^{\text{exp.}}$ [pF]	A_M [cm^2]
Herzmuskel	DIV 2	0.426	—	—
Patchmode	V_M^H [mV]	V_M^{Puls} [mV]	Abtastrate	Mittelung
VC	-90	-30, 10	20 kHz	100 Zyklen

Die Herzzelle wird auf ein Haltepotential von $V_M = -90$ mV eingestellt und danach durch einen Spannungspuls auf $V_M = -30$ mV bzw. $V_M = 10$ mV depolarisiert, (Bild 5.55 A1 und A2). Der resultierende Gesamtionenstrom bei diesen Membranpotentialen ist auf eine Überlagerung aus Na^+ , K^+ und Ca^{2+} zurückzuführen. Die einwärts gerichteten Na^+ -Ströme liegen mit $I^{Na} = 1.9$ nA und $I^{Na} = 2.35$ nA deutlich über den Werten für den auswärtsgerichteten K^+ -Strom mit $I^K = 0.23$ nA und $I^K = 0.48$ nA in Bild 5.55 B1 und B2. Für die Membrankapazität wird ein durchschnittlicher Wert von 20 pF angenommen. Daraus berechnen sich die spezifischen Leitfähigkeiten zu $g_{FM}^{Na} = 1.1$ mS/ cm^2 und $g_{FM}^{Na} = 1.68$ mS/ cm^2 . Die kapazitiven Spikes erlauben die Bestimmung von $g_J = 10$ S/ cm^2 für beide Kopplungen in Bild 5.55 C1 und C2. Der einwärts gerichtete Na^+ -Strom erzeugt einen Spannungsabfall über den Abdichtwiderstand von $V_J = 248$ μV (Bild 5.55 C1) und $V_J = 252$ μV (Bild 5.55 C2). Anhand der Simulation in Bild 5.55 ergeben sich für die Skalierung der spezifischen Na^+ -Leitfähigkeit einmal $X_{JM}^{Na} = 16$ für Bild 5.55 D1 und $X_{JM}^{Na} = 13$ für Bild 5.55 D2. Damit erhöht sich die Leitfähigkeit im Kontaktbereich auf $g_{JM}^{Na} = 18$ mS/ cm^2 und auf $g_{JM}^{Na} = 22$ mS/ cm^2 .

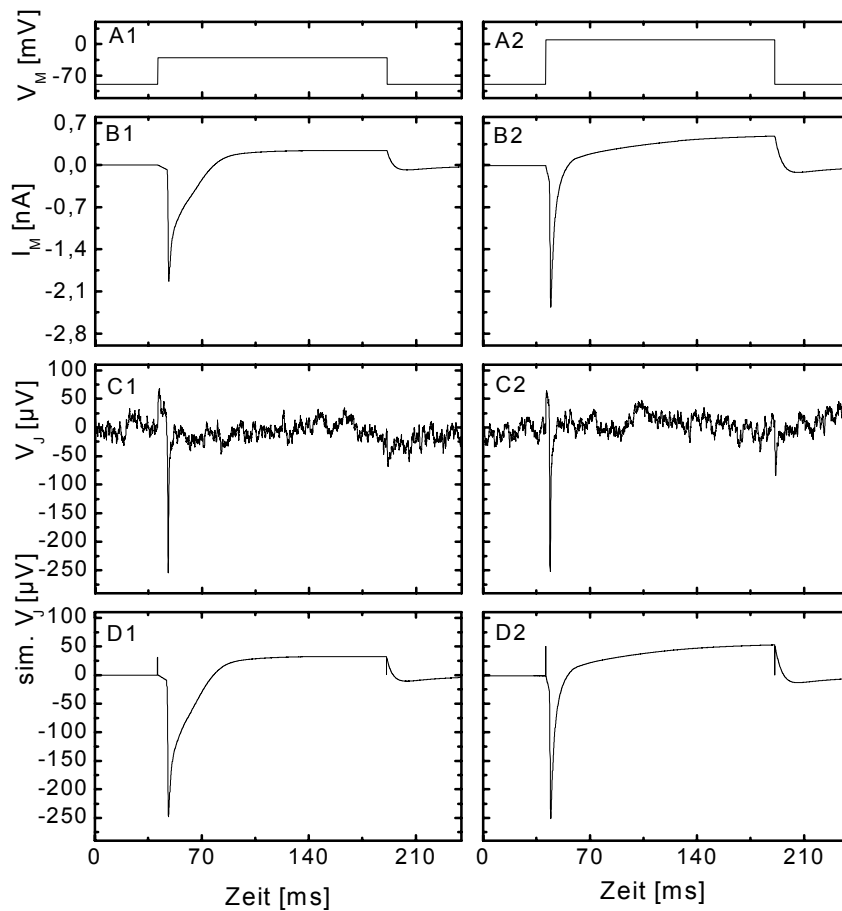
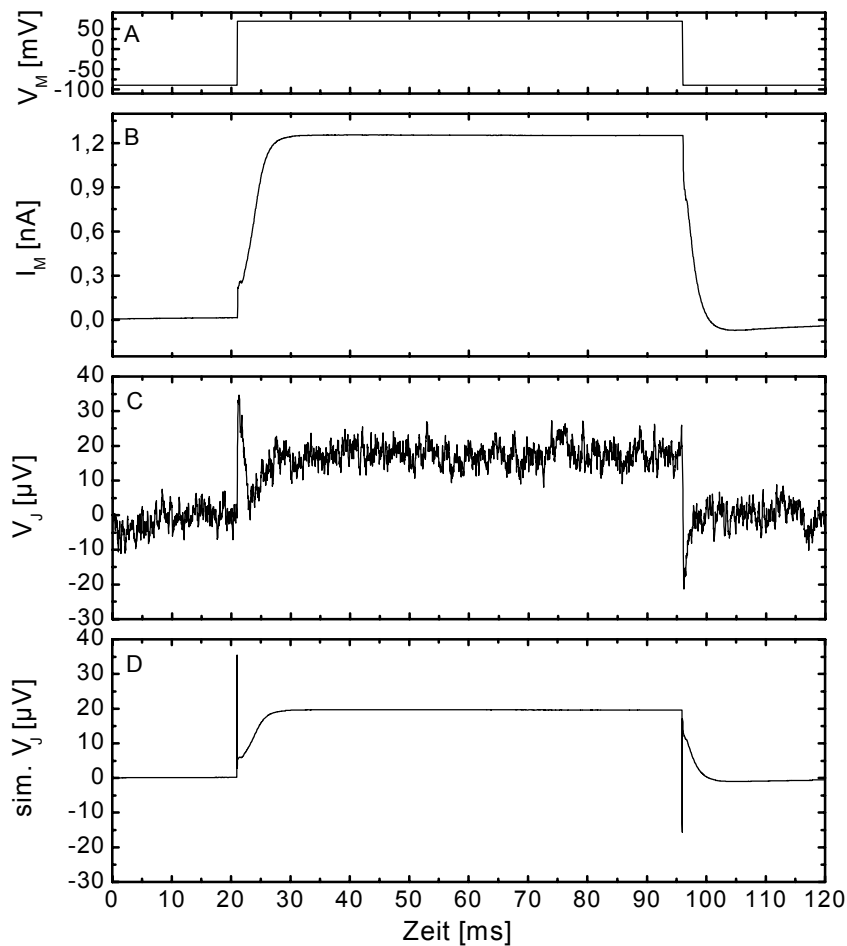


Bild 5.55: Na^+ , K^+ und Ca^+ -Ionenströme und die extrazellulären Antwortsignale einer Herzmuskelzelle ($V_{\text{RP}} = -50 \text{ mV}$, 2 DIV). A und B zeigen jeweils den Stimulationspuls V_M und den Membranstrom I_M durch die Patchelektrode. C zeigt die entsprechenden eingekoppelten Signale V_J . Zur Bestimmung der Kopplungsparameter werden die Signale V_J entsprechend simuliert (D).

Das folgende Experiment zeigt die Signaleinkopplung zur Untersuchung der K^+ Kopplungsfähigkeit. Dabei wurden embryonale Herzmuskelzellen vom Tag E18 mit einer Anzahl von 0.75×10^6 Zellen/ml in der Zellsuspension auf das Goldelektroden EGE Array gesetzt und für 3 Tage in Kultur gehalten. Bild 5.56 zeigt das Stimulationsexperimente einer Herzmuskelzelle auf einer Goldelektrode.

Tabelle 5.25: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.56 durchgeführte Kopplungs-experiment.

Sensor-Typ	A_{Ele} [μm]	V_{GS} [V]	V_{DS} [V]	g_m [mS]
Au-EGE	10	0.05	0.2	1.2
Zell-Typ	V_{RP} [mV] -30	$R_M^{\text{exp.}}$ [$\text{G}\Omega$]	$C_M^{\text{exp.}}$ [pF]	A_M [cm^2]
Herzmuskel	DIV 3	30	17	1.7×10^{-5}
Patchmode	V_M^H [mV]	V_M^{Puls} [mV]	Abtastrate	Mittelung
VC	-90	70	33 kHz	95 Zyklen

Bild 5.56: K^+ -Ionenstrom und das extrazelluläre Antwortsignal einer Herzmuskelzelle ($V_{RP} = -30$ mV, 3 DIV).

Die spezifische Leckleitfähigkeit ergibt zu $g_{FM}^L = 1.9 \times 10^{-6} \text{ S/cm}^2$. Durch den Spannungspuls (Bild 5.56 A) öffnet die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle und es kann ein Ionenstrom von $I^K = 1.2 \text{ nA}$ (Bild 5.56 B) gemessen werden. Die Reaktion auf Stimulationspuls und K^+ -Auswärtsstrom zeigt Bild 5.56 C. Die kapazitiven Spikes, mit einer Amplitude von $V_J = 35 \text{ } \mu\text{V}$ liefern einen Wert von $g_J = 25 \text{ S/cm}^2$. Durch den Spannungsabfall über den Abdichtwiderstand erzeugt der aus der Zelle herausfließende K^+ -Strom ein extrazelluläres Signal von $V_J = 20 \text{ } \mu\text{V}$. Die Simulation in Bild 5.56 D) bestimmt die Skalierung der spezifischen K^+ -Leitfähigkeit. Die Betrag erhöht sich, von $g_{FM}^K = 0.48 \text{ mS/cm}^2$, mit $X_{JM}^K = 6.6$ auf $g_{JM}^K = 3.1 \text{ mS/cm}^2$. Dieses Ergebnis bestätigt experimentell die Simulation der extrazellulären Aktionspotentiale. Die Erhöhung der spezifischen K^+ -Leitfähigkeit der Herzzelle im Kontaktbereich über der Goldelektrode bzw. eines Feldeffekttransistors erzeugt den positiven Verlauf.

Die zuvor durchgeführten Kopplungsexperimente weisen die notwendige Skalierung von Na^+ und K^+ -Leitfähigkeiten im Kontaktbereich zur Erzeugung des extrazellulären Signals nach. Im folgenden Experiment kann zusätzlich die unterschiedliche Skalierung von Na^+ und Ca^{2+} gezeigt werden und somit die Voraussetzung für die Simulation der D1-D4 Typen bestätigen.

Bei diesem Experiment werden embryonalen Herzmuskelzellen mit einer Zelldichte von 0.75×10^6 Zellen/ml in der Zellsuspension auf die Oberfläche des n-Kanal FET Arrays aufgesetzt. Im *Current-Clamp* Modus kann das Ruhepotential von $V_{RP} = -35 \text{ mV}$ gemessen werden

Tabelle 5.26: Experimentelle Parameter für das in Bild 5.57 durchgeführte Kopplungsexperiment.

Sensor-Typ	$A_{Gate} [\mu\text{m}^2]$	$V_{GS} [\text{V}]$	$V_{DS} [\text{V}]$	$g_m [\text{mS}]$
n-Kanal FET	4×16	3	2	0.79
Zell-Typ	$V_{RP} [\text{mV}] -35$	$R_M^{\text{exp.}} [\text{G}\Omega]$	$C_M^{\text{exp.}} [\text{pF}]$	$A_M [\text{cm}^2]$
Herzmuskel	DIV 2	7.5	31	3.1×10^{-5}
Patchmode	$V_M^H [\text{mV}]$	$V_M^{\text{Puls}} [\text{mV}]$	Abtastrate	Mittelung
VC	-90	-50, -10	20 kHz	150 Zyklen

Ausgehend vom Haltepotential wird das Membranpotential der Zelle in Bild 5.57 A1 und A2 auf einen positiven Wert verschoben. Dabei wird der Gesamtstrom I_M in Bild 5.57 B1 und B2 aufgezeichnet.

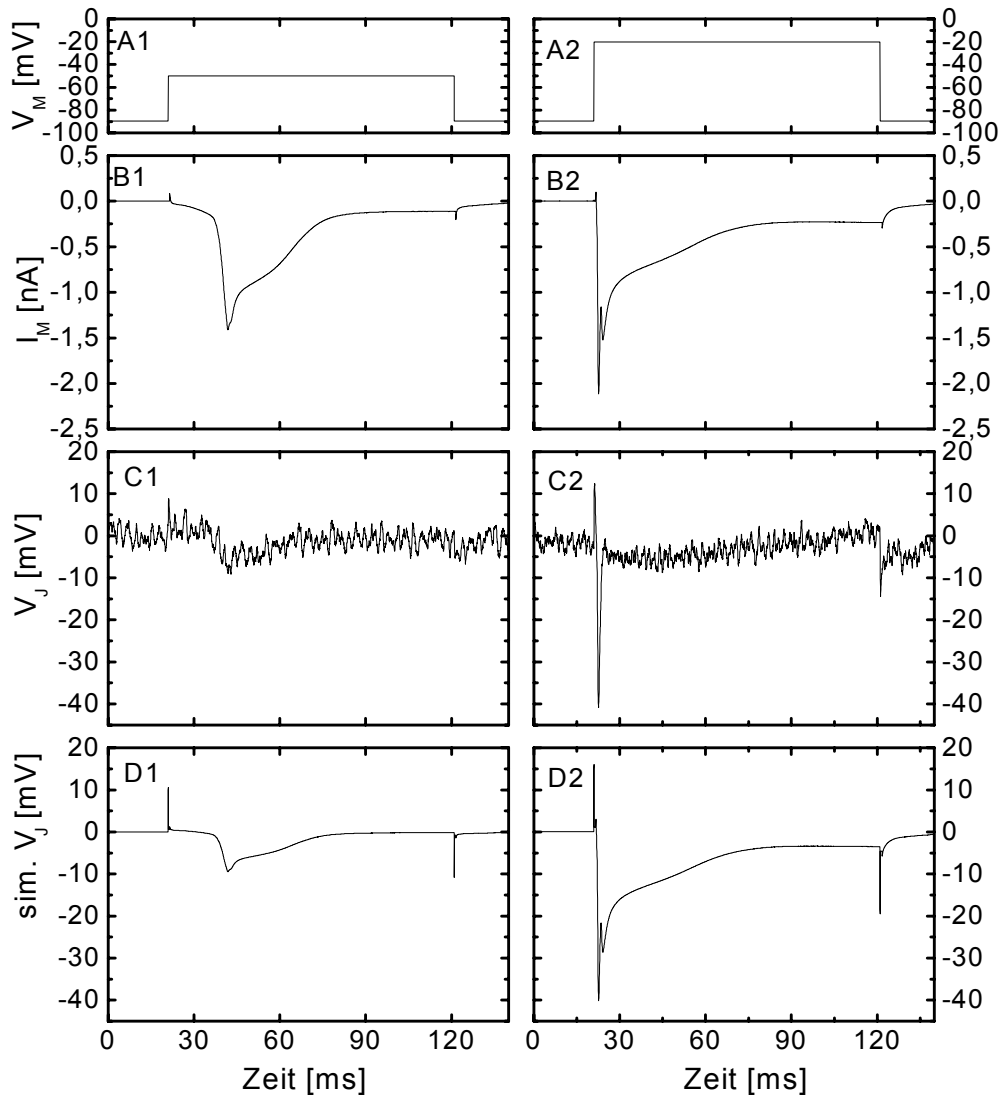


Bild 5.57: Na^+ und Ca^+ -Ionenströme und die extrazellulären Antwortsignale einer Herzmuskelzelle ($V_{RP} = -35$ mV, 2 DIV). A und B zeigen jeweils den Stimulationspuls V_M und den Membranstrom I_M durch die Patchelektrode. C zeigt die entsprechenden eingekoppelten Signale V_J . Zur Bestimmung der Kopplungsparameter werden die Signale V_J entsprechend simuliert (D).

Der Stimulationspuls auf $V_M = -50$ mV löst hier hauptsächlich den verlangsamtsten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Herzmuskelzelle aus (Bild 5.57 B1). Bei $t = 40$ ms steigt der Ionenstrom auf den maximalen Wert von $I^{Ca} = 1.4$ nA. Im Gegensatz zum Ca^{2+} -

Einwärtsstrom öffnet der Stimulationspuls auf $V_M = -20$ mV einen schnellen Na^+ -Einwärtsstrom (Bild 5.57 B2). Dieser Strom steigt unmittelbar nach dem Spannungspuls auf $V_M = -20$ mV auf seinen maximalen Wert von $I^{\text{Na}} = 2.1$ nA.

Die extrazellulären Signale V_J in Bild 5.57 C1 und C2 zeigen wie erwartet die kapazitiven Anteile. Dazwischen treten die extrazellulären Signale auf die durch die Ionen, die durch die spannungsabhängigen Ionenkanäle im Kontaktbereich fließen, erzeugt werden. Nicht nur die Amplitude sondern auch der zeitliche Verlauf der beiden Signale unterscheidet sich. Die zeitliche Verzögerung des gemessene Ca^{2+} -Ionenstroms ist auch im extrazellulären Signal wiederzufinden. Auch der negative Spike zeigt in V_J den gleichen Zeitverlauf wie der im *Voltage-Clamp* registrierte schnelle Na^+ -Ionenstrom. Deutlich zeigt sich der Unterschied im extrazellulären Signal V_J für die Ca^{2+} und Na^+ Ionenströme. Das Signal der Ca^{2+} -Ionen liegt mit $V_J = 10$ μV deutlich unter dem Wert von Na^+ mit $V_J = 40$ μV . Aus der Simulation ergeben sich die spezifischen Abdichtleitfähigkeit zu $g_J = 25$ S/cm^2 (Bild 5.57 C1) und $g_J = 22$ S/cm^2 (Bild 5.57 C21). Die Simulation des extrazellulären Signals, welches hauptsächlich durch den verlangsamten Ca^{2+} -Ionenstrom dominiert wird, liefert für den Skalierungsfaktor einen Wert von $X_{JM}^{\text{Ca}} = 4.4$. Im Gegensatz dazu ist die Na^+ -Leitfähigkeit um den Faktor $X_{JM}^{\text{Na}} = 15$ erhöht.

Tabelle 5.27: Ergebnisse aus den Experimenten mit keiner und hoher Ionenkanalleitfähigkeit im Kontaktbereich.

Herzmuskel	g_J [S/cm^2]	X_{JM}^L	X_{JM}^{Na}	X_{JM}^K	X_{JM}^{Ca}
—	5	—	—	—	—
Na^+	10	—	16, 13	—	—
K^+	30	80	—	4.9	—
$\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$	25, 22	—	15	—	4.4

Die durch die Einzelzellexperimenten bestimmten Werte für die spezifische Abdichtleitfähigkeit liegen auch für die größeren Kardiomyozyten bis auf den relativ guten Wert von $g_J = 5$ S/cm^2 in dem gleichen Größenbereich wie sie bei den extrazellulären Kopplungsexperimenten mit den SH-SY5Y, EA.hy-926 und den hippocampalen Neuronen beobachtet wurden. Dies lässt sich auf die gleiche Oberflächenmodifikation zurückführen. Denn wie für die Zell-Linien wird auch für die Kardiomyozyten Fibronectin zur Oberflächenmodifizierung eingesetzt. Eine deutlich höhere Amplitude zeigt sich in den

extrazellulären Signalen bei der Untersuchung der Na^+ -Leitfähigkeit im Kontaktbereich in Bild 5.55. Die erhöhte Amplitude lässt sich auf den relativ guten Wert für den spezifischen Abdichtleitwert mit $g_j = 10 \text{ S/cm}^2$ und einem maximalen Na^+ -Ionenstrom von $I^{\text{Na}} = 2.4 \text{ nA}$ zurückführen, der im Kontaktbereich mit einem Faktor von $X_{JM}^{\text{Na}} = 16$ erhöht ist. Auch der K^+ -Strom ist im Kontaktbereich um den Faktor $X_{JM}^{\text{K}} = 4.9$ erhöht. Ein sehr wichtiges Ergebnis aus den Kopplungsexperimenten zeigt Bild 5.57. Hier kann nicht nur eine erhöhte spezifische Ionenleitfähigkeit für Na^+ und Ca^{2+} im Kontaktbereich nachgewiesen werden sondern auch die unterschiedliche Skalierung der Na^+ und Ca^{2+} -Ionenströme. Die Skalierungsfaktoren zeigen für Na^+ einen Wert von $X_{JM}^{\text{Na}} = 15$ und für Ca^{2+} einen Betrag von $X_{JM}^{\text{Ca}} = 4.4$. Dieses Ergebnis bestätigt die zur Beschreibung der verschiedenen Typen von extrazellulären Aktionspotentialen (D1-D4) gemachte Annahme der unterschiedlichen Skalierung von Na^+ , K^+ und Ca^{2+} -Ionenströmen im Kontaktbereich.

Die Ergebnisse aus den Experimenten mit konfluenten Zell-Monolayern aus Herzzellen zeigen, dass sich die mit den EGEs aufgezeichneten extrazellulären Aktionspotentiale (D1) in ihrem zeitlichen Verlauf nicht von denen mit FETs detektierten unterscheiden. Dieses Verhalten bestätigt auch die Simulation, bei der die Elektrodenkapazität im Bereich von 0.1 bis $1000 \mu\text{F/cm}^2$ variiert worden ist. Diese Berechnung zeigt, dass die Elektroden, die hier zur Messung eingesetzt werden, mit ihren Elektrodenkapazitäten im Bereich von 5 - $30 \mu\text{F/cm}^2$ keine wesentliche Veränderung des zeitlichen Verlaufs von V_j bewirken. Die detektierten extrazellulären Aktionspotentiale (D1-D4) die hier mit den EGEs und FETs aufgenommen wurden, zeigen indirekt die Auswirkung der unterschiedlichen Skalierung von Ionenströmen im Kontaktbereich, wie es auch durch die Experimente in den Einzelzellmessungen bestätigt wird. Die Einführung der EGEs ermöglicht aufgrund der Anzahl der Elektroden eine gleichzeitige Detektion von extrazellulären Aktionspotentialen von unterschiedlichen Orten auf den Sensor. Die hohen Amplituden bei den Monolayer-Experimenten weisen auf einen geringen spezifischen Abdichtleitwert g_j hin. Befindet sich der ganze Zellmonolayer auf gleichem Potential so kann diesem Layer ein einzelner Abdichtwiderstand zugeordnet werden. Somit ermöglicht der Monolayer als Einheit eine bessere Abdichtung der Sensorflächen. Im Gegensatz dazu erzeugt der Monolayer der Endothelzellen nicht diesen geringen Abdichtleitwert. Die Endothelzellen wirken nicht wie bei den Herzmuskelzellen als ein

einheitlicher Layer, wodurch sich die viel größeren Werte für den spezifischen Abdichtleitwert erklären lassen.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Zell-Transistor Kopplungen:

Die Experimente zur Zell-Transistor Kopplung zeigen das mit allen hier eingesetzten Zellsystemen und den in dieser Arbeit hergestellten FET und EGE extrazelluläre Signale, durch die Anwendung der *Voltage-* und *Current-Clamp* Methode, unter zu Hilfe-nahme der Mittelung detektieren lassen. Die in den Einzelzellexperimenten beobachteten extrazellulären Signale können durch die Anwendung des Kirchhoffschen Gesetzes mit Hilfe des Punkt-Kontakt-Modell beschrieben werden.

Dabei werden Experimente mit Zellen unterschieden, bei denen sich keine aktiven Ionenkanäle in der Zellmembran entwickelt haben, was durch die chemischen Einwirkungen während der Präparation hervorgerufen werden kann. In diesen Fällen wird das detektierte Signal ausschließlich durch die spezifische Membrankapazität und Leckleitfähigkeit im Kontaktbereich beeinflusst. Dabei unterscheidet man den A-Typ und den B-Typ Anteil am Gesamtsignal. Bei allen Zellen lassen sich diese beiden Kopplungsarten beobachten, wobei über den kapazitiven Anteil, der proportional zur zeitlichen Ableitung des Stimulationspulses ist, die spezifische Abdichtleitfähigkeit abgeschätzt werden kann. Die Auswertung dieser Einzelzellexperiment dieser Kopplungsart zeigt, dass der Wert von g_j bis zu einem Faktor 3 besser ist als bei der Mittelung aller Einzelexperimente. Einen großen Einfluss auf das Verhalten von g_j hat die Oberflächenmodifikation zur Zelladhärierung. Die hier eingesetzten Zelladhäsive wie Fibronectin und Laminin bei den hippocampalen Neuronen zeigen zum einen die Zuverlässigkeit die für die Experimente erforderlich ist, zum anderen wird die Zelle vielleicht nicht nahe genug an die aktive Sensorfläche gebunden. Ein weiterer Punkt der g_j beeinflusst ist die Lage des Zellkörpers auf den FETs oder EGEs. Hohe Amplituden in dem extrazellulären Signalverlauf zeigen sich immer dann, wenn die gesamte Zelle das Gate bzw. die Elektrode abdeckt. Dann liegen die Werte für g_j im Bereich zwischen 5-10 S/cm². Da in der Arbeit auch Experimente durchgeführt werden, bei denen Zellkörper nicht ganz die aktive Fläche abdeckt, erhöht sich dadurch die spezifische Abdichtleitfähigkeit. Dies gilt für alle Zellsysteme. Auch der Einsatz von Zellen mit größeren Durchmessern wie

den Endothelzellen und den Kardiomyozyten bringt keine deutliche Erniedrigung der spezifischen Abdichtleitfähigkeit, sofern sie nicht ganz auf der aktiven Flächen liegen. Eine Ausnahme zeigt sich bei den Kardiomyozyten im Monolayer, bei denen im *Current-Clamp* Mode sehr hohe Amplituden beobachtet werden.

Bei den Messungen mit spannungsgesteuerten Ionenkanälen in der Zellmembran können Experimente mit geringer und erhöhter Ionenkanalleitfähigkeit im Kontaktbereich unterschieden werden.

Bei Experimenten mit aktiven Ionenkanälen in der Zellmembran besitzt die SH-SY5Y Zell-Linie, als einfachstes Zellmodell einer neuronalen Zelle, im wesentlichen nur zwei Arten Ionenkanäle (Na^+ , K^+) deren Ionenströme genügend groß werden können und bei unterschiedlichen Membranpotentialen öffnen. Deshalb kann die Auswirkung der beiden Ionenströme getrennt voneinander untersucht werden. Nur bei den Kopplungen mit den SH-SY5Y Zellen bei denen geringe Ionenströme über die Zellmembran beobachtet werden bleibt das extrazelluläre Signal unbeeinflusst. Das extrazelluläre Signal zeigt dann nur die oben beschriebenen kapazitiven und ohmschen Anteile. Diese Beobachtung weist daraufhin, dass die vorhandene Ionenkanaldichte, von Na^+ - und K^+ -Kanälen, mit ihrer Leitfähigkeit nicht ausreicht das Gate- oder Elektrodenpotential entscheidend zu beeinflussen.

Bei normaler bis erhöhter Ionenleitfähigkeit im Kontaktbereich zeigt sich eine Proportionalität zwischen dem beobachteten Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Membranstrom und dem extrazellulären Signal. Diese Abhängigkeit zeigen die Neuroblastomazellen, die hippocampalen Neuronen und die Kardiomyozyten. Diese Beobachtung zeigt deutlich, dass der Einstrom von Ionen in den Kontaktbereich zwischen Zelle und Sensorfläche den zeitlichen Verlauf des extrazellulär detektierten Signals beeinflusst.

Die Simulation der extrazellulären Signale mittels der Gleichung aus dem Punkt-Kontaktmodell liefert die Erkenntnis dass die spezifischen Ionenleitfähigkeiten für Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Ionen im Kontaktbereich erhöht sein muss um das extrazelluläre Signal nachzubilden. Dabei werden die gemessenen Ionenströme der Ionenart i mit dem jeweiligen Faktor X_{JM}^i skaliert. Experimente mit den Kardiomyozyten zeigen, dass nicht nur die spezifische Ionenleitfähigkeit erhöht sein muss sondern auch, dass die Ionenströme im Kontaktbereich unterschiedlich skalieren ($X_{JM}^{\text{Na}} \neq X_{JM}^{\text{Ca}}$). Bei dieser beobachteten

Erhöhung dieser Leitfähigkeiten muss es dann zu einer unterschiedlichen Anhäufung von Ionenkanälen in der Zellmembran über der Sensorflächen kommen, um die beobachteten extrazellulären Signale beschrieben zu können. Verstärkt zeigt sich dieses Verhalten bei den Experimenten mit den hippocampalen Neuronen bei denen ein Teil des beobachteten K^+ -Stroms über den A-Typ K^+ -Kanal fließt. Dieser bestimmte K^+ -Strom zeigt keine Auswirkung auf das extrazelluläre Signal. Dies kann dadurch beschrieben werden, dass sich diese Art von Ionenkanälen nicht im Kontaktbereich befindet oder die Kanaldichte zu gering ist, dass die Leitfähigkeit das Gatepotential nicht beeinflusst. Bei zukünftigen Experimenten auf diesem Gebiet kann es sinnvoll sein diese Ionenkanaldichte im Kontaktbereich zu untersuchen.

Der Nachweis, dass es sich bei den K^+ -Einkopplungen tatsächlich um K^+ -Ionenströme über die Zellmembran in den Kontaktbereich handelt, wird bei den Experimenten mit den SH-SY5Y Zellen und den hippocampalen Neuronen durch die Zugabe von TEA realisiert. TEA blockiert die K-Typ K^+ -Kanäle und verhindert dadurch eine Reaktion im extrazellulären Signal. Dadurch ist bewiesen das der Einstrom von K^+ -Strom in den Kontaktbereich das Gatepotential in positive Richtung verändert.

Die Ergebnisse der *Voltage-Clamp* Experimente bestätigen die Annahme der Skalierung der Ionenströme im Kontaktbereich bei der Simulation der extrazellulären Aktionspotentiale vom Typ D1-D4 mit Kardiomyozyten.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Verknüpfung von biologischen Systemen mit speziellen Halbleiterbauelementen zur Untersuchung der extrazellulären Signalübertragung. Dabei steht der Einfluß passiver Membranelemente, wie Kapazität und Widerstand, sowie aktiver Stromanteile, aus spannungsabhängigen Ionenkanälen verschiedener Zellsysteme, auf das in die Sensoren eingekoppelte Übertragungssignal im Vordergrund der Betrachtung. Die Untersuchung erfordert zum einen die Entwicklung genügend sensitiver Sensoren zur Detektion der Signale im μV -Bereich und zum anderen die erfolgreiche Anbindung von lebenden Zellsystemen auf diese Sensoroberflächen ohne die Beeinträchtigung ihrer elektrischen und chemischen Eigenschaften.

Die mit den Standardprozessen der Halbleitertechnologie hergestellten p- und n-Kanal Feldeffekttransistoren zeigen bzgl. der Steilheit und Langzeitstabilität gute Werte. Die Steilheit der p-Kanal FET liegt zwischen 0.3 und 0.6 mS und die der n-Kanal FET zwischen 0.3 und 1.2 mS, wobei sich die Gateabmessung von $2 \times 16 \mu\text{m}^2$ für beide Kanaltypen als besonders gut erweist. Das in einer trockenen Atmosphäre aufgebraute Gateoxid zeigt mit einer Dicke von 10 nm einen guten Kompromiss zwischen Gatesteilheit und Langzeitstabilität, die bei 5 bis 10 Präparations- und Messumläufen liegt.

Mittels der Dünnschichttechnologie wurden EGE aus Gold und Titan hergestellt die in ihren Durchmessern im Bereich der Zellkörper liegen und somit eine gute Abdeckung erlauben. Als besonderen Ansatzpunkt zur Verkleinerung des spezifischen Abdichtleitwertes kann die Einführung von Elektroden mit Topographie gesehen werden. Die Langzeitstabilität der hergestellten EGE Arrays, bezogen auf die Standfestigkeit des Schutzoxids sowie der elektrischen Kontaktierung der Glaschips, ist so gut, dass sie bis zu 50 Messdurchläufen verwendet werden können. Die hier eingeführte Flip-Chip-Technologie, zum Aufkleben der EGE-Glaschips mit 64 einzelnen Kontakten auf die

strukturierten Platinen, erzeugt elektrisch stabile Kontakte und konnte als Alternative zum Bonden mit Al/Si-Draht etabliert werden.

Das Rauschen der FETs und der EGEs, bei der Kontaktierung mit den JFETs, liegt nach einer Rauschanalyse über dem Eigenrauschen der jeweiligen Messelektronik. Die n-Kanal FETs liegen unter dem Rauschen der p-Kanal FETs, wobei in beiden Fällen das $1/f$ Rauschen, durch Kombination-Rekombinationsprozesse, deutlich vorherrscht. Störende Frequenzen können durch die Kompaktbauweise der Vorverstärker ausgeschlossen werden.

Eine Verbesserung der Oberflächenmodifikation mit dem Ziel eine bessere Zelladhärenz zu schaffen konnte durch das Aufbringen einer 100 nm dicken Siliziumoxidschicht auf die Isolationsschicht beider Sensorsysteme erreicht werden. Diese Oberfläche in Verbindung mit den hier eingesetzten Fibronectin und Laminin erweist sich als zuverlässiges Substrat für die Zellanbindung.

Die für die Kopplungsexperimente mit den EGEs neu eingeführte Meßmethode, bei der die Elektroden als Extended-Gate-Electrode an die Gates kommerzieller JunctionFETs kontaktiert werden zeigt gegenüber der herkömmlichen Messmethode mit Metallmikroelektroden deutliche Vorteile. Die Oberfläche der EGEs bedarf keiner zusätzlichen Oberflächenmodifikation, wie der Elektrodenplatinierung, zur Impedanzerniedrigung, da diese Modifikation gleichzeitig die spezifische Elektrodenkapazität erhöht. Die geringe Elektrodenkapazität der EGEs ($5\text{-}30 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) ergibt somit eine ganz ähnliche Signalform für das extrazelluläre Signal wie bei den FETs. Es kommt somit nicht zu einer Änderung des zeitlichen Verlaufs wie dies bei herkömmlichen Messmethoden mit Metallmikroelektroden beobachtet wird.

Zur Untersuchung der Kopplungseigenschaften verschiedener Zelltypen werden die neuronale Zell-Linie SHSY-5Y, die humane Endothelzellen-Linie EA.hy-926 sowie primäre Zellen von hippocampalen Neuronen und Kardiomyozyten, aus embryonalen und neonatalen Ratten, eingesetzt. Alle Versuche, mit den oben genannten Zellsystemen, werden als Einzelzellexperimenten durchgeführt, wobei zusätzlich Kopplungen mit den Kardiomyozyten, als elektrisch verbundener Zellverband, betrachtet werden.

Mit Hilfe der Patch-Clamp Technik werden die Zellsysteme im *Voltage-* und *Current-Clamp* Mode definiert depolarisiert. Das Hauptaugenmerk galt den spezifischen Leitfä-

higkeiten der verschiedenen Ionenkanäle um diese dann mit den jeweiligen Leitfähigkeiten im Kontaktbereich zu vergleichen. Diese Untersuchungsmethoden werden dann auf Zellen angewendete, die direkt auf den Elektroden der EGEs bzw. auf den Gates der FETs adhärirt sind.

Von allen in der Arbeit verwendeten Zellsystemen können, in den Einzelzellexperimenten mit der *Voltage-Clamp* Technik extrazelluläre Kopplungen, mit den hergestellten FET und EGE durchgeführt werden. Alle untersuchten Zellsysteme zeigen als Reaktion auf einen depolarisierenden Spannungspuls eine kapazitive Kopplung (A-Typ), wobei das extrazelluläre Signal V_J proportional zur Ableitung des Membranpotentials V_M ist. Dies zeigt sich besonders deutlich bei Versuchen mit den SH-SY5Y und Kardiomyozyten. Der ohmsche Kopplungstyp (B-Typ) zeigt dagegen die Proportionalität zum Membranpotential und wird auf eine hohe spezifische Leckleitfähigkeit im Kontaktbereich der Zellmembran zurückgeführt, wobei die kapazitiven Kopplungen in diesen Fällen nicht sehr deutlich hervortreten. Die Leckleitfähigkeit im Kontaktbereich kann sich bis zum 3 GröÙeordnungen der durchschnittlichen Membranleitfähigkeit erhöhen. Bei einigen Zell-Transistor Kopplungen treten beide Typen zusammen sehr deutlich im extrazellulären Signal auf. Durch die Simulationen der beobachteten extrazellulären Signale kann die Stärke der Kopplung, die von der spezifischen Abdichtleitfähigkeit g_J abhängt, berechnet werden. Die in dieser Arbeit gefundenen Werte liegen im Bereich 5-100 S/cm², wobei immer dann eine starke Kopplung beobachtet werden kann, wenn die Zelle das Gate oder die Elektrode vollständig bedeckt hat.

Damit Ionenströme die experimentell gefundenen extrazellulären Signale bewirken muss die spezifische Ionenleitfähigkeit im Kontaktbereich gegenüber der freien Zellmembran erhöht sein. Die Erhöhung der spezifischen Ionenleitfähigkeit beträgt bei den SHSY-5Y und den hippocampalen Neuronen bis zu einem Faktor 10 und bei den Kardiomyozyten bis zu einem Faktor 16.

Die Verwendung der Kardiomyozyten als elektrisch verbundenen Zellverband auf den FET und EGE führt zu charakteristischen Kopplungstypen im *Current-Clamp* Modus. Die Annahmen für diese Simulationen mit den skalierbaren Leitfähigkeiten kann mit den Ergebnissen der Einzelzellkopplungen an Kardiomyozyten, als auch mit den neuronalen Zellsystemen, bestätigt werden.

In dieser Arbeit ist der experimentelle Nachweis erfolgt, dass der Einstrom von verschiedenen Ionenströme in den Kontaktbereich zwischen Zelle und Sensorfeld sich deutlich auf die Signaleinkopplung auswirkt. Die im *Voltage-Clamp* gezielt ausgelösten Ionenströme, von Neuroblastoma, hippocampalen Neuronen und Kardiomyozyten, erzeugen charakteristische Antwortsignale V_J , deren zeitlicher Verlauf vorhersagbar und reproduzierbar ist.

Zukünftige Arbeiten auf diesem Gebiet liegen in der technischen Weiterentwicklung der p- und n-Kanal Feldeffekttransistoren in Bezug auf das Rauschverhalten sowie die Rückseitenkontaktierung der Chips auf die Kerramik-Carrier. Diese Entwicklungen werden in Zukunft eine bessere Signaldetektion und Zellpräparation ermöglichen. Die Rückseitenkontaktierung bietet die Möglichkeit den ganzen FET Chip als Präparationsfläche zu nutzen, dabei wird die Verkapselung mit dem Silikontrichter wie sie in der Arbeit beschrieben wird, zum Schutz der Aluminiumdrähte, vermieden. Die größere Fläche kann dann zu Experimenten mit Gehirnschnitten von Ratten herangezogen werden. Die Zellpräparation dieser Slices ermöglicht das Ausbreiten von Neuronen des Hippocampus aus dem Gewebeverband in Richtung der Elektroden oder Gates. Die gleichen Experimente können dann mit dem Einsatz von Topographie-Elektroden durchgeführt werden. Dabei können die Elektroden mit den hergestellten Spitzen direkt durch die oberste Schicht der Gewebeschnitte durchdringen und an intakte Neurone ankoppeln. Eine Weiterentwicklung der Anbindung der Zellsysteme auf die diversen EGE und FET kann in Zukunft die Erniedrigung des spezifischen Abdichtleitwertes erbringen und somit die Kopplung auf Dauer verbessern. Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Signalausbreitung in hippocampalen Neuronen und Kardiomyozyten ist die gezielte Positionierung der Zellen auf die Oberfläche der Sensorsysteme. Dabei können durch gezielte Oberflächenmodifikation die Zellen auf Netzwerken über die aktiven Flächen der Sensoren gebracht werden. Bilden diese Zellen auch Synapsen, wie bei den Neuronen, bzw. elektrische Verbindungen, wie bei den Herzzellen, so kann die Weiterleitung von Aktionspotentialen im Netzwerk der Zellen extrazellulär mit den Sensorsystem nachvollzogen werden.

7 Anhang

Die in den Kopplungsexperimenten verwendeten Sensoren wie die Feldeffekttransistoren (FET) und die Extended-Gate-Electrode (EGE) wurden mit Prozessen aus der Halbleiter-Technologie im Institut für Mikrotechnik Mainz (IMM) hergestellt.

7.1 Fabrikationsprozesse

7.1.1 p-Kanal Feldeffekttransistoren

Das Ausgangsmaterial für die Herstellung der p-Kanal Anreicherungs-Feldeffekttransistoren sind n-dotierte 625 μm dicke und 125 mm im Durchmesser messende Silizium Wafer mit einem spezifischen Widerstand von 5-10 Ωcm . Der erste Prozessschritt besteht aus dem Oxidieren des Wafers bei 1100 $^{\circ}\text{C}$ für 148 min., welches zu einem 1000 nm dicken Grundoxid führt. In dem ersten Lithographieschritt wird ein erster Teil der Zuleitungen in den Positiv-Photolack belichtet und entwickelt. Das Oxid an den Photolack freien Stellen wird mit Hilfe von BHF-Säure (40 $^{\circ}\text{C}$, 5:30 min) entfernt (Bild 7.1).

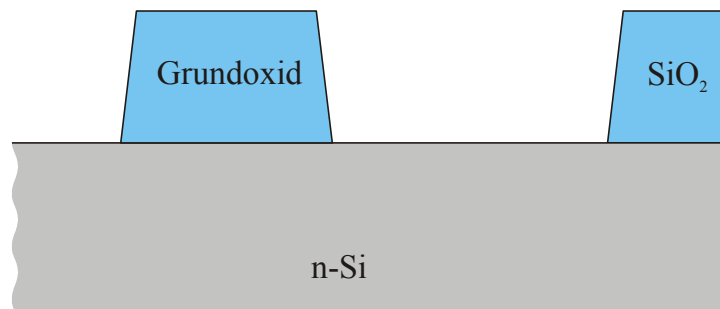


Bild 7.1: Im ersten Schritt wird das 1000 nm dicke Grundoxid aufgebracht, die Leiterbahnen definiert und danach das Grundoxid geätzt.

Danach wird, in die nun freiliegenden Leiterbahnen, Bor implantiert. Die Implantationsenergie der Bor-Ionen für die erste tiefe Implantation beträgt 120 keV, bei einer Dosis von $8 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$. Der anschließende Diffusionsschritt (20 min O_2 -Flash, 12 h 45 min. $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ N_2) verschiebt das oberflächennahe gausförmige Implantationsprofil in die Tiefe. Dabei diffundieren die Bor-Atome sowohl in die Tiefe als auch unter den Bereich der noch mit SiO_2 bedeckt ist. Nach der Diffusion wird bei der gleichen Temperatur eine feuchte Oxidation des Wafers ausgeführt, dabei vergrößert sich das Grundoxid sowie der Bereich über den implantierten Gebieten jeweils um 110 nm (Bild 7.2).

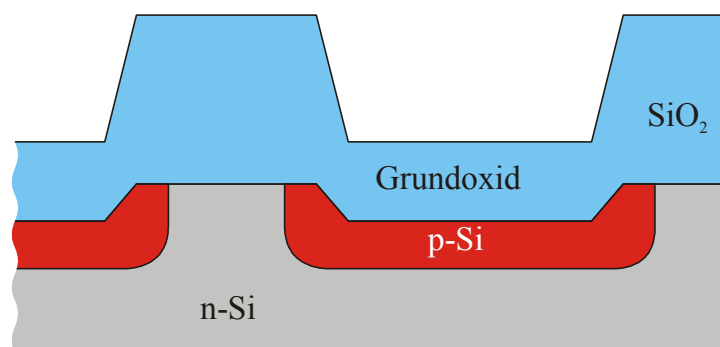


Bild 7.2: Im zweiten Schritt werden die oxidfreien Stellen mit Bor implantiert und in einem anschließenden Diffusions-Oxidationsprozess wird das Profil in die Tiefe verschoben und die Leiterbahnen wieder mit Oxid bedeckt.

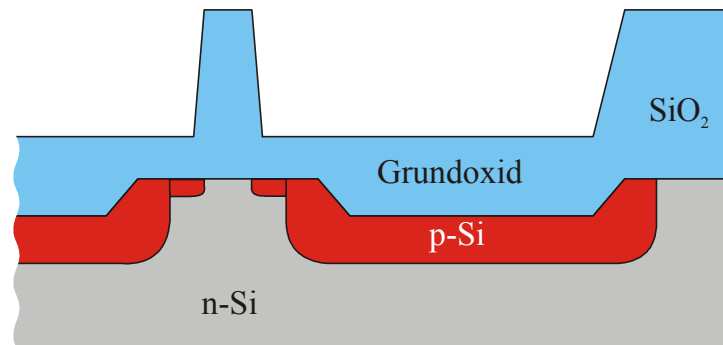


Bild 7.3: Die zweite Implantation definiert die endgültigen Dimension des Source-Drain Gebietes sowie des Gatebereichs.

Die endgültige Definition der Zuleitungen erfolgt im zweiten Lithographieschritt. Das Oxid der zuvor implantierten Gebiete sowie das Grundoxid über den zukünftigen Source-Drain Gebieten wird mit der BHF-Säure (20 °C, 16 s) entfernt. Im zweiten Schritt werden die Bor-Ionen mit einer Energie von 80 keV und einer Dosis von $5 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ (Strahlstrom = 65 μA) implantiert. Der anschließende kombinierte Diffusion- und Oxidationsprozess hat die Aufgabe, die Ionen in die Tiefe des Substrates zu verlagern und über dem Implantationsgebiet eine 250nm dicke Oxidschicht herzustellen (Bild 7.3). Der nach der Methode von *van der Pauw* gemessene Quadratwiderstand beträgt $R_{\square} = 19 \Omega$. Die Diffusion für diese flache Implantation wird bei einer Temperatur von 1000 °C und Stickstoff Atmosphäre ausgeführt. Die feuchte Oxidation bei 1000 °C und Wasserstoff Atmosphäre ergibt die erforderliche Oxidschicht. Der dritte Lithographieschritt definiert die 16 Gate- und Kontaktbereiche. Das Oxid wird mit BHF-Säure (40 °C, 5 min.) entfernt. Das Entfernen des Photolacks und ein Reinigungsätzen in Caroscher Säure ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$) bereitet den Wafer für das Aufbringen des Schutzoxids vor. Das 60 nm dicke Schutzoxid wird bei 900 °C in feuchter Atmosphäre abgeschieden (Bild 7.4).

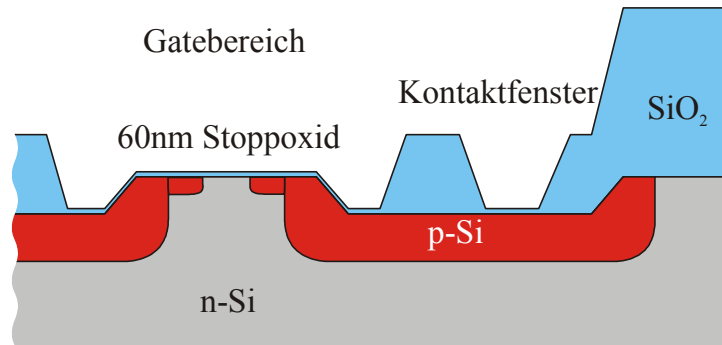


Bild 7.4: Der 3. Photolithographieschritt öffnet gleichzeitig die 16 Gate und Kontaktfenster. Danach wird ein 60 nm dickes Oxid aufgebracht, welche im nachfolgenden Schritt als Ätzstopp dient.

Zum weiteren Aufbau der Isolationsschicht, gegenüber dem später Elektrolyten, wird eine *Low-Pressure-Chemical-Vapour-Deposition (LPCVD)*-Nitrid Schicht abgeschieden. Dieser Silan Prozeß ($T = 850\text{ C}^\circ$, $t = 250\text{ min}$, $\text{NH}_3\text{ SiH}_4$, $p = 50\text{ mTorr}$) ergibt eine 125 nm Si_3N_4 Schicht. Zur Hydrophilisierung der Oberfläche wird eine 100 nm dicke Plasma *Enhanced-Chemical-Vapour-Deposition (PECVD)*-Oxidschicht aufgebracht (Bild 7.5).

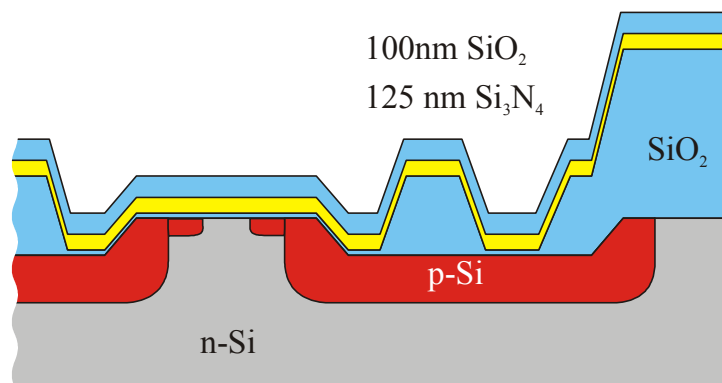


Bild 7.5: Eine 125 nm dicke Si_3N_4 Schicht zum Schutz gegen den Elektrolyten und eine 100 nm dicke SiO_2 Schicht für die Oberflächenmodifikation wird aufgetragen.

Der vierte Lithographieschritt definiert die endgültige Größe der Gate und Kontaktbereiche. Das PECVD Oxid wird mit BHF-Säure (20 C° , 30 s) entfernt. Das LPCVD-Nitrid wird mit einem *Isotropic-Chemical-Plasmaetching*-Prozess (SF_6 , $t = 9\text{ min}$)

entfernt, dabei dient das Schutzoxid als Ätzstop. Das Schutzoxid wird dann wiederum mit BHF entfernt (Bild 7.6).

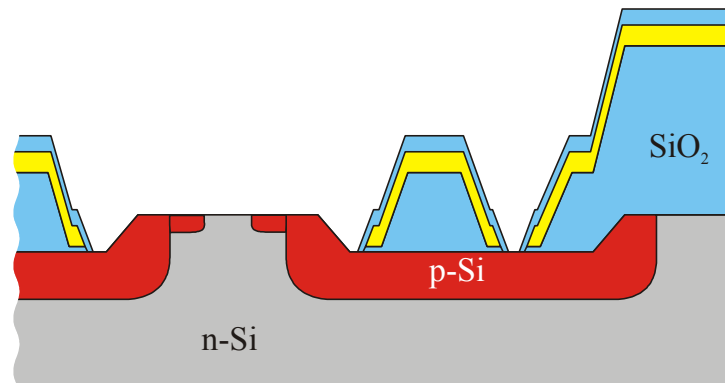


Bild 7.6: Mit den Ätzprozessen wird die entgültige Dimension des Gates festgelegt und zusätzlich die Kontaktfenster geöffnet.

Im nächsten Schritt wird das Gateoxid aufgebracht. Dabei durchläuft der Wafer zuvor noch einige Reinigungs- und Trockenschritte aus Caroscher Säure. Dabei ist es wichtig, daß die Oberfläche bei der Oxidation noch OH-Gruppen besitzt. Das Gateoxid wird bei trockener Atomsphäre und einer Temperatur von 820 °C in unterschiedlicher Dicke hergestellt. Durch die verschiedenen Prozesszeiten ergeben sich dabei Dicken von 8, 10 und 12 nm über dem Gatebereich und den Kontaktbereichen (Bild 7.7).

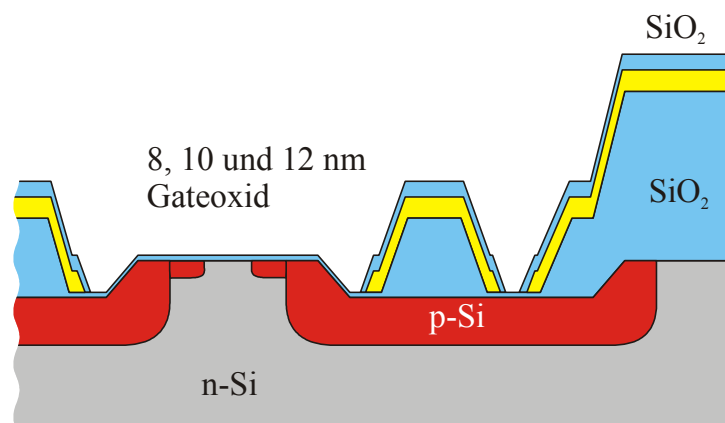


Bild 7.7: Das Gateoxid wird in einem trockenen Oxidationsprozess in Dicken von 8, 10 und 12 nm aufgebracht. Im Anschluss daran werden die 16 Kontaktfenster mit einem Ätzschritt geöffnet.

Damit ist der FET im Source-, Drain- und Gatebereich fertiggestellt. Der fünfte Lithographieschritt definiert nochmals die Kontaktbereiche die im späteren Ätzprozess mit BHF entfernt werden. Damit liegen die Siliziumkontaktbereiche frei. Der sechste Lithographieschritt wird mit einem *Image-Reversal (IR)*-Lack durchgeführt. Die durch diesen Prozeß freien Kontaktbereich werden mit 200 nm Aluminium aufgedampft.

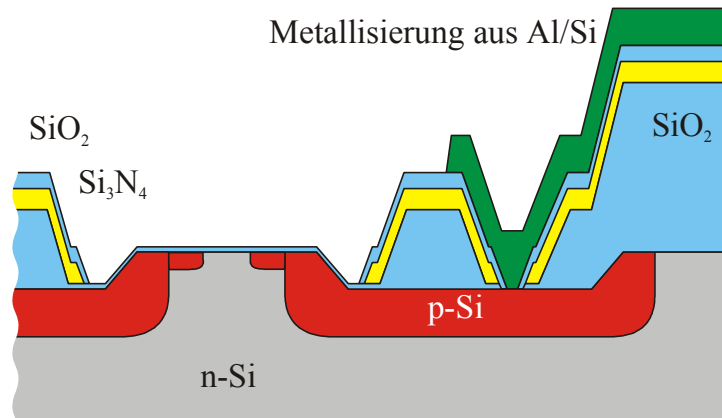


Bild 7.8: Im letzten Schritt wird die Metallisierung durchgeführt.

Mit Hilfe des *Lift-Off* Prozesses wird das Aluminium mit dem IR-Lack entfernt. Das über dem Kontaktbereich verbleibende Aluminium wird 30 min. bei 400 °C in N₂-Atmosphäre getempert (Bild 7.8). Damit wird ein Schottky-Kontakt zwischen dem Bor implantierten Silizium und dem Aluminium verhindert. Zuletzt erhält der Wafer einen Schutzlack und wird in die einzelne Chips zersägt.

7.1.2 n-Kanal Feldeffekttransistoren

Die Herstellung der n-Kanal Feldeffekttransistoren startet mit Silizium Wafern, die p-dotiert sind und einen Flächenwiderstand von 8.5-11.5 Ωcm haben. Bei den n-Kanal FET sollen sowohl Anreicherungs- als auch Verarmungstyp hergestellt werden. Dazu werden die Wafer zuerst oxidiert. Bei dieser feuchten Oxidation (T = 1000C°, t = 30 min, H₂O Atmosphäre) entsteht eine Schichtdicke von 240 nm. In einem sich anschließenden LPCVD-Prozess wird Nitrid (T = 790 °C, t = 120 min, p = 300 mTorr, DiChlor-Silan und NH₃) in einer Höhe von 400 nm aufgebracht.

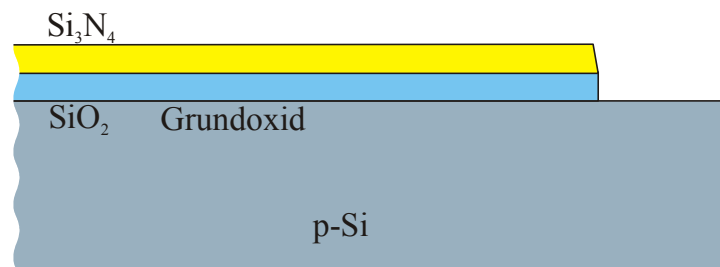


Bild 7.9: Der erste Schritt umfasst die Oxidation und das Aufbringen einer Nitridschicht. Danach wird der Feldbereich definiert und geätzt.

Die folgende erste Lithographie definiert die Source-, Drain- und Gatebereiche als ein zusammenhängendes Gebiet, mit Hilfe des *Image-Reversal* Lacks. Die nun außerhalb liegende Oxid Nitrid-Fläche wird nacheinander entfernt. Die Nitridschicht wird mit dem Plasmaätzprozeß entfernt (1000 W, 30 mTorr, SF₆ und O₂), dabei dient die untere Oxidschicht als Ätzstopp. Das verbleibende Oxid wird mit der BHF (40 °C, t = 1 min.) aufgelöst (Bild 7.9). Nach dem Ablacken und Reinigungsätzen, in Caroscher Säure, wird die Feldimplantation durchgeführt. Bor-Ionen mit einer Energie von 100 keV und einer Dosis von $5 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ werden in die nicht mit Oxid-Nitrid bedeckten Bereiche implantiert. Die Feldimplantation dient dazu die Selbstinversion zu verhindern. Der Diffusionsprozess erfolgt bei T = 1000 °C für t = 30 min. in N₂ Atmosphäre. Der nachfolgende feuchte Oxidationsprozess (T = 1000 °C, t = 87 min) ergibt dann eine über dem Feldimplantationsbereich 470 nm dicke SiO₂ Schicht. Bei der feuchten Oxidation entsteht über den Bereichen mit Si₃N₄ kein Oxid (Bild 7.10).

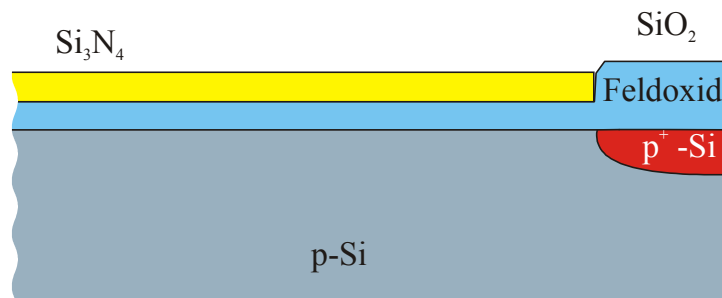


Bild 7.10: Um die Source, Drain und Gatebereiche wird eine Feldimplantation durchgeführt.

Das LPCVD-Nitrid, welches sich nur auf dem zusammenhängenden Source-, Drain-Gatebereich befindet, wird mit dem ICP -Ätzprozess (800 W, SF₆, t = 10 min.) entfernt, wobei die darunter liegende Oxidschicht als Ätzstop dient. Die zweite Lithographie bestimmt den endgültigen Source-Drain Abstand. Bei dem Entfernen der 240 nm dicken Oxidschicht wird BHF-Säure (T = 20 °C, t = 3 min 40 s) eingesetzt.

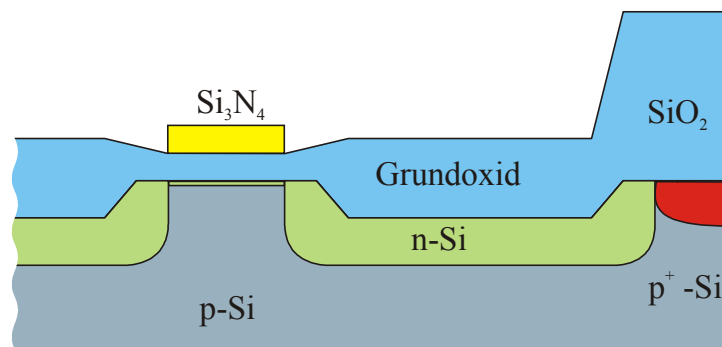


Bild 7.11: Im zweiten Schritt werden die oxidfreien Stellen mit Phosphor implantiert und in einem anschließenden Diffusions-Oxidationsprozess wird das Profil in die Tiefe verschoben und die Leiterbahnen wieder mit Oxid bedeckt.

Dabei darf es zu keiner Überätzung des Source-Drain Abstandes kommen. Nach dem Ablacken und Reinigungsätzen kommt es dann zum zweiten Implantationsschritt. Der Gatebereich ist mit einer 200 nm dicken Oxidschicht bedeckt. Zur Herstellung der n-Kanal FETs haben die Phosphor-Ionen verschiedene Implantationsenergien von 27, 40, 50, 60, 70keV, dabei beträgt die Ionendosis $8 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$. Nach dieser zweiten Implan-

tion folgt wiederum ein kombinierter Diffusions- und Oxidationsschritt bei $T = 1000^\circ\text{C}$. Die Oxidation führt zu einer 350 nm dicken Schicht über den Source und Drain Gebieten (Bild 7.11). Der nach der Methode von van der Pavn gemessene Quadratwiderstand beträgt für diese n-Kanal Feldeffekttransistoren $R_{\square} = 11 \Omega$. Ab dem dritten Lithographieschritt folgt der Prozess dem bei der Herstellung der p-Kanal Anreicherungstypen.

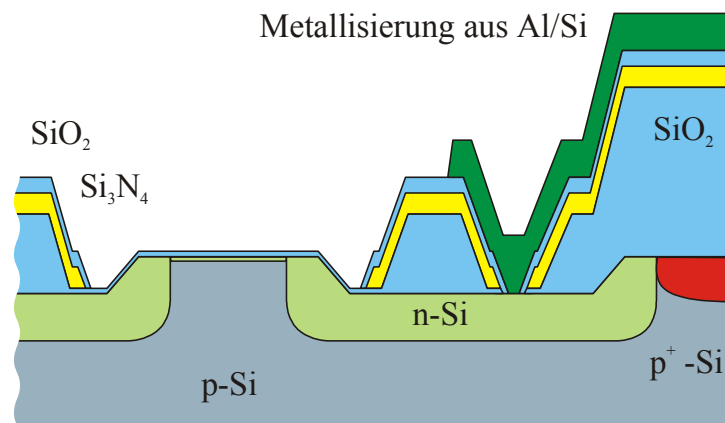


Bild 7.12: Der letzte Schritt ist auch hier wieder die Metallisierung der Kontaktfenster.

Bild 7.12 zeigt im Querschnitt den fertiggestellten n-Kanal FET.

7.1.3 Extended-Gate-Electrode (EGE)

Die Produktion der EGE verwendet ebenfalls die Halbleiter Prozesstechnologie. Die Elektrodenflächen bestehen aus Gold und Titan und werden mit Hilfe der *Lift-Off* Technik hergestellt. Die verwendeten Substrate sind Glaswafer (Borloat 33, Schott DESAG AG) mit einer Dicke von 650 nm und einem Durchmesser von 125 mm. Die Produktion dieser EGE unterteilt sich in zwei Bereiche. Der erste Bereich beinhaltet die planaren und mit einer Topographie hergestellten Goldelektroden. Der zweite Bereich die der Titanelektroden. Der erste Lithographieschritt besteht aus dem Aufbringen des IR-Lacks, in dem die Elektroden, Leiterbahnen und die Kontaktflächen definiert werden.

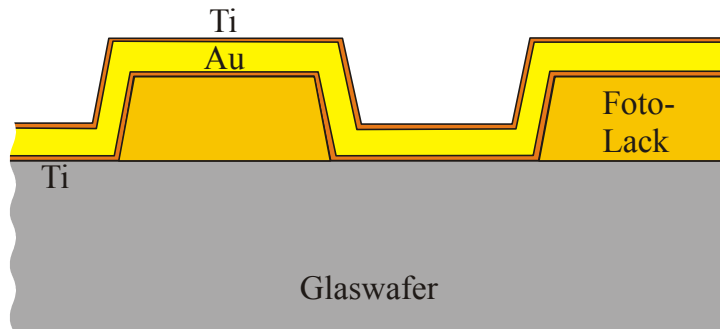


Bild 7.13: Aufdampfen der Ti/Au/Ti Schichtfolge auf dem IR-Lack.

Danach wird eine 300 nm dicke Goldschicht aufgedampft. Zur Verbesserung der Adhäsion des Goldes auf dem Glassubstrat und der späteren Isolationsschicht werden 30 nm Titan aufgedampft. Der erste Schritt zur Herstellung der Titanelektroden entspricht dem der Goldelektroden, nur mit einer 300 nm dicken Titanschicht (Bild 7.13). Nach dem *Lift-Off* Prozess wird die Isolationsschichten bestehend aus 500 nm PECVD-SiO₂ (T = 300 °C, SiH₄ N₂O), 500 nm PECVD-Si₃N₄ (T = 300 °C, SiH₄ NH₃) und einer 100 nm dicken PECVD-SiO₂ Schicht aufoxidiert (Bild 7.14).

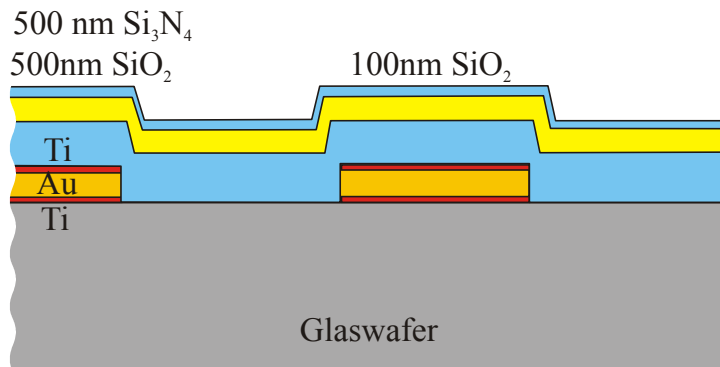


Bild 7.14: Nach dem *Lift-Off*-Prozess werden die Isolationsschichten aufgebracht.

Im zweiten Lithographieschritt werden die Elektroden- und die Kontaktbereiche definiert und danach mit Hilfe der Plasmaätztechnik in einer CHF₃-Atmosphäre geätzt. Die verbleibende Titanschicht auf den Goldelektroden und den Kontaktflächen wird mit einer Ammoniumfluorid-Lösung entfernt (Bild 7.15, Bild 7.16). Die Titanelektroden durchlaufen ebenfalls diesen Isolations- und Ätzschritt.

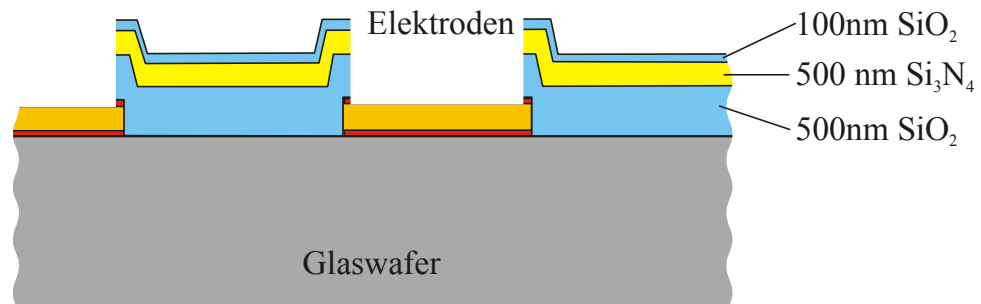


Bild 7.15: Im letzten Schritt werden die Elektroden mit einem Plasma-Ätzprozess geöffnet und die verbleibende Titanschicht entfernt.

In Bild 7.16 sind die einzelnen Isolationsschichten deutlich zu erkennen.

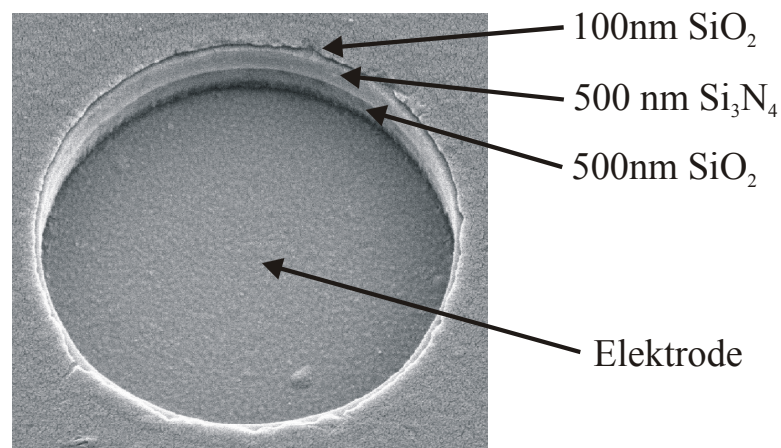


Bild 7.16: REM-Bild einer EGE Goldelektrode mit einem Durchmesser von $\varnothing = 6\mu\text{m}$. Deutlich zu erkennen sind die einzelnen Isolationsschicht, (Bild IMM).

Die EGEs mit Topographie haben im Gegensatz zu den oben beschriebenen planaren Gold- und Titanelektroden eine Erhöhung im Bereich der Elektroden von 1-5 µm. Der Herstellungsprozess dieser Elektroden unterscheidet sich nur durch zwei zusätzliche Schritte gegenüber dem der planaren Elektroden. In Abhängigkeit der erforderlichen Elektrodenhöhe (1-5 µm) werden die Glaswafer mit PECVD-Nitrid beschichtet ($T = 300\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{SiH}_4 \text{ NH}_3$). Dann wird im nachfolgenden Lithographieschritt mit der Maske zur Öffnung der Elektroden- und Kontaktflächen die Topographie der Elektroden definiert. Damit ergeben sich bei dem Plasma-Ätzen unterschiedliche Durchmesser der Elektrodenunterlagen. Der Ätzvorgang stoppt auf dem Glaswafer. Die nachfolgenden Schritte

wie Aufdampfen der Goldstrukturen und Aufbringen der Isolation entsprechen denen der planaren EGEs.

7.2 Patch Clamp Ausstattung

Zur Durchführung der Patch-Clamp Experimente wurden folgende Rezepturen für die intra- und extrazellulären Patch-Lösungen verwendet.

Intrazelluläre Patch-Lösung: V = 100 ml SHSY-5Y, EA.hy-926 Hippocampale Neurone Kardiomyozyten	140 mM, 2,357g 1 mM, 0,02g 11 mM, 0,418g 10 mM, 0,238g	Kaliumchlorid, Magnesiumdichlorid, EGTA, HEPES, eingestellt auf pH 7,3 mit Kaliumhydro- xid, Osmolarität: 300 ± 10 mOs/kg
---	---	--

Intrazelluläre Patch-Lösung: V = 100 ml Hippocampale Neurone	125 mM, 2,928g 20 mM, 0,14g 0,5 mM, 0,007g 2 mM, 0,04g 5 mM, 0,186g 10 mM, 0,238g	Kalziumgluconat, Kaliumchlorid, Kalziumdichlorid, Magnesiumdichlorid, EGTA, HEPES, ATP 0.004g für 2 ml Patch-Lösung eingestellt auf pH 7,3 mit Kaliumhydro- xid, Osmolarität: 300 ± 10 mOs/kg
---	--	---

Extrazelluläres Badmedium: V = 1 l	135 mM, 7,889g 5,4 mM, 0,402g 1 mM, 0,203g 1,8 mM, 0,265g 5 mM, 1,192g 10 mM, 1,8g	Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumdichlorid, Kalziumdichlorid, HEPES, Glucose, eingestellt auf pH 7,3 mit Natriumhydro- xid, Osmolarität: 300 ± 10 mOs/kg
--	---	--

Die Geräte und Materialien für die Patch-Clamp Versuche sind :

Patch-Verstärker	Whole Cell / Patch-Clamp Amplifier, Modell: L/M-PC, Luigs&Neumann GmbH, 40880 Ratingen
------------------	--

Patch-Verstärker	Whole Cell / Patch-Clamp Amplifier, Modell: EPC-9, Steuersoftware: Tida 4.11 HEKA Elektronik, Dr. Schulz GmbH, 67466 Lambrecht/Pfalz
Glaselektroden-Pullen	Horizontaler Puller Modell: P-97 Sutter Instrument Company, USA
Glaselektroden	Borosilicatglaskapilare mit Filament Länge $L = 100\text{mm}$, $D_A = 1.5\text{mm}$, $D_I = 0,87\text{mm}$ Wandstärke $s = 0,315\text{ mm}$ Filamentdurchmesser $D_F = 0,315\text{mm}$ Artikel-Nr.: 1810016 Hilgenberg, 34323 Maisfeld

7.3 Geräteverzeichnis

In den Kopplungsversuchen wurden folgende kommerziell erhältliche Geräte eingesetzt:

Auflichtmikroskop	Axitech Vario (45032) DIC Differential Interferenz Contrast, Objektive: Epiplan 5x (442920), Epiplan 10x (442930), LD Epiplan 20x (442840) Carl Zeiss Jena GmbH, 60335 Frankfurt
Immersions-Objektiv	UMPLFL 20xW/0.50 UIS-Obj AA33 Artikel-Nr.: 037588 Olympus Optical Co.(Europa) GmbH, 20097 Hamburg
Manipulatoren	Manipulatoren für das Mikroskop und den Patch-Clamp Vorverstärker, XYZ-Richtung Luigs&Neumann GmbH, 40880 Ratingen
Oszilloskop	Speicheroszilloskop Modell: 9400A LeCroy, Schweiz
Sterilbank	Sterilarbeitsbank Modell: Lamin Air HB 2436 Heraeus Instruments GmbH, 63450 Hanau

Inkubator	Inkubator, CO ₂ – Begasung Modell: BB 6060 Heraeus Instruments GmbH, 63450 Hanau
-----------	---

7.4 FET und EGE Aufbau

Für den Aufbau der FET und EGE Sensoren werden folgende Geräte und Materialien verwendet:

Chip-Carrier	Keramik Chip-Carrier Modell: 28 LD S/B Package CS B02880(KD-78368-E) Spectrum Semiconductors Materials INC., San Jose, USA
Platinen	Gold-galvanisiert Dicke 1mm, Schwind-Elektronik, 89081 Ulm-Lehr
H20E-175	EPO-TEK, Epoxy-Klebstof, 2-Komponenten, Nr.: 12419-016 Polytec GmbH, 76337 Waldbronn
H20E-PFC	Flip-Chip-Kleber EPO-TEK, Epoxy-Klebstof, 2-Komponenten, Polytec GmbH, 76337 Waldbronn
U-300	Liquid underfill encapsulant for flip chip 2-Komponenten Polytec GmbH, 76337 Waldbronn
Sylgard 182	Silikonelastomar, 2-Komponenten Dow Corning GmbH, 65201 Wiesbaden
Dow Corning 96-083	Silikonklebstoff, 2-Komponenten Dow Corning GmbH, 65201 Wiesbaden
Siebdrucker	Siebdrucker mit Handrakel Modell: ESSEMTEC SP-002 ESSEMTEC AG, Schweiz
SMD Schablone	SMD Schablone mit Rahmen für Siebdrucker KOENEN, 85521 Ottobrunn

Positioniereinheit	Positionierung der EGE Chips FINEPLACER-145“PICO“ FINETECH electronics, 10247 Berlin
Stereomikroskop	Basis Leica MS5 Artikel-Nr.: S/N 5036558 Vergrößerung 4x/52.9mm – 25,2x/8,3 mm, 5 Stufen Leica Microscopy Systems Ltd., Schweiz
Stereolupe	Stemi 2000, 6.5x – 45x Carl Zeiss GmbH, 60335 Frankfurt

7.5 Chemikalien und Rezepturen

Die Chemikalien zur Zellkultivierung sind im folgenden dargestellt:

Glutamax I	Dipeptid L-Alanyl-L-Glutamin, Best.-Nr.: 35050-038 Life Technologies GmbH, 76131 Karlsruhe
ATP	Adenosin 5`-Triphosphate, Best.-Nr.: A8937 Sigma-Aldrich GmbH, 82041 Deisenhofen
DMEM/F12	Dulbecco´s Modifiziertes Eagle Medium / Nutrient Mix F12 (1:1)(1x), Best.-Nr.: 21331-012 Life Technologies GmbH, 76131 Karlsruhe
P/S	Penicillin/Streptomycin Lösung, Best.-Nr.: 15070-022 Life Technologies GmbH, 76131 Karlsruhe
EDTA	Best.-Nr.: G7020 Sigma-Aldrich GmbH, 82041 Deisenhofen
EGTA	Best.-Nr.: G7E3889 Sigma-Aldrich GmbH, 82041 Deisenhofen
PBS	Dulbecco´s Phosphatgepufferte Kochsalzlösung Best.-Nr.: 14040-083 Life Technologies GmbH, 76131 Karlsruhe
Trypsin	Trypsin Typ II porcine pancreas, Best.-Nr.: T7409 Sigma-Aldrich GmbH, 82041 Deisenhofen
M199	Modifizierte Earle´s Salze, Best.-Nr.: 31153-018 Life Technologies GmbH, 76131 Karlsruhe

HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung, Best.-Nr.: 14185-045 Life Technologies GmbH, 76131 Karlsruhe
B27	Serumfreies Supplement, Best.-Nr.: 17504-44 Life Technologies GmbH, 76131 Karlsruhe
Neurobasal	Neurobasal TM -Medium, Best.-Nr.: 21103-49 Life Technologies GmbH, 76131 Karlsruhe
Laminin	Best.-Nr.: L6246 Sigma-Aldrich GmbH, 82041 Deisenhofen
Fibronectin	Fibronectin from bovine plasma, Best.-Nr.: F1141 Sigma-Aldrich GmbH, 82041 Deisenhofen
DNAse II	40.000 units, Best.-Nr.: D4527 Sigma-Aldrich GmbH, 82041 Deisenhofen
HEPES	HEPES Puffer, Best.-Nr.: H9136 Sigma-Aldrich GmbH, 82041 Deisenhofen
F10	Nutrient Mixture Ham's F-10, Best.-Nr.: 21955-026 Life Technologies GmbH, 76131 Karlsruhe
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium Supplement, Best.-Nr.: 1884 Sigma-Aldrich GmbH, 82041 Deisenhofen
FCS	Fötale Rinderserum, Best.-Nr.: 10119-154 Life Technologies GmbH, 76131 Karlsruhe
TEA	Tetraethylammonium-Chlorid (TEA) Sigma-Aldrich GmbH, 82041 Deisenhofen

Im folgenden ist die Zusammensetzung der Kulturmedien für die einzelnen Zellkulturen beschrieben.

Kulturmedium SHSY-5Y	DMEM Ham's F12 200 mM 1% P/S 12% FCS	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium, Nutrient Mix F12(1:1), Glutamax I, Penicillin/Streptomycin, fötale Rinderserum
Kulturmedium EA.hy-926	M199 200 mM 1% P/S 15% FCS	Modifizierte Earle's Salze, Glutamax I, Penicillin/Streptomycin, fötale Rinderserum

Kulturmedium Hippocampale Neurone	2 %	B27 Supplement gelöst in Neurobasalmedium
Kulturmedium Kardiomyocyten	20 ml 1 ml 180 ml 20 ml 5 ml 1 ml	F10 Nutrient Solution Na ₂ CO ₂ Natriumbicarbonat HEPES FCS Antibiotika – Lösung ??? ITS Lösung
Versene Puffer	140 mM 5 mM 5 mM 10 mM 0.5 mM	Natriumchlorid Kaliumchlorid Glucose HEPES EDTA eingestellt auf pH 5 mit 5 M NaOH

Literatur

- [Alberts, 95] B. Alberts, B. Dennis, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, **1995**,
Molekularbiologie der Zelle,
Übers. hrsg. von L. Jaenicke, 3. Aufl.
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- [Beneking, 91] H. Beneking, **1991**,
Halbleiter-Technologie: eine Einführung in die Prozesstechnik von Silizium und III-IV-Verbindungen,
Teubner, Stuttgart.
- [Bergveld, 70] P. Bergveld, **1970**,
Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements,
IEEE Trans. Biomed. Eng., **BME-17**, S. 70-71.
- [Bergveld, 76] P. Bergveld, J. Wiersma, H. Meertens **1976**,
Extracellular potential recordings by means of a field effect transistor without gate metal, called OSFET,
IEEE Trans. Biomed. Eng., **23** (2), S. 136-144.
- [Biedler, 78] J.L. Biedler, S. Rofflertarlov, M. Schachner, L.S. Freedman, **1978**
Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones
Cancer Research, 38, 11, S. 3751-3757
- [Brown, 97] H. Brown, R. Kozlowski, **1997**
Physiology and Pharmacology of the Heart
Blackwell Science, ISBN 0-86542-722-4
- [Cole, 68] K. S. Cole, **1968**,
Membranes, Ions and Impulses,
University of California Press, Berkley.
- [DiFrancesco, 85] D. DiFrancesco, D. Noble, **1985**
A Model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes
Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B, **B307**, S. 353-398

- [Earm, 90] Y.E. Earm, D. Noble, **1990**
A Model of the single atrial cell: relation between calcium current and calcium release
Proc. R. Soc., **240**, S. 83-96
D. Noble, OXSOFT HEART Manual, version 4.8
(Oxsoft Ltd., Oxford, 1997)
- [Ficker, 92] E. Ficker, U. Heinemann, **1992**
Slow and fast transient potassium currents in cultured rat hippocampal cells
J. Physiol (Lond.), **445**, S.431-455
- [Fromherz, 91] P. Fromherz, A. Offenhäusser, T. Vetter, J. Weis, **1991**,
A Neuron-Silicon Junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor,
Science, **252**, S. 1290-1293.
- [Fromherz, 93] P. Fromherz, C. O. Müller, R. Weis, **1993**,
Neuron Transistor: Electrical Transfer Function Measured by the Patch-Clamp Technique,
Phys. Rev. Lett., **71** (24), S. 4079-4082.
- [Fromherz, 99] P. Fromherz, **1999**
Extracellular recording with transistors and the distribution of ionic conductances in a cell membrane
Eur. Biophys. J., **28**, S. 254-258
- [Ginsborg, 91] B.L. Ginsborg, R.J. Martin, L. Patmore, **1991**
On the sodium and potassium currents of a human neuroblastoma cell line
J. Physiol. (Lond.), **434**, S. 121-149
- [Gross, 77] G. W. Gross, E. Rieske, G. W. Kreutzberg, A. Meyer, **1977**,
A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro,
Neurosci. Lett., **6**, S. 101-105.
- [Gross, 95] G. W. Gross, B. K. Rhoades, H. M. E. Azzazy, M.-C. Wu, **1995**,
The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors,
Biosensors & Bioelectronics, **10**, S. 553-567
- [Hamill, 81] O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sackman, F.J. Sigworth, **1981**
Improved patch-clamp techniques für high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches
Pflügers Archiv-European J. Physiol. **391**, 2, S. 85-100

- [Hämmerle, 94] H. Hämmerle, U. Egert, A. Mohr, W. Nisch, **1994**
Extracellular recording in neuronal networks with substrate integrated microelectrode arrays
Biosensors & Bioelectronics, **9**, S. 691-696
- [Hille, 92] B. Hille, **1992**
Ionic channels of excitable membranes, 2nd ed.
Sinauer Associates, Inc., Sunderland, USA
- [Hodgkin, 52] A.L. Hodgkin, A.F. Huxley, **1952**
A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve
J. Physiol., **117**, S. 500-544
- [Israel, 84] D. A. Israel, W. H. Barry, D. J. Edell, R. G. Mark, **1984**,
An array of microelectrodes to stimulate and record from cardiac cells in culture,
Am. J. Physiol., **247**, S. H669-H674.
- [Jenker, 97] M. Jenker, P. Fromherz, **1997**
Bistability of membrane conductance in cell Adhesion observed in a Neuron Transistor
Phys. Rev. Lett., **79**, 23, S. 4705-4708
- [Johansson, 94] S. Johansson, **1994**
Graded action potentials generated by differentiated human neuroblastoma cells
Acta. Physiol. Scand., **151**, S. 331-341
- [Klee, 97] R. Klee, C. Eder, E. Ficker, U. Heinemann, **1997**
Age-dependent variation in potassium sensitivity of A-currents in rat hippocampal neurons
Eur. J. Neurosci., **9**, S. 1970-1976
- [Krause, 2000 a] M. Krause, S. Ingebrandt, D. Richter, M. Denyer, M. Scholl, C. Sprössler, A. Offenhäusser, **2000**
Extended gate electrode arrays for extracellular signal recordings
Sensors and Actuators B, im Druck
- [Krause, 2000 b] M. Krause, S. Ingebrandt, C. Klein, A. Offenhäusser, **2000**
Neuron-transistor coupling characterized by voltage-clamp method
Physical Review eingereicht
- [Korn, 91] S. J. Korn, A. Marty, J. A. Connor, R. Horn, **1991**
Perforated Patch Recording
J. Methods in Neurosci., **4**, S. 364-373

- [Köhler, 98] R. Köhler, G. Schönfelder, H. Hopp, A. Distler, J. Hoyer **1998**
Strech-activated cation channel in human umbilical vein endothelium in normal pregnancy and in preeclampsia
J. of Hypertension, **16**, 8, S. 1149-1156
- [Lau, 95] J.H. Lau, **1995**
FLIP CHIP Technologie
McGraw-Hill, New York, S. 223
- [Löcherer, 92] K.-H. Löcherer, **1992**
Halbleiterbauelemente
B.G. Teubner Stuttgart
- [Müller, 87] R. Müller, **1987**,
Bauelemente der Halbleiter-Elektronik,
Halbleiter-Elektronik, **2**, 3. Aufl.,
Springer Verlag, Berlin.
- [Müller, 90] R. Müller, **1990**,
Rauschen,
Halbleiter-Elektronik, **15**, 2. Aufl.,
Springer Verlag, Berlin.
- [Neher, 76] E. Neher, B. Sakman, **1976**,
Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres,
Nature, **260**, S. 799-802.
- [Nisch, 94] W. Nisch, J. Böck, U. Egert, H. Hämmerle, A. Mohr, **1994**
A thin film microelectrode array for monitoring extracellular neuronal activity in vitro
Biosensors & Bioelectronics, **9**, S. 737-741
- [Offenhäusser, 95] A. Offenhäusser, J. Rühle, W. Knoll, **1995**,
Neuronal cells cultured on modified microelectronic device surfaces,
J. Vac. Sci. Technol. A, **13**, S. 2606-2612.
- [Offenhäusser, 97b] A. Offenhäusser, C. Sprössler, M. Matsuzawa, W. Knoll, **1997**,
Field-Effect Transistor Array for Monitoring Electrical Activity from Mammalian Neurons in Culture,
Biosensors & Bioelectronics, **12**, 8, S. 819-826
- [Pickard, 79] R. S. Pickard, **1979**,
A review of printed circuit microelectrodes and their production,
J. Neurosci. Meth., **1**, S. 301-318.
- [Rae, 91] J. Rae, K. Cooper, P. Gates, M. Watsky, **1991**
Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B.
J. Neurosci. Methods, **37**, S. 15-26

- [Sakmann, 95] B. Sakmann, E. Neher, **1995**,
Single-channel recording, 2.Aufl.,
Plenum Press, New York.
- [Schätzthauer, 98] R. Schätzthauer, P. Fromherz, **1998**
Neuron-junction with voltage-gated ionic currents
Eur. J. Neurosci., **10**, S. 1956-1962
- [Shrier, 86] A. Shrier, J.R. Clay, **1986**
*Repolarisation currents in embryonic chick atrial heart
cell aggregates*
Biophys. J., **50**, S. 861-874
- [Sprössler, 97] C. Sprössler, **1997**
*Extrazelluläre Signalableitung durch ein Sensorfeld
mit Feldeffekttransistoren*
Dissertation, Cuvillier Verlag, Göttingen
- [Sprössler, 98] C. Sprössler, D. Richter, M. Denyer, A. Offenhäusser, **1997**
*Long-term recording system based on field-effect
transistor arrays for monitoring electrogenic cells in culture*
Biosensors & Bioelectronics, **13**, S. 613-618
- [Sprössler, 99] C. Sprössler, M. Denyer, S. Britland, W. Knoll,
A. Offenhäusser, **1999**
*Electrical recordings from rat cardiac muscle cells using
field-effect transistors.*
Physical Review E, **60**, 2, S. 2171-2176
- [Sprössler, 2000] C. Sprössler, M. Scholl, M.C. Denyer, M. Krause,
K. Nakajima, W. Knoll, A. Offenhäusser
*Model network architectures in vitro on extrazellular
recording systems using microcontact printing*
Synth. Meth., im Druck
- [Storm, 90] J.F. Storm, **1990**
Potassium currents in hippocampal pyramidal cells
Prog. Brain Research, **83**, S. 161-187
- [Sze, 85] S. M. Sze, **1985**
Semiconductor Devices, Physics and Technology,
John Wiley & Sons, New York.
- [Tholl, 76] H. Tholl, **1976**
Bauelemente der Halbleiterelektronik Teil 1
B.G. Teubner Stuttgart
- [Tholl, 78] H. Tholl, **1978**
Bauelemente der Halbleiterelektronik Teil 2
B.G. Teubner Stuttgart

- [Toselli, 91] M. Toselli, S. Masetto, P. Rossi, V. Taglietti, **1991**
Characterization of a Voltage-dependent Calcium Current in the Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y During In Vitro Differentiation
Eur. J. Neurosci., **3**, S. 514-522
- [Toselli, 96] M. Toselli, P. Tosetti, V. Taglietti, **1996**
Functional Changes in Sodium Conductances in the Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y During In Vitro Differentiation
J. Neurophysiol., **76**, 6, S. 3920-3927
- [Tosetti, 98] P. Tosetti, V. Taglietti, M. Toselli, **1998**
Functional Changes in Potassium Conductances of human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y During In Vitro Differentiation
J. Neurophysiol., **79**, 2, S. 648-658
- [Vassanelli, 99] S. Vassanelli, P. Fromherz, **1999**
Transistor probes local potassium conductances in the adhesion region of cultured rat hippocampal neurons
J. Neurosci., 19, **16**, S. 6767-6773
- [Weis, 97] R. Weis, P. Fromherz, **1997**,
Frequency dependent signal transfer in neuron transistors,
Phys. Rev. E, **55** (1), S. 877-889.

Lebenslauf

	Michael Wolfgang Krause
geboren	08. April 1969 in Kaiserslautern
wohnhaft	Ringstraße 11 67705 Trippstadt
1975-1979	Grundschule Trippstadt
1979-1988	Staatliche Integrierte Gesamtschule Kaiserslautern-Süd
1988-1996	Studium der Physik an der Universität Kaiserslautern
1994-1995	Diplomarbeit im Institut für Oberflächen- und Schicht- analytik (IFOS) an der Universität Kaiserslautern
9.1996-6.1997	Grundwehrdienst an der Fachschule für Elektrotechnik an der Technischen Schule der Luftwaffe in Kaufbeuren
11.1997-7.2000	Doktorand im Arbeitskreis Materialwissenschaften am Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz
10.1998-12.1998	Gastwissenschaftler am Institute for Physical and Chemical Research (RIKEN), Wako (Tokio, Japan)

Danksagung

Zum Ende meiner Arbeit möchte ich mich bei allen bedanken, die mir die Voraussetzung zur Promotion gegeben haben um mich bei meiner wissenschaftlichen Arbeit begleitet haben. Mein ganz besonderer Dank gilt...

... Prof. Dr. W. Knoll für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, auf einem so zukunftssträchtigen Gebiet zu arbeiten.

... Dr. A. Offenhäusser für seine engagierte und freundschaftliche Betreuung in dieser fächerübergreifenden Materie und den vielen motivierenden Diskussionen zu meiner Arbeit.

... Prof. Dr. H.-J. Butt für sein Interesse an meiner wissenschaftlichen Tätigkeit sowie der Vertretung meiner Arbeit vor dem Fachbereich Chemie und Pharmazie an der Universität Mainz, sowie Prof. Dr. H. Decker für die Möglichkeit der Präsentation meiner Arbeit im Fachbereich Biologie an der Universität Mainz.

... Prof. Dr. A. Maelicke, Dr. M. Scholl und Dr. C. Klein vom Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie an der Universität Mainz für die sehr gute Kooperation bei allen Fragen der Zellkultivierung.

... Dr. M. Scholl, für die Präparation der hippocampalen Neuronen, T. M. Siepchen und J. Hayashi für die Kardiomyozyten-Präparation und A. Kosan und M. Hemmerlein für die Kultivierung der beiden Zell-Linien.

... Dr. C. Sprössler und S. Ingebrandt für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

... den Mitarbeitern der mechanischen und elektronischen Werkstätten, besonders Herrn Richter, Herrn Müller und Herrn Christ für ihre schnelle, engagierte und qualifizierte Hilfe.

... W. Staab und den Mitarbeitern des Instituts für Mikrotechnik Mainz (IMM) für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Herstellung der FETs und EGEs.

... H. Wieder für die unterstützende Arbeit bei der Impedanzmessung.

... den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Exotic Nano Materials in Japan für die Gastfreundlichkeit und die Einführung in den japanischen Lebensstil.

... und natürlich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe.

